

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY



ALKALOIDY *CENTAUREA CYANUS* L. (ASTERACEAE)
A JEJICH BIOLOGICKÁ AKTIVITA VZTAŽENÁ
K ALZHEIMEROVĚ CHOROBE

Diplomová práce

Adriana Drabbová

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cáhliková, PhD.

Hradec Králové, 2020

CHARLES UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL BOTANY



CENTAUREA CYANUS L. (ASTERACEAE) ALKALOIDS
AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY
RELATED TO ALZHEIMER'S DISEASE

Diploma Thesis

Adriana Drabbová

Supervisor: PharmDr. Jakub Chlebek, PhD.

Head of Department: Assoc. Prof. Ing. Lucie Cáhliková, PhD.

Hradec Králové, 2020

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala především svému školiteli PharmDr. Jakubovi Chleb-
kovi, PhD. za vedení mé diplomové práce, odborné rady, zkušenosti, poskytnuté materiály
a rovněž i dostatek trpělivosti při práci v laboratoři.

Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření cholineste-
rasové inhibiční aktivity a Mgr. Jaroslavovi Jenčovi za LC-MS analýzu, RNDr. Martině Hrabi-
nové, Ph.D. z University Obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové,
za změření inhibice prolyloligopeptidasy. Za pomoc se změřením a interpretací NMR spekter
bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Jirímu Kunešovi, Ph.D. a Mgr. Janě Maříkové z katedry
organické a bioorganické chemie.

Tato diplomová práce byla vytvořena za využití přístrojů v rámci projektu OPVVV
02_16_017: CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_017/0002682: Modernizace laboratoře buněčných interakcí
s látkami přírodního původu (MOLABI), MŠMT ČR/Univerzita Karlova v Praze.

PROHLÁŠENÍ

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

V Hradci Králové 2020

Adriana Drabbová

OBSAH

Obsah.....	iv
Seznam použitých zkratk a vysvětlivek	ix
Přehled schémat a obrázků	xi
Přehled tabulek	xiii
1. Úvod.....	14
2. Cíl práce	15
3. Teoretická část	16
3.1 Alzheimerova choroba.....	16
3.1.1 Epidemiologie.....	16
3.1.2 Rizikové faktory	16
3.1.3 Etiopatogeneze	17
3.1.3.1 Změny v cholinergním systému při AD	17
3.1.3.2 Amyloidní plaky.....	17
3.1.3.3 Neuronální klubka	18
3.1.3.4 Apolipoprotein E	19
3.1.3.5 Oxidační stres.....	19
3.1.3.6 Nervový růstový faktor.....	20
3.1.3.7 Gliové buňky.....	20
3.1.3.8 Zánětlivé mechanismy.....	21
3.1.4 Klinický obraz	21
3.1.5 Farmakoterapie	22
3.1.5.1 Inhibitory cholinesterasy	22
3.1.5.1.1 Donepezil	22
3.1.5.1.2 Rivastigmin	22
3.1.5.1.3 Galantamin	23

3.1.5.1.4	Huperzin A.....	23
3.1.5.1.5	Takrin.....	24
3.1.5.2	Antagonisté NMDA receptorů.....	24
3.1.5.2.1	Memantin.....	25
3.1.5.3	Nové přístupy v terapii.....	25
3.1.5.3.1	Ovlivnění β -sekretas a γ -sekretas.....	25
3.1.5.3.2	Ovlivnění A β transportu.....	26
3.1.5.3.3	Blok agregace A β	27
3.1.5.3.4	Zvýšení clearance A β	27
3.1.5.3.5	Aktivní a pasivní imunizace proti A β	27
3.1.5.3.6	Inhibice GSK-3 β	27
3.1.5.3.7	Stabilizace mikrotubulů.....	28
3.1.5.3.8	Prevence τ -agregace.....	29
3.1.5.3.9	Imunoterapie proti τ -proteinu.....	29
3.1.5.3.10	Antagonisté 5-HT ₆ receptorů.....	30
3.1.5.3.11	Inhibitory prolyloligopeptidasy.....	30
3.1.5.4	Uplatnění přírodních látek při AD.....	31
3.1.5.4.1	Alkaloidy.....	31
3.1.5.4.2	Flavonoidy.....	32
3.1.5.4.3	Resveratrol.....	33
3.1.5.4.4	Kurkumin.....	33
3.1.5.5	Doplňková terapie.....	33
3.2	<i>Centaurea cyanus</i> L. (Asteraceae).....	35
3.2.1	Taxonomické zařazení.....	35
3.2.2	Charakteristika čeledi Asteraceae.....	35
3.2.3	Charakteristika rodu <i>Centaurea</i>	36
3.2.4	Charakteristika <i>Centaurea cyanus</i> L.....	37

3.2.5	Účinky obsahových látek <i>Centaurea cyanus</i> L.	37
3.2.6	Obsahové látky <i>Centaurea cyanus</i> L.	37
3.2.6.1	Indolové alkaloidy	37
4.	Experimentální část	40
4.1	Izolace alkaloidů	40
4.1.1	Materiál a chemikálie	40
4.1.1.1	Chemikálie	40
4.1.1.2	Rozpouštědla	40
4.1.1.3	Pomocný materiál	40
4.1.1.4	Adsorbenty a materiál pro chromatografii	41
4.1.1.5	Vyvíjecí soustavy pro tenkovrstevnou chromatografii	41
4.1.2	Přístrojové vybavení	41
4.2	Metody	42
4.2.1	Obecné postupy	42
4.2.1.1	Příprava detekčních činidel	42
4.2.1.2	Příprava a čištění rozpouštědel	42
4.2.1.3	Odpařování extraktů a frakcí	42
4.2.1.4	Sušení extraktu, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování	42
4.2.1.5	Příprava litých desek	43
4.2.1.6	Příprava roztěru	43
4.2.1.7	Příprava kolony pro sloupcovou chromatografii	43
4.2.1.8	Flash chromatografie	43
4.3	Separace alkaloidů	44
4.3.1	Rostlinný materiál	44
4.3.2	Příprava alkaloidního extraktu	44
4.3.3	Sloupcová chromatografie	45
4.3.4	Preparativní TLC frakce A	46

4.3.4.1	Separace alkaloidu z podfrakce A4	47
4.3.4.2	Separace a čištění alkaloidu z podfrakce A4/2	47
4.3.5	Flash chromatografie	47
4.3.6	LC-MS analýza frakcí získaných flash chromatografií na C18 kartridži	49
4.4	Strukturní analýza	50
4.4.1	MS analýza	50
4.4.1.1	LC-MS	50
4.4.1.2	HRMS	50
4.4.2	NMR analýza	51
4.4.3	Optická otáčivost	51
4.5	Stanovení biologické aktivity izolovaných alkaloidů	52
4.5.1	Stanovení inhibiční aktivity vůči lidské AChE a BChE	52
4.5.1.1	Materiál a chemikálie	52
4.5.1.2	Roztoky a pufrů	52
4.5.1.3	Přístroje	52
4.5.1.4	Úprava plazmy a získání AChE a BChE	52
4.5.1.5	Metoda stanovení	53
4.5.2	Stanovení inhibiční aktivity vůči POP	54
4.5.2.1	Materiál a chemikálie	54
4.5.2.2	Roztoky a pufrů	54
4.5.2.3	Přístroje	54
4.5.2.4	Metoda stanovení inhibice POP	54
4.5.3	Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β	55
4.5.3.1	Materiál a chemikálie	55
4.5.3.2	Roztoky a pufrů	55
4.5.3.3	Přístroje	55
4.5.3.4	Metoda stanovení	55

5.	Výsledky.....	57
5.1	Strukturální analýza izolovaných alkaloidů	57
5.1.1	MS analýza.....	57
5.1.1.1	LC-MS analýza	57
5.1.1.2	HRMS analýza	57
5.1.2	NMR analýza.....	58
5.1.3	Optická otáčivost	58
5.2	LC-MS analýza frakcí získaných flash chromatografií.....	59
5.2.1	Frakce 17–22	59
5.2.2	Frakce 23–27	62
5.2.3	Frakce 28–29	63
5.2.4	Frakce 30–38	64
5.2.5	Frakce 39–50	65
5.2.6	Frakce 51–77	66
5.2.7	Frakce 78–99 (100–141).....	67
5.2.8	Frakce 142–154	68
5.3	Inhibiční aktivita vůči AChE, BChE, POP a GSK-3β	69
6.	Diskuse	70
7.	Abstrakt	72
8.	Abstract	73
9.	Použitá literatura	74

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A VYSVĚTLIVEK

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AICD	intracelulární doména amyloidního prekurzorového proteinu
ApoE	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATChI	acetylthiocholinjodid
A β	β -amyloidní peptid
BACE1	β -sekretasa
BFCN	bazální cholinergní neuron předního mozku
BPSD	behaviorální a psychologické symptomy demence
BTChI	butyrylthiocholinjodid
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
ESI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací
GSK-3 β	glykogensynthasa-kinasa 3 β
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hup A	huperzin A
IL-6	Interleukin 6
MAO	monoaminoxidasa
MS	hmotnostní spektrometrie
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
NO	oxid dusnatý
NT	netestováno
PAS	periferní aniontové místo
POP	prolyloligopeptidasa
RAGE	receptor pro pokročilé glykační produkty

Rf	retenční faktor
ROS	reaktivní formy kyslíku
TIC	celkový iontový proud
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α

PŘEHLED SCHÉMAT A OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Donepezil.....	22
Obrázek 2 Rivastigmin.....	23
Obrázek 3 Galanthamin.....	23
Obrázek 4 Huperzin A	24
Obrázek 5 Takrin	24
Obrázek 6 Memantin.....	25
Obrázek 7 Pinitol	26
Obrázek 8 PF-04494700.....	26
Obrázek 9 Tramiprosat.....	27
Obrázek 10 Tideglusib	28
Obrázek 11 Paklitaxel	29
Obrázek 12 Methylenová modř	29
Obrázek 13 Interdipin	30
Obrázek 14 Berberin	31
Obrázek 15 Harmin.....	31
Obrázek 16 Resveratrol.....	33
Obrázek 17 Kurkumin.....	33
Obrázek 18 Piracetam	34
Obrázek 19 <i>Centaurea cyanus</i> L.	35
Obrázek 20 Indolové alkaloidy identifikované v rostlinách rodu <i>Centaurea</i> L.....	38
Obrázek 21 TLC alkaloidních sumárního EtOAc a CHCl ₃ extraktů.....	45
Obrázek 22 Souhrnné TLC ostatních frakcí.....	47
Obrázek 23 Záznam separace spojené frakce na C18 40 g.....	48
Obrázek 24 TLC analýza spojených frakcí získaných flash chromatografií.....	49
Obrázek 25 Struktura alkaloidu AD-1 (Adrabbinu)	57
Obrázek 26 HRMS spektru sloučeniny AD-1 (Adrabbin)	58
Obrázek 27 Sken ES+ a TIC frakce 17–22	59
Obrázek 28 Sken ES+ sloučeniny s Mr 378 [M+H] ⁺	60
Obrázek 29 Sken ES+ sloučeniny s Mr 353 [M+H] ⁺	60
Obrázek 30 Sken ES+ sloučeniny o Mr 353 [M+H] ⁺	61
Obrázek 31 Sken ES+ TIC frakce 23–27 a jednotlivých přítomných sloučenin.....	62

Obrázek 32 Sken ES+ TIC sloučeniny o MR 395 [M+H] ⁺	63
Obrázek 33 Sken ES+ sloučeniny o Mr 395 [M+H] ⁺	63
Obrázek 34 Sken ES+TIC frakce 30–38 a jednotlivých přítomných sloučenin.....	64
Obrázek 35 Sken ES+ TIC frakce 39–50 a jednotlivých jejich sloučenin	65
Obrázek 36 Sken ES+TIC frakce 51–77 a jednotlivých přítomných sloučenin.....	66
Obrázek 37 Sken ES+ TIC frakce 78–99, složením identická s 100–141	67
Obrázek 38 Sken ES+ TIC frakce 142–158 a jednotlivých přítomných sloučenin	68

PŘEHLED TABULEK

Tabulka 1 Systematické zařazení.....	35
Tabulka 2 Frakce získané sloupcovou chromatografií alkaloidního EtOAc extraktu	46
Tabulka 3 Podfrakce získané preparativní TLC frakce A.....	46
Tabulka 4 Přehled podfrakcí získaných z podfrakce A4	47
Tabulka 5 Nastavený gradient mobilních fází A a B.....	48
Tabulka 6 Hmotnosti jednotlivých frakcí získaných flash chromatografií	49
Tabulka 7 Biologické aktivity izolované sloučeniny	69

1. ÚVOD

Alzheimerova choroba, je známa jako hlavní příčina demence u stárnoucích lidí. Jde o progresivní ireverzibilní formu demence s postupnou poruchou mozkových funkcí. Nemoc je charakterizována celkovým kognitivním poklesem, který zahrnuje zrátu paměti, visuospeciální orientace, poruchou úsudku, komunikace a uvažování. Jedná se celosvětově o hlavní a rostoucí zdravotní výzvu[1].

Etiologie tohoto onemocnění není zcela známá a doposud neexistuje bezpečné a efektivní léčivo proti Alzheimerově chorobě, které by předcházelo, zastavilo nebo zvrátilo průběh toho onemocnění. Současná farmakoterapie založená na inhibitech cholinesteras poskytuje pouze částečnou stabilizaci kognitivních funkcí a pozitivní účinek těchto sloučenin je krátkodobý a nemohou ovlivnit průběh onemocnění[1]. Druhou skupinou je memantin, který je nekompetitivním blokátorem *N*-methyl-D-aspartátových receptorů a zároveň dopaminovým agonistou, který je schávelný pro těžkou formu Alzheimerovy choroby[2].

Při hledání nových účinných látek proti Alzheimerově chorobě se výzkum zaměřuje i na přírodní látky. Různé sekundární metabolity hrají důležitou roli v prevenci a léčbě různých onemocnění zahrnující i neuredegenerativní onemocnění jako je Alzheimerova choroba. Přirozeně se vyskytující sloučeniny jako jsou flavonoidy, polyfenoly, alkaloidy a glykosidy nacházející se v různých částech rostlin nebo mořských zdrojích mohou potenciálně chránit před neurodegenerací a stejně tak zlepšovat paměť a kognitivní funkce. Velké množství přírodních sloučenin vykazuje aktivitu potenciálně využitelnou v terapii Alzheimerovy choroby skrze specifické farmakologické vlastnosti, jako je cílení na acetylcholinesterasu, β -amyloid, β -sekretasu 1, apod.[3].

Výzkumem přírodních látek potenciálně ovlivňujících Alzheimerovu chorobu se rovněž zabývá výzkumná skupina ADINACO na katedře Farmaceutické botaniky na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové. V rámci screeningu provedeného na této katedře byla objevena zajímavá inhibiční aktivita vůči lidské butyrylcholinesterase u alkaloidního extraktu z nažek *Centaurea cyanus* L. Náplní této diplomové práce se stala izolace alkaloidů právě z *C. cyanus* L. a jejich testování na inhibiční aktivitu vůči vybraným enzymům, hrající klíčovou roli v patofyziologii Alzheimerovy choroby.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- vypracování literární rešerše na zadané téma,
- provedení sloupcové chromatografie sumárního alkaloidního výtřepku připraveného z nažek *Centaurea cyanus* L.,
- izolace alespoň jednoho alkaloidu v čisté formě z vybrané frakce získané ze sloupcové kolony,
- podíl na určení struktury izolovaných sloučenin – příprava vzorků pro NMR analýzu, změření optické otáčivosti, hmotnostní spektrometrii,
- podíl na určení biologické aktivity izolovaných sloučenin – příprava vzorků pro testování na stanovení inhibice cholinesteras, prolyloligopeptidasy a glykogensynthasy-kinasy 3 β
- vyhodnocení získaných dat a sepsání diplomové práce

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD), nejčastější příčina demence, je rostoucím globálním zdravotním problémem s obrovskými důsledky pro jednotlivce i společnost. Světová zdravotnická organizace ji označuje jako prioritu v oblasti veřejného zdraví. I přes velké přínosy v porozumění patogeneze AD a způsobu, jakým je nemoc konceptualizována, od doby kdy Alois Alzheimer nemoc poprvé v roce 1907 popsal, stále neexistuje chorobu modifikující léčba[4].

3.1.1 Epidemiologie

AD je jednou z hlavních příčin demence čítající 50–75 % a je primárně podmínkou pozdějších zdravotních komplikací. Prevalence se každých 5 let po 65. roku života zhruba zdvojnásobuje[4]. AD a ostatními demencemi trpí častěji ženy než muži[5].

Současné odhady naznačují, že demencí trpí v současnosti 44 milionů lidí. Do roku 2050 se předpokládá, že v důsledku stárnutí populace se toto číslo ztrojnásobí. Největší nárůst prevalence se očekává v zemích s nízkým a středním příjmem, které vykazují vzorce rostoucích kardiovaskulárních onemocnění, hypertenze a diabetu[4].

Předpokládá se, že v České republice žije více než 150 tisíc pacientů s demencí, a to ze dvou třetin ženy, zejména ve vyšší věkové kategorii[6].

3.1.2 Rizikové faktory

Faktory, které zvyšují riziko AD jsou kardiovaskulární onemocnění, hypertenze, diabetes 2. typu, obezita, zranění hlavy. Snižující faktory rizika jsou vzdělání, středomořská strava, fyzická aktivita[7]. Ačkoliv většina případů AD není přímo dědičná, byly identifikovány genetické rizikové faktory, z nichž nejsilnější je izoforma $\epsilon 4$ apolipoproteinu E (APOE4)[8]. Vzácná je familiární AD představující 1–2 % všech případů tohoto onemocnění. Jedná se o mutace třech samostatných genů na chromozomu 21, 14 a 1[9].

3.1.3 Etiopatogeneze

Doposud nebyla etiopatogeneze AD zcela vysvětlena. Přesto je však rozlišována sporadická a familiární forma a nemoc je nyní přisuzována jak genetickým, tak enviromentálním faktorům[10].

Patologické projevy AD zahrnují difúzní a neuritické extracelulární amyloidní plaky a intracelulární neurofibrilární klubka doprovázené reaktivní mikroglíózou, dystrofickými neurity a ztrátou neuronů a synapsí[7].

3.1.3.1 Změny v cholinergním systému při AD

Acetylcholin (ACh) je neurotransmitter, který využívají všechny cholinergní neurony, jež mají důležitou roli v centrálním i periferním nervovém systému[11]. ACh je syntetizován ze dvou hlavních prekurzorů cholinu a acetylkoenzymu A. Syntéza je katalyzována cholinacetyltransferasou a odehrává se v cytoplazmě cholinergních neuronů[12]. Poté je neurotransmitter transportován vezikulárním acetylcholinovým transportérem z cytosolu do synaptických vezikul. Depolarizací presynaptického neuronu dojde k uvolnění ACh do synaptické štěrbině, kde se může vázat na nikotinové nebo muskarinové receptory, což vede k stimulační nebo inhibiční odpovědi[11].

ACh je odbouráván hlavně acetylcholinesterasou (AChE), která je vysoce selektivní pro ACh, ale i butyrylcholinesterasou (BChE)[13].

Patologicky je při AD cholinergní systém postižen progredující ztrátou cholinergních neuronů a jejich kortikální projekcí z nucleus basalis a oblastí přilehlých bazálnímu přednímu mozku. Dochází ke snížení celkového množství ACh, deficitu cholinacetyltransferasy a AChE. Naopak progresivně stoupá hladina BChE[13].

3.1.3.2 Amyloidní plaky

Jedním z neuropatologických znaků AD je ukládání extracelulárních plaků složených z β -amyloidních ($A\beta$) peptidů v mozkovém parenchymu. Hlavní součástí amyloidních plaků jsou $A\beta$ peptidy složené z 40 nebo 42 aminokyselin, společně s dalšími proteiny jako jsou ubikvitin a dalšími proteoglykany. Tyto peptidy jsou tvořeny sekvenčním proteolytickým štěpením amyloidního prekurzorového proteinu (APP). Počáteční štěpení APP probíhá pomocí α - nebo β -sekretasy. Poté jsou zbylé membránově vázané β - nebo α -C-terminální fragmenty štěpeny v jejich transmembránových doménách pomocí γ -sekretasy[14].

Podle sekretasy, zahajující iniciační štěpení APP, rozlišujeme amyloidní a neamyloidní cestu. Neamyloidní cesta je zahájena α -sekretasou, která štěpí uvnitř domény A β a vytváří rozpustnou ektodoménu sAPP α . Následuje štěpení γ -sekretasou membránově vázaného C-koncového fragmentu APP C83 a poté dochází k uvolnění rozpustných fragmentů p3 a APP intracelulární domény (AICD). Amyloidní cestu zahajuje β -sekretasa (BACE1) za vzniku rozpustného fragmentu sAPP β . Zbývající C-koncový fragment C99 je štěpen γ -sekretasou za vzniku A β peptidů a také AICD[14].

Na základě analýzy byl prokázán značný výskyt N-zkrácených A β_{x-42} u případů AD, na rozdíl od normálních délek A β_{1-40} a A β_{1-42} , což je zajímavé z patologického hlediska, protože A β plné délky jsou metabolity produkované za fyziologických podmínek. Přesná fyziologická funkce těchto amyloidních peptidů zůstává neobjasněna, nicméně se předpokládá, že modulace endogenní produkce A β může hrát důležitou roli v regulaci neuronální aktivity prostřednictvím mechanismu zpětné smyčky. Zatímco peptidy plné smyčky začínají zbytkem kyseliny asparagové a jsou generovány BACE1, mnohem méně je známo o protease zodpovědné za produkci N-zkrácených A β peptidů. Změna aminokyselin na N-konci mění biofyzikální vlastnosti A β peptidů a tím ovlivňuje jejich agregační náchylnost a toxicitu. V důsledku toho se v poslední době zvýšilo úsilí o pochopení významu N-zkrácených A β v patogenezi AD a jejich mechanismu vzniku[14].

