

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Biologická aktivita sekundárních metabolitů rostlin IV. Alkaloidy *Vinca minor* L.

Biological activity of secondary plants metabolites IV. Alkaloids of *Vinca minor* L.

Vedoucí katedry: Doc. Ing. Lucie Cahlíková, PhD.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Miroslav Ločárek

Hradec Králové, 2016

Aneta Vítovcová

PROHLÁŠENÍ

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

v Hradci Králové, 2016

.....
podpis

Ráda bych poděkovala Ing. Miroslavu Ločárkovi za odborné vedení této diplomové práce. Za vstřícnost, obětovaný čas, pomoc a trpělivost při mé práci v laboratoři a za změření MS spekter. Děkuji za cenné rady a připomínky k sepsání diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat Prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za stanovení anticholinesterázových aktivit izolovaných alkaloidů a všem dalším pracovníkům katedry farmaceutické botaniky a ekologie za pozitivní přístup a pomoc při práci v laboratoři.

Tato diplomová práce byla zpracována s podporou projektu SVV 260 292.

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1 ÚVOD.....	6
2 CÍL PRÁCE	8
3 TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1 Alzheimerova choroba.....	9
3.1.1 Klinický obraz	9
3.1.2 Etiologie	10
3.1.3 Farmakologická léčba	12
3.2 <i>Vinca minor</i> L.....	21
3.2.1 Taxonomické zařazení	21
3.2.2 Botanická charakteristika	21
3.2.3 Obsahové látky.....	24
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
4.1 Všeobecné postupy	33
4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel.....	33
4.1.2 Odpařování extraktů	33
4.1.3 Příprava litých desek na preparativní TLC	33
4.1.4 Detekce alkaloidů	33
4.1.5 Flash chromatografie.....	33
4.2 Izolace alkaloidů	34
4.2.1 Použitý materiál a vybavení pro izolaci	34
4.2.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu	36
4.2.3 Sloupcová chromatografie.....	37
4.2.4 Separace alkaloidů z vybraných frakcí.....	38
4.3 Strukturní analýza	39
4.3.1 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů	39
4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE	40
4.4.1 Použitý materiál, chemikálie.....	40
4.4.2 Přístroj použitý pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity	40

4.4.3	Příprava erythrocytárních pouzder	40
4.4.4	Podmínky měření	41
4.4.5	Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC ₅₀).....	41
5	VÝSLEDKY.....	43
5.1	Strukturní analýza	43
5.1.1	(+)-vinkaminorin (AV-1)	43
5.1.2	Vinkorin (AV-2).....	44
5.2	Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů	46
6	DISKUSE.....	47
7	ZÁVĚR	48
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	49

Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova demence
ADINACO	Alzheimer's disease and natural compounds
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
AChEi	Inhibitor acetylcholinesterázy
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidový prekurzorový protein
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CNS	Centrální nervová soustava
CYP	Cytochrom P
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
GC/MS	plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie
GIT	Gastrointestinální
IC	Inhibiční koncentrace
IChE	Inhibitory cholinesteráz
7-MEOTA	7-methoxytakrin
MIAs	Monoterpenické idnolové alkaloidy
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát

1 Úvod

Tato práce je součástí výzkumu katedry farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy, kde působí výzkumná skupina ADINACO. Skupina ADINACO se zabývá studiem látek přírodní povahy, které mohou být potenciálními léčivy Alzheimerovy demence (AD).

Demence je a vždy byla velkým sociálním problémem. Lidé trpící demencí v období do 16. století byli považováni za blázny. Rodina se těchto nemocných vzdala a oni se tak často ocitali na ulici a v chudobincích. Postupem času se situace zlepšovala. V 16. století začala být demence brána jako onemocnění. Ne však jako onemocnění mozku, ale spíše jako porucha chování. Na přelomu 18. a 19. století byly zřízeny psychiatrické léčebny, kde byli tito nemocní chráněni před okolním světem. Začali se zde i léčit a od roku 1950 se těmto nemocným podávaly psychotropní léky.

AD jako taková byla objevena a popsána v roce 1906 německým neuropatologem a psychiatrem Aloisem Alzheimerem. Ten poprvé AD objevil u pacientky Auguste D., která byla v roce 1901 přijata do nemocnice pro duševně choré a epileptiky v německém Frankfurtu. Tato pacientka již několik let trpěla ztrátou paměti, nespavostí, neklidem a postupně již nebyla schopna fyzické ani duševní práce. Po její smrti mohl Alzheimer zkoumat její mozek a popsat tak jeho změny¹.

V současné době patří AD mezi onemocnění, které postihuje mozek lidí především ve středním a vyšším věku. AD tvoří asi 65 – 75 % všech demencí. Obecně lze říci, že incidence AD je zhruba 1 případ na 100 obyvatel za rok u lidí ve věku 70 – 80 let, po 80. roce už jsou to na 100 obyvatel případy 2².

Podle výše uvedeného je zřejmé, že AD je velkým problémem populace, která díky pokrokům moderní medicíny více stárne. Terapie AD je pouze symptomatická, protože stále ještě neznáme přesnou etiologii nemoci. V současnosti využíváme především inhibitory

acetylcholinesterázy (AChEi), které blokací cholinesteráz zvyšují nabídku acetylcholinu (ACh) k vazbě na receptory. Podle cholinergní hypotézy souvisí pokles hladiny ACh s projevy AD. Symptomatická léčba může zmírnit projevy nemoci, zpomalit její progresi, ale ne ji zcela zastavit. Stále tedy hledáme nová potencionální léčiva a to i v oblasti přírodních zdrojů.

Čeleď Apocynaceae je velmi důležitou čeledí, která zahrnuje řadu lékařsky užitkových rostlin. Rostliny patřící do této čeledi jsou zdrojem různých alkaloidů, z nichž některé nacházejí uplatnění v klinické praxi.

Alkaloidem je biologicky aktivní heterocyklická sloučenina, která obsahuje dusík a většinou prokazuje farmakologické účinky. Jsou to bezbarvé krystalické látky, hořké chuti málo rozpustné ve vodě, ale velmi dobře rozpustné v etanolu, chloroformu, benzenu a etheru. Díky svému bazickému charakteru mají schopnost tvořit ve vodě rozpustné soli.

Farmaceutickému průmyslu se podařilo izolování alkaloidů, které se nyní používají k terapii různých nemocí. Došlo například k vývoji antimalarických činidel (chinin, chlorchinin), látek podporujících prokrvení mozku (vinkamin) nebo látek působících protinádorově (taxol, vinblastin, vinkristin).

Druhy alkaloidů patřící do čeledi Apocynaceae jsou odvozeny od aminokyseliny L-tryptofanu. Alkaloidy, které jsou v rostlinách rodu *Vinca* např: ajmalicin, katarantin, vindolin, vinblastin, vindesin, vinkristin a další, se uplatňují především v léčbě nádorových onemocnění, dále se používají také jako antihypertenziva, adstringentia a mají antibakteriální účinky³.

Dle výše uvedeného lze soudit, že *Vinca* alkaloidy mohou mít ještě další nezjištěné farmakologické účinky. Proto je třeba jim věnovat větší pozornost a zkusit vyizolovat alkaloidy, které nám pomohou vyřešit další problémy.

2 Cíl práce

Cíle diplomové práce:

1. Izolace alkaloidů z vybrané frakce získané ze sumárního alkaloidního extraktu z *Vinca minor* L. za použití chromatografických metod
2. GC/MS analýza alkaloidních extraktů a identifikace alkaloidů
3. Stanovení biologické aktivity alkaloidních extraktů, případně čistých alkaloidů
4. Vypracování literární rešerše

3 Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

V dnešní době neustále přibývá pacientů s demencí. Alzheimerova demence patří mezi 10 nejčastějších příčin úmrtí⁴. Stala se také jednou z hlavních priorit Evropského parlamentu, kdy poslanci přijali prohlášení, kterým žádají spojení sil ve vědě a výzkumu, aby tato nemoc mohla být dříve diagnostikována a včas léčena účinnějšími medikamenty⁵.

Alzheimerovu chorobu poprvé popsal Alois Alzheimer v roce 1906 na přednášce v Tübingenu, v roce 1907 dostává tato choroba jeho jméno⁶.

Nemocí, která je doprovázena degenerativními změnami v mozku a tvorbou patologických bílkovin, trpí hlavně lidé nad 65let. V Americe jsou tímto onemocněním postižené více jak 4 miliony pacientů⁷.

3.1.1 Klinický obraz

Počátky onemocnění jsou nejprve pro okolí nenápadné, ale postižený si je začíná brzy uvědomovat, avšak většinou se za své problémy stydí, proto trvá déle, než se onemocnění začne řešit. Nejdříve je důležité odlišit AD od benigní stařecké zapomnětlivosti. Nemoc tedy začíná poruchami novopaměti, neschopností pamatovat si a učit se, výkyvy nálad a změnou osobnosti⁸. V řeči jsou problémy s vybavováním slov, často dochází k nepochopení humoru a pacient působí zpomaleně a nechápavě⁹. Přechodně bývá problém i s časoprostorovou orientací. U nemocných se začínají projevovat emoce, které v životě skrývali nebo se je snažili korigovat, např.: zlost, nepřátelství, vznětlivost.

V další fázi, tj. středně těžká demence, se prohlubují potíže první (časné) fáze⁸. Je zde závažné postižení paměti, nemocný zapomíná témata a je bez empatií ke společnosti⁹. V této fázi se nemocný o sebe nedokáže postarat, potřebuje pomoc při základních denních činnostech (jídlo, oblékání, WC). Zcela ztratí vnímání časoprostoru.

V terminální fázi je nemocný již zcela závislý na okolí, dochází k rozkladu osobnosti. Nemocný ztrácí paměť i řeč, je imobilní, inkontinentní a hrozí zde nebezpečí imobilizačního syndromu (pády, pneumonie, dekubity). V této poslední fázi je nemocný většinou umístěn do ústavu péče.

Doba přežití je průměrně 7let (2 až 20 let) od stanovení diagnózy⁸.

3.1.2 Etiologie

Příčina tohoto onemocnění není přesně známa, studují se proto různé mechanismy vzniku AD (genetické, metabolické, infekční a toxické), s kterými souvisí i neuropatologické nálezy.

3.1.2.1 Cholinergní hypotéza

Tato hypotéza je první teorií vzniku AD. Zabývá se hledáním souvislosti mezi poklesem hladiny acetylcholinu a projevy AD. Za úbytek ACh může snížení aktivity enzymu cholinacetyltransferázy, která v organismu ACh syntetizuje. Rozklad ACh v synapsích ovlivňuje acetylcholinesteráza (AChE). Na základě tohoto zjištění byly do léčby AD zařazeny inhibitory acetylcholinesterázy¹⁰.

3.1.2.2 Produkce patologických proteinů

Tvorba patologických proteinů je hlavním nálezem u AD. Důležitým degenerativním proteinem je β -amyloid. Tento protein se v mozku objevuje v průběhu stárnutí a Alzheimerovy nemoci. Najdeme ho především v senilních plakách, cévních stěnách nebo leptomeninx. Polymerizovaný β -amyloid tvoří v alzheimerovských plakách drúzy, okolo kterých se tvoří gliový lem (odumřelé neurony). Zdrojem amyloidu je amyloidový prekurzorový protein (APP), který má několik forem. APP je štěpen α -sekretázou na části o velikosti do 40 aminokyselin. Za patologických podmínek se ke štěpení APP kromě α -sekretázy přidávají i β - a γ -sekretázy, které APP štěpí na jiných místech. V jádrech senilních plak jsou tedy amyloidové uloženiny obsahující peptidy, které tvoří 42 až 43 aminokyselin. β -amyloid, který je tvořen 42 aminokyselinami, se účastní už rané fáze vývoje AD^{11,12}.

U nemocných s genetickou predispozicí je toto patologické štěpení APP podmíněno mutacemi. Vzniklé atypické fragmenty APP již nejsou solubilní a začnou vytvářet oligomery, které jsou neurotoxické. Tyto oligomery v kortexu koagulují a polymerují a dochází tedy ke vzniku β -amyloidu.

