

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky



**Štruktúra minoritných alkaloidov čeľade Amaryllidaceae
ako inšpirácia pre syntézu zlúčenín s biologickou aktivitou
cielenou voči Alzheimerovej chorobe**

DIZERTAČNÁ PRÁCA

Vedúca práce: prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne pod vedením svojej školiteľky prof. Ing. Lucie Cahlíkové, Ph.D. a konzultanta doc. PharmDr. Jana Korábečného, Ph.D. Uvedená literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých bolo pri písaní práce čerpané, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové dňa

.....
Mgr. Filip Pidaný

PodĎakovanie

Na tomto mieste by som rád poĎakoval svojej školiteľke prof. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a podporu počas celej doby môjho postgraduálneho štúdia. Moje poĎakovanie tiež patrí všetkým kolegom z Katedry farmakognozie a farmaceutické botaniky a výskumnej skupiny Sekundárne metabolity rastlín ako potenciálne liečivá, ktorí so mnou zdieľali všetky radosti aj strasti spojené s postgraduálnym štúdiom.

Chcel by som taktiež vyjadriť úprimné poĎakovanie svojmu konzultantovi doc. PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D. z Katedry toxikologie a vojenskej farmacie, Vojenskej lekárskej fakulty, Univerzity obrany za jeho prínosné konzultácie a odborné vedenie počas našej vynikajúcej spolupráce. Rovnako by som chcel poĎakovať pracovníkom Centra biomedicínskeho výskumu Fakultnej nemocnice v Hradci Králové za ich výskumnú podporu.

Rád by som touto cestou vyjadril hlbokú vĎaku svojej rodine a priateľke, ktorí ma počas celého štúdia neprestajne podporovali v riešení nových výziev.

Za finančnú podporu Ďakujem Univerzite Karlově (projekt SVV 260 662), projekt Predaplikačného výskumu inovatívnych liekov a medicínskych technológií (InoMed) (reg. č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/0010046) Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy, spolufinancovaný Európskou úniou, programu AKTION a Fondu mobility UK, bez ktorých by táto práca nemohla vzniknúť.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakognozie a farmaceutické botaniky

Kandidát: Mgr. Filip PIDANÝ

Školiteľ: prof. Ing. Lucie CAHLÍKOVÁ, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Jan KORÁBEČNÝ, Ph.D.

Názov dizertačnej práce: Štruktúra minoritných alkaloidov čeľade Amaryllidaceae ako inšpirácia pre syntézu zlúčenín s biologickou aktivitou cielenou voči Alzheimerovej chorobe

Predkladaná dizertačná práca v teoretickej časti poskytuje základný prehľad o čeľadi Amaryllidaceae známej pre bohatý výskyt štruktúrne rozmanitých alkaloidov. Tieto látky vykazujú široké spektrum farmakologických účinkov, pričom naše štúdie sa zameriavajú na ich potenciálne terapeutické využitie v terapii Alzheimerovej choroby (AD). Ide o najčastejšiu formu demencie, ktorá je charakterizovaná progresívnou neurodegeneráciou. S narastajúcou dĺžkou života populácie rastie aj celosvetová prevalencia AD. Tento trend predstavuje nielen ekonomické, ale aj sociálne výzvy pre zdravotné systémy a spoločnosť ako celok. V práci sú detailne popísané najznámejšie hypotézy vzniku AD a charakteristiky klinicky používaných liečiv. Pozornosť je venovaná poklesu hladín acetylcholinesterázy, dominantného enzýmu zdravého mozgu, ako aj postupnému nárastu hladín kompenzačného enzýmu butyrylcholinesterázy (BChE).

Experimentálna časť práce sa preto zameriava na výskum nových potenciálnych selektívnych inhibítorov BChE. Práca rozširuje poznatky získané z predchádzajúcich izolačných prác nových alkaloidov z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, s osobitným zameraním na alkaloidy pomenované karltoníny A-E. Karltonín A a B ukázali zvlášť významnú inhibíciu ľudskej butyrylcholinesterázy (hBChE) s hodnotami $IC_{50} = 0,91 \pm 0,02 \mu M$, resp. $IC_{50} = 0,031 \pm 0,001 \mu M$.

V rámci nadväznej prvej syntetickej série sme identifikovali najúčinnjší inhibítor hBChE, molekulu označenú ako **I-6**, s hodnotou $IC_{50} = 0,07 \pm 0,01 \mu M$. Následne, v druhej sérii, boli identifikované dve molekuly, **II-87** a **II-88**, ktoré preukázali ešte signifikantnejšiu

*h*BChE inhibičnú aktivitu, s hodnotami $IC_{50} = 0,0038 \pm 0,0002 \mu\text{M}$ a $IC_{50} = 0,0057 \pm 0,0015 \mu\text{M}$, v uvedenom poradí. Paralelne s druhou sériou prebiehala príprava tretej série, kde boli ako najaktívnejšie deriváty identifikované zlúčeniny **III-28** a **III-33** s hodnotami $IC_{50} = 0,171 \pm 0,063 \mu\text{M}$ a $IC_{50} = 0,167 \pm 0,018 \mu\text{M}$.

V práci diskutujem experimentálne údaje týkajúce sa dizajnu, syntézy a evaluácie biologickej aktivity pripravených derivátov a detailne analyzujem vzťah medzi štruktúrou a aktivitou (SAR). Najúčinnšie zlúčeniny boli špecificky hodnotené z hľadiska ich schopnosti prechádzať hematoencefalickou bariérou, profilu cytotoxicity, mikrozosomálnej a plazmatickej stability a vo vybranom prípade rozpustnosti vo vode. Získané údaje boli podporené *in silico* štúdiami a kryštalografickou štúdiou najúčinnnejšej molekuly **II-87** s *h*BChE. Výskumom sme identifikovali radu perspektívnych zlúčenín s potenciálnym využitím v liečbe chorôb spojených s cholinergnou dysfunkciou.

Kľúčové slová: prírodné látky, liečivá, alkaloidy, neurodegeneratívne ochorenia, Alzheimerova choroba

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany

Candidate:	Mgr. Filip Pidaný
Supervisor:	Prof. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.
Consultant:	Assoc. Prof. Jan Korábečný, Ph.D.
Title of Doctoral Thesis:	The structure of minor alkaloids of the Amaryllidaceae family as inspiration for the synthesis of compounds with biological activity targeting Alzheimer's disease

The theoretical part of this dissertation provides a basic overview of the Amaryllidaceae family known for its rich occurrence of structurally diverse alkaloids. These substances exhibit a wide range of pharmacological effects, with our studies focusing on their potential therapeutic use in the treatment of Alzheimer's disease (AD). It is the most common form of dementia, which is characterized by progressive neurodegeneration. As the life expectancy of the population increases, the global prevalence of AD is also rising. This trend presents not only economic but also social challenges for healthcare systems, and society as a whole. The thesis provides detailed descriptions of the most well-known hypotheses of AD development and the characteristics of clinically used medications. Attention is given to the decline in levels of acetylcholinesterase, the dominant enzyme in a healthy brain, as well as the gradual increase in levels of the compensatory enzyme butyrylcholinesterase (BChE).

The experimental part of the thesis focuses on researching new potential selective inhibitors of BChE. The study extends the knowledge gained from previous isolation efforts on new alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, with particular focus on the alkaloids named Carltonine A-E. Carltonine A and B demonstrated particularly significant inhibition of human butyrylcholinesterase (*h*BChE) with $IC_{50} = 0.91 \pm 0.02 \mu\text{M}$ and $IC_{50} = 0.031 \pm 0.001 \mu\text{M}$, respectively.

In the follow-up first synthetic series, we identified the most potent inhibitor of *h*BChE, designated as molecule **I-6**, with an $IC_{50} = 0.07 \pm 0.01 \mu\text{M}$. Subsequently, in the second series, two molecules, **II-87**, and **II-88**, exhibited even more significant *h*BChE inhibitory activity, with $IC_{50} = 0.0038 \pm 0.0002 \mu\text{M}$ and $IC_{50} = 0.0057 \pm 0.0015 \mu\text{M}$, respectively. In parallel with the second series, the preparation of the third series was carried out, where compounds **III-28** and **III-33** were identified as the most active derivatives, with IC_{50} values = $0.171 \pm 0.063 \mu\text{M}$ and $IC_{50} = 0.167 \pm 0.018 \mu\text{M}$, respectively.

In this thesis, I discuss the experimental data related to the design, synthesis, and evaluation of the biological activity of the prepared derivatives and analyze in detail the structure-activity relationship (SAR). The most effective compounds were specifically evaluated in terms of their ability to cross the blood-brain barrier, cytotoxicity profile, microsomal and plasma stability, and in a selected case, water solubility. The data obtained were supported by *in silico* studies and a crystallographic study of the most potent molecule **II-87** with *h*BChE. Our research has identified a range of promising compounds with potential use in the treatment of diseases associated with cholinergic dysfunction.

Key words: natural products, drugs, alkaloids, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AAAs	Amaryllidaceae alkaloidy; z angl. Amaryllidaceae alkaloids
acetyl-CoA	acetylkoenzým A
AD	Alzheimerova choroba; z angl. Alzheimer's disease
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibítor acetylcholinesterázy
AICD	intracelulárna doména amyloidného prekursorového proteínu; z angl. amyloid intracellular domain
AMK	aminokyselina
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolpropionová kyselina
ApoE	apolipoproteín E
APP	amyloidový prekursorový proteín
ATP7A	ATPáza prenášajúca meď
A β	amyloid beta
BACE-1	β -sekretáza 1; z angl. beta-site APP cleaving enzyme 1
BBB	hematoencefalická bariéra; z angl. blood-brain barrier
BH ₃ -THF	borán-tetrahydrofurán komplex
BChE	butyrylcholinesteráza
BChEI	inhibítor butyrylcholinesterázy
CAT	kataláza
CCS	chaperón pre superoxid dismutázu medi
CDK5	cyklín-dependentná kináza 5
CNS	centrálny nervový systém
COX	cyklooxygenáza
COX17	chaperón medi pre cytochróm c-oxidázu 17
CTR1	transportér medi 1
DCM	dichlórmétán
DHP	3,4-dihidropyran
DMP	Dess-Martin periodinan
EeAChE	acetylcholinesteráza z elektrického úhora (lat. <i>Electrophorus electricus</i>)
EMA	Európska lieková agentúra; z angl. European Medicines Agency
EqBChE	butyrylcholinesteráza z konského séra (lat. <i>Equus ferus caballus</i>)
FAD	familiárna Alzheimerova choroba
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv; z angl. Food and Drug Administration
Glu	glutamát
GSK-3 β	glykogén syntáza kináza 3 β
HACU	vysokoafinitný cholínový transportér; z angl. high affinity choline uptake
hAChE	ľudská acetylcholinesteráza
hBChE	ľudská butyrylcholinesteráza
HepG2	bunková línia hepatocelulárneho karcinómu
HLM	ľudské pečenevé mikrozómy; z angl. human liver microsomes
CH ₃ CN	acetonitril

ChAT	cholínacetyltransferáza
ChE	cholínesteráza
IAs	izochinolínové alkaloidy; z angl. isoquinoline alkaloids
IgG1	imunoglobulín gamma 1
K ₂ CO ₃	uhličitan draselný
KI	jodid draselný
MAO	monoaminoxidáza
MAP	mikrotubulárny asociačný proteín
MeOH	metanol
N4'OMT	norbelladín 4'- <i>O</i> -metyltransferáza
NaBH ₃ CN	kyanoborohydrid sodný
NaBH ₄	borohydrid sodný
NADH	nikotínamidadenín dinukleotid
NADPH	nikotínamidadenín dinukleotidfosfát
NaH	hydrid sodný
NBS	norbelladín syntáza
NFT	neurofibrilárne kľbká; z angl. neurofibrillary tangles
NMDA	<i>N</i> -metyl-D-aspartát
NMDAR	<i>N</i> -metyl-D-aspartátový receptor
nNOS	neuronálna syntáza oxidu dusnatého
NR	noroxomaritidín reduktáza
OS	oxidačný stres
PAL	fenylalanín amónium-lyáza
PAMPA	paralelný test priepustnosti umelých membrán; z angl. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PDB	proteínová dátová banka; z angl. Protein Data Bank
PDC	pyruvátdehydrogenázový komplex
POP	prolyloligopeptidáza
PPTS	pyridínium <i>p</i> -toluénsulfonát
PSEN	presenilín
PTSA	kyselina <i>p</i> -toluénsulfónová
QSAR	kvantitatívny vzťah medzi štruktúrou a aktivitou; z angl. quantitative structure-activity relationship
RNS	reaktívne formy dusíka; z angl. reactive nitrogen species
ROS	reaktívne formy kyslíka; z angl. reactive oxygen species
RT	teplota miestnosti; z angl. room temperature
SAD	sporadická Alzheimerova choroba
sAPP α/β	solubilná <i>N</i> -terminálna ektodoména APP alfa/beta
SAR	štúdium vzťahu štruktúra-aktivity; z angl. structure-activity relationship
SH-SY5Y	bunková línia ľudského neuroblastómu
SI	index bezpečnosti; z angl. safety index
SOD	superoxid dizmutáza
THF	tetrahydrofurán
TYDC	tyrozín dekarboxyláza
VACHT	vezikulárny acetylcholínový transportér
VpVAN	vanilín syntáza

Obsah

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	9
1 ÚVOD	13
2 TEORETICKÁ ČASŤ	15
2.1 Charakteristika čeľade Amaryllidaceae, tradičná medicína	15
2.2 Sekundárne metabolity čeľade Amaryllidaceae	16
2.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov	16
2.2.2 Norbelladínový štruktúrny typ	19
2.2.3 Narcikachnínový štruktúrny typ	20
2.2.4 Karltonínový štruktúrny typ	21
2.3 Alzheimerova choroba	23
2.3.1 Cholinergná hypotéza	25
2.3.1.1 Úloha BChE v kontexte AD.....	27
2.3.2 Glutamátová hypotéza	28
2.3.3 Amyloidná hypotéza.....	30
2.3.4 Hypotéza hyperfosforylovaného tau proteínu	32
2.3.5 Teória oxidačného stresu	33
2.3.6 Súčasná terapia	35
2.3.7 Potenciál vybraných Amaryllidaceae alkaloidov v terapii Alzheimerovej choroby	37
3 CIELE PRÁCE	41
4 KOMENTÁR K PUBLIKOVANÝM PRÁCAM	42
4.1 Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological activity evaluation, and docking studies	42
4.2 Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids - Design, synthesis, and biological evaluation	47
4.3 Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition	57
4.4 Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease	65
5 ZÁVER.....	68
6 ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ.....	71
6.1 Zoznam publikácií zahrnutých v dizertačnej práci.....	71
6.2 Zoznam publikácií nezahrnutých v dizertačnej práci.....	72

7 PREZENTÁCIA VÝSLEDKOV NA KONFERENCIÁCH	74
7.1 Prednášky.....	74
7.2 Posterové zdelenia.....	75
7.3 Zahraničné stáže	75
8 LITERATÚRA	76
9 ZOZNAM PRÍLOH.....	88

1 ÚVOD

Príroda slúžila po tisícročia ako hlavný zdroj surovín, ktoré pokrývali všetky základné potreby ľudí. Počas rozvoja ľudskej spoločnosti sa starostlivosť o zdravie stala kľúčovou pre prežitie jednotlivcov a spoločnosti. Ľudia sa už od pradávna snažili liečiť choroby pomocou prírodných látok, čo stálo za základom liečby od samotných počiatkov existencie ľudstva. Najstaršie dochované písomné záznamy o užívaní liečivých rastlín pochádzajú zo sumerskej hlinenej dosky nájdennej v Nagpure, ktorá je stará približne 5000 rokov. Tento dochovaný materiál obsahoval dvanásť receptov, ktoré používali takmer 250 druhov rastlín [1, 2].

Významným medzníkom bol prelom 18. a 19. storočia, kedy boli prvýkrát izolované účinné látky z rastlinného materiálu. Lekárnik F. W. A. Sertürner objavil morfín a mekonovú kyselinu, zatiaľ čo profesor chémie J. B. Caventou spolu s lekárnikom J. Pelletierom izolovali strychnín, emetín, kofeín a ďalšie. S postupným nárastom znalostí o zložení, účinkoch a využití prírodných liečiv, ktorá bola súhrnne označovaná ako „*materia medica*“, začal vznikať samostatný vedný odbor nazývaný „farmakognózia“ [3, 4].

Jedna z najvýznamnejších a najrozsiahlejších skupín sekundárnych metabolitov sú alkaloidy. V súčasnej dobe je známych viac ako 27 000 týchto dusíkatých zlúčenín. Všeobecne platí, že vo forme voľnej zásady ide o lipofilné látky, ktoré často nemajú vlastnú farbu ani zápach, avšak existujú výnimky. Vďaka svojej alkalickéj povahe sú schopné vytvárať soli s kyselinami [5].

Čeľaď Amaryllidaceae je významná vďaka svojmu bohatému obsahu množstva štruktúrne špecifických alkaloidov, známych ako Amaryllidaceae alkaloidy (AAs), ktoré sa primárne vyskytujú v tejto čeľadi a patria medzi jednu z najdôležitejších skupín alkaloidov. Prvý dôkaz o liečebnom využití týchto rastlín sa datuje do 4. storočia pred n. l., keď Hippokratés z Kósu odporúčal olejovú emulziu z *Narcissus poeticus* na liečbu nádorov maternice [6]. Pre tento typ sekundárnych metabolitov boli vo viacerých štúdiách popísané rôznorodé farmakologické vlastnosti, vrátane cytotoxických, antibakteriálnych, antivírusových, protizápalových a anticholínesterázových účinkov. Tieto vlastnosti ich robia sľubnými kandidátmi pre terapeutický vývoj a ich využitie v liečbe rôznych chorôb [7, 8]. Najznámejším zástupcom AAs je bezpochyby galantamín. Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) ho v roku 2001 schválil na liečbu miernych až stredne ťažkých štádií AD

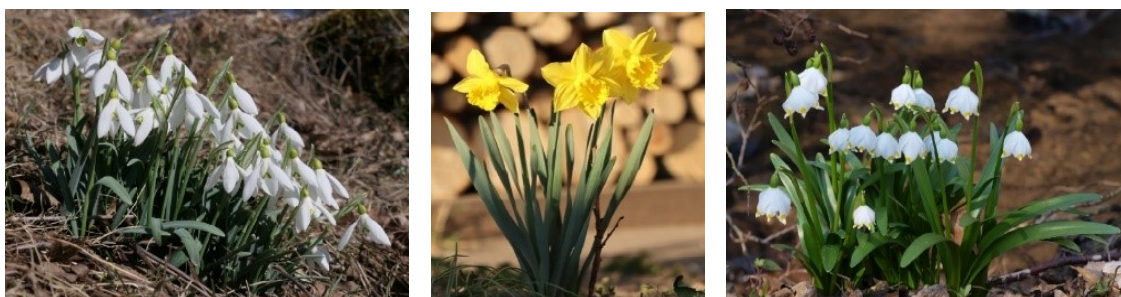
ako prírodný selektívny inhibítor acetylcholinesterázy (AChE, EC 3.1.1.7) [9]. AD prvýkrát popísal nemecký lekár Alois Alzheimer v roku 1907. V tom čase sa považovala za chorobu veľmi vzácnu. V súčasnosti žije po celom svete viac ako 55 miliónov ľudí s demenciou, pričom 60-70 % prípadov tvorí AD. Predpokladá sa, že v roku 2050 dosiahne počet trpiacich AD takmer 153 miliónov prípadov. Pri prevedení odhadov na úroveň Českej republiky je súčasný počet zasiahnutých ľudí 150-tisíc a do roku 2050 je očakávané zdvojnásobenie [10-12]. AD je klasifikovaná ako chronické a postupujúce ochorenie mozgu s neznámou etiológiou. U jedincov s diagnózou AD dochádza k poklesu pamäťových funkcií vrátane spomienok, poznávania, porozumenia, učenia, jazykových schopností a vnímania priestoru a času. Asymptomatická fáza ochorenia zvyčajne začína približne 20 až 30 rokov pred objavením sa prvých príznakov, pričom smrť obvykle nastáva do 3 až 8 rokov od prvotných symptómov [13].

