

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY

---



DIPLOMOVÁ PRÁCE  
CYTOTOXICKÁ A CHOLINESTERÁSOVÁ INHIBIČNÍ AKTIVITA EXTRAKTŮ Z VYBRANÝCH DRUHŮ  
RODU *CENTAUREA* L.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, Ph.D.

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

## PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval především svému školiteli PharmDr. Jakubovi Chlebkovi, Ph.D. za veškerou pomoc, odborné rady a ochotu během vypracování diplomové práce. Dále bych rád poděkoval prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření inhibiční aktivity cholinesteras u extraktů i čistých izolovaných látek. Další poděkování patří doc. PharmDr. Danielovi Junovi, Ph.D. a Mgr. Martině Hrabinové, Ph.D. z Univerzity Obrany v Hradci Králové za změření inhibice prolyloligopeptidasy. Za změření cytotoxicity bych rád poděkoval také RNDr. Radimu Havelkovi, Ph.D. z Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. NMR analýzu a interpretaci jejich spekter provedl doc. PhamDr. Jiří Kuneš, CSc. a mgr. Jana Maříková z katedry organické a bioorganické chemie, oběma náleží také velký dík.

## PROHLÁŠENÍ

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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	9
3 TEORETICKÁ ČÁST .....	10
3.1 Alzheimerova choroba .....	10
3.1.1 Epidemiologie .....	10
3.1.2 Etiopatogeneze .....	11
3.1.3 Příznaky.....	15
3.1.4 Diagnóza .....	15
3.1.5 Rizikové faktory .....	16
3.1.6 Farmakoterapie.....	16
3.2 Cytotoxicita .....	24
3.2.1 Cytotoxické látky přírodního původu .....	24
3.3 . Rod <i>Centaurea</i> L.....	27
3.3.1 Systematické zařazení [58] .....	27
3.3.2 Popis druhů .....	27
3.3.3 Přehled sekundárních metabolitů a jejich biologická aktivita .....	34
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	41
4.1 Materiál a přístrojové vybavení.....	41
4.1.1 Chemikálie .....	41
4.1.2 Rozpouštědla .....	41
4.1.3 Absorbenty pro chromatografii .....	42
4.1.4 Pomocný materiál .....	42
4.1.5 Přístroje .....	42
4.1.6 Vyvíjecí soustavy pro TLC.....	42

4.1.7 Detekční čidla .....	43
4.1.8 Rostlinný materiál .....	43
4.1.9 Chemikálie a čidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE .....	43
4.1.10 Chemikálie a čidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP.....	44
4.2 Metody .....	44
4.2.1 Obecné postupy .....	44
4.2.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností.....	45
4.2.3 Stanovení biologické aktivity .....	46
4.3. Izolace sloučenin z nažek vybraných druhů rodu <i>Centaurea</i> .....	49
4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu.....	49
4.3.2 Izolace sloučenin .....	50
5 Výsledky .....	52
5.1 MS analýza extraktů .....	52
5.1.1 GC-MS analýza extraktů .....	52
5.1.2 LC-MS analýza EtOAc extraktů chrp.....	53
5.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek.....	53
5.2.1 Arktiin .....	53
5.2.2 Matairesinosid .....	54
5.2.3 Arktigenin.....	55
5.2.4 Matairesinol .....	55
5.3 Inhibiční aktivita vůči AChE, BChE a POP.....	57
5.2 Cytotoxická aktivita.....	60
6 Diskuze .....	61
7 Abstrakt.....	64
8 Abstract .....	66
9 Seznam použité literatury .....	68



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
AD	Alzheimer's disease = Alzheimerova choroba
ADINACO	Alzheimer's Disease and NATural COMpounds
AK	aminokyselina
AMPK	adenosinmonofostát-aktivovaná proteinkinasa
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
$\beta$ A	$\beta$ -amyloid
BACE	$\beta$ -sekretasa
BChE	butyrylcholinesterasa
CAA	cerebrální amyloidní angiopatie
CAP 37	kationový antimikrobiální protein
CNS	centrální nervová soustava
DM2	diabetes mellitus 2
GIT	gastrointestinální trakt
HEB	hematoencefalická bariéra
IL	interleukin
LPO	peroxidace lipidů
MHC	major histocompatibility complex = hlavní histokompatibilní komplex
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
OS	oxidativní stres
POP	prolyloligopeptidasa
Rf	retenční faktor
ROS	reaktivní druhy kyslíku
SNRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TLC	chromatografie na tenké vrstvě

## PŘEHLED OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 1 rivastigmin .....	17
Obrázek 2 donepezil .....	17
Obrázek 3 galantamin .....	18
Obrázek 4 huperzin A.....	18
Obrázek 5 takrin .....	19
Obrázek 6 memantin .....	20
Obrázek 7 <i>Centaurea cyanus</i> L. [58] .....	27
Obrázek 8 <i>Centaurea jacea</i> L. [60] .....	28
Obrázek 9 <i>Centaurea scabiosa</i> L. [61] .....	29
Obrázek 10 <i>Centaurea pseudophrygia</i> C. A. Meyer [62] .....	30
Obrázek 11 <i>Centaurea stoebe</i> L. [63] .....	31
Obrázek 12 <i>Centaurea benedicta</i> L. [64] .....	32
Obrázek 13 <i>Centaurea solstitialis</i> L. [65] .....	33
Obrázek 14 knicin .....	35
Obrázek 15 kvercetin .....	36
Obrázek 16 rutin .....	37
Obrázek 17 matairesinol .....	38
Obrázek 18 arktigenin.....	38
Obrázek 19 moschamin .....	39
Obrázek 20 detekce alkaloidů v ethyl-acetátovém extraktu (nalevo Dragendorffovo činidlo, napravo jodoplaticité činidlo).....	50
Obrázek 21 GC-MS analýza ethanolových a ethylacetátových vzorků.....	52
Obrázek 22 GC-MS analýza ethanolového a ethyl-acetátového vzorku AL-623 ( <i>C. scabiosa</i> )...52	
Obrázek 23 arktiin.....	53
Obrázek 24 matairesinosid.....	54
Obrázek 25 arktigenin.....	55
Obrázek 26 EI-MS analýza arktigeninu.....	55
Obrázek 27 matairesinol.....	55
Obrázek 28 EI-MS analýza matairesinolu.....	56



Tabulka 1 Systematické zařazení.....	27
Tabulka 2 Přehled seskviterpenů ve vybraných druzích rodu <i>Centaurea</i> .....	34
Tabulka 3 Přehled flavonoidů ve vybraných druzích rodu <i>Centaurea</i> .....	36
Tabulka 4 Přehled lignanů ve vybraných druzích rodu <i>Centaurea</i> .....	38
Tabulka 5 Přehled alkaloidů ve vybraných druzích rodu <i>Centaurea</i> .....	39
Tabulka 6 Hmotnosti alkaloidních extraktů a izolovaných majoritních sloučenin z vybraných druhů rodu <i>Centaurea</i> .....	51
Tabulka 7 Biologická aktivita ethanolových extraktů vybraných druhů rodu <i>Centaurea</i> .....	57
Tabulka 8 Biologická aktivita ethyl-acetátových extraktů vybraných druhů rodu <i>Centaurea</i> ...	58
Tabulka 9 Biologická aktivita izolovaných látek.....	59
Tabulka 10 Cytotoxická aktivita ethyl-acetátových extraktů vybraných druhů rodu <i>Centaurea</i> .....	60

# 1 ÚVOD

Alzheimerova choroba je progresivní degenerativní onemocnění centrálního nervového systému, které je chronické a způsobuje u pacientů demenci. Projevem tohoto onemocnění je zapomínání společně se ztrátou kognitivních funkcí. Při Alzheimerově chorově dochází k úmrtí neuronů a nedostatku acetylcholinu v mozku, což je způsobeno různými mechanismy [1]. Dnešní terapie dokáže pouze zpomalit progresi choroby a oddálit těžká stádia Alzheimerovy choroby, ale neumožňuje nám vyléčení této choroby. Kvůli dosud komplexně nepopsané etiologii, nejsme schopni léčit Alzheimerovu chorobu kauzálně. Zatím existují pouze 2 farmakoterapeutické přístupy, které jsou založeny na důkazech. Prvním přístupem je inhibice cholinesteras, což má za následek zvýšení koncentrace acetylcholinu v mozku. Druhou terapeutickou možností jsou inhibitory NMDA receptorů glutamatergního systému [2].

Spektrum používaných sloučenin v terapii této choroby je omezené, proto se hledají další potenciální léčiva, včetně léčiv přírodního původu. Jednou z nových perspektivních látek přírodního původu, která se nedávno začala používat v klinické praxi v Číně, je alkaloid huperzin A izolovaný z *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis., který se dlouhodobě používá v tradiční čínské medicíně. Společně s větším množstvím informací o patofyziologii Alzheimerovy choroby se objevují nové možnosti jak terapeuticky ovlivnit vznik a rozvoj této choroby. Mezi látky, které jsou zkoumány, patří látky zasahující do aktivity transmembránových sekretas, inhibující prolyloligopeptidasu, zabraňující fosforylaci  $\tau$ -proteinu a další [3].

Tato diplomová práce byla zpracována na Katedře farmaceutické botaniky v rámci výzkumné skupiny ADINACO, která se zabývá studiem sekundárních metabolitů rostlin, které je zaměřeno na hledání látek potenciálně využitelných v terapii AD a na látky s protinádorovou aktivitou. Rostliny z rodu *Centaurea* jsou velice zajímavým zdrojem sekundárních metabolitů, u kterých jsou v mnoha vědeckých studiích popsány různé biologické aktivity. Právě proto byl tento rod vybrán ke studiu inhibice cholinesteras a cytotoxicity.

## 2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je:

- příprava sumárních a alkaloidních extraktů z nažek vybraných druhů rodu *Centaurea*
- analýza vzorků hmotnostní spektrometrií (GC-MS, ESI), interpretace získaných dat a porovnání údajů s daty v literatuře
- příprava vzorků na biologické testy (cytotoxicita, inhibice cholinesteras)
- otestování extraktů na cytotoxicitu a inhibici cholinesteras
- vyhodnocení výsledků biologických testů
- zhodnocení dosažených výsledků – výběr taxonu(ů) pro další studiu

# 3 TEORETICKÁ ČÁST

## 3.1 Alzheimerova choroba

Ve starší populaci představuje demence jeden z největších zdravotních problémů vůbec. Progresivně se zhoršuje kognice, nemoc také zasahuje do běžných denních úkonů a chování pacienta, což ve výsledku může vést až k nezpůsobilosti pacienta. Celosvětově přibližně 40 milionů lidí ve věku nad 65 let trpí demencí, z nichž 70 % je postiženo právě Alzheimerovou chorobou (AD). Tato čísla ukazují na to, že AD představuje nejrozšířenější formu demence. Věk hraje hlavní roli v incidenci AD, a proto s vyšším věkem vzrůstá i nebezpečí AD [4]. Poprvé byla tato neurodegenerativní porucha popsána před více jak jedním stoletím [5].

### 3.1.1 Epidemiologie

Míra prevalence AD se exponenciálně zvyšuje s věkem, výrazně po 65 letech věku. Uvádí se, že nárůst demencí a především AD mezi 65 – 80 lety věku je až patnáctinásobný [6]. Dle nejnovějších odhadů se předpokládá, že počet nových případů demence a AD se do roku 2050 zdvojnásobí a tím se tak výrazně zvýší socioekonomická zátěž po celém světě. Jedním z důvodů zdvojnásobení počtu demencí a AD je stárnutí populace. Incidence AD je obecně nižší v ekonomicky méně rozvinutých státech než Severní Americe a Evropě. Pro Čínu, Latinskou Ameriku a Indii je však předpovídán výrazný nárůst prevalence AD. Pro každou zasaženou zemi má tento efekt zvyšování demencí a AD zřetelné socioekonomické důsledky, které se projeví zvýšením nákladů na nemocniční péči a na zdravotnické pracovníky [7]. Výskyt AD v České republice se může pouze odhadovat, protože nemáme dostupná přesná data a velké množství lidí toto onemocnění ještě nemá diagnostikováno. Odhady však ukazují na to, že v roce 2015 bylo v České republice 155,9 tisíc lidí s demencí. Více toto onemocnění postihuje ženy než muže a to v poměru 2:1 [8].

## 3.1.2 Etiopatogeneze

Přesná etiopatogeneze AD není doposud známa, ale existuje několik teorií, které se snaží popsat vznik a příčinu této nemoci.

### 3.1.2.1 Změny v cholinergním systému

Pro všechny cholinergní neurony je acetylcholin (ACh) využíván jako neuromediátor. V centrálním i periferním nervovém systému hraje velmi důležitou roli. Cholinergní neurony jsou široce distribuovány v celé centrální nervové soustavě a můžeme říct, že téměř všechny oblasti mozku jsou jimi inervovány. ACh je syntetizován v cytoplazmě cholinergních neuronů z cholinu a acetylkoenzymu A za pomoci enzymu cholin acetyltransferasy. Po syntéze následuje transport ACh z cytosolu do synaptických vezikul, který je zprostředkovaný acetylcholinovým transportérem. Na postsynaptické části jsou acetylcholinové receptory, které mohou být ionotropní nikotinové a muskarinové, spřažené s G-proteinem. Depolarizací membrány cholinergních neuronů se exocytózou uvolňuje ACh do synaptické štěrbiny, může aktivovat muskarinové i nikotinové receptory [9].

Hydrolyza neurotransmiteru ACh je zprostředkována acetylcholinesterasou (AChE) a buytrylcholinesterasou (BChE). Zatímco AChE je vysoce selektivní pouze pro ACh, BChE může metabolizovat různé substráty. U pacientů s AD je aktivita AChE nižší a naopak u BChE je vyšší. Z toho vyplývá, že inhibitory obou enzymů AChE i BChE, mohou poskytovat daleko lepší terapeutickou odpověď než selektivní inhibitory AChE [10].

### 3.1.2.2 Senilní plaky

U AD můžeme pozorovat větší množství senilních plaků, než je tomu u běžného fyziologického stárnutí mozku. Senilní plaky můžeme v histologických řezech popsat jako nepravidelně okrouhlé, heterogenní útvary obsahující amyloid. Různé techniky nám umožňují je znázornit v mozkové kůře, podkorové šedi a kůře mozečku. Jedno z kritérií definitivní diagnózy AD je počet senilních plaků vztahovaný na plošnou jednotku mozkové kůry. Neuritické plaky poškozují kognitivní funkce, ale je zapotřebí je odlišit od fyziologických neuritických plaků, které doprovází stárnutí [11] [12].

### 3.1.2.3 $\beta$ -Amyloid

$\beta$ -Amyloid ( $\beta$ A) nebo také  $\beta$ -amyloidní protein se může chronicky ukládat extracelulárně i intracelulárně. Sekundární struktura  $\beta$ A je podobná  $\beta$ -skládanému listu. Při AD se tento protein, skládající se z 39 – 43 aminokyselin (AK), ukládá do jader senilních plaků a do stěn tepének [11].  $\beta$ A vzniká proteolytickým zpracováním svého prekurzoru, kterým je amyloidní prekurzorový protein (APP). Na několika subcelulárních místech je APP proteolyticky zpracován pomocí tří proteázových aktivit nazvaných  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasa. Rozlišujeme dva druhy proteolytického zpracování APP, neamyloidogenní dráhu a amyloidogenní dráhu. Neamyloidogenní dráha zabraňuje tvorbě  $\beta$ A a uplatňuje se zde především enzym  $\alpha$ -sekretasa. Proto zvýšení aktivity  $\alpha$ -sekretasy pro podporu neamyloidogenního zpracování APP má potenciálně určitou terapeutickou hodnotu. U AD se uplatňuje amyloidogenní dráha zpracování APP enzymem  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasa [13]. Degradace  $\beta$ A probíhá pomocí neprilysinu. Rovnovážný stav mezi produkcí a rychlostí degradace je především ve zdravém mozku. Akumulace  $\beta$ A tak vzniká při nerovnováze mezi produkcí a rychlostí degradace [14]. Amyloidové uloženiny, které nacházíme v senilních placích, jsou tvořeny 42 – 43 AK. Amyloid nacházející se v cévních stěnách se skládá z 39 – 40 AK. Forma  $\beta$ A 42 se účastní raných fází vývoje choroby a  $\beta$ A 40 pozdních fází. Ovlivnění tvorby proteinu  $\beta$ A 42 by se tak mohlo v budoucnu stát základním léčebným cílem, protože tato forma je považována za základní patogenetický článek při degenerativních procesech AD [11].

### 3.1.2.4 Neuronální klubka

$\tau$ -Protein je jedním z nejdůležitějších proteinů spojovaných s mikrotubuly v neuronech. Pokud je fosforylace tohoto proteinu v rovnováze, je  $\tau$ -protein vázán k mikrotubulům, kde se podílí na sestavování mikrotubulů a udržování struktury a stability neuronů. Pokud však je  $\tau$ -protein hyperfosforylován, tak dochází k jeho agregaci a vznikají párové helikální vláknité útvary, které nazýváme neuronální klubka [15]. Za hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu je zodpovědný enzym kinasa naopak defosforylaci zajišťuje enzym fosfatasa. Z toho vyplývá, že nežádoucím z této dvojice je enzym kinasa. Nejde však jen o jednu formu tohoto proteinu, ale je jich daleko více. Proto bylo vyvinuto významné výzkumné úsilí na identifikaci těchto kinas, jakož i na vývoj farmakologických léčiv k inhibici těchto molekul [16]. Dalšími posttranslačními modifikacemi  $\tau$ -proteinu může být zkrácení, ubikvitinizace, glykace, nitrace a sumoylace [17].

### 3.1.2.5 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je protein o velikosti 34 kDa a je zodpovědný za transport cholesterolu a dalších lipidů v plazmě a centrálním nervovém systému. Nejvíce je koncentrován v mozku a játrech. Humánní ApoE je tvořen 299 AK [18]. Umístění genu pro lidský ApoE je na chromozomu 19q13 a kóduje tři hlavní izoformy ApoE: ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Tyto tři izoformy se od sebe odlišují aminokyselinovými zbytky 112 a 158, které mají zásadní vliv na strukturu a funkci ApoE. Především jde o vliv na molekulární a buněčné úrovni a jsou spojeny neuropatologickými stavy jako je AD. Genetickou analýzou v roce 1993 bylo identifikováno, že ApoE4 je hlavním rizikovým faktorem AD. Bezprostředně po této analýze byl ApoE2 označen jako ochránce před AD [19]. U heterozygotních nosičů ApoE4 je zvýšení rizika nástupu AD dvojnásobné až trojnásobné a u homozygotních nosičů ApoE4 dokonce až dvanáctinásobné. U obou nosičů dochází ke snížení věku nástupu o 8 let. Je tedy jasné, že ApoE4 má hluboký dopad na patogenezi AD, avšak mechanismus této patogeneze zatím není znám. Pochopení molekulárního dopadu ApoE4 na AD by však mohlo vést k vývoji nových terapeutik pro léčbu AD [20].

### 3.1.2.6 Gliové buňky, zánětlivé mechanismy a oxidativní stres

V centrálním nervovém systému (CNS) jsou mikroglie rezidentními imunitními buňkami. Také jsou primárními mediátory neuronálního zánětu, který je jedním z mechanismů neurodegenerace u AD [21]. Proliferace a aktivace mikroglíí v mozku je významným znakem AD. Mikroglie se koncentrují kolem amyloidních plaků a díky dostupným informacím o lidské genetice je usuzováno, že hrají klíčovou úlohu v patogenezi AD. Mikroglie jsou fagocyty v CNS, jež neustále zkoumají prostředí a udržují tkáň CNS. Jsou odpovědné za imunitní odezvu a brání CNS proti patogenům. Při zvýšené hladině  $\beta$ A mikroglie fagocytují a čistí  $\beta$ A agregáty. Následně mikroglie  $\beta$ A agregují v hustých jádrových placích a chrání tak neurony. Nedostatečná funkce mikroglíí může být následkem stárnutí nebo genetické náchylnosti. Familiární typ AD je spíše vzácností a většina případů AD je sporadická. Zdá se, že AD s pozdním nástupem je především zapříčiněna kombinací genetických a environmentálních faktorů včetně stárnutí, které má největší podíl [22].