Další příčinou AD je zřejmě nadměrná fosforylace τ -proteinu neuronových mikrotubulů¹¹. Fyziologickou funkcí τ -proteinu je zajišťování struktury a stability mikrotubulů v neuronech¹³. Hyperfosforylovaný τ -protein vede k polymeraci neurálních tubulů. Degenerovaný τ -protein je základem tangles (neurofibrilární uzlíčky). Hyperfosforylaci τ -proteinu spouští některé proteinkinázy (glykogensyntázakináza-3 β). Aktivaci těchto enzymů zřejmě spouští β -amyloid. Takto zasažené neurony potom zanikají.

Z degenerativních proteinů je zřejmě primární β -amyloid, který dále svou toxicitou způsobí degradaci τ -proteinu¹¹.

3.1.2.3 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je tvořen 299 aminokyselinami. Je to látka tělu vlastní, která slouží například k transportu cholesterolu. V roce 1991 bylo objeveno, že senilní plaky i angiopatické cévy jsou označovány protilátkami proti ApoE¹².

ApoE je známý ve třech isoformách E2, E3, a E4, které se liší jen dvěma aminokyselinami. Isoforma ApoE3 se vyskytuje u většiny populace (77-78 %), oproti tomu isoforma ApoE2 je vzácná a ApoE4 se vyskytuje u 16-17 % populace. U lidí s AD se isoforma ApoE4 vyskytuje s větší frekvencí než u lidí, kteří touto nemocí netrpí. Lidé homozygotní v alelách E4 inklinují podstatně více ke vzniku AD než lidé, kteří jsou heterozygoti anebo alelu E4 vůbec nemají. Tito lidé většinou i AD onemocní dříve než ostatní. Zvláštním zjištěním je to, že lidé trpící AD a vlastníci alely E4, mají průběh AD méně agresivní než ti, kteří nosiči alely E4 nejsou.

Při vyšetřování imunohistochemicky obarvených plak byly zjištěny jisté rozdíly mezi uloženinami ApoE a β -amyloidu. Uloženiny ApoE se objevují na periferii uloženin β -amyloidu. V některých uloženinách však ApoE není a to především ve zralých plakách s amyloidovým jádrem. Z toho tedy vyplývá předpoklad, že k ukládání β -amyloidu zřejmě dochází až po

ukládání ApoE. Je však možné, že tato skutečnost nemá žádný patogenetický význam. β -amyloid je totiž absorbentem mnoha proteinů, které byly nalezeny v jádrech senilních plak, avšak není prokázáno, zda tyto proteiny mají ve vývoji AD nějaký patogenetický význam. Imunohistochemicky byl ApoE prokázán i v neuronálních klubkách¹².

Apo E4 není nezbytným faktorem pro vznik AD, je to pouze faktor rizikový¹¹.

3.1.2.4 Oxidační stres a volné radikály

Teorie o patogenezi AD mají mnoho společného. β -amyloid má zřejmě schopnost způsobovat oxidační stres a také se předpokládá, že se β -amyloid ve tkáni tvoří jako odpověď na oxidační stres již probíhající, protože v menších koncentracích má účinky antioxidační. β -amyloid má také vysokou afinitu ke kovovým iontům, které jsou velkým zdrojem oxidačního stresu¹³. V mozcích pacientů s AD je zvýšené množství železa, rtuti a hliníku¹².

V místě poškození tkáně nebo zánětu se tvoří reaktivní formy kyslíku, které fungují jako signální molekuly, ale ve vysokých koncentracích buňku poškodí a mohou způsobit i buněčnou smrt. Volné radikály, které způsobují oxidační stres a uplatňují se při AD, jsou většinou produkty oxidační fosforylace v mitochondriích¹³. Reakce volných radikálů mohou kriticky poškozovat významné molekuly jako je např. DNA, buněčné proteiny a lipidy buněčných membrán¹².

Mitochondrie mají v patogenezi AD zřejmě důležitou roli. Mitochondrie jsou hlavním intracelulárním zdrojem reaktivních forem kyslíku, ale zároveň jsou velmi náchylné k oxidačnímu poškození a také k poškození β -amyloidem a hyperfosforylovaným τ -proteinem. Bylo zjištěno, že v mozku pacienta trpícího AD je snížené využívání glukózy, které může být způsobeno selháním funkce mitochondrií¹³.

3.1.3 Farmakologická léčba

Kauzální a dostatečně účinná léčba dosud není k dispozici z důvodu ne zcela známé etiopatogeneze AD¹⁴. Používáme proto kognitivní terapii, která zlepšuje nebo alespoň na nějaký čas stabilizuje průběh choroby¹¹.

Terapie AD má být komplexní. Proto zahrnuje více léčebných postupů (farmakoterapie, psychosocioterapie, léčba interkurentních onemocnění, rehabilitace, práce s rodinou a dalšími pečovateli nemocného)¹².

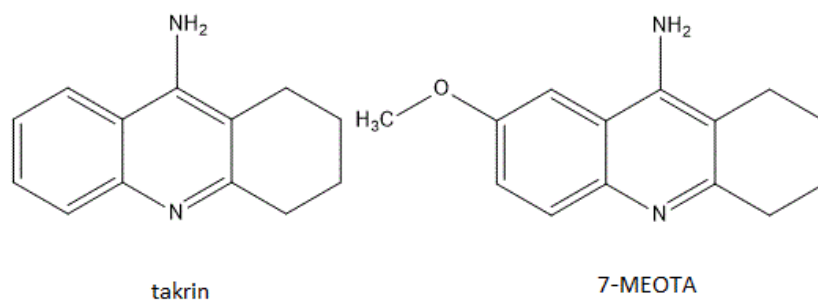
Současná léčba AD je prezentována dvěma skupinami látek:

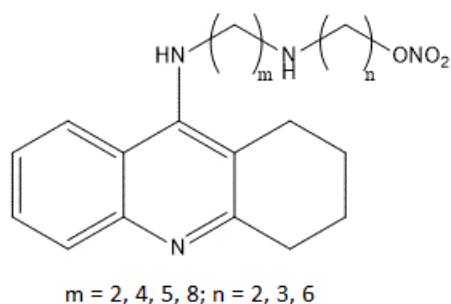
- Inhibitory acetylcholinesterázy
- Inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových receptorů

3.1.3.1 Inhibitory acetylcholinesterázy

AChE je enzym, který odbourává ACh v centrální nervové soustavě (CNS), na periférii je odbouráván i enzymem butyrylcholinesterázou (BuChE), jejíž množství se při AD neúměrně zvyšuje. ACh je těmito esterázami rozkládán na cholin a kyselinu octovou. Cholin se pak reuptakem vrací do presynaptického oddílu neuronu, kde z něj opět vzniká ACh¹⁵. Zablokováním cholinesteráz dojde ke zvýšení nabídky ACh k vazbě na muskarinové a nikotinové receptory^{13,14}.

AChEi v dnešní době představují hlavní terapeutický přístup k léčbě lehkých až středně těžkých fází AD. Můžeme je rozdělit do dvou generací. První generaci představuje takrin, u kterého byla zjištěna určitá hepatotoxicita, a proto byl stažen z trhu. Objevují se však nové netoxické deriváty takrinu, jako je u nás vyvinutý 7-methoxytakrin (7-MEOTA) nebo sloučeniny takrinu s oxidem dusnatým (Obr. 1)





hybridy takrinu a oxidu dusnatého

Obr. 1: Struktura takrinu a jeho derivátů

Do druhé generace AChEi řadíme méně toxický donepezil, rivastigmin a galantamin¹⁶. Prvním v této generaci byl fyzostigmin, který se používá už jen experimentálně. Nevýhodou je jeho krátký poločas, nežádoucí účinky a velmi těžko se zde hledá terapeutické okno. Prodlužováním postranního řetězce fyzostigminu došlo k objevení rivastigminu, který se v současnosti běžně používá¹².

AChEi zpomalují průběh choroby, oddalují vznik těžkých stádií, ale nejsou schopny AD vyléčit nebo trvale zamezit progresi onemocnění. Mohou zlepšit kvalitu života nemocných, jejich pečovateli a dalších blízkých. U každého pacienta však nemusí být účinné. Pokud jeden inhibitor mozkových cholinesteráz nezabírá, přecházíme na inhibitor druhý, nejdříve však po půl roce podávání. Na AChEi příznivě reaguje 70 % pacientů.

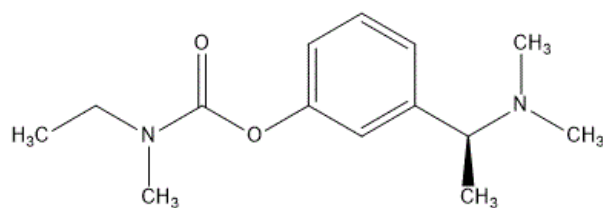
Nejčastějšími nežádoucími účinky AChEi jsou gastrointestinální příznaky (zvracení, nauzea, nechutenství), někdy také bolesti hlavy a křeče¹⁵.

Rivastigmin

Rivastigmin (Obr. 2) je látka karbamátového typu a v průběhu inhibice AChE reverzibilně inhibuje místo kyseliny karbamové. Rivastigmin je odvozen od fyzostigminu, má terciární aminoskupinu, kterou je umožněn jeho průnik přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a pak snadno působí v CNS. Pro zvýšení rozpustnosti se používá ve formě soli (tartrát). Přítomnost této látky v plazmě je kratší než doba, po kterou má schopnost odbourávat cholinesterázy, s jinými léčivy proto tolik neinteraguje a je v tomto směru velmi bezpečný. Rivastigmin blokuje mozkové AChE i BuChE.

Při léčbě rivastigminem je nutno dávku titrovat. Perorálně se podává 2× denně 1 kapsle: první měsíc 2× 1,5 mg, druhý měsíc 2× 3,0 mg, třetí měsíc 2× 4,5 mg a od čtvrtého měsíce 2× 6,0 mg.

Rivastigmin jako kompetitivní AChEi má vedlejší gastrointestinální (GIT) účinky, které lze minimalizovat transdermálním podáním ve formě náplastí. Tato léková forma se využívá při intoleranci formy perorální. Dávka je titrována i náplastmi: první měsíc se uvolňuje 5 mg rivastigminu/den, další měsíce 10 mg/den. Léčba rivastigminem je vhodná především pro demence s poruchami chování a přidruženými psychotickými příznaky^{10,15}.



rivastigmin

Obr. 2: Vzorec rivastigminu

Galantamin

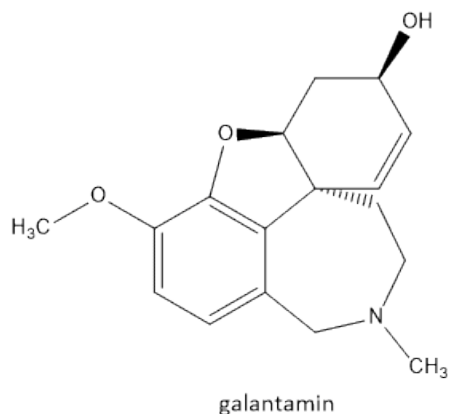
Galantamin (Obr. 3) je alkaloid, který byl poprvé syntetizován ze sněženky (*Galanthus woronowii*), dnes se získává i z *Narcissus spp.* nebo *Leucojum aestivium*, využívá se i jeho syntetická výroba.

Galantamin dobře inhibuje AChE, ale je velmi málo účinný vůči BuChE. Má dva mechanismy účinku. Kromě selektivní inhibice AChE také alostericky moduluje nikotinové receptory, zvyšuje tak presynaptické uvolňování ACh a postsynaptický přenos nervových vzruchů¹⁷. Působí příznivě na omezení tvorby alzheimerovských plak. Používá se u pacientů s lehkou až středně těžkou formou demence⁷.

Výhodou galantaminu je velmi dobré vstřebávání po perorálním podání. Pacienti by měli být poučeni, aby galantamin užívali po jídle, pak se sníží výskyt nežádoucích GIT účinků. Tyto nežádoucí účinky se objevují především na začátku léčby, při titraci dávek¹⁸. Podává se ve formě retardovaných nebo neretardovaných tablet. Neretardované tablety se užívají 2× 4 mg/den první měsíc, 2× 8 mg/den druhý měsíc a 2× 24 mg/den po zbytek léčby. Pokud

pacient užívá retardované tablety, užívá dvojnásobnou dávku podle předchozího modelu 1× denně¹⁵.