V poslednej dobe sa stretávame s názormi, že farmakognózia je v dnešnom farmaceutickom prostredí zastaraná, pričom liečivé rastliny strácajú svoj význam v súvislosti s pokrokom v syntetickej chémii, ktorá dominuje pri vývoji nových liečiv. Na druhej strane je nepopierateľné, že prírodné produkty predstavujú bohatý zdroj pre objavovanie liečiv, buď v ich prirodzenej forme, alebo ako polosyntetické/syntetické varianty. Možnosti využitia týchto látok sú takmer nekonečné [14]. Predložená dizertačná práca je inšpirovaná detailnou fytochemickou štúdiou z cibúľ *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, v rámci ktorej boli identifikované nové alkaloidy s doteraz nepopísaným štruktúrnym typom alkaloidov. Izolované látky v minoritných množstvách slúžili ako predloha pre prípravu knižnice analóg s možnosťou objasnenia SAR a realizáciou biologických testov súvisiacich s AD.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Charakteristika čeľade Amaryllidaceae, tradičná medicína

Rastliny patriace do čeľade Amaryllidaceae sa vyznačujú tým, že sú viacročné, patria medzi jednoklíčnolistové krytosemenné rastliny a majú podzemnú cibuľu alebo oddenok. Tieto vlastnosti im umožňujú prežívať v rozmanitých podmienkach, vrátane období sucha. Zahŕňajú približne 82 rodov a viac ako 1600 rastlinných druhov [15] rozšírených po celom svete, dominantných predovšetkým v tropických a subtropických oblastiach, vrátane Andskej Južnej Ameriky, Stredomoria a južnej Afriky. Najmä južná Afrika je významným miestom diverzity týchto rastlín, kde sa nachádza viac ako 300 pôvodných rastlinných taxónov. Táto rozmanitosť odráža schopnosť čeľade prispôbiť sa širokej škále podmienok prostredia [16]. V strednej Európe, vrátane Českej republiky, sa prirodzene vyskytujú zástupcovia troch rodov: *Galanthus*, *Leucojum* a *Narcissus* (Obr. 1), pričom bleduľa jarná (*L. vernum*) a snežienka jarná (*G. nivalis*) sú považované za ohrozené druhy chránené zákonom [17]. Rastliny tejto čeľade sú oceňované nielen pre svoj ekologický, ale zároveň dekoratívny význam, zahŕňajúc rody ako *Clivia*, *Nerine*, *Crinum*, *Ammocharis* a ďalšie, ktoré sú pestované po celom svete pre svoje atraktívne kvety, pričom bohatá rozmanitosť prirodzených i kultivovaných odrôd obohacuje záhrady a krajinu [18].



Obr. 1. *Galanthus nivalis*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Leucojum vernum* [19-21].

Tradičné používanie rastlín čeľade Amaryllidaceae siaha až do staroveku, pričom Hippokrates, „otec medicíny“, odporúčal pesar z oleja *Narcissus poeticus* na liečbu nádorov maternice v 4. storočí pred n. l. Plínius Starší, rovnako ako biblické zmienky z prvého storočia n. l., ďalej podčiarkujú liečivé vlastnosti rodu *Narcissus* a jeho historický význam použitia proti rakovine. [6]. Ďalšou významnou rastlinou tejto čeľade je *Boophone disticha*, ktorá má v južnej Afrike dlhoročnú tradíciu používania. Tá je odrazom jej dôležitosti

v tradíciách kmeňov Khoi-San a širokého využitia v tradičnej medicíne etnických skupín vrátane Sotho, Xhosa a Zulu. Tieto rastliny sa využívali na liečbu širokej škály ochorení, ako napríklad močové a pohlavné choroby, bolesti hlavy, horúčky a neurologické poruchy, opuchy a ochorenia kĺbov, kožné, dýchacie a tráviace ťažkosti [22]. Etnobotanické využitie rastlín čeľade prekračuje hranice Afriky. Rody ako *Crinum*, *Haemanthus* a *Zephyranthes*, známe pre svoju účinnosť proti infekčným ochoreniam, nachádzajú tradičné uplatnenie v desiatkach krajín po celom svete. To poukazuje na ich rozsiahle zastúpenie v ľudovej medicíne a zdôrazňuje ich globálny význam pri liečbe rôznych zdravotných stavov [23].

2.2 Sekundárne metabolity čeľade Amaryllidaceae

Jednou z charakteristických vlastností čeľade je schopnosť produkovať bohatú škálu štruktúrne jedinečných sekundárnych metabolitov označovaných ako AAs. Hoci sú tieto metabolity štruktúrne špecifické, na základe biosyntetického pôvodu sú radené do skupiny izochinolínových alkaloidov (IAs). K dnešnému dňu bolo identifikovaných viac ako 600 týchto zlúčenín, čím je táto čeľaď radená medzi dvadsať alkaloidne najvýznamnejších. Prvou izolovanou látkou z tejto skupiny bol v roku 1877 lykorín, ktorý znamenal významný míľnik v štúdiu rastlinných alkaloidov. Všeobecne sú tieto látky rozmiestnené v celej rastline, avšak najvyššie koncentrácie dosahujú v podzemných orgánoch. Hoci prítomnosť týchto zlúčenín nie je rozhodujúca pre rast rastliny, zdá sa, že zohrávajú dôležitú úlohu predovšetkým pri jej obrane. Napriek rozsiahlym poznatkom o ich farmakologických účinkoch je ich ekologická úloha menej známa [24-27].

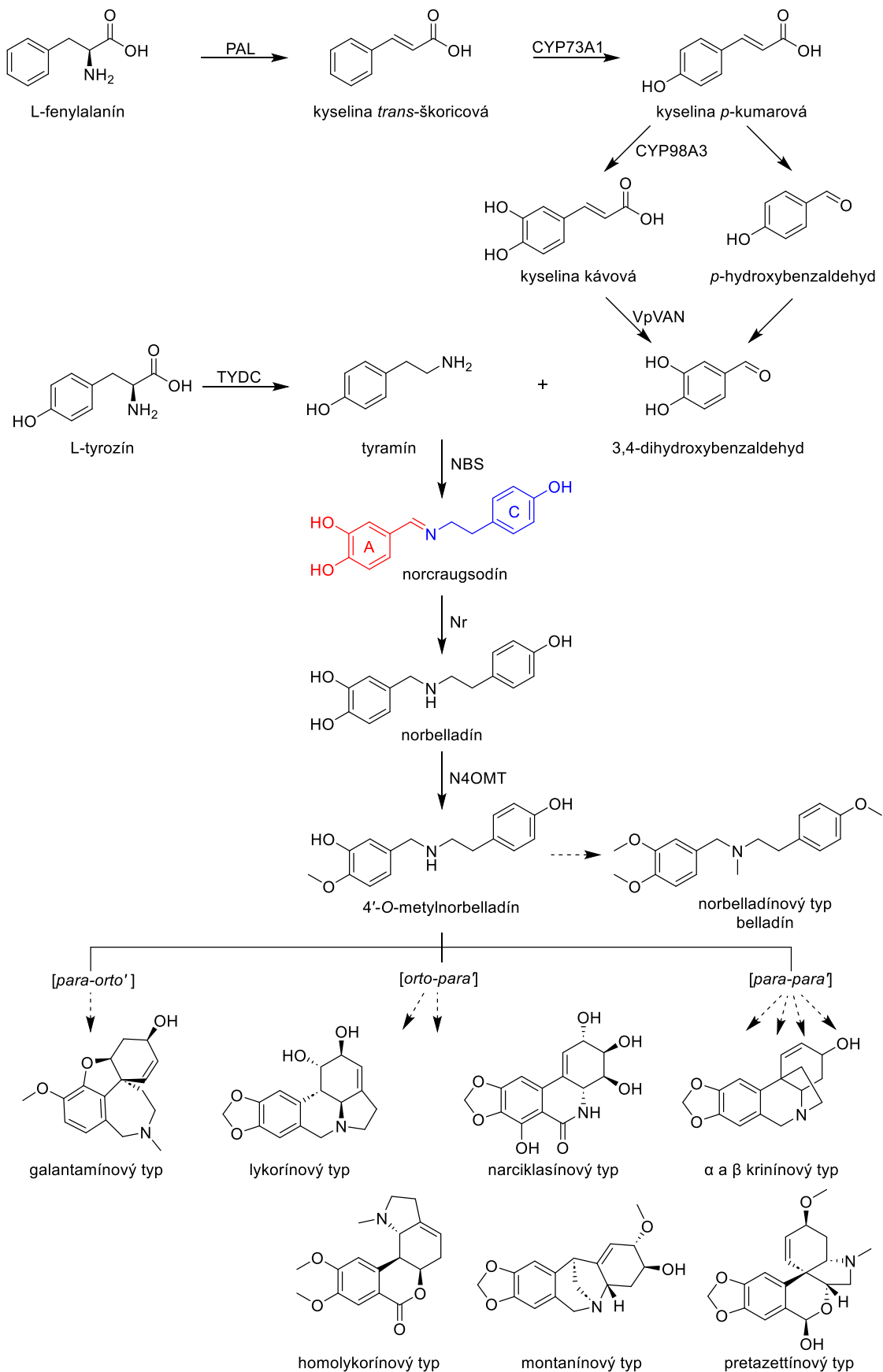
2.2.1 Biosyntéza Amaryllidaceae alkaloidov

Základný mechanizmus biosyntézy v čeľadi Amaryllidaceae zahŕňa použitie dvoch špecifických aromatických aminokyselín (AMK) L-fenylalanínu a L-tyrozínu, ktoré sú odvodené z procesu biosyntézy šikimátu [28]. Rádioaktívne značenie ukázalo, že skúmané zlúčeniny zdieľajú biosyntetickú cestu cez kľúčový medziprodukt norbelladín, čo viedlo k pomenovaniu tejto cesty ako norbelladínová. L-Fenylalanín je prekurzor pre C₆-C₁ fragment tvoriaci kruh A a predstavuje benzylovú časť molekuly norbelladínu (Obr. 2). L-Tyrozín je prekurzorom dusíka, dvojuhlíkového linkeru a kruhu C. V počiatočných štádiách enzým fenylalanín amónium-lyáza (PAL) katalyzuje elimináciu amoniaku

z L-fenylalanínu za vzniku kyseliny *trans*-škoricovej. Kyselina škoricová je enzymaticky transformovaná *trans*-cinnamát monooxygenázou (CYP73A1) na kyselinu *p*-kumarovú. Následne, v závislosti od špecifickej aktivity kumarát 3-hydroxylázy (CYP98A3), je z kyseliny *p*-kumarovej tvorený *p*-hydroxybenzaldehyd, alebo kyselina kávová. Z oboch zmienovaných zlúčenín následne vzniká 3,4-dihydroxybenzaldehyd (3,4-DHBA), pričom kyselina kávová je transformovaná pôsobením vanilín syntázy (VpVAN). Na druhej strane, enzýmom zodpovedným za biosyntézu tyramínu je tyrozín dekarboxyláza (TYDC), ktorá predstavuje kľúčový regulačný enzým v mnohých rastlinách produkujúcich alkaloidy. Kondenzácia tyramínu a 3,4-DHBA vedie k tvorbe norbelladínu, katalyzovanej norbelladín syntázou (NBS) a/alebo noroxomaritidín reduktázou (NR), prípadne ich kombináciou. Norbelladín slúži ako základný prekursor pre všetky AAs. Jeho ďalšie spracovanie zahŕňa metyláciu pomocou norbelladín 4'-*O*-metyltransferázy (N4'OMT), za vzniku 4'-*O*-metylnorbelladínu [29-32].

Cyklizácia 4'-*O*-metylnorbelladínu je kľúčovým procesom pri syntéze rôznych štrukturálnych typov AAs, pri ktorej zohráva kľúčovú úlohu enzým CYP96T1. Tento mechanizmus zahŕňa regioselektívny oxidatívny fenol-fenol coupling, ktorý môže prebiehať tromi možnými spôsobmi: *para-orto'*, *orto-para'*, *para-para'*. Táto rôznorodosť tvorby väzieb umožňuje vznik mnohých štrukturálne odlišných typov alkaloidov. Podľa typu intramolekulárnej cyklizácie býva v literatúre uvedených 9 základných typov (Obr. 2). Do tejto skupiny je možné zaradiť približne 80 % doposiaľ známych AAs pomenovaných podľa svojho hlavného zástupcu. Tie následne poskytujú základ pre generovanie minoritných štruktúrnych typov [24, 33]. Doplnujúcich 20 % tvoria špecifické typy alkaloidov, ako sú napríklad plikaminový, galasinový, galantindolový, buflavinový a mnohé ďalšie. Tieto typy obsahujú jeden alebo niekoľko málo alkaloidov, ktoré sú zvyčajne prítomné vo veľmi nízkych koncentráciách. Je potrebné podotknúť, že mechanizmy vzniku minoritných variantov neboli doposiaľ explicitne objasnené [34].

V nasledujúcej časti textu bude podrobnejšie komentovaná problematika troch štruktúrnych typov AAs, ktoré sú relevantné pre experimentálnu časť tejto práce. Detailnejšie informácie o ďalších štruktúrnych typoch týchto alkaloidov možno nájsť v predchádzajúcich kvalifikačných prácach a odbornej literatúre [34-36].



Obr. 2. Navrhovaná biosyntetická cesta základných štruktúrnych typov AAs: znázornenie jednostupňových a viacstupňových reakcií pomocou plných a prerušovaných šípok [30-34].

2.2.2 Norbelladínový štruktúrny typ

Norbelladín, ako eponym diskutovaného štruktúrneho typu, stojí na začiatku vlastnej biosyntézy. Z klasifikačného hľadiska nejde o pravý alkaloid, ale protoalkaloid, terciárny amín, ktorého dusík nie je súčasťou heterocyklu [37]. Tento štruktúrny typ zahŕňa celkovo 13 zlúčenín (Tab. 1) [34] s 15-uhlíkovým skeletom izolovaných predovšetkým z rodov *Nerine*, *Crinum*, *Panocratium* a ázijského rodu *Lycoris* [38-42]. Jedenásť zlúčenín vykazuje vysokú mieru štruktúrnej podobnosti, pričom ich rozdiely sa vo väčšine prípadov obmedzujú na polohu a množstvo metylových skupín. Ďalšie dva alkaloidy, kraugsodín a *izo*-kraugsodín, sú príkladmi Schiffových zásad, ktoré boli izolované z niekoľkých druhov rodu *Crinum* [43]. Táto izolácia potvrdzuje prirodzenú prítomnosť tohoto typu látok v prírode a zároveň podporuje správnosť teórie o biosyntetickej ceste AAs [34].

Biologická aktivita alkaloidov tohto štruktúrneho typu bola v porovnaní s inými zástupcami rovnakej čeľade preskúmaná len okrajovo. Samotnému testovaniu obvykle predchádza syntetická príprava norbelladínu, ktorá je motivovaná jeho prirodzenou nízkou koncentráciou v rastlinnom materiáli. V rámci štúdia biologických účinkov norbelladínu bola preukázaná schopnosť vychytávať voľné radikály, inhibovať enzýmy cyklooxygenázy (COX) COX-1 a COX-2 a potláčať aktiváciu nukleárneho faktoru kappu B, ktoré sú spojené s oxidatívnym stresom a zápalovou reakciou [44].

Tabuľka 1. Prehľad alkaloidov norbelladínového typu [34].

Názov	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
norbelladín	H	H	H	H	H	H
4'-O-metylnorbelladín	H	H	H	H	H	Me
latisodín	H	H	H	H	Me	Me
4-O-demetylbelladín	H	H	H	Me	Me	Me
O,N-dimetylnorbelladín	H	H	H	Me	H	Me
βR-hydroxy-O,N-dimetylnorbelladín	H	H	OH	Me	H	Me
belladín	Me	H	H	Me	Me	Me
N-demetylbelladín	Me	H	H	H	Me	Me
3'-O-demetylbelladín	Me	H	H	Me	H	Me
ryllistín	Me	OMe	H	H	Me	Me
latisolín	Glc	H	H	H	Me	Me

kraugsodín

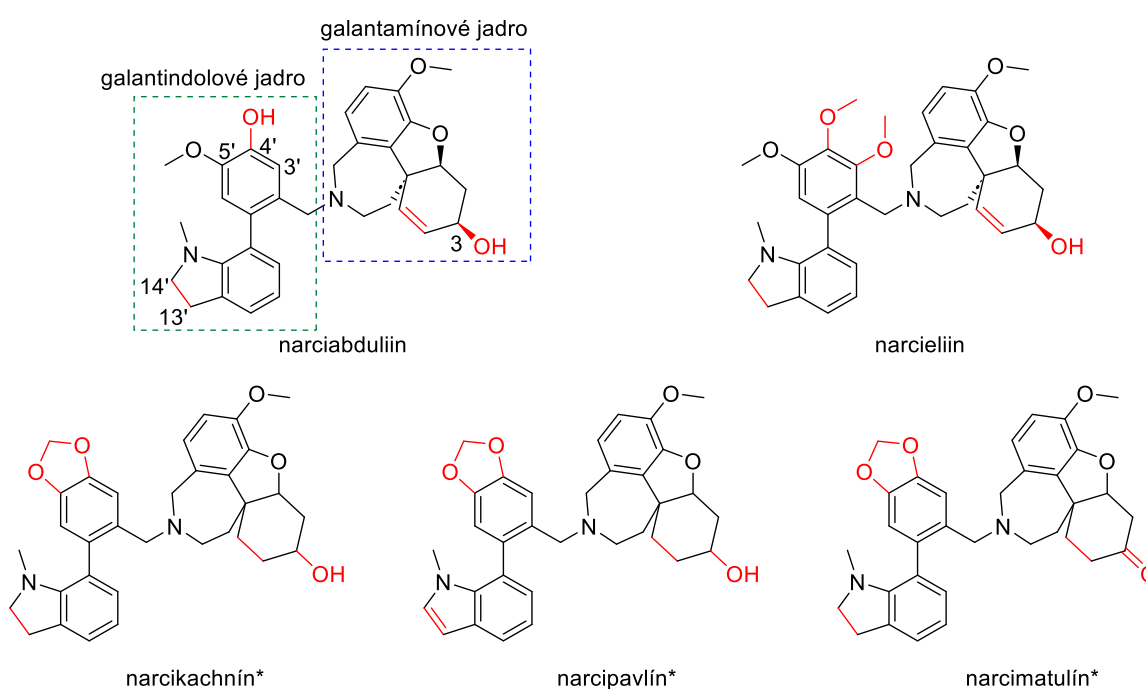
izo-kraugsodín

2.2.3 Narcikachnínový štruktúrny typ

V posledných rokoch bol na našom výskumnom pracovisku dosiahnutý významný pokrok v izolácii a identifikácii nových štruktúrnych typov AAs, konkrétne heterodimérneho narcikachnínového typu. Tieto alkaloidy izolované z rôznych druhov rodu *Narcissus* predstavujú zlúčeniny, ktoré v sebe kombinujú štruktúrne detaily galantamínového a galantindolového typu, čím ďalej rozširujú skupinu dimérnych AAs (Obr.3).