3.1.3.3 Neuronální klubka

τ -Protein je hlavním členem skupiny proteinů asociovaných s mikrotubuly. Vazbou s tubulinovými dimery představují mikrotubuly účastníci se jejich asociace a disociace, což představuje základní dynamiku v neuronálním transportu[15].

Stupeň fosforylace τ -proteinu regulují kinasy, které jsou zodpovědné za fosforylaci a specifické fosfatasy, které jsou zodpovědné za defosforylaci. Na mikrotubuly se přednostně váží nefosforylované formy. V nativním stavu je τ -protein desorganizovaný, velmi flexibilní a rezistentní vůči agresivním úpravám jako jsou vysoké teploty a kyselé prostředí. Zároveň je to jeden z nejvíce rozpustných proteinů[15].

Pokud se proces fosforylace stane patologickým, τ -protein prochází odlišnou posttranslační úpravou – glykosylací, štěpením, nitrací, ubikvitinizací, glykací nebo a to hlavně hyperfosforylací. Hyperfosforylace je způsobena porušením regulace kinas a fosfatas působící na τ -proteinu. Mezi kinasy, účastníci se fosforylace τ -proteinu, patří glykogen-

synthasa-kináza 3 (GSK-3), cyklin-dependentní kinasa 5, mitogenem aktivovaná protein-kinasa p38, extracelulární signál-regulující kinasa 1 nebo 2, c-Jun N-terminální kinasa. Přičemž klíčovým enzymem fosforylace za fyziologických i patologických podmínek je GSK-3 β [15].

Právě GSK-3 β je součástí hypotézi o vzniku AD. Pokud by tato hypotéza byla potvrzená a GSK-3 β by byla skutečně jednou z příčin AD, poté by inhibitory GSK-3 β poskytovaly novou cestu terapeutické intervence[16].

3.1.3.4 Apolipoprotein E

Apolipoprotein E (ApoE) je glykoprotein složený z 299 aminokyselin. Vyskytuje se ve 3 isoformách a to ApoE2, ApoE3 a ApoE4. ApoE transportuje a dodává cholesterol a další lipidy do plasmy a centrálního nervového systému (CNS) prostřednictvím vazby na ApoE receptory na buněčném povrchu. Primárně je produkován hepatocyty, makrofágy a adipocyty v periferních tkáních[17].

Apo E je kódovaný genem APOE. Ten se nachází ve 3 běžných polymorfismech a to ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4. Alely APOE ϵ 2, ϵ 3 a ϵ 4 silně a v závislosti na dávce mění pravděpodobnost rozvoje AD a mozkové amyloidní angiopatie. Zejména APOE ϵ 4 je spojen se zvýšeným rizikem rozvoje AD. Zatímco APOE ϵ 2 je spojen se snížením rizika[18].

Nové poznatky o ApoE v souvislosti s patofyziologií AD představují nové možnosti v terapii[17].

3.1.3.5 Oxidační stres

Oxidační stres hraje významnou roli v patogenzi AD. Vysoká energetická spotřeba mozku vede k jeho větší náchylnosti k oxidačnímu stresu. Neuron jakožto základní jednotka mozku je mnohem náchylnější k tomuto působení než ostatní buňky a jeho složky jako lipidy, proteiny a nukleové kyseliny mohou být oxidovány v důsledku mitochondriální dysfunkce, zvýšené hladiny kovů, zánětu a A β . Oxidační stres se podílí na rozvoji AD podporou depozice A β , hyperfosforylací τ -proteinu a následnou ztrátou synapsí a neuronů. Mitochondrie jsou velmi citlivé na oxidační stres jako místo elektrontransportového řetězce pro tvorbu adenosintrifosfátu a reaktivních forem kyslíku (ROS). Klíčovým enzymem je cytochromoxidas, jejíž nedostatek je spojen se zvýšením ROS u AD [19].

Vztah mezi oxidačním stresem a AD ukazuje, že je základní součástí patologického procesu a antioxidanty mohou být užitečné v terapii AD[19].

3.1.3.6 Nervový růstový faktor

Nervový růstový faktor (NGF) je glykoprotein složený ze 3 podjednotek: neaktivní α -NGF, biologicky aktivní β -NGF a γ -NGF, který přetváří NGF prekurzor ve zralou formu. NGF je syntetizován jako prekurzor z pro-NGF, který je buď sekretován mimo buňky nebo štěpen intracelulárně na zralý NGF. Sekrece může být směsí pro-NGF a NGF. Vazbou na receptory TrkA a p75 je zprostředkován trofický efekt, zatímco vazbou na p75 ve spojení se sortilinem je zprostředkován neurotoxický efekt[20].

Degenerace bazálního cholinergního neuronu předního mozku (BFCN) je charakteristickým znakem AD. Přežití a správná funkce BFCN závisí na NGF. Ve zdravém mozku BFCN exprimuje TrkA a p75^{NTR}, proNGF je neurotrofický aktivující TrkA-dependentní signální dráhy. Pokud dojde ke ztrátě TrkA nebo zvýšení p75^{NTR}, proNGF aktivuje p75^{NTR} dependentní apoptickou dráhu. Tato receptorová sensitivita slouží jako neurotroficko/apoptický přepínač, který eliminuje BFCN, jež nejsou schopné udržet rovnováhu TrkA/p75^{NTR}. TrkA je ztrácí při středním kognitivní poškození a AD. Kromě toho se proNGF hromadí na koncových BFCN v kůře a hippocampu, čímž se snižuje množství trofického faktoru, který dosahuje BFCN buněčných struktur. Zvýšené hladiny proNGF a snížení TrkA vede neurodegeneraci BFCN a možné apoptóze závislé na p75^{NTR}[21].

3.1.3.7 Gliové buňky

Gliové buňky se nacházejí ve vysokém počtu v celém nervovém systému a plní v něm mnoho funkcí, jako je regulace synapsí, účast na tvorbě struktury, podpory a výživy a rovněž přispívající k imunitní reakci a okysličování tkáně[22].

Výrazným znakem AD jsou proliferující a aktivované mikroglie, koncentrované kolem A β plaků v mozku. Většina rizikových genů u AD jsou vysoce exprimovány a mnoho z nich je selektivně vyjádřeno mikroglie v mozku. Existují protichůdné důkazy, že mikroglie chrání před výskytem AD, ale i že poškozené mikroglie aktivita a pozměněné mikroglie jsou odpovědné za zvýšení rizika vzniku AD. Rovněž jsou důkazy o tom, že aktivované mikroglie mohou být škodlivé pro neurony. Mikroglie mohou zprostředkovat ztrátu synapsí jejich pohlcením a to pravděpodobně cestou komplement dependentním mechanismem. Mikroglie také mohou zhoršovat τ -patologii a vyplavovat zánětlivé faktory, které poškozují přímo neurony nebo prostřednictvím aktivace neurotoxických astrocytů.

Expresí genových profilů označují více stavů mikroglální aktivity u neurodegenerativních onemocnění, které mohou vysvětlovat odlišné role mikroglíí při vývoji progresivní patologie AD[23].

3.1.3.8 Zánětlivé mechanismy

V posledních letech mnoho studií naznačuje zapojení zánětlivých mechanismů u AD. Proteiny akutní fáze jako je α 1-antichymotrypsin a C-reaktivní protein, elementy komplementu a aktivované mikroglální a astroglální buňky se trvale nachází v mozku pacientů s AD. A co je nejdůležitější, také cytokiny jako je interleukin-6 (IL-6) byly detekovány u pacientů s AD, což ukazuje na lokální aktivaci složek nespecifického zánětlivého systému. Až doposud nebylo jasné, zda zánětlivé mechanismy představují primární případ nebo pouze nespecifickou reakci na poškození mozkové tkáně. U pacientů s AD byl IL-6 nalezen v difúzních placích ve větším poměru, než by se očekávalo ve srovnání s dalšími typy plaků. Toto zjištění naznačuje, že IL-6 může předcházet neuritickým změnám a že imunologický mechanismus může být zapojen, jak do transformace z difúzních do neuritických plaků v AD, tak do vývoje demence[24].

3.1.4 Klinický obraz

AD je neurodegenerativní onemocnění charakterizované progresivní kognitivní poruchou, která na začátku obvykle ovlivňuje episodickou paměť. S postupující nemocí dochází ke ztrátě nezávislosti. Behaviorální a psychologické symptomy u demence (BPSD) jsou skupinou poruch chování, nálady, vnímání nebo poruchou myšlení projevující se úzkostí, agitací, bludy a halucinacemi. Přítomnost příznaků BPSD vede k ústavní hospitalizaci, většímu kognitivnímu poškození, horší kvalitě života, zvýšené mortalitě, prodloužené hospitalizaci, obtížnějšímu propouštění. Znaky psychiatrických symptomů u AD se obvykle liší od příznaků jiných psychiatrických poruch. Ve srovnání se schizofrenií jsou bludy u AD jednodušší, často charakterizované nedůvěrou, a to i k rodinným příslušníkům, krádežemi a pocitem opuštěnosti. Halucinace u AD jsou obvykle vizuální, vzácněji somatické a čichové. Agitovanost bývá spojena se strukturálním a funkčním poškozením emočních obvodů vedoucích například ke zvýšenému vnímání ohrožení[25].

3.1.5 Farmakoterapie

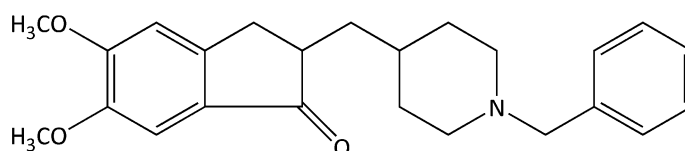
V současné době jsou pro pacienty trpící AD dostupné pouze dvě farmakologické skupiny léčiv. Inhibitory cholinesteras jsou doporučeny pro pacienty s mírným, středním až těžkým stádiem. Memantin, jakožto antagonist NMDA receptorů a dopaminový agonista, je schválen pro pacienty se středně těžkým až těžkým stádiem[2].

3.1.5.1 Inhibitory cholinesterasy

Inhibitory cholinesteras zvyšují množství ACh v synaptické štěrbině hipocampu a mozkové kůry s cílem zlepšit kognitivní funkce. Dále bylo zjištěno, že cholinergní transmise se účastní regulace nálady a mohou inhibitory cholinesteras zlepšit psychiatrické symptomy u pacientů s AD[26]. Tyto sloučeniny však mají krátkodobě pozitivní účinky, obvykle po 1–3 roky a nejsou schopné ovlivnit rozvoj nemoci[1].

3.1.5.1.1 Donepezil

Donepezil, jako jediný ze třídy inhibitorů AChE, je schválený pro celé spektrum mírné, střední a těžké fáze AD. Je předepisován v doporučených dávkách 5–10 mg za den po dobu delší než deset let. V roce 2010 byla schválena vysoká dávka 23 mg jednou denně pro pacienty se středně těžkou až těžkou AD. Důvodem schválení vyšší dávky byl vztah dávky a účinku, kdy při vyšší dávce dochází ke zvýšení inhibice AChE v pozdějších stádiích[27].

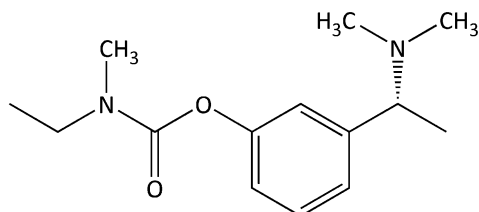


Obrázek 1 Donepezil

3.1.5.1.2 Rivastigmin

Rivastigmin je pseudo-ireverzibilní, mozkově selektivní duální inhibitor AChE a BChE karbamátového typu. Farmakokinetický profil ukazuje, že ve srovnání s perorální přípravkem poskytuje transdermální náplast hladší, nepřetržité a stejně tak kontrolované dodání léčiva po 24 h, což vede k menším vedlejším účinkům. Studie též ukazují, že inhibice BChE rivastigminem koreluje se zlepšením kognice u pacientů s AD. Zpočátku byly léčebné snahy zaměřeny na inhibici AChE, několik studií však prokázalo důležitost AChE a BChE

v patofyziologii a farmakologické léčbě AD. Na základě důkazů o zapojení BChE v cholinergní regulaci a předpokládané roli v progresi AD, může duální inhibice nabídnout další výhody, zejména dlouhodobě[28].

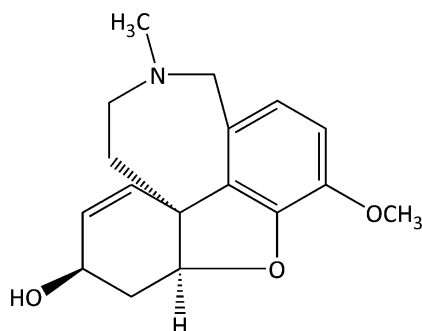


Obrázek 2 Rivastigmin

3.1.5.1.3 Galantamin

Galantamin byl původně izolován z několika rostlin, včetně cibulek narcisu, ale v současnosti je i uměle syntetizován. Galantamin je specifický, kompetitivní a reversibilní AChE inhibitor. Je to také alosterický modulátor nikotinových receptorů, potencující cholinergní nikotinovou transmissi[29].

Kromě své inhibiční aktivity je schopný modulovat nikotinové receptory a zvýšit A β fagocytózu. Molekula galantaminu perfektně sedí do vazebného místa AChE, ale není dostatečně velká, aby zablokovala periferní aniontové místo (PAS). Bylo připraveno několik sérií derivátů galantaminu s protáhlými *N*-postranními řetězci končícími objemným substituentem interagujícím s PAS. Všechny vykazovaly lepší inhibiční vlastnosti než samotný galantamin[30].

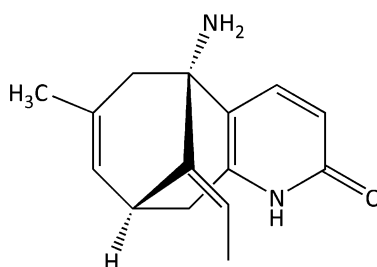


Obrázek 3 Galanthamin

3.1.5.1.4 Huperzin A

Huperzin A (Hup A), alkaloid izolovaný z čínské rostliny *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis, je silný, vysoce specifický a reverzibilní inhibitor AChE. Ve srovnání s takrinem, donepezilem a rivastigminem má Hup A lepší vstup přes hematoencefalitickou bariéru, vyšší perorální biologickou dostupnost a delší inhibiční účinek vůči AChE. Hup A má

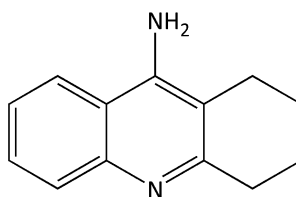
schopnost chránit buňky proti peroxidu vodíku, A β , glutamátem, ischemií a staurosporinem indukované toxicitou a apoptózou. Tyto ochranné účinky souvisejí se schopností zmírňovat oxidativní stres, regulovat expresi apoptických proteinů Bcl-2, Bax, P53 a kaspasy-3, chránit mitochondrie, upregulovat nervový růstový faktor a jeho receptory. Zkoušky bezpečnosti prokázaly, že Hup A nemá neočekávanou toxicitu, zejména hepatotoxicitu. Klinické fáze IV s HuP A v Číně prokázaly významné zlepšení paměti u lidí s AD a vaskulární demencí, s minimálními periferními cholinergními vedlejšími účinky bez neočekávané toxicity. Hup A může být též použit při otravě organofosfáty[31].



Obrázek 4 Huperzin A

3.1.5.1.5 Takrin

Takrin byl v roce 1993 prvním schváleným AChE inhibitorem pro léčbu AD. V roce 1998 byl však ztažen z důvodu hepatotoxicity. Nicméně, takrin se stal znovu předmětem výzkumu ve snaze syntetizovat jeho deriváty[32].



Obrázek 5 Takrin

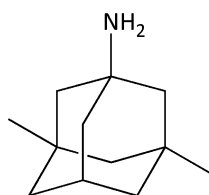
3.1.5.2 Antagonisté NMDA receptorů

Při chronických a patologických stavech dochází při perzistentí depolarizaci membrán nervových buněk k uvolnění bloku Mg²⁺ iontů z NMDA receptorů, což vede ke zvýšenému množství intracelulárních Ca²⁺ iontů. Tato excesivní aktivace může vést k excitotoxické nekróze kortikálních a subkortikálních neuronů. Neuropatologické a neurochemické studie mozku s AD ukázaly, že degenerace L-glutamátových (L-Glu) zprostředkovaných drah nastává při začátcích nemoci a ve vzorci odpovídajícímu distribuci plaků a klubek[33].

Rostoucí množství důkazů naznačuje, že poruchy v systémech využívajících excitační aminokyselinu L-Glu mohou být základem patogenetických mechanismů například ischemické hypoxie, epilepsie a chronických neurodegenerativních onemocnění jako je Huntingtonova choroba a AD. Téměř všechny neurony v CNS nesou NMDA subtyp inotropních L-Glu receptorů, které zprostředkovávají postsynaptický influx Ca^{2+} iontů[33].

3.1.5.2.1 Memantin

Memantin nekompetitivně blokuje NMDA receptory a může působit neuroprotektivně tím, že brání ztrátě neuronů, stejně tak zlepšuje symptomy pomocí obnovení funkce poškozených neuronů. Zpočátku je předepisován v denní dávce 5mg, zvyšuje se týdně o 5mg až na maximální dávku 20mg. Obecně je dobře tolerován s méně vedlejšími účinky než inhibitory cholinesteras. Přidání k donepezilu může být prospěšné u středních stádií AD nebo u těch, kteří se kognitivně zhoršují[34].



Obrázek 6 Memantin

3.1.5.3 Nové přístupy v terapii

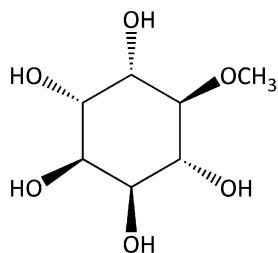
Inhibitory AChE a memantin poskytují pouze symptomatickou léčbu, ale nedokáží zvrátit průběh nemoci. Proto jsou v současnosti na vzestupu terapeutické přístupy, které cílí na modifikaci nemoci[35].

3.1.5.3.1 Ovlivnění β -sekretas a γ -sekretas

$\text{A}\beta$ vzniká z transmembránového proteinu APP po působení sekretas. α -Sekretasa je hlavním enzymem působícím na APP za fyziologických podmínek následovaná γ -sekretasou. APP podléhá amyloidnímu procesu, pokud na něho působí β -sekretasa místo α -sekretasy. Zdůvodnění ovlivnění sekretas vychází z myšlenky, že zvýšení α -sekretasy vede k netoxickým vedlejším produktům a inhibice β - a γ -sekretas snižuje amyloidogenní cestu APP[35].

Mezi inhibitory β -sekretas, které dosáhly povzbudivých klinických dat v probíhajících studiích patří E2609, AZD3293, CNP520, JNJ-54861911[36].

Z látek ovlivňujících γ -sekretasu je v klinických studiích NIC5-15, což je přirozeně se vyskytující cukr pinitol[36].

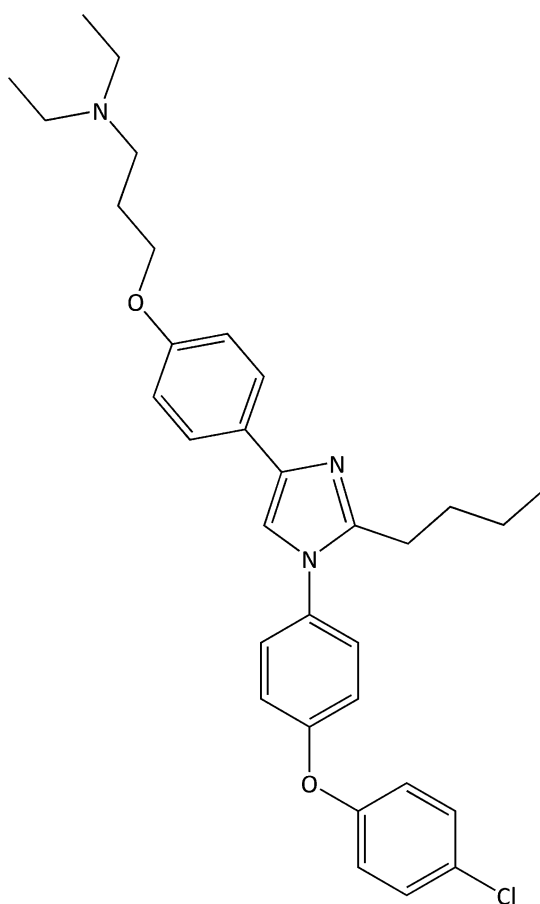


Obrázek 7 Pinitol

3.1.5.3.2 Ovlivění A β transportu

RAGE (receptor pro pokročilé glykační produkty) je multiligandový receptor vázající A β s vysokou afinitou a usnadňuje jeho přestup do CNS. Při AD se exprese RAGE zvyšuje [35].