Obr. 3: Vzorec galantaminu

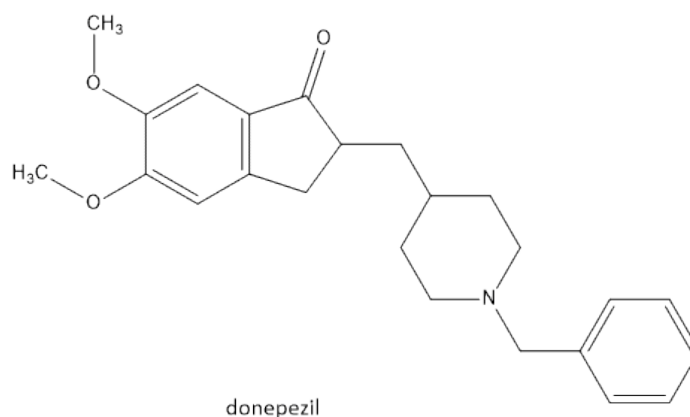


Donepezil

Donepezil (Obr. 4) se řadí mezi preferenční AChEi a je nejúčinnějším centrálním AChEi. Dále brání ukládání amyloidních plak, má antioxidační vlastnosti a celkově působí neuroprotektivně. Kompetitivně inhibuje AChE, ale téměř neovlivňuje BuChE, kromě toho aktivuje specifické nikotinové receptory. Dále bylo objeveno, že zlepšuje mozkovou mikrocirkulaci aktivací muskarinových receptorů^{10,15}.

Donepezil je piperidinový derivát s dlouhým poločasem vylučování (více než 70 hodin). Vzhledem k dlouhému poločasu se používá 1× denně 5 mg, při dobré toleranci 1× denně 10 mg. Při užívání donepezilu musíme dávat pozor na lékové interakce. Donepezil je metabolizován pomocí CYP 3A4 a CYP 2D6. Musíme proto dávat pozor na současné užívání s léky blokující CYP 3A4 (erytromycin, ketokonazol, diltiazem) a léky blokující CYP 2D6 (amiodaron, chinidin, propafenon, fluoxetin, paroxetin), jinak by mohlo dojít k nežádoucímu zvýšení plazmatických hladin donepezilu. Snížit plazmatické hladiny donepezilu a tím i jeho účinek mohou naopak induktory CYP 3A4 (karbamazepin, fenobarbital, fenytoin). Kontraindikací donepezilu je aktivní gastroduodenální vředová choroba a těžší poruchy převodního systému srdce.

Na základě klinických studií v USA bylo zjištěno, že donepezil působí i na těžší formy AD¹⁵.

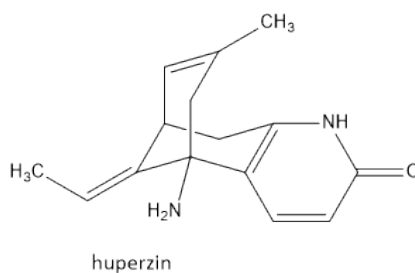


Obr. 4: Vzorec donepezilu

Huperzin A

V Číně je huperzin (Obr. 5) registrován jako přípravek na léčbu AD. Huperzin byl získán z plavuně *Huperzia serrata*. Západní medicína zatím jeho účinky při léčbě AD odmítá, ale mnoho studií již potvrzuje jeho pozitivní působení⁷.

Mechanismem účinku je centrální reverzibilní inhibice AChE. Tento alkaloid je neuroprotektivní, má schopnost zmírnit oxidační stres, reguluje expresi apoptických proteinů a zabraňuje i buněčné smrti mitochondrií. Tato látka je opticky aktivní a účinná je pouze v levotočivé formě. Huperzin snadno prochází HEB a zvyšuje hladiny ACh v mozku. Při používání huperzinu se objevuje menší množství nežádoucích účinků než u již používaných AChEi^{19,7}.



Obr. 5: Vzorec huperzinu

3.1.3.2 Inhibitory *N*-methyl-D-aspartátových receptorů (NMDA)

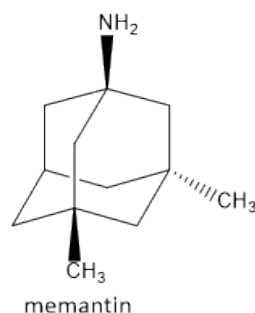
V pokročilejších stádiích AD se nadměrně uvolňuje glutamát a v postižených oblastech se snižuje jeho zpětné vychytávání, to způsobí přesycení glutamátergních receptorů. Dostatečný výdej glutamátu je důležitý pro paměť a učení. Nadměrným přísunem glutamátu pro NMDA receptor je narušen jeho metabolismus dlouhodobé potenciace, který slouží pro učení a paměť. Důsledkem nadměrné stimulace NMDA receptorů je nadměrný vstup kalcia do neuronů, čímž dojde k destabilizaci jejich prostředí a nakonec k apoptóze. Proto v terapii AD využíváme antagonistů NMDA receptorů¹⁵.

Memantin

Memantin (Obr. 6) je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Působí navázáním se uvnitř kanálu NMDA receptorů, tím zabrání jejich aktivaci. Příčinou aktivace NMDA receptorů je zvýšená hladina glutamátové kyseliny, která je při AD přítomna v CNS.

Memantin se díky svým neuroprotektivním účinkům využívá i v terapii Parkinsonovy choroby a traumat CNS¹⁰, pozitivně ovlivňuje i chování pacientů s AD. Obvykle je velmi dobře tolerován, u některých pacientů může dojít k nežádoucí excitaci nebo k přechodným halucinacím. Dávka se musí titrovat, začíná se 5 mg/den a každý týden se přidá 5 mg. Terapeutická dávka je 20 mg/den a to buď v dávce jedné, nebo ve 2 stejných denních dávkách.

V současnosti se osvědčila terapie pomocí kombinace memantinu a AChEi. Jedinou její nevýhodou je finanční náročnost¹⁵.



Obr. 6: Vzorec memantinu

3.1.3.3 Neuroprotektiva

Neuroprotektiva jsou látky, které chrání nervové buňky a jejich funkce před poškozením. V posledních letech se začalo hojně využívat přírodních látek rostlinného původu. Mnoho studií potvrzuje pozitivní působení těchto přípravků na kognitivní funkce. V současnosti se využívá především vinpocetin, *Ginkgo biloba* L., *Bacopa monniera* L. a další. Užívání těchto látek zlepšuje léčbu a průběh neurodegenerativních onemocnění.

Vinpocetin

Vinpocetin je derivát vincaminu, který je izolován z barvíčku (*Vinca minor* L.) nebo břečťanu (*Hedera helix* L.). Používá se při léčbě demencí včetně AD, cerebrovaskulárních onemocnění a při neurodegenerativních onemocněních vaskulárního typu. Mechanismus účinku není známý. Předpokládá se, že bez ovlivnění periferní cirkulace zvyšuje průtok krve mozkiem a stimuluje jeho metabolismus. Další studie prokázaly, že vinpocetin je schopen chránit astrocyty před hypoxickým poškozením a jejich zničením. Toto působení způsobuje inhibice kaspasy 3 a zvýšení mitochondriálních funkcí⁷.

Vinpocetin má nízkou toxicitu a minimum nežádoucích účinků. V Evropě ho můžeme znát jako lék pod názvem Cavinton²⁰.

Ginkgo biloba

Standardizovaný extrakt z listů *Ginkgo biloba* (EGb 761) se používá jako doplněk léčby demencí, včetně AD a zejména různých typů vaskulárních demencí. Obsahuje směs účinných látek s různými mechanismy účinku (antiagregační a antioxidační působení, zlepšení neuronálního metabolismu), zlepšuje krevní tok v cévách a kapilárách. Pozitivní vliv má při mozkových poruchách spojených se ztrátou paměti, při problémech s koncentrací, při bolestech hlavy, závratích. Působí také jako prevence před vznikem depresí, chrání před vznikem trombóz.

Extrakt lze užívat samostatně anebo v kombinaci s AChEi nebo memantinem. Podle nedávné švýcarské studie je dokázáno, že standardizovaný extrakt je svými účinky srovnatelný s účinky

AChEi. Nyní se provádějí experimenty s preventivním podáváním preparátů, které by působily před možným vznikem AD^{7,21}.

3.2 *Vinca minor* L.

Český název: Barvínek menší, Brčál menší

3.2.1 Taxonomické zařazení²²

Oddělení:	Magnoliophyta
Třída:	Magnoliopsida
Podtřída:	Lamiidae
Řád:	Gentianales
Čeleď:	Apocynaceae
Rod:	<i>Vinca</i>
Druh:	<i>Vinca minor</i> L.

3.2.2 Botanická charakteristika

3.2.2.1 Čeleď Apocynaceae

♀ * K(5) [C(5-4) A5]G(2)

Obr. 7: Květní vzorec čeledi Apocynaceae

Do čeledi Apocynaceae (toješťovité) patří byliny, malé keře, stromy i liány. Výskyt těchto rostlin je převažující v tropech a subtropích. V pletivech toješťovitých se vyskytují mléčnice. Květy jsou barevné, pravidelné, květní obaly jsou rozlišené (koruna je tvořena čtyřmi až pěti srostlými lístky a je srostlá s andrecenem, kalich má pět volných lístků), květ je oboupohlavný (tyčinek je pět, pestík je srostlý ze dvou plodolistů, semeník je svrchní). Plodem může být tobolka, měchýřek, bobule nebo peckovice.

Obsahovými látkami této čeledi jsou kardioaktivní glykosidy, sekoiridoidní a irioidní monoterpeny, indolové alkaloidy a také polyterpeny rozptýlené v latexu²².

Toješťovité mají velké využití v tradiční medicíně. Používají se k léčbě horečky, bolesti, žaludečních a střevních onemocnění. U některých druhů bylo zjištěno, že mají protirakovinové

a antimalarické vlastností²³. Řadíme sem mnoho velmi významných a v klinické praxi využívaných druhů. Mezi hlavní zástupce patří *Catharanthus roseus*, *Carissa carandas*, *Vinca major*, *Rauvolfia serpentina*, *Tabernaemontana coronaria* a v neposlední řadě i *Vinca minor*²⁴.

3.2.2.2 Rod *Vinca*

Do tohoto rodu v současnosti řadíme asi 5 druhů²⁵ (Obr. 8, Obr. 9, Obr. 10): *Vinca difformis*, *Vinca erecta*, *Vinca herbacea*, *Vinca major* a *Vinca minor*, se kterým se můžeme setkat i v České republice. Mezi poslední nově objevené a zkoumané druhy patří *Vinca soneri* a *Vinca ispartensis*^{26, 27}.



Obr. 8: *Vinca minor*²⁸, *Vinca major*²⁹ (zleva)



Obr. 9: *Vinca difformis*³⁰, *Vinca herbacea*³¹ (zleva)



Obr. 10: *Vinca erecta*³², *Vinca ispartensis*³³, *Vinca soneri*³⁴(zleva)

Rod *Vinca* původně pochází z Evropy a západní Asie a postupně se dostával do dalších zemí světa. Tyto rostliny se vyskytují především jako polokeře nebo byliny na suchých místech nebo v listnatých lesích. Používají se pro své léčivé vlastnosti nebo jako dekorativní rostliny³⁵.

3.2.2.3 Druh *Vinca minor* L.

Vinca minor L. (Obr. 11) je stálezelený polokeř původem z jižní Evropy. Postupně se rozšířil do střední Evropy a Severní Ameriky³⁶. Je jediný z čeledi Apocynaceae, který volně roste i na území České republiky, často jako důsledek zplanění²².

Barvínek je 10-20 cm vysoká plazivá vytrvalá rostlina s na bázi zdřevnařující lodyhou. Rozrůstá se svými poléhavými oddenky a vytváří tak kompaktní plochy. Listy jsou tmavě zelené, kožovité, neopadavé, krátce řapíkaté, vstřícné, kopinaté až eliptické. Květy jsou jednotlivé, dlouze stopkaté, pravidelné, 5 čtne a oboupohlavné. Koruna většinou modrá, fialově modrá, někdy ale i růžová až bílá. Plodem jsou měchýřky. Kvetे převážně v jarním období, od března do června^{37,38}.

Rozmnožování probíhá především vegetativně oddenky. V populacích na sever od Alp se zřídka vyskytnou zralé plody a semena, ale poměr pohlavního a nepohlavního rozmnožování zatím nebyl molekulárně zkoumán³⁶.

Dobře roste na stinných místech, ale nevadí mu ani slunné prostředí, pokud má dostatečný příjem vláhy²⁴. U nás ho najdeme vysazovaný v zahradách a parcích jako půdopokryvnou rostlinu. Dále ho najdeme na hřbitovech, u kaplí a kostelů, na skalkách a jiných stinných místech³⁸.