Tento nový typ alkaloidov bol po prvýkrát izolovaný z *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol a pomenovaný narcikachnín a narcipavlín [45]. Nasledovala izolácia narcimatulínu z *N. pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master [46]. Kvôli limitovanému množstvu izolovaných zlúčenín zatiaľ nebolo možné určiť ich absolútnu konfiguráciu. V rámci následných fytochemických štúdií bol zo *Zephyranthes citrina* izolovaný narcieliin [47] a z *N. pseudonarcissus* cv. Carlton narciabduliin [48]. Vďaka dostatočnému izolovanému

množstvu a pokročilým technikám, ako 2D-NMR a cirkulárny dichroizmus, bolo možné presné určenie ich absolútnej konfigurácie. Štruktúrne odlišnosti medzi diskutovanými alkaloidmi sú spôsobené predovšetkým štyrmi faktormi: typom substitúcie na benzénovom kruhu galantindolovej časti molekuly, úrovňou nasýtenia indolového kruhu, (ne)prítomnosťou dvojitej väzby v cyklohexánovom kruhu substituovanom hydroxylovou alebo keto skupinou [45-48]. Štyri z týchto nových alkaloidov boli podrobené biologickému testovaniu, pričom táto problematika bude podrobnejšie popísaná v kapitole „3.3.7 Potenciál vybraných Amaryllidaceae alkaloidov v terapii Alzheimerovej choroby“.

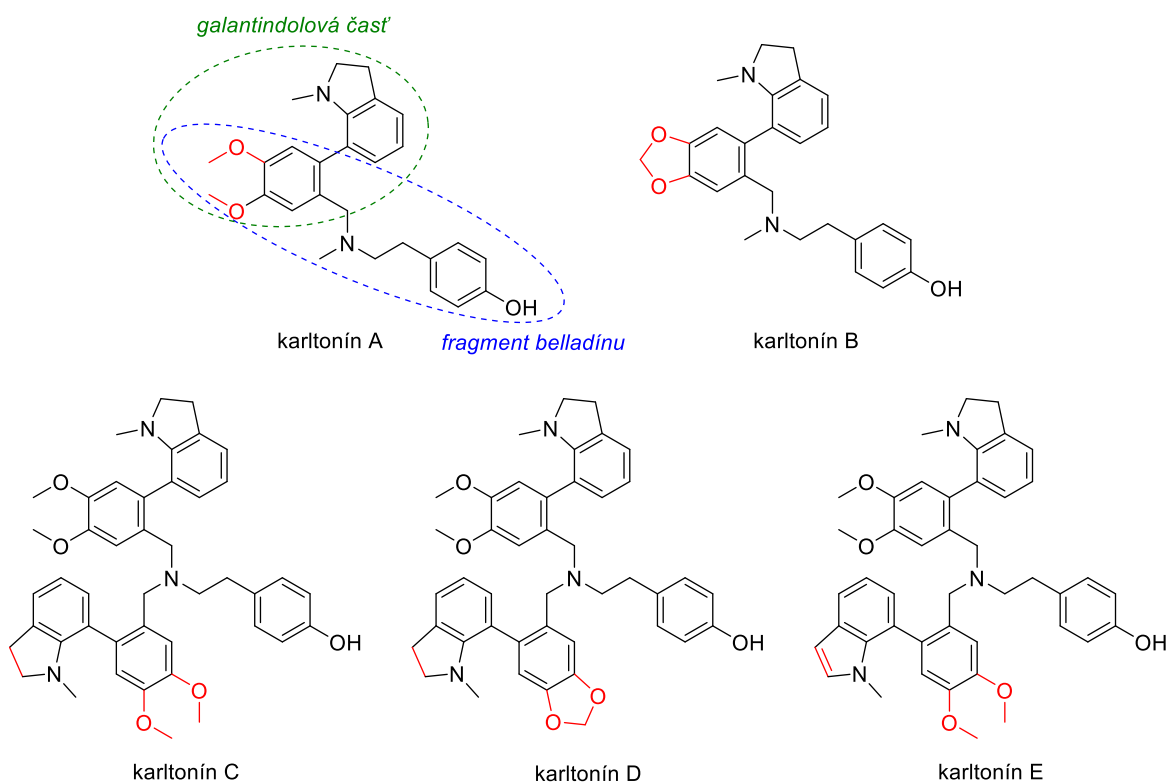


Obr. 3. Zástupcovia narcikachnínového štruktúrneho typu so zvýraznenými rozdielmi v štruktúre; * absolútna konfigurácia nebola doposiaľ objasnená.

2.2.4 Karltonínový štruktúrny typ

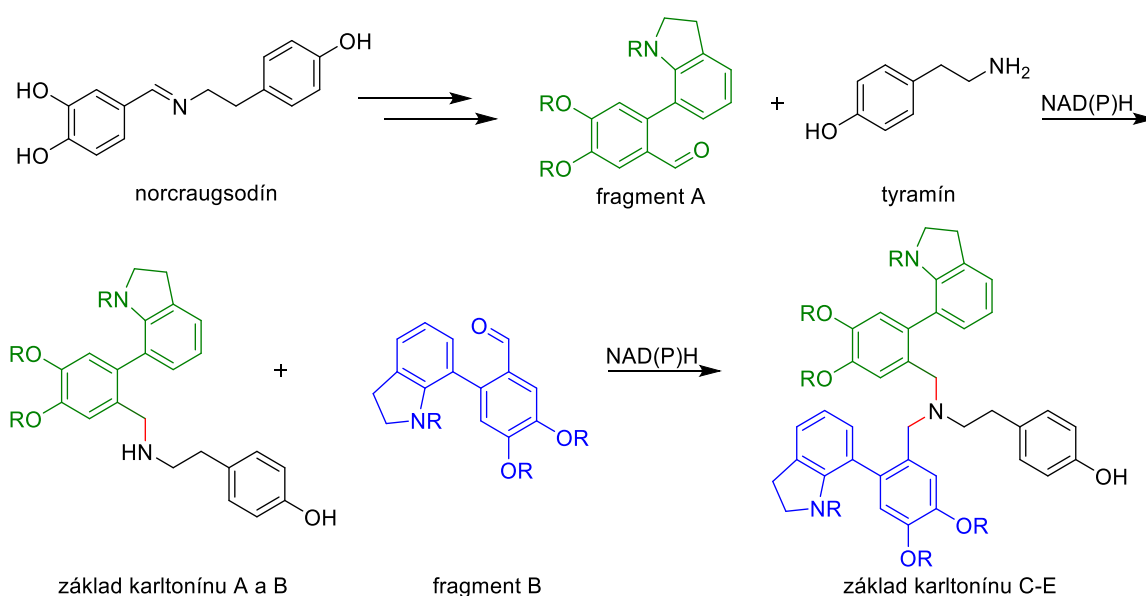
V rámci podrobnej fytochemickej štúdie boli popísané unikátne alkaloidy izolované z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, pomenované karltonín A-C (Obr. 4) [49]. V rámci nadväzujúcich experimentov boli izolovaní ďalší dvaja zástupcovia, karltonín D a E (Obr. 4), ktorí predstavujú deriváty karltonínu C [50]. Pôvodne boli tieto alkaloidy nesprávne klasifikované do belladínového štruktúrneho typu, ktorý je charakterizovaný prítomnosťou *N*-benzyl-2-fenyletylamínového jadra. Následne boli preklasifikované do nového a samostatného karltonínového typu, ktorý biosynteticky interferuje s narcikachnínovým.

Ide o malú skupinu piatich alkaloidov, ktoré vo svojej štruktúre kombinujú dve časti, belladinovú a galantindolovú. Charakteristickým štruktúrnym rysom týchto alkaloidov je prítomnosť dvoch dusíkových atómov v prípade karltonínu A a B a troch v prípade karltonínov C-E. Podobne ako alkaloidy narcikachínového typu, aj tieto látky sú prítomné v rastlinnom materiáli len v nízkych až stopových koncentráciách. Konkrétne z 30 kg čerstvých cibúľ *N. pseudonarcissus* cv. Carlton bolo získaných 70 mg karltonínu A, 6 mg karltonínu B a 7 mg karltonínu C [49]. V kontexte potenciálneho využitia v terapii AD, boli tieto nové alkaloidy preskúvané z hľadiska ich inhibičného účinku voči obojom ľudským cholínesterázam (ChE). Táto problematika bude podrobnejšie popísaná v kapitole „3.3.7 Potenciál vybraných Amaryllidaceae alkaloidov v terapii Alzheimerovej choroby“.



Obr. 4. Zástupcovia karltonínového štruktúrneho typu so zvýraznenými rozdielmi v štruktúre.

Predpokladaná biosyntetická cesta týchto nových alkaloidov je odvodená z krokov popísaných v biosyntetickej schéme (Obr. 2). Kondenzáciou vznikutá Schiffová báza je modifikovaná v sérii redoxných reakcií, metylácií a C-C couplingu za vzniku galantindolového jadra pre fragment A a B (Obr. 5). V procese je aktivovaný benzylový uhlík, prednostne vo forme aldehydu, atakovaný tyramínom za vzniku imínu. V prítomnosti NADH alebo NADPH katalýzy dochádza k redukcii imínu na sekundárny amín, ktorý tvorí základ pre karltoníny A a B. Tento sekundárny amín má potenciál pre ďalšiu alkyláciu s využitím fragmentu B. Následný prenos vodíka z redoxného systému na enamín generuje nesymetrický terciárny amín, základ pre karltoníny C-E [50].



Obr. 5. Predpokladaná biosyntetická cesta karltonínov [50].

2.3 Alzheimerova choroba

V roku 1906 predstavil Alois Alzheimer v nemeckom Tübingene prípad, ktorý definoval chorobu, ktorá dnes nesie jeho meno. Jeho správa o Auguste Deterovej poskytla podrobný popis klinických a neuropatologických charakteristík vrátane straty pamäti, dezorientácie a jedinečných mozgových lézií, ktoré starostlivo porovnával s pozorovanými psychiatrickými príznakmi. Napriek počiatočnému nedostatočnému uznaniu táto správa položila základy chápania AD ako osobitného neurodegeneratívneho ochorenia a zásadne posunula náš prístup k demencii [51, 52]. Po viac ako storočí od prvého popisu AD

sa výskum patofyziologických pochodov tohto ochorenia výrazne posunul. Avšak aj napriek obrovskému úsiliu zostáva presná etiológia ochorenia neznáma [53, 54].

AD sa prejavuje ako progresívne degeneratívne ochorenie mozgu, ktorého preklinická fáza môže začínať už 20 až 30 rokov pred výskytom prvých viditeľných príznakov [55, 56]. Prvými pozorovanými zmenami sú často malé odlišnosti v správaní a ťažkosti s krátkodobou pamäťou, ktoré postupne sprevádzajú problémy s učením a rozhodovaním. Postihnutie sa prejavuje aj zmenami v ovládaní emócií a primeranosti reakcií. S postupujúcim ochorením sa príznaky rozširujú na stratu pamäti, orientácie, komunikačných schopností a nakoniec na stratu sebaidentifikácie a rozpoznávania blízkych. Medzi najčastejšie nekognitívne behaviorálne zmeny patrí depresia, agresivita, apatia, úzkosť, psychóza, blúdenie a poruchy cirkadiálneho rytmu. V poslednom štádiu je pacient úplne odkázaný na starostlivosť iných, pričom dochádza k výraznému poklesu telesných a duševných schopností, čo zahŕňa aj stratu kontroly nad základnými životnými funkciami [57-59].

V patofyziologických procesoch je kľúčový význam pripisovaný najmä prítomnosti aberantných proteínov, ako sú amyloid beta (A β) a tau proteín a nerovnováhe v hladinách niektorých neurotransmitterov. Okrem toho nedostatočná kapacita antioxidantného systému vedie k oxidačnému poškodeniu buniek, ktoré spolu so zápalovými reakciami a nekontrolovaným tokom niektorých iónov predstavujú ďalšie faktory podieľajúce sa na patologických zmenách [60, 61].

AD sa delí na dve základné formy: familiárnu AD (FAD) a sporadickú AD (SAD). FAD, ktorá predstavuje menej ako 5–10 % všetkých prípadov, sa zvyčajne prejavuje pred 65. rokom života a je priamo spojená s mutáciami v špecifických génoch. Naproti tomu SAD, forma s neskorým nástupom, predstavuje 90–95 % prípadov AD, je pozorovaná predovšetkým u osôb vo veku 65 rokov a starších a vzniká kombináciou genetických predispozícií a vplyvov prostredia [62]. Najväčšími rizikovými faktormi neskorého nástupu sú vek, genetická informácia pre alelu ϵ 4 apolipoproteínu E a výskyt ochorenia v rodine [63]. Zvýšenému riziku sú vystavení najmä ľudia vo veku 65 rokov a starší, pričom odhadovaná prevalencia v Európe je približne 4,4 %. Táto prevalencia sa dramaticky zvyšuje u ľudí nad 85 rokov, u ktorých sa za rizikovú považuje takmer tretina tejto demografickej skupiny [64]. Hlavný genetický rizikový faktor, apolipoproteín E (ApoE), je fyziologicky zodpovedný za lipidovú homeostázu tým, že sa podieľa na redistribúcii a metabolizme

lipidov, predovšetkým triglyceridov, cholesterolu a fosfolipidov. Ľudský gén pre ApoE obsahuje tri alely, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, ktoré kódujú tri izoformy – ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Z hľadiska rizika AD je ApoE2 považovaný za protektívny, ApoE3 za neutrálny, a ApoE4 za škodlivý. Riziko AD a priemerný vek pri nástupe klinického ochorenia je 91 % a 68 rokov u homozygotov $\epsilon 4$, 47 % a 76 rokov u heterozygotov $\epsilon 4$, a 20 % a 84 rokov u nenosičov $\epsilon 4$. ApoE4 významne urýchľuje akumuláciu A β do senilných plakov a je spojená so zvýšeným rizikom hyperlipidémie a hypercholesterolémie [65, 66]. Do mozaiky významných genetických faktorov, ktoré prispievajú k rozvoju ochorenia, patrí mutácia v géne pre amyloidový prekursorový proteín (APP), ktorý je lokalizovaný na chromozóme 21. Ďalej, mutácie v génoch lokalizovaných na chromozómoch 14 a 1 sú spojené s génmi pre presenilín 1 a presenilín 2 (PSEN1 a PSEN2). Všetky tieto zložky zohrávajú kľúčovú úlohu v teórii amyloidnej kaskády [67].

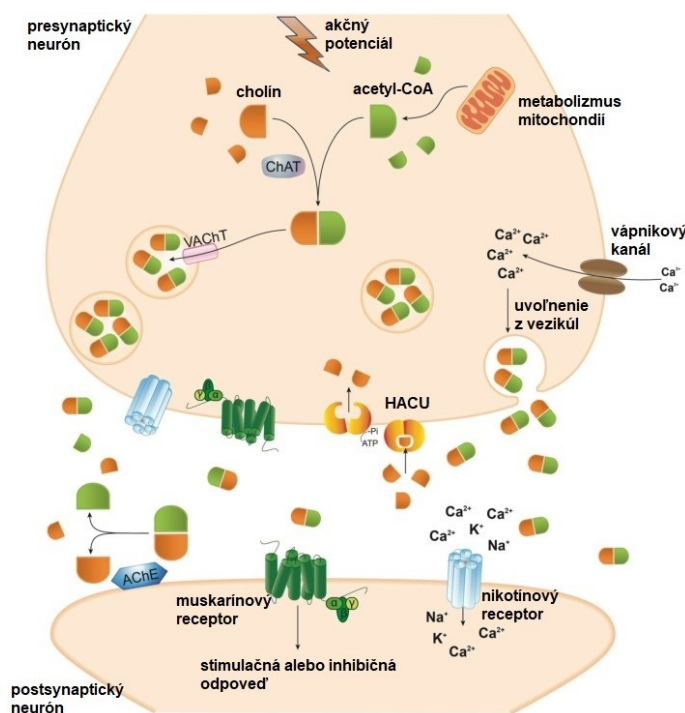
Hoci genetickým rizikovým faktorom nie je možné predchádzať, správa Lancet komisie z roku 2020 ukazuje, že intervenciou v oblasti modifikovateľných rizikových faktorov je možné oddialiť až 40 % prípadov demencie. Zdravie mozgu je neoddeliteľne spojené so stavom srdcovo-cievneho systému. Napriek tomu, že mozog tvorí len 2 % telesnej hmotnosti, využíva až 20 % všetkého kyslíka a energie. Faktory ako hypertenzia, diabetes mellitus, hypercholesterolémia a obezita, ktoré sú často dôsledkom nevhodných stravovacích návykov, spolu s nadmernou konzumáciou alkoholu a tabakových výrobkov, významne zvyšujú riziko týchto stavov. Na základe týchto informácií je dôležité zdôrazniť, že riziko vzniku AD je možné redukovať prostredníctvom správnej výživy, dostatočného príjmu antioxidantov, udržiavania pravidelnej fyzickej aktivity a podpory vzdelávacích iniciatív [68].

2.3.1 Cholinergná hypotéza

Formovanie cholinergnej teórie AD sa datuje do začiatku 70. rokov 20. storočia, kedy séria fundamentálnych štúdií ustanovila spojenie medzi kľúčovým neurotransmitterom acetylcholínom (ACh) a kognitívnymi procesmi spojenými s pamäťou. Základná premisa tejto teórie vzišla z pozorovaní účinkov skopolamínu, anticholinergika, ktorý má za následok zhoršenie pamäťových schopností, čím inšpirovala výskumníkov k formulácii hypotézy o zásadnej úlohe cholinergnej neurotransmisie vo funkciách pamäti. Počiatočné experimenty realizované Pazzaglim a Pepeu na hlodavcoch naznačili kauzálny vzťah medzi

amnéziou vyvolanou skopolamínom a koncentráciou acetylcholínu v mozgu, čo neskôr potvrdili a rozšírili štúdie na primátoch [69]. ACh je kľúčovým neurotransmitterom nevyhnutným pre fungovanie a udržiavanie integrity periférneho a centrálného nervového systému (CNS). Jeho význam sa odráža v širokej prítomnosti a aktivite v rozsiahlych oblastiach mozgu. Cholinergný systém je esenciálny pre mnohé kognitívne procesy vrátane pamäte, učenia a regulácie pozornosti, ako aj pre fyziológiu spánku a adaptívne reakcie na stres [70, 71].