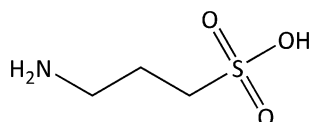
PF-04494700 byl první RAGE inhibitor zkušný u lidí, měl přijatelný bezpečnostní profil v 1. fázi studií, ale ve 2. fázi byl neúspěšný. Další možností je tvorba rozpustného analoga RAGE, který by sloužil jako návnadový receptor[35].



Obrázek 8 PF-04494700

3.1.5.3.3 Blok agregace A β

Tramiprosat inhibuje tvorbu A β oligomeru mechanismem působení více ligandů, což stabilizuje A β 42 monomery, čímž zabraňuje tvorbě oligomerů a následné agregaci. Tramiprosat však vykazoval dva limitující nedostatky: variabilní farmakokinetiku a výskyt nevolností a zvracení. K vyřešení těchto nedostatků bylo vytvořeno jeho proléčivo ALZ-801, které jeví slibné výsledky ve fázi III[37].



Obrázek 9 Tramiprosat

3.1.5.3.4 Zvýšení clearance A β

Mezi proteasy degradující plaky A β patří například plazmin, neprylisin, insulin degradující enzym, endotelin konvertující enzym, angiotensin konvertující enzym a metaloproteasa 9. Roli hraje i somatostatin, který reguluje clearance A β přes aktivaci neprilysinu. Hladina somatostatinu však s věkem klesá, zajímavou možností by však mohlo být cílení na neprilysin se somatostatinem nebo jeho analoga[35].

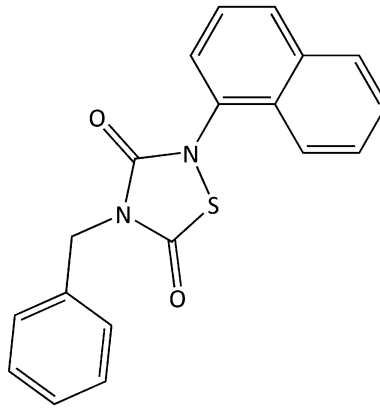
3.1.5.3.5 Aktivní a pasivní imunizace proti A β

První publikace o imunoterapii vyšla v roce 1999. Látka AN-1792 byla stažena z klinického testování v důsledku výskytu meningoencefalopatie. Další generace vakcín se snaží cílit na více specifitější epitopy k vyvolání lépe řízené imunitní odpovědi. V klinických studiích je látka CAD106[36].

Nejpokročilejším přístupem v léčbě AD je pasivní imunizace proti A β . Ve fázi klinického testování se nachází crenezumab, solanezumab, gantenerumab, BAN2401, aducanumab[36].

3.1.5.3.6 Inhibice GSK-3 β

Doposud se do fáze II klinického testování dostal pouze tideglusib. V II. fázi testování u pacientů s mírnou až střední AD vykázal dobrou snášenlivost, ale ne významné klinické zlepšení[38].



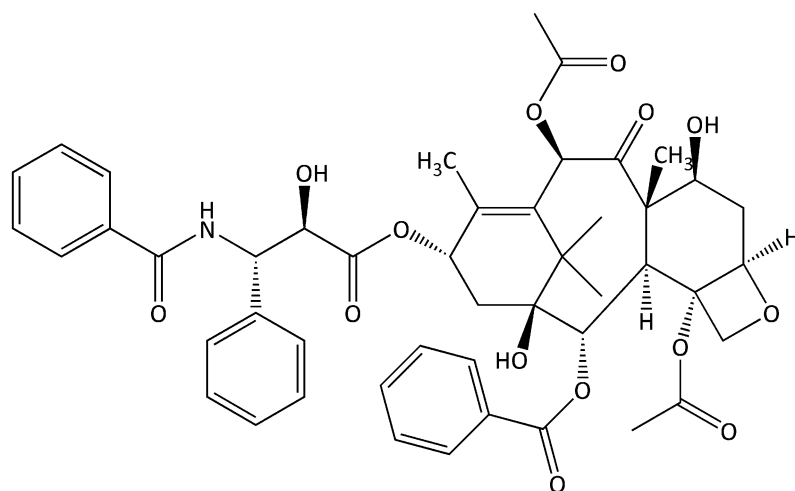
Obrázek 10 Tideglusib

Chlorid lithný, lék schválený FDA pro léčbu bipolární poruchy, je slabý a nespecifický inhibitor GSK-3 β . V terapeutických dávkách je schopný redukovat její aktivitu přibližně o 25 % bez vedlejších účinků. Malé klinické studie prokázaly pozitivní výsledky zahrnující zlepšení kognitivního chování a redukcí τ -fosforylace, což naznačuje, že by lithium mohlo mít potenciál jako nemoc modifikující terapie[38].

Aktuální klinický výzkum selhal při hledání efektivních a bezpečných inhibitorů GSK-3 β . Skutečnost, že GSK-3 β je exprimována všudypřítomně a je zapojena do několika klíčových buněčných procesů, vzneslo mnoho obav a významných toxikologických pochybností při dlouhodobém podání během pre-klinických a klinických studiích. Budoucí možné strategie zaměřené na obcházení vedlejších účinků by měly konkrétně inhibovat GSK-3 β v CNS a buňkách zájmu[38].

3.1.5.3.7 Stabilizace mikrotubulů

Schopnost stabilizovat mikrotubuly má protinádorová látka paklitaxel. Jeho podání při nemaligních stavech však vzbuzuje bezpečnostní obavy. Epothilon D je další látkou ze skupiny stabilizátorů, jehož nízká chronická dávka prokázala významné zlepšení v patologii mikrotubulů[35].

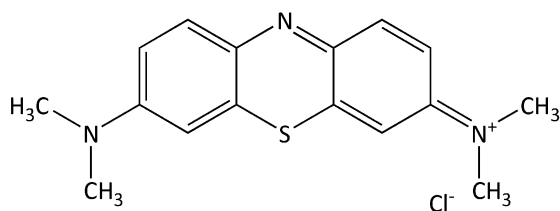


Obrázek 11 Paklitaxel

V klinických studiích pro pacienty s mírnou až střední AD se nachází TPI 287, který se váže na tubulin[36].

3.1.5.3.8 Prevence τ -agregace

Barvivo methylenová modř vykazuje různé farmakologické vlastnosti, jednou z nich je zábrana interakce τ -proteinu. Kromě toho methylenová modř hraje roli v agregaci amyloidní agregace, zlepšení elektronového transportu, snížení oxidačního stresu, prevenci mitochondriální destrukce a inhibici AChE[35]. Rember byl první generací derivátu methylenové modři testovaný u AD, ale selhal ve II. fázi klinického testování kvůli vedlejším účinkům[35,36]. Ve III. fázi klinického testování se nachází druhá generace inhibitorů agregace τ -proteinů např. TRx0237[36].



Obrázek 12 Methylenová modř

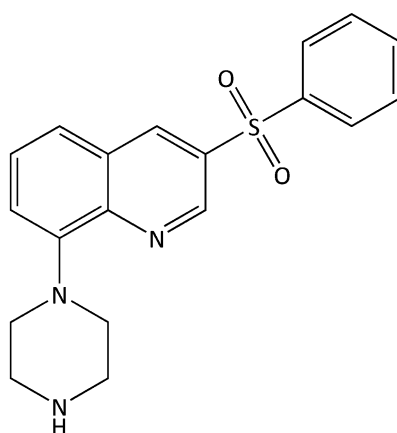
3.1.5.3.9 Imunoterapie proti τ -proteinu

Dalším přístupem v terapii se jeví aktivní imunizace vysoce afinitními protilátkami proti fosforylovanému τ -proteinu. Ve II. fázi klinického testování se nachází látka AA-Dvac-1 a ve fázi I klinického testování se nachází ACI-35[36].

3.1.5.3.10 Antagonisté 5-HT₆ receptorů

S progresí AD je poškozena i serotonergní neurotransmise a ovlivnění této cesty by mohlo mít terapeutický význam. Serotonin aktivuje specifické 5-HT receptory. Receptor 5-HT₆ je exprimován primárně v kůře a hippocampu, tedy v oblastech zapojených do procesu učení a paměti. Myšlenkou tedy je, že antagonisté těchto receptorů by mohly zvýšit cholinergní transmissi[36].

Ve III. fázi klinického testování se nachází interpirdin a analýza z II. fáze studií naznačuje, že přidání tohoto léčiva k donepezilu může zlepšit kognitivní funkce u pacientů s mírnou až střední AD[36].



Obrázek 13 Interpirdin

3.1.5.3.11 Inhibitory prolyloligopeptidasy

Prolyloligopeptidasa (POP) je serinová peptidasa, která štěpí malé peptidové hormony, neuroaktivní peptidy a různé buněčné faktory[39]. POP je všudypřítomný enzym, vysoce exprimovaný v mozku. Současné znalosti o jeho biologických vlastnostech a farmakologických vlastnostech jeho inhibitorů naznačují, že POP se účastní několika aspektů v CNS, zahrnujících učení, paměť a náladu. Předpokládá se zapojení POP v patologických procesech jako je porucha příjmu potravy a nálady, hypertenze a neurodegenerativních onemocnění jako AD, Huntingtonova a Parkinsonova choroba[40].

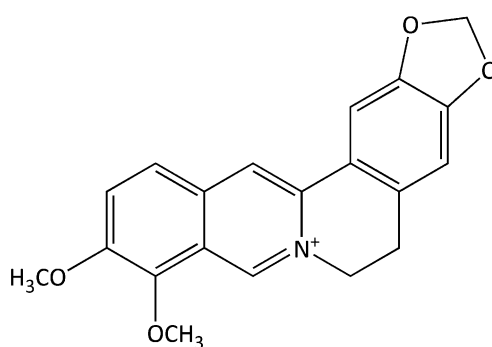
V současné době bylo již v předklinických studiích hodnoceno několik inhibitorů POP jako potenciální léčiva pro přirozený deficit paměti, při které dochází během stárnutí nebo při AD[40].

3.1.5.4 Uplatnění přírodních látek při AD

Přírodní látky jako alkaloidy, flavonoidy, resveratrol a kurkumin mají multifunkční vlastnosti a bylo zjištěno, že tyto látky jsou schopné interagovat s více cíli související s AD. Proto by přírodní látky a jejich deriváty s prokázanou účinností mohly být použity při léčbě AD[41].

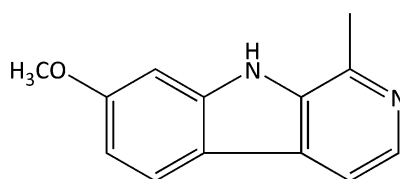
3.1.5.4.1 Alkaloidy

Berberin je kvarterní isochinolinový alkaloid vyskytující se v kořenech, odděncích, stonkách a kůře rostlin jako je *Berberis* spp., *Coptis chinensis* Franch., *Hydrastis canadensis* L. a *Phellodendron amurense* Rupr. Má silné antioxidační, protizánětlivé, protinádorové a antimikrobiální účinky společně s kardioprotektivními a neuroprotektivními vlastnostmi. Inhibuje AChE i BChE, ale je selektivnější pro AChE, navíc působí jako antagonist NMDA receptorů a rovněž blokuje napětově řízený draselný kanál, což vede k neuroprotekcí. Tudiž, berberin zvyšuje cholinergní stimulaci a zlepšuje kognitivní poškození u AD. Bylo již připraveno několik derivátů berberinu[41].



Obrázek 14 Berberin

Harmin, izolovaný např. z *Banisteriopsis caapi* Spruce ex Griseb., patří do skupiny β -karbolinových alkaloidů, strukturálně složené z indolového a pyridinového jádra. Má antitykotické, antibakteriální, antiplasmodiální, antioxidační vlastnosti a je inhibitor DYRK1A. Inhibuje též fosforylaci τ -proteinu. Rovněž bylo připraveno několik jeho derivátů[41].



Obrázek 15 Harmin

Aporfinové alkaloidy mají tetrahydroisochochinolovou strukturu a patří mezi isochinolové alkaloidy. Aporfinové strukturální typy oxoisoaporfiny a oxoaporfiny, izolované z kořene čínské léčivé byliny *Menispermum dauricum* DC., vykazují rozdílnou biologickou aktivitu např. inhibují telomerasové cholinesterasy a β A agregaci, společně s antioxidační kapacitou, imunoregulační a protinádorovou aktivitou. Byly připraveny rovněž i jejich deriváty[41].

3.1.5.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolových metabolitů, které se vyskytují téměř ve všech rostlinách, ovoci, semenech a zelenině. Jsou hojně zastoupeny u vyšší rostlin v Polygonaceae, Rutaceae, Fabaceae, Apiaceae a Asteraceae. Kvůli své polyfenolové povaze mají schopnost zhaset volné radikály, peroxid a superoxidové radikály – mají neuprotektivní aktivitu. Vlastnosti polyfenolů zhaset volné radikály se liší podle počtu a polohy hydroxylových skupin. Pro jejich účinky na faktory AD byly vyvinuty nové série flavonoidů[41].

Flavony se vyskytují hlavně v listech, květech, ovoci, rostlinách a vykazují inhibiční efekt na konečné produkty pokročilé glykace a také mají protizánětlivý, antioxidační a neuprotektivní aktivitu. Série analogů flavonů působí jako slibná činidla proti AD[41].

Isoflavonoidy se hojně vyskytují v luštěninách a jsou také izolovány z mikrobů. Působí jako prekurzory pro syntézu fytoalexinů během interakce rostlina-mikrob. Série isoflavonových analogů byla zkoumána pro jejich inhibiční aktivitu proti AChE a MAO-B[41].

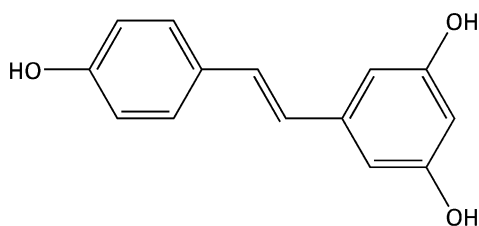
Flavanony jsou další důležitou podskupinou flavonoidů, nacházejí se ve všech citrusových plodech (pomeranče, citrony a grepy). Mají schopnost zhaset volné radikály, mají protizánětlivý účinek, snižují krevní lipidy a cholesterol. Proto je užití flavanonů pro syntézu multitargetových řídicích ligandů na vzestupu[41].

Chalkony jsou rovněž podskupinou flavonoidů. Jsou hojně obsaženy v rajčatech, hruškách, jahodách a některých pšeničných produktech. Chalkony vzbudily zájem jako potenciální léčiva u AD pro svoje rozsáhlé biologické výhody, které poskytují[41].

Neoflavonoidy jsou charakterizované ketoskupinou v poloze 2 a fenylovou skupinou v poloze 4 kruhu C. Jejich deriváty by mohly působit jako inhibitory AChE a též jako inhibitory agregace $\text{A}\beta$ [41].

3.1.5.4.3 Resveratrol

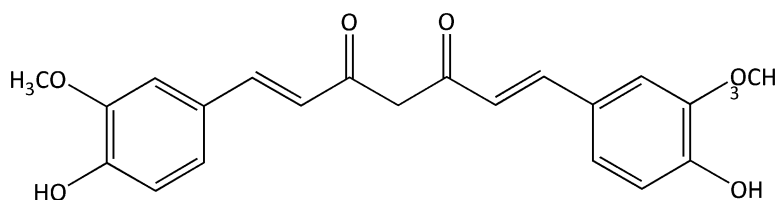
Resveratrol je druh přírodního polyfenolu (stylben), hojně se nacházející v potravinách jako jsou arašídý, grepy, červené víno, bobulové ovoce. Má různé biologické vlastnosti jako jsou protinádorový účinek, protizánětlivý a neuroprotektivní vlastnosti. Pro svoje antioxidační schopnosti, inhibiční schopnost vůči A β agregaci a schopnosti zhaset radikály je potenciálním léčivem u AD. Jeho stylbenová struktura je zodpovědná za inhibiční aktivitu monoaminoxidas (MAO). Díky jeho aktivitě jsou syntetizovány další deriváty[41].



Obrázek 16 Resveratrol

3.1.5.4.4 Kurkumin

Kurkumin je izolován z rostliny *Curcuma longa* L. z čeledi Zingiberaceae. Strukturálně je kurkumin α , β -nenasyčená karbonylová sloučenina s připojenými planárními aromatickými kruhy. Má široké farmakologické vlastnosti zahrnující protizánětlivé, protinádorové, antimikrobiální, antioxidační vlastnosti, rovněž má hojivý účinek na rány a schopnost inhibovat A β agregaci. Kurkumin rovněž vykazuje aktivitu vůči neurologickým onemocněním zahrnující AD, Parkinsonovu chorobu, epilepsii, schizofrenii a deprese. Díky svému širokému farmakologickému rozsahu byly syntetizovány a hodnoceny jeho různá analoga. Kurkuminová analoga vykazují inhibiční aktivitu vůči AChE, hyperfosforylaci τ -proteinu, A β ₁₋₄₂ agregaci, BACE1 a také některé deriváty zhasí volné radikály a chelatují ionty kovů[41].



Obrázek 17 Kurkumin

3.1.5.5 Doplnková terapie

Souběžné psychiatrické poruchy jako deprese a anxieta jsou u AD běžné a obtížně léčitelné. Existují pouze omezené důkazy o prospěšnosti antidepressivní léčby u AD. V této

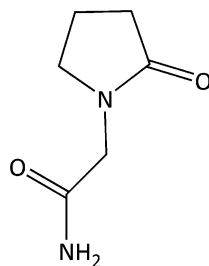
souvislosti je však třeba se vyhnout tricyklickým antidepresivům, která mohou zhoršovat zmatenost. Existují však důkazy o prospěchu psychologické léčby snižující deprese a v menší míře i anxiety. V pozdější fázi onemocnění se může rozvinout agitovanost, agrese, psychóza. V těchto případech jsou upřednostňována atypická antipsychotika, ale i jejich užití by mělo být omezeno pouze při těžkých psychózách. Pokud je to nezbytné, nejlepší důkazy jsou pro nízkou dávku risperidonu[4].

Roli v terapii AD hraje i nefarmakologická léčba, která zahrnuje cvičení, motorickou rehabilitaci, kognitivní rehabilitace, nefarmakologickou léčbu pro behaviorální a psychologické symptomy, psychologická terapie, komplementární a alternativní medicína[42].

Mezi další doplňkové látky se řadí standardizovaný extrakt EGb 761 z *Ginkgo biloba* L., který působí jako „scavenger“ (vychytávač) volných kyslíkových radikálů, inhibitor NMDA receptorů a má také vazodilatorní vlastnosti – inhibuje faktor aktivující krevní destičky[43].

Piracetam neprokázal dostatečnou účinnost, je nyní zkoušen ve velkých dávkách především u pacientů se středním kognitivním poškozením a v počátcích AD[43].

Jako doplněk terapie k inhibitorům cholinesterasy se používá jako zhášec volných kyslíkových radikálů vitamin E v denní dávce 2000 UI po dlouhou dobu, což má určitý preventivní efekt proti rozvoji demence[43].



Obrázek 18 Piracetam

U AD je nedostatek růstových nervových faktorů, proto je dále používán i přípravek cerebrolysin, obsahující aminokyseliny a velmi krátké peptidy k syntéze růstových faktorů[43].

3.2 *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae)

3.2.1 Taxonomické zařazení

Tabulka 1 Systematické zařazení [44]

Oddělení	Magnoliophyta	Krytosemenné
Třída	Magnoliopsida	Dvouděložné
Řád	Asterales	Hvězdicotvaré
Čeleď	Asteraceae	Hvěznicovité
Rod	<i>Centaurea</i>	Chrupa
Druh	<i>Centaurea cyanus</i> L.	Chrupa modrá



Obrázek 19 *Centaurea cyanus* L. [45]

3.2.2 Charakteristika čeledi Asteraceae

Čeleď Asteraceae představují především vytrvalé nebo jednoleté byliny a polokeře, často s různým typem žláznatých nebo jiných trichomů. Často se systémem článkovaných mléčnic v lýku, které obsahují latex bohatý na triterpeny, nebo s více či méně vyvinutým systémem schizogenních pryskyřičných kanálek, které jsou často vystlané epitelem. Oba sekreční systémy se obvykle společně v jednom druhu nevyskytují. Listy jsou střídavé, méně často protistojné, jednoduché nebo složené, někdy redukované v šupiny. Květy jsou obojaké nebo jednopohlavné i jalové, drobné, s obaly rozlišenými, pokud kalich nechybí (kalich bývá často přeměněn v chmýr nebo žláznatý val). Koruna srostlolupenná, obvykle pětičetná, aktinomorfni nebo zoomorfni. Květy tvoří husté racemózní květenství – úbor se

zákrovem z listenů. Květenství je tvořeno buď jedním typem květů jazykovitých, nebo jazykovitými květy vytvářejícími terč úboru. Tyčinek je pět, jejich prašníky se slepují v trubičku; nitkami přirůstají ke koruně. Gyneceum je tvořeno dvěma plodolisty, je zakončené dvouramennou bliznou. Semeník je spodní, jednopouzdrový, s jedním vajíčkem. Plodem je nažka s vytrvávajícím chmýrem kalichového původu[46].

Významným chemotaxonomickým znaky jsou výskyt inulinu jako zásobního polysacharidu, biosyntéza polyynů (polyacetylenů) a seskviterpenických laktonů, výskyt pentacyklických triterpenů v latexu, silice, kávové kyseliny a jejich derivátů, lokalizovaně se vyskytující alkaloidy. Význačným znakem je absence iridoidů[46].

Podčeleď Asteroidae je typická tvorbou jazykovitých i trubkovitých květů obojakých i jednopohlavních i jalových, uspořádaných na úborovém lůžku jako paprsek a terč. Mléčnice se obvykle nevyskytují[46].