Poblíž amyloidových depozit je zvýšená exprese histokompatibilních antigenů II. třídy, což mají za následek mikroglie a jejich imunitní aktivita. Při AD se dají v mikroglíích

prokázat vysoké počty receptorů I. třídy MHC (major histocompatibility complex), C3 a C1q složek komplementu, interleukinu-1 (IL-1) a ferritinu. Neurotoxické cytokiny mohou být potenciálně vylučovány imunitně aktivovanými mononukleárními fagocyty. Je tedy patrné, že svůj podíl na tvorbě senilních plak a patogenezi AD má aktivace mikroglií. Další zajímavostí je, že ApoE3 blokuje aktivaci mikroglií, která je způsobena  $\beta$ A a ApoE4 tuto aktivaci neblokuje.

Mikroglie v průběhu své akutní aktivace vytváří cytokin IL-1, který dále zvyšuje míru syntézy tromboplastinu, C3 složky komplementu, ApoE3,  $\alpha$  1-antichymotrypsinu a APP  $\beta$ A. V mozcích lidí, kteří trpí AD, se prokazuje přítomnost interleukinu-6, jenž je jedním z hlavních mediátorů zánětlivé odpovědi. Mohla by zde tedy být teoretická možnost terapeutického ovlivnění vývoje AD nesteroidními antiflogistiky. Dalším mediátorem zánětu je CAP 37 (kationový antimikrobiální protein), který způsobuje přilnutí monocytů ke kapilárním endotelu. Buňky kapilárního endotelu na tyto mediátory zánětu reagují další tvorbou  $\beta$ A. Je tedy zřejmé, že poškození neuronů se ještě zvětšuje [11].

Jednou ze společných charakteristik neurodegenerativních onemocnění je vztah mezi oxidativním stresem (OS) a neuronální apoptózou. OS je stav, ve kterém je celkem významně narušena rovnováha mezi produkcí reaktivních druhů kyslíku (ROS) a antioxidanty, což má za následek poškození buněk. ROS dokáží chemicky interagovat s biologickými molekulami, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a lipidy. V patogenezi AD hraje OS významnou roli, ale přesné mechanismy vzniku redoxní nerovnováhy a volných radikálů nejsou známy. Je prokázáno, že abnormální akumulace  $\beta$ A podporuje tvorbu ROS. Dále je známo, že OS zvyšuje produkci a agregaci  $\beta$ A a také usnadňuje fosforylaci a polymeraci  $\tau$ -proteinu [23].

Neenzymatický proces, jež probíhá nekontrolovaným způsobem se jmenuje peroxidace lipidů (LPO), kterou můžeme popsat jako proces, při kterém volné radikály napadají lipidy obsahující dvojnou vazbu uhlík – uhlík [24]. U jedinců s AD se v nemocných oblastech mozku vyskytují markery LPO, které lze detekovat také v periferních tekutinách a může se tak zvýšit včasná detekce subjektů během prodromální fáze [25].

### **3.1.2.7 Amyloidní angiopatie**

Hlavní příčinou u mnoha neurodegenerativních onemocnění je selhání eliminace proteinů, které se poté hromadí ve stěnách mozkových kapilár a tepen. Pro amyloid uložený v cévní stěně se používá termín cerebrální amyloidní angiopatie (CAA) [26]. U 85 – 95 %



pacientů s AD je identifikována akumulace vaskulárního amyloidu. Nejsou však zcela objasněny mechanismy, které jsou zodpovědné za patogenezi CAA a za následné účinky na mozek [27]. Častým nálezem hrajícím poměrně důležitou roli ve vývoji kognitivního poklesu jsou ischemické léze. Pokročilá CAA může způsobit jak ischemické poranění mozku, tak hemoragické poranění mozku. Díky škodlivým účinkům na stavbu cév a jejich funkci, zvyšuje CAA náchylnost k mozkovému infarktu [28].

### 3.1.3 Příznaky

Velmi mírná nebo mírná AD se může projevovat proměnlivými, ale významnými změnami a mírnými až středně těžkými poruchami v kognitivních, funkčních a behaviorálních doménách. U stárnutí normálního jedince obvykle pozorujeme dlouhodobé udržení osobnosti, zájmů, iniciativy, motivace, empatie, ovlivnění a chování. Roky před tím než, je AD diagnostikována jsou typickými příznaky změny nálady, spánku a úzkosti. V časných nebo předklinických stádiích převažuje nadměrná úzkost, depresivní symptomy apatie. Pro pozdější stadia AD je typickým příznakem zhoršený úsudek, dezorientace, zmatenost, velké změny chování jako je agresivita a agitace. Dále také neuropsychiatrické symptomy, mezi něž můžeme zařadit bludy a halucinace. Prvním krokem účinné péče je rozpoznání a odpovídající hodnocení těchto příznaků [29].

### 3.1.4 Diagnóza

Sporadické neurodegenerativní stavy může být velmi obtížně včasné diagnostikovat, zejména pokud pacienti vykazují nespecifické symptomy, které lze přičítat jakékoli formě demence nebo neurodegenerativní choroby [30]. V současné době je diagnostika a klasifikace AD založena na klinických a neuropsychologických vyšetřeních, které jsou doplněny o neurografické studie. Nicméně přesvědčivá diagnóza je stále opřena o patologické vyšetření mozkové tkáně, která probíhá *post mortem*. Pro diagnostiku AD bylo navrženo mnoho experimentálních biomarkerů. Nejrozšířenějšími však jsou hladiny  $\tau$ -proteinu a  $\beta$ A, které jsou doplněny o zobrazovací metody, jako je uhlíková pozitronová emisní tomografie. Nedostatek adekvátních zdravotnických zařízení a zvýšené náklady zapříčiňují, že tato diagnostika není dostupná všem pacientům s demencí [31]. Za pomoci typických klinických příznaků určujeme takzvanou pravděpodobnou diagnózu. Mezi

tyto typické klinické příznaky řadíme orientaci, rozsah pozornosti, pozornost a počítání, paměť a řeč [11].

### **3.1.5 Rizikové faktory**

Rizikové faktory AD jsou dobře známy. Můžeme je rozdělit na modifikovatelné, mezi něž řadíme špatnou životosprávu, nízkou úroveň vzdělání, fyzickou a duševní nečinnost, obezitu, kouření, znečištění ovzduší, hypertenzi, cukrovku, vyšší hladinu cholesterolu v krvi a kardiovaskulární onemocnění. Mezi nemodifikovatelné rizikové faktory řadíme věk, ženské pohlaví, etnický původ (černoši) a genetické faktory [32].

### **3.1.6 Farmakoterapie**

V posledním desetiletí byla velká část výzkumu zaměřena na léčbu, která by byla schopna změnit průběh AD. Výzkum této léčby tedy převažoval nad výzkumem léčby, která by byla cílená proti symptomům AD [33]. V současné době zahrnuje farmakoterapie AD hlavně inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) a antagonisty *N*-methyl-D-aspartátového receptoru (NMDA). Tyto dvě možnosti farmakoterapie však nabízí pouze symptomatickou léčbu a neřeší příčinu nemoci [34].

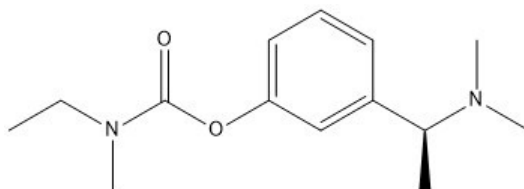
#### **3.1.6.1 Inhibitory acetylcholinesterasy**

Inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) snižují fyziologický rozklad ACh tím, že blokují enzym AChE v synaptické štěrbině, která je zodpovědná za fyziologický rozklad ACh [29]. Zjistilo se, že AChEI mají i další neuroprotektivní účinky jako ovlivnění metabolismu amyloidního prekurzorového proteinu, neuroprotektce zprostředkovaná skrze nikotinové ACh receptory, modulace muskarinových ACh receptorů a inhibice *N*-methyl-D-aspartátových receptorů [35]. Nežádoucí účinky AChEI se vyskytují v gastrointestinálním traktu (GIT) a také se může objevit nespavost. Minimalizovat tyto nežádoucí účinky můžeme podáním v dopoledních hodinách a po jídle [29].

##### **3.1.6.1.1 Rivastigmin**

Rivastigmin dokáže inhibovat AChE i BChE a je mozkově selektivní [36]. Rivastigmin je silný, pomalu reverzibilní karbamátový inhibitor. V zemích EU byl schválen k léčbě mírné až střední AD. Způsob podání je orálně a kapalně za přítomnosti GIT nežádoucích účinků.

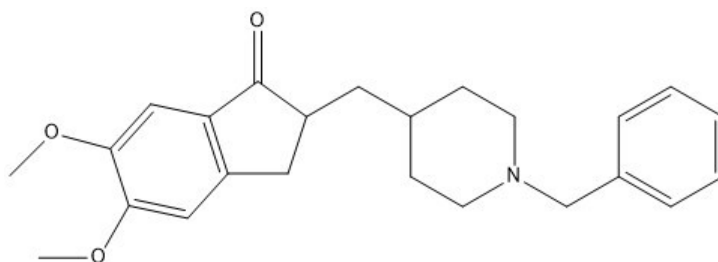
Ke snížení může být rivastigmin podán transdermálně. Při denních dávkách 6 až 12 mg rivastigminu byly pozorovány příznivé účinky na rychlost poklesu kognitivních funkcí, aktivit denního života a závažnosti demence. Při léčbě Lewyho tělísek a demence Parkinsonovy choroby se rivastigmin také uplatní [37].



Obrázek 1 rivastigmin

### 3.1.6.1.2 Donepezil

Donepezil je rychle reverzibilní selektivní inhibitor AChE vázající se na periferní aniontové místo. Při léčbě AD vykazuje symptomatické účinky a navíc oddaluje ukládání amyloidního plaku. Terapeutickým použitím donepezilu je paliativní léčba mírné až střední AD, ale také zlepšuje symptomy u pacientů s těžkou formou AD. Bylo zjištěno, že donepezil má menší GIT nežádoucí účinky než rivastigmin a galantamin. Jeho biologická dostupnost je velmi dobrá a díky svému dlouhému poločasu účinku je podáván jednou denně. Na začátku terapie se začíná s dávkou 5 mg a po pár týdnech se zvyšuje na 10 mg denně [37].

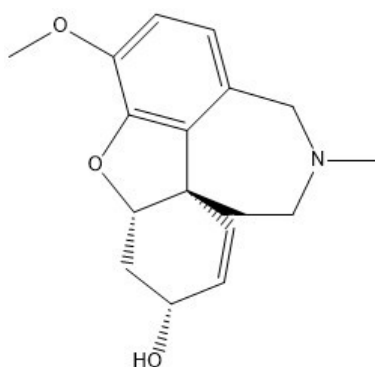


Obrázek 2 donepezil

### 3.1.6.1.3 Galantamin

Galantamin je alkaloid izolovaný z rostlinných zdrojů čeledi Amaryllidaceae a nyní je i syntetizován. Je využíván k léčbě mírné až střední AD [37]. Stejně jako donepezil je galantamin rychle reverzibilní inhibitor AChE a má další alostericky zvyšující účinky na nikotinové receptory. Tato funkce přispívá nejen k ochraně neuronů proti neurotoxickým podnětům, ale zároveň zvyšuje uvolňování neurotransmiterů, jako je dopamin, noradrenalin

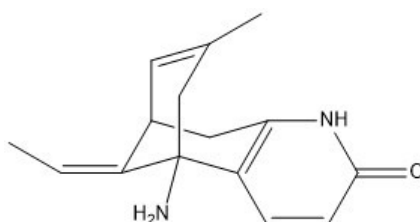
a glutamát [38]. Tyto účinky mohou zlepšit kognitivní dysfunkci a psychiatrické onemocnění u schizofrenie, velké deprese, bipolární poruchy alkoholismu. Léčba se zahajuje dávkou 4 mg 2× denně a postupně je zvyšována na 12 mg 2× denně. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u donepezilu a rivastigminu. Pečlivá a postupná titrace dávek, která může trvat i více než 3 měsíce, může zlepšit dlouhodobou snášenlivost [37].



Obrázek 3 galantamin

#### 3.1.6.1.4 Huperzin A

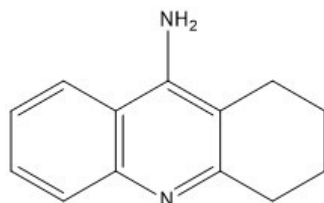
Huperzin A je přírodním alkaloidem pocházejícím z rostliny *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis nebo je také možno ho syntetizovat. Huperzin A prokázal lepší prostupnost hematoencefalickou bariérou než ostatní AChEI. Jeho inhibice AChE je delší a má také vyšší perorální biologickou dostupnost než ostatní inhibitory [37]. Má příznivé účinky na zlepšení kognitivních funkcí, každodenní aktivity a klinické hodnocení pacientů s AD [39].



Obrázek 4 huperzin A

### 3.1.6.1.5 Takrin

Takrin byl v roce 1993 jako první z inhibitorů AChE schválen pro léčbu AD. Od jeho použití však bylo upuštěno kvůli významné hepatotoxicitě [37]. V roce 1998 byl proto stažen z trhu. Stále však jsou aktivní snahy o syntézu derivátů takrinu s menší hepatotoxicitou [40].



Obrázek 5 takrin

### 3.1.6.2 Antagonisté NMDA receptorů

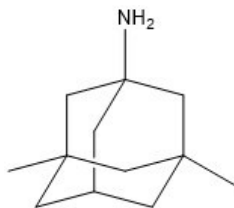
NMDA receptor je ligand glutamátu, který je primárním excitačním neurotransmiterem v lidském mozku. Pokud je aktivita NMDA receptoru abnormální, pak je spojena s křečemi, ischemickou mrtvicí a neurodegenerativními chorobami, mezi něž řadíme AD, Huntigtonovou a Parkinsonovu chorobu. Pro přežití neuronů a synaptickou plasticitu je kritická excitační neurotransmise glutamátu. Pokud je však aktivita NMDA receptoru nadměrná, tak dochází k excitotoxicitě a podpoře buněčné smrti, což může být základem mechanismu neurodegenerace, k níž dochází při AD. Z toho vyplývá, že inhibicí NMDA receptoru se snižuje neurotoxicita způsobená glutamátem [41].

#### 3.1.6.2.1 Memantin

Excitotoxicitu zprostředkovanou NMDA receptory inhibuje účinek memantinu. Je nekompetitivním antagonistou NMDA receptoru se silnou závislostí na napětí a rychlou kinetikou odblokování. Memantin zabraňuje patologickému přítoku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buňky a oxidativnímu stresu. Je schopen selektivně blokovat patologickou aktivaci NMDA receptoru a zároveň zachovávat fyziologickou synaptickou aktivaci těchto receptorů [42].

Při monoterapii memantinem dochází ke zlepšení kognice, chování, aktivity každodenního života a stadium demence. Navíc je léčba dobře tolerována u pacientů s AD. Terapie memantinem může být také doplněna o AChEI [43]. Nežádoucí účinky monoterapie memantinem jsou závratě, deprese, zvýšení hmotnosti, zácpa a bolesti zad. Pro snížení rizika

nežádoucích účinků je dobré dávku titrovat. Začíná se dávkou 5 mg denně a každý týden se dávka zvedne o 5 mg denně do udržovací dávky 20 mg [44].



Obrázek 6 memantin

### 3.1.6.3 Nové přístupy v terapii

Současná léčba AChEI a memantinem je v podstatě pouze symptomatická. Tato terapie nedokáže zastavit progresi demence, ale spíše vede k dočasnému zpomalení ztráty kognitivních funkcí. Většina klinických studií při vývoji nových terapeutických alternativ, skončila v důsledku nežádoucích účinků nebo nedostatku terapeutické účinnosti [45].

Předpokládá se, že cholinergní neurotransmisi můžou zvyšovat antagonisté receptoru 5-HT<sub>6</sub> (serotoninový receptor). Jednou z takových látek je idalopirdin, který měl velice slibné údaje z klinických testů. Ve fázi III klinického testování však nesplňoval svoji účinnost. Ve fázi testování však zůstává další látka ze skupiny těchto antagonistů receptoru 5-HT<sub>6</sub> a to intepirdin. Hodnocení léčby zatím ukazuje, že přidání této látky pacientům užívajícím donepezil může zlepšit kognitivní funkce u mírné až středně závažné AD [45].

Další možnou terapií je inhibice  $\beta$ -sekretasy (BACE). Je to enzym, který hraje klíčovou roli při tvorbě  $\beta$ A a je tedy možným léčivým cílem pro modulaci produkce  $\beta$ A. První generace těchto inhibitorů však selhala díky nízké perorální biologické dostupnosti a nízkému průchodu přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Bohužel ani druhá generace BACE inhibitorů neprošla klinickým testováním a to kvůli jaterní toxicitě. Třetí generace prokázala uspokojivou farmakokinetiku a to především látky E2609, AZD3293, CNP520 a JNJ-54861911. Látka verubecestat redukuje  $\beta$ A v CNS, ale v roce 2017 společnost Merck kvůli nedostatku účinnosti ukončila klinickou studii u pacientů s mírnou až středně závažnou AD [45].

Další terapie, která by se v budoucnu mohla uplatnit je inhibice  $\gamma$ -sekretasy. Tento enzym je komplexem majícím 4 podjednotky, z nichž každá z podjednotek je potenciálním cílem terapeutik pro modulaci produkce  $\beta$ A nebo zvýšení jeho odbourávání. Jednou z testovaných látek byl semagacestat, který však vykazoval zhoršující se symptomy

u některých pacientů a proto bylo testování ukončeno. Avagacestat byl dalším inhibítorem  $\gamma$ -sekretasy, jenž způsoboval cerebrální mikrokrvácení, glykosurii závislou na dávce a nemelanomovou rakovinu kůže. EVP-0962 je perorálním selektivním modulátorem  $\gamma$ -sekretasy, který má za následek štěpení kratších a méně toxických  $\beta$ A bílkovin. Jeho klinické studie byly také přerušeny. Nyní se v testování objevuje cyklický cukerný alkohol pinitol, který je modulátorem  $\gamma$ -sekretasy a snižuje tak produkci  $\beta$ A [45].

Dalším terapeutickým přístupem k AD je imunoterapie prostřednictvím aktivní a pasivní imunizace proti  $\beta$ A. První publikovaná zpráva o imunoterapii se objevila již v roce 1999. Z důvodu meningoencefalitidy u 6 % pacientů s mírnou až středně těžkou AD byla přerušena klinická studie látky AN-1792. Další látkou, u které studie stále probíhají je látka CAD106. Jednou z nejpokročilejších strategií léčby AD je pasivní imunizace proti  $\beta$ A. Různých fázích klinického testování se nyní nachází několik látek, z nichž mezi nejvýznamnější řadíme crenezumab, solanezumab, gantenerumab a aducanumab. V klinickém testování jsou také látky, které zvyšují odbourávání fosforylovaného  $\tau$ -proteinu. Můžeme sem zařadit AADvac1 nebo ACI-35. Intravenózní podávání imunoglobulinů je dalším přístupem pasivní imunizace. Je to přirozeně se vyskytující protilátka z krevní plazmy zdravých dárců a může směřovat proti tvorbě  $\beta$ A. Prozatímni výsledky klinických testů jsou příslibem imunizační léčby AD [45].

Chronický vysoký krevní tlak zvyšuje riziko demence. Nilvadipin je blokátorem kalciových kanálů pro léčbu hypertenze a na myších modelech s AD snižuje hladiny a zlepšuje odbourávání  $\beta$ A přes HEB. Byla již dokončena třetí fáze studie a výsledky nyní čekají na prezentaci [45].

Plazmaferéza je další možností terapie AD. Je to metoda, při které je vyměňována plazma s navázaným  $\beta$ A za plazmu bez  $\beta$ A. Snižením hladiny  $\beta$ A v krvi tak dochází i ke snížení v likvoru, protože koncentrace mezi nimi se neustále ustaluje [46].