Biosyntéza ACh je séria biochemických reakcií, ktorá začína tvorbou acetylkoenzýmu A (acetyl-CoA) z pyruvátu prostredníctvom pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDC) v mitochondriách. Druhým dôležitým enzýmom je cholinacetyltransferáza (ChAT, EC 2.3.1.6), ktorá prenáša acetylovú skupinu z acetyl-CoA na cholín za tvorby ACh (Obr. 6). Ten je následne uložený do zásobných vezikúl prostredníctvom vezikulárneho acetylcholínového transportéru (VACHT). Po stimulácii akčným potenciálom, presynaptický neurón uvoľní ACh do synaptickej štrbiny, kde dochádza k jeho naviazaniu na cholinergné receptory (muskarínové a nikotínové). Rozklad ACh v synapsii na cholín a kyselinu octovú zabezpečuje AChE a BChE (BChE, EC 3.1.1.8). Spätne vychytávanie tzv. reuptake cholínu do presynaptického neurónu zaisťuje vysokoafinitný cholínový transportér (HACU) [72-75].



Obr. 6. Syntéza a uvoľnenie ACh z cholinergného neurónu. Prevzaté a modifikované z ref. [75].

U AD je porucha cholinergnej kaskády pozorovaná na viacerých úrovniach. Znížené aktivity PDC a ChAT môžu byť doplnené o pokles spätného vychytávania cholínu. Defekt cholinergnej transmisie môže byť spôsobený taktiež zníženým príjmom signálu, respektíve jeho amplifikáciou. V prípade muskarínových receptorov je patologická funkcia daná zníženým prenosom signálu, v prípade nikotínových je pozorovaný ich znížený počet. Deficit produkcie ACh je taktiež spojený s významným poklesom samotných cholinergných neurónov, pričom najviac zasiahnutou oblasťou je *nucleus basalis Meynertii* v bazálnom prednom mozgu [76, 77]. AChE, serínová hydroláza, zabezpečuje rýchlu termináciu signálov v synapsiách rozkladom ACh. Inhibícia AChE znižuje hydrolytickú degradáciu ACh, čo vedie k jeho akumulácii v synaptickej štrbine a potenciácii cholinergnej signalizácie [78]. Podrobnejšia diskusia o inhibítoroch AChE (AChEI) bude popísaná v kapitole „3.3.6 Súčasná terapia“.

2.3.1.1 Úloha BChE v kontexte AD

AChE a BChE vykazujú značnú štruktúrnu homológiu, pričom ich AMK sekvencie sú zo 65 % identické [79]. Oba enzýmy majú aktívne miesta zložené zo zvyškov katalytickej triády (Ser-His-Glu), cholínovej a acylovej väzbovej kapsy, lokalizované na dne ~ 20 Å hlbokéj úžiny [80]. Hlavný rozdiel na molekulárnej úrovni spočíva v acyl-viažúcej kapse, domény lokalizovanej vo vnútri úžiny. Táto doména zohráva kľúčovú úlohu pri umiestňovaní acylovej časti substrátov v procese hydrolýzy. Objem aktívneho miesta BChE je objemnejší v porovnaní s aktívnym miestom AChE (500 Å³ oproti 300 Å³) [81]. Zatiaľ čo úžinu AChE charakterizuje úzka a hlboká konformácia, v prípade BChE sa vyznačuje miskovitým tvarom. Dôležitým aspektom štruktúry BChE je o 40 % nižší počet aromatických zbytkov AMK, ktoré sú nahradené menšími alifatickými [82]. Táto substitúcia znižuje substrátovú špecifickosť BChE a rozširuje jej schopnosť interagovať s rôznorodými ligandmi a substrátmi. Okrem výlučnej hydrolýzy esterov cholínu sa BChE podieľa na metabolizácii esterov, ako sú sukcinylcholín, kokaín, heroín alebo aspirín [83].

V mozgu zdravých ľudí je AChE zodpovedná za 80 % cholínesterázovej aktivity, zatiaľ čo BChE za dopĺňujúcich 20 % [84]. S progresiou AD dochádza k markantnému poklesu mozgovej hladiny AChE o viac ako 90 %. Naopak, hladina BChE sa progresívne zvyšuje až na 120–165 % prirodzených hladín. Z tohto pohľadu sa predpokladá, že BChE plní

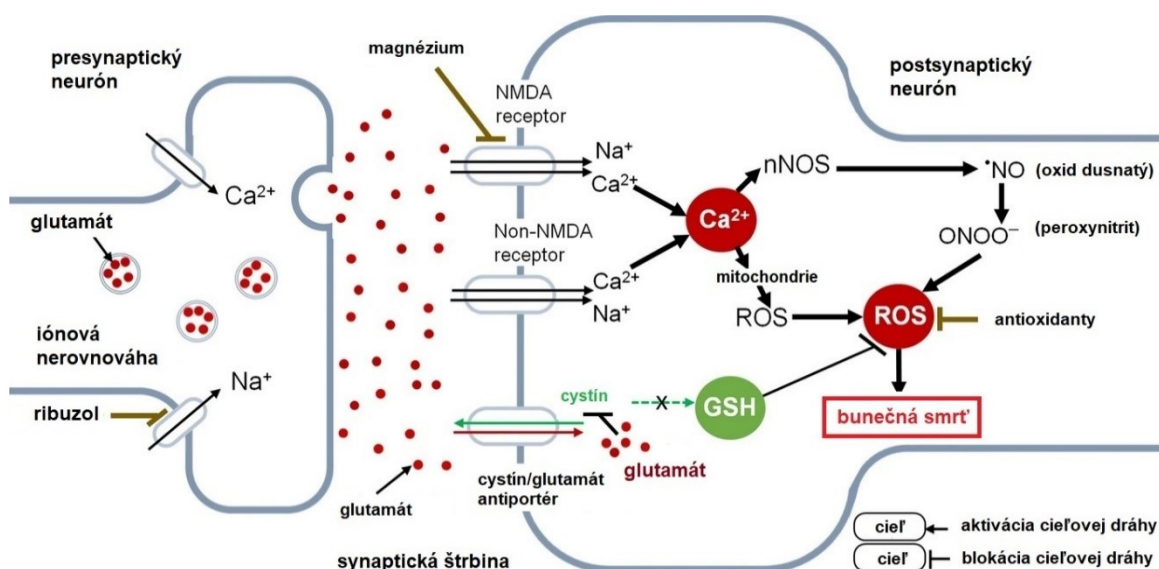
kompenzačnú úlohu pri hydrolýze ACh [78, 85, 86]. Tieto zmeny sú pozorované najmä v hipokampe, ktorý súvisí s kognitívnymi a pamäťovými funkciami [87]. Priame prepojenie medzi aktivitou BChE a etiopatogenezou ochorenia sa potvrdilo použitím selektívnych inhibítorov BChE, ktoré v štúdiách na zvieracích modeloch preukázali prokognitívne účinky [88, 89]. Okrem toho je BChE spojená s agregáciou A β , čo prispieva k formovaniu a zreniu senilných plakov. Štúdie na rodentných modeloch s knockoutovaným génom BChE ukázali významný pokles v akumulácii A β plakov. Zaujímavé je, že tieto myši nevykázali po expozícii neurotoxickému peptidu A β 25-35 žiadne kognitívne deficity, na rozdiel od zvierat geneticky nemodifikovaných, u ktorých sa prejavilo zhoršenie kognitívnych funkcií [90]. Štúdie ďalej uvádzajú, že nízka sérová hladina BChE slúži ako marker pečeneňových a zápalových ochorení a podvýživy, zatiaľ čo zvýšené hladiny sú spojené s obezitou, diabetom 1. a 2. typu, aberantným lipidovým profilom a hypertenziou. Doposiaľ však nie je jasné, či zvýšené hladiny enzýmu súvisia s príčinou uvedených metabolických porúch, alebo sú ich dôsledkom. V súvislosti s metabolizmom bola predstavená schopnosť BChE hydrolyzovať peptidový hormón ghrelín, známeho ako hormón hladu, a to odstránením oktanoylovej skupiny. Tento proces zohráva úlohu v metabolizme a energetickej homeostáze. Z prebiehajúcich štúdií na myšiach vyplýva, že ovplyvňovaním signálnej dráhy ghrelínu, môže BChE regulovať nielen energetický metabolizmus, ale aj emočné správanie ako úzkosť a agresivitu [90-93].

Selektívna inhibícia BChE môže prinášať oproti inhibícii AChE značné terapeutické benefity vďaka redukcii nežiaducich periférnych účinkov. Kým bežne používané inhibítory AChE môžu spôsobovať nepríjemné vedľajšie účinky, ako sú svalové kŕče, tráviace ťažkosti a bradykardiu, selektívne inhibítory BChE tieto riziká minimalizujú. Dosahujú to obmedzením nadmernej periférnej parasymptomimetickej aktivity mimo CNS. Nižší výskyt nežiaducich účinkov a lepšiu toleranciu pre inhibítory BChE potvrdzujú aj štúdie na jedincoch s deficienciou BChE, ktorí vykazujú normálnu dĺžku a kvalitu života. Tieto pozorovania posilňujú klinický potenciál inhibície BChE ako novej terapeuticko-jej stratégie [90, 94-96].

2.3.2 Glutamátová hypotéza

V kontexte AD dochádza k patologickým zmenám taktiež na úrovni tzv. glutamátergnej transmisie. Glutamát (Glu), ktorý je kľúčovou intracelulárnou

excitačnou AMK, má zásadný význam pre pamäť, synaptickú plasticitu a vývoj neurónov [97]. Existujú dva hlavné typy Glu receptorov: ionotropné a metabotropné. Iontropné receptory vrátane *N*-metyl-D-aspartátových (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolpropionovej kyseliny (AMPA) a kainátových sú ligandom riadené iónové kanály, ktoré podporujú rýchlu excitačnú neurotransmisiu. Metabotropné receptory, tvoriace druhú skupinu, sú asociované s G-proteínmi a systémom druhých poslov [98-100]. NMDA receptory (NMDAR) vykazujú vyššiu priepustnosť pre vápenaté katióny ako receptory AMPA alebo kainátové, z čoho vyplýva vyššia schopnosť indukovať intracelulárne preťaženie Ca^{2+} [101]. NMDAR je v pokojovom stave s membránovým potenciálom približne -70 mV nepermeabilný pre vápenaté katióny v dôsledku blokácie póru horečnatými katiónmi (Obr. 7). Počas indukcie membránového potenciálu a následnej depolarizácie membrány dochádza k odplaveniu horečnatých katiónov, čo umožňuje vstup vápenatých katiónov a aktiváciu NMDAR [102]. Za patologických podmienok AD sa uvoľňuje zvýšené množstvo Glu, čo vedie k nadmernej aktivácii Glu receptorov. Tento proces vedie k masívnemu prílevu vápenatých iónov do nervových buniek a aktivácii neuronálnej syntázy oxidu dusnatého (nNOS), zvýšenej permeabilite mitochondriálnej membrány a aktivácii niektorých proteínkináz spojených s tvorbou proapoptických faktorov. Pri AD je taktiež znížené spätné vychytávanie Glu z extracelulárneho priestoru, pričom celá táto dysregulácia vedie k excitotoxicite a iniciuje degeneratívnu kaskádu [103-105]. Previazanosť jednotlivých patologických kaskád u AD navyše zdôrazňuje fakt, že Glu receptory sú taktiež dysregulované prítomnosťou oligomérov $\text{A}\beta$, čo vedie k narušeniu glutamátergného synaptického prenosu [102, 106, 107]. K zabráneniu nadmernej aktivácie NMDAR je v súčasnosti používaný, pre stredne ťažké a ťažké štádia AD, nekompetitívny antagonistu memantín [108].



Obr. 7. Excesívne uvoľňovanie glutamátu pri neuronálnom poškodení je asociované s eleváciou intracelulárnych koncentrácií vápnika. To spúšťa kaskádu, v ktorej vápenaté ióny aktivujú nNOS a narušujú funkciu mitochondrií. Paralelne dochádza k poklesu intracelulárnych hladín cysteínu, čo negatívne ovplyvňuje dostupnosť glutatiónu (GSH), kľúčového antioxidantu. Nadmerné hromadenie reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) vedie k zániku buniek a neurodegenerácii. Prevzaté a modifikované z ref. [109].

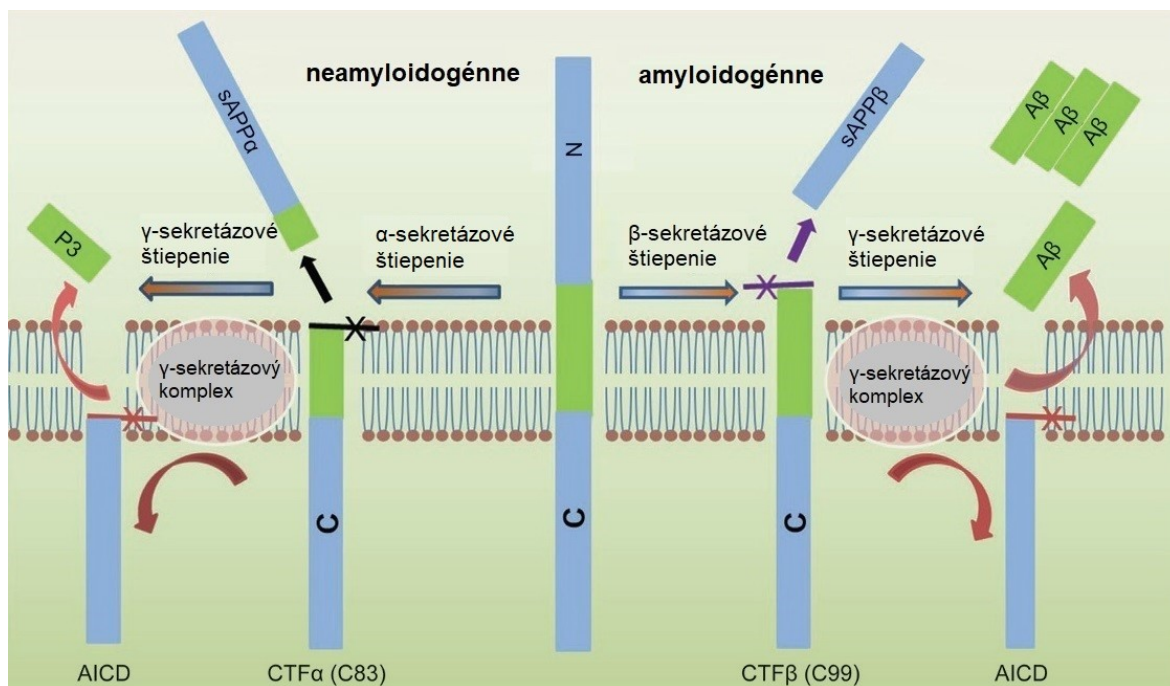
2.3.3 Amyloidná hypotéza

Alois Alzheimer, Oskar Fischer, a neskôr mnohí ďalší patológovia, zaznamenali v histologických vzorkách mozgov pacientov s AD prítomnosť extracelulárnych depozitov. Tieto depozity, známe pod názvom amyloidné plaky, sú štruktúry tvorené koagulovaným A β [76, 110]. Na začiatku celej kaskády stojí transmembránový proteín APP, ktorý zohráva fyziologickú úlohu pri vývoji, prežívaní a plasticite neurónov, čo súvisí s neurogenézou a správnu funkciou synapsí [111-113].

Za fyziologických podmienok prebieha štiepenie APP neamyloidogennou cestou, za postupnej účasti α - a γ -sekretázy (Obr. 8). α -Sekretázové štiepenie uvoľňuje z APP solubilnú N-terminálnu ektodoménu APP alfa (sAPP α) a ponecháva 83-AMK C-terminálny fragment, označovaný ako C83. Vzniklý metabolit sAPP α je známy pre svoje neurotrofické a neuroprotektívne vlastnosti. Ďalšie spracovanie zahŕňa intramembránové štiepenie pomocou γ -sekretázy, čím sa uvoľňuje peptid P3 a intracelulárna doména (AICD).

Amyloidogénne spracovanie APP iniciované β -sekretázou (BACE-1) produkuje solubilnú ektodoménu APP beta (sAPP β) a C-terminálny fragment o dĺžke 99 AMK (C99) [114, 115]. Proteázová aktivita γ -sekretázy na fragmente C99 vedie k uvoľneniu AICD

a monomérov A β s rôznou dĺžkou, typicky v rozsahu 39-43 AMK. Najčastejšie produkty štiepenia sú tie, ktoré majú 40 a 42 AMK (A β 40 a A β 42). Najrozšírenejším monomérom v mozgu je A β 40, zatiaľ čo monomér A β 42 je najviac náchylný na nesprávne skladanie a agregáciu [116, 117]. Monoméry A β sa následne agregujú do rozpustných oligomérov rôznych dĺžok (diméry až dodekaméry) a rozpustných protofibríl. Oligoméry sa ďalej agregujú do nerozpustných fibríl a amyloidných plakov [118]. Po dlhoročných omyloch a nesprávnom zameraní na amyloidné plaky ako hlavný cieľ v terapii AD sa vedecký konsenzus posunul. Aktuálne výskumy sa zhodujú na tom, že skutočným pôvodcom patológie a neurotoxicity sú práve rozpustné oligoméry. Oligoméry A β majú priamy neurotoxický účinok vytváraním pórov iónových kanálov v neurónových membránach, čo narušuje vápnikovú homeostázu, vedie k mitochondriálnej dysfunkcii a oxidačnému stresu. Oligoméry rušia pamäť a učenie blokáciou dlhodobej potenciácie a spôsobujú redistribúciu synaptických proteínov a hyperaktivitu glutamátových receptorov, čo vedie k poruchám ako hyperfosforylácia tau proteínu a strate synaptických funkcií [119-121]. Inhibítory β - a γ sekretázy boli považované za sľubné terapeutické ciele AD. Ich vývoj sa však obvykle v druhej a tretej fáze klinických skúšok stretol s výraznými komplikáciami. Jedným z kritických problémov bola nedostatočná účinnosť a častý výskyt nežiadúcich účinkov, ktoré boli pripisované substrátovej promiskuite týchto enzýmov [76, 122, 123]. Súčasná výskumná terapeutická stratégia sa sústreďuje na samotný A β a jeho zhluky prostredníctvom použitia malých molekúl alebo imunoterapie monoklonálnymi protilátkami. Cieľom je: znížiť produkciu A β , podporiť jeho rozklad a clearance; neutralizovať rozpustné monoméry A β s cieľom zabrániť formovaniu toxických oligomérov [124, 125].