Vinca minor L. je v ČR považován za bylinu jedovatou²². Obsahuje však látky, které se hojně využívají v léčitelství i lékařství. Historicky se užíval především jako adstringent při silném menstruačním krvácení, při krvácení dásní a ústních vředech, ale také k tlumení dráždivého kašle.

V tradiční medicíně se dnes využívá různě v různých částech světa. V Asii a Evropě se využívají jeho baktericidní vlastnosti, používá se také jako adstringent a collyrium. Uplatňuje se v léčbě průjmů a zažívacích potíží, hypertenze, posiluje mozkové funkce a paměť, působí sedativně, bývá užíván při cukrovce a kožních problémech²⁴.



Obr. 11: rostlina, větvíčka, porost *Vinca minor* L.²⁸

3.2.3 Obsahové látky

Mezi hlavní obsahové látky rostliny *Vinca minor* L. patří indolové alkaloidy (obsah asi 1,3 %), z dalších látek jsou to třísloviny, saponiny, pektin, hořčina vincin, flavonoidy a kyselina ursolová³⁹.

3.2.3.1 Indolové alkaloidy

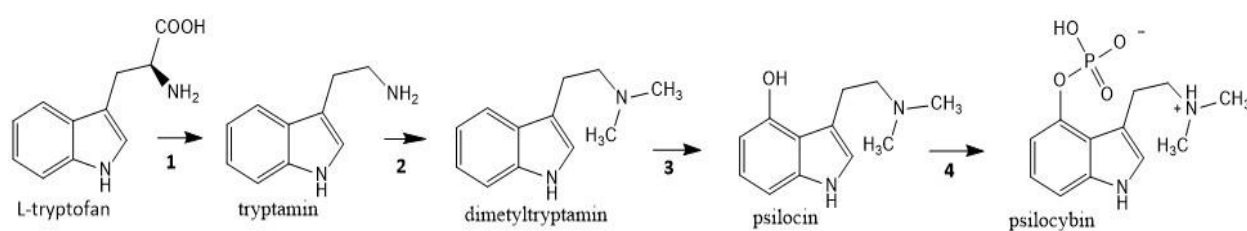
Rostliny čeledi Apocynaceae jsou velmi bohaté na indolové alkaloidy. Mnohé z těchto alkaloidů, jako např. reserpin, yohimbin, kamptothecin, jsou již dlouho využívány pro své farmakologické účinky⁴⁰.

Indolové alkaloidy jsou látky s různorodou chemickou strukturou. Biochemickým prekurzorem je aminokyselina tryptofan. Ve strukturách indolových alkaloidů se objevují terpenické jednotky. Proto jsou rozlišovány non-izoprenoidní a izoprenoidní indolové alkaloidy⁴¹.

Non-izoprenoidní indolové alkaloidy

Mezi non-izoprenoidní indolové alkaloidy řadíme jednoduché alkaloidy odvozené od indolu. Hydroxylací tryptaminu vzniká nejjednodušší alkaloid serotonin, který se nachází v těle rostlin i živočichů a proto není obecně označován jako alkaloid. Dalším významným jednoduchým alkaloidem je psilocin, který po esterifikaci kyselinou fosforečnou přechází na psilocybin (Obr. 12)⁴². Psilocin a psilocybin jsou halucinogenní indolové alkaloidy, které se převážně objevují v houbách čeledi *Agaricaceae*: *Stropharia* sp., *Psilocybe* sp., *Conocybe* sp., *Panaeolus* sp.⁴³.

Obr. 12: Biosyntéza psilocybinu; 1 – dekarboxylace, 2 – metylace, 3 – oxidace, 4 – fosforylace



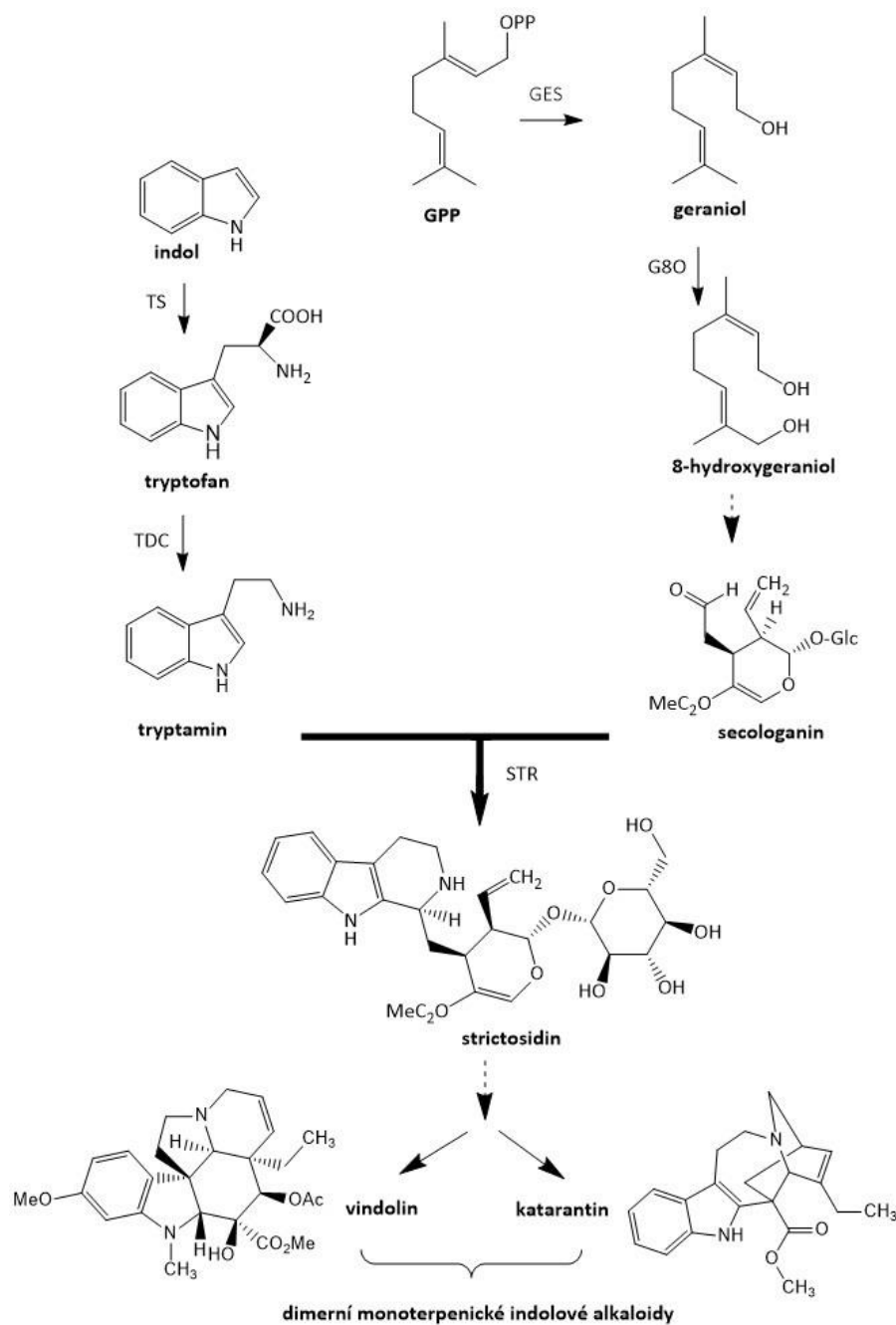
Do skupiny non-izoprenoidních alkaloidů dále řadíme jednoduché deriváty β -karbolinu. Jádra β -karbolinu vznikají Mannichovou reakcí z tryptaminu. Zástupci této skupiny jsou: harman, harmin, harmalin a elaeagnin⁴².

Izoprenoidní indolové alkaloidy

Izoprenoidní indolové alkaloidy dále dělíme do dvou skupin podle počtu obsažených izoprenových jednotek a to na monoterpenické (MIAs) a hemiterpenické.

Monoterpenické indolové alkaloidy

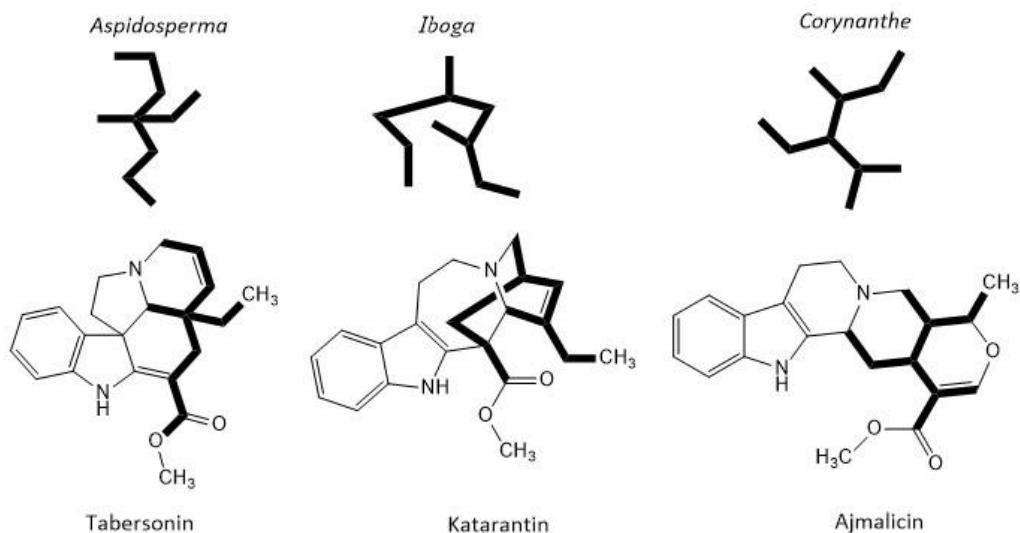
MIAs jsou nejvíce biologicky aktivní skupinou alkaloidů, které najdeme v tisících druzích rostlin z čeledí *Apocynaceae*, *Rubiaceae* a *Loganiaceae*. Významným druhem je *Catharantus roseus* s alkaloidy vinblastin, vinkristin, ajmalicin. Biosyntézy MIAs se kromě aminokyseliny tryptofanu účastní také sekologanin. Jejich kondenzací vznikne strictosidin, který je pak převeden na jednotlivé MIAs (Obr. 13)⁴⁴.



Obr. 13: Biosyntéza MIAs v *Catharantus roseus*⁴⁵; GES (geraniolsyntéza), G8O (geraniol 10-hydroxyláza/8 oxidáza), GPP (geranyldifosfát), STR (strictosidinsyntéza), TDC (tryptofandekarboxyláza), TS (tryptofansyntéza)

MIAs dělíme podle struktury monoterpenické složky secologaninu. Rozlišujeme typy *Aspidosperma*, *iboga* a *Corynanthe*, které jsou tak označeny podle rodu nebo druhu rostliny, kde se typicky vyskytují^{46,47,42}. Struktury jednotlivých terpenových jednotek jsou zobrazeny na Obr. 14.

Obr. 14: Strukturní typy MIAs⁴²



Hemiterpenické indolové alkaloidy

Do této třídy indolových alkaloidů řadíme alkaloidy námelové, které se vyskytují především v říši hub u druhů *Claviceps*. Rozlišujeme 3 skupiny námelových alkaloidů: klavinové alkaloidy, deriváty kyseliny lysergové a ergopeptiny. Jednotlivé druhy *Claviceps* se liší schopností produkovat různé druhy alkaloidů. Ergopeptiny, jako finální produkty biosyntézy námelových alkaloidů, mohou produkovat jen některé druhy (*Claviceps purpurea* a *Claviceps africana*)⁴⁸.

3.2.3.2 *Vinca* alkaloidy

Alkaloidy rodu *Vinca* označujeme jako *Vinca* alkaloidy. Tyto alkaloidy byly objeveny v roce 1950 kanadskými vědci Robertem Noblem a Charlesem Beerem. *Vinca* alkaloidy jsou dlouhodobě zkoumány pro své léčivé vlastnosti⁴⁹. Jsou jednou z nejvýznamnějších skupin terpenoidních alkaloidů. Dále rozlišujeme 5 hlavních typů: eburnaminový typ, ajmalinový typ, sarpaginový typ, akuamminový typ a oxindolový typ⁴⁰.