Výzkum však probíhá také na poli nových lékových forem u již používaných léčiv. U některých léčiv je totiž problém s přechodem přes HEB a nebo nežádoucími účinky. Například rivastigmin se může podávat intranasální mikroemulzí pro zvýšení přestupu přes HEB nebo transdermální náplastí pro snížení GIT nežádoucích účinků [36].

Prolyloloigopeptidasa (POP) je enzym vysoce exprimovaný v mozku, který selektivně hydrolyzuje oligopeptidy štěpením peptidových vazeb prolinového zbytku. POP je účastníkem několika procesů v mozku, jako je učení, paměť, a nálada. POP je také spojována s neurodegenerativními procesy, které se vyskytují u AD. V současné době již bylo v

předklinických studiích hodnoceno několik inhibitorů POP jako potenciálních léčiv pro léčbu deficitu přirozené paměti, ke kterému dochází při stárnutí nebo při patologické ztrátě paměti charakteristické pro Alzheimerovu chorobu [47].

### **3.1.6.3.1 Alzheimerova choroba a diabetes mellitus**

Existuje také určitá spojitost mezi AD a diabetes mellitus typu 2 (DM2). U některých pacientů s DM2 totiž byla hlášena změna v kognici a to i přesto, že u nich nebyla demence ani AD diagnostikována. Je tedy pravděpodobné, že DM2 zvyšuje konverzi z amnestického mírného kognitivního poškození na AD. Podle klinických dat je tedy jasné, že zvýšenou pravděpodobnost vzniku demence a AD mají právě pacienti s DM2. Vzájemný vztah těchto dvou nemocí utvrzuje fakt, že pacienti trpící AD jsou ve vyšším riziku rozvoje DM2 nebo zhoršení tolerance glukosy [48].

Metformin je biguanid, který snižuje kardiovaskulární riziko, jaterní lipogenezi a oxidační stres. Mechanismy působení metforminu nejsou dosud zcela objasněny, je však jisté, že metformin inhibuje produkci glukózy v játrech a zvyšuje příjem glukózy v periferních tkáních. To má za následek snižování hladiny glukózy v krvi. Důležitou dráhou pro účinek metforminu při AD je AMPK-dependentní dráha (adenosinmonofosfát aktivovaná proteinkinasa). Bylo prokázáno, že AMPK reguluje fosforylaci  $\tau$ -proteinu a tvorbu  $\beta$ A. Aktivací AMPK se inhibuje produkce  $\beta$ A a fosforylace  $\tau$ -proteinu. Aktivační účinek metforminu na AMPK je tedy nepřímý a to díky inhibici komplexu I elektronového transportního řetězce potřebného pro mitochondriální dýchání, což má za následek energetický deficit a aktivaci AMPK. Toto je jedna z cest jak může být metformin prospěšný pacientům s AD. Celkově metformin zvyšuje defosforylaci  $\tau$ -proteinu, snižuje produkci  $\beta$ A, má antioxidační a protizánětlivé účinky. Existuje tedy spousta důkazů o tom, že metformin je vhodný, bezpečný a levný lék, který je možnou budoucí alternativou v terapii AD [48].

### **3.1.6.3.2 Alzheimerova choroba a rakovina**

AD a rakovina jsou hlavními rizikovými faktory, které ohrožují lidské zdraví a život zejména u starších osob. Incidence obou onemocnění se zvyšuje s věkem. Řada studií v nedávné době odhalila inverzní vztah mezi těmito onemocněními. Většina druhů rakoviny totiž snižuje riziko výskytu AD. Lidé s rakovinou mají o 35 % nižší riziko výskytu AD a naopak lidé trpící AD mají o 43 % nižší riziko výskytu rakoviny. Takový jev poukazuje na určitou



interakci mezi oběma chorobnými stavy, pravděpodobně se jedná o typ kompetitivního buněčného procesu. Je však zapotřebí udělat ještě další epidemiologické studie, které by tento vztah dále potvrdily a zda tento jev souvisí s různými typy rakoviny a s užíváním léků proti rakovině [49]. Významný je neuroprotektivní účinek chemoterapie. Může totiž být dalším možným zásahem u AD a to zejména paklitaxel, docetaxel a další mikrotubuly stabilizující látky [50].

#### **3.1.6.4 Doplnková terapie u pacientů s AD**

Terapie AD by se neměla soustředit pouze na farmakologickou léčbu, ale velice důležitá je také nefarmakologická léčba spočívající v psychoterapeutických a socioterapeutických přístupech. Mezi hlavní nefarmakologické přístupy patří cvičení a motorická rehabilitace, kognitivní rehabilitace, nefarmakologická terapie pro behaviorální a psychologické symptomy demence, psychologická terapie, doplňková a alternativní medicína [4].

K AD je přidružena deprese a úzkost. Léčba těchto dvou onemocnění je pouze symptomatická. Mohou se použít benzodiazepiny, ale jen v co nejnižší dávce a po co nejkratší dobu, co je to nutné. Vhodnější je použití venlafaxinu, který patří do SNRI (inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu) antidepresiv nebo citalopramu patřícího do SSRI (inhibitory zpětného vychytávání serotoninu) antidepresiv. Dále se používají také antipsychotika risperidon a quetiapin. Antipsychotika by se měla používat pouze za velmi zvláštních okolností a to při těžké, nezvládnutelné úzkosti [51].

Při AD dochází ke snížení neuronálního metabolismu, proto jsou používány nootropní farmaka, jež zvyšují mozkový metabolismus. Mezi nejznámější a nejpoužívanější můžeme zařadit piracetam a standardizovaný extrakt z rostliny *Ginkgo biloba* L., který je komplexním rostlinným nootropním farmakem. Volné kyslíkové radikály mají také uplatnění v patogenezi AD. K jejich likvidaci jsou využívány zhášeče (zametače), mezi něž patří vitamin E, vitamin C, retinol a další. Mezi zhášeče jsou počítány i přírodní antioxidanty a proto je vhodné zvýšit příjem ovoce a zeleniny, kde se přírodní antioxidanty vyskytují [11].

## 3.2 Cytotoxicita

Cytotoxicita je jednou z biologických aktivit. Je to schopnost buněk nebo chemických látek ničit buňky. Měří se *in vitro* na různých buněčných liniích.

### 3.2.1 Cytotoxické látky přírodního původu

#### 3.2.1.1 Vinkristin

Vinkristin je přirozeně se vyskytující alkaloid izolovaný z listů rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., který má široké spektrum klinických aplikací. Extrakty rostliny nalézají uplatnění při hojení ran, diabetických vředech, DM2 a při rakovinné terapii. Vinkristin je znám jako účinná látka pro chemoterapii neoplastických onemocnění. Jeho farmakologická aktivita souvisí s inhibicí dynamiky mikrotubulů, což vede k mitotickému zastavení a smrti buňky. Vinkristin destabilizuje mikrotubuly indukci depolymerizace mikrotubulů a destrukcí mitotického vřetenka [52].

#### 3.2.1.2 Vinblastin

Vinblastin je další alkaloid izolovaný z rostliny *Catharanthus roseus* (L.) G. Don., který působí interakci s mikrotubuly. Společně s Vinkristinem jsou terapeuticky nejvýznamnějšími Vinka alkaloidy. Mechanismus účinku spočívá v inhibici polymerizace tubulinu [53].

#### 3.2.1.3 Alkaloidy čeledi *Amaryllidaceae*

Bylo prokázáno, že čeleď *Amaryllidaceae* je dobrým zdrojem unikátních alkaloidů s velkým biologicky aktivním spektrem. Zájem o tuto skupinu přirozeně se vyskytujících sloučenin vzrůstal díky široké škále bioaktivit, mezi něž řadíme protinádorovou, antivirovou, antibakteriální, antifungální, antimalarickou, analgetickou a cytotoxickou aktivitu. Hlavní léčebné použití alkaloidů z této čeledi reprezentuje galantamin, který je komerčně dostupný jako lék proti AD. První z izolovaných alkaloidů s protinádorovou aktivitou byl v roce 1877 lykysin a to z rostliny *Narcissus pseudonarcissus* L. a další následovaly. Dalšími izolovanými alkaloidy s protinádorovou aktivitou z této čeledi jsou narciclasin, narciclasin-4-O- $\beta$ -D-glukopyranosid, hemanthamin, hemanthidin, bulbispermin, pretazettin a jonquailin [54].

### 3.2.1.4 Paklitaxel

Paklitaxel je rostlinný alkaloid izolovaný z *Taxus brevifolia* Nutt., jehož obchodní název je taxol. Má antimikrotubulární účinek tím, že podporuje stavbu mikrotubulů z tubulinových dimérů. Takto vytvořené mikrotubuly ještě stabilizuje tím, že dokáže inhibovat jejich depolymerizaci. Mikrotubulární síť, která je nezbytná pro interfázi a mitotickou funkci buněk, tak díky této stabilizaci není schopna se normálně dynamicky reorganizovat. Paklitaxel je schválen k léčbě rakoviny vaječníků, prsu, plic a Kaposiho sarkomu. Jeho použití mimo schválené indikace je například k léčbě gastroezofageálního, endometriálního a cervikálního karcinomu [55].

### 3.2.1.5 Podofylotoxin

Podofylotoxin je přirozeně se vyskytující lignan. Tato sloučenina je původně a běžně izolována z kořenů a oddenků rodu *Podophyllum*. Podofylotoxin a jeho příbuzné lignany patří do skupiny významných produktů, které vykazují různé biologické aktivity, mezi něž řadíme cytotoxickou, insekticidní, antifungální, antivirovou, protizánětlivou, neurotoxickou, imunosupresivní, antirevmatickou, antioxidační a hypolipidemickou aktivitu [56]. Mechanismus účinku podofylotoxinu je inhibice polymerizace mikrotubulů, ale jeho deriváty etoposid a teniposid mají mechanismus účinku odlišný, a to inhibice DNA topoisomerasy II, která je zodpovědná za rozplétání a opětovné splétání dvojšroubovice DNA [53].

### 3.2.1.6 Cytotoxické látky z rodu *Centaurea* L.

Také v rostlinách z rodu *Centaurea* L. bylo nalezeno několik cytotoxických látek. Například extrakt z *Centaurea cyanus* L. vykazoval nízkou cytotoxicitu bez buněčného poškození nebo buněčné smrti. Významný cytotoxický účinek naopak vykazoval 80% methanolvý extrakt z *Centaurea alexanderina* (Delile) a to proti buněčné linii plic A-495. Z další studie se ukázalo, že druhy *Centaurea jacea* L., *Centaurea spinulosa* Rochel ex Spreng. a *Centaurea biebersteinii* DC. mají silnou cytotoxickou aktivitu proti cervikálním HeLa a epidermálním A431 buněčným liniím. Tyto druhy také vykazují cytotoxickou účinnost proti buněčným liniím MCF-7 u karcinomu prsu. *Centaurea musimomum* Maire vyazuje cytotoxickou aktivitu proti buňkám získaným z člověka trpícího karcinomem nosohltanu. Algerianin izolovaný z rostliny *Centaurea africana* Lam. má významný cytotoxický účinek na lidských myeloidních buňkách leukemických buňkách HL-60. Také seskviterpenový lakton

knicin má cytotoxickou aktivitu proti několika buněčným liniím. Silice z *Centaurea behen* L. vykazovala také cytotoxickou aktivitu [57].

## 3.3 . Rod *Centaurea* L.

### 3.3.1 Systematické zařazení [58]

Tabulka 1 Systematické zařazení

Podříše	Tracheobionta	Cévnaté rostliny
Oddělení	Magnoliophyta	Krytosemenné
Třída	Rosopsida	Vyšší dvouděložné
Řád	Asterales	Hvězdicotvaré
Čeleď	Asteraceae	Hvězdicovité
Rod	<i>Centaurea</i> L.	Chrpa

### 3.3.2 Popis druhů

V rodu *Centaurea* L. bylo nalezeno přes 500 druhů chrp [59]. V experimentální části byly zkoumány pouze jednotlivě vybrané druhy tohoto rodu, a proto jsou detailněji popsány níže.

#### 3.3.2.1 *Centaurea cyanus* L . – chrpa modrá



Obrázek 7 *Centaurea cyanus* L. [60]

Jednoletá rostlina s lodyhou přímou, až 80 cm vysokou, často větvenou. Lodyžní listy jsou čárkovitě kopinaté, do 6 mm široké. Úbory jsou jednotlivé, v průměru mají do 3 cm. Květy jsou modrofialové uprostřed a výrazně modré při okrajích, někdy s růžovým nádechem, občas i bílé. Plodem je podlouhle vejcovitá nažka. Rostlina pochází z jihovýchodní Evropy a roztrousila se společně s obilím po celé Evropě. Později se rozšířila také do Severní a Jižní Ameriky a Austrálie. Nejčastěji se vyskytuje především na úhorech a na polích, nejčastěji obilných. Kvete od června do srpna [61].

### 3.3.2.2 *Centaurea jacea* L. – chrpa luční



Obrázek 8 *Centaurea jacea* L. [62]

Vytrvalá, 50–120 cm vysoká rostlina. Lodyha vystoupavá až přímá, jednoduchá nebo v horní polovině řídce větvená, hranatá. Přízemní listy dlouze řapíkaté, celistvé až peřenodílné, lodyžní střídavé, řapíkaté až přisedlé, celistvé, vejčité až kopinaté, zubaté nebo pilovité. Úbory vyrůstají jednotlivě nebo po dvou na koncích větví, skládají se z trubkovitých květů, jazykovité květy chybí. Průměr úboru je přibližně 4 cm. Jednotlivé květy pěticipé, růžové až růžovofialové. Plodem je nažka. Rozšířena je přes Španělsko, Francii, střední Skandinávii, sever Ruska, sever Itálie, střední Balkán, Ukrajinu až po Ural. Zavlečena také do Severní Ameriky, Argentiny a Chile. Roste na loukách, pastvinách, okrajích lesů, v příkopech a na mezích. Kvete od července do září [62].

### 3.3.2.3 *Centaurea scabiosa* L. – chrpa čekánek



Obrázek 9 *Centaurea scabiosa* L. [63]

Vytrvalá, 30–150 cm vysoká bylina. Lodyha přímá, v horní části větvená, hranatá, olysá až řídce chlupatá. Listy střídavé, peřenosečné, přízemní a dolní lodyžní listy dlouze řapíkaté, střední a horní krátce řapíkaté až přisedlé, 4–15 cm dlouhé, lysé až roztroušeně drsně chlupaté. Úbory vyrůstají jednotlivě na koncích větví, skládají se z trubkovitých květů, jazykovité květy chybí. Průměr úboru je přibližně 4 cm. Jednotlivé květy pěticipé, purpurově červené. Plodem je nažka. Rozšířena od Britských ostrovů, Francii, Německo, sever Itálie, střední a východní Evropu, střední Skandinávii, sever Balkánu, jižní část Ruska k Bajkalu. Druhotný výskyt je také v Severní Americe. U nás je její výskyt rozšířen téměř na celé území od nížin po vrchoviny. Typicky roste na loukách, mezích, v lesních lemech, na křovinatých stráních a v příkopech. Kvete od července do září [63].



### 3.3.2.4 *Centaurea pseudophrygia* C. A. Meyer – chrpa parukářka



Obrázek 10 *Centaurea pseudophrygia* C. A. Meyer [64]

Vytrvalá rostlina. Kořen je poměrně krátký, ale tlustý a větvenovitý. Lodyhy jsou přímé, až 130 cm dlouhé, v horní třetině až polovině větvené, řídce chlupaté krátkými pokroucenými mnohobuněčnými chlupy a s řídkými přisedlými žlázkami. Listy jsou celistvé, na okrajích oddáleně ostře zubaté, v mládí krátce chlupaté. Přízemní růžice listů je za květů odumřelá. Dolní listy řapíkaté, od střední části lodyhy jsou listy přisedlé, vejčité až podlouhlé, směrem k vrcholu se jen málo zmenšují. Horní listy jsou na bázi většinou poloobjímavé nebo zaokrouhlené. Květenstvím je úbor, veliký 4 – 5 cm v průměru, barvy růžové až růžově fialové, jednotlivé. Zákrov je kulovitý až válcovitý. Přívěsky středních a vnějších zákrovních listenů na bázi černé nebo černohnědé, v horní části černohnědé, většinou zcela zakrývají zákrovní listeny, na konci hřebenitě členěná vrcholová část (včetně koncové třásně). Nejdelší přívěsky i s třásněmi jsou velmi výrazně ven vyhnuté a vytvářejí okolo zákrovu hustou „paruku“. Koruna je růžová až růžově fialová, u okrajových květů paprskující. Plodem je nažka válcovitá, světle hnědá s chmýrem až 1,7 mm dlouhým. Rozšířena je ve střední Evropě, Dánsko, jižní Norsko, druhotně také Švédsko. Izolovaně se vyskytuje také Bosně a Hercegovině a Srbsku. U nás se vyskytuje roztroušeně a to zejména Šumava, Předšumaví, Krušné hory, Podkrkonoší, České středohoří, Železné hory, vzácně v



Českém lese, Orlických horách a na Českomoravské vrchovině Roste na mezofilních loukách, světlých lesních lemech, v příkopech komunikací. Vysazuje se také jako okrasná rostlina [64].

### 3.3.2.5 *Centaurea stoebe* L. – chrpa latnatá



Obrázek 11 *Centaurea stoebe* L. [65]

Dvouleté nebo krátce vytrvalé, monokarpické byliny (rostlina vykveté jen jednou, potom hyne). Lodyha nejčastěji jedna přímá (řidčeji až pět), vystoupavá, do 0,5 m vysoká, hranatá, tuhá, řídce pavučinatě chlupatá, šedozelená, často fialově naběhlá. Listy přízemní růžice za květu odumřelé, řapíkaté, 6 – 15 cm dlouhé, s čepelí dvakrát peřnosečnou v čárkovitě kopinaté až úzce kopistovitě úkrojky. Lodyžní listy čtené, přisedlé, menší, šedozelené, drsné velmi krátkými chlupy. Úbory poměrně malé, 1,5 – 2,5 cm v průměru, světle růžové, růžové nebo bělavé, skládající latovité nebo hroznovité květenství, zákrov vejcovitý, zákrovní listeny světle zelené, podélně světleji žilkované, v horní části s tmavě hnědým přívěskem. Okrajové květy s korunou zřetelně paprskující. Plodem je nažka. Rozšířena je ve střední a východní Evropě, na východ po Ukrajinu a střední část evropského Ruska, druhotně v Severní Americe, Austrálii a na Havajských ostrovech. V České republice roste roztroušeně až hojně v teplých oblastech Čech i Moravy. Můžeme jí najít na skalách, kamenitých svazích, sutích, většinou na výslunných a suchých stanovištích. Kvete od června do září [65].

### 3.3.2.6 *Centaurea benedicta* L. – benedikt lékařský



Obrázek 12 *Centaurea benedicta* L. [66]

Jednoletá, pavučinatě vlnatá bylina vysoká 10 – 60 cm, s přímou, občas rozvětvenou, hranatou lodyhou. Listy jsou střídavé, kracovitě peřenoklané, 20 – 30 cm dlouhé a 8 – 10 cm široké, na okraji drobně ostnitě, na spodní straně s bílou žilnatinou. Úbor je koncový, vejcovitý až kulovitý, asi 4 cm dlouhý a 2 cm široký, obalený nejvyššími vejčitými až kopinatými listeny; zákrov je víceřadý, střečovitý, vnitřní zákrovní listeny s dlouhým, hřebenitým červenohnědým ostnem; květy jsou žluté, okrajové jalové, s 2 – 3cípou nitovitou korunou, středové oboupohlavné, s 5cípou trubkovitou korunou. Nažky jsou válcovité, 7–8 mm dlouhé; chmýr je jednoduchý, dvouřadý. Rozšířen je ve Středozeří od Portugalska po Řecko, v Asii v Turecku, Sýrii, Libanonu a Izraeli, dále zasahuje do Zakavkazí, Iránu a Afghánistánu. Velmi vzácně a přechodně i v České republice, Severní a Jižní Americe a v jižní Africe. Najdeme jí v křovinách, stepních trávnicích, úhorech a okrajích cest. V lidovém léčitelství se používala na žaludeční obtíže. Nyní se z ní získávají ligniny, které mají virostatický účinek [66].