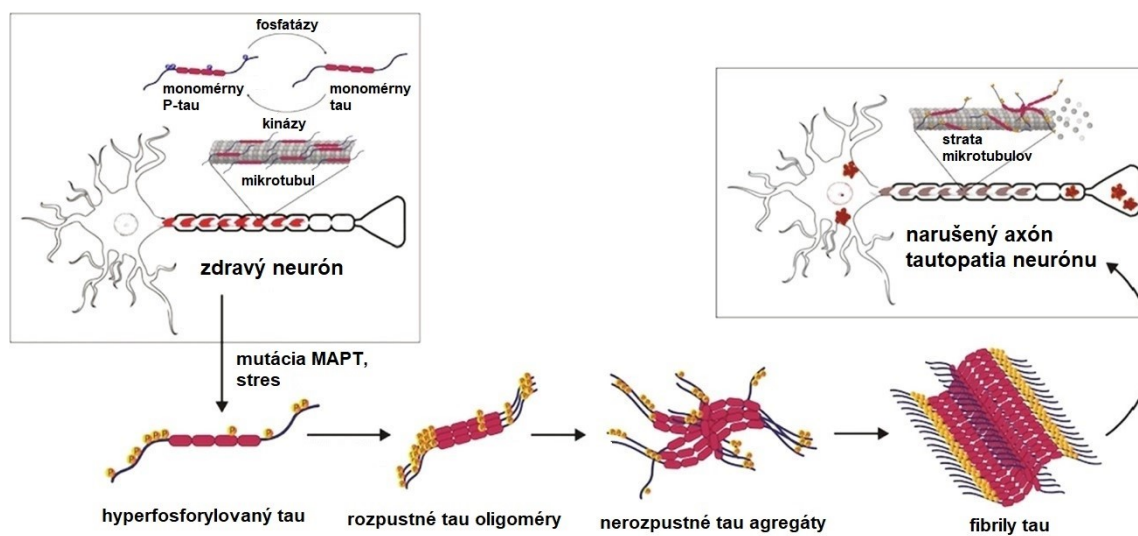


Obr. 8. Spracovanie APP neamyloidogennou a amyloidogennou cestou. Pri neamyloidogennej ceste dochádza ku štiepeniu pomocou α - a γ -sekretáz za vzniku membránovo viazaného fragment C83 a N-terminálny fragment sAPP α . Amyloidogénne spracovanie sa uskutočňuje postupným pôsobením β - a γ -sekretáz. C-koncový fragment C99 je štiepený γ -sekretázou na extracelulárny A β a intracelulárnu doménu AICD. Prevzaté a modifikované z ref. [114].

2.3.4 Hypotéza hyperfosforylovaného tau proteínu

Proteín tau, klasifikovaný ako mikrotubulárny asociačný proteín (MAP), zohráva kľúčovú úlohu v stabilizácii cytoskeletu neurónu prostredníctvom interakcie s mikrotubulmi (Obr. 9). Tým zvyšuje geometrickú stabilitu axónu, a to nie len pri diferenciácii a raste neurónu, ale aj pri jeho fixácii vo vyvinutých neurálnych štruktúrach [76, 126]. Patologická forma tau proteínu tvorí základnú zložku vo vode nerozpustných intracelulárnych neurofibrilárnych spletencoch (NFT, z angl. neurofibrillary tangles), charakteristických u pacientov AD a príbuzných neurodegeneratívnych ochorení, označovaných ako tauopatie [127]. V rámci posttranslačnej modifikácie je tau proteín fosforylovaný. Za patologických podmienok dochádza k narušeniu rovnováhy medzi kinázami a fosfatázami [127-129]. Hyperfosforylovaný tau je disociovaný z mikrotubulov, pričom dochádza k narušeniu axoplazmatického transportu [130, 131]. Podobne ako v prípade A β , monoméry tau podliehajú procesu dimerizácie a oligomerizácie s následnou tvorbou nerozpustných párových helikálnych filamentov a NFT [132, 133]. Esenciálnu úlohu v tomto procese zohrávajú enzýmy zodpovedné za reguláciu fosforylácie, konkrétne glykogénsyntáza kináza

3 β (GSK-3 β), cyklin-dependentná kináza 5 (CDK5), s mikrotubulmi asociovaná regulujúca kináza (MARK) [134]. Previazanosť jednotlivých teórií súvisí so schopnosťou A β zvyšovať produkciu tau aktiváciou vybraných kináz [135]. Patologická forma tau proteínu sa dokáže uvoľňovať z poškodených neurónov, pričom môže dochádzať k jeho absorpcii zdravými, doposiaľ nezasiahnutými neurónmi. Tento proces vedie k rýchlejšej progresii a zhoršeniu klinických príznakov [136, 137].



Obr. 9. Stabilizácia mikrotubulov proteínom tau regulovaná aktivitou kináz a fosfatáz. Abnormálna hyperfosforylácia tau spôsobuje depolymerizáciu mikrotubulov a tvorbu intracelulárnych nerozpustných NFT. MAPT je gén kódujúci tau proteín. Prevzaté a modifikované z ref. [132].

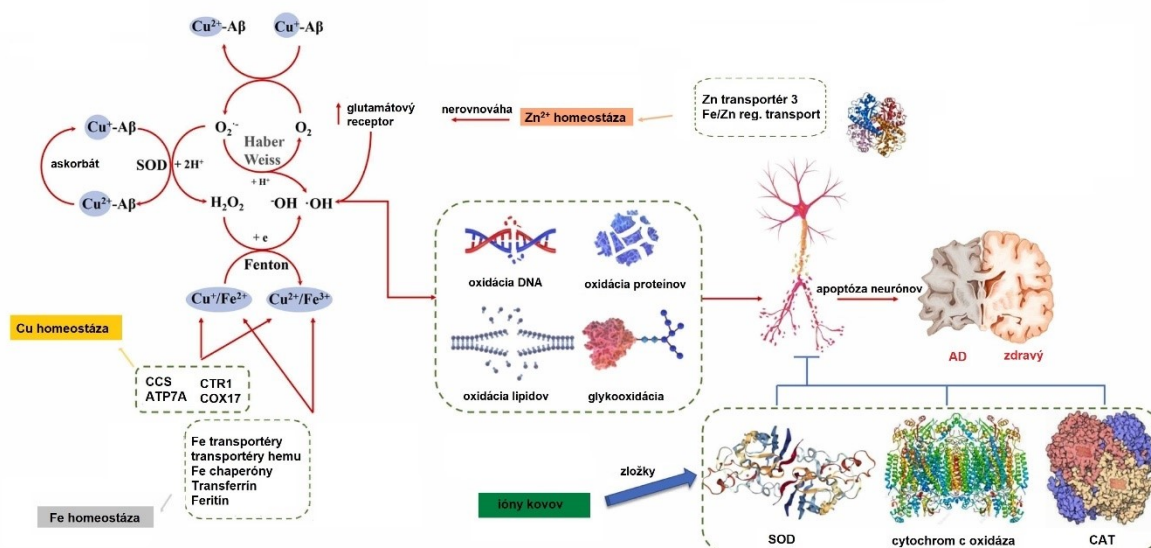
2.3.5 Teória oxidačného stresu

Je známe, že oxidačný stres (OS) zohráva dôležitú úlohu v patogenéze mnohých civilizačných ochorení, vrátane AD. K oxidačnému stresu dochádza v dôsledku narušenia rovnováhy medzi produkciou ROS/RNS a antioxidačným systémom organizmu [138, 139]. Zatiaľ čo ROS/RNS slúžia ako základné signálne molekuly na udržanie fyziologického stavu buniek, ich nadmerná tvorba v patologických podmienkach vedie k oxidačným modifikáciám a dysfunkcii bunkových biomolekúl, vrátane nukleových kyselín, lipidov, proteínov (Obr. 10) [140-142].

Mozog je obzvlášť náchylný na oxidačné poškodenie kvôli svojej vysokej spotrebe kyslíka, ktorá predstavuje až 20 % celkovej bazálnej spotreby [143]. Medzi ďalšie dôležité faktory OS v mozgu patria: 1) zraniteľnosť neurónových membrán, ktoré sú bohaté

na polyenasýtené mastné kyseliny, náchylné k oxidačnému poškodeniu; 2) nerovnováha kovových iónov, ktoré pôsobia ako významné katalyzátory vzniku voľných radikálov; 3) v porovnaní s inými tkanivami, mozog disponuje skromnejšími antioxidantnými obrannými mechanizmami s nižšími hladinami antioxidantov a súvisiacich enzýmov, ako sú kataláza (CAT), superoxidodismutáza (SOD), glutatiónpoxidáza, vitamín E a vitamín C a ďalšie [76, 140].

Mitochondrie sú považované za hlavný zdroj OS spôsobeného únikom elektrónov z mitochondriálneho elektrón transportného reťazca, ktorý vedie k produkcii superoxidového aniónového radikálu $O_2^{\bullet-}$ a hydroxylového radikálu OH^{\bullet} . Mitochondriálna dysfunkcia súvisí s defektným transportom a metabolizmom glukózy, dyshomeostázou vápenatých iónov a nadmernou produkciou A β [144, 145]. Molekula A β môže ovplyvňovať redoxnú aktivitu metionínom na pozícií 35, ktorý dokáže generovať voľné radikály priamo. Alternatívnym mechanizmom je schopnosť viazať ióny prechodných kovov, ako sú železo (Fe), meď (Cu) a zinok (Zn), prostredníctvom histidínových rezíduí na pozíciách 6, 13 a 14. Táto interakcia podporuje redoxný cyklus kovových iónov a napomáha tvorbe voľných radikálov [76, 146, 147].



Obr. 10. Teória oxidačného stresu v súvislosti s nerovnováhou kovových iónov a A β . Homeostáza esenciálnych kovov ako Fe, Cu a Zn je regulovaná pomocou komplexného systému, ktorý zahŕňa transportné proteíny, molekulárne chaperóny, enzýmy a reduktázy. V prípade Fe a Cu môžu voľné a na A β viazané ióny katalyzovať Fentonovu a Haber-Weissovu reakciu, čím dochádza k tvorbe OH^{\bullet} . Nerovnováha v homeostáze Zn vedie k upregulácii glutamátových receptorov, čo dodatočne prispieva k zvýšenej produkcii ROS.

Ak antioxidantný systém tela, zahŕňajúci enzýmy ako SOD a CAT, nie je schopný tieto ROS účinne neutralizovať, dochádza k poškodeniu biomolekúl, apoptóze neurónov a v konečnom dôsledku k degenerácii nervového systému. Prevzaté z ref. [148].

2.3.6 Súčasná terapia

Súčasná liečba AD sa zameriava na symptomatickú úľavu, nakoľko k dnešnému dňu neexistuje liek, ktorý by chorobu úplne vyliečil. Symptomatická liečba sa opiera o dve hlavné skupiny liečiv: AChEI a antagonistu NMDAR [149]. Základ prvej skupiny položil takrín (Obr. 11), schválený FDA pre liečbu miernych až stredne ťažkých foriem AD v roku 1993. Napriek sľubným údajom o účinnosti bol tento liek v roku 2013 stiahnutý z klinického používania kvôli závažným nežiaducim účinkom, ako sú hepatotoxicita a gastrointestinálny dyskomfort [150, 151].

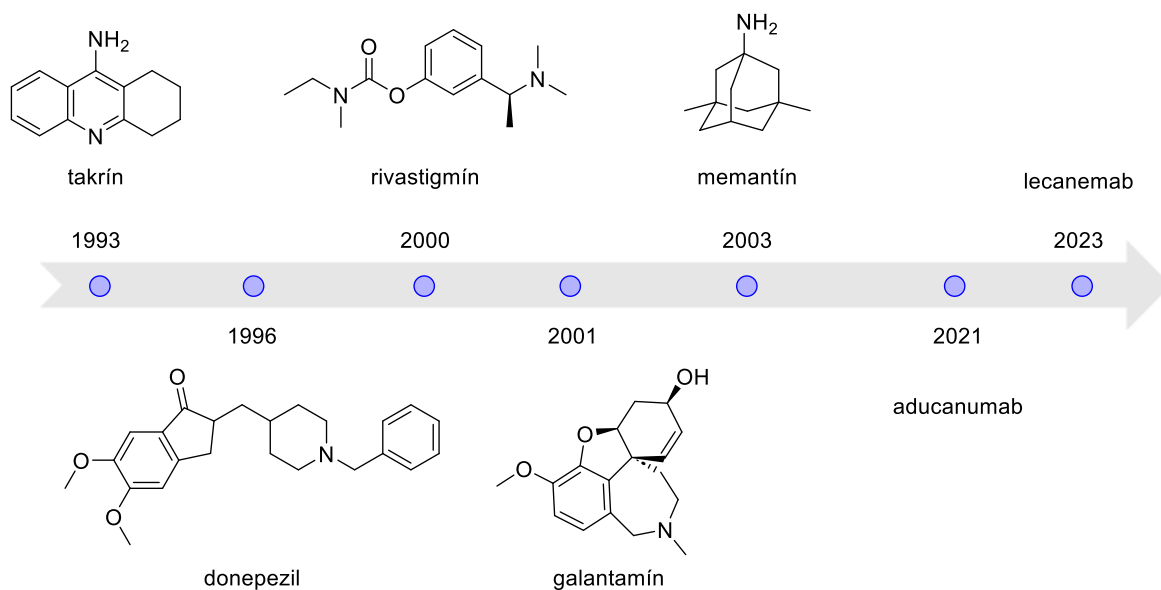
Do skupiny novších inhibítorov, ktoré predstavujú súčasný štandard v liečbe AD s indikáciou miernych až stredne ťažkých štádií, patrí donepezil, rivastigmín a galantamín. Donepezil je piperidínový derivát, ktorý pôsobí ako nekompetitívny a reverzibilný AChEI [152]. Rivastigmín je karbamátový derivát, štrukturálne príbuzný alkaloidu fysostigmínu, ktorý pôsobí ako pseudoireverzibilný neselektívny AChEI a BChE inhibítor (BChEI) [153]. Posledným používaným liečivom z tejto skupiny je galantamín, terciárny alkaloid z čeľade Amaryllidaceae, ktorý bol prvotne izolovaný z cibúľ *Galanthus woronovii*. Galantamín pôsobí ako selektívny, kompetitívny a reverzibilný inhibítor AChE a zároveň zosilňuje účinok ACh na nikotínové receptory prostredníctvom ich allosterickej modulácie [154].

Vedľa cholinergnej dysfunkcie je v patogenéze AD pozorované významné zvýšenie hladiny extracelulárneho glutamátu, ktoré vedie k nadmernej aktivácii NMDAR s následnou intracelulárnou akumuláciou Ca^{2+} . Táto akumulácia spúšťa kaskádu udalostí vedúcich k apoptóze a úbytku neurónov [155]. Memantín, nekompetitívny antagonist NMDAR so stredne silnou afinitou, chráni pred excitotoxicitou sprostredkovanou glutamátom, bez obmedzenia fyziologickej aktivácie receptorov, ktoré sú zodpovedné za synaptickú plasticitu a pamäťové funkcie. Memantín je indikovaný pre liečbu stredne ťažkej až ťažkej formy AD, pričom jeho použitie u miernej formy AD neprináša významný prínos [156]. V roku 2014 FDA schválila fixnú kombináciu memantínu a donepezilu pre liečbu stredne ťažkej až ťažkej AD u pacientov, ktorí sú stabilizovaní na oboch liečivách [157].

Novým prístupom k liečbe AD je zavádzanie liečiv modifikujúcich ochorenie. Monoklonálne protilátky proti $A\beta$ patria medzi prvé, ktoré cieľia na spomalenie progresie

ochorenia. Zasahujú do základných patofyziologických procesov choroby, a tým bránia progresii do ťažšej kognitívnej poruchy.

Takmer dve desaťročia po registrácii memantínu v roku 2021 FDA schválila nový liek s názvom aducanumab. Jedná sa o imunoterapeutikum imunoglobulín gamma 1 (IgG1), ľudská monoklonálna protilátka proti epitopu A β . Jeho mechanizmus účinku spočíva v prestupe hematoencefalickou bariérou (BBB) a následnou väzbou na agregované rozpustné oligoméry a nerozpustné fibrily A β . Zvýšená selektivita k agregátom vedie k zníženiu ukladania A β plakov v neurónovom tkanive [158]. Schválenie aducanumabu vyvolalo vlnu kontroverzie kvôli prerušeniu a následnému obnoveniu štúdií EMERGE a ENGAGE, zrýchlenému schvaľovaciemu procesu FDA, zameraniu na biologický účinok odstraňovania A β namiesto klinického účinku, potenciálnym vedľajším účinkom a nesúhlasom členov poradného panelu FDA s následnou rezignáciou niektorých členov. K širšiemu použitiu v USA zatiaľ nedošlo a Medicare schvaľuje úhradu len pre pacientov v klinických štúdiách. Európska lieková agentúra (EMA) vydala v decembri 2021 zamietavé stanovisko a v apríli 2022 výrobca stiahol žiadosť o registráciu v Európskej únii [159, 160]. Ďalším významným míľnikom v terapii AD bolo zrýchlené a následne úplné schválenie monoklonálnej IgG1 protilátky lecanemab. Lecanemab, podobne ako aducanumab, sa zameriava na redukciiu hladiny amyloidných depozitov. Jeho terapeutický mechanizmus spočíva vo väzbe na oligoméry, protofibrily a nerozpustné fibrily A β , pričom vykazuje preferenčnú afinitu k protofibrilám [161]. V súčasnosti je lecanemab schválený FDA, zatiaľ čo EMA prijala žiadosť o registráciu a aktuálne prebiehajú regulačné posudzovacie procesy [162].



Obr. 11. Míľníky v pamäti: chronológia schvaľovania liečiv FDA v priebehu času [76, 160, 163].

2.3.7 Potenciál vybraných Amaryllidaceae alkaloidov v terapii Alzheimerovej choroby

Najznámejším alkaloidom čeľade Amaryllidaceae je bezpochyby už diskutovaný galantamín, ktorý je dnes široko používaný v liečbe AD. Základná myšlienka jeho použitia vychádzala z etnobotanických informácií. Prvé zmienky o použití *Galanthus woronowii* a *Galanthus nivalis*, ktoré sú známe obsahom galantamínu, pochádzajú z oblasti východnej Európy. Rastliny boli používané pri liečbe reziduálnych príznakov paralýzy pri poliomyelitíde, pri myastenii gravis a neuralgiách [164]. Registrácia galantamínu FDA v roku 2001 motivovala vedecké tímy k zintenzívneniu pátrania po nových bioaktívnych zlúčeninách v čeľadi Amaryllidaceae, s perspektívou ich aplikácie v terapeutickej stratégii AD.