Zástupci vinblastin, vinkristin, vinorelbin a vindesin jsou čtyřmi hlavními klinicky využívanými alkaloidy schválenými v USA. V Evropě je schválen alkaloid vinflun, který se používá pro léčbu nádorů. *Vinca* alkaloidy jsou druhými nejužívanějšími léčivými v léčbě karcinomů⁴⁹. Mechanismem antineoplastického účinku je jejich interakce s tubulinem, kdy dojde k narušení funkce mikrotubulů v mitotickém aparátu^{50,49}.

Eburnaminový typ

Alkaloidy eburnaminového typu byly poprvé objeveny v rodu *Vinca*. Podle toho také nazýváme základní skelet (tetrahydrofuranový kruh) jako vinkan. Enantiomerem vinkanu je eburnan. Přehled některých eburnaminových *Vinca* alkaloidů je uveden v tabulce 1⁵¹.

Tabulka 1: Eburnaminové *Vinca* alkaloidy

Název alkaloidu	Vybraný druh <i>Vinca</i>
Dimethoxyeburnamon	<i>Vinca minor</i>
11-methoxyeburnamon	<i>Vinca minor</i>
Vinkamin	<i>Vinca minor</i>

Ajmalinový typ

Ajmalinové alkaloidy jsou alkaloidy čeledi Apocynaceae. Rodem ve kterém se vyskytují nejhojněji je rod *Rauvolfia*, najdeme je ale i v dalších např.: *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Cabucala*, *Vinca*. Základní zástupci vyskytující se v rodu *Vinca* jsou uvedeny v tabulce 2⁵².

Tabulka 2: Ajmalinové *Vinca* alkaloidy

Název alkaloidu	Vybraný druh <i>Vinca</i>
10-methoxytetracyclidin	<i>Vinca major</i>
10-methoxyvinorin	<i>Vinca erecta, major</i>
Majoridin	<i>Vinca erecta, major</i>
Majorinin	<i>Vinca major</i>
Quebrachidin	<i>Vinca herbacea</i>
Vinkamajin	<i>Vinca difformis, major</i>
Vinkamajinin	<i>Vinca major</i>
Vinkarin	<i>Vinca erecta, herbacea,</i>

Sarpaginový typ

Indolové alkaloidy sarpaginového typu se vyskytují především v čeledi Apocynaceae, ale najdeme je i v čeledi Loganiaceae. Nejdůležitějším rodem je rod *Rauwolfia*, kde byl sarpagin poprvé objeven. Dalšími rody, které obsahují sarpagine alkaloidy jsou: *Alstonia*, *Aspidosperma*, *Catharanthus*, *Vinca* a další. Některé alkaloidy tohoto typu jsou uvedeny v tabulce 3⁵³.

Tabulka 3: Sarpaginové *Vinca* alkaloidy

Název alkaloidu	Vybraný druh <i>Vinca</i>
Lochvinerin	<i>Vinca major</i>
O-benzoyltombozin	<i>Vinca erecta</i>
Rhazin	<i>Vinca difformis, erecta</i>
Vellosimin	<i>Vinca difformis</i>
Vellosiminol	<i>Vinca difformis, erecta</i>

Akuamminový typ

Tento typ je odvozen od alkaloidu akuamminu, známého také jako vinkamajoridin, původně izolovaného ze semen stromu *Picralima nitida* z čeledi Apocynaceae. Vinkamajoridin je alkaloid, který byl izolován z *Vinca major*, ale svou strukturou je totožný s akuamminem. Proto tento typ řadíme i k *Vinca* alkaloidům⁵⁴.

Oxindolový typ

Oxindolový typ indolových alkaloidů byl poprvé objeven v kořenech rostliny *Gelsemium sempervirens*. Postupně se do této skupiny přidávaly alkaloidy z rodů *Aspidosperma*,

Mitragyna, Rauwolfia, Ourouparia a *Vinca*. Přehled některých oxindolových *Vinca* alkaloidů je uveden v tabulce 4⁵⁵.

Tabulka 4: Oxindolové *Vinca* alkaloidy

Název alkaloidu	Vybraný druh <i>Vinca</i>
Erycinin	<i>Vinca erecta</i>
Herbalin	<i>Vinca herbacea</i>
Herbarin	<i>Vinca herbacea</i>
Isomajdin	<i>Vinca major</i>
Majdin	<i>Vinca major</i>
Vineridin	<i>Vinca erecta</i>
Vinerin	<i>Vinca erecta</i>
Vinin	<i>Vinca major</i>

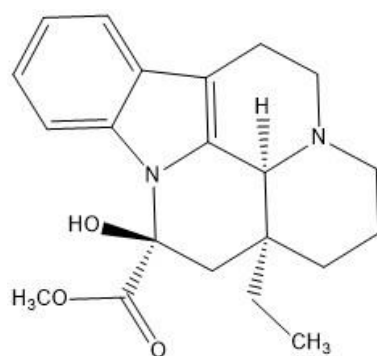
Z rostliny *Vinca minor* L. bylo již izolováno více než 50 indolových alkaloidů⁵⁶. Nejdůležitější z nich jsou vinblastin, vinkristin, vinkamin, vinkamidin, izovinkamin, vinkaminorein, vinkaleukoblastin a leukokrystin³⁹.

Vinkamin

Vinkamin (Obr. 15) řadíme do skupiny *Aspidosperma* indolových alkaloidů a označujeme jako typ eburnaminový⁵⁶. Je hlavním alkaloidem listů rostliny *Vinca minor* L., můžeme ho však najít i v dalších druzích jako je *Catharanthus roseus*, *Vinca major* nebo *Crioceras longiflorus*²⁴.

Vinkamin je důležitým lékem v oblasti mozkových poruch, využívá se v léčbě roztroušené sklerózy a také při pooperačních stavech centrálního nervového systému. Působí vazodilatačně a má nootropní vlastnosti. Tímto je tedy zajímavý pro léčbu neurogenerativních onemocnění typu AD a Parkinsonovy choroby⁵⁷.

Eliminační poločas vinkaminu je přibližně 2 hodiny po perorálním podání. Metabolizuje se především v játrech a vylučován je ledvinami⁵⁸. Jeho biologická dostupnost po perorálním podání je ale pouze 20 %. Z chemického hlediska je to vysoce lipofilní krystalická látka⁵⁷.



vinkamin

Obr. 15: Vzorec vinkaminu

Vinblastin

Vinblastin (Obr. 16) řadíme do skupiny *iboga* indolových alkaloidů⁴². Najdeme ho především v rostlině *Catharanthus roseus*, odkud byl původně izolován⁵⁹.

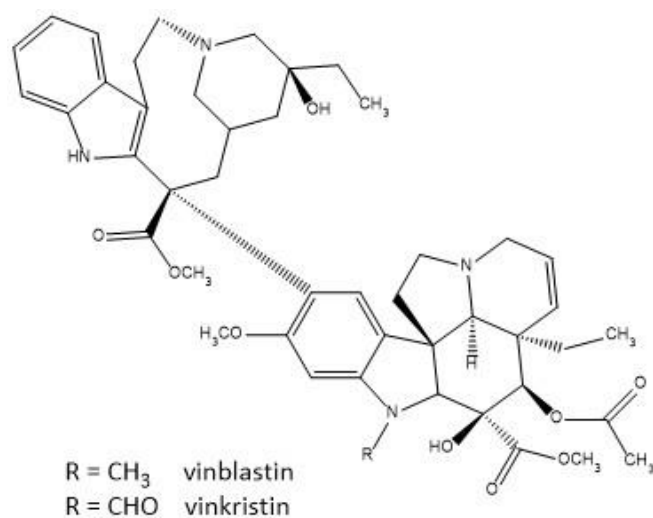
Vinblastin je široce využíván v terapii některých nádorových onemocnění. V kombinaci s jinými cytotoxickými preparáty se používá pro léčení Hodgkinovy choroby, non-Hodgkinova lymfomu nebo pokročilého karcinomu varlete. Lze také použít pro léčbu rakoviny močového měchýře a karcinomu nebo melanomu ledvin. Podává se intravenózně⁶⁰. Mechanismem účinku je ovlivnění fáze mitózy inhibičním působením na mikrotubuly. Tímto dojde k blokaci rychle se dělících nádorových buněk. Bohužel toto chemoterapeutikum nerozlišuje buňky zdravé od buněk nádorových, z toho důvodu má vinblastin řadu nežádoucích účinků, mezi které patří potlačení imunity, neurotoxicita, gastrotoxicita nebo myelosuprese. Pro předcházení těmto nežádoucím účinkům se podává především v kombinaci s jinou netoxickou pomocnou látkou⁶¹.

Vinkristin

Vinkristin (Obr. 16) je velmi podobný alkaloidu vinblastinu. Řadíme ho také mezi *iboga* indolové alkaloidy a získává se z *Catharanthus roseus*⁵⁹.

Od vinblastinu se liší především nižší myelosupresivní toxicitou a proto bývá zařazen do mnoha chemoterapeutických režimů. Mechanismus účinku je stejný jako u vinblastinu. Používá se především pro léčbu akutní lymfocytární leukemie, lymfomů a nádorů mozku obecně⁶⁰ a to

buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými protinádorovými činidly. I toto chemoterapeutikum však není bez toxicity. Hlavním nežádoucím účinkem je neuropatická bolest, která je odolná vůči standardním analgetikům. Bylo zjištěno, že tento vedlejší účinek je na dávce závislý a bohužel často přetrvává i po ukončení podávání chemoterapeutika. Neuropatické bolesti způsobené vinkristinem by se však podle nedávných studií mohly řešit podáváním topisetronu⁶².



Obr. 16: Vzorec vinblastinu a vinkristinu

4 Experimentální část

4.1 Všeobecné postupy

4.1.1 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna rozpouštědla, která byla při práci použita, byla přečištěna destilací komerčních rozpouštědel. Takto přečištěná rozpouštědla se dále uchovávala v tmavých skleněných stojátkách a byla tak chráněna před světlem.

4.1.2 Odpařování extraktů

Získané extrakty byly odpařeny na vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě do 40 °C.

4.1.3 Příprava litých desek na preparativní TLC

Lité desky pro preparativní TLC musí být připraveny alespoň den před jejich použitím. Skleněné desky určené pro toto TLC se musí před nalitím umýt a odmastit. Následně se přelijí suspenzí silikagelu (na 1 cm² připadá 0,03 g silikagelu v 0,1 ml vody). Tato suspenze se důkladně na desce rozetře a poté se nechá schnout.

4.1.4 Detekce alkaloidů

Přítomnost alkaloidů na chromatografických deskách se provádí pod UV lampou při vlnové délce 254 a 366 nm. Alkaloidy na desce přítomné se pod UV zářením zbarví modře nebo tmavě. Detekce alkaloidů na desce se dále provádí postřikem Dragendorffovým činidlem. Alkaloidní skvrny jsou po postřiku oranžové až červeno-oranžové. Tyto skvrny je třeba hodnotit velmi pozorně, protože někdy může být reakce relativně slabá i přes to, že alkaloidy jsou přítomny.

4.1.5 Flash chromatografie

Některé frakce alkaloidů byly děleny pomocí Flash chromatografie. Flash chromatografie je rychlejší a automatizovaná forma chromatografie sloupcové.

Frakce, která se má dělit, je nanesena na horní část komerčně dodávané kolony. Zbytek sloupce je vyplněn izokraticky nebo gradientem rozpouštědla, které za pomoci tlaku propustí nanesený vzorek dál do kolony, kde je dělen do dalších frakcí. Po rozdělení frakce a následném odpaření získaných frakcí se provádí kontrolní TLC a kvantitativně stejné frakce se spojují.

4.2 Izolace alkaloidů

4.2.1 Použitý materiál a vybavení pro izolaci

4.2.1.1 Rozpouštědla

Acetonitril (CH_3CN), p. a. (LachNer)

Diethylamin (Et_2NH), p. a. (LachNer)

Diethylether, čistý destilovaný bez stabilizátoru (Et_2O) (Penta)

Ethanol 95%, denaturovaný metanolem (EtOH) (Lihovar Kolín)

Ethylacetát (EtOAc), p.a. (Penta)

Chloroform (CHCl_3), p. a. (Penta)

Lékařský benzín lékopisné kvality ČL 2009 (Bz) (Penta a.s.)