3.2.3 Charakteristika rodu *Centaurea*

Jednoleté až vytrvalé byliny. Lodyhy zpravidla dobře vyvinuté, větvené nebo jednoduché (mimo území ČR též značně zkrácené), olistěné, zpravidla křídlaté, pavučinatě chlupaté. Listy přízemní (v nebohatých růžicích, za květu často odumřelé) a lodyžní střídavé, přisedlé nebo nevýrazně řapíkaté, celistvé nebo peřeně členěné, zpravidla sbíhavé, méně často nesbíhavé, nejčastěji ± hustě pavučinatě až hedvábitě chlupaté. Úbory malé až středně velké, na konci lodyhy a větví, jasně modré, růžové, purpurové nebo žlutavé; zákrov vejcovitý, víceřadý, zákrovní listeny trojúhelníkovité, vejčité až podlouhle kopinaté, střechovitě uspořádané, přívěsky zákrovních listenů dl. sbíhající, často téměř po celé délce okraje zákrovního listenu, s okrajem zubatým nebo trásnitým, v osten nikdy nepřeměněné; lůžko úboru štětinatě chlupaté, bez plevek. Květy pouze trubkovité, okrajové obvykle jalové, často s korunou zvětšující, mírně souměrnou a paprskující, středové květy oboupohlavné, s korunou pravidelnou; prašníky podélně spojené v trubičku, pylová zrna elipsoidní až válcovitá, na povrchu hladká; bliznová ramena téměř po celé délce spojená, na bázi s věnečkem vymetacích chlupů. Nažky nejčastěji 3,5– mm dl., na bázi s bočně umístěnou oddělovací ploškou obklopenou dlouhými tuhými odstálými chlupy; paprsky víceřadé; paprsky chmýru víceřadé, různě dlouhé (vnější nejkratší), drsné, s různě dlouhými, nepravidelně uspořádanými krátkými štětinkami (mezi buňkami tvořícími dlouhé „zoubky“ na paprscích chmýru jsou buňky vyčnívající jen jako krátké papily), paprsky chmýru někdy velmi krátké nebo chmýr ± chybějící[47].

Přibližně 40 druhů rozšířených v Evropě, jz. Asii a s. Africe, největší druhová rozmanitost je v horských oblastech Středomoří [47].

3.2.4 Charakteristika *Centaurea cyanus* L.

Rostliny jednoleté; lodyžní listy neshíhavé, 3–6 mm široké. Lodyhy jednoduché nebo větvené; listy vločkovitě vlnaté, dolní až lyrovitě peřenosečné, za květu zaschlé, lodyžní čárkovitě kopinaté, úbory na koncích větví jednotlivé, cca 3 cm v průměru, zákrovní listeny s přívěskem velmi úzce sbíhavým, tmavě hnědým až černým s cca 1 mm dl., stříbřitě bílými brvami; okrajové květy obvykle jasně modré, středové modrofialové, nažky 3,5–4 mm dl., chmýr 3–4 mm dl. Pole, čerstvé úhory; dříve hojně, dnes roztr.; v poslední době též pěst. v různobarevných formách jako ozdobná letnička[48].

3.2.5 Účinky obsahových látek *Centaurea cyanus* L.

Květenství rostliny *Centaurea cyanus* L. je dobře známou rostlinnou drogou používanou v Evropě v tradiční medicíně pro léčbu méně závažného očního zánětu, jako diuretikum a cholagogum. Rovněž byly popsány i antimikrobiální, protizánětlivé a imunologické účinky[49].

3.2.6 Obsahové látky *Centaurea cyanus* L.

Mezi sekundární metabolity objevené v *Centaurea cyanus* L. při předchozích fytochemických studiích patří například anthocyany, flavonoidy a jejich glykosidy, fenolkarboxylové kyseliny, seskviterpeny, kumariny a alkaloidy[49].

Při našem výzkumu jsme se zaměřili na izolaci alkaloidů, kterých bylo doposud z rostliny rodu *Centaurea* získáno jen několik a mohly by poskytnout zajímavou inhibiční aktivitu. Konkrétně z *Centaurea cyanus* L. byly doposud vyizolovány a popsány čtyři alkaloidy s indolovou strukturou.

3.2.6.1 Indolové alkaloidy

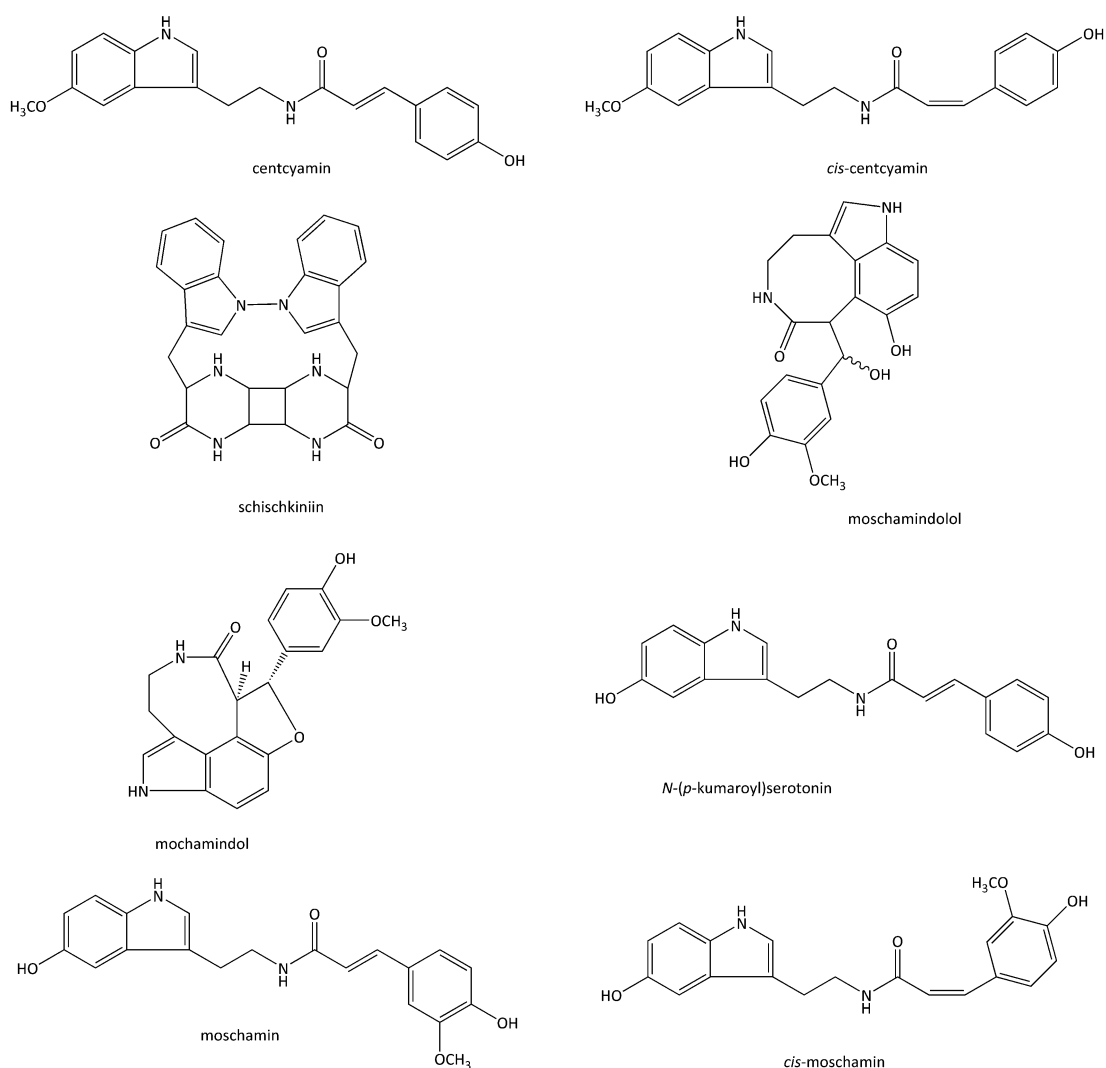
Z *Centaurea cyanus* L. byly doposud izolované čtyři indolové alkaloidy a to konkrétně moschamin, *cis*-moschamin, centcyamin a *cis*-centcyamin. Moschamin a *cis*-moschamin byly již dříve izolované z jiného druhu, konkrétně z *Centaurea moschata* L. V případě centcyaminu a *cis*-centcyaminu se jedná, pokud je známo o nové sloučeniny[49].

Dalším indolovým alkaloidem, izolovaný z rostlin rodu *Centaurea*, je schischkiniin, který byl vyizolovaný ze semen *Centaurea schischkinii* Tzvelev a vykazuje antikancerogenní a antioxidační vlastnosti[50].

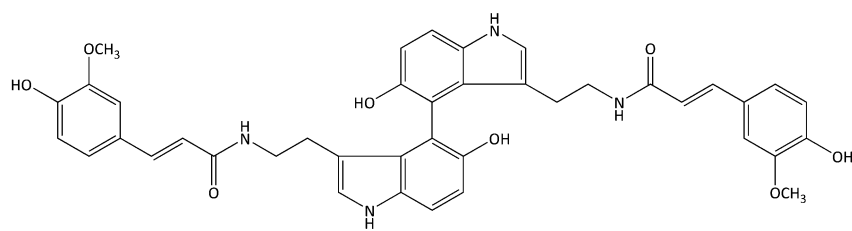
V semenech *Centaurea moschata* L. byly prokázány moschamindol, moschamindolol, moschamin a *cis*-moschamin[51].

Izolací ze semen *Centaurea vlachorum* Hartvig byly získány 2 alkaloidy moschamin a *N*-(*p*-kumaroyl)serotonin[52].

Dimerický indolový alkaloid montamin byl vyizolován ze semen *Centaurea montana* L.[53].



Obrázek 20 Indolové alkaloidy identifikované v rostlinách rodu *Centaurea* L.



montamin

Obrázek 20 Indolové alkaloidy identifikované v rostlinách rodu *Centaurea* L. (pokračování)

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Izolace alkaloidů

4.1.1 Materiál a chemikálie

4.1.1.1 Chemikálie

- kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Ing. Švec – Penta) (HCl)
- kyselina octová 99% p.a. (Ing. Švec – Penta)
- uhličitan sodný bezvodý č. (Ing. Švec – Penta) (Na₂CO₃)
- amoniak 25% p.a. (Ing. Švec – Penta) (NH₄OH)
- trifluoroctová kyselina 99% p.a. (Fluka) (TFAA)

4.1.1.2 Rozpouštědla

- chloroform p.a. (Penta a.s., ing. Švec) (CHCl₃)
- ethyl-acetát p.a. (Penta a.s., ing. Švec) (EtOAc)
- deuterizovaný chloroform pro NMR (Sigma-Adrich) (CDCl₃)
- diethylether č. (Lach-Ner) (Et₂O)
- ethanol 95% (liho var Chrudim) (EtOH)
- methanol p.a. (Sigma-Adrich) (MeOH)
- dichlormethan p.a. (Penta a.s., ing. Švec) (CH₂Cl₂)
- *n*-hexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec) (C₆H₁₄)
- cyklohexan p. a. (Penta a.s., ing. Švec) (C₆H₁₂)
- superčistá voda (Millipore, Milford, MA, USA) (H₂O)

4.1.1.3 Pomocný materiál

- křemelina (Sigma Aldrich)
- silikagel sušící perly (Ing. Švec – Penta)
- síran sodný bezvodý p.a. (Ing. Švec – Penta) (Na₂SO₄)
- vata
- vliselin

4.1.1.4 Adsorbenty a materiál pro chromatografii

- Oxid hlinitý (Al_2O_3) deaktivovaný 6% H_2O , stupeň deaktivace Brockmann III, velikost zrn 50–200 μm (ACROSS)
- TLC SiO_2 60 F254, (firma Merck), hliníkové komerční desky s vrstvou silikagelu 0,2 mm
- TLC SiO_2 60 RP-18 F₂₅₄S (firma Merck)
- Silikagel 60 PF 254 pro preparativní TLC (firma Merck)
- polypropylenová (PP) kartridž EcoFlex C18 50 μm spherical 40 g (Büchi, Donaulab)
- PP předkolona 12×75 mm (Büchi, Donaulab)
- C18 silikagel 200–400 mesh (Sigma Aldrich)

4.1.1.5 Vytvářecí soustavy pro tenkovrstevnou chromatografii

- CHCl_3 + MeOH + NH_4OH (92,5:7,5:0,25)
- C_6H_{12} + EtOAc + IPA + DEA (45:45:5:5)
- MeOH + H_2O + TFAA (40:60:0,1)
- CHCl_3 + MeOH + NH_4OH (90:10: 0,75)
- CHCl_3 + MeOH + NH_4OH (80:20:1,5)
- CH_2Cl_2 + MeOH + NH_4OH (80:20:0,2)

4.1.2 Přístrojové vybavení

- ultrazvuková lázeň Sonorex Super 10P (Bandelin, Berlin, Německo)
- vakuová odparka Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Německo)
- polarimetr P3000 (A. Krüss Optronic, Hamburg, Německo)
- laboratorní mlýnek IKA A11 basic (IKA - WERKE GMBH & CO. KG, Staufen, Německo)
- spektrometr VNMR S500 (Varian, USA)
- Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA), přístroj sestává z modulů Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru, kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 μm) (Milford, USA)

- UHPLC systém Acquity UPLC, nejvyšší třída (Waters, Millford, USA), spojený s vysokorozlišovacím spektrometrem (HRMS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) využívající kvadrupól Time-of-Flight (TOF), kolona Acquity UPLC BEH C18 (2,1 × 50mm, 1,7 μm)
- Sepacore Flash X10 systém skládající se z UV detektoru C-640, ze dvou binárních pump C-605, frakčního kolektoru C-660 a řídicí jednotky C-60. Pro ovládání systému se používá PC s programem SepacoreControl 1.2. (Büchi, Švýcarsko)

4.2 Metody

4.2.1 Obecné postupy

4.2.1.1 Příprava detekčních činidel

- Dragendorffovo činidlo – skládá se z roztoku A a roztoku B v poměru 1:1,
roztok A vzniká rozpuštěním 1,7 g dusičnanu bismutitého zásaditého a 20 g kyseliny vinné v 80 ml vody
roztok B vzniká rozpuštěním 16 g jodidu draselného ve 40 ml vody.
- Meyerovo činidlo – vzniká rozpuštěním 1,36 g chloridu rtuťnatého a 5 g jodidu draselného ve 100 ml vody.

4.2.1.2 Příprava a čištění rozpouštědel

Všechna komerčně používaná rozpouštědla použitá pro chromatografii byla před použitím přečištěna destilací dle standardních postupů a uchována v tmavých láhvích z důvodu ochrany před světlem.

4.2.1.3 Odpařování extraktů a frakcí

Odpařování rozpouštědel z extraktů a frakcí získaných při sloupcové chromatografii bylo prováděno na vakuové odparce při 40°C za sníženého tlaku.

4.2.1.4 Sušení extraktu, frakcí, izolovaných čistých látek a jejich skladování

Získaný extrakt, frakce a izolované čisté látky byly sušeny v exsikátoru za sníženého tlaku. Poté byly skladovány v lednici při teplotě 2 – 8 °C.

4.2.1.5 Příprava litých desek

Na skleněnou desku o rozměrech 15×15cm byla nalita suspenze tvořená 6,5 g silikagelu pro preparativní TLC a 20 ml destilované vody. Tato homogenní suspenze byla na desky rovnoměrně rozprostřena a nechala se před použitím schnout minimálně 24 h při pokojové teplotě.

4.2.1.6 Příprava roztěru

Roztěr pro sloupcovou chromatografii a flash chromatografii byl připraven rozpuštěním alkaloidního extraktu nebo frakce v $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{MeOH}$ (1:1) a přidáním adsorbentu v 4–5násobném množství k poměru hmotnosti vzorku. Odstranění rozpouštědel ze vzniklé suspenze probíhalo za stálého míchání na vodní lázni při 40 °C. Roztěr byl následně dosušen za sníženého tlaku v exsikátoru nad aktivními perlami silikagelu po dobu 24 hodin.

4.2.1.7 Příprava kolony pro sloupcovou chromatografii

Do skleněného sloupce o vhodné velikosti se adsorbent (neutrální oxid hlinitý 50–200 μm deaktivovaný přidavkem 6 % H_2O) nanáší ve formě suspenze s mobilní fází o počáteční koncentraci pro stupňovitou eluci. Nejprve se do skleněné kolony umístí na dno kousek vaty, který se zatíží skleněnou tyčí a opatrně se nalévá do kolony připravená suspenze. Po ustálení sedimentace adsorbentu se stáhne mobilní fáze těsně nad sloupec adsorbentu, přidá se roztěr, na který se umístí filtrační papírový kruh o vhodné velikosti, poté vata, která se zatíží skleněnými kuličkami.

4.2.1.8 Flash chromatografie

Purifikace alkaloidů byla provedena na Sepacore Flash X10 systému. Samotný proces separace probíhal tak, že nejprve byla PP kartridž EcoFlex C18 50 μm kondicionována mobilní fází po dobu 30 min (došlo k 10násobnému promytí kolonového objemu) a poté byla zapojena do systému PP předkolona s roztěrem, z které se pak gradientovou elucí vymývaly alkaloidy zvyšujícím se podílem MeOH v mobilní fázi MeOH+ H_2O obsahující 0,1% kyseliny mravenčí.

Jednotlivé frakce byly jímány do 50 ml válců podle nastaveného objemu sběru (10 ml v minimu píků, 20 ml mezi píky). Průtok činil 20 ml/min. Vlnové délky UV detektoru byly nastaveny na 255, 280, 290 a 322 nm (vlnové délky byly nastaveny podle předchozího

přeměření absorpčních spekter alkaloidů PDA detektorem, který je součástí LC-MS Waters systému).

4.3 Separace alkaloidů

4.3.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál tvořily nažky *Centaurea cyanus* L. Množství 2,4 kg bylo zakoupeno z *Planta Naturalis* v Markvarticích a 0,7 kg bylo vypěstováno v Botanické zahradě Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Rostlinný materiál verifikoval prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc.

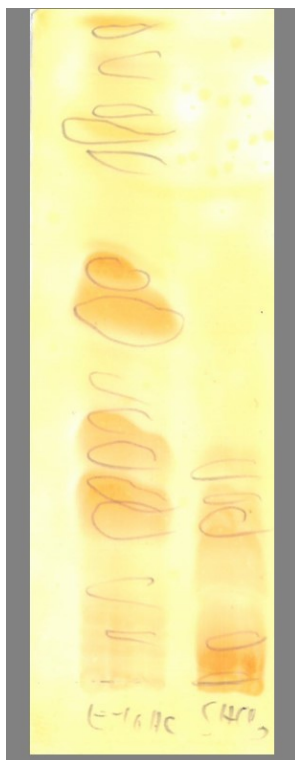
4.3.2 Příprava alkaloidního extraktu

Pro přípravu alkaloidního extraktu bylo použito 3,1 kg nažek *Centaurea cyanus* L. Nažky byly rozdrobeny pomocí laboratorního mlýnku. Rozdrobněné nažky byly extrahovány 2× 95% EtOH po dobu 30 minut. Poté byl přebytečný EtOH odpařen za redukovaného tlaku na vakuové odparce, čímž byl získán sumární EtOH extrakt. Ten byl poté podroben „odtučnění“ (odstranění triglyceridů) rozpuštěním extraktu v MeOH (800 ml), naředěn přidáním H₂O (200 ml) a následně vytřepán C₆H₁₄ (3× 300 ml). MeOH z roztoku byl odstraněn odpařením na vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 40 °C. Úplné odstranění MeOH z extraktu v destilační baňce se projevilo „orosením“ chladiče vakuové odparky H₂O.

Vodná fáze extraktu byla okyselena na pH 1 přidáním 100 ml 2% HCl, následně přefiltrována přes křemelinu, která byla po filtraci promyta 50 ml 2% HCl. Okyselený vodný roztok byl doplněn destilovanou H₂O na 500 ml a vytřepán 3× 150 ml Et₂O (odstranění neutrálních lipofilních sloučenin). K vodné fázi byl přidán EtOAc (200 ml) a provedla se alkalizace roztoku 10% Na₂CO₃ na pH 9–10, který byl vytřepán EtOAc (4× 200 ml). Odpařením organické fáze na vakuové odparce za sníženého tlaku bylo získáno 4,64 g EtOAc výtřepku.

Jelikož ve vodné fázi stále zůstávaly alkaloidy (detekce byla provedena Meyerovým činidlem), byla vodná fáze následně vytřepaná CHCl₃ (4× 200 ml). Odpařením CHCl₃ za redukovaného tlaku na vakuové odparce bylo získáno 380 mg CHCl₃ výtřepku. Alkaloidní profil sumárních EtOAc a CHCl₃ výtřepků byl analyzován na komerční TLC SiO₂ 60 F₂₅₄

, jako vyvíjející soustava byla použita směs $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_4\text{OH}$ (80:20:1,5), počet vyvíjení $1\times$, detekce alkaloidů provedená Dragendorffovým činidlem (Obrázek 21).