V posledných rokoch boli na našom pracovisku realizované fytochemické štúdie, v rámci ktorých boli izolované zlúčeniny nových štruktúrnych typov AAs, konkrétne narcikachnínového a karltonínového typu. Naprieč väčšinou zástupcov z oboch štruktúrnych typov sa prelína spoločný atribút, zvýšená aktivita voči hBChE (Tab. 2). V rámci narcikachnínového typu bolo identifikovaných päť nových alkaloidov (Obr. 3), ktoré boli podrobené skríningu aktivít voči obom ľudským ChE. V priebehu fytochemickej štúdie boli izolované narcikachnín a narcipavln, pričom inhibičná aktivita voči ChE bola kvôli obmedzenému dostupnému množstvu stanovovaná len u narcipavlnu [45]. V porovnaní s narcipavlnom, ktorý je menej účinným inhibítorom ($hBChE IC_{50} = 24,4 \pm 1,2 \mu M$), dosiahol

narcimatulín významnejšej inhibície (*hBChE* $IC_{50} = 5,9 \pm 0,2 \mu M$). Tento rozdiel v inhibičnej aktivite možno pripísať odlišnosti v substitúcii v polohe C-3 galantamínovej časti molekuly, kde v prípade narcipavlínu je prítomná hydroxylová a u narcimatulínu keto skupina. Ďalším rozdielom je prítomnosť, resp. neprítomnosť dvojitej väzby v polohe C-13'/C-14' indolového kruhu u oboch týchto alkaloidov (Obr.3). Biologický profil narcimatulínu bol rozšírený o testovanie účinku voči GSK-3 β , kde pôsobil ako mierny inhibítor ($IC_{50} = 20,7 \pm 2,4 \mu M$). Paralelne bola stanovená aktivita voči prolyl oligopeptidáze (POP), ktorá je považovaná za potenciálny cieľ v liečbe neurologických ochorení. Jedná sa o cytozolický enzým, ktorý je zapojený do rôznych fyziologických procesov bunkovej signalizácie, ako je modulácia hladín neuronálnych peptidov a hormónov s prolínovým zvyškom. Tento proteolytický enzým je predmetom výskumu zameraného na jeho selektívnu inhibíciu, ktorá môže predstavovať sľubný smer v liečbe neurodegeneratívnych ochorení, vrátane AD, Parkinsonovej choroby a ďalších kognitívnych porúch [165]. Alkaloid dosiahol násobne vyššiu inhibíciu ($IC_{50} = 29,2 \pm 1,0 \mu M$) v porovnaní s berberínom ($IC_{50} = 142 \pm 21 \mu M$), ktorý je považovaný za prírodný inhibítor tohoto enzýmu [46]. Narcabduliin, jediný spomedzi diskutovaných alkaloidov, preukázal vyváženú inhibičnú aktivitu voči obom testovaným ľudským enzýmom (*hAChE* $IC_{50} = 3,3 \pm 0,7 \mu M$ a *hBChE* $IC_{50} = 3,44 \pm 0,02 \mu M$) [48]. Narcieliin disponoval najvýznamnejšou inhibičnou aktivitou spomedzi zástupcov narcikachnínového typu (*hBChE* $IC_{50} = 1,3 \pm 0,3 \mu M$), ktorý ako jediný obsahuje v galantindolovej časti molekuly C-3' až C-5' tri-metoxi substitúciu. Analýza narcieliinu zahrnila stanovenie enzýmovej kinetiky, pričom v prípade *hAChE* preukázal kompetitívny typ inhibície a zmiešaný typ v prípade *hBChE*. V štúdiu inhibičnej aktivity voči POP dosiahol aktivitu porovnateľnú s berberínom ($IC_{50} = 163 \pm 13 \mu M$) [47]. Pre objasnenie štruktúrnych rozdielov dvoch najvýraznejších inhibítorov *hAChE/hBChE*, narcabduliinu a narcieliinu, bola u týchto dvoch alkaloidov vykonaná štúdia molekulového modelovania. Z tejto štúdie vyplýva, že za inhibičnú aktivitu voči *hAChE* je pravdepodobne zodpovedná galantamínová časť molekuly, zatiaľ čo inhibičná účinnosť a selektivita voči *hBChE* je pravdepodobne spojená s galantindolovou časťou molekuly [47, 48].

Tabuľka 2. Inhibičné aktivity alkaloidov narcikachnínového a karltonínového typu voči enzýmom asociovaných s AD [45-50].

Alkaloid	Štruktúrny typ	IC ₅₀ , hAChE ± SEM (μM) ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^a	POP ± SEM (μM) ^a
narcipavлін	narcikachnínový	208 ± 37	24,4 ± 1,2	-
narcimatulín	narcikachnínový	489 ± 60	5,9 ± 0,2	29,2 ± 1,0
narcieliin	narcikachnínový	18,7 ± 2,3	1,3 ± 0,3	163 ± 13
narciabduliin	narcikachnínový	3,3 ± 0,7	3,44 ± 0,02	-
karltonín A	karltonínový	>100	0,91 ± 0,02	143 ± 12
karltonín B	karltonínový	>100	0,031 ± 0,001	-
karltonín C	karltonínový	>100	14,8 ± 1,1	-
karltonín D	karltonínový	>100	6,8 ± 0,7	-
karltonín E	karltonínový	>100	>100	-
galantamín ^b	galantamínový	1,7 ± 0,1	34,0 ± 2,7	> 500

^a Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaníach; ^b Referenčná zlúčenina.

Fragment galantindolu je taktiež súčasťou štruktúry alkaloidov karltonínového štruktúrneho typu (Obr. 4), ktoré predstavujú novo popísanú skupinu AAs. Alkaloidy tohto štruktúrneho typu demonštrovali významnú a selektívnu inhibičnú aktivitu voči hBChE v nanomolárnych koncentráciách (karltonín A a B: hBChE IC₅₀ = 910 nM a hBChE IC₅₀ = 31 nM), bez inhibičnej účinnosti voči hAChE (Tab. 2). Kľúčové štruktúrne odlišnosti medzi týmito dvoma alkaloidmi, ktoré sú zodpovedné za ovplyvnenie ich účinnosti, spočívajú v substitúcii na benzénovom kruhu galantindolovej časti molekuly. Zatiaľ čo u karltonínu A je prítomný dimetoxybenzén, v prípade karltonínu B dochádza k uzavretiu kruhu a formovaniu 1,3-benzodioxolu. Prítomnosť tohoto kruhu v prípade karltonínu B je spojená s tridsaťnásobne vyššou aktivitou voči hBChE v porovnaní s otvoreným dimetoxylbenzénovým substituentom, prítomným v molekule karltonínu A. Tieto *in vitro* poznatky boli doplnené štúdiou molekulového modelovania, kde prítomnosť 1,3-dioxolového kruhu, ktorý má „rozšírené“ aromatické vlastnosti, podporuje hydrofóbne interakcie medzi ligandom a enzýmom. Alkaloidy karltonín C až E, ktoré predstavujú posledné známe príklady v sérii karltonínových alkaloidov, sú charakteristické prítomnosťou dvoch galantindolových fragmentov vo svojej molekulárnej štruktúre. Tento štruktúrny motív je spojený so značným zvýšením molekulovej hmotnosti, ktorá sa podpisuje na negatívnom vplyve voči inhibičnej aktivite voči hBChE. Prítomnosť 1,3-dioxolového kruhu u karltonínu D čiastočne minimalizuje negatívny vplyv

digalantindolovej substitúcie, avšak všetky tri spomínané alkaloidy vykazujú podstatne nižšiu inhibičnú aktivitu v porovnaní s monogalantindolovými analógmi. Vzhľadom na nízke izolované množstvo týchto alkaloidov bol inhibičný potenciál voči POP testovaný len u karltonínu A. Získaná hodnota ($IC_{50} = 163 \pm 13 \mu M$) bola opäť porovnateľná s používaným štandardom, berberínom [49, 50].

3 CIELE PRÁCE

Hlavným cieľom predloženej dizertačnej práce bola príprava série zlúčenín štruktúrne odvodených od minoritných alkaloidov karltonínového štruktúrneho typu a následné štúdium biologických aktivít s dôrazom na inhibíciu *h*BChE v kontexte AD.

Čiastkové ciele práce:

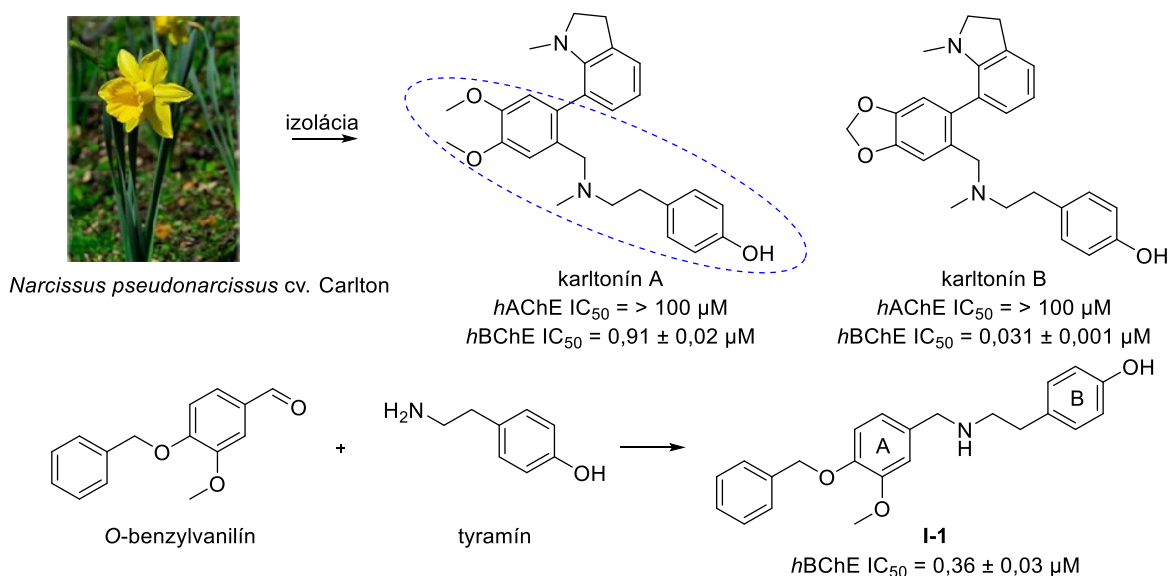
- a) Rešerše literatúry zaoberajúce sa AAs a zlúčeninami štruktúrne inšpirovanými týmito látkami, ako potenciálnymi inhibítormi *h*BChE so zameraním na AD.
- b) Príprava zlúčenín štruktúrne inšpirovaných izolovanými minoritnými AAs.
- c) Štruktúrna analýza pripravených látok na základe ich fyzikálno-chemických vlastností (NMR, MS, HRMS, optická otáčavosť).
- d) Stanovenie biologickej aktivity pripravených derivátov.
- e) Vyhodnotenie vzťahu štruktúra-účinnok u pripravených zlúčenín na základe získaných výsledkov.

4 KOMENTÁR K PUBLIKOVANÝM PRÁCAM

Táto dizertačná práca je predkladaná ako komentovaný súbor štyroch prác. Všetky tieto práce boli publikované v medzinárodných impaktovaných časopisoch. Kandidát je prvým autorom dvoch publikovaných prác a spoluautorom dvoch publikácií, vzťahujúcich sa k téme dizertačnej práce. Tri z uvedených publikácií sú pôvodné experimentálne práce zamerané na syntézu karltonínových derivátov a hodnotenie biologickej aktivity súvisiacej s potenciálnou liečbou AD. Štvrtá prehľadová publikácia je zameraná na potencionálne využitie IAs v terapii AD. Experimentálna časť práce rozširuje získané výsledky z predchádzajúcej fytochemickej štúdie realizovanej na *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Izolácia minoritných alkaloidov viedla k syntéze nových, doposiaľ nepopísaných štruktúr.

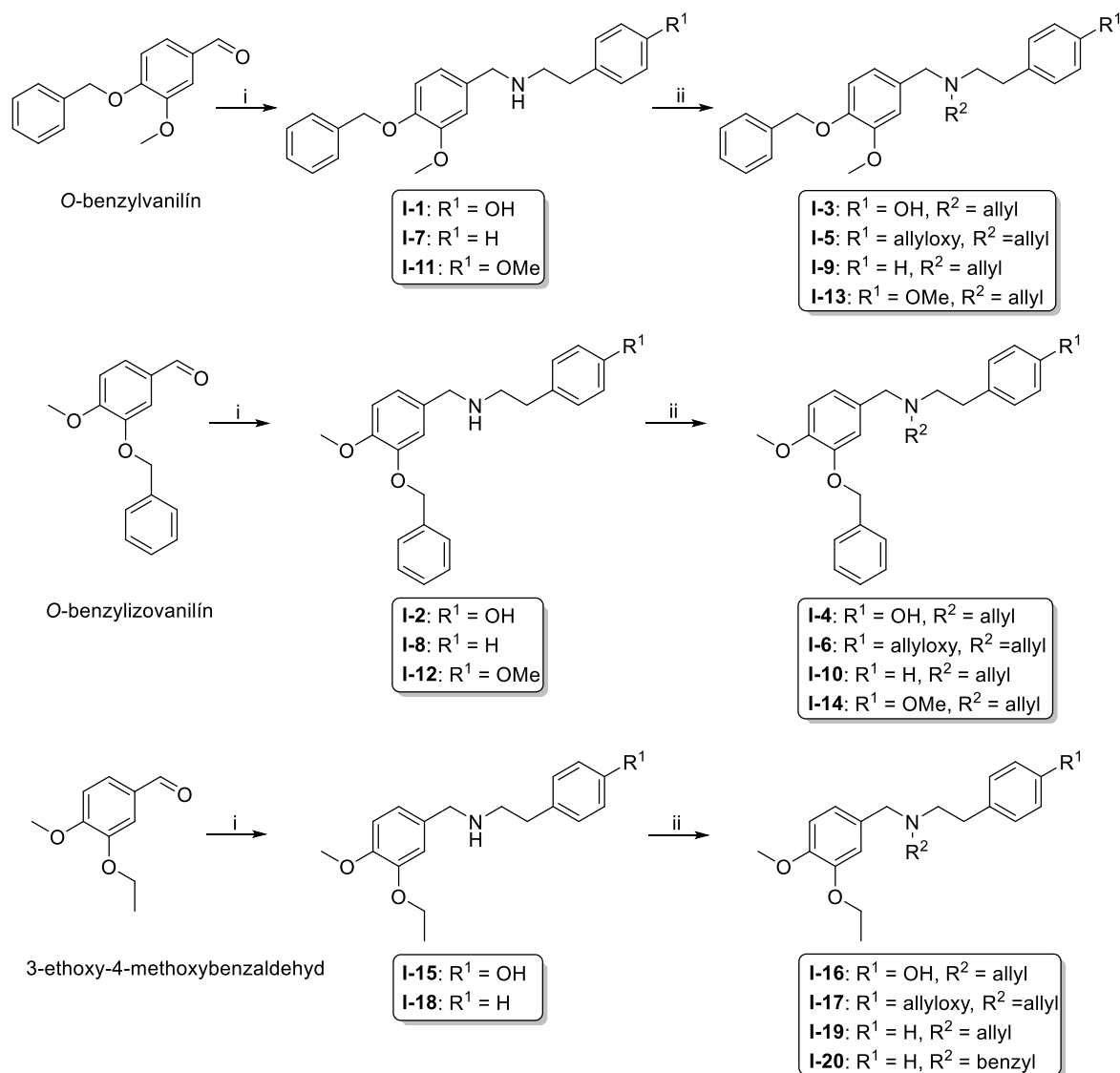
4.1 Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological activity evaluation, and docking studies

V rámci tejto štúdie bola pripravená pilotná séria syntetických derivátov. Základný štruktúrny motív bol inšpirovaný izoláciou novo popísaných AAs, konkrétne karltonínu A a B, získaných z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton. Tieto zlúčeniny predstavujú významné a vysoko selektívne inhibítory hBChE. Nanešťastie, tieto alkaloidy sú prítomné v rastlinnom materiáli len v stopových koncentráciách, ktoré neumožňujú podrobnejší biologický výskum. Táto skutočnosť nás motivovala k syntéze pilotnej série nových zlúčenín **I(1-20)**. Naše úsilie bolo zamerané na zachovanie niektorých kľúčových štruktúrnych požiadaviek karltonínu A/B, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za vysokú inhibičnú aktivitu voči hBChE, konkrétne 4-[2-(benzylamino)etyl]fenolový fragment (Obr. 12). Našu pozornosť sme zamerali aj na ďalšie molekulárne oblasti, za účelom objasnenia SAR. Konkrétne nás zaujímala (i) úloha sekundárnej alebo terciárnej amino skupiny (prítomnosť allylovej skupiny), (ii) éterifikácia fenolickej hydroxylovej skupiny na aromatickom kruhu B a (iii) pozícia alkoxy alebo aryloxy substituentov na benzénovom kruhu A (Obr. 13). Vplyv týchto aspektov bol preskúmaný s ohľadom na *in vitro* inhibičnú aktivitu voči hAChE/hBChE.



Obr. 12. Design nových inhibítorov hBChE odvodených od AAs izolovaných z *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton a z nich odvodený vedúci kandidát I-1.

Vedúci kandidát I-1 bol syntetizovaný z komerčne dostupného O-benzylvanilínu a tyramínu s vynikajúcim 95% výťažkom (Obr. 12). Rôzne štrukturálne úpravy boli preskúmané prostredníctvom kondenzačných reakcií O-benzylvanilínu, O-benzylizovanilínu a 3-etoxy-4-metoxybenzaldehydu s primárnymi amínmi ako sú tyramín, fenyletylamín a 4-metoxyfenyletylamín (Obr. 13). Podmienky redukčnej aminácie v prostredí borohydridu sodného (NaBH₄) v metanole (MeOH) za laboratórnej teploty (RT) poskytli požadované sekundárne amíny I-1, I-2, I-7, I-8, I-11, I-12, I-15 a I-18 v dobrých výťažkoch (74-95%). Následnou reakciou pripravených zlúčenín s nadbytkom allylbromidu a hydridu sodného (NaH) boli získané príslušné N-allyl deriváty I-3, I-4, I-9, I-10, I-13, I-14, I-16 a I-19. Na fenolickej skupine zlúčenín I-3, I-4 a I-16 bola realizovaná ďalšia nukleofilná substitúcia s použitím nadbytku allylbromidu za vzniku allyl éterov I-5, I-6 a I-17. Okrem uvedenej allylácie bola zlúčenina I-18 podrobená aj ďalšej alkylácii za vzniku N-benzyl derivátu I-20.



Obr. 13. Syntéza selektívnych inhibítorov hBChE **I(1-20)** vychádzajúcich z *O*-benzylvanilínu/*O*-benzylizovanilínu/3-etoxy-4-metoxybenzaldehydu. Reakčné podmienky: i) tyramín/fenyletylamín/4-metoxyfenetylamín, MeOH, RT, 24 h, následne NaBH₄, 0 °C → RT, 3 h, 74-95%; ii) allyl bromid/benzyl bromid, THF, NaH, 0 °C, 30 min → RT, 24 h, 41-84%.

Všetky zlúčeniny **I(1-20)** boli podrobené skríningu inhibičnej účinnosti voči hAChE/hBChE pri koncentrácii 100 μM s využitím mierne modifikovanej Ellmanovej metódy. Zlúčeniny, ktoré vykázali inhibičnú účinnosť >60% voči jednej alebo obom cholinesterázam, boli selektované k stanoveniu hodnôt IC₅₀ (Tab. 3). Ako pozitívne kontroly v testoch bol použitý galantamín a eserín. Všetky testované zlúčeniny vykazovali iba nízku alebo žiadnu inhibičnú aktivitu voči hAChE (s hodnotami IC₅₀ > 20 μM) a preukázali selektivitu v prospech hBChE. Všetky nové zlúčeniny demonštrovali schopnosť inhibovať hBChE v rozmedzí od mikromolárnej po nízku nanomolárnu koncentráciu (Tab. 3).