Methanol, LC-MS CHROMASOLV® (MeOH) (Sigma-Aldrich)

Toluen (To), p. a. (Penta)

4.2.1.2 Chemikálie

Amoniak, 25% vodný roztok, p. a. (Lachema)

Hydroxid sodný 2%, č. (Lachema)

Kyselina chlorovodíková 2%, p. a. (Lachema)

Síran sodný bezvodý, č. (Penta)

4.2.1.3 Pomocné látky

Křemelina Celite C 535 Jonh's Manville (Sigma-Aldrich)

4.2.1.4 Detekční činidla

Dragendorffovo činidlo – vzniká složením roztoku A a roztoku B v poměru 1:1

Roztok A vzniká rozpuštěním 20 g kyseliny vinné a 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého v 80 ml vody.

Roztok B vzniká rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.

Detekční roztok se vytvoří smísením 5 ml zásobního roztoku (roztok A+B) s roztokem 10 g kyseliny vinné v 50 ml vody.

Meyerovo činidlo – Vzniká rozpuštěním 5 g jodidu draselného a 1,36 g chloridu rtuťnatého ve 100 ml vody.

4.2.1.5 Vyvíjecí soustavy pro TLC

Bz + CHCl₃ (87,5 : 12,5, 85 : 15, 80 : 20, 75 : 25)

EtOAc + MeOH (9 : 1)

To + CH₃CN (100 : 15)

To + EtOAc + Et₂NH (45 : 10 : 2)

4.2.1.6 Chromatografické adsorbenty

Kieselgel 60 GF₂₅₄ (Merck, CZ) – nalévané desky

Oxid hlinitý neutrální (100 μm) deaktivovaný 6 % vody (Sigma-Aldrich)

TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, CZ) – komerční desky

Sepacore Silica Flash Cartridge, 120g (Büchi)

4.2.1.7 Přístroje

Vakuová odparka Büchi Rotavapor R-114

Kontrolní jednotka Büchi Sepacore C-620 s pumpou C-605, detektorem C-640 a kolektorem frakcí C-660

4.2.1.8 Biologický materiál

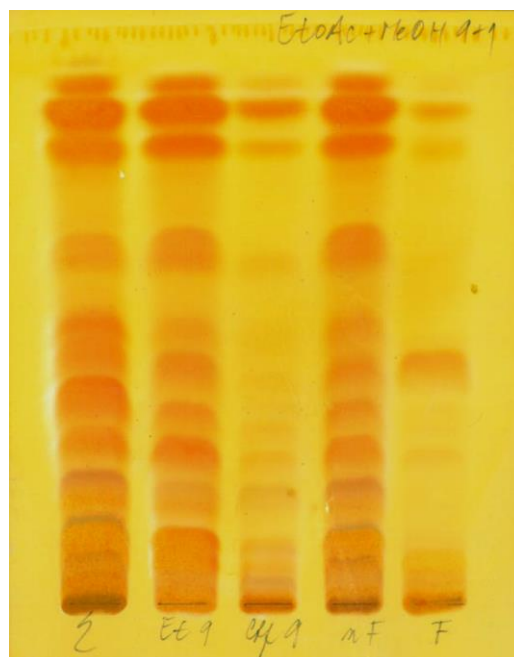
Nať rostliny *Vinca minor* L. byla dodána komerčně od prodejce Megafyt s. r. o. (Vrané nad Vltavou) jako droga jemně řezaná. Verifikaci provedl Prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Dokladové vzorky jsou uloženy v herbáři Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

4.2.2 Extrakce drogy a zpracování extraktu

Po částech bylo extrahováno 62 kg nati. 500 g drogy se extrahovalo vyvařením s 3 litry 95% EtOH na vodní lázni po dobu 30 minut. Tato extrakce se po filtraci prováděla ještě jednou. Následně spojené ethanolové extrakty byly zahuštěny do celkového objemu přibližně 70 litrů. Na Büchnerově nálevce byla odfiltrována šedavo-zelená sedlina (chlorofyl + kyselina ursolová). Hnědý filtrát o objemu přibližně 65 litrů byl alkalizován 25% amoniakem na pH 9 – 9,5 a suspenze byla vytřepána 5× 15 litry CHCl₃. Vodná fáze se dále nezpracovávala. Chloroformové výtřepky (výtřepky Σ) byly odpařeny do sucha. Tímto způsobem bylo získáno 454 g tmavě hnědého velmi viskózního produktu.

Dále byly přibližně 2 g chloroformového odparku dispergovány za tepla s použitím ultrazvuku 10 ml 2% HCl, roztok byl zředěn na 40 ml, zfiltrován, alkalizován amoniakem na pH 9 – 10 a následně vytřepán 4× 15 ml Et₂O (výtřepek Et9). Vodná fáze ale stále silně reagovala alkaloidně a proto byla ještě 4× vytřepána CHCl₃ (výtřepek CHf9). Odparek CHCl₃ byl masivní, ale alkaloidů obsahoval málo.

Oba odparky byly znovu spojeny (cca 2 g) a rozpuštěny ve 40 ml CHCl₃. Tento roztok byl vytřepán 3× 10 ml 2% NaOH a 2× 10 ml vody. Vodné fáze byly spojeny, okyseleny na pH 1, alkalizovány 25% amoniakem a roztok byl znovu vytřepán 3× 15 ml CHCl₃. Malý, olejovitý odparek F obsahoval pouze 3 alkaloidy, které byly přítomny i ve frakci alkaloidů nefenolických nF. Promytý chloroformový roztok byl vysušen síranem sodným a odpařen (odparek NF). LC/MS ukázalo, že alkaloidy v odparku F jsou totožné s alkaloidy odparku nF (Obr. 17).



Obr. 17: TLC jednotlivých výtřepků (adsorbent silikagel Merck UV 254, MF: EtOAc + MeOH 9 : 1, vyvíjeno 1×, detekce UV 254 nm, Dragendorffovo činidlo); Σ - první CHCl₃ výtřepek, Et9 – Et₂O výtřepek z chloroformového extraktu (alkaloidy, pH 9), Chf9 – CHCl₃ výtřepek po vytřepání Et₂O z chloroformového extraktu, nF – nefenolické baze, F – fenolické baze

4.2.3 Sloupcová chromatografie

Předčištěný chloroformový výtřepek VM CHCl₃-A byl připraven separací na sloupcové chromatografii se stacionární fází oxidem hlinitým. Po filtraci byl sloupec promyt potřebným množstvím chloroformu a poté 20 ml směsí CHCl₃ + EtOH 9 : 1, filtráty byly odpařeny. Tímto dělením bylo získáno 201 g tmavě hnědého, velmi viskózního CHCl₃ odparku a 94 g hnědého, pěnovitého odparku CHCl₃ a 10 % EtOH.

Předčištěný extrakt VM CHCl₃-A byl rozdělen na frakce pomocí sloupcové chromatografie. Ze získaných frakcí byly dále izolovány jednotlivé alkaloidy. Podmínky sloupcové chromatografie jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Chromatografie předčištěné CHCl₃-A

Množství odparku	200,0 g
CHCl ₃ na rozpuštění odparku	300 ml
Adsorbent na roztěr	500 g
Adsorbent	Oxid hlinitý neutrální (100 μm) deaktivovaný 6 % vody; 6,0 kg
Dělicí vrstva ve sloupci	Ø 15 x 35 cm
Vrstva s extraktem	Ø 15 x 2,9 cm
Mrtvý objem	4,4 litru
Frakce	500 ml
Doba toku 1 frakce	ca 25 min

Tímto způsobem bylo získáno 531 frakcí. Každá z těchto frakcí byla analyzována pomocí TLC, kdy se sledovalo kvantitativní složení. Eluáty s obsahem stejných alkaloidů byly spojeny do celkem 17 frakcí.

4.2.4 Separace alkaloidů z vybraných frakcí

Pro další práci byly vybrány frakce č. 2 a č. 5.

Tabulka 6: Vybrané spojené frakce ze sloupcové chromatografie

Číslo	Spojené frakce	Frakce	Eluce	Odparek	Popis
2	73 – 110	73 – 90	Bz + CHCl ₃ 87,5 : 12,5	1,44 g	Hnědočervený, velmi viskózní
		91 – 98	Bz + CHCl ₃ 85 : 15		
		99 – 105	Bz + CHCl ₃ 85 : 15		
		106 – 110	Bz + CHCl ₃ 80 : 20		
5	128 – 146	128 – 146	Bz + CHCl ₃ 75 : 25	10,81 g	Řídký, světlý

4.2.4.1 Separace alkaloidů z frakce č. 2

Frakce č. 2 (1,44 g) byla rozdělena pomocí preparativního TLC (adsorbent SiO₂, mobilní fáze To + CH₃CN 100 : 15) na 4 další podfrakce 2.1 – 2.4.

Po krystalizaci (CHCl₃ + EtOH 1 : 1) frakce 2.1 bylo získáno 120 mg bílé krystalické alkaloidní látky AV-1.

4.2.4.2 Separace alkaloidů z frakce č. 5

Frakce č. 5 (10,81 g) byla dělena pomocí Flash chromatografie na silikagelu (velikost částic 40 – 63 μm). Mobilní fázi tvořil $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$, gradient od 0 do 100 % EtOH. Průtoková rychlost byla 80 ml/min a detekce jednotlivých píků byla prováděna při 254 nm. Tímto dělením se získalo 12 podfrakcí označených 5.1 – 5.12.

Frakce 5.10 (1,32 g) byla dále dělena na preparativním TLC (adsorbent SiO_2 , mobilní fáze $\text{To} + \text{EtOAc} + \text{Et}_2\text{NH}$ 45 : 10 : 2) na další 4 podfrakce 5.10.1 – 5.10.4. Po krystalizaci ($\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$ 1 : 1) frakce 5.10.2 bylo získáno 37 mg bílé krystalické alkaloidní látky AV-2.

4.3 Strukturní analýza

4.3.1 GC/MS analýza a identifikace alkaloidů

Alkaloidy rostliny *Vina minor* L. byly identifikovány za použití plynového chromatografu Agilent Technologies 7890A s hmotnostním detektorem Agilent Technologies 5975C. Dělení proběhlo na koloně HP-5MS (30 m \times 0,250 mm). Teplotní program: 15 $^\circ\text{C}/\text{min}$ ze 100 $^\circ\text{C}$ na 180 $^\circ\text{C}$, 1 min stabilizováno na 180 $^\circ\text{C}$, poté 5 $^\circ\text{C}/\text{min}$ ze 180 $^\circ\text{C}$ na 300 $^\circ\text{C}$ a další stabilizace 40 min na 300 $^\circ\text{C}$. Nástřik byl proveden při 280 $^\circ\text{C}$ v objemu 1 μl (1 mg/ml) alkaloidního extraktu ve split módu v poměru 15:1. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokovou rychlostí 0,8 ml/min. Při 230 $^\circ\text{C}$ a elektronové ionizaci 70 eV byly detekovány fragmenty v rozmezí 40-600 m/z .

Identifikace jednotlivých alkaloidů byla provedena porovnáním jejich hmotnostních spekter s dostupnými daty v knihovně spekter NIST 11 (National Institute of Standards and Technology Library, USA) a s daty uvedenými v literatuře.

4.4 Stanovení inhibiční aktivity alkaloidů a alkaloidních extraktů vůči erythrocytární AChE a sérové BuChE

4.4.1 Použitý materiál, chemikálie

4.4.1.1 Chemikálie

10mM acetylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)

10mM butyrylthiocholin jodid (Sigma-Adrich)

Dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)

5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)

Huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)

4.4.1.2 Pufry

5mM fosfátový pufr pH 7,4

5mM fosfátový pufr pH 7,4 obsahující 150 mM chloridu sodného

100mM fosfátový pufr pH 7,4

4.4.1.3 Biologický materiál

Zdrojem acetylcholinesterázy byla pouzdra lidských erythrocytů, zdrojem butyrylcholinesterázy lidská plazma. Měření bylo prováděno v mikrotitračních destičkách.

4.4.2 Příklad použitého pro stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity

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

4.4.3 Příprava erythrocytárních pouzder

Erythrocytární pouzdra byla získána z čerstvě odebrané krve. K 18 ml krve byly přidány 2 ml citranu sodného. Ihned po odběru byla krev rozdělena po 5 ml do šroubovacích zkumavek a centrifugována (Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611, rychlost 4000 rpm, teplota 4 °C,

10 min). Po centrifugaci byla odsáta plazma, bez erytrocytů, která byla uchovávána v ledničce při 4 °C do doby stanovení aktivity BuChE (nejdéle 6 hodin).