### 3.3.2.7 *Centaurea solstitialis* L. – chrpa žlutá



Obrázek 13 *Centaurea solstitialis* L. [67]

Jedno- až dvouletá bylina, 40 – 80 cm vysoká, lodyha je přímá, větvená, křídlatá, pavučinatě chlupatá. Přízemní listy v růžici, lyrovitě peřenodílné, až 15 cm dlouhé a 4 cm široké, lodyžní listy celistvé, kopinaté, plstnatě pavučinaté, horní sbíhavé. Úbory jednotlivé, zákrov výrazně ostnitý, zákrovní listeny uspořádány střečovitě, pavučinatě chlupaté, olysávající. Květy jsou žluté. Plodem je nažka. Rozšíření je okolo Středozemního moře, na sever zasahuje do Maďarska a na Slovensko. Dále také Írán, Zakavkazsko, Ukrajina, Dagestán, Turkestán, Tádžikistán. Druh byl zavlečen také do Británie, jižní Afriky, Severní Ameriky, jih jižní Ameriky, Austrálie a Nový Zéland. Zavlékán bývá občas i k nám a to především do teplejších oblastí. Roste na okrajích polí, úhorech, skládkách, podél cest, na půdách kamenitých a suchých. Kvete od května do září [67].

### 3.3.3 Přehled sekundárních metabolitů a jejich biologická aktivita

Rod *Centaurea* L. je co do počtu druhů velký, ale pouze malá část tohoto rodu byla zkoumána na sekundární metabolity. Z tohoto rodu jsou nejvíce zkoumanými sekundárními metabolity seskviterpenové laktony, naopak nejméně zkoumány jsou alkaloidy [59].

#### 3.3.3.1 Seskviterpeny

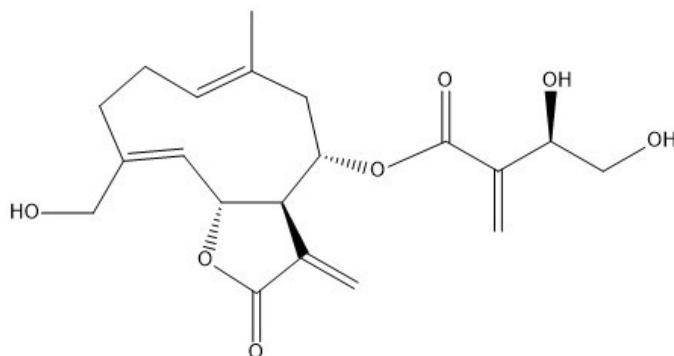
Látky zajišťující přežití a konkurenceschopnost rostlin, řadíme je pod skupinu izoprenoidů. Nejvíce se hromadí v listech v období květu a v reprodukčních orgánech (květy, plod). Jsou patnáctiuhlíkaté, protože se skládají ze tří izoprenových jednotek, kde jedna izoprenová jednotka má vzorec  $C_5H_8$ . Seskviterpeny jsou bezbarvé, lipofilní sloučeniny, jejichž syntéza probíhá v endoplazmatickém retikulu. Bylo zjištěno, že seskviterpeny by mohly být významné při léčbě rakoviny a kardiovaskulárních onemocnění [68].

Tabulka 2 Přehled seskviterpenů ve vybraných druzích rodu *Centaurea*

Druh	Seskviterpeny	Literatura
<i>Centaurea solstitialis</i>	cyanopikrin, aguerin B , centaurepensin, chlorojanerin, 13-acetylsolstitialin A , germakren D , bicyklogermakren, $\beta$ -karyofylen	[59], [69], [70]
<i>Centaurea stoebe</i>	knicin, salonitenolid, stoebenolid	[71]
<i>Centaurea benedicta</i>	knicin, melitensin 15-O- $\beta$ -D-glukosid, 11 $\beta$ ,13-dihydrosalonitenolid 15-O- $\beta$ -D-glukosid	[72]
<i>Centaurea jacea</i>	amarin, hydroamarin, melitensin, dihydromelitensin, knicin, 4'-acetylnicin	[73]
<i>Centaurea scabiosa</i>	cyanopikrin, grosshemin, renin	[74]

Seskviterpenový lakton knicin je znám svojí protizánětlivou, antifungální, antibakteriální a cytotoxickou aktivitu. Je to hlavní sloučenina několika druhů rodu *Centaurea*

a je velice pravděpodobné, že za farmakologickými vlastnostmi těchto druhů je právě knicin [75].



Obrázek 14 knicin

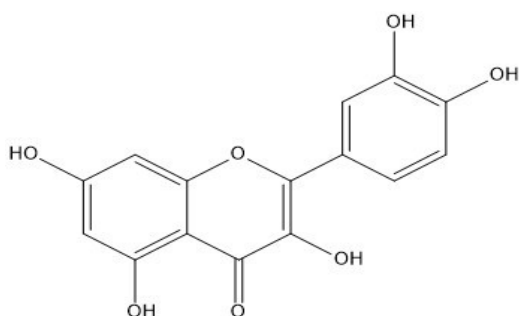
### 3.3.3.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou velkou skupinou přírodních produktů. Jsou rozšířeny ve vyšších a nižších rostlinách včetně řas. Flavonoidy jsou sloučeniny skládající se ze dvou aromatických kruhů a jednoho heterocyklického kruhu obsahující kyslík. V závislosti na centrálním heterocyklickém kruhu mohou být flavonoidy nenasycené, například flavony a flavonoly, a nasycené, mezi něž řadíme flavanony a flavany [59]. Většinou se v rostlinách nacházejí glykosidně vázané flavonoidy, ale účinné jsou jak glykosidy, tak aglykony. Jejich biosyntéza probíhá dvěma cestami a to šikmátovou a acetátovou. Velmi široké je jejich terapeutické využití a to zejména schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, odstraňovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematosně. Dále rozšiřují cévy, snižují krevní tlak, působí antiagregačně, mají antioxidační aktivitu, působí protizánětlivě a brání oxidaci lipidů [76]. Bylo popsáno několik flavonoidů, které mají AChE inhibiční aktivitu [77].

Tabulka 3 Přehled flavonoidů ve vybraných druzích rodu *Centaurea*

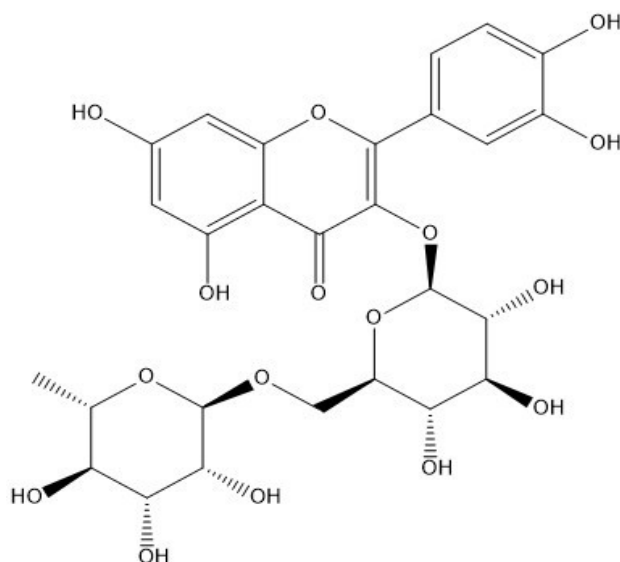
Druh	Flavonoidy	Literatura
<i>Centaurea stoebe</i>	kempferol, dihydrokvercetin, katechin	[78]
<i>Centaurea benedicta</i>	genistin, genisten, daidzein, apigenin, luteolin, rutin, kempferol, isokvercetin	[79]
<i>Centaurea jacea</i>	jaceidin, jacein, centaurein, jaceosid, 6 - methoxykaempferol-3 -methylether-7 -O - glukosid, hispidulin, apigenin, isokempferid, eupatorin	[73]
<i>Centaurea scabiosa</i>	baikalein, apiin, rutin, skutellarein, dihydrokvercetin, apigenin	[80]
<i>Centaurea cyanus</i>	apigenin, apigenin 4'-O -β -D -glukosid, hispidulin, isorhamnetin, isorhamnetin 7 -O - β -D -glukosid, kempferol 7 -O -β -D -glukosid, kempferol, luteolin, kvercetin	[59]
<i>Centaurea pseudophrygia</i>	apigenin, kempferol-3 ,6 -dimethylether, kempferol-3 -methylether, jaceidin, centaureidin, hispidulin, jaceosidin	[59]

Kvercetin a jeho glykosidy mají řadu biologických aktivit pro boj s neurodegenerací. Má antioxidační potenciál, který má přímou úlohu na potlačení AD. Mechanismy působení kvercetinu proti AD jsou jak přímé, tak nepřímé na buněčné a molekulární úrovni [81].



Obrázek 15 kvercetin

Rutin, který dostal název podle routy vonné (*Ruta graveolens* L.), z níž byl poprvé izolován, je terapeuticky významný flavonolový glykosid. Především je využíván jako venofarmakum kléčbě žilní nedostatečnosti, zvyšuje pevnost cévní stěny a snižuje permeabilitu kapilár [76]. Při studiích na myších dokázal rutin zmírňovat kognitivní poruchy, snižovat hladiny  $\beta$ A, redukovat oxidační stres a produkci cytokinů a vykazoval neuroprotektivní účinek [82].



Obrázek 16 rutin

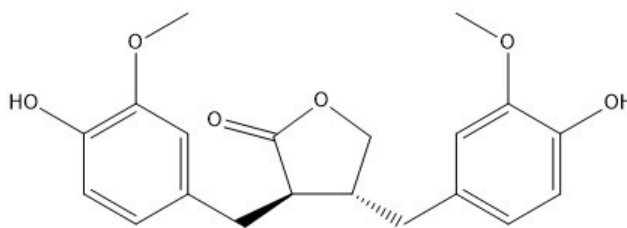
### 3.3.3.3 Lignany

Lignany jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou spojovány s řadou biologických aktivit. Nacházejí se v kořenech, listech, semenech, ovoci a dřevěných částech rostlin. Zajišťují ochranu rostliny proti chorobám a škůdcům, jakou jsou houbové hniloby. Mezi dva nejvíce studované lignany patří sekoisolariciresinol a matairesinol. V přírodě se obvykle vyskytují jako glykosidy a přírodní lignany jsou opticky aktivní [59]. Jsou odvozeny od koniferylalkoholu a dalších fenylypropanů. Spojením dvou fenylypropanových derivátů vznikají lignany [76]. Mají četné farmakologické účinky jako protinádorové, hepatoprotektivní, antagonistické účinky na faktor aktivující destičky, insekticidní, estrogenní, antifungální, antihypertenzní, sedativní a antioxidační účinky. Více než tisíc let jsou využívány v lidové medicíně v Číně a Japonsku [83].

Tabulka 4 Přehled lignanů ve vybraných druzích rodu *Centaurea*

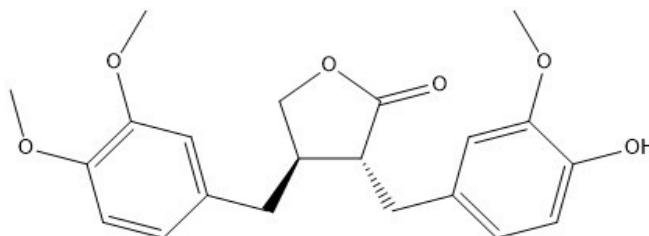
Druh	Lignany	Literatura
<i>Centaurea benedicta</i>	arktiin, arktigenin, matairesinol	[84]
<i>Centaurea scabiosa</i>	arktigenin, matairesinol, matairesinosid, 7-(S)-hydroxyarktigenin	[59]
<i>Centaurea pseudophrygia</i>	arktigenin	[59]
<i>Centaurea solstitialis</i>	arktiin, matairesinol	[59]

Matairesinol je rostlinný lignan, který se vyskytuje v široké škále potravin. Má antiangiogenní, antioxidační, protirakovinné, antifungální a protizánětlivé účinky [85].



Obrázek 17 matairesinol

Arktigenin je aglykonem arktiinu. Bylo prokázáno mnoha studiemi, že arktigenin má různé terapeutické účinky včetně protizánětlivých, antivirových, imunomodulačních a protinádorových. Studie *in vivo* ukázaly vícenásobné mechanismy účinku, které mohou inhibovat tyto onkogenní signální dráhy [86].



Obrázek 18 arktigenin



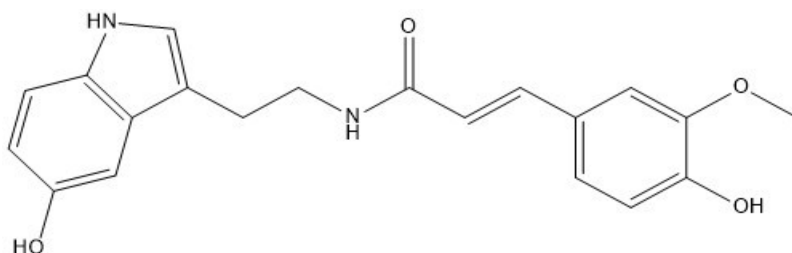
### 3.3.3.4 Alkaloidy

V rodu *Centaurea* L. se převážně vyskytují indolové alkaloidy odvozené od tryptaminu, který je odvozený od tryptofanu. V druhu *Centaurea vlachorum* Hartvig *N*-(*p*-kumaroyl) serotonin a moschamin [87]. Dalším indolovým alkaloidem izolovaným ze semen druhu *Centaurea schischkinii* Tzvelev je schischkiniin, jenž vykazoval stěžení míru protinádorové aktivity [88]. Z druhu *Centaurea montana* L. bylo izolováno 8 alkaloidů, mezi něž patří tryptamin, *N*-(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxytryptamin, *cis-N*-(4-hydroxycinnamoyl)-5-hydroxytryptamin, centcyamin, *cis*-centcyamin, moschamin, *cis*-moschamin a montamin, který je dimerem odvozeným od moschaminu [89]. V semenech druhu *Centaurea moschata* L. se nachází alkaloid moschamid [90]. Dále z tohoto druhu byly izolovány také moschamin, *cis*-moschamin, moschamindol a moschamindolol [91]. Zajímavou sloučeninou, která byla izolována z *Centaurea diffusa* Lam. je také jednoduchý chinolový alkaloid 8-hydroxychinolin [92].

Tabulka 5 Přehled alkaloidů ve vybraných druzích rodu *Centaurea*

Druh	Alkaloidy	Literatura
<i>Centaurea cyanus</i>	centcyamin, <i>cis</i> -centcyamin, moschamin, <i>cis</i> -moschamin	[59]

Moschamin můžeme považovat za amid fenylpropanových kyseliny typu safflomidu, který je strukturně odvozený od serotoninu, a proto se jako synonymum využívá také *N*-feruloylserotonin. Několik studií ukazuje, že tyto amidy mohou potenciálně mít antioxidační, protizánětlivé a jiné aktivity poskytující příznivé účinky na chronická onemocnění člověka, jako jsou zánět a kardiovaskulární onemocnění. Moschamin je schopen inhibovat cyklooxygenasu I a II. Při perorálním podání myším byl v nezměněné podobě nalezen v plazmě s inhibičními účinky na cyklooxygenasu a se serotoninergními aktivitami [93].



Obrázek 19 moschamin

### 3.3.3.5 Ostatní sekundární metabolity

Kromě výše popsaných hlavních tříd sekundárních metabolitů, byly také z rodu *Centaurea* popsány další sekundární metabolity jako kumariny, steroidy, terpeny a jednoduché deriváty fenolu. V rostlině *Cenaturea cyanus* se vyskytují kumariny umbeliferon se skopoletinem a dále také kyselina kávová, chlorogenová, neochlorogenová a isochlorogenová [59]

# 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4.1 Materiál a přístrojové vybavení

### 4.1.1 Chemikálie

- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (HCl)
- kyselina sírová 96% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)
- amoniak 25% p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (NH<sub>4</sub>OH)
- hexachloroplatičitá kyselina (Sigma Aldrich, Praha)
- dimethylsulfoxid p. a. (Sigma-Adrich)
- (Z)-GlyPro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich, Praha)
- bajkalin (Sigma-Aldrich, Praha)
- fysostigmin (Sigma-Aldrich, Praha)
- galantamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- huperzin A (TAZHONGHUI – Tai'an zhonghui Plant Biochemical Co., Ltd., China)
- rivastigmin (Sigma-Aldrich, Praha)
- doxorubicin (Sigma-Aldrich, Praha)
- vinkamin (izolován na katedře farmaceutické botaniky FAF UK)

### 4.1.2 Rozpouštědla

- ethanol 95% (Lihovar Chrudim, Chrudim) (EtOH)
- ethyl-acetát p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (EtOAc)
- chloroform p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (CHCl<sub>3</sub>)
- methanol p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (MeOH)
- methanol LC-MS Chromasolv (Fisher Scientific, Pardubice)
- *n*-hexan p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha)
- voda superčistá

### 4.1.3 Absorbenty pro chromatografii

- komerční Kieselgel SiO<sub>2</sub> GF254 (firma Merck), velikost 20 × 20 cm, hliníková deska s vrstvou silikagelu pro TLC s hloubkou vrstvy 0,2 mm

### 4.1.4 Pomocný materiál

- křemelina (Sigma Aldrich, Praha)
- silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta, Praha)
- síran sodný bezvodý p.a. (Ing. Švec – Penta, Praha) (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- vata
- vliselin

### 4.1.5 Přístroje

- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Německo)
- vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- spektrometr ESI-MS Thermo Finnigan LCQDuo (GenTech Scientific, Arcade, New York, USA)
- spektrometr EI-MS na GC-MS system using an Agilent 7890A GC 5975 inertní MSD; EI mód 70 eV; kolona DP-5 MS (30 x 025 mm x 0,25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- laboratorní mlýnek IKA A11 basic (IKA - WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Německo)
- reader Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- microplate ELISA reader AL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- kultivační mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, 96-jamkové

### 4.1.6 Vydávající soustavy pro TLC

- S1: CHCl<sub>3</sub> + MeOH + NH<sub>4</sub>OH 80:20:1,5
- S2: CHCl<sub>3</sub> + MeOH + NH<sub>4</sub>OH 85:15:0,75
- S3: CHCl<sub>3</sub> + MeOH 95:5

### 4.1.7 Detekční činidla

- **Dragendorffovo činidlo** je složeno z roztoku 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml destilované vody a roztoku 16 g jodidu draselného v 40 ml destilované vody. Tyto dva roztoky jsou smíseny v poměru 1 :1
- **Mayerovo činidlo** bylo připraveno rozpuštěním 5 g KI ve 30 ml vody a k tomu bylo přidáno 1,35 g HgCl<sub>2</sub> v prášku. Poté se míchalo do rozpuštění vzniklé sraženiny. Uchovávalo bylo v lednici při teplotě 4 °C.
- **jodoplatičité činidlo** bylo připraveno smícháním roztoku A s roztokem B. Roztok A byl připraven rozpuštěním 100 mg hexachlorplatičité kyseliny (H<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>Pt . xH<sub>2</sub>O) v 1 ml vody. Roztok B byl připraven rozpuštěním jodidu draselného (KI) ve 100 ml vody.

### 4.1.8 Rostlinný materiál

Nažky vybraných druhů rodu *Centaurea* (*Centaurea cyanus*, *Centaurea jacea*, *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudophrygia* a *Centaurea stoebe*) byly zakoupeny po 25 g z Planta Naturalis v Markvarticích. Ze Zahrady léčivých rostlin Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy pochází nažky *Centaurea cyanus*. Nažky *Centaurea solstitialis* byly získána z Botanické zahrady léčivých rostlin v německém Braunschweigu a nažky *Centaurea benedicta* z botanické zahrady léčivých rostlin v polském Lublinu. Rostlinný materiál verifikoval prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc..