Výnimkou bola zlúčenina **I-5**, ktorá nevykazovala inhibičnú účinnosť voči žiadnemu z enzýmov.

Zlúčenina **I-6**, ktorá je odvodená z *O*-benzylizovanilínu a tyramínu s prítomnou *N/O* allylovou disubstitúciou, sa ukázala byť najefektívnejším inhibítorom (*hBChE* IC₅₀ = 72 ± 5 nM). Prekvapivo, štruktúrne blízky polohový izomér **I-5**, nevykazoval v prípade *hBChE* žiadnu inhibičnú aktivitu (*hBChE* IC₅₀ > 100 μM). V tomto konkrétnom prípade je úplná strata inhibičnej schopnosti spojená s opačným rozmiestnením metoxy a benzyloxy skupín na aromatickom kruhu, čo bolo ďalej analyzované pomocou *in silico* metód. Inhibičná schopnosť zlúčeniny **I-1** (*hBChE* IC₅₀ = 0,36 ± 0,03 μM) sa postupne znižovala so substitúciou *N/O*-allyl, ako bolo pozorované u zlúčenín **I-3** (*hBChE* IC₅₀ = 0,61 ± 0,04 μM) a **I-5** (*hBChE* IC₅₀ > 100 μM). Pri použití templátovej zlúčeniny **I-2** bol pozorovaný opačný účinok, ktorý ukázal, že dvoj-allylový derivát **I-6** bol o jeden rád účinnejší ako zlúčenina **I-4** (Tab. 3). Modifikácie štruktúry v polohe C-4' kruhu B pomocou H a OMe v zlúčeninách **I-7** a **I-11** boli spojené s postupným poklesom inhibičnej účinnosti voči *hBChE*. Konkrétne sa účinnosť znížila, v prípade absencie OH skupiny v zlúčenine **I-1**, ako je to vidieť prípade **I-7**, alebo náhradou OCH₃ skupinou v prípade **I-11**, (**I-1**: *hBChE* IC₅₀ = 0,36 ± 0,03 μM; **I-7**: *hBChE* IC₅₀ = 1,28 ± 0,05 μM; **I-11**: *hBChE* IC₅₀ = 2,39 ± 0,27 μM). Obdobný účinok bol pozorovaný v sérii odvodenej od *O*-benzylizovanilínu (**I-2**: *hBChE* IC₅₀ = 0,29 ± 0,02 μM; **I-8**: *hBChE* IC₅₀ = 1,10 ± 0,05 μM; **I-12**: *hBChE* IC₅₀ = 1,12 ± 0,11 μM). Na ďalšie objasnenie dôležitosti prítomnosti benzylovej skupiny bola vytvorená malá séria derivátov **I(15-20)**, vychádzajúca z 3-etoxy-4-metoxybenzaldehydu. V tejto podskupine sa zlúčenina **I-20** (*hBChE* IC₅₀ = 0,69 ± 0,03 μM) ukázala ako najúčinnější inhibítor *hBChE* vďaka prítomnej *N*-benzylovej substitúcii na centrálnom atóme dusíka. Tento jav možno pripísať lepšiemu obsadeniu objemnej úžiny aktívneho miesta *hBChE* ligandom.

Derivát **I-6** s najvýraznejšou inhibičnou aktivitou bol podrobený enzýmovej kinetickej analýze za účelom určenia spôsobu inhibície *hBChE*. Kinetika inhibície bola analyzovaná pri použití rôznych koncentrácií substrátu butyrylthiocholínu a testovanej látky. Štatistická analýza ukázala zmiešaný typ inhibície a reverzibilný typ väzby na enzým.

Inhibícia POP môže predstavovať podpornú stratégiu v terapii AD. S týmto zámerom bola hodnotená inhibičná kapacita u najaktívnejších derivátov **I(1-4)**, **I-6** a **I-14**. Avšak v dôsledku nízkej rozpustnosti týchto zlúčenín v pufrí bolo možné stanoviť hodnotu IC₅₀ len

pre zlúčeninu **I-1**, ktorá preukázala mierne slabšiu inhibičnú aktivitu (POP IC₅₀ = 186 ± 14 μM), v porovnaní s používaným štandardom berberínom (POP IC₅₀ = 142 ± 21 μM).

Tabuľka 3. *In vitro* inhibícia hAChE/hBChE **I(1-20)** a ich predpokladaná dostupnosť v CNS odhadnutá pomocou algoritmu BBB skóre.

Zlúčenina	% Inhibícia hAChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hAChE ± SEM (μM) ^b	% Inhibícia hBChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^b	BBB skóre ^c
I-1	30,4 ± 2,1	>100	98,7 ± 0,3	0,36 ± 0,03	4,53
I-2	35,8 ± 1,2	>100	97,7 ± 0,5	0,29 ± 0,02	4,53
I-3	20,8 ± 0,9	>100	96,8 ± 1,1	0,61 ± 0,04	4,79
I-4	45,2 ± 2,4	>100	97,9 ± 0,6	0,25 ± 0,01	4,79
I-5	3,4 ± 0,5	>100	38,9 ± 0,9	>100	4,87
I-6	10,1 ± 0,6	>100	98,6 ± 0,9	0,07 ± 0,01	4,87
I-7	23,4 ± 2,5	>100	94,5 ± 0,9	1,28 ± 0,05	5,15
I-8	12,6 ± 0,5	>100	96,6 ± 0,4	1,10 ± 0,05	5,15
I-9	18,8 ± 1,9	>100	74,9 ± 2,4	5,19 ± 0,28	5,04
I-10	72,4 ± 1,1	21,5 ± 0,6	92,0 ± 2,4	1,17 ± 0,04	5,04
I-11	27,9 ± 0,7	>100	93,5 ± 0,3	2,39 ± 0,27	4,87
I-12	0	>100	94,6 ± 0,6	1,12 ± 0,11	4,87
I-13	32,7 ± 1,6	>100	90,9 ± 1,5	2,72 ± 0,50	4,96
I-14	60,9 ± 0,4	37,7 ± 1,7	95,8 ± 0,9	0,38 ± 0,01	4,96
I-15	25,8 ± 1,3	>100	75,3 ± 0,6	15,06 ± 2,34	4,80
I-16	28,3 ± 1,1	>100	91,7 ± 0,4	1,21 ± 0,08	5,21
I-17	29,3 ± 3,9	>100	77,0 ± 1,0	9,89 ± 1,37	5,39
I-18	0	>100	60,0 ± 1,6	41,1 ± 2,6	5,53
I-19	5,9 ± 2,1	>100	80,2 ± 0,2	4,63 ± 0,48	5,60
I-20	49,5 ± 0,8	>100	82,5 ± 1,0	0,69 ± 0,03	5,13
galantamín ^d	98,8 ± 1,1	2,0 ± 0,1	68,2 ± 1,2	34,0 ± 2,7	5,01
eserín ^d	99,8 ± 0,6	0,20 ± 0,01	99,9 ± 0,5	0,30 ± 0,01	5,02

^a Testované pri koncentrácii zlúčeniny 100 μM; ^b Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaníach; ^c Vypočítané hodnoty BBB skóre; ^d Referenčná zlúčenina.

Pri návrhu nových liečiv cielených na AD je rozhodujúcim faktorom významná expozícia mozgu. V súlade s touto požiadavkou sme použili *in-silico* výpočet tzv. skóre BBB. Tento predikčný nástroj určený k rozlišovaniu liečiv pre CNS a mimo CNS sa opiera o viaceré fyzikálno-chemické vlastnosti. Je predpokladané, že zlúčeniny s BBB skóre vyššími ako 4,0 majú schopnosť prenikať do oblasti CNS. V tejto štúdii všetky nové zlúčeniny **I(1-20)** dosiahli BBB skóre v rozmedzí 4,53 až 5,60 (Tab. 3), čo poukazuje na ich schopnosť prenikať cez BBB. Je dôležité poznamenať, že BBB skóre alkaloidov karltonínu A (4,52) a karltonínu B (4,54),

vykázali porovnateľné hodnoty so zlúčeninou **I-1**, zatiaľ čo zvyšok skupiny ukázal vyššie hodnoty BBB skóre.

Za účelom určenia rozdielov v interakciách v aktívnom mieste *hBChE* (PDB ID: 6QAA) medzi neaktívnou zlúčeninou **I-5** a polohovým izomérom, najaktívnejšou zlúčeninou **I-6**, bola využitá molekulová dynamická simulácia. Z molekulárnej simulácie možno usúdiť, že vyššiu inhibičnú schopnosť **I-6** možno pripísať polohe benzyloxy substituentu, ktorý umožňuje ligandu „priamočiarejšie“ umiestnenie a formovanie niekoľkých kľúčových hydrofóbných interakcií s enzýmom. Neschopnosť **I-5** usadiť sa v aktívnom mieste *hBChE*, podobne ako **I-6**, viedla k energeticky menej výhodnej celkovej topológii, a teda „zabalenej“ konformácii.

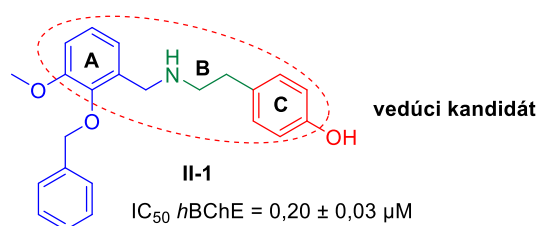
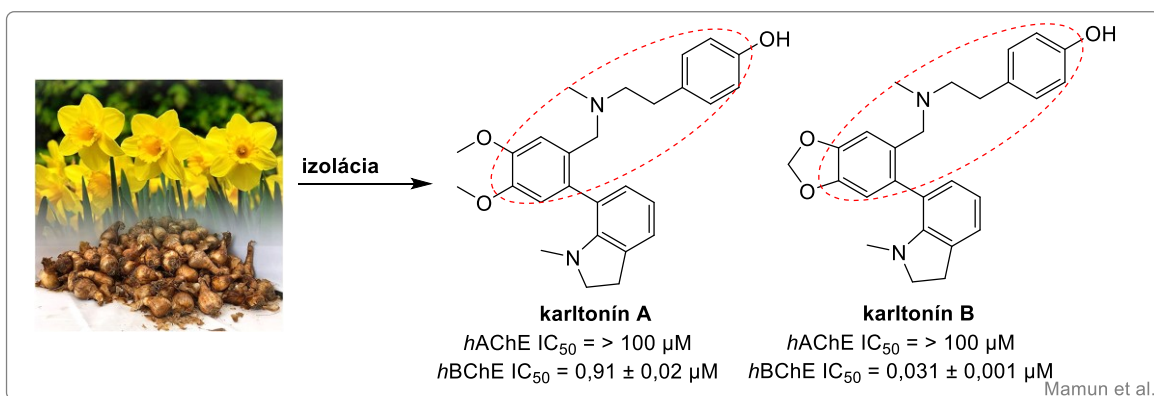
Za účelom stanovenia bezpečnosti bola testovaná cytotoxicita na ľudskej neuroblastómovej bunkovej línii SH-SY5Y. Pri aplikácii koncentrácie 10 μM bola zlúčenina **I-6** prakticky netoxická, s životaschopnosťou buniek dosahujúcou $95,1 \pm 2,6\%$.

Štúdia úspešne rozvinula syntézu nových zlúčenín vychádzajúcu z karltonínov, u ktorých bol zachovaný vysoko selektívny profil voči *hBChE*. Tento potenciál je najvýznamnejší v prípade zlúčeniny **I-6**, ktorá predstavila sľubný základ pre nadväznú syntézu.

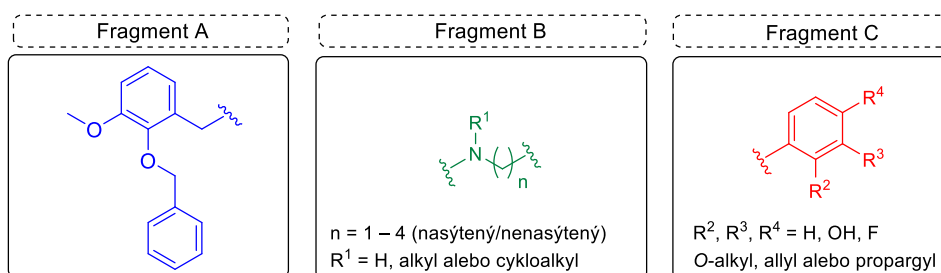
4.2 Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids - Design, synthesis, and biological evaluation

Zlúčenina **I-6** sa stala východiskovou štruktúrou pre nadväzujúcu štúdiu, keďže spĺňala potrebné atribúty, t.j. významnú a selektívnu inhibíciu *hBChE*, ktorá bola potvrdená *in vitro* a *in silico* štúdiami, doplnenú o priaznivý profil bezpečnosti voči neuroblastómovej línii. Z karltonínu A/B a zlúčeniny **I-6** sme zachovali niektoré štrukturálne fragmenty, považované za kľúčové pre vysokú inhibíciu *hBChE*. Konkrétne ide o 4-[2-(benzylamino)etyl]fenolovú časť. Celá táto séria výskumu vychádza z využitia komerčne dostupného 2-benzyloxy-3-metoxybenzaldehydu. Cieľom bolo pripraviť novú skupinu polohových izomérov zlúčeniny **I-6**. Pri pôvodnej zlúčenine **I-6** je charakteristické zoskupenie substituentov na aromatickom kruhu A, a to 3-benzyloxy-4-metoxyfenyl. Nová

séria využíva izomérické zoskupenie 2-benzyloxy-3-metoxyfenyl. Táto drobná štruktúrna modifikácia vyústila v identifikáciu nového vedúceho kandidáta **II-1**, ktorý vykazuje posilnenú inhibíciu (*h*BChE IC₅₀ = 0,20 ± 0,03 μM). Z chemického hľadiska sme sledovali základné princípy SAR, zamerané na štruktúrne modifikácie v štyroch oblastiach: i) polohová izoméria benzyloxy a metoxy skupín, s ohľadom na prvú sériu (Obr. 14, fragment A); ii) rozšírenie chemického priestoru medzi dvoma aromatickými kruhmi pomocou nasýtených alebo nenasýtených uhľovodíkových reťazcov rôznej dĺžky (v rozsahu od jedného do štyroch metylénových jednotiek); iii) skúmanie úlohy bázičného centra molekuly (sekundárny/terciárny amín), vrátane pripojenia rôznych alkylových reťazcov k dusíku v prípade terciárnych amínov (Obr. 14, fragment B); a iv) substitúcia rôznych elektrón-odoberajúcich alebo elektrón-donorujúcich skupín na aromatickej časti (Obr. 14, fragment C). Súhrnne, v tejto štúdii sme navrhli a syntetizovali 57 nových potenciálnych inhibítorov *h*BChE.

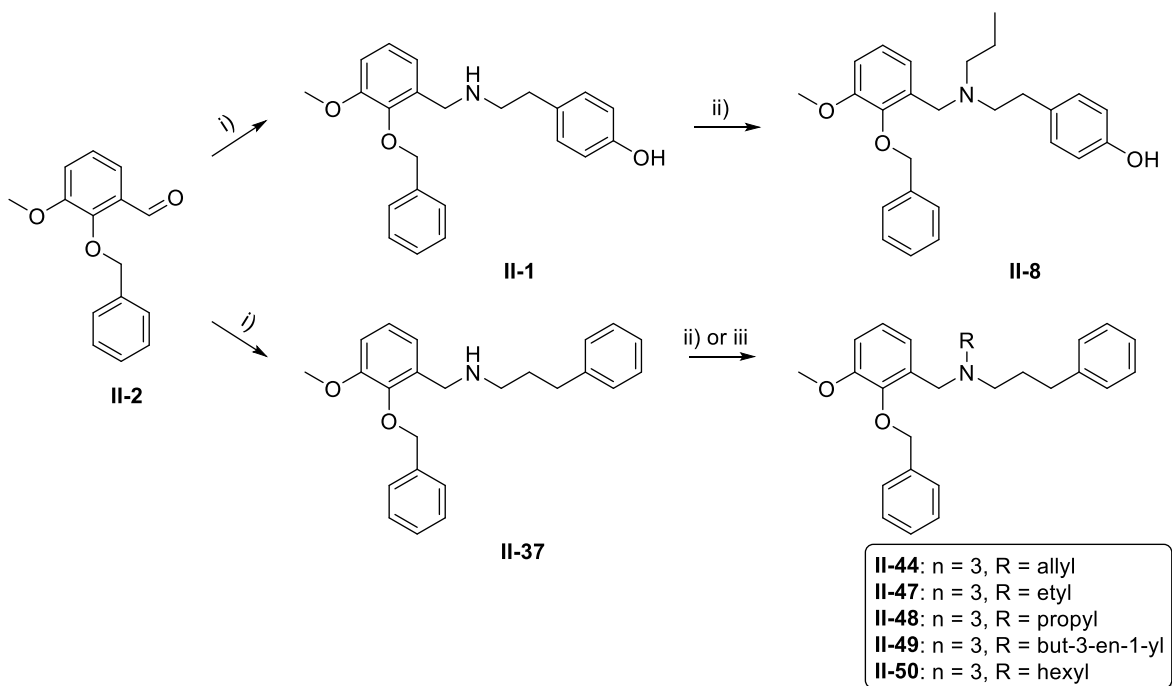


↓
optimalizácia



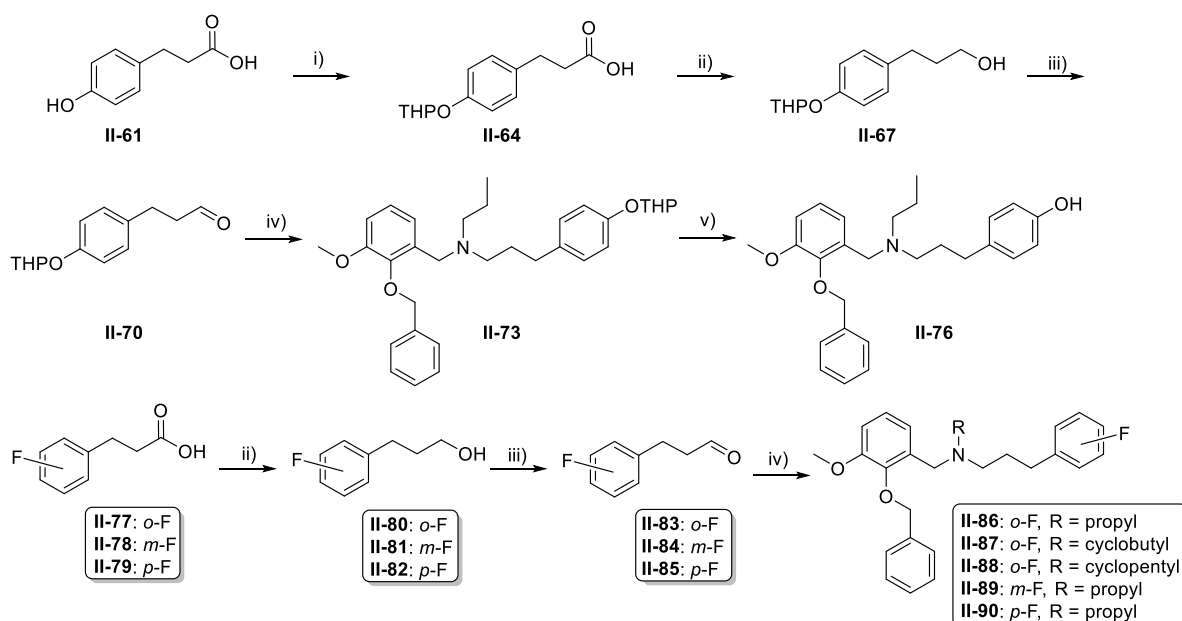
Obr. 14. Chemické štruktúry vzorových zlúčenín karltonínu A a B, zlúčenina II-1 a návrh nových inhibítorov hBChE relevantných pre túto štúdiu.