Zvlášť bylo odebráno 500 µl plazmy, která byla uchovávána při normální teplotě za nepřístupu světla do stanovení aktivity (max. 1 hodinu). Po stanovení absorbance u plazmy, před rozplněním do mikrozkušavek, byla provedena filtrace přes tenkou vrstvu buničité vaty.

Z erytrocytárního sedimentu byl odsán zbytek plazmy a byl odečten objem erytrocytů. Poté byl sediment zředěn 5mM fosfátovým pufrům o pH 7,4, který obsahoval 150 mM chloridu sodného a byl rozdělen do 8 zkumavek pokaždé v objemu 13 ml. Po promíchání suspenze se 3× provede promytí centrifugací použitou již při oddělování plazmy. K takto promytému sedimentu se přidá tolik 5mM fosfátového pufru o pH 7,4, bez obsahu chloridu sodného, aby objemový poměr erytrocyty : pufr byl 1:9. Po homogenizaci směsi se erytrocyty ponechají v nezábrusové Erlenmayerově baňce spontánně hemolyzovat po dobu 10 minut, za míchání teflonovým míchadlem na magnetické míchačce. Ihned po skončení řízené hemolýzy byla u suspenze stanovena aktivita a naředěná suspenze byla dispenzována do mikrozkušavek a uchovávána při -22 °C.

4.4.4 Podmínky měření

Experimenty byly prováděny za těchto podmínek:

- prostředí fosfátového pufru pH 7,4
- teplota 37 °C
- vlnová délka spektrofotometru 436 nm
- použití mikrotitračních destiček

4.4.5 Stanovení cholinesterázové inhibiční aktivity (hodnoty IC₅₀)

Hodnota IC₅₀ byla stanovena Ellmanovou spektrofotometrickou metodou s použitím 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu, byly použity jako substráty. Stanovovala se SH- skupina thiocholinu, která se navázala na DTNB za vzniku žlutého produktu,

který byl dále stanoven spektrofotometricky. Byl sledován nárůst absorbance za 1 minutu. Hodnoty IC₅₀ se počítají z naměřených hodnot poklesu aktivity AChE nebo BuChE nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Následně jsou výsledky porovnávány s hodnotami IC₅₀ již známých inhibitorů cholinesteráz: huperzinem A a galantaminem.

Procenta inhibice (% I) se počítají podle vzorce:

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

ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku za 1 minutu

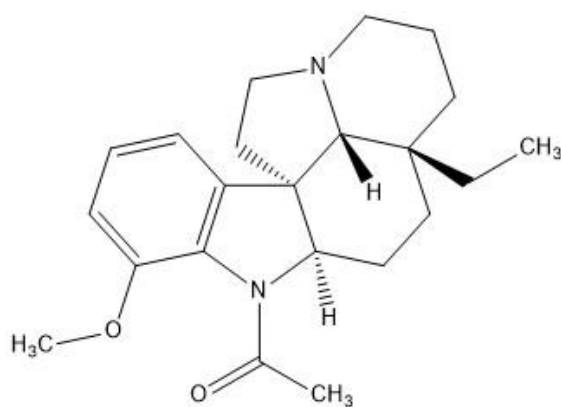
ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku

5 Výsledky

5.1 Strukturní analýza

5.1.1 (+)-vinkaminorin (AV-1)

CAS: 1935-07-5

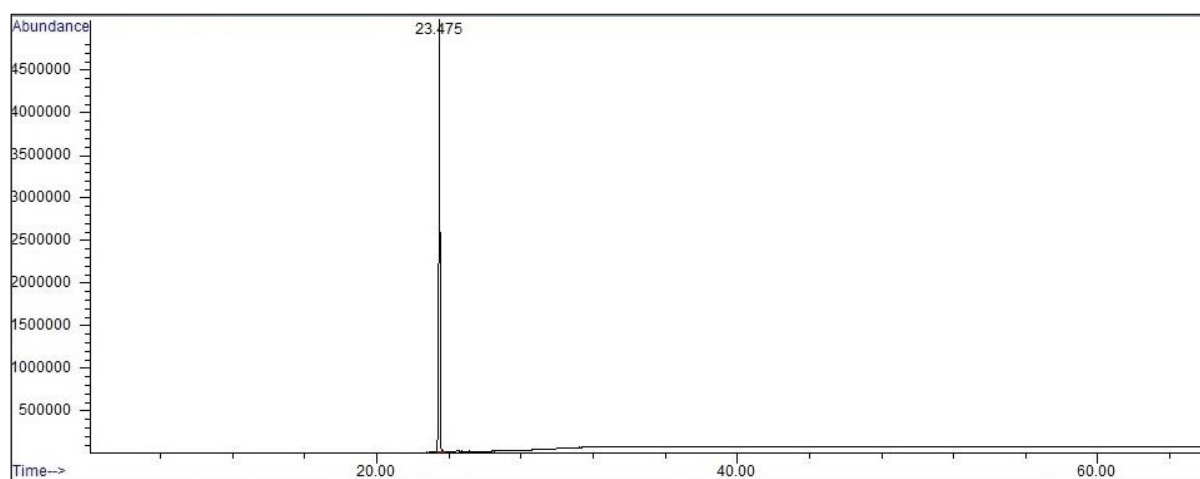


(+)-vinkaminorin

Obr. 18: Vzorec (+)-vinkaminorinu

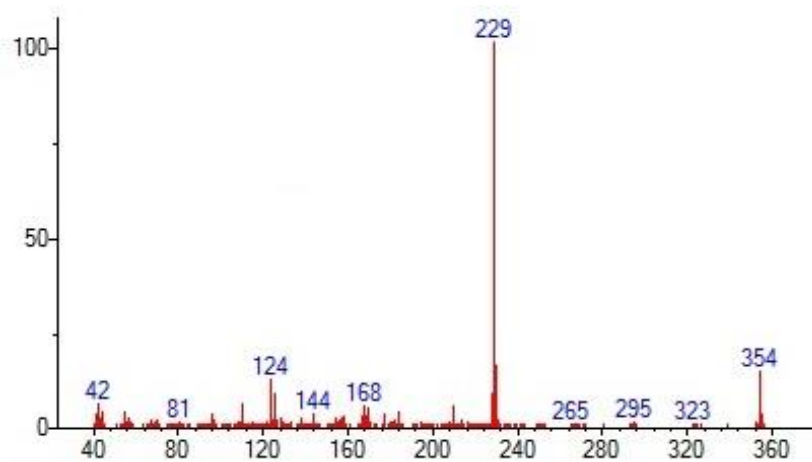
5.1.1.1 GC/MS analýza

Retenční čas: 23,475 min



Obr. 19: Chromatografický záznam (+)-vinkaminorinu

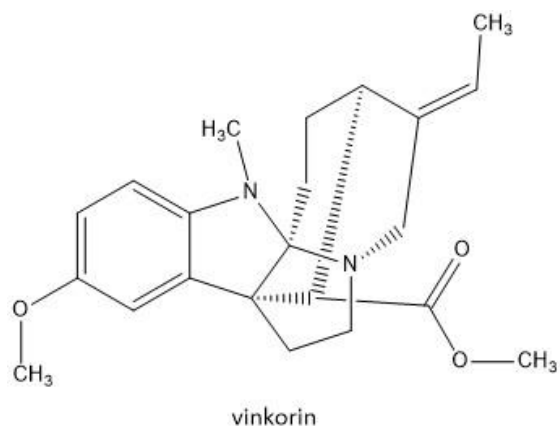
EI-MS [M^+]: 354 (15), 229 (100), 168 (5), 124 (12)



Obr. 20: MS spektrum (+)-vinkaminorinu

5.1.2 Vinkorin (AV-2)

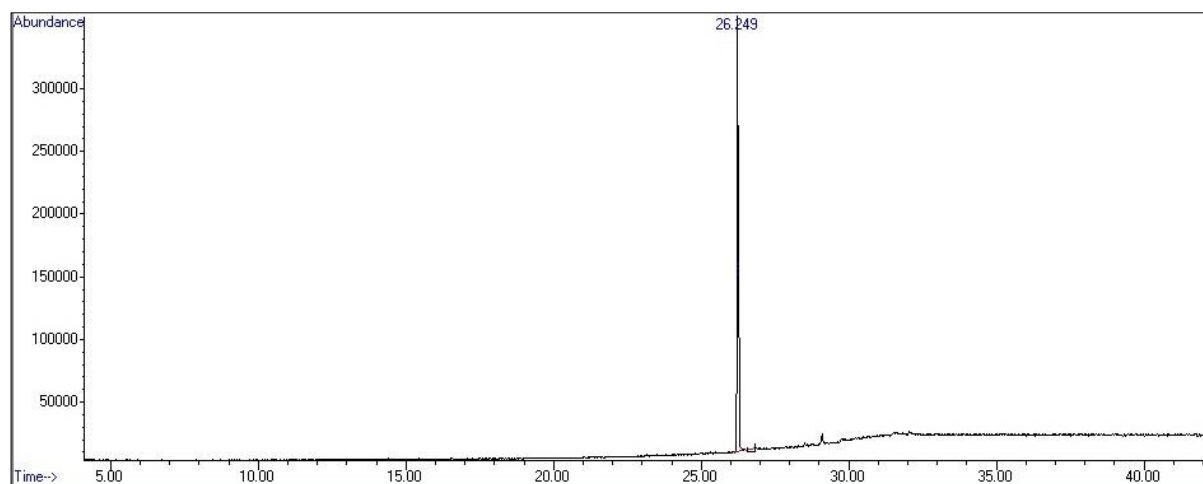
CAS: 33023-08-4



Obr. 21: Vzorec vinkorinu

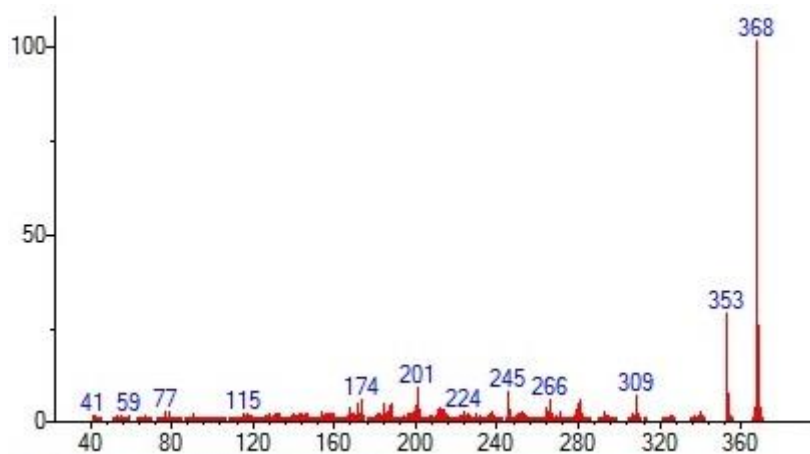
5.1.2.1 GC/MS analýza

Retenční čas: 26,249 min



Obr. 22: Chromatografický záznam vinkorinu

EI-MS [M^+]: 368 (100), 353 (28), 266 (6), 245 (8), 201 (9)



Obr. 23: MS spektrum vinkorinu

5.2 Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Tabulka 7: Inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů

Izolovaný alkaloid	AChEi (IC₅₀ μM)	BuChEi (IC₅₀ μM)
(+)-vinkaminorin	746,5 ± 84,13	684,32 ± 70,66
vinkorin	> 1000	9,75 ± 0,45
Standardy pro ChE		
galantamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30
huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000

6 Diskuse

IChE významně ovlivňují stav pacienta s AD. Oddalují progresi symptomů, zlepšují denní aktivity a i symptomy na neuropsychiatrické úrovni. Nemocní AD jsou velice heterogenní skupinou. Zřejmě existují podskupiny pacientů, kteří profitují významně více z terapie konkrétním enzymem IChE⁶³.

Cílem této diplomové práce byla izolace alkaloidů z alkaloidního extraktu z *Vinca minor* L. za použití chromatografických metod, jejich následná GC/MS analýza, identifikace a stanovení biologické aktivity vůči AChE a BuChE.

Po dělení frakcí č. 2 a č. 5 byly izolovány dva alkaloidy v čisté formě, které na základě GS/MS analýzy a po porovnání s literaturou byly označeny jako (+)-vinkaminorin (AV-1) a vinkorin (AV-2).