### 4.1.9 Chemikálie a činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BChE

- acetylthiocholin jodid ≥99.0% (Sigma-Adrich, Praha)(ATChI)
- butyrylthiocholin jodid ≥98.0% (Sigma-Adrich, Praha) (BTChI)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina ≥ 98% (Sigma-Aldrich, Praha) (DTNB)
- **5mM roztok 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny** byl připraven rozpuštěním látky v 100mM fosfátovém pufru pH 7,4. Vzniklý roztok by měl být jen slabě žlutý. Byl uchováván v lednici při 4 °C, max. 1 týden.
- **10mM roztok acetylthiocholin jodidu** byl připraven rozpuštěním látky ve vodě, vznikl čirý roztok. Byl uchováván v lednici při 4 °C, max. 1 týden.

- **10mM roztok butyrylthiocholin jodidu** byl připraven stejným způsobem a uchováván stejně jako roztok ATChI.

- 

### **4.1.10 Chemikálie a činidla pro stanovení inhibiční aktivity vůči POP**

- **Roztok 10mM Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu** byl připraven rozpuštěním látky v 40% 1,4-dioxanu. Byl uchováván v lednici při 4 °C.
- (Z)-GlyPro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich, Praha)
- dimethylsulfoxid ≥99.7% (Sigma-Adrich)(DMSO)
- bajkalin (Sigma-Aldrich, Praha)
- fysostigmin (Sigma-Aldrich, Praha)

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Obecné postupy**

#### **4.2.1.1 Příprava rozpouštědel**

Před použitím byla rozpouštědla přečištěna pomocí destilace a poté byla uchovávána v nádobách z tmavého skla, kvůli ochraně před světlem.

#### **4.2.1.2 Odpařování rozpouštědel z extraktů a čistých izolovaných sloučenin**

Odpařování extraktů a izolovaných sloučenin probíhalo na vakuové odparce Laborota 4000 Heidolph na vodní lázni při 45 °C.

#### **4.2.1.3 Sušení a skladování**

Extrakty i chemicky čisté látky byly vysušeny ve vakuovém exsikátoru (vakuum cca 1,33 kPa) nad sušícími perlami silikagelu min. 24 h. Po vysušení byly skladovány v lednici při teplotě 2 – 8 °C.

#### **4.2.1.4 Preparativní TLC**

Sloučeniny byly separovány pomocí preparativní TLC na komerčních hliníkových deskách, kde byly zóny o stejném  $R_f$  seškrábány a spojeny.

#### **4.2.1.5 Detekce alkaloidů**

Potenciální přítomnost alkaloidů ve vodné fázi byla při přípravě alkaloidního extraktu zjišťována pomocí Mayerova činidla. Vodná fáze se okyselila pomocí HCl na pH 2 – 3 a přidalo se 1 – 2 ml vody. K roztoku bylo přidáno několik kapek činidla. V případě přítomnosti alkaloidů vznikla v roztoku bílá sraženina.

Před detekcí Dragendorffovým činidlem byla kontrolní TLC detekována pod UV lampou ( $\lambda=254$  a  $366$  nm) a byly označeny viditelné zóny. Poté byly postříkány Dragendorffovým činidlem. Po odvětrání činidla vzniklo v případě přítomnosti alkaloidů intenzivní oranžové zbarvení.

Detekce jodoplaticitým činidlem probíhala stejně jako pomocí Dragendorffovým činidlem. V případě přítomnosti alkaloidů vzniklo hnědé až modré zbarvení.

### **4.2.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností**

#### **4.2.2.1 Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI)**

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru LC-MS Thermo Finnigan LCQDuo s ionizací elektrosprejem v kladném modu. Jako analyzátor sloužila iontová past.  $MS^n$  spektra byla měřena při kolizní energii 40 eV. Vzorky byly rozpuštěny v MeOH pro LC-MS ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a zaváděny přímo pomocí sondy.

#### **4.2.2.2 Hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací (EI)**

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru Agilent 7890A GC 5975 v módu 70 eV s GC kolonou DP-5 MS. Vzorky byly rozpuštěny v MeOH ( $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a nástřik byl proveden v split módu v poměru 1:10. Detekce byla provedena pomocí srovnání spekter s NIST knihovnou.

### 4.2.2.3 NMR analýza

Pro měření NMR spekter byl použit spektrometr VNMR S500, měření probíhalo za teploty 25 °C. Přístroj pracoval při frekvenci 499,87 MHz pro jádra  $^1\text{H}$  a 125,70 MHz pro jádra  $^{13}\text{C}$ . Chemické posuny byly zaznamenávány jako hodnoty  $\delta$  vyjádřené v pars per milion (ppm) a byly vztaženy na hodnoty vnitřního standardu (TMS). Spektra byla měřena v různých prostředích. V  $\text{CDCl}_3$  byly hodnoty chemického posunu pro atomy  $^1\text{H}$   $\delta = 7,26$  ppm a pro  $^{13}\text{C}$   $\delta = 77,0$  ppm. V  $\text{CD}_3\text{OD}$  byly pro  $^1\text{H}$   $\delta = 3,30$  ppm a pro  $^{13}\text{C}$   $\delta = 49,0$  ppm. Naměřená data jsou ve výsledcích uváděna v 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 J (v Hz).

### 4.2.2.4 Optická otáčivost

Optická otáčivost izolovaných sloučenin byla měřena v MeOH na polarimetru P 3000 při laboratorní teplotě 25° C. Specifická otáčivost byla vypočtena podle vzorce:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{100 \times \alpha}{c \times l}$$

, kde D = sodíková D čára (589,3 nm);  $\alpha$  = naměřená otáčivost [°]; c = koncentrace měřeného alkaloidu [g/100 ml]; l = délka kyvety [dm].

## 4.2.3 Stanovení biologické aktivity

### 4.2.3.1 Příprava hemolyzátu a plazmy

Lidské cholinesterasy byly získané z krve zdravého dobrovolníka, ke které byla ihned po odběru přidán antikoagulační přísada (2 ml 3,4% citrátu sodného na 18 ml krve). Z krve byla oddělena plazma centrifugací při 4 °C a rychlosti 4000 ot. $\cdot$ min $^{-1}$  na centrifuze Boeco U-32R, která následně sloužila jako zdroj BChE. Oddělené erythrocyty byly použity jako zdroj AChE.

Erythrocyty byly 3 $\times$  promyty pomocí 5mM fosfátového pufru pH 7,4, který obsahoval 150 mM NaCl, a byly opět stejným způsobem centrifugovány. K promytým erythrocytům byl přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4, (tentokrát bez NaCl) v poměru 1 : 9 erythrocyty k pufru. Erythrocyty se nechaly spontánně hemolyzovat za stálého míchání po dobu 10 min.



Následně byla stanovena absorbance BChE v plazmě a AChE v hemolyzátu. Dle potřeby byla hodnota absorbance upravena příslušným množstvím 5mM fosfátového pufru pH 7,4. Enzymové preparáty byly uchovávány až do doby použití při -22 °C.

#### **4.2.3.2 Stanovení absorbance enzymových preparátů a stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči lidským cholinesterasám**

Stanovení inhibiční aktivity ( $IC_{50}$ ) bylo provedeno pomocí modifikované Ellmanovy metody s využitím Ellmanova činidla (DTNB). Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BChE) příslušnou cholinesterasou. Po enzymové hydrolýze je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule skupinu SH je detegován pomocí DTNB tím, že po reakci s thiocholinem dochází ke vzniku aniontu 5-sulfanyl-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB). Tento anion je pak detekován spektrofotometricky při vlnových délkách 436 nm (AChE) 412 nm (BChE) [94].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 8,3  $\mu$ l roztoku hemolyzátu/plazmy v 5mM fosfátovém pufru pH 7,4 o určité koncentraci (objemový poměr pro hemolyzát 1 : 0; 3 : 1; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3; 1 : 4; 1 : 5 a pro plazmu 1 : 0; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3; 1 : 4). Poté bylo přidáno 283  $\mu$ l 5 mM roztoku DTNB ve fosfátovém pufru pH 7,4 a 8,3  $\mu$ l zkoušeného alkaloidu o určité koncentraci v DMSO (40mM, 10mM, 4mM, 1mM, 0,4mM a 0mM). Směs byla třepána 1 minutu v mikrotřepačce a vložena do readeru Synergy<sup>TM</sup> HT Multi-Detection Microplate Reader, kde byla inkubována při 37 °C po dobu 5 min. Po inkubaci bylo k vzorkům přidáno 33,3  $\mu$ l DMSO (slepý vzorek) nebo 33,3  $\mu$ l enzymového preparátu a po 2 minutách byla měřena absorbance. Pokud látka silně inhibuje cholinesterasy (0,4mM koncentrace alkaloidu vykazuje více než 3% inhibici), je nutné změřit další koncentrační řadu (0,1mM, 0,04mM, 0,01mM, 0,004mM, 0,001mM a čistý DMSO). Každá koncentrace alkaloidu byla připravena 6 $\times$  a měřena při 37 °C.

Absorbance u stanovení inhibiční aktivity AChE byla měřena při  $\lambda = 436$  nm a BChE při  $\lambda = 412$  nm. 50% inhibiční aktivita byla dopočítána pomocí programu GraphPad Prism dle vzorce:

$$\% I = 100 - \left(100 \times \frac{\Delta A_{Bl}}{\Delta A_{Sa}}\right)$$

% I = procento inhibice;  $\Delta A_{Bl}$  = pokles absorbance slepého vzorku během 1 min;  $\Delta A_{Sa}$  = absorbance testovaného vzorku během 1 min. Zjištěná inhibiční aktivita  $IC_{50}$  AChE a BChE pro jednotlivé látky byla porovnána s  $IC_{50}$  referenčních látek.

#### 4.2.3.3 Stanovení inhibiční aktivity testovaných látek vůči POP

Enzym POP, jehož specifická aktivita byla  $0,2 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$ , byl rozpuštěn v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). K testování byla použita standardní polystyrenová 96-jamková mikrotitrační destička s rovným průhledným dnem. Zásobní roztoky testovaných látek byly připraveny rozpuštěním v DMSO (10 mM), z těchto roztoků byly naředěním superčistou vodou připraveny roztoky pro testování ( $10^{-3}$  –  $10^{-7}$  M). Slepé vzorky obsahovaly stejný objem DMSO, ale bez testované sloučeniny. Jako POP substrát byl použit Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 40% 1,4-dioxanu (10 mM). V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 170  $\mu\text{l}$  PBS, 5  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky o určité koncentraci a 5  $\mu\text{l}$  roztoku POP. Destička byla inkubována po dobu 5 min při teplotě 37 °C, do jamky bylo dále přidáno 20  $\mu\text{l}$  substrátu a směs byla znovu inkubována (30 min při 37 °C). Množství vytvořeného produktu *p*-nitroanilinu bylo přímo úměrné POP aktivitě. Měření probíhalo spektrofotometricky při  $\lambda = 405$  nm na microplate ELISA readeru EL800. Inhibiční aktivita testovaných látek byla vyjádřena jako  $IC_{50}$ . Zjištěná inhibiční aktivita  $IC_{50}$  pro jednotlivé látky byla porovnána s  $IC_{50}$  referenčních látek.

#### 4.2.3.4 Stanovení cytotoxicity extraktů a izolovaných sloučenin

Stanovení cytotoxicity proti vybraným buněčným liniím stanovoval RNDr. Radim Havelek, Ph.D. z Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Stanovení probíhalo na buněčných liniích Jurkat (acute T cell leukemia), MOLT-4 (acute lymphoblastic leukemia), A549 (lung carcinoma), HT-29 (colorectal adenocarcinoma), PANC-1 (pancreas epithelioid carcinoma), A2780 (ovarian carcinoma), HeLa (cervix

adenocarcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), SAOS-2 (osteosarcoma) a na jedné kontrolní linii nenádorových buněk MRC-5 (primary human lung fibroblasts).

U extraktů se měřila buněčná viabilita po jejich 48hodinovém působení a je vyjádřena v procentech (kolik procent buněk přežilo), jako referenční sloučenina byl používán doxorubicin. Buňky byly vystavovány extraktům o koncentraci 50 µg/ml a 1 µmol/L doxorubicinu. Výsledky jsou znázorněny jako aritmetický průměr ze tří nezávislých měření, ± směrodatná odchylka.

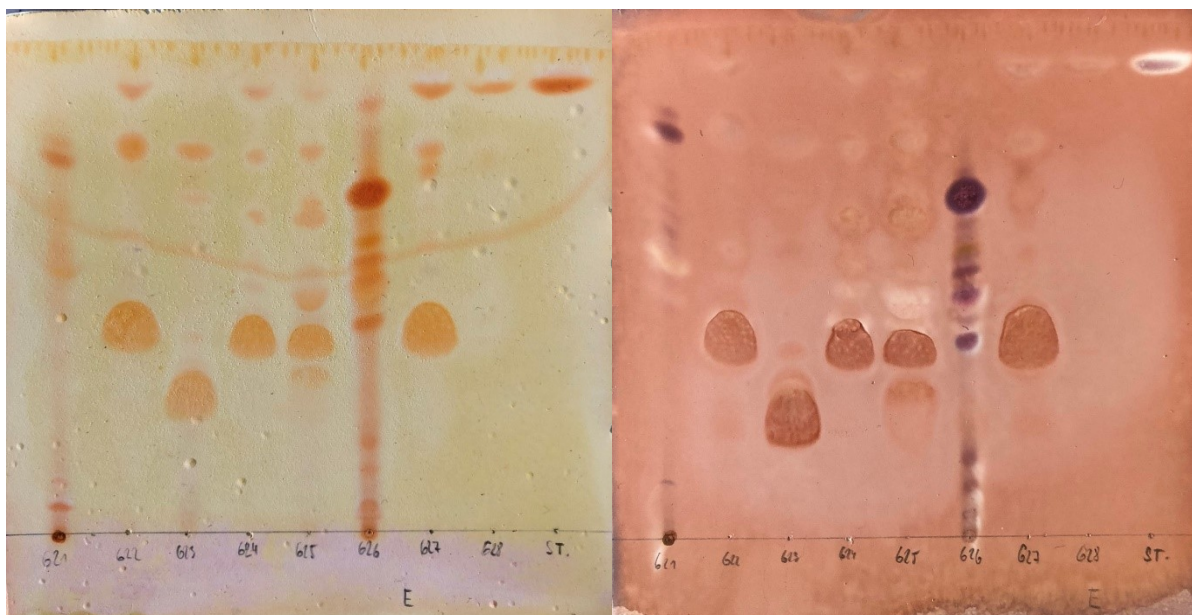
Metoda se stanovovala pomocí MTT testu, jež je založen na buněčném vychytávání žlutého barviva MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) a jeho následné redukci v mitochondriích přeživších buněk na tmavě modrý krystalický formazan. Princip metody je založen na spektrofotometrické detekci redukce tetrazoliové soli na barevný produkt formazan. Absorbance formazanu je měřena při 440 nm [95].

## **4.3. Izolace sloučenin z nažek vybraných druhů rodu *Centaurea***

### **4.3.1 Příprava alkaloidního extraktu**

Na přípravu alkaloidního extraktu bylo použito 25 g nažek vybraných taxonů rodu *Centaurea*, které byly rozdrobněny laboratorním mlýnkem. Rozemleté nažky byly 2× extrahovány 95% EtOH po dobu 30 minut. Vznikla matolína, která byla přelita ethanolem a sonikována na ultrazvukové lázni 10 minut, se přefiltrovala přes vliselin (zachycení hrubých mechanických a nerozpustných kousků nažek a nečistot). Spojený ethanolový extrakt se poté filtroval na filtračním tubusu přes vrstvu křemeliny. Zbytek ethanolového extraktu byl odpařen do sucha a poté k němu bylo přidáno 30 ml 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pro rozpuštění alkaloidů byla baňka zahřáta na vodní lázni o teplotě 100 °C, extrakt se ztekutlil a ponořil do ultrazvukové lázně. Získaná suspenze se přefiltrovala přes křemelinu a po zasáknutí extraktu byla křemelina promyta 10 ml 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a malým množstvím destilované vody. Získaný vodný extrakt byl odtučněn 3násobným vytřepáním 30 ml *n*-hexanu. Tato *n*-hexanová vrstva se dále nezpracovávala. K vodné okyselené fázi bylo přidáno 30 ml předestilovaného ethyl-acetátu a 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bylo pH vodné fáze upraveno na 9 – 10, která byla následně 3× vytřepávána

EtOAc. Ethyl-acetátové extrakty byly testovány na TLC na přítomnost alkaloidů Dragendorffovým a jodoplaticitým činidlem. V případě přítomnosti alkaloidů vzniká s Dragendorffovým činidlem oranžové zbarvení a s jodoplaticitým hnědé až modré zbarvení.



Obrázek 20 Detekce alkaloidů v ethyl-acetátovém extraktu (nalevo Dragendorffovo činidlo, napravo jodoplaticité činidlo)

Spojené ethyl-acetátové alkaloidní extrakty byly předsušeny bezvodým síranem sodným p.a. a nechaly se 30 minut odstát. Vysušené ethyl-acetátové extrakty poté byly odpařeny za sníženého vakua. Na biologické testy se poté vzorky rozpustily a přefiltrovaly přes vrstvičku vaty.

### 4.3.2 Izolace sloučenin

Na základě TLC analýzy a MS detekce byly spojeny extrakty *Centaurea jacea* (AL-622), *Centaurea pseudophrygia* (AL-624), *Centaurea stoebe* (AL-625), *Centaurea solstitialis* (AL-627), *Centaurea benedicta* (AL-628), extrakt *Centaurea scabiosa* (AL-623) byl zpracováván samostatně. Provedla se TLC v soustavě S1 (spojený extrakt AL-622, 624, 625, 627, 628 vykazoval jednu hlavní majoritní sloučeninu o  $R_f=0,3$ , která po dvojnásobném vyvinutí měla  $R_f=0,3$ ; samotný extrakt AL-623 vykazoval jednu majoritní sloučeninu s  $R_f=0,2$  a po dvojnásobném vyvinutí měl  $R_f=0,2$ ) a následně v soustavě S2 (spojené extrakty AL-622, 624, 625, 627, 628 měly  $R_f=0,5$  a vyvíjeny byly 2 $\times$ ; samotný extrakt AL-623 měl  $R_f=0,4$  a byl vyvíjen 2 $\times$ ). Z těchto dvou kroků byly získány amorfní, čiré sloučeniny JF-1 (50 mg) a JF-2 (27 mg). Pro objasnění vztahu struktury-biologické aktivity byly následnou kyselou hydrolýzou (2% HCl, 1

hodina, 100 °C) izolovaných sloučenin (JF-1, 11,2 mg) a (JF-2, 7,5 mg) získány jejich aglykony, které byly vytřepány z vodné fáze do EtOAc a následně byly přečištěny separací na komerčních TLC 20×10 cm (mobilní fáze: S3, počet vyvíjení: 1x, dráha 8,5 cm, Rf aglykonů = 0,7 a 0,5). Byly získány sloučeniny JF-3 (6,5 mg) a JF-4 (3,6 mg). Struktura aglykonů byla určena pomocí optické otáčivosti a EI-MS, získaná spektra se shodovala se spektry v databázi NIST (>93% shoda).