Obrázek 21 TLC alkaloidních sumárního EtOAc a CHCl_3 extraktů

4.3.3 Sloupcová chromatografie

EtOAc výtřepek (4,67 g) byl podroben sloupcové chromatografii. Pro separaci byla použita kolona o délce 63 cm a průměru 3,7 cm. Kolona byla naplněna stacionární fází, kterou tvořil Al_2O_3 deaktivovaný 6% H_2O , stupeň deaktivace Brockmann III, velikost zrn 40–200 μm (ACROSS) o hmotnosti 567g. Eluce probíhala skokově s mobilní fází obsahující CHCl_3 , $\text{CHCl}_3 + \text{EtOH}$, $\text{EtOH} + 1\% \text{CH}_3\text{COOH}$. Mrtvý objem kolony činil 410 ml. Jednotlivé frakce byly jímány po 100 ml, celkově bylo získáno 102 frakcí, které byly na základě TLC spojeny do 9 spojených frakcí označených A – I (Tabulka 2). Separace jednotlivých frakcí byla monitorována pomocí kontrolních TLC s mobilní fází $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH} + \text{NH}_4\text{OH}$ (90:10:0,75 a 80:20:1,5).

Tabulka 2 Frakce získané sloupcovou chromatografií alkaloidního EtOAc extraktu

Název frakce	Číslo spojené frakce	Eluční systém	Hmotnost frakce (mg)
A	5–22	CHCl ₃ , CHCl ₃ + EtOH (99:1)	697,5
B	22–33	CHCl ₃ + EtOH (99:1)	74,6
C	34–38	CHCl ₃ + EtOH (99:1)	31,6
D	39–50	CHCl ₃ + EtOH (99:1), CHCl ₃ + EtOH (98:2)	76,9
E	51–54	CHCl ₃ + EtOH (95:5)	13,1
F	55–64	CHCl ₃ + EtOH (95:5)	64,7
G	65–98	CHCl ₃ + EtOH (95:5) CHCl ₃ + EtOH (9:1) CHCl ₃ + EtOH (8:2) CHCl ₃ + EtOH (1:1)	315,1
H	99	EtOH	516,4
I	100–102	EtOH + CH ₃ COOH (100:1)	361

4.3.4 Preparativní TLC frakce A

Frakce A (698 mg) byla podrobena preparativní TLC na 27 litých SiO₂ deskách 15×15 cm. Jako vyvíjející soustava byla použita směs CHCl₃ + MeOH + NH₄OH (92,5:7,5:0,25), počet vyvíjení 2×. Tímto bylo získáno 7 podfrakcí A1 – A7 (Tabulka 3).

Tabulka 3 Podfrakce získané preparativní TLC frakce A

Název frakce	Retenční faktor	Hmotnost (mg)
A1	0,83	14,6
A2	0,75	36,6
A3	0,67	44,7
A4	0,50	373
A5	0,33	26,5
A6	0,25	16,4
A7	0,17	26,6

4.3.4.1 Separace alkaloidu z podfrakce A4

Podfrakce A4 (373 mg) byla purifikována další preparativní na 8 litých SiO₂ deskách 15×15 cm. Mobilní fází byla směs C₆H₁₂ + EtOAc + IPA + DEA (45:45:5:5), počet vyvíjení 2×. Tímto byly získány 3 podfrakce A4/1 – 3 (Tabulka 4).

Tabulka 4 Přehled podfrakcí získaných z podfrakce A4

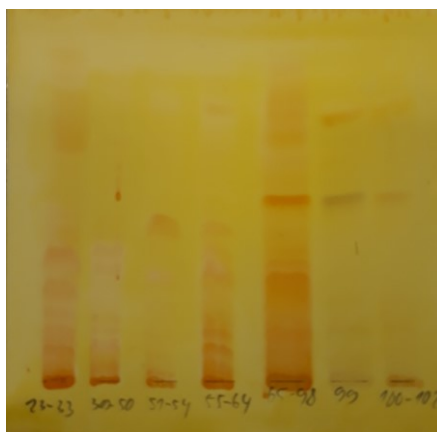
Název podfrakce	Retenční čas	Hmotnost (mg)
A4/1	0,66	18,8
A4/2	0,55	134,7
A4/3	0,32	15,8

4.3.4.2 Separace a čištění alkaloidu z podfrakce A4/2

Podfrakce A4/2 byla přečištěna preparativní TLC na silikagelu 60 RP-18_{F254}S. Celkově bylo použito 17 TLC desek 20×10 cm, mobilní fází byla směs MeOH + H₂O + TFAA (40:60:0,1), počet vyvíjení 2x vyvíjení. Tímto bylo získáno 63 mg čisté látky, která tvořila sůl s TFAA. TFAA byla odstraněna následujícím způsobem. Z původního množství 63 mg látky bylo 50 mg (13 mg bylo dáno na NMR analýzu) rozpuštěno v několika ml 2% HCl a vytřepáno 3× Et₂O. Vodní fáze byla alkalizována 10% Na₂CO₃ a volná báze alkaloidu byla získána vytřepáním do Et₂O (4×), ke kterému se přidalo malé množství bezvodého Na₂SO₄ (navázání stopového množství vodné fáze v Et₂O vrstvě). Filtrací Et₂O vrstvy přes vatku, odpařením solventu a vysušením vzorku v exsikatoru bylo získáno 39 mg amorfni, bělavě průsvitné sloučeniny **AD-1**.

4.3.5 Flash chromatografie

Jelikož sloupcová chromatografie alkaloidního EtOAc extraktu na oxidu hlinitém nevedla k dostatečně uspokojivé separaci u jednotlivých spojených frakcí (Obrázek 22),



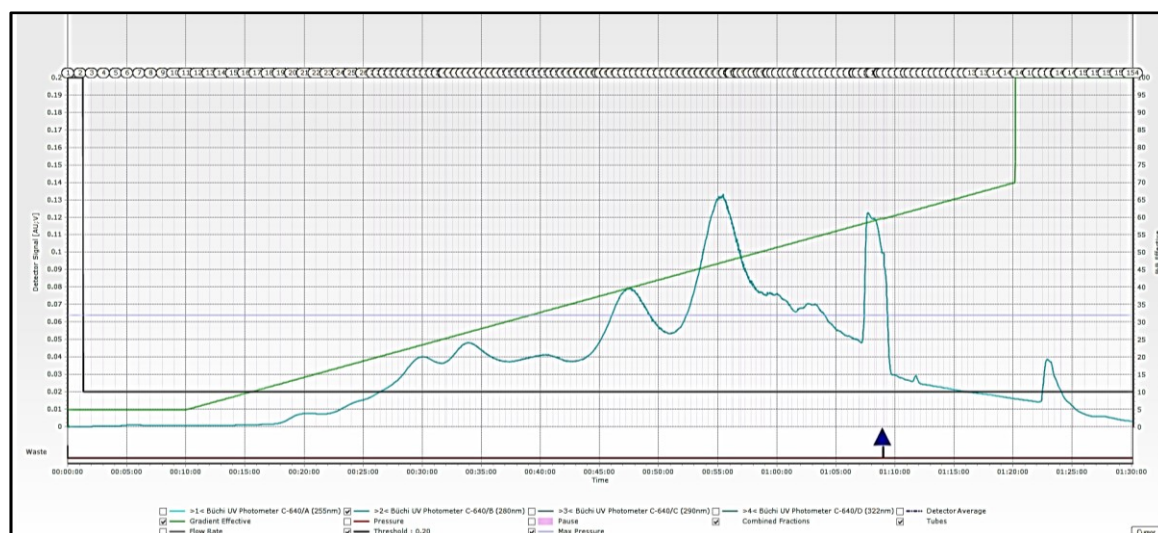
Obrázek 22 Souhrnné TLC ostatních frakcí

byly ostatní dosud nezpracované frakce spojeny dohromady a separovány pomocí flash chromatografie na PP kartridži EcoFlex C18 50 μ m spherical 40g. Alkaloidy byly eluovány z roztěru umístěný v předkoloně 12 \times 75 mm směsí mobilních fází A: (H₂O + 0,1% HCOOH) a B: (MeOH + HCOOH 0,1 %) nastaveným gradientem (Tabulka 5). Průtok směsi mobilních fází A + B byl nastaven na 20 ml/min.

Tabulka 5 Nastavený gradient mobilních fází A a B

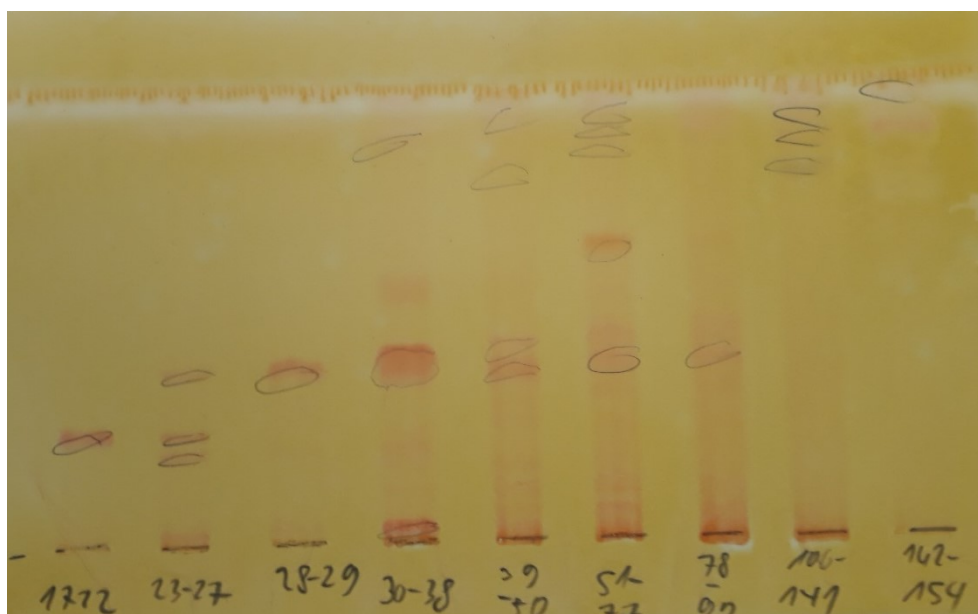
Start % B	Konec %B	min
5	5	10
5	70	70
70	100	1 s
100	100	10
Celkový čas separace 1 hod 30 min 1 s		

Izolace alkaloidů byla monitorována UV detektorem podle nastavení příslušných 4 vlnových délek. Jednotlivé frakce byly jímány frakčním kolektorem do 50 ml zkumavek, celkově bylo jímáno 154 frakcí (Obrázek 23),



Obrázek 23 Záznam separace spojené frakce na C18 40 g

kteřé byly spojeny do 9 finálních frakcí i na základě TLC analýzy jednotlivých frakcí na komerčních deskách silikagelu 60 F254. Jako vyvíjející směs byla použita soustava CH₂Cl₂ + MeOH obsahující 0,2 % NH₄OH, počet vyvíjení byl 1 \times (Obrázek 24).



Obrázek 24 TLC analýza spojených frakcí získaných flash chromatografií

Mobilní fáze z 9 spojených frakcí byla odpařena na vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 60 °C. Jednotlivé hmotnostní výtěžky jsou uvedeny níže (Tabulka 6).

Tabulka 6 Hmotnosti jednotlivých frakcí získaných flash chromatografií

Název frakce	Číslo spojené frakce	Hmotnost frakce (mg)
1	17–22	14,7
2	23–27	18,4
3	28–29	9,5
4	30–38	40,7
5	39–50	47,0
6	51–77	138,6
7	78–99	132,8
8	100–141	138,4
9	142–154	38,2

4.3.6 LC-MS analýza frakcí získaných flash chromatografií na C18 kartridži

Izolace alkaloidů z podfrakcí získaných flash chromatografií nebyla dále prováděna díky restrikcím způsobené onemocněním COVID-19 v České republice (přerušeno možností finalizovat diplomovou práci v 5. ročníku po dobu několika týdnů). U jednotlivých získaných frakcí byla alespoň provedena LC-MS analýza k identifikaci přítomných alkaloidů, zhodnocení účinnosti separace a návržení způsobu další purifikace.

4.4 Strukturní analýza

4.4.1 MS analýza

4.4.1.1 LC-MS

Vzorky (0,2 – 0,3 mg) byly rozpuštěny v 1 ml metanolu čistoty LC-MS a měřeny pomocí systému Waters Autopurification™ HPLC-MS (Milford, USA). Přístroj sestává z modulů Waters Sample Manager 2767, System Fluidics Organizer, binární gradientové pumpy Waters 2545, Waters 2998 detektoru s diodovým polem a Waters Acquity qDa hmotnostního spektrometru. Vzorky byly analyzovány při laboratorní teplotě. Na separaci byla použita kolona s reverzní fází XSelect® CSH™ C18 OBD™ (100 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Milford, USA). Jako mobilní fáze byly použity voda s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo A) a methanol s 0,1% kyselinou mravenčí (rozpuštědlo B). Průtok mobilní fáze byl 1 ml / min. Eluční program s gradientem byl naprogramován následovně (v / v): 0 min 5% B, 5 min 100% B, 8,5 min 5% B, poté 1,5 minuty v počátečních podmínkách pro ekvilibraci. Optimální hodnoty parametrů ESI-MS byly: kapilární napětí - 0,8 kV; Teplota próby - 600 ° C; Kuželové napětí – 15V. LC-MS hmotnostní spektra byla zaznamenána v rozmezí od 200 – 800 m/z. Pro detekci PDA byl rozsah detektoru nastaven od 190 do 700 nm. LC ESI-MS analýzy byly provedeny v pozitivním iontovém režimu. Eluce sloučenin nastává v pořadí od více polárních k méně polárním, s narůstající eluční silou mobilní fáze. V průběhu chromatografické analýzy zůstává koncentrace kyseliny mravenčí konstantní.

4.4.1.2 HRMS

UHPLC systém Acquity UPLC, nejvyšší třída (Waters, Millford, USA) spojený s vysokorozlišovacím spektrometrem (HRMS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) využívající kvadrupól Time-of-Flight (TOF). Chromatografie byla provedena na koloně Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 µm) využívající gradientovou eluci s acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí s průtokem 0,4 ml/min. Elektrosprejová ionizace byla provedena v pozitivním módu. ESI spektra byla zaznamenána v rozmezí 200 – 1200 m/z. Jako referenční látka pro hmotnostní detekci byl použit leucine-enkefalin a pro kalibraci byl použit mravenčan sodný.

4.4.2 NMR analýza

NMR spektra byla měřena na spektrometrech Varian VNMRS500 s pracovní frekvencí 500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C jádra. ^{13}C NMR spektra byla měřena v 5 mm SW širokopásmové sondě, ^1H v inverzní 5 mm ID PFG sondě s využitím standardních pulsních sekvencí. Experimenty byly měřeny v CDCl_3 při 25°C . Hodnoty chemických posunů jsou v ppm a jsou vztaženy k internímu standardu (hexamethyldisilan nebo TMS, 0,04 ppm, v ^1H spektrech) nebo signálu solventu (76.99 ppm, v ^{13}C spektrech).

4.4.3 Optická otáčivost

Optická otáčivost byla měřena v methanolu na polarimetru Automatic P 3000 v MeOH při laboratorní teplotě 25°C .

4.5 Stanovení biologické aktivity izolovaných alkaloidů

4.5.1 Stanovení inhibiční aktivity vůči lidské AChE a BChE

4.5.1.1 Materiál a chemikálie

- acetylthiocholin jodid $\geq 99.0\%$ (Sigma-Adrich)(ATChI)
- butyrylthiocholin jodid $\geq 98.0\%$ (Sigma-Adrich) (BTChI)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich) (DTNB)
- fysostigmin 99% (Sigma-Aldrich)
- galanthamin hydrobromid (Changsha Organic Haerb Inc., China)
- dimethylsulfoxid pro biologické testy (Sigma-Adrich) (DMSO)
- polystyrenové 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým a čirým dnem

4.5.1.2 Roztoky a pufr

- 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.
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 (obsahujícím 150 mM chloridu sodného)
- 5mM fosfátový pufr pH 7,4 (bez NaCl)

4.5.1.3 Přístroje

- centrifuga Boeco U-32R s rotorem Hettich 1611
- reader SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)

4.5.1.4 Úprava plazmy a získání AChE a BChE

Enzymy byly získány z krve zdravého dobrovolníka. Okamžitě po odebrání vzorku byla přidána antikoagulační přísada (2ml 3,4% citrátu sodného na 18 ml krve). Plazma byla poté

oddělena centrifugací při 4 °C a rychlosti 4000 ot.·min⁻¹ a následně sloužila jako zdroj BChE. Jako zdroj AChE se použily separované erythrocyty.

Plazma se odebrala a zbytek se odsál bezpopelovým filtračním papírem s hlazeným povrchem. Odečtený objem erythrocytární masy se zředil 5mM fosfátovým pufrům pH 7,4, tak aby v každé z 8 zkumavek bylo 10 – 12 ml vzorku a poté následovala opět centrifugace. Promytí se provedlo 3x. Následně byl znovu přidán 5mM fosfátový pufr pH 7,4 (tentokrát bez NaCl) a to v poměru 1:9 erythrocyty k pufru. Směs byla homogenizována, přelita do Erlenmayerovy baňky a erythrocyty se ponechaly spontánně hemolyzovat za stálého míchání po dobu 10 minut.

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

4.5.1.5 Metoda stanovení

Stanovení inhibiční aktivity (IC₅₀) bylo provedeno dle Ellmanovy metody za použití Ellmanova činidla 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB)[54].

Do jamek polystyrenové 96 jamkové mikrotitrační destičky s plochým a čirým dnem bylo nanášeno 8,3 μl hemolyzátu nebo plazmových ředění (nejméně v 6 rozdílných koncentracích), dále 283 μl 5mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) a 8,3 μl vzorku zředěného v dimethylsulfoxidu (DMSO) (40nM, 10nM, 4nM, 1nM, 0,4nM, 0nM) nebo slepý vzorek (DMSO). Reakce byla iniciována přidáním 33,3 μl 10 nM substrátu (10 mM acetylthiocholinjodidu nebo 10mM butyrylthiocholinjodidu). Konečný poměr DTNB a substrátu byl 1:1. Zvýšení absorbance (ΔA) na 436 nm pro AChE a 412 nm pro BChE bylo měřeno 1 minutu při 37 °C za použití readru. Každé měření bylo opakováno 6x pro každou koncentraci enzymové preparátu. Procentuální inhibiční koncentrace byla spočítána na základě vzorce:

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

kde ΔA_{BL} je nárůst absorbance slepého vzorku a ΔA_{SA} je nárůst absorbance měřeného vzorku[54].

Inhibiční potenciál testované sloučeniny byl vyjádřen jako hodnota IC₅₀ (koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% cholinestrasovou inhibici) v μM a porovnávána s referenčními látkami galanthaminem a fysostigminem[54].

4.5.2 Stanovení inhibiční aktivity vůči POP

4.5.2.1 Materiál a chemikálie

- dimethylsulfoxid $\geq 99.7\%$ (Sigma-Aldrich)(DMSO)
- (Z)-Gly-Pro-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich)
- bajkalin (Sigma-Aldrich)
- berberin (Sigma-Aldrich)
- prolyloligopeptidasa (Sigma Aldrich)
- polystyrenové 96 jamkové mikrotitrační destičce s plochým a čirým dnem (Sigma Aldrich)

4.5.2.2 Roztoky a pufr

- 10mM roztok Z-Gly-Pro-*p*-nitroanilidu byl připraven rozpuštěním látky v 40% 1,4-dioxanu. Byl uchováván v lednici při 4 °C.
- fosfátový solný pufr pH 7,4 (obsahující 137mM NaCl a 2,7 mM KCl)

4.5.2.3 Přístroje

- reader ELISA (Multi-mode microplate reader Synergy 2, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)

4.5.2.4 Metoda stanovení inhibice POP

POP byla rozpuštěna ve fosfátovém solném pufru pH 7,4 (obsahující 137mM NaCl a 2,7 mM KCl), specifická aktivita enzymu byla 0,2 U/ml. Test byl proveden ve standardní polystyrenové 96 jamkové mikrotitrační destičce s plochým a čirým dnem. Zásobní roztoky testovaných sloučenin byly připraveny rozpuštěním v DMSO (10mM). Zředovací roztoky (10^{-3} – 10^{-7}) byly připraveny ze zásobních roztoků s neionizovanou vodou, kontrola byla provedena se stejnou koncentrací DMSO. Substrát pro POP je (Z)-Gly-Pro-*p*-nitroanilid, který byl rozpuštěn v 50% 1,4-dioxanu (5mM). Pro každou reakci byly fosfátový pufr (170 μ l), testovaná sloučenina (5 μ l) a POP (5 μ l) inkubovány na 5 minut při 37 °C. Poté byl přidán substrát (20 μ l) a směs se inkubovala 30 minut při 37 °C. Tvorba *p*-nitroanilidu, přímo uměrná aktivitě POP byla měřena spektrofotometricky při 405 nm za použití ELISA readru. Inhibiční aktivita byla vyjádřena hodnoutou IC₅₀[54].