Získané látky byly testovány na inhibiční aktivitu pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody *in vitro*. Získané aktivity byly porovnávány se standardy galantaminem a huperzinem A. Galantamin je alkaloid se silnou inhibiční aktivitou vůči AChE ($1,710 \pm 0,065 \mu\text{M}$), ale vůči BuChE je jeho inhibiční aktivita nižší ($42,30 \pm 1,30 \mu\text{M}$). Inhibiční aktivity huperzinu A jsou podobné jako u galantaminu. Vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE ($0,033 \pm 0,001 \mu\text{M}$), ale na BuChE nepůsobí ($> 1000 \mu\text{M}$).

Izolovaný alkaloid (+)-vinkaminorin nedosahuje téměř žádných aktivit vůči AChE a BuChE. Jeho inhibiční aktivita vůči AChE je $746,5 \pm 84,13 \mu\text{M}$ a vůči BuChE $684,32 \pm 70,66 \mu\text{M}$. Tento alkaloid tedy nemůže být nositelem inhibiční aktivity, kterou vykazoval sumární alkaloidní extrakt. Zajímavější jsou ale výsledky inhibičních aktivit u alkaloidu vinkorinu. Zde nebyla naměřena žádná AChE inhibiční aktivita (AChE $> 1000 \mu\text{M}$), ale inhibiční aktivita vůči BuChE ($9,75 \pm 0,45 \mu\text{M}$) je vyšší než u obou výše zmíněných standardů.

Dle těchto výsledků můžeme soudit, že alkaloid (+)-vinkaminorin není využitelný pro ovlivnění průběhu AD, alkaloid vinkorin by však nějaké výsledky přinášet mohl. Testování biologické aktivity získaných alkaloidů bude dále probíhat v rámci dalších testů *in vitro*.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce byla izolace alkaloidů, jejich identifikace a stanovení biologické aktivity. Z alkaloidního extraktu *Vinca minor* L. byly za použití chromatografických metod izolovány 2 alkaloidy, které byly po GC/MS analýze identifikovány jako (+)-vinkaminorin a vinkorin.

Alkaloid (+)-vinkaminorin byl izolován z frakce č. 2, která byla dělena metodou preparativního TLC. Izolace vinkorinu byla provedena z frakce č. 5. Tato frakce byla nejprve dělena pomocí flash chromatografie a získané podfrakce byly dále rozděleny na preparativním TLC.

Po identifikaci získaných alkaloidů byly provedeny testy na jejich inhibiční aktivitu. (+)-vinkaminorin nevykazoval téměř žádnou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE, proto je v terapii AD nevyužitelný. Inhibiční aktivita vinkorinu vůči AChE nebyla naměřena, ale vůči BuChE ($9,75 \pm 0,45 \mu\text{M}$) je významná. Vinkorin tedy bude podroben dalšímu testování.

8 Použitá literatura

1 Weiner M. F., Lipton A. M.: *Textbook of Alzheimer Disease and Other Dementias*. The American Psychiatric pub., Washington 2009.

2 Preiss M., Kučerová H.: *Neuropsychologie v neurologii*. Grada, Praha 2006.

3 Aniszewski T.: *Alkaloids - secrets of life: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role*. Elsevier, 2007.

4 Ferková E., Ilievová L.: Známy neznámý Alzheimer. *Sestra: Odborný dvouměsíčník pro zdravotní sestry* 23(4), 56 (2013).

5 Kelnarová L., Tomanová J.: Výzkum, diagnostika a terapie Alzheimerovy nemoci. *Sestra: Odborný dvouměsíčník pro zdravotní sestry* 22(9), 56 (2012).

6 Šťastný F.: Alois Alzheimer: příběh jedné nemoci. *Vesmír* 86(4), 251 (2007).

7 Červenka F., Jahodář L.: Rostlinné metabolity jako nootropika a kognitiva. *Česká a slovenská farmacie* 55(5), 219 (2006).

8 Meluzínová H., Weber P.: Alzheimerova demence - epidemie 21. století: můžeme a umíme jí předcházet? *Geriatric a gerontologie* 2(4), 192 (2013).

9 Love R. J., Webb W. G.: *Mozek a řeč: neurologie nejen pro logopedy*. Portál, Praha 2009.

10 Doležal M., et al.: *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Karolinum, Praha 2013.

11 Fišar Z.: *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada, Praha 2009.

12 Koukolík F., Jiráček R.: *Alzheimerova nemoc a další demence*. Grada, Praha 1998.

- 13 Kračmarová A., Pohanka M.: Alzheimerova nemoc a oxidační stres. *Psychiatrie* 16(3), 145 (2012).
- 14 Waberžinek G., Krajíčková D.: *Základy speciální neurologie*. Karolinum, Praha 2006.
- 15 Jirák R.: Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékárenství: časopis postgraduálního vzdělávání pro farmaceuty* 8(3), 107 (2012).
- 16 Korábečný J., Hrubá E., Soukup O., et al.: Zvažované farmakoterapeutické přístupy léčby Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská farmacie* 61(1-2), 4 (2012).
- 17 Heinrich M., Teoh H. L.: Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *Journal of Ethnopharmacology* 92(2-3), 147 (2004).
- 18 Scarpini E., Schelterns P., Feldman H.: Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives. *The Lancet Neurology* 2(9), 539 (2013).
- 19 Perry E., Howes M.-J. R.: Medicinal Plants and Dementia Therapy: Herbal Hopes for Brain Aging? *CNS Neuroscience* 17(6), 683 (2011).
- 20 Akhondzadeh S., Abbasi S. H.: Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias* 21(2), 113 (2006).
- 21 Kosová J., Kostiuk P.: Doporučení Světové federace společností biologické psychiatrie (WFSBP) pro farmakoterapii Alzheimerovy nemoci a dalších demencí. *Farmi news: časopis do lékárny* 9(2), 28 (2012).
- 22 Jahodář L.: *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Karolinum, Praha 2011.
- 23 Wong S. K., Lim Y. Y., Chan E. W. C.: Botany, Uses, Phytochemistry and Pharmacology of Selected Apocynaceae Species. *Pharmacognosy Communications* 3(3), 2 (2013).
- 24 Arora R.: *Medicinal plant biotechnology* [online]. Cambridge, Mass.: CABI, 2010 [cit. 2016-03-10].

- 25 *The Plant List: A working list of all plant species* [online]. 2013 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=vinca>
- 26 Koyuncu M.: A new species of *Vinca* (Apocynaceae) from eastern Anatolia, Turkey. *Turkish journal of botany* 36, 247 (2012).
- 27 Life Science Research; Recent Findings from Ankara University Provides New Insights into Botany [*Vinca ispartensis* (Apocynaceae), a new species from Turkey]. *Life Science Weekly*. Dec 29,2015;pp. 2250 ProQuest Central.
- 28 *Daidalea* [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10024>
- 29 *Vinca* [online]. 2014 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://onebeanrow.com/tag/vinca/>
- 30 *Vinca difformis: intermediate periwinkle* [online]. 2016 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://www.rhs.org.uk/Plants/23728/Vinca-difformis/details>
- 31 *Genus: Vinca (periwinkle)* [online]. 2016 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://gobotany.newenglandwild.org/genus/vinca/>
- 32 *Vinca erecta* [online]. 2012 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.plantarium.ru/page/image/id/167166.html>
- 33 *Vinca ispartensis* [online]. 2015 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://dogalhayat.org/property/vinca-ispartensis/>
- 34 *Plants of Turkey* [online]. [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: <http://www.turkiyebitkileri.com/index.php?dil=tr&id=2&familya=8&cins=22&tur=5267#.VvEkWfnhDIW>
- 35 Gagua N., Mchedlidze K., Vachnadze V., Bakuridze A.: Structural Peculiarities of the Vegetative Organs of the Species of *Vinca*. *Pharmacognosy journal* 4(28), 49 (2012).

- 36 Moeller S., Wöhrmann T., Huettel B., Weising K.: Development of 18 Polymorphic Microsatellite Markers for *Vinca minor* (Apocynaceae) via 454 Pyrosequencing. *Applications in Plant Sciences* 3(5), (2015).
- 37 Barvínek menší - *Vinca minor*. *Květena České republiky - plané rostliny ČR* [online]. 2015 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://www.kvetenacr.cz/detail.asp?IDdetail=140>
- 38 *Vinca minor* L. - barvínek menší / zimozeleň menšia. *Botany.cz* [online]. 2015 [cit. 2016-03-12]. Dostupné z: <http://botany.cz/cs/vinca-minor/>
- 39 Korbelař J., Endris Z.: *Naše rostliny v lékařství*. Avicenum, Praha 1981.
- 40 Cheng G.-G., Zhao Y.-L., Zhang Y., et al.: Indole alkaloids from cultivated *Vinca major*. *Tetrahedron* 55(47), 8723 (2014).
- 41 Alkaloids Derived from Tryptophan. *Pharmacognosy* [online]. 2012 [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: <http://www.epharmacognosy.com/2012/07/alkaloids-derived-from-tryptophan.html>
- 42 Dewick P.: *M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Wiley, New York 2002.
- 43 Opletal L.: Alkaloidy vycházející z metabolismu tryptofanu. In: *Daidalea* [online]. [cit. 2016-03-15]. Dostupné z: http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compound/2-8-4_Alkaloidy_z_m etabolizmu_ tryptofanu.pdf
- 44 Salim V., De Luca V., Thamm A.: Making iridoids/secoiridoids and monoterpenoid indole alkaloids: progress on pathway elucidation. *Current Opinion in Plant Biology* 19, 35 (2004)
- 45 Kumar, K., Dwivedi V., Rai A.: Precursor feeding studies and molecular characterization of geraniol synthase establish the limiting role of geraniol in monoterpene indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* leaves. *Plant Science* 239, 56 (2015).
- 46 Gribble G. W., Joule J. A.: *Progress in Heterocyclic Chemistry*. Volume 23. Elsevier, 2011.

- 47 Jana G. K., Sinha S.: Reductive Heck coupling: an efficient approach toward the iboga alkaloids. Synthesis of ibogamine, epiibogamine and iboga analogs. *Tetrahedron Letters* 53(13), 1671 (2012).
- 48 Hulvová H., Galuszka P., Frébortová J., Frébort I.: Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances* 31(1), 79 (2013).
- 49 Moudi M., Go R., et al.: Vinca alkaloids. *International Journal of Preventive Medicine* 4(11), 1231 (2013).
- 50 Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O.: *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology*. Wiley, 2008.
- 51 *The Alkaloids: Chemistry and Physiology* 20, 303 (1982).
- 52 Lounasmaa M., Hanhinen P.: The ajmaline group of indole alkaloids. *The alkaloids: Chemistry and biology* 55, 2001.
- 53 Cordell G. A.: *The alkaloids: chemistry and biology, vol. 52*. San Diego [etc.]: Academic Press, 1998.
- 54 Saxton J. E.: Alkaloids of *Picralimanitida*. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology* 8, 119 (1965).
- 55 Jindra B. S.: *The Alkaloids: Chemistry and Physiology* 14, 83 (1973).
- 56 Verma P., Sharma A., Khan S., 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 (2015).
- 57 Hasa D., Perissutti B., Chierotti M. R., et al.: Mechanochemically induced disordered structures of vincamine: The different mediation of two cross-linked polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 436(1-2), 41 (2012).

- 58 Juan Y.-P., Tsai T.-H.: Measurement and pharmacokinetics of vincamine in rat blood and brain using microdialysis. *Journal of Chromatography A* 1088(1-2), 146 (2005).
- 59 Keglevich P., Ábrányi-balogh P., Szigetvári Á., Szántay C., Hazai L.: Studies on the mechanism of quaternization of the catharanthine part of vinblastine and vincristine. *Tetrahedron Letters* 57 (15), 1672 (2016).
- 60 Aronson J. K.: *Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions* Elsevier, 2016.
- 61 Nurcahyanti A. D. R., Wink M.: Cytotoxic potentiation of vinblastine and paclitaxel by L-canavanine in human cervical cancer and hepatocellular carcinoma cells. *Phytomedicine* 22(14), 1232 (2015).
- 62 Barzegar-Fallah A., Alimoradi H., Mehrzadi S., Barzegar-Fallah N., Zendedel A., Abbasi A., Dehpour A.: The neuroprotective effect of tropisetron on vincristine-induced neurotoxicity. *NeuroToxicology* 41, 1 (2014).
- 63 Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi* 2, 112 (2007).