Tabulka 6 Hmotnosti EtOAc extraktů a izolovaných majoritních sloučenin z vybraných druhů rodu *Centaurea*

Rostliny	Alkaloidní extrakty	Izolace majoritních alkaloidů
<i>Centaurea jacea</i> (AL-622)	110,5 mg	11 mg
<i>Centaurea scabiosa</i> (AL-623)	162,8	27 mg
<i>Centaurea pseudophrygia</i> (AL-624)	153,6 mg	14 mg
<i>Centaurea stoebe</i> (AL-625)	79,1 mg	5,8 mg
<i>Centaurea solstitialis</i> (AL-627)	150 mg	30 mg
<i>Centaurea benedicta</i> (AL-628)	*	*
<i>Centaure cyanus</i> (AL-621,626)	**	**

Vysvětlivky: \* = Nezpracováno pro malé množství zbylého alkaloidního extraktu (5,1 mg)

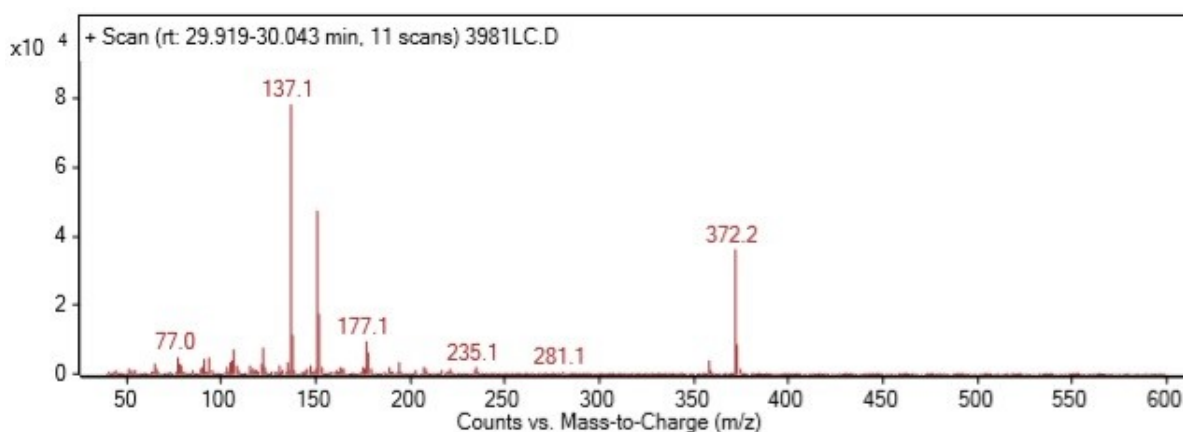
\*\* = Velký počet alkaloidů v extraktu, je předmětem výzkumu navazujícího projektu ohledně izolace alkaloidů z rodu *Centaurea*

# 5 Výsledky

## 5.1 MS analýza extraktů

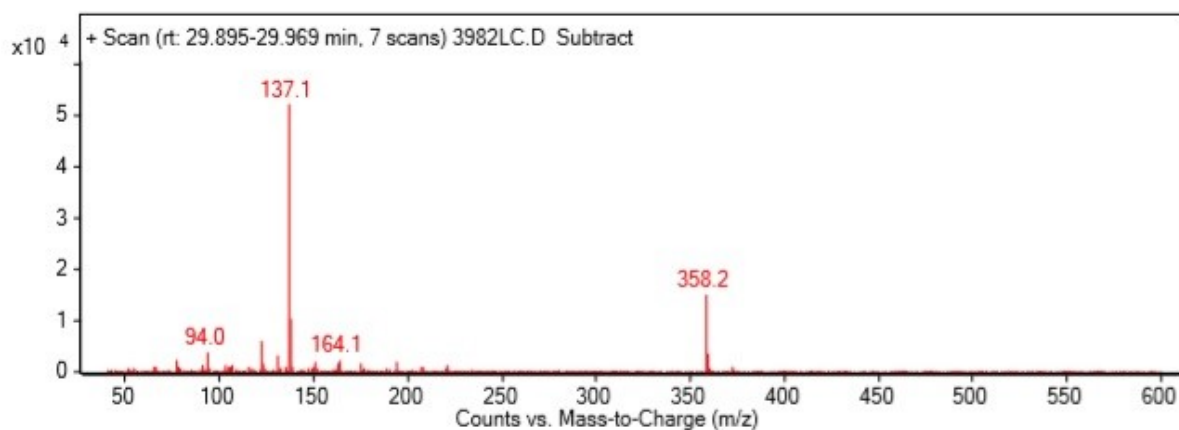
### 5.1.1 GC-MS analýza extraktů

Pomocí GS-MS byla v sumárních EtOH extraktech AL-622 (*C. jacea*), AL-624 (*C. pseudophyrgia*), AL-625 (*C. stoebe*), AL-627 (*C. solstitialis*), AL-628 (*C. benedicta*) a EtOAc extraktech AL-621 (*C. cyanus*), AL-622 (*C. jacea*), AL-624 (*C. pseudophyrgia*), AL-625 (*C. stoebe*), AL-626 (*C. cyanus* BZLR), AL-627 (*C. solstitialis*), AL-628 (*C. benedicta*) detekována sloučenina arktigenin (obr. 21).



Obrázek 21 GC-MS analýza EtOH a EtOAc extraktů chrp.

V EtOAc a EtOH extraktu AL-623 (*C. scabiosa*) byl identifikován matairesinol (obr. 22).



Obrázek 22 GC-MS analýza EtOH a EtOAc extraktu AL-623 (*C. scabiosa*).

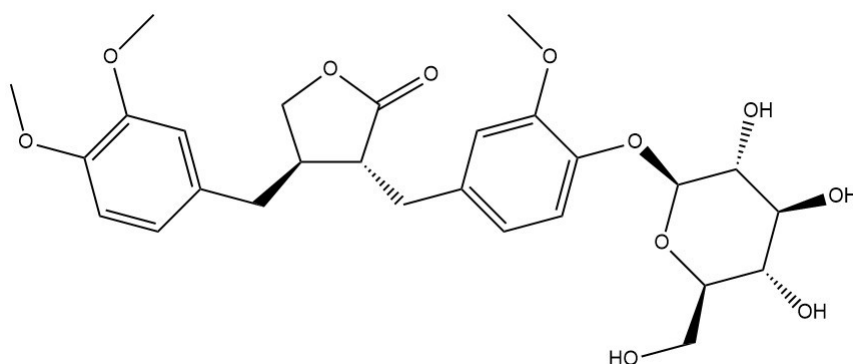
## 5.1.2 LC-MS analýza EtOAc extraktů chrp

- ESI-MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 557 (100). MS/MS m/z 395 (100) = AL-622 (*C. jacea*), AL-624 (*C. pseudophyrgia*), AL-625 (*C. stoebe*), AL-627 (*C. solstitialis*), AL-628 (*C. benedicta*)
- ESI-MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 543 (100). MS/MS m/z 381 (100) = AL-623 (*C. scabiosa*)
- ESI-MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 395 (100), 381 (40), 365 (48), 353 (20), 335 (16) = AL-626 (*C. cyanus*)

## 5.2 Strukturní analýza a stanovení fyzikálně-chemických vlastností izolovaných látek

### 5.2.1 Arktiin

sumární vzorec: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub>



Obrázek 23 arktiin

#### 5.2.1.1 MS analýza

ESI-MS m/z [M+H]<sup>+</sup> 557 (100) [C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub> + Na]<sup>+</sup>. MS/MS m/z 395 (100)

#### 5.2.1.2 NMR analýza

<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 7.05 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.74 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.65 (1H, dd, *J* = 8.5 Hz, *J* = 2.0 Hz), 6.62–6.63 (1H, m), 6.59 (1H, s), 4.82 (1H, s), 4.15 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 7.5 Hz), 3.89 (1H, dd, *J* = 9.0 Hz, *J* = 8.0 Hz), 3.89–3.84 (1H, m), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.76 (3H, s), 3.72–3.67 (1H, m), 3.51–3.44 (2H, m), 3.42–3.39 (2H, m), 2.93 (1H, dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 5.1 Hz), 2.84 (1H, dd, *J* = 13.6 Hz, *J* = 7.2 Hz), 2.70 (1H, td, *J* = 7.2 Hz, *J* = 5.1 Hz), 2.60–2.48 (3H, m)

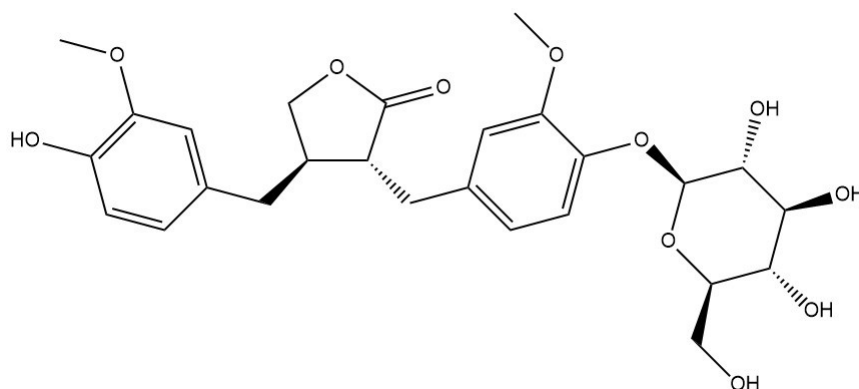
$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 181.47, 150.60, 150.42, 149.13, 146.81 134.24, 132.72, 123.02, 122.13, 117.81, 114.80, 113.61, 113.07, 102.88, 78.14, 77.78, 74.89, 72.96, 71.33, 62.50, 56.74, 56.55, 56.50, 47.65, 42.48, 38.90, 35.41

### 5.2.1.3 Optická otáčivost

$[\alpha] = -19,5^\circ$  ( $c = 0,205$ ; MeOH)

## 5.2.2 Matairesinosid

Sumární vzorec:  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$



Obrázek 24 matairesinosid

### 5.2.2.1 MS analýza

ESI-MS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  543 (100)  $[\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11} + \text{Na}]^+$ . MS/MS  $m/z$  381 (100)

### 5.2.2.2 NMR analýza

$^1\text{H}$  NMR (500MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 7.04 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.71 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.69 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz), 6.65 (1H, d,  $J = 1.7$  Hz), 6.59 (1H, dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, overlapped), 6.58 (1H, dd,  $J = 8.1$  Hz,  $J = 1.7$  Hz, overlapped), 4.86 (1H, s), 4.17 (1H, dd,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 7.4$  Hz), 3.94 (1H, dd,  $J = 8.9$  Hz,  $J = 7.4$  Hz), 3.90–3.86 (1H, m), 3.80 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.72–3.67 (1H, m), 3.51–3.46 (2H, m), 3.42–3.39 (2H, m), 2.90 (1H, dd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 5.1$  Hz), 2.80 (1H, dd,  $J = 13.7$  Hz,  $J = 7.2$  Hz), 2.66 (1H, td,  $J = 7.2$  Hz,  $J = 5.1$  Hz), 2.58–2.47 (3H, m)

$^{13}\text{C}$  NMR (125MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 181.5, 150.7, 149.0, 146.7, 146.4, 134.9, 130.7, 123.0, 122.2, 118.0, 116.1, 114.2, 113.9, 102.9, 78.2, 77.8, 74.9, 72.9, 71.4, 62.5, 56.7, 56.4, 47.7, 42.4, 38.9, 35.5

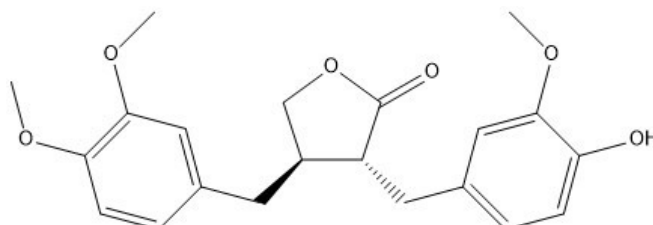


### 5.2.2.3 Optická otáčivost

$[\alpha] = -29,6^\circ$  ( $c = 0,135$ ; MeOH)

## 5.2.3 Arktigenin

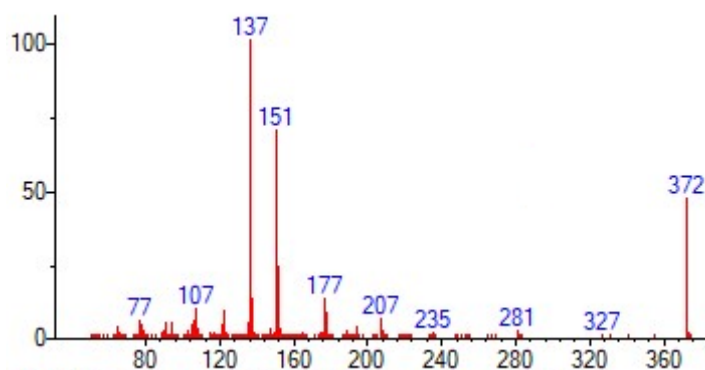
Sumární vzorec:  $C_{21}H_{24}O_6$



Obrázek 25 arktigenin

### 5.2.3.1 MS analýza

EI-MS  $m/z$  372(50), 207(10), 177(20), 151(70), 137(100), 122(10), 107(10).



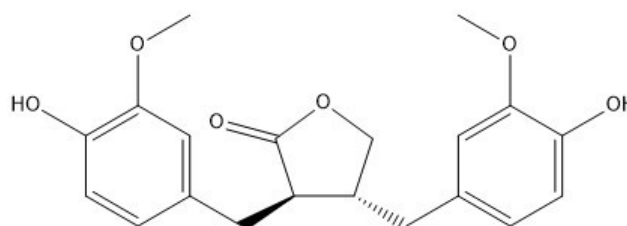
Obrázek 26 EI-MS analýza arktigeninu

### 5.2.3.2 Optická otáčivost

$[\alpha] = -28,2^\circ$  ( $c = 0,284$ ; MeOH)

## 5.2.4 Matairesinol

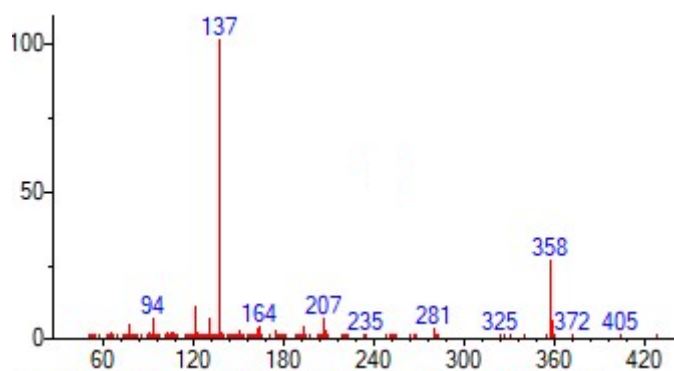
Sumární vzorec:  $C_{20}H_{22}O_6$



Obrázek 27 matairesinol

### 5.2.4.1 MS analýza

EI-MS m/z 358(25), 207(10), 137(100).



Obrázek 23 EI-MS analýza matairesinolu

### 5.2.4.2 Optická otáčivost

$[\alpha] = -14,4^\circ$  (c = 0,139; MeOH)

## 5.3 Inhibiční aktivita vůči AChE, BChE a POP

Tabulka 7 Biologická aktivita ethanolových extraktů vybraných druhů rodu *Centaurea*

Vzorek	Rostlina	AChE (μg/ml)	BChE (μg/ml)
AL-621A	<i>Centaurea cyanus</i> (Markvartice)	> 1000	763,7 ± 87,6
AL-622A	<i>Centaurea jacea</i>	> 1000	220,55 ± 22,3
AL-623A	<i>Centaurea scabiosa</i>	> 1000	480,25 ± 87,2
AL-624A	<i>Centaurea pseudophrygia</i>	> 1000	336,25 ± 33,18
AL-625A	<i>Centaurea stoebe</i>	> 1000	187,85 ± 13,02
AL-626A	<i>Centaurea cyanus</i> (BZLR)	650,85 ± 189,84	145,43 ± 8,73
AL-627A	<i>Centaurea solstitialis</i>	> 1000	> 1000
AL-628A	<i>Centaurea benedicta</i>	> 1000	> 1000
<b>Standardy</b>		<b>AChE (μg/ml)</b>	<b>BChE (μg/ml)</b>
galantamin		0,51 ± 0,019	12,16 ± 0,37
huperzin A		0,008 ± 0,0	> 242
rivastigmin		0,009 ± 0,0	0,0008 ± 0,0

Tabulka 8 Biologická aktivita ethyl-acetátových extraktů vybraných druhů rodu *Centaurea*

Vzorek	Rostlina	AChE (μg/ml)	BChE (μg/ml)
AL-621E	<i>Centaurea cyanus</i> (Markvartice)	221,50 ± 44,56	<b>22,62 ± 3,62</b>
AL-622E	<i>Centaurea jacea</i>	> 1000	326,95 ± 17,60
AL-623E	<i>Centaurea scabiosa</i>	> 1000	858,2 ± 58,6
AL-624E	<i>Centaurea pseudophrygia</i>	> 1000	364,37 ± 92,81
AL-625E	<i>Centaurea stoebe</i>	> 1000	149,23 ± 27,92
AL-626E	<i>Centaurea cyanus</i> (BZLR)	650,85 ± 189,84	<b>25,26 ± 4,42</b>
AL-627E	<i>Centaurea solstitialis</i>	> 1000	> 1000
AL-628E	<i>Centaurea benedicta</i>	> 1000	> 1000
<b>Standardy</b>		<b>AChE (μg/ml)</b>	<b>BChE (μg/ml)</b>
galantamin		0,51 ± 0,019	12,16 ± 0,37
huperzin A		0,008 ± 0,0	> 242
rivastigmin		0,009 ± 0,0	0,0008 ± 0,0

Tabulka 9 Biologická aktivita izolovaných sloučenin vůči AChE, BChE a POP.

Sloučenina	IC <sub>50</sub> [μM]		
	AChE	BChE	POP
arktiin	> 1000	> 1000	0,801 ± 0,055
matairesinosid	> 1000	> 1000	0,733 ± 0,043
arktigenin	m*	m*	-
matairesinosid	m*	m*	-
<b>Standardy</b>			
fysostigmin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-
bajkalin	-	-	194,1 ± 14,3
Z-pro-prolinal	-	-	2,8 × 10 <sup>-3</sup> ± 2,2 × 10 <sup>-3</sup>
galantamin	1,710 ± 0,065	42,30 ± 1,30	-
huperzin A	0,033 ± 0,001	>1000	-
eserin	0,063 ± 0,001	0,130 ± 0,004	-

\* m = jejich aktivita se v současné době stanovuje, z důvodu nastálých problémů s aktivitou AChE u připravených hemolyzátů nebylo možné dříve aktivity připravených aglykonů stanovit.

## 5.2 Cytotoxická aktivita

Tabulka 10 Cytotoxická aktivita EtOAc extraktů vybraných druhů rodu *Centaurea*

Buněčná linie	EtOAc extrakty							Stand*
	AL- 621E	AL- 622E	AL- 623E	AL- 624E	AL-625E	AL- 627E	AL- 628E	Dox*
Jurkat	<b>34 ± 2</b>	75 ± 1	52 ± 5	69 ± 2	57 ± 1	77 ± 2	72 ± 2	2 ± 1
MOLT-4	<b>16 ± 7</b>	56±18	46 ± 6	55±18	<b>24 ± 8</b>	71 ± 5	45 ± 9	0 ± 2
A549	93 ± 5	76 ± 7	80 ± 6	98±21	73 ± 6	81 ± 6	59 ± 8	96 ± 1
HT-29	59 ± 7	97±10	81±10	98 ± 6	91±10	85 ± 4	81 ± 4	109 ± 7
PANC-1	57 ± 6	91 ± 5	80 ± 3	94 ± 8	80 ± 4	89 ± 5	95 ± 4	81 ± 2
A2780	62 ± 3	81 ± 4	74 ± 3	87 ± 7	70 ± 6	84 ± 6	90 ± 4	14 ± 7
HeLa	61 ± 5	77±11	75 ± 8	78 ± 4	67±10	73 ± 6	69 ± 2	13 ± 1
MCF-7	73 ± 3	95 ± 7	83 ± 7	93 ± 8	83 ± 3	104±7	101±6	33 ± 1
SAOS-2	36 ± 2	91 ± 9	75±12	88 ± 8	77 ± 5	98 ± 8	102±12	26 ± 4
MRC-5	85 ± 7	89 ± 2	86 ± 2	89 ± 3	84 ± 5	112±6	114±6	34 ± 4

Dox\* = Doxorubicin; Stand\* = Standard

## 6 Diskuze

Pomocí GS-MS byla v sumárních EtOH extraktech AL-622 (*C. jacea*), AL-624 (*C. pseudophyrgia*), AL-625 (*C. stoebe*), AL-627 (*C. solstitialis*), AL-628 (*C. benedicta*) a EtOAc extraktech AL-621 (*C. cyanus*), AL-622 (*C. jacea*), AL-624 (*C. pseudophyrgia*), AL-625 (*C. stoebe*), AL-626 (*C. cyanus* BZLR), AL-627 (*C. solstitialis*), AL-628 (*C. benedicta*) detekována stejná sloučenina – arktigenin. V EtOAc a EtOH extraktu AL-623 (*C. scabiosa*) byl detekován matairesinol. Obě tyto sloučeniny byly již dříve detekovány v extraktu nažek u druhu *Centaurea scabiosa* [96]. Dále byly tyto dva glykosidy nalezeny v dalších druzích rodu *Centaurea* a to v *Centaurea affinis* Friv., *Centaurea calcitrapa* L., *Centaurea nigra* L. a *Centaurea tweediei* Hook. [59].