4.5.3 Stanovení inhibiční aktivity vůči GSK-3 β

4.5.3.1 Materiál a chemikálie

- dimethylsulfoxid pro biologické testy (Sigma-Aldrich)(DMSO)
- lidská rekombinantní GSK-3 β (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)
- GSM substrát (Merck Millipore, Darmstadt, Německo)
- HEPES (Sigma Aldrich)
- EDTA (Sigma Aldrich)
- EGTA (Sigma Aldrich)
- octan hořečnatý (Sigma Aldrich)
- ATP (Sigma Aldrich)
- Kinase Glo Kit (Promega Biotech Iberica, S.L., Madrid, Spain),
- GSK-3 β selektivní inhibitor SB-415286 (Selleck Chemicals, Houston, TX, USA)

4.5.3.2 Roztoky a pufr

- pufr (pH 7.5) obsahující 50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA a 15 mM octanu hořečnatého

4.5.3.3 Přístroje

- Victor X3 multimode plate reader (Perkin Elmer, MA, USA)
- kultivační mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) – plastové, sterilní, 96jamkové

4.5.3.4 Metoda stanovení

Aktivita a inhibice GSK-3 β byly stanoveny podle luminiscenční metody dle Baki et al. za použití činidla Kinase-Glo[55]. Reakce byla prováděna v 96 jamkové destičce. Každá jamka obsahovala 10 μ l testované sloučeniny (rozpuštěné v 1mM DMSO) zředěné pufrům pH 7,5 obsahujícím 50mM HEPES, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 15mM octanu hořečnatého acetátu o požadované koncentraci, 10 μ l 1 μ M ATP, 10 μ l 100 μ M GSM a 10 μ l GSK-3 β . Místo roztoku testované sloučeniny bylo použito 10 μ l pufru nebo SB-415286 o koncentraci 5 μ M za účelem zjištění pozitivní (maximální aktivity) a negativní kontroly (celkové inhibice). Celková koncentrace DMSO v reakční směsi nepřesáhla 5%. Směs se nechala reagovat po dobu 30minut při 37 °C. Poté byly enzymatické reakce zastaveny přidáním 40 μ l

čidla Kinase-Glo. Luminiscenční aktivita byla zaznamenána po 10 minutách. Aktivita je přímo úměrná rozdílu celkovému a spotřebovanému ATP. Inhibiční aktivita byla spočítána na základě maximální aktivity měřené bez přítomnosti inhibitoru a maximální inhibice měřené za přítomnosti referenční sloučeniny.

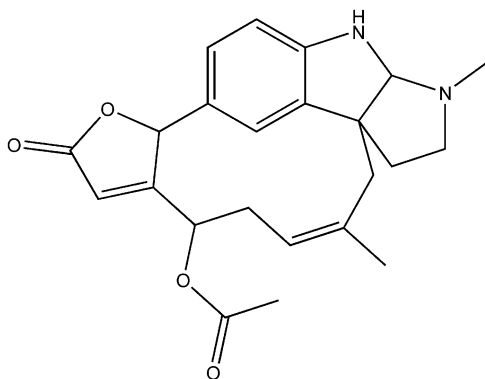
Hodnoty IC_{50} byly vypočítány za použití programu GraphPad Prism 4.0 program (GraphPad Software Inc., CA, USA).

5. VÝSLEDKY

5.1 Strukturní analýza izolovaných alkaloidů

AD-1 (Adrabbín)

Sumární vzorec: $C_{23}H_{26}N_2O_4$



Obrázek 25 Struktura alkaloidu AD-1 (Adrabbínu)

5.1.1 MS analýza

5.1.1.1 LC-MS analýza

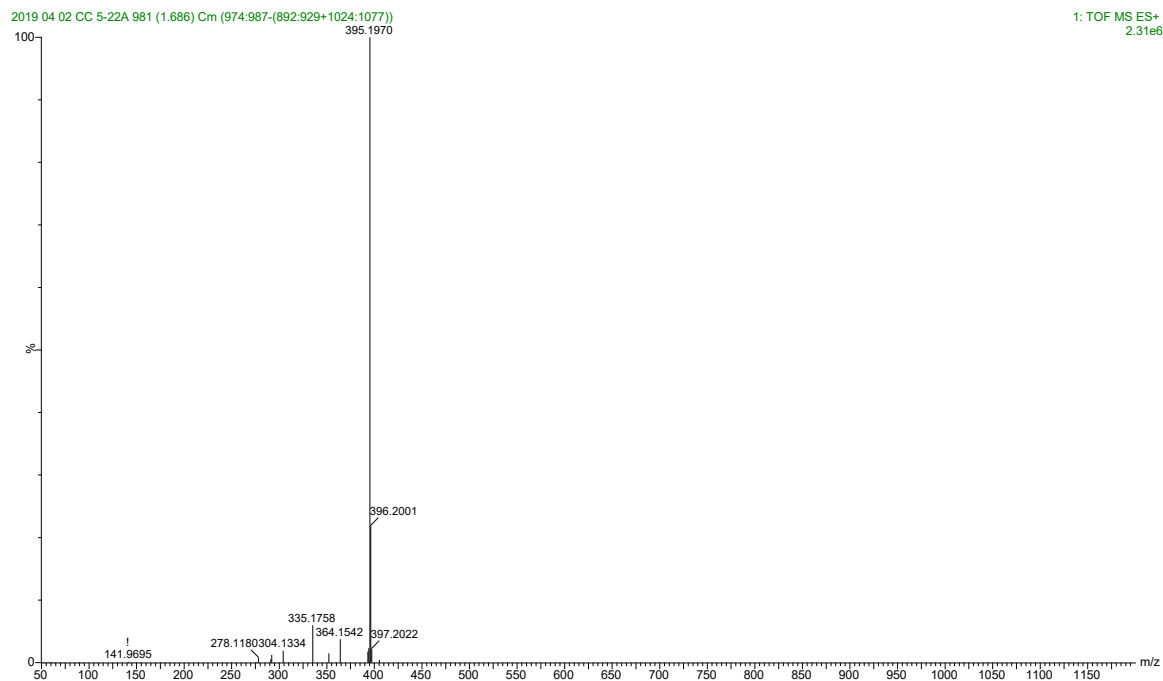
MS-ESI: m/z (%) $[M+H]^+$ 395,169(100), 396,236(33).

5.1.1.2 HRMS analýza

m/z exp: 395,1970

m/z teoret: 395,1965

ppm: 1,27



Obrázek 26 HRMS spektru sloučeniny AD-1 (Adrabbin)

5.1.2 NMR analýza

^1H NMR (500 MHz, THF) δ : 7.19 (1H, dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 6.89 (1H, bs), 6.69 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 6.48 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 6.22 (1H, s), 6.09 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 5.76 (1H, s), 5.29 (1H, s), 4.05 (1H, d, $J = 11.6$ Hz), 3.70 – 3.64 (1H, m), 2.83 – 2.72 (2H, m), 2.67 (3H, s), 2.63 – 2.51 (1H, m), 2.55 (1H, d, $J = 12.8$ Hz), 2.48 – 2.41 (2H, m), 1.93 (1H, d, overlap, $J = 12.8$ Hz), 1.92 (3H, s, overlap), 1.79 (s, 3H)

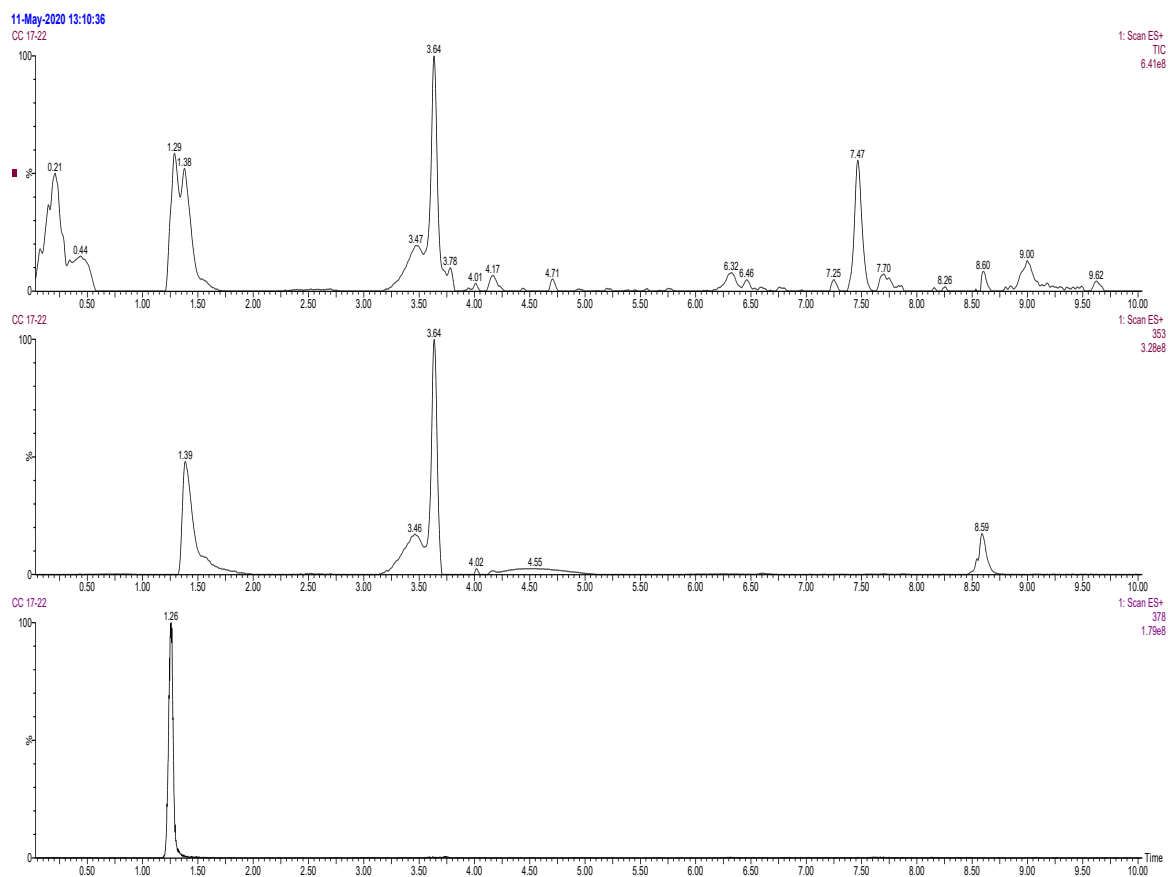
^{13}C NMR (125.7 MHz, THF) δ : 172.8, 172.4, 169.9, 150.7, 133.5, 130.8, 130.3, 127.5, 127.3, 122.7, 116.9, 108.5, 87.5, 85.0, 71.3, 60.4, 55.7, 49.0, 35.3, 35.0, 33.9, 20.2, 17.5

5.1.3 Optická otáčivost

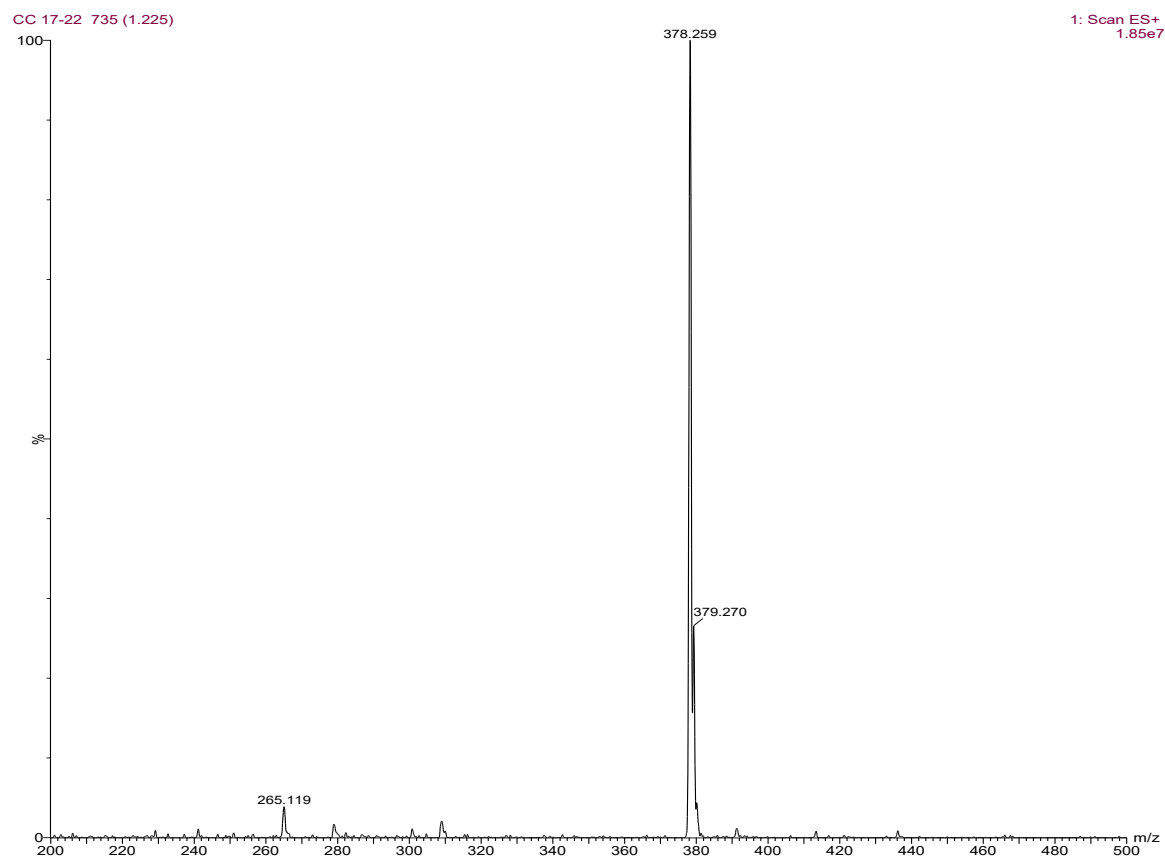
$$[\alpha]_D^{25} = -106^\circ \text{ (c 0,13; MeOH)}$$

5.2 LC-MS analýza frakcí získaných flash chromatografií

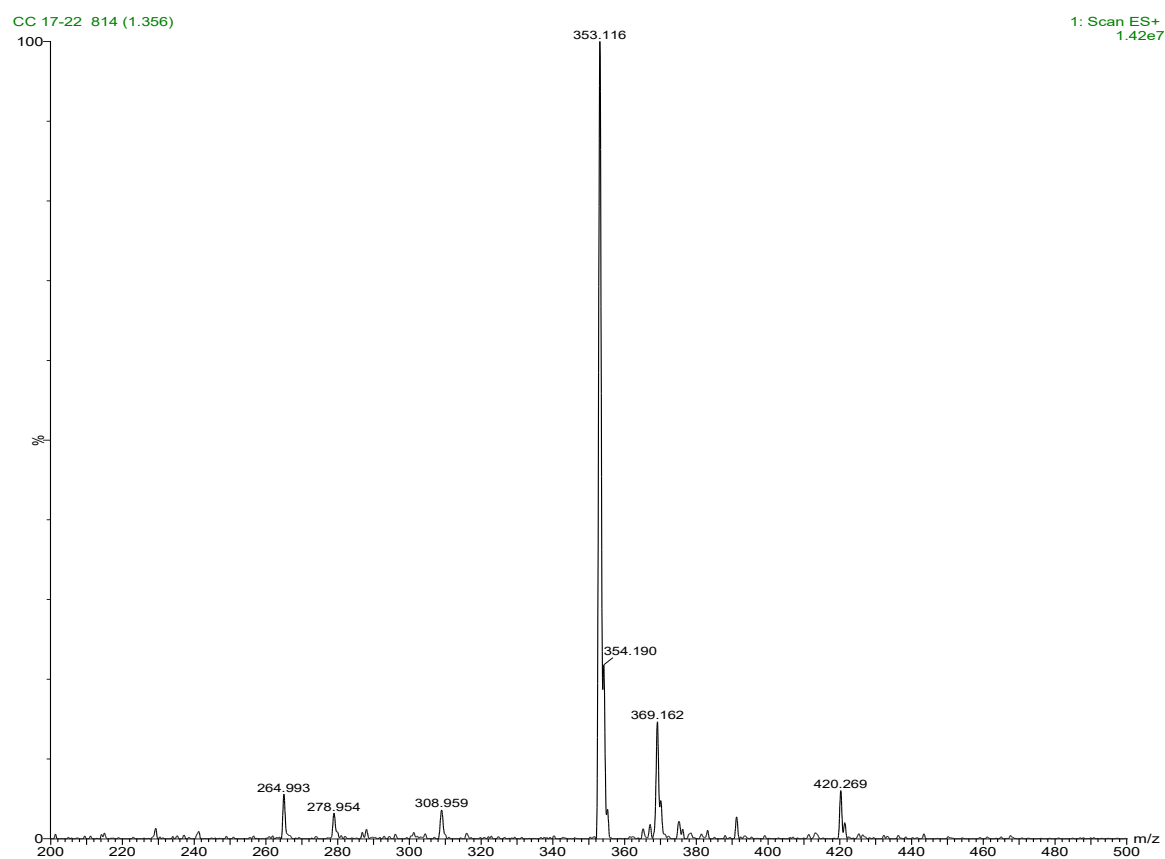
5.2.1 Frakce 17-22



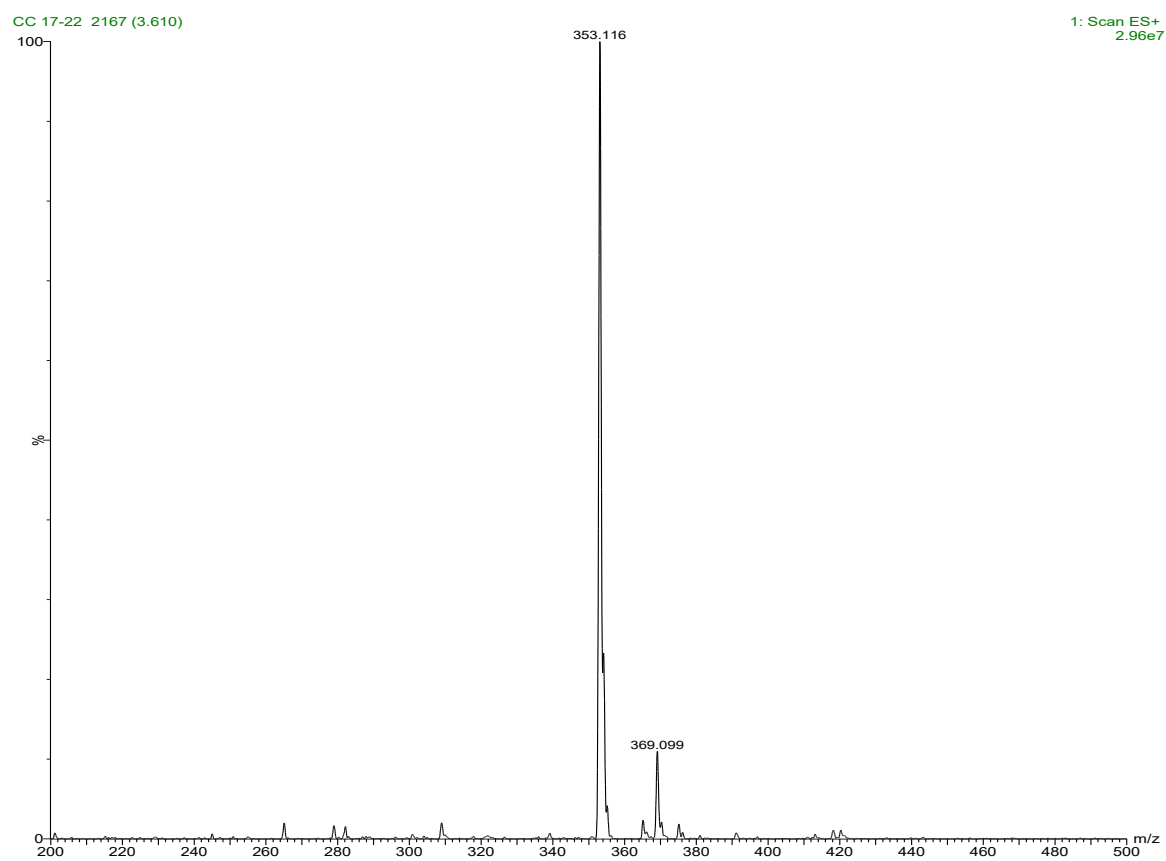
Obrázek 27 Sken ES+ a TIC frakce 17-22



Obrázek 28 Sken ES+ sloučeniny s Mr 378 [M+H]⁺



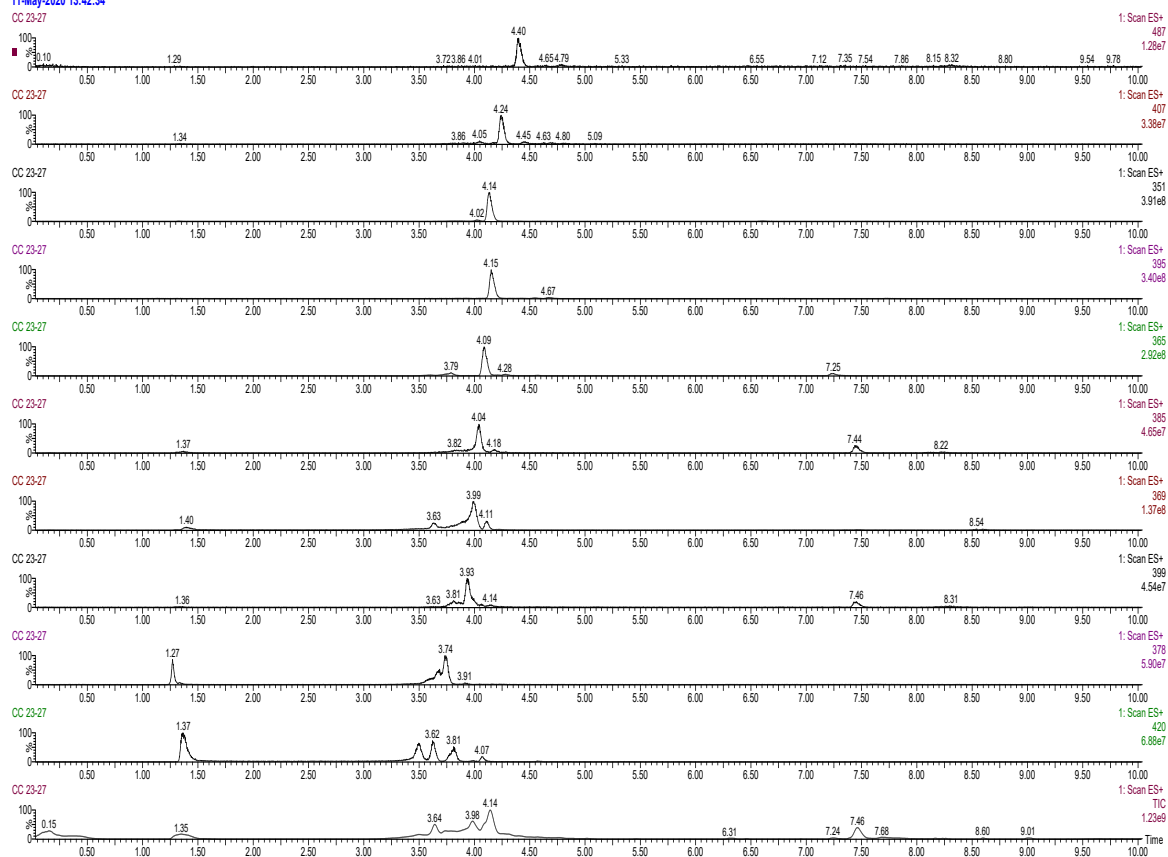
Obrázek 29 Sken ES+ sloučeniny s Mr 353 [M+H]⁺