TLC analýzy extraktů selektivními činidly Dragendorffovým a jodoplatičitým činidlem na přítomnost alkaloidů vykazovaly u většiny ethyl-acetátových extraktů chrp falešně pozitivní reakci, kromě extraktů z *Centaurea cyanus* (Markvartice, Botanická zahrada léčivých rostlin FAF UK), které dávaly pozitivní reakci na přítomnost alkaloidů i s Mayerovým činidlem, která se projevila vznikem bílé sraženiny, ostatní extrakty z nažek chrp reagovaly s Mayerovým činidlem negativně. Pozitivně falešnou reakci s Dragendorffovým činidlem mohou dávat i sloučeniny bez přítomnosti dusíku v molekule a to za předpokladu, že kyslíková funkce a  $\beta$ -uhlík vázaný na kyslík mají vysokou elektronovou hustotu [97]. Na základě této zkušenosti se zdá jako nezbytné při detekci alkaloidů v extraktech vždy kombinovat více selektivních činidel, aby se vyhnulo falešně pozitivní reakci. Například jako vhodné se jeví kombinovat pro detekci alkaloidů ve vzorcích Dragendorffovo činidlo (TLC detekce) s Mayerovým činidlem (analýza v roztoku). Pro jodoplatičité činidlo nejsou v literatuře známy případy falešně pozitivních reakcí.

Ethyl-acetátové extrakty byly testovány na inhibiční aktivitu AChE, BChE a na cytotoxickou aktivitu, která byla měřena *in vitro* na různých nádorových liniích. U ethanolových sumárních extraktů byla také zjišťována inhibiční aktivita AChE a BChE, tyto extrakty však byly neaktivní na inhibici cholinesteras ( $IC_{50}$  AChE a  $IC_{50}$  BChE byla vyšší než 100  $\mu\text{g/ml}$ ). Referenčními látkami pro měření inhibiční aktivity AChE a BChE byl galantamin, huperzin A, rivastigmin a fysostigmin. Zajímavou inhibiční aktivitu na BChE vykazoval EtOAc extrakt z *Centaurea cyanus*, který selektivně inhiboval BChE ( $IC_{50}$  BChE =  $22,62 \pm 3,62$   $\mu\text{g/ml}$ ,

$IC_{50\text{ AChE}} = 221,50 \pm 44,56 \mu\text{g/ml}$ ). Cytotoxická aktivita byla měřena jen u ethyl-acetátových extraktů, a to při koncentraci  $50 \mu\text{g/ml}$  a byla vyjádřena jako procentuální viabilita buněk po 48 hodinách pomocí MTT testu. Jako referenční sloučenina se použil doxorubicin. Nejvýraznější cytotoxickou aktivitu vykazoval extrakt z *Centaurea cyanus*, který byl nejvíce cytotoxický u nádorové linie MOLT-4 ( $16 \pm 7 \%$ ). Ostatní vybrané extrakty vykazovaly nevýraznou cytotoxicitu. V literatuře bylo testováno několik druhů chrp na cytotoxicitu. V *Centaurea tweediei* Hook. a *Centaurea diffusa* L. byla objevena cytotoxicita pikrinu a onopordopikrinu. Arktigenin izolovaný z *Centaurea schischkinii* Tzvelev, montamin a moschamin izolovaný z *Centaurea motana* L. vykazovaly cytotoxickou aktivitu. Cytotoxická aktivita byla potvrzena u arktigeninu a matairesinolu, sloučenin izolované z *Centaurea arenaria* Willd. [99].

V rámci této diplomové práce byly extrakty *Centaurea jacea* (AL-622), *Centaurea pseudophrygia* (AL-624), *Centaurea stoebe* (AL-625), *Centaurea solstitialis* (AL-627) a *Centaurea benedicta* (AL-628) spojeny dohromady na základě jejich shodného retenčního faktoru a MS analýzy (identifikovány stejné molekulové hmotnosti a jejich fragmenty), aby z nich mohla být izolována preparativní TLC majoritní sloučenina. Extrakt *Centaurea scabiosa* (AL-623) byl zpracován samostatně, protože se od ostatních lišil ve výše uvedených výsledcích. Ze samostatného vzorku *Centaurea scabiosa* (AL-623) byla izolována amorfni, průhledná sloučenina matairesinosid a ze spojených extraktů *Centaurea jacea* (AL-622), *Centaurea pseudophrygia* (AL-624), *Centaurea stoebe* (AL-625), *Centaurea solstitialis* (AL-627) a *Centaurea benedicta* (AL-628) byla izolována amorfni, průhledná sloučenina arktiin.

Matairesinosid byl již dříve izolován z nážek *Centaurea scabiosa* L., *Arctium lappa* L.. V rodu *Centaurea* existuje ještě dalších několik druhů, ze kterých byl matairesinosid izolován, jeho struktura byla potvrzena ESI-MS a NMR analýzami [96] [98] [59]. Hodnota specifické optické otáčivosti této sloučeniny, která byla změřena v rámci této diplomové práce, se lišila s hodnotou nalezenou v literatuře. V literatuře je uváděna  $[\alpha] = -48,8^\circ$  ( $c = 0,002$ ; MeOH) a v této diplomové práci byla naměřena hodnota  $[\alpha] = -29,6^\circ$  ( $c = 0,135$ ; MeOH) [59].

Co se týče arktiinu, v literatuře je uváděno, že byl již dříve izolován a nalezen v několika druzích rodu *Arctium* L., ze kterého byl také poprvé izolován. Dále arktiin byl nalezen v několika druzích *Centaurea* a také ve dvou druzích rodu *Cirsium* [98] [59]. Výsledky NMR a ESI-MS analýzy korelují s výsledky uvedené v této diplomové práci, avšak specifická optická otáčivost je v porovnání s literaturou poněkud odlišná [96] [59]. Výsledky specifické optické



otáčivosti arktiinu z literatury byly  $[\alpha] = -55,3^\circ$  ( $c = 0,003$ ; MeOH) a arktiin izolovaný v této diplomové práci měl optickou otáčivost  $[\alpha] = -19,5^\circ$  ( $c = 0,205$ ; MeOH) [59]

Matairesinosid a arktiin byly testovány na inhibiční aktivitu vůči AChE, BChE a POP. Sloučenina arktiinu nebyla doposud na tyto aktivity testována. Inhibiční aktivita arktiinu naměřená při biologických testech je však velice nízká, a proto se vůči těmto enzymům jeví jako neaktivní. Velice podobných výsledků dosáhnul izolovaný matairesinosid. Jeho inhibiční aktivita také nebyla doposud měřena. Arktigenin a matairesinol jsou aglykony arktiinu a matairesinosidu a byly v rámci této diplomové práce také připraveny za účelem studia vztahů biologické aktivity izolovaných glykosidů a jejich aglykonů. Bohužel, aglykony byly připraveny těsně před odevzdáním práce, a tudíž získané hodnoty cholinesterasové inhibiční aktivity nemohly být zahrnuty do odevzdané diplomové práce, protože se na pracovišti katedry farmaceutické botaniky v dané chvíli objevil problém s aktivitou AChE v hemolyzátu krve. Ostatní aktivity u aglykonů nemohly být stanoveny, neboť sloučeniny nebyly dostupné v dostatečném množství.

Matairesinol a arktigenin byly již dříve izolovány z nažek rostlin rodu *Centaurea* L., konkrétně také z druhu studovaném v této diplomové práci (*Centaurea scabiosa* L.) [96]. Dále byly sloučeniny matairesinol a arktigenin izolovány z *Centaurea schischkinii* L., *Centaurea nigra* L. nebo *Centaurea calcitrapa* L., z čehož vyplývá, že povětšinou se tyto sloučeniny vyskytují v rostlinách současně [59] [88].

Pro další studium se jeví jako perspektivní sekundární metabolity v nažkách *Centaurea cyanus*, které vykazovaly zajímavou inhibiční aktivitu vůči BChE a proti nádorové linii MOLT-4 (nádorová linie akutní lymfoblastické leukémie). Látky matairesinosid a arktiin mají jen velmi nízkou cytotoxicitu, ale jejich aglykony matairesinol a arktigenin jsou podle literatury zajímavými cytotoxickými látkami. Arktigenin měl dokonce srovnatelnou cytotoxickou aktivitu proti žábřonožkám solným jako podofylotoxin a matairesinol zase může být považován za účinnou sloučeninu proti buňkám rakoviny tlustého střeva díky své aktivitě proti nádorovým liniím tlustého střeva (CaCo-2) [88]. Z tohoto pohledu se jeví aglykony matairesinol a arktigenin zajímavé pro další studium cytotoxické aktivity.

## 7 Abstrakt

Faschingbauer J.: Cytotoxická a cholinesterasová inhibiční aktivita extraktů z vybraných druhů rodu *Centaurea* L.. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2019.

V rámci screeningu biologicky aktivních sekundárních metabolitů rostlin, prováděné na katedře farmaceutické botaniky FAF UK, byly zkoumány vybrané taxony rodu *Centaurea* (Asteraceae). Tato studie se zabývá základním fytochemickým výzkumem extraktů připravených z nažek druhů *Centaurea cyanus*, *Centaurea jacea*, *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudophrygia*, *Centaurea stoebe*, *Centaurea solstitialis* a *Centaurea benedicta*. Pro objasnění jednotlivých skupin sekundárních metabolitů byly připravené extrakty podrobené důkazovým reakcím na TLC a MS analýze (EI, ESI). Ethyl-acetátové i sumární ethanolové extrakty byly zkoumány na potenciální inhibiční aktivitu vůči lidské erytrocytární acetylcholinesterase (AChE) a plazmové butyrylcholinesterase (BChE) a cytotoxictě vůči vybraným 9 nádorovým liniím. Zajímavou cholinesterasovou aktivitu vykazoval ethyl-acetátový extrakt *C. cyanus*, který selektivně inhiboval BChE ( $IC_{50}^{BChE} = 22,62 \pm 3,62 \mu\text{g/ml}$ ;  $IC_{50}^{AChE} = 221,50 \pm 44,56 \mu\text{g/ml}$ ). Ostatní ethyl-acetátové a ethanolové extrakty dalších vybraných druhů rodu *Centaurea* byly vůči cholinesterasám neaktivní ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ ). Na základě výsledků, se jako perspektivní pro další studium jeví sekundární metabolity *Centaurea cyanus*.

U izolovaných látek arktiinu a matairesinosidu byla měřena inhibiční aktivita proti POP, kde byly použity jako standardy fyzostigmin, bajkalin a Z-pro-prolinal. Ani jedna z látek však nevykazovala aktivitu proti POP.

V rámci této diplomové práce byly izolovány látky arktiin a matairesinosid, které se v této diplomové práci jeví jako neaktivní vůči vybraným biologickým testům (inhibice AChE, BChE, POP a cytotoxicitě). Byly však také připraveny jejich aglykony arktigenin a matairesinol, které podle literatury vykazují velice zajímavé cytotoxické účinky.

Cytotoxická aktivita ethyl-acetátových extraktů byla zkoumána v koncentracích 50  $\mu\text{g/ml}$  vůči nádorovým liniím Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7,

SAOS-2 a jako kontrolní linie byly použity nenádorové buňky MRC-5. Doxorubicin (1  $\mu$ M) byl použit jako pozitivní standard. Cytotoxická aktivita extraktů byla vyjádřena jako buněčná viabilita po jejich 48 hodinovém působení a hodnoty byly vyjádřeny v procentech vztažených ke kontrole (100%). Alkaloidní extrakt *C. cyanus* vykazoval nejlepší cytotoxickou aktivitu, byl účinný vůči MOLT-4 ( $16 \pm 7\%$  viabilita). Nicméně, v porovnání se standardem doxorubicinem, cytotoxická aktivita ethyl-acetátových extraktů vůči vybraným nádorovým liniím je nízká.

## 8 Abstract

Faschingbauer J.: Cytotoxic and cholinesterase inhibitory activity of extracts from selected species of the *Centaurea* L. genus. Diploma thesis, Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové, 2019.

During the screening of biologically active secondary metabolites of plants carried out at the Department of Pharmaceutical Botany FAF UK, selected taxa of the genus *Centaurea* (Asteraceae) were investigated. This study is focused on a basic phytochemical research of extracts prepared from *Centaurea cyanus*, *Centaurea jacea*, *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudophrygia*, *Centaurea stoebe*, *Centaurea solstitialis* a *Centaurea benedicta*. Extracts were prepared for evidence of the proof reactions of TLC and MS analysis (EI, ESI) to clarify a potential presence of alkaloids. EtOAc and ethanol extracts were evaluated for potential inhibitory activity against human erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and plasma butyrylcholinesterase (BChE) and cytotoxicity against selected 9 tumor lines. *C. cyanus* alkaloid extract had interesting cholinesterase activity which selectively inhibited BChE ( $IC_{50}^{BChE} = 22.62 \pm 3.62 \mu\text{g} / \text{ml}$ ,  $IC_{50}^{AChE} = 221.50 \pm 44.56 \mu\text{g} / \text{ml}$ ). Other EtOAc extracts of selected *Centaurea* species were considered inactive ( $IC_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). Summary ethanol extracts were inactive against ChE inhibition activity. Based on obtained results, alkaloidal extract of *Centaurea cyanus* seems to be interesting for further investigation.

Isolated arctiin and matairesinosid were measured for inhibition activity against POP. Standards were fyzostigmin, bajkalin and Z-pro-prolinal. However, none of the substances showed activity against POP.

Within this diploma thesis, pure compounds arctiin and matairesinoside were isolated, both compounds in biological tests focused on inhibition AChE, BChE, and POP were considered inactive. However, their aglycons arctigenin and matairesinol were also prepared, which according to the literature possess very interesting cytotoxic effects.

The cytotoxic activity of EtOAc extracts was evaluated at screening concentrations of  $50 \mu\text{g} / \text{ml}$  against the tumor lines Jurkat, MOLT-4, A549, HT-29, PANC-1, A2780, HeLa, MCF-7, SAOS-2 and MRC-5 non-tumor lines was used as a control lines. Doxorubicin ( $1 \mu\text{M}$ ) was

used as a positive standard. The cytotoxic activity of the extracts was expressed as cell viability after 48 hours and the values were expressed as percentages relative to the control (100%). The *C. cyanus* alkaloid extract had the best cytotoxic activity and was slightly effective against MOLT-4 ( $16 \pm 7\%$  viability). However, the cytotoxic activity of EtOAc extracts were low against the selected tumor lines in comparison compared to the standard doxorubicin.

## 9 Seznam použité literatury

- [1] V. Pidrman, *Demence*, Vyd. 1. Praha: Grada, 2007.
- [2] R. Jirák CSc, „Farmakoterapie Alzheimerovy choroby“, *Prakt. Lékařství*, roč. 5, č. 4, s. 176–178, srp. 2009.
- [3] L. Cahlíková, K. Macáková, N. Benešová, J. Chlebek, A. Hošťálková, a L. Opletal, „Chapter 6 - Natural Compounds (Small Molecules) as Potential and Real Drugs of Alzheimer’s Disease: A Critical Review“, in *Studies in Natural Products Chemistry*, roč. 42, Atta-ur-Rahman, Ed. Elsevier, 2014, s. 153–194.
- [4] C. Zucchella, E. Sinfioriani, S. Tamburin, A. Federico, E. Mantovani, S. Bernini, R. Casale, a M. Bartolo, „The Multidisciplinary Approach to Alzheimer’s Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment“, *Front. Neurol.*, roč. 9, pro. 2018.
- [5] P. van Wijngaarden, X. Hadoux, M. Alwan, S. Keel, a M. Dirani, „Emerging ocular biomarkers of Alzheimer disease“, *Clin. Experiment. Ophthalmol.*, roč. 45, č. 1, s. 54–61, 2017.
- [6] R. Mayeux a Y. Stern, „Epidemiology of Alzheimer Disease“, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, roč. 2, č. 8, srp. 2012.
- [7] R. Hickman, A. Faustin, a T. Wisniewski, „Alzheimer Disease and its Growing Epidemic: Risk Factors, Biomarkers and the Urgent Need for Therapeutics“, *Neurol. Clin.*, roč. 34, č. 4, s. 941–953, lis. 2016.
- [8] O. Mátl a M. Mátlová, „Zpráva o stavu demence 2016“, s. 24.
- [9] T. H. Ferreira-Vieira, I. M. Guimaraes, F. R. Silva, a F. M. Ribeiro, „Alzheimer’s Disease: Targeting the Cholinergic System“, *Curr. Neuropharmacol.*, roč. 14, č. 1, s. 101–115, led. 2016.
- [10] L. R. Tallini, J. Bastida, N. Cortes, E. H. Osorio, C. Theoduloz, a G. Schmeda-Hirschmann, „Cholinesterase Inhibition Activity, Alkaloid Profiling and Molecular Docking of Chilean *Rhodophiala* (Amaryllidaceae)“, *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.*, roč. 23, č. 7, čer. 2018.
- [11] F. Koukolík a R. Jirák, *Alzheimerova nemoc a další demence*, Vyd. 1. Praha: Grada, 1998.

- [12] Y. Arai, Y. Iwasaki, T. Suzuki, S. Ide, a M. Kaga, „Elimination of amyloid precursor protein in senile plaques in the brain of a patient with Alzheimer-type dementia and Down syndrome", *Brain Dev.*, roč. 41, č. 1, led. 2019
- [13] C. Haass, C. Kaether, G. Thinakaran, a S. Sisodia, „Trafficking and Proteolytic Processing of APP", *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, roč. 2, č. 5, kvě. 2012.
- [14] T. Kawakubo, R. Mori, K. Shirotani, N. Iwata, a M. Asai, „Nepriylsin Is Suppressed by Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinase 1A (DYRK1A) in Down-Syndrome-Derived Fibroblasts", *Biol. Pharm. Bull.*, roč. 40, č. 3, s. 327–333, bře. 2017.
- [15] N. Ahmadian, S. Hejazi, J. Mahmoudi, a M. Talebi, „Tau Pathology of Alzheimer Disease: Possible Role of Sleep Deprivation", *Basic Clin. Neurosci.*, roč. 9, č. 5, s. 307–316, 2018.
- [16] P. J. Dolan a G. V. Johnson, „The role of tau kinases in Alzheimer’s disease", *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, roč. 13, č. 5, s. 595–603, zář. 2010.
- [17] S. Jadhav, J. Avila, M. Schöll, GG. Kovacs, E. Kövari, R. Skrabana, LD. Evans, E. Kontsekova, B. Malawska, R. de Silva, L. Buee, a N. Zilka, „A walk through tau therapeutic strategies", *Acta Neuropathol. Commun.*, roč. 7, č. 1, s. 22, úno. 2019.
- [18] G. Bu, „Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer’s disease: pathways, pathogenesis and therapy", *Nat. Rev. Neurosci.*, roč. 10, č. 5, s. 333–344, kvě. 2009.
- [19] J.-T. Yu, L. Tan, a J. Hardy, „Apolipoprotein E in Alzheimer’s Disease: An Update", *Annu. Rev. Neurosci.*, roč. 37, č. 1, s. 79–100, čvc. 2014.
- [20] L. Mahoney-Sanchez, A. A. Belaidi, A. I. Bush, a S. Ayton, „The Complex Role of Apolipoprotein E in Alzheimer’s Disease: an Overview and Update", *J. Mol. Neurosci.*, roč. 60, č. 3, s. 325–335, lis. 2016.
- [21] S. C. Hopp, Y. Lin, D. Oakley, A. D. Roe, S. L. DeVos, D. Hanlon, a B. T. Hyman, „The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer’s disease", *J. Neuroinflammation*, roč. 15, zář. 2018.
- [22] D. V. Hansen, J. E. Hanson, a M. Sheng, „Microglia in Alzheimer’s disease", *J. Cell Biol.*, roč. 217, č. 2, s. 459–472, 05 2018.
- [23] A. Sanabria-Castro, I. Alvarado-Echeverría, a C. Monge-Bonilla, „Molecular Pathogenesis of Alzheimer’s Disease: An Update", *Ann. Neurosci.*, roč. 24, č. 1, s. 46–54, kvě. 2017.

- [24] A. Ayala, M. F. Muñoz, a S. Argüelles, „Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal", *Oxid. Med. Cell. Longev.*, roč. 2014, 2014.
- [25] M. A. Bradley-Whitman a M. A. Lovell, „Biomarkers of lipid peroxidation in Alzheimer disease (AD): an update", *Arch. Toxicol.*, roč. 89, č. 7, s. 1035–1044, čvc. 2015.
- [26] R. O. Carare, C. A. Hawkes, M. Jeffrey, R. N. Kalaria, a R. O. Weller, „Review: cerebral amyloid angiopathy, prion angiopathy, CADASIL and the spectrum of protein elimination failure angiopathies (PEFA) in neurodegenerative disease with a focus on therapy", *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, roč. 39, č. 6, s. 593–611, říj. 2013.
- [27] Y. You, A. Perkins, P. Cisternas, B. Muñoz, X. Taylor, Y. You, H. J. Garringer, A. L. Oblak, B. K. Atwood, R. Vidal, a C. A. Lasagna-Reeves, „Tau as a mediator of neurotoxicity associated to cerebral amyloid angiopathy", *Acta Neuropathol. Commun.*, roč. 7, úno. 2019.
- [28] Y. D. Reijmer, S. J. van Veluw, a S. M. Greenberg, „Ischemic brain injury in cerebral amyloid angiopathy", *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, roč. 36, č. 1, s. 40–54, led. 2016.
- [29] A. Atri, „The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management", *Medical Clinics of North America*, roč. 36, č. 2, s. 263–293, bře. 2019
- [30] G. D. Femminella, T. Thayanandan, V. Calsolaro, K. Komici, G. Renco, G. Corbi, a N. Ferrara, „Imaging and Molecular Mechanisms of Alzheimer's Disease: A Review", *Int. J. Mol. Sci.*, roč. 19, č. 12, lis. 2018.
- [31] M. A. Cerquera-Jaramillo, M. O. Nava-Mesa, R. E. González-Reyes, C. Tellez-Conti, a A. de-la-Torre, „Visual Features in Alzheimer's Disease: From Basic Mechanisms to Clinical Overview", *Neural Plast.*, roč. 2018, říj. 2018.
- [32] R. M. F. L. D. Silva, C. M. Miranda, T. Liu, G. Tse, a L. Roever, „Atrial Fibrillation and Risk of Dementia: Epidemiology, Mechanisms, and Effect of Anticoagulation", *Front. Neurosci.*, roč. 13, led. 2019.
- [33] R. Briggs, S. P. Kennelly, a D. O'Neill, „Drug treatments in Alzheimer's disease", *Clin. Med.*, roč. 16, č. 3, s. 247–253, čer. 2016.
- [34] A. Kulshreshtha a P. Piplani, „Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease", *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.*, roč. 37, č. 9, s. 1403–1435, zář. 2016.



- [35] J. Chlebek, J. Korábečný, R. Doležal, Š. Štěpánková, D. I. Pérez, A. Hošťálková, L. Opletal, L. Cahlíková, K. Macáková, T. Kučera, M. Hrabínová, a D. Jun, „In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier", *Molecules*, roč. 24, č. 7, s. 1340–1340, dub. 2019.
- [36] N. Kandiah, MC Pai, V. Senanarong, I. Looi, E. Ampil, KW Park, AK, Karanam, a S. Christopher, „Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia", *Clin. Interv. Aging*, roč. 12, s. 697–707, dub. 2017.
- [37] M. B. Čolović, D. Z. Krstić, T. D. Lazarević-Pašti, A. M. Bondžić, a V. M. Vasić, „Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology", *Curr. Neuropharmacol.*, roč. 11, č. 3, s. 315–335, kvě. 2013.
- [38] Y. Ago, K. Koda, K. Takuma, a T. Matsuda, „Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine", *J. Pharmacol. Sci.*, roč. 116, č. 1, s. 6–17, 2011.
- [39] G. Yang, Y. Wang, J. Tian, a J.-P. Liu, „Huperzine A for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials", *PLoS ONE*, roč. 8, č. 9, zář. 2013.
- [40] W.-Y. Wu, Y.-C. Dai, N.-G. Li, Z.-X. Dong, T. Gu, Z.-H. Shi, X. Xue, Y.-P. Tang, a J.-A. Duan, „Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease", *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, roč. 32, č. 1, s. 572–587, led. 2017.
- [41] J. Liu, L. Chang, Y. Song, H. Li, a Y. Wu, „The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease", *Front. Neurosci.*, roč. 13, úno. 2019.
- [42] W. Danysz a C. G. Parsons, „Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections", *Br. J. Pharmacol.*, roč. 167, č. 2, s. 324–352, zář. 2012.
- [43] S. Matsunaga, T. Kishi, a N. Iwata, „Memantine Monotherapy for Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis", *PLoS ONE*, roč. 10, č. 4, dub. 2015.
- [44] W. J. Deardorff a G. T. Grossberg, „A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease", *Drug Des. Devel. Ther.*, roč. 10, s. 3267–3279, říj. 2016.

- [45] S.-Y. Hung a W.-M. Fu, „Drug candidates in clinical trials for Alzheimer’s disease“, *J. Biomed. Sci.*, roč. 24, čvc. 2017.
- [46] G. Cuberas-Borrós, I. Roca, M. Boada, L. Tárraga, I. Hernández, M. Buendia, L. Rubio, G. Torres, Á. Bittini, J.A. Guzmán-de-Villoria, F. Pujadas, M. Torres, L. Núñez, J. Castell, A. Páez, „Longitudinal Neuroimaging Analysis in Mild-Moderate Alzheimer’s Disease Patients Treated with Plasma Exchange with 5% Human Albumin“, *J. Alzheimers Dis.*, roč. 61, č. 1, s. 321–332.
- [47] P. T. Männistö, J. Venäläinen, A. Jalkanen, a J. A. García-Horsman, „Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders“, *Drug News Perspect.*, roč. 20, č. 5, s. 293–305, čer. 2007.
- [48] C. Rotermund, G. Machetanz, a J. C. Fitzgerald, „The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases“, *Front. Endocrinol.*, roč. 9, čvc. 2018.
- [49] J.-M. Li, C. Liu, X. Hu, Y. Cai, C. Ma, X.-G. Luo, a X.-X. Yan, „Inverse correlation between Alzheimer’s disease and cancer: implication for a strong impact of regenerative propensity on neurodegeneration?“, *BMC Neurol.*, roč. 14, lis. 2014.
- [50] C. Ballatore, K. R. Brunden, D. M. Hurn, J. Q. Trojanowski, V. M.-Y. Lee, a A. B. Smith, „Microtubule Stabilizing Agents as Potential Treatment for Alzheimer’s Disease and Related Neurodegenerative Tauopathies“, *J. Med. Chem.*, roč. 55, č. 21, s. 8979–8996, lis. 2012.
- [51] Y. T. Kwak, Y. Yang, a M.-S. Koo, „Anxiety in Dementia“, *Dement. Neurocognitive Disord.*, roč. 16, č. 2, s. 33–39, čer. 2017.
- [52] J. M. Coello a Y. D. Sabres, *Vincristine: Clinical Uses, Pharmacokinetics and Impacts on Health*. Nova Science Publishers, Incorporated, 2013.
- [53] V. Ali (2014). *Přírodní látky a jejich úloha v prevenci rakoviny* (Diplomová práce). Praha, Karlova Univerzita.
- [54] A. Cimmino, M. Masi, M. Evidente, S. Superchi, a A. Evidente, „Amaryllidaceae alkaloids: Absolute configuration and biological activity“, *CHIRALITY*, roč. 29, č. 9, s. 486–499, zář. 2017.
- [55] B. A. Weaver, „How Taxol/paclitaxel kills cancer cells“, *Mol. Biol. Cell*, roč. 25, č. 18, s. 2677–2681, zář. 2014.
- [56] X. Yu, Z. Che, a H. Xu, „Recent Advances in the Chemistry and Biology of Podophyllotoxins“, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, roč. 23, č. 19, s. 4467–4526, dub. 2017.

- [57] F. Ç. Çelikezen, Ş. Hayta, Ö. Özdemir, a H. Türkez, „Cytotoxic and antioxidant properties of essential oil of *Centaurea behen* L. in vitro", *Cytotechnology*, roč. 71, č. 1, s. 345–350, úno. 2019.
- [58] Daidalea. *Rostliny - systematické rozdělení* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSystematic.asp>
- [59] M. Shoeb, „Cytotoxic compounds from the genus *Centaurea*.", pro. 2005.
- [60] Daidalea. *Cyanus segetum HILL – chrpa modrák (chrpa polní)* [online]. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2005 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10049>
- [61] CENTAUREA CYANUS L. – chrpa modrá / nevädza poľná. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-cyanus/>
- [62] CENTAUREA JACEA L. – chrpa luční / nevädzovec lúčny. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-jacea/>
- [63] CENTAUREA SCABIOSA L. – chrpa čekánek / nevädzník hlaváčovitý. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-scabiosa/>
- [64] CENTAUREA PSEUDOPHRYGIA C. A. Meyer – chrpa parukárka / nevädzovec vyvýšený. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-pseudophrygia/>
- [65] CENTAUREA STOEBE L. – chrpa latnatá / nevädzka porýnska. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-stoebe/>
- [66] CNICUS BENEDICTUS (L.) Greuter et Burdet – benedikt lékařský / benedikt lekársky. *Botany.cz*[online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/cnicus-benedictus/>
- [67] CENTAUREA SOLSTITIALIS L. – chrpa žlutá / panevädza letná. *Botany.cz* [online]. 2007 [cit. 2019-05-12]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/centaurea-solstitialis/>
- [68] H. Horáčková (2018). Vliv seskviterpenů na detoxikační enzymy v jaterních řezech (Diplomová práce). Praha, Karlova univerzita.
- [69] B. Özçelik, I. Gürbüz, T. Karaoglu, a E. Yeşilada, „Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*", *Microbiol. Res.*, roč. 164, č. 5, s. 545–552, zář. 2009.

- [70] I. Carev, M. Ruščić, M. Skočibušić, A. Maravić, S. Siljak-Yakovlev, a O. Politeo, „Phytochemical and Cytogenetic Characterization of *Centaurea solstitialis* L. (Asteraceae) from Croatia", *Chem. Biodivers.*, roč. 14, č. 2, s. e1600213, 2017.
- [71] S. Huneck, J. Jakupovic, a A. Schuster, „Weitere Inhaltsstoffe aus *Centaurea stoebe*", *Planata Med*, roč. 52, č. 5, s. 398–399, bře 1986
- [72] Y. Peng, Y. Jian, A. Zulfiqar, B. Li, K. Zhang, F. Long, C. Peng, X. Cai, I.-A. Khai, a W. Wang, „Two new sesquiterpene lactone glycosides from *Cnicus benedictus*", *Nat. Prod. Res.*, roč. 31, č. 19, s. 2211–2217, říj. 2017.
- [73] P. Forgo, I. Zupkó, J. Molnár, A. Vasas, G. Dombi, a J. Hohmann, „Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L.", *Fitoterapia*, roč. 83, č. 5, s. 921–925, čvc. 2012.
- [74] I. P. Kaminskii, E. A. Krasnov, T. V. Kadyrova, S. A. Ivashenko, B. B. Rakhimova, a S. M. Adekenov, „Quantitative Hplc Determination of Cynaropicrin in *Centaurea Scabiosa* Dry Extract", *Pharm. Chem. J.*, roč. 45, č. 9, s. 560–563, lis. 2011.
- [75] S. B. Erel, C. Karaalp, E. Bedir, H. Kaehlig, S. Glasl, S. Khan, a L. Krenn, „Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities", *Pharm. Biol.*, roč. 49, č. 8, s. 840–849, srp. 2011.
- [76] J. Spilková, J. Martin, T. Siatka, L. Tůmová, M. Kašparová, Karlova Univerzita, *Farmakognozie*, Vydání první. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016.
- [77] A. N. Panche, A. D. Diwan, a S. R. Chandra, „Flavonoids: an overview", *J. Nutr. Sci.*, roč. 5, pro. 2016.
- [78] H. P. Bais, T. S. Walker, A. J. Kennan, F. R. Stermitz, a J. M. Vivanco, „Structure-Dependent Phytotoxicity of Catechins and Other Flavonoids: Flavonoid Conversions by Cell-free Protein Extracts of *Centaurea maculosa* (Spotted Knapweed) Roots", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 51, č. 4, s. 897–901, úno. 2003.
- [79] G. Paun, E. Neagu, V. Moroeanu, C. Albu, S. Savin, a G. Lucian Radu, „Chemical and Bioactivity Evaluation of *Eryngium planum* and *Cnicus benedictus* Polyphenolic-Rich Extracts", *BioMed Res. Int.*, s. 1–10, bře. 2019.
- [80] M. S. Lar'kina, T. V. Kadyrova, E. V. Ermilova, a E. A. Krasnov, „Quantitative determination of flavonoids from the aerial part of greater knapweed ( *Centaurea scabiosa* L.)", *Pharm. Chem. J.*, roč. 43, č. 6, s. 320–323, čer. 2009.

- [81] E. Zaplatic, M. Bule, S. Z. A. Shah, M. S. Uddin, a K. Niaz, „Molecular mechanisms underlying protective role of quercetin in attenuating Alzheimer’s disease”, *Life Sci.*, roč. 224, s. 109–119, kvě. 2019.
- [82] P. Xu, S. Wang, X. Yu, Y. Su, T. Wang, W. Zhou, H. Zhang, Y. Wang, R. Liu, „Rutin improves spatial memory in Alzheimer’s disease transgenic mice by reducing A $\beta$  oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation”, *Behav. Brain Res.*, roč. 264, s. 173–180, kvě. 2014.
- [83] J. Zhang, J. Chen, Z. Liang, a C. Zhao, „New Lignans and Their Biological Activities”, *Chem. Biodivers.*, roč. 11, č. 1, s. 1–54, led. 2014.
- [84] A. Sólyomváry, G. Tóth, M. Kraszni, B. Noszál, I. Molnár-Perl, a I. Boldizsár, „Identification and quantification of lignans and sesquilignans in the fruits of *Cnicus benedictus* L.: Quantitative chromatographic and spectroscopic approaches”, *Microchem. J.*, roč. 114, s. 238–246, kvě. 2014.
- [85] P. Xu, M.-W. Huang, C.-X. Xiao, F. Long, Y. Wang, S.-Y. Liu, W.-W. Jia, W.-J. Wu, D. Yang, X.-H. Liu, Y.-Z. Zhu, a J.-F. Hu, „Matairesinol Suppresses Neuroinflammation and Migration Associated with Src and ERK1/2-NF- $\kappa$ B Pathway in Activating BV2 Microglia”, *Neurochem. Res.*, roč. 42, č. 10, s. 2850–2860, 01 2017.
- [86] Y. He, Q. Fan, T. Cai, W. Huang, X. Xie, Y. Wen, a Z. Shi, „Molecular mechanisms of the action of Arctigenin in cancer”, *Biomed. Pharmacother.*, roč. 108, s. 403–407, pro. 2018.
- [87] E. Hodaj, O. Tsiftoglou, S. Abazi, D. Hadjipavlou-Litina, a D. Lazari, „Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity”, *Nat. Prod. Res.*, roč. 31, č. 10, s. 1195–1200, kvě. 2017.
- [88] M. Shoeb, S. Celik, M. Jaspars, Y. Kumarasamy, S. M. MacManus, L. Nahar, P. K. Thoo-Lin, a S. D. Sarker, „Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii*”, *Tetrahedron*, roč. 61, č. 38, s. 9001–9006, zář. 2005.
- [89] M. Shoeb, S. M. MacManus, M. Jaspars, J. Trevidu, L. Nahar, P. K. Thoo-Lin, a S. D. Sarker, „Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells”, *Tetrahedron*, roč. 62, č. 48, s. 11172–11177, lis. 2006.

- [90] S. D. Sarker, L. Dinan, V. Šik, E. Underwood, a P. G. Waterman, „Moschamide: An unusual alkaloid from the seeds of *Centaurea moschata*“, *Tetrahedron Lett.*, roč. 39, č. 11, s. 1421–1424, bře. 1998.
- [91] S. D. Sarker, T. Savchenko, P. Whiting, V. Šik, a L. N. Dinan, „Moschamine, CIS-Moschamine, Moschamindole and Moschamindolol: Four Novel Indole Alkaloids from *Centaurea Moschata*“, *Nat. Prod. Lett.*, roč. 9, č. 3, s. 189–199, led. 1997.
- [92] N. Tharayil, P. Bhowmik, P. Alpert, E. Walker, D. Amarasiriwardena, a B. Xing, „Dual purpose secondary compounds: phytotoxin of *Centaurea diffusa* also facilitates nutrient uptake“, *New Phytol.*, roč. 181, č. 2, s. 424–434, 2009.
- [93] J. B. Park, „Synthesis, biological activities and bioavailability of moschamine, a safflomide-type phenylpropenoic acid amide found in *Centaurea cyanus*“, *Nat. Prod. Res.*, roč. 26, č. 16, s. 1465–1472, 2012.
- [94] J. Žďárová-Karasová, K. Kuča, D. Jun, a J. Bajgar, „Using the Ellman method for in vivo testing of cholinesterase activity“, *Chem. Listy*, roč. 104, č. 1, s. 46–50, 01 2010.
- [95] M. Šafratová, A. Hošťálková, D. Hulcová, K. Breiterová, V. Hrabcová, M. Machado, D. Fontinha, M. Prudêncio, J. Kuneš, J. Chlebek, D. Jun, M. Hrabínová, L. Nováková, R. Havelek, M. Seifrtová, L. Opletal, a L. Cahlíková, „Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink parasol of various structural types and their biological activity“, *Arch Pharm Res.*, roč. 41, č. 2, úno. 2018
- [96] I. Boldizsár, Z. Füzfai, F. Tóth, E. Sedlák, L. Borsodi, a I. Molnár-Perl, „Mass fragmentation study of the trimethylsilyl derivatives of arctiin, matairesinoside, arctigenin, phylligenin, matairesinol, pinosresinol and methylarctigenin: their gas and liquid chromatographic analysis in plant extract“, *J. Chromatogr. A.*, roč. 1217, č. 10, bře. 2010
- [97] A.-A. M. Habib, „False-Positive Alkaloid Reactions“, *J. Pharm. Sci.*, roč. 69, č. 1, s. 37–43, led. 1980.
- [98] L. Szokol-Borsodi, A. Sólyomváry, I. Molnár-Perl, a I. Boldizsár, „Optimum yields of dibenzylbutyrolactone-type lignans from *Cynareae* fruits, during their ripening, germination and enzymatic hydrolysis processes, determined by on-line chromatographic methods“, *Phytochem Anal.*, roč. 23, č. 6, 598–603, pro. 2012

- [99] S. N. Ostad, A. Rajabi, R. Khademi, F. Farjadmand, M. Eftekhari, A. Hadjiakhoondi, a M. Khanavi, „Cytotoxic Potential of *Centaurea bruguierana* ssp. *belangerana*: The MTT assay", *Acta med. Iran.*, roč. 54, č. 9, zář. 2016