Obrázek 30 Sken ES+ sloučeniny o Mr 353 [M+H]⁺

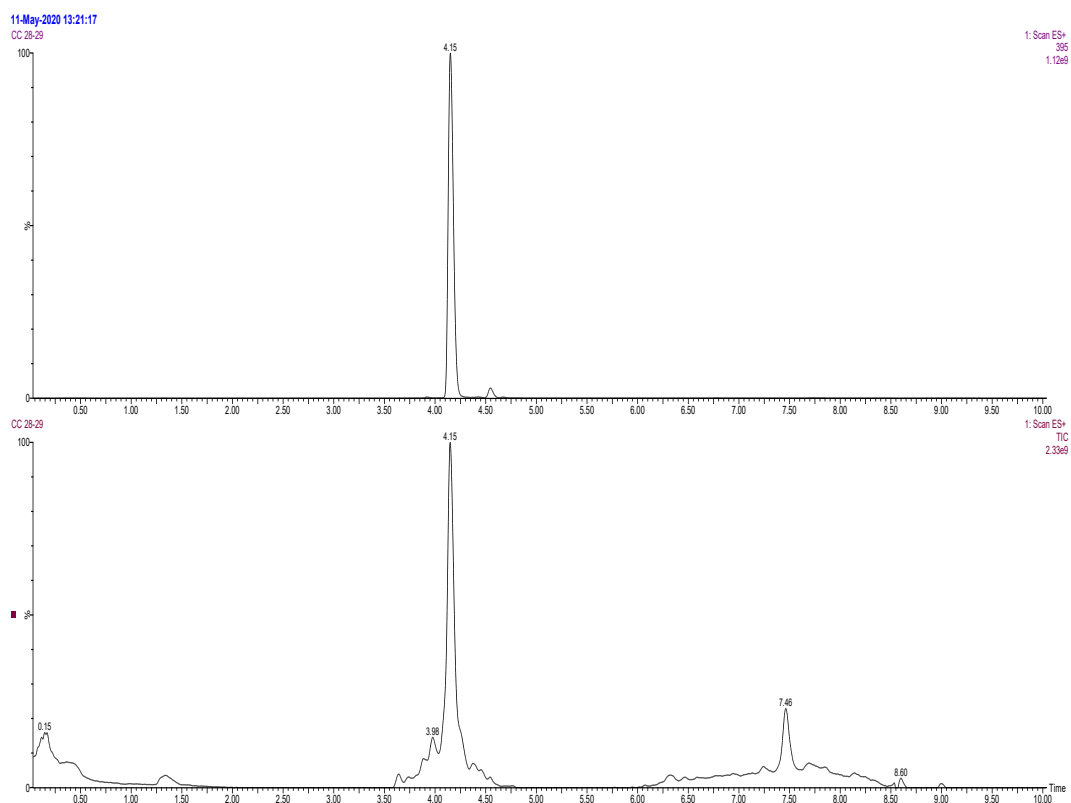
5.2.2 Frakce 23–27

11-May-2020 13:42:34

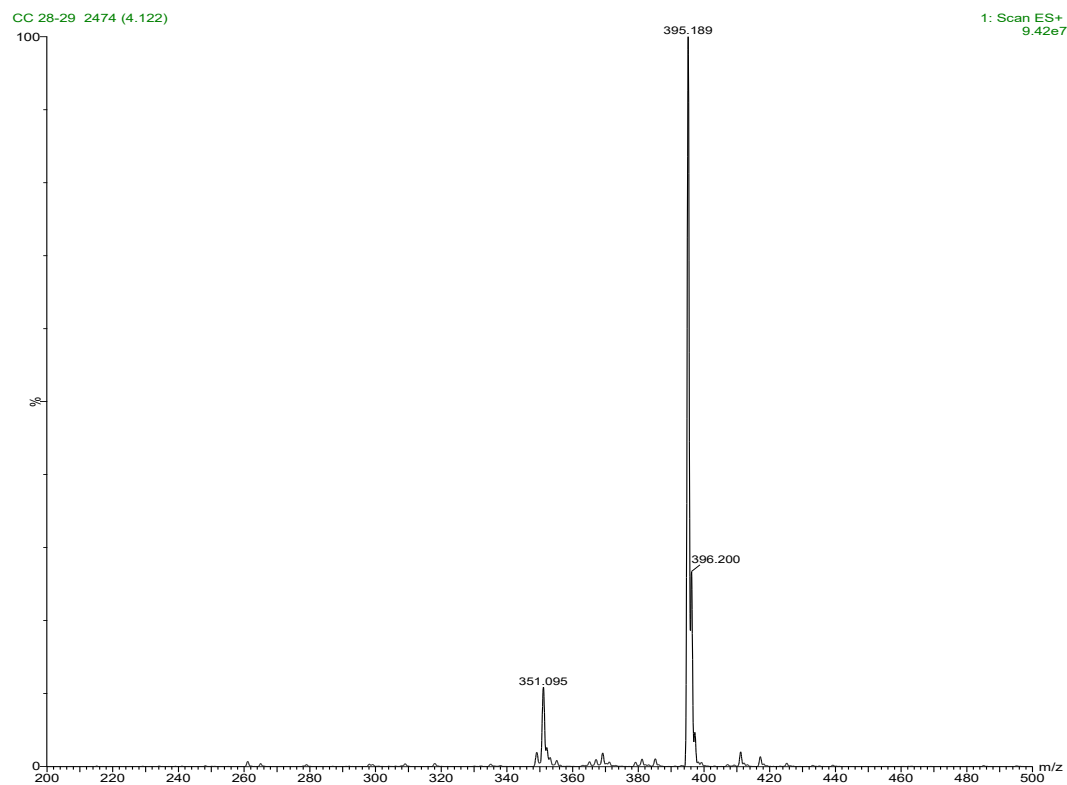


Obrázek 31 Sken ES+ TIC frakce 23–27 a jednotlivých přítomných sloučenin

5.2.3 Frakce 28-29

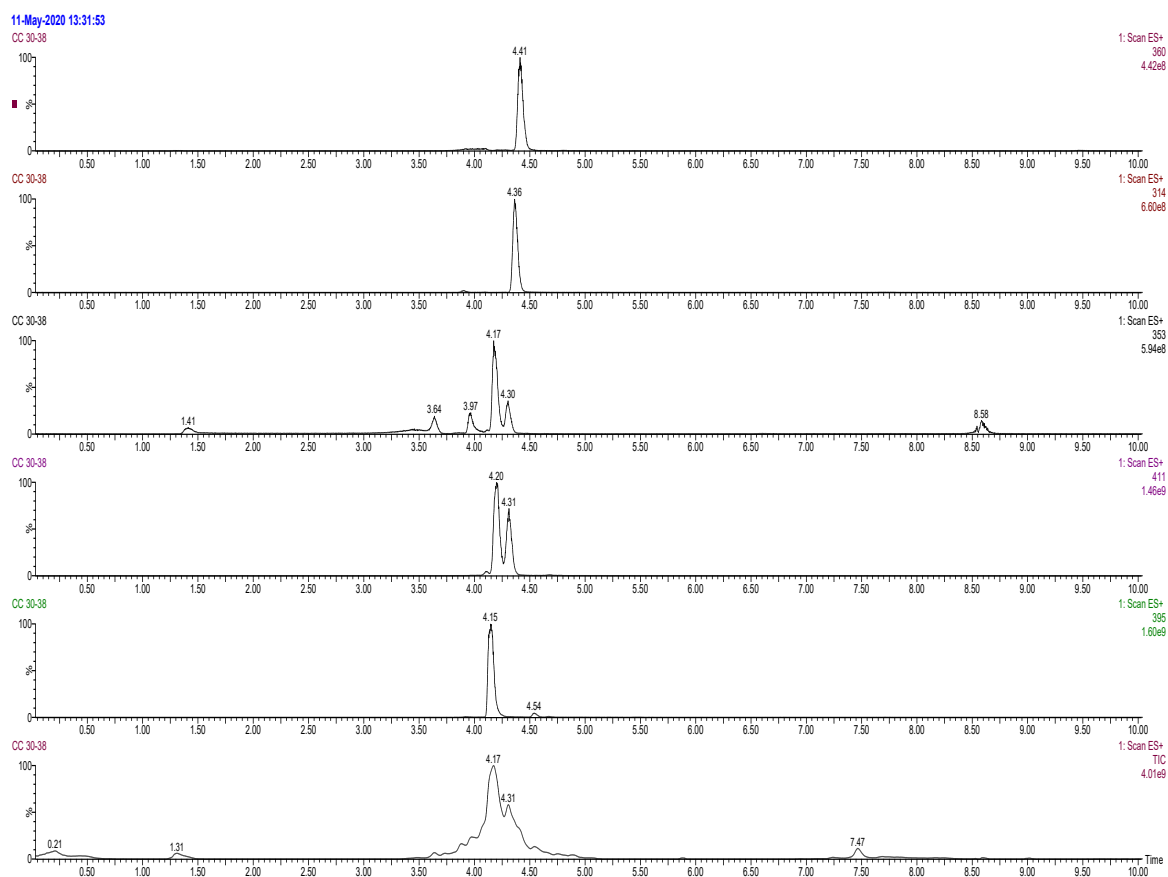


Obrázek 32 Sken ES+ TIC sloučeniny o MR 395 [M+H]⁺



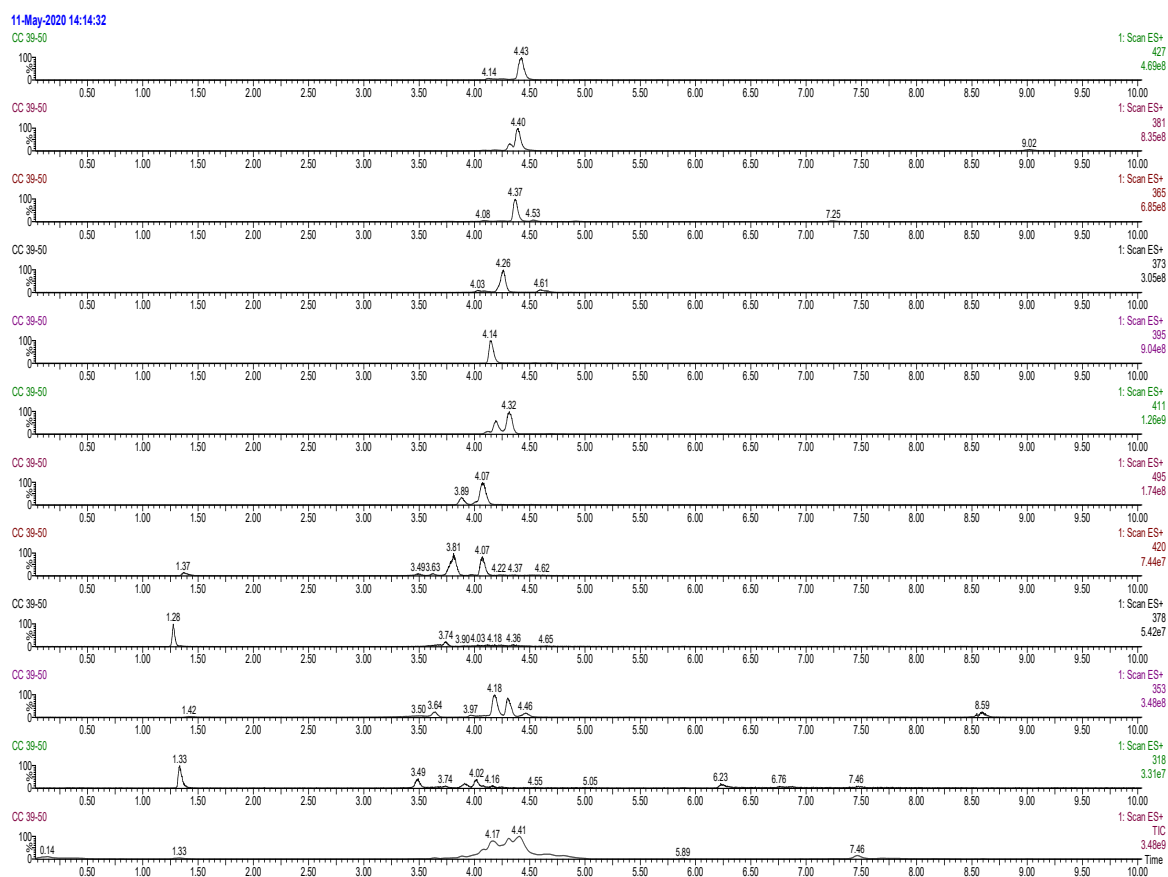
Obrázek 33 Sken ES+ sloučeniny o Mr 395 [M+H]⁺

5.2.4 Frakce 30–38



Obrázek 34 Sken ES+TIC frakce 30–38 a jednotlivých přítomných sloučenin

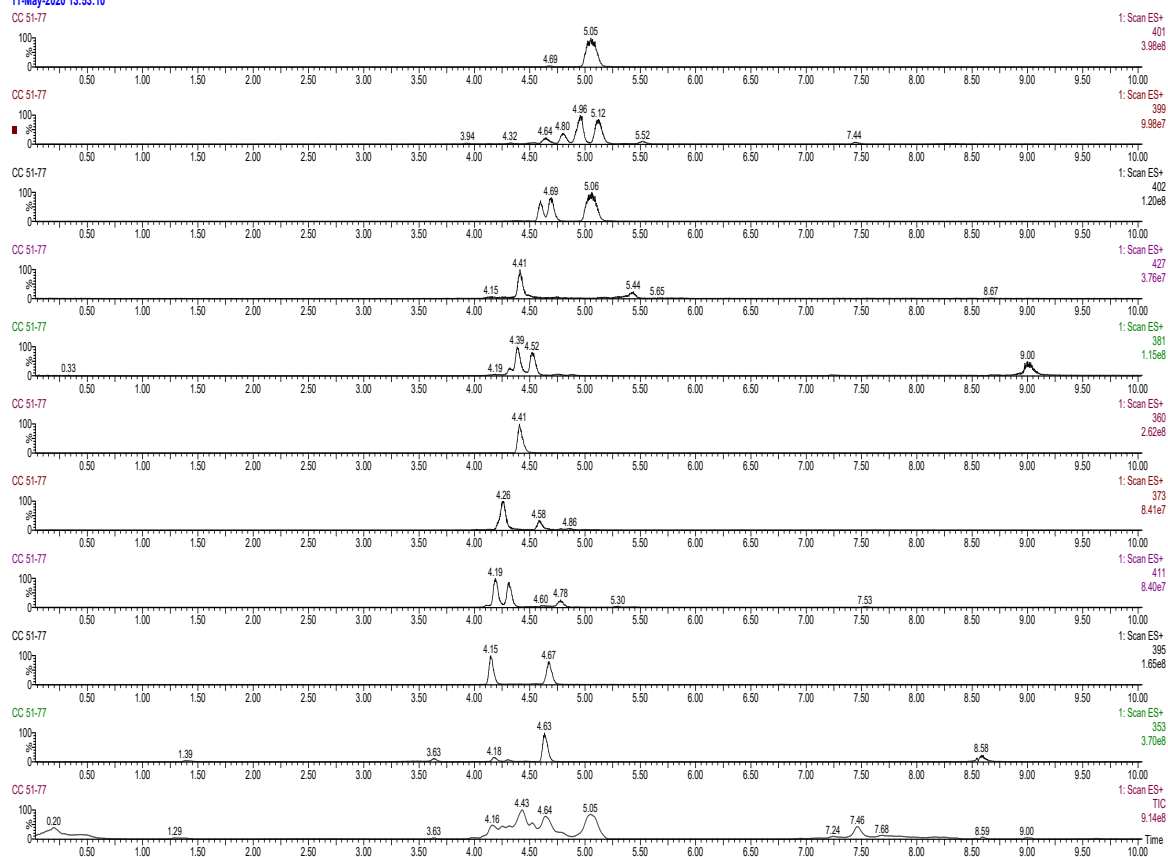
5.2.5 Frakce 39–50



Obrázek 35 Sken ES+ TIC frakce 39–50 a jednotlivých jejích sloučenin

5.2.6 Frakce 51-77

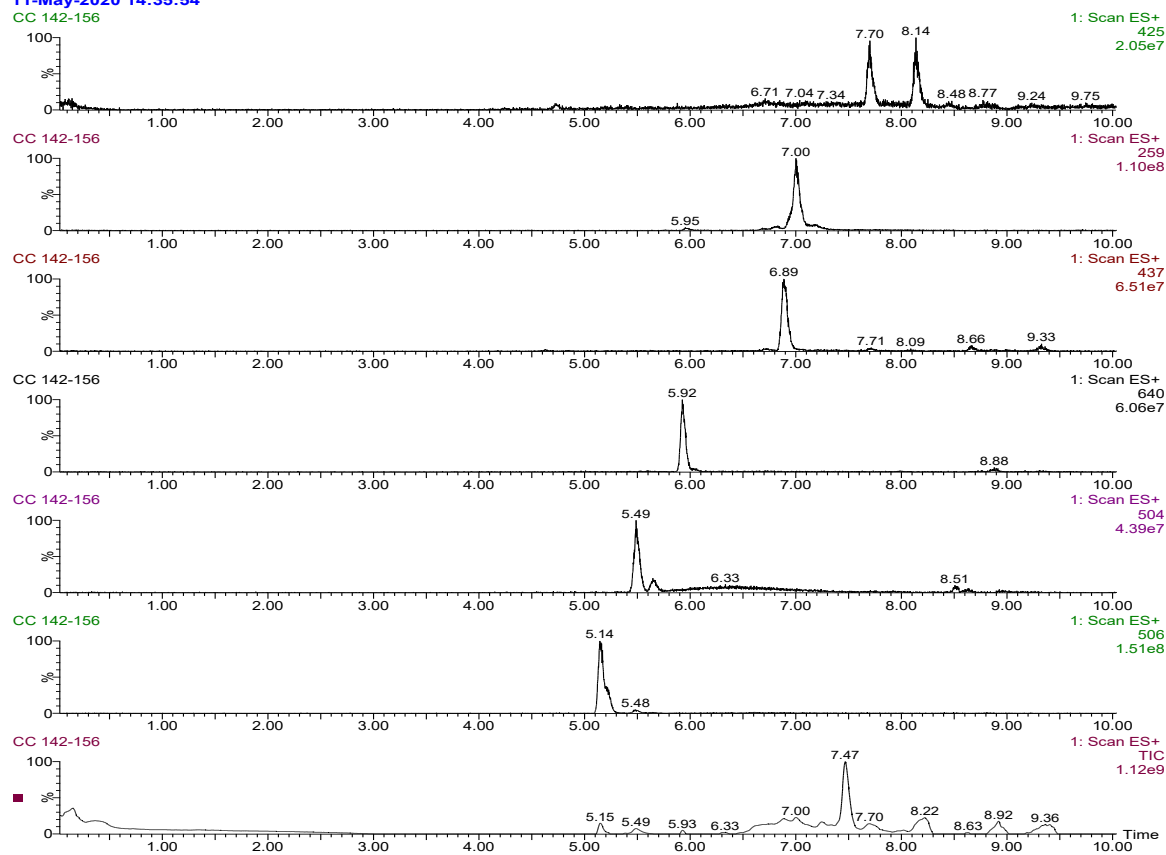
11-May-2020 13:53:10



Obrázek 36 Sken ES+TIC frakce 51-77 a jednotlivých přítomných sloučenin

5.2.8 Frakce 142-154

11-May-2020 14:35:54



Obrázek 38 Sken ES+ TIC frakce 142-158 a jednotlivých přítomných sloučenin

5.3 Inhibiční aktivita vůči AChE, BChE, POP a GSK-3β

Tabulka 7 Biologické aktivity izolované sloučeniny

Alkaloid	AChE (IC ₅₀ ; μM)	BChE (IC ₅₀ ; μM)	POP (IC ₅₀ ; μM)	GSK-3β (50 μM; %inhibice)
Adrabbín	>100	>100	143,0 ± 6,0	Měří se
Galanthamin	1,71 ± 0,1	42,3 ± 1,3	-	-
Fysostigmin	63,0 ± 1,0 × 10 ⁻³	130,0 ± 4,0 × 10 ⁻³	-	-
Bajkalin	-	-	194,0 ± 14,0	-
Berberin	-	-	142,0 ± 21,0	-
Z-pro-prolinal	-	-	3,27 ± 0,02 × 10 ⁻³	-
SB-415286	-	-	-	70,0 nM (IC ₅₀)

6. DISKUSE

Alkaloidní EtOAc výtřepok z nažek *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) byl separován běžnými chromatografickými metodami, které vedly k izolaci alkaloidu AD-1 (Adrabbinu) s Mr 394. Struktura sloučeniny byla určena na základě hmotnostní detekce (LC-MS, LC-HRMS), NMR analýzy a změřením optické otáčivosti. Na základě získaných dat bylo zjištěno, že se jedná o dosud neizolovanou sloučeninu indolového charakteru, obsahující dva dusíky (hexahydropyrroloindol) a nenasycený 5členný lakton. Nenasycený lakton a indolo-pyrrolidinová strukturní jednotka jsou navzájem spojené 5uhlíkatým řetězcem, obsahující dvojnou vazbu, acetátový ester a tvoří dohromady cyklickou strukturu (Obrázek 25). Zajímavostí je, že hexahydropyrroloindolový skelet vzniká z tryptofanu indukci γ -zářením a působením kyslíkatých radikálů[56]. Tudíž, alkaloid AD-1 (Adrabbin) pravděpodobně vznikl radikálovou reakcí tryptofanu se seskviterpenovým laktonem. Seskviterpenové laktony jsou sekundární metabolity rostlin, které se vyskytují v rodu *Centaurea* L., (včetně *Centaurea cyanus* L.) a obecně jsou chemotaxonomickým znakem rostlin v čeledi Asteraceae[49,57].

Jak již bylo v teoretické části této diplomové práce zmíněno, indolové alkaloidy byly z nažek *Centaurea cyanus* L. již dříve izolovány (moschamin, *cis*-moschamin, centcyamin a *cis*-centcyamin)[49]. Podobně byly indolové alkaloidy nalezené i v nažkách dalších druhů rodu *Centaurea* L.[50,52,53,53].

V této práci se další alkaloidy nepodařilo izolovat, nicméně LC-MS analýzou frakcí získaných flash chromatografií byly ve frakcích detekovány sloučeniny pozitivně reagující s Dragendorffovým činidlem (Obrázek 22). Ve frakci 17–22 byly detekovány sloučeniny s Mr 353 $[M+H]^+$, odpovídající Mr 352 (Obrázek 27, Obrázek 29), což by odpovídalo alkaloidům moschamin/*cis*-moschamin (*cis*/*trans* enantiomerům), které byly z *C. cyanus* L. izolovány jako racemická směs 45:55[49]. Podobně se tyto alkaloidy chovaly i při LC-MS analýze, kdy se sloučeniny eluovaly od $R_t = 1,39$ až 3,64 min (Obrázek 27). Separace těchto alkaloidů by se mohla vylepšit např. použitím aprotického rozpouštědla (acetonitrilu) nebo přidáním chirálního selektoru do mobilní fáze[58]. Centcyamin, Mr 337 $[M+H]^+$, odpovídající Mr 336, další izolovaný alkaloid z *C. cyanus* L.[49], nebyl ve frakcích vůbec detekován (Obrázek 27–38). Ve frakci 23–27 byla detekována sloučenina s Mr 351 $[M+H]^+$, odpovídající Mr 350, což by mohla odpovídat alkaloidu moschamindolu izolovaného z *C. moschata* L.[51]. Ve stejné frakci byla rovněž detekována sloučenina s Mr 369, $[M+H]^+$,

odpovídající Mr 368, která naznačuje přítomnosti alkaloidu moschamindololu, který byl izolován opět z *C. moschata* L.[51]. Nicméně, potvrzení přítomnosti obou alkaloidů musí být ověřeno izolací a NMR analýzou. Bohužel, frakce 23-27 váží pouze 18,6 mg, což znamená, že nebude jednoduché získat sloučeniny v dostatečném množství a čistotě pro provedení této analýzy.

Alkaloid AD-1 (Adrabbín) byl testován na inhibici vybraných enzymů hrajících důležitou roli v patofyziologii AD: na inhibici lidských cholinesteras (AChE a BChE), prolylolygopeptidasy (POP) a glykogensynthasy-kinasy 3 β (GSK-3 β). Vůči oběma lidským cholinesterasám byla nová sloučenina neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu M$), prolylolygopeptidasu alkaloid inhiboval lépe než standard bajkalin a srovnatelně jako alkaloid berberin, který je považován jako inhibitor tohoto enzymu ($IC_{50 AD-1} = 143,0 \pm 6,0 \mu M$; $IC_{50 berberin} = 142,0 \pm 21,0$; $IC_{50 bajkalin} = 194,0 \pm 14,0 \mu M$; Tabulka 7)[59]. Výsledek inhibice GSK-3 β látkou AD-1 (Adrabbín) v době odevzdání této diplomové práce nebyl znám, látka byla odeslána začátkem roku do Itálie na změření této aktivity, nicméně kvůli pandemii COVID-19 nebyla nová sloučenina dosud změřena. Nicméně, podle dosud nepublikovaných výsledků ze skupiny ADINACO, indolové alkaloidy signifikantně inhibují GSK-3 β , tudíž nelze vyloučit, že by tato sloučenina mohla být vůči tomuto enzymu aktivní. Právě u alkaloidů indolového typu byla prvně objevena inhibice GSK-3 β , mezi potentní inhibitory přírodního původu patří např. alkaloid manzamin A izolovaný z mořské houby[60].

Závěrem, izolovaný AD-1 (Adrabbín) je alkaloid s unikátní strukturou, který doposud nebyl izolován a zdá se, že by mohl být zajímavou předlohou v hledání nových sloučenin ovlivňující POP, která hraje roli nejen v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění ale i u dalších nemocí.

7. ABSTRAKT

Drabbová, A.: Alkaloidy *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) a jejich biologická aktivita vztahovaná k Alzheimerově chorobě. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky, Hradec Králové 2020

Z nažek *Centaurea cyanus* L. byly připraveny ethyl-acetátové a chloroformové alkaloidní extrakty. Z ethyl-acetátového alkaloidního výtřepku byl běžnými chromatografickými metodami (sloupcovou chromatografií a preparativní TLC) izolován úplně nový alkaloid AD-1 (Adrabbín). Identifikace alkaloidu byla provedena hmotnostní spektrometrií, NMR analýzou a optickou otáčivostí. Sloučenina AD-1 (Adrabbín) má unikátní indolovou cyklickou strukturu. V rámci diplomové práce byla provedena i LC-MS analýza frakcí získaných flash chromatografií. V těchto frakcích, pozitivně reagujících s Dragendorffovým činidlem, byly detekovány látky odpovídající molekulovým hmotnostem alkaloidů dříve izolovaných z nažek některých druhů rodu *Centaurea* L.

Alkaloid AD-1 (Adrabbín) byl testován na inhibici lidských cholinesteras a prolyllooligopeptidasy. Vůči lidským cholinesterasám je látka považována za neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu M$), prolyllooligopeptidasu alkaloid AD-1 (Adrabbín) inhiboval srovnatelným způsobem jako známý inhibitor berberin (AD-1: $IC_{50} 143,0 \pm 6,0 \mu M$; berberin: $IC_{50} 142,0 \pm 21,0 \mu M$). Výsledek inhibice glykogensynthasy-kinasy 3β není zatím znám, měření bylo v Itálii přerušeno díky pandemii COVID-19.

Klíčová slova: *Centaurea cyanus*, nažky, indolové alkaloidy, AD-1 (Adrabbín), acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, prolyllooligopeptidasa, glykogensynthasa-kinasa 3β .

8. ABSTRACT

Drabbová, A.: Title of Diploma Thesis: *Centaurea cyanus* L. (Asteraceae) alkaloids and their biological activity related to Alzheimer's disease. Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmaceutical Botany, Hradec Králové 2020.

Ethyl acetate and chloroform alkaloids extracts were prepared from *Centaurea cyanus* L. seeds. A novel alkaloid AD-1 (Adrabbín) was isolated from the ethyl acetate extract by common chromatographic methods (column chromatography, preparative TLC). Its structure was elucidated by mass spectrometry, NMR analysis and determination of optical rotation. The alkaloid AD-1 (Adrabbín) possesses a unique structure which consists of a cyclic indole moiety.

Also LC-MS analysis of fractions obtained by flash chromatography was performed. In those fractions were detected molecular ions related to compounds previously isolated from other *Centaurea* species.

Alkaloid AD-1 (Adrabbín) was tested on ability to inhibit human cholinesterases, prolyl oligopeptidase and glycogen synthase kinase 3 β . The compound was considered against human cholinesterases inactive (IC₅₀ values > 100 μ M). Interestingly, the alkaloid inhibited prolyl oligopeptidase the same intensity as a standard berberine (AD-1: IC₅₀ 143,0 \pm 6,0 μ M; berberin: IC₅₀ 142,0 \pm 21,0 μ M). The novel compound has not been tested yet on inhibition of glycogen synthase-kinase 3 β due to the current COVID-19 pandemic.

Key words: *Centaurea cyanus* L., seeds, indole alkaloids, AD-1 (Adrabbín), acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, prolyl oligopeptidase, glycogen synthase-kinase 3 β .

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Stanciu, G.D.; Luca, A.; Rusu, R.N.; Bild, V.; Beschea Chiriac, S.I.; Solcan, C.; Bild, W.; Ababei, D.C. Alzheimer's Disease Pharmacotherapy in Relation to Cholinergic System Involvement. *Biomolecules* **2020**, *10*, 40, doi:10.3390/biom10010040.
2. Weller, J.; Budson, A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* **2018**, *7*, doi:10.12688/f1000research.14506.1.
3. Panda, S.S.; Jhanji, N. Natural Products as Potential anti-Alzheimer Agents. *Curr. Med. Chem.* **2019**, doi:10.2174/0929867326666190618113613.
4. Lane, C.A.; Hardy, J.; Schott, J.M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 59–70, doi:10.1111/ene.13439.
5. Alzheimer's Association 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* **2016**, *12*, 459–509, doi:10.1016/j.jalz.2016.03.001.
6. Prokopová, I. Farmakoterapie Alzheimerovy demence a přidružených neuropsychiatrických symptomů – 1. část. *Psychiatr. Praxi* **2018**, *19*, 7–10.
7. Mayeux, R.; Stern, Y. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, doi:10.1101/cshperspect.a006239.
8. Jackson, R.J.; Rose, J.; Tulloch, J.; Henstridge, C.; Smith, C.; Spires-Jones, T.L. Clusterin accumulates in synapses in Alzheimer's disease and is increased in apolipoprotein E4 carriers. *Brain Commun.* **2019**, *1*, doi:10.1093/braincomms/fcz003.
9. Bondi, M.W.; Edmonds, E.C.; Salmon, D.P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J. Int. Neuropsychol. Soc. JINS* **2017**, *23*, 818–831, doi:10.1017/S135561771700100X.
10. Goschorska, M.; Baranowska-Bosiacka, I.; Gutowska, I.; Metryka, E.; Skórka-Majewicz, M.; Chlubek, D. Potential Role of Fluoride in the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3965, doi:10.3390/ijms19123965.
11. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 101–115, doi:10.2174/1570159X13666150716165726.
12. Taylor, P.; Brown, J.H. Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine. *Basic Neurochem. Mol. Cell. Med. Asp. 6th Ed.* **1999**.
13. Brunovský, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě alzheimerovy nemoci. *Neurol. Praxi* **2007**, *8*, 112–117.
14. Wirths, O.; Zampar, S.; Weggen, S. N-Terminally Truncated A β Peptide Variants in Alzheimer's Disease. In *Alzheimer's Disease*; Wisniewski, T., Ed.; Codon Publications: Brisbane (AU), 2019 ISBN 978-0-646-80968-7.
15. Jouanne, M.; Rault, S.; Voisin-Chiret, A.-S. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *139*, 153–167, doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.070.
16. Hooper, C.; Killick, R.; Lovestone, S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1433–1439, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x.
17. Zhao, N.; Liu, C.-C.; Qiao, W.; Bu, G. Apolipoprotein E, Receptors and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* **2018**, *83*, 347–357, doi:10.1016/j.biopsych.2017.03.003.
18. Verghese, P.B.; Castellano, J.M.; Holtzman, D.M. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 241–252, doi:10.1016/S1474-4422(10)70325-2.
19. Chen, Z.; Zhong, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci. Bull.* **2014**, *30*, 271–281, doi:10.1007/s12264-013-1423-y.

20. Budni, J.; Bellettini-Santos, T.; Mina, F.; Garcez, M.L.; Zugno, A.I. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis.* **2015**, *6*, 331–341, doi:10.14336/AD.2015.0825.
21. Fahnestock, M.; Shekari, A. ProNGF and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, doi:10.3389/fnins.2019.00129.
22. Lozano, J.C.M.; Gomez, R.M.; Sanabria, A.G.Z.; Jubiz, G.; Valderrama, S.D.P.O. Genetic Aspects of Glial Cells Regarding Neurodegenerative Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24*, 1727–1735, doi:10.2174/1381612823666170828134055.
23. Hansen, D.V.; Hanson, J.E.; Sheng, M. Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 459–472, doi:10.1083/jcb.201709069.
24. Hüll, M.; Berger, M.; Bauer, J.; Strauss, S.; Volk, B. Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **1996**, *246*, 124–128, doi:10.1007/BF02189112.
25. Calsolaro, V.; Antognoli, R.; Okoye, C.; Monzani, F. The Use of Antipsychotic Drugs for Treating Behavioral Symptoms in Alzheimer's Disease. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fphar.2019.01465.
26. Blanco-Silvente, L.; Castells, X.; Saez, M.; Barceló, M.A.; Garre-Olmo, J.; Vilalta-Franch, J.; Capellà, D. Discontinuation, Efficacy, and Safety of Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease: a Meta-Analysis and Meta-Regression of 43 Randomized Clinical Trials Enrolling 16 106 Patients. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2017**, *20*, 519–528, doi:10.1093/ijnp/pyx012.
27. Lee, J.-H.; Jeong, S.-K.; Kim, B.C.; Park, K.W.; Dash, A. Donepezil across the spectrum of Alzheimer's disease: dose optimization and clinical relevance. *Acta Neurol. Scand.* **2015**, *131*, 259–267, doi:10.1111/ane.12386.
28. Kandiah, N.; Pai, M.-C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K.W.; Karanam, A.K.; Christopher, S. 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* **2017**, *12*, 697–707, doi:10.2147/CIA.S129145.
29. Olin, J.T.; Schneider, L. Galantamine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2002**, doi:10.1002/14651858.CD001747.
30. Stavrakov, G.; Philipova, I.; Zheleva-Dimitrova, D.; Valkova, I.; Salamanova, E.; Konstantinov, S.; Doytchinova, I. Docking-based design and synthesis of galantamine-camphane hybrids as inhibitors of acetylcholinesterase. *Chem. Biol. Drug Des.* **2017**, *90*, 709–718, doi:10.1111/cbdd.12991.
31. Wang, R.; Yan, H.; Tang, X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine1. *Acta Pharmacol. Sin.* **2006**, *27*, 1–26, doi:10.1111/j.1745-7254.2006.00255.x.
32. Wu, W.-Y.; Dai, Y.-C.; Li, N.-G.; Dong, Z.-X.; Gu, T.; Shi, Z.-H.; Xue, X.; Tang, Y.-P.; Duan, J.-A. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 572–587, doi:10.1080/14756366.2016.1210139.
33. Hynd, M.R.; Scott, H.L.; Dodd, P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **2004**, *45*, 583–595, doi:10.1016/j.neuint.2004.03.007.
34. Briggs, R.; Kennelly, S.P.; O'Neill, D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin. Med.* **2016**, *16*, 247–253, doi:10.7861/clinmedicine.16-3-247.
35. Anand, R.; Gill, K.D.; Mahdi, A.A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **2014**, *76*, 27–50, doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.004.

36. Hung, S.-Y.; Fu, W.-M. Drug candidates in clinical trials for Alzheimer's disease. *J. Biomed. Sci.* **2017**, *24*, 47, doi:10.1186/s12929-017-0355-7.
37. Hey, J.A.; Yu, J.Y.; Versavel, M.; Abushakra, S.; Kocis, P.; Power, A.; Kaplan, P.L.; Amedio, J.; Tolar, M. Clinical Pharmacokinetics and Safety of ALZ-801, a Novel Prodrug of Tramiprosate in Development for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clin. Pharmacokinet.* **2018**, *57*, 315–333, doi:10.1007/s40262-017-0608-3.
38. Lauretti, E.; Dincer, O.; Praticò, D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 118664, doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118664.
39. García-Horsman, J.A.; Männistö, P.T.; Venäläinen, J.I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* **2007**, *41*, 1–24, doi:10.1016/j.npep.2006.10.004.
40. Männistö, P.T.; Venäläinen, J.; Jalkanen, A.; García-Horsman, J.A. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect.* **2007**, *20*, 293–305, doi:10.1358/dnp.2007.20.5.1120216.
41. Patil, P.; Thakur, A.; Sharma, A.; Flora, S.J.S. Natural products and their derivatives as multifunctional ligands against Alzheimer's disease. *Drug Dev. Res.* *n/a*, doi:10.1002/ddr.21587.
42. Zucchella, C.; Sinforiani, E.; Tamburin, S.; Federico, A.; Mantovani, E.; Bernini, S.; Casale, R.; Bartolo, M. The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Front. Neurol.* **2018**, *9*, doi:10.3389/fneur.2018.01058.
43. Jiráček, R. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. *Psychiatr. Praxi* **2005**, *3*, 55–58.
44. Daidalea Available online: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSystematic.asp> (accessed on Feb 28, 2020).
45. Daidalea Available online: <https://apps.faf.cuni.cz/daidalea/PlantSpecies.asp?id=10049> (accessed on Feb 28, 2020).
46. Jahodář, L.; Univerzita Karlova *Farmakobotanika: semenné rostliny*; Karolinum: Praha, 2011; ISBN 978-80-246-2015-2.
47. *Květena České Republiky: = Flora of the Czech Republic. 7: ...*; Slavík, B., Štěpánek, J., Eds.; Vyd. 1.; Academia: Praha, 2004; ISBN 978-80-200-1161-9.
48. *Klíč ke květeně České republiky*; Kubát, K., Bělohávková, R., Eds.; Vyd. 1.; Academia: Praha, 2002; ISBN 978-80-200-0836-7.
49. Sarker, S.D.; Laird, A.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y.; Jaspars, M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1273–1276, doi:10.1016/S0031-9422(01)00084-X.
50. Shoeb, M.; Celik, S.; Jaspars, M.; Kumarasamy, Y.; MacManus, S.M.; Nahar, L.; Thoo-Lin, P.K.; Sarker, S.D. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9001–9006, doi:10.1016/j.tet.2005.07.047.
51. Sarker, S.D.; Savchenko, T.; Whiting, P.; Šik, V.; Dinan, L.N. Moschamine, CIS-Moschamine, Moschamindole and Moschamindolol: Four Novel Indole Alkaloids from *Centaurea moschata*. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *9*, 189–199, doi:10.1080/10575639708048314.
52. Hodaj, E.; Tsiftoglou, O.; Abazi, S.; Hadjipavlou-Litina, D.; Lazari, D. Lignans and indole alkaloids from the seeds of *Centaurea vlachorum* Hartvig (Asteraceae), growing wild in Albania and their biological activity. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *31*, 1195–1200, doi:10.1080/14786419.2016.1226823.

53. Shoeb, M.; MacManus, S.M.; Jaspars, M.; Trevidu, J.; Nahar, L.; Kong-Thoo-Lin, P.; Sarker, S.D. 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* **2006**, *62*, 11172–11177, doi:10.1016/j.tet.2006.09.020.
54. Siatka, T.; Adamcová, M.; Opletal, L.; Cahlíková, L.; Jun, D.; Hrabínová, M.; Kuneš, J.; Chlebek, J. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* **2017**, *22*, doi:10.3390/molecules22071181.
55. Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keserü, G.M. A high throughput luminescent assay for glycogen synthase kinase-3beta inhibitors. *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*, 75–83, doi:10.1089/adt.2006.029.
56. Griffiths, H.R.; Lunec, J.; Blake, D.R. Oxygen radical induced fluorescence in proteins; identification of the fluorescent tryptophan metabolite, N-formyl kynurenine, as a biological index of radical damage. *Amino Acids* **1992**, *3*, 183–194, doi:10.1007/BF00806783.
57. Nowak, G.; Dawid-Pač, R.; Urbańska, M.; Nawrot, J. TLC of selected sesquiterpenoids of the Asteraceae family. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2011**, *80*, 193–196, doi:10.5586/asbp.2011.016.
58. Popl *Chromatographic Analysis of Alkaloids*; Routledge, 2018; ISBN 978-1-351-46087-3.
59. Tarrago, T.; Kichik, N.; Seguí, J.; Giralt, E. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 354–359, doi:10.1002/cmdc.200600303.
60. Hamann, M.; Alonso, D.; Martín-Aparicio, E.; Fuertes, A.; Pérez-Puerto, M.J.; Castro, A.; Morales, S.; Navarro, M.L.; Del Monte-Millán, M.; Medina, M.; et al. Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibitory activity and structure-activity relationship (SAR) studies of the manzamine alkaloids. Potential for Alzheimer's disease. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1397–1405, doi:10.1021/np060092r.