Vzhľadom na rozsiahlosť syntetickej časti bude komentovaná chemická syntéza s osobitným zameraním na deriváty, ktoré preukázali najvyššiu inhibičnú aktivitu voči hBChE (II-1, II-8, II-37, II-44, II-47, II-48, II-49, II-50, II-76 a II(86-90); Obr. 15 a 16). Syntetická cesta bola iniciovaná z komerčne dostupného 2-benzyloxy-3-metoxybenzaldehydu (II-2) reagujúceho s tyramínom za podmienok redukčnej aminácie za vzniku zlúčeniny II-1. Nový vedúci kandidát bol následne modifikovaný nukleofilnou substitúciou na sekundárnom dusíku propylou skupinou za vzniku II-8. Ďalej sme sa zamerali na dĺžku spojovacieho linkera medzi dvoma aromatickými oblasťami (Obr. 15). Trojčlenný metylénový linker medzi základným centrom a fragmentom C viedol k novej kandidátskej štruktúre II-37. Aby sme odhalili rozdiel medzi sekundárnym a terciárnym amínom, zaviedli sme rôzne N-alkylové substituenty, čím sme získali terciárne amíny II-44 a II(47-50) (Obr. 15).



Obr. 15. Syntéza vedúceho kandidáta **II-1** a derivátu s trojčlenným metylénovým spojovacím reťazcom **II-37** a príbuzných *N*-substituovaných derivátov **II-8**, **II-44** a **II(47-50)**. Činidlá a podmienky: i) vybraný primárny amín, MeOH, RT, 24 h, následne NaBH₄, 0 °C → RT, 3 h, **II-1**: 99%, **II-37**: 98%; ii) pre **II-8** a **II(47-50)**: vybraný halogenalkán, CH₃CN, K₂CO₃, KI kat., reflux, 24 h, 80-99%; iii) pre **II-44**: allylbromid, THF, NaH, 0 °C, 30 min → RT, 24 h, 83%.

Pri designe ďalších derivátov bol študovaný vplyv prítomnosti fenolickej skupiny pri fixácii trojuhlíkového spojovacieho reťazca (Obr. 16). Syntéza začala z *p*-OH karboxylovej kyseliny **II-61**, u ktorej bola fenolická skupina chránená pomocou 3,4-dihydropyranu (DHP) a katalytického množstva pyridinium *p*-toluénsulfonátu (PPTS) v dichlórmetáne (DCM) za vzniku tetrahydropyranyléru **II-64**. Takto ochránená karboxylová kyselina bola redukovaná na alkohol **II-67** pomocou borán-tetrahydrofuránového komplexu (BH₃-THF), potom oxidovaná na aldehyd **II-70** s použitím Dess-Martin periodinanu (DMP) a následne podrobený reductívnej aminácii s medziproduktom **II-41** za použitia kyanoborohydridu sodného (NaBH₃CN), za vzniku **II-73**. Konečná zlúčenina **II-76** bola získaná kyslou deprotekciou THP-éterov pomocou kyseliny *p*-toluénsulfónovej (PTSA). Obdobná stratégia bola použitá pre *o*-, *m*- a *p*-fluorované karboxylové kyseliny **II(77-79)**, kde prvý krok zahŕňal redukciiu karboxylovej kyseliny na alkoholy **II(80-82)**, oxidáciu na aldehydy **II(83-85)** a reductívnu amináciu s acyklickými a cyklickými medziproduktmi sekundárnymi benzylamínmi **II(41-43)** za vzniku finálnych zlúčenín **II(86-90)** (Obr.16).



Obr. 16. Syntetická cesta vychádzajúca z karboxylových kyselín obsahujúcich *p*-fenolickú hydroxylovú skupinu **II-61** a atóm fluóru **II(77-79)** a ich premena na najúčinnnejšie inhibítory *h*BChE **II-76** a **II(86-90)**. Činidlá a podmienky: i) DHP, DCM, PPTS, RT, cez noc, 44%; ii) BH₃-THF, 0 °C → RT, 3 h, potom 0 °C, MeOH, 1 h, 95-98%; iii) DMP, DCM, 0 °C → RT, 3 h, 94-99%; iv) medziprodukty **II(41-43)**, NaBH₃CN, MeOH, AcOH kat., RT, cez noc, 69-95%; v) PTSA, MeOH, RT, 3 h, 85%.

Podobne ako v predchádzajúcej štúdii, všetkých 57 nových zlúčenín bolo podrobených skríningu inhibičnej účinnosti voči *h*AChE/*h*BChE pri koncentrácii 10 μM s využitím Ellmanovej metódy. Zlúčeniny, ktoré vykázali inhibičnú účinnosť >50% voči jednej alebo oboch ChE, boli selektované k stanoveniu hodnôt IC₅₀ (Tab. 4 a 5). Vo všeobecnosti všetky zlúčeniny vykazovali slabú až žiadnu inhibičnú účinnosť voči *h*AChE a boli vysoko selektívne voči *h*BChE v mikromolárnom až jednocifernom nanomolárnom rozsahu.

Prvé optimalizačné pokusy **II-1** (*h*BChE IC₅₀ = 0,20 ± 0,03 μM) zahŕňali skúmanie vplyvu substitúcie na *N/O* pomocou allyl alebo propargyl skupín v zlúčeninách **II-5**, **II-6** a **II(9-12)**. Inhibičnú aktivitu si udržala len zlúčenina **II-11**, s dvoma propargylovými skupinami. Naproti tomu *N*-etylový derivát **II-7** a bis-etylovaný **II-13** neukázali významný rozdiel oproti východiskovej **II-1**. O jeden rád vyššiu inhibičnú účinnosť preukázal *N*-propylový derivát **II-8** (*h*BChE IC₅₀ = 0,09 ± 0,01 μM), čo naznačuje, že monosubstitúcia na dusíku alkylovými reťazcami je efektívnejšia než éterifikácia hydroxylovej skupiny. Ďalej sme modifikovali fragment C absenciou fenolického hydroxyly **II-14**, alebo jeho náhradou

metoxy skupinou v rôznych pozíciách na fenylovom kruhu **II(15-17)**. *Para*-metoxy zlúčenina **II-17** bola najefektívnejšou zlúčeninou z tejto podskupiny ($hBChE$ $IC_{50} = 0,40 \pm 0,01 \mu M$), avšak zaostávala za referenčnou **II-1**. Na základe úspechu monosubstitúcie dusíka, kde zlúčenina **II-8** ukázala najvýraznejší nárast inhibície $hBChE$, sme modifikovali sekundárnu amino skupinu pridávaním krátkych až stredne dlhých substituentov rôznej povahy v kombinácii s fenylovým bez substituentu alebo s *o*-, *m*- a *p*-metoxy substitúciou **II(18-35)**. Všetky tieto snahy však viedli k zanedbateľným zmenám v aktivite. Ďalej sme zamerali našu pozornosť na povahu reťazca medzi aromatickými kruhmi A a C, zohľadňujúc predĺženie a vetvenie. Dĺžka spojovacieho reťazca mala významný vplyv na inhibičnú účinnosť. Skrátenie spojovacieho reťazca na jeden metylén viedol k poklesu inhibície (**II-36**: $hBChE$ $IC_{50} = 1,5 \pm 0,4 \mu M$), zatiaľ čo jeho predĺženie na tri metylény zlepšilo inhibičnú aktivitu (**II-37**: $hBChE$ $IC_{50} = 0,090 \pm 0,009 \mu M$). Predĺženie na štyri metylény malo na inhibíciu opäť negatívny vplyv (**II-38**: $hBChE$ $IC_{50} = 0,20 \pm 0,03 \mu M$). Rozvetvenie reťazca si zachovalo aktivitu v submikromolárnej škále (**II-39**: $hBChE$ $IC_{50} = 0,160 \pm 0,006 \mu M$ a **II-40**: $hBChE$ $IC_{50} = 0,130 \pm 0,003 \mu M$). Na základe získaných výsledkov sme pokračovali úpravou **II-37** s pevne fixovaným trojmetylénovým reťazcom, pričom sme sa sústredili na alkyláciu dusíka za účelom generovania terciárnych amínov. Najnižšiu účinnosť preukázali zlúčeniny **II-45** a **II-46** s propargylovou a metylovou substitúciou. Sľubnú aktivitu vykázali molekuly **II-44**, **II-48** a **II-50** s allyl, propyl a hexyl substitúciou, dosahujúce takmer identickú inhibičnú účinnosť $hBChE$ ($IC_{50} \sim 0,040 \mu M$). Spojenie všetkých prospešných štrukturálnych požiadaviek do jednej molekuly, t. j. propylový substituent na dusíku a trojmetylénový spojovací reťazec s dvojitou väzbou umožnil **II-58** veľmi zaujímavú inhibíciu ($hBChE$ $IC_{50} = 0,04 \pm 0,01 \mu M$). Zlúčeniny **II(74-76)** fixovali všetky tieto štrukturálne atribúty, avšak s trojčlenným nasýteným reťazcom. Fenylová časť fragmentu C bola doplnená fenolickým hydroxylom v rôznych polohách, vyzdvihujúc **II-76** s najvyššou aktivitou ($hBChE$ $IC_{50} = 0,07 \pm 0,01 \mu M$). Výrazné zvýšenie aktivity bolo dosiahnuté náhradou fenolického hydroxylu elektrón-akceptujúcim fluórom, s aktivitou v poradí **II-90** > **II-89** > **II-86** pre *p*-, *m*-, a *o*-fluór. Zlúčenina **II-86** vykázala najvýznamnejšiu aktivitu ($hBChE$ $IC_{50} = 0,020 \pm 0,001 \mu M$). Záverečná optimalizácia bola venovaná substitúcii na dusíku, kde bol *N*-propylový reťazec nahradený objemnejším cyklobutylom **II-87** a cyklopentylom **II-88**, čo vyústilo v najvýraznejšiu inhibíciu $hBChE$ (**II-87**: $IC_{50} = 3,8 \pm 0,2$ nM a **II-88**: $IC_{50} = 5,7 \pm 1,5$ nM). Enzymová kinetická analýza bola vykonaná s cieľom určiť mechanizmus

interakcie **II-87** s enzýmom. Štatistickou analýzou bol identifikovaný kompetitívny typ inhibície a reverzibilný spôsob väzby do aktívneho miesta enzýmu.

Tabuľka 4. *In vitro* inhibícia hAChE/hBChE **II-1**, **II(4-35)** a ich predpokladaná dostupnosť v CNS odhadnutá pomocou algoritmu BBB skóre.

Zlúčenina	R ¹	R ²	% Inhibícia hAChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hAChE ± SEM (μM) ^b	% Inhibícia hBChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^b	BBB skóre ^c
II-1	H	4-OH	23,0 ± 2,7	>10	94,0 ± 0,9	0,20 ± 0,03	4,5
II-4		4-OH	6,6 ± 0,5	>10	48,0 ± 0,5	8,0 ± 0,8	4,6
II-5	allyl	4-OH	1,6 ± 1,0	>10	96,0 ± 0,4	0,30 ± 0,02	4,8
II-6	propargyl	4-OH	18,0 ± 2,5	>10	78,0 ± 2,1	1,9 ± 0,2	4,8
II-7	etyl	4-OH	0	>10	94,0 ± 0,5	0,30 ± 0,02	4,8
II-8	propyl	4-OH	0	>10	95,0 ± 0,4	0,09 ± 0,01	4,8
II-9	allyl	4-allyloxy	27,0 ± 3,7	>10	71,0 ± 1,2	1,3 ± 0,1	4,9
II-10	allyl	4-propargyloxy	24,0 ± 2,5	>10	64,0 ± 1,5	2,2 ± 0,2	4,9
II-11	propargyl	4-propargyloxy	14,0 ± 1,1	>10	72,0 ± 0,5	0,2 ± 0,1	4,8
II-12	propargyl	4-allyloxy	6,7 ± 1,7	>10	42,0 ± 0,9	>10	4,8
II-13	etyl	4-etoxy	0	>10	84,0 ± 1,1	0,9 ± 0,2	5,0
II-14	H	H	30,0 ± 1,4	>10	93,0 ± 0,4	0,40 ± 0,01	5,2
II-15	H	2-OMe	16,0 ± 1,9	>10	88,0 ± 0,5	0,8 ± 0,1	4,9
II-16	H	3-OMe	16,0 ± 1,5	>10	77,0 ± 1,4	2,5 ± 0,1	4,9
II-17	H	4-OMe	19,0 ± 2,3	>10	94,0 ± 0,6	0,40 ± 0,01	4,9
II-18	allyl	H	16,0 ± 1,6	>10	88,0 ± 1,4	0,40 ± 0,01	5,1
II-19	propargyl	H	25,0 ± 2,4	>10	46,0 ± 1,0	>10	5,0
II-20	allyl	2-OMe	27,0 ± 2,2	>10	90,0 ± 0,7	0,30 ± 0,02	4,9
II-21	propargyl	2-OMe	25,0 ± 3,5	>10	35,0 ± 1,6	>10	4,9
II-22	allyl	3-OMe	0	>10	76,0 ± 1,1	1,5 ± 0,2	4,9
II-23	propargyl	3-OMe	0	>10	28,0 ± 1,0	>10	4,9
II-24	allyl	4-OMe	5,6 ± 1,0	>10	72,0 ± 1,1	2,0 ± 0,2	4,9
II-25	propargyl	4-OMe	11,0 ± 3,0	>10	66,0 ± 1,0	1,3 ± 0,2	4,9
II-26	etyl	H	0	>10	91,0 ± 0,3	0,6 ± 0,1	5,1
II-27	propyl	H	0	>10	91,0 ± 0,6	0,5 ± 0,1	5,1
II-28	metyl	2-OMe	0	>10	85,0 ± 1,4	0,8 ± 0,1	5,0
II-29	etyl	2-OMe	0	>10	94,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	5,0
II-30	propyl	2-OMe	0	>10	92,0 ± 0,7	0,7 ± 0,1	5,0
II-31	etyl	3-OMe	0	>10	88,0 ± 1,5	0,9 ± 0,1	5,0
II-32	propyl	3-OMe	0	>10	89,0 ± 1,3	0,9 ± 0,1	5,0
II-33	metyl	4-OMe	0	>10	76,0 ± 0,7	3,2 ± 0,3	5,0
II-34	etyl	4-OMe	0	>10	77,0 ± 1,5	2,5 ± 0,2	5,0
II-35	propyl	4-OMe	0	>10	82,0 ± 1,1	1,4 ± 0,2	5,0
galantamín ^d			80,0 ± 1,4	2,0 ± 0,1	29,0 ± 3,5	34,0 ± 2,7	5,0
eserín ^d			97,0 ± 0,6	0,200 ± 0,009	96,0 ± 0,3	0,30 ± 0,01	5,0

^a Testované pri koncentrácii zlúčeniny 10 μM; ^b Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaníach;

^c Vypočítané hodnoty BBB skóre; ^d Referenčná zlúčenina.

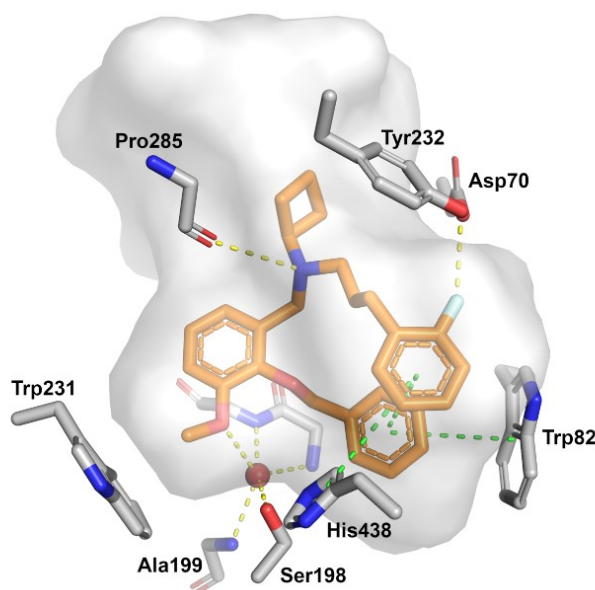
Tabuľka 5. *In vitro* inhibícia hAChE/hBChE **II(36-40)**, **II(44-53)**, **II-58**, **II(74-76)**, **II(86-90)** a ich predpokladaná dostupnosť v CNS odhadnutá pomocou algoritmu BBB skóre.

Zlúčenina	R ¹	R ²	n	% Inhibícia hAChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hAChE ± SEM (μM) ^b	% Inhibícia hBChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^b	BBB skóre ^c
II-36	H	H	1	26,0 ± 0,7	>10	78,0 ± 1,2	1,5 ± 0,4	5,2
II-37	H	H	3	20,0 ± 2,0	>10	97,0 ± 0,2	0,090 ± 0,009	5,1
II-38	H	H	4	21,0 ± 0,3	>10	94,0 ± 0,3	0,20 ± 0,03	5,1
II-39	H	H		17,0 ± 1,1	>10	96,0 ± 0,4	0,160 ± 0,006	5,1
II-40	H	H		0	>10	97,0 ± 0,1	0,130 ± 0,003	5,1
II-44	allyl	H	3	23,0 ± 1,0	>10	98,0 ± 0,2	0,040 ± 0,003	5,0
II-45	propargyl	H	3	15,0 ± 1,0	>10	76,0 ± 3,4	0,23 ± 0,02	5,0
II-46	metyl	H	3	9,0 ± 0,5	>10	97,0 ± 0,2	0,10 ± 0,01	5,1
II-47	etyl	H	3	0	>10	98,0 ± 0,4	0,060 ± 0,004	5,1
II-48	propyl	H	3	10,0 ± 1,1	>10	98,0 ± 0,2	0,040 ± 0,002	5,0
II-49	but-3-en-1-yl	H	3	8,1 ± 1,3	>10	97,0 ± 0,4	0,070 ± 0,002	5,0
II-50	hexyl	H	3	11,0 ± 1,7	>10	95,0 ± 0,8	0,040 ± 0,003	4,9
II-51	hexyl	H	4	15,0 ± 0,5	>10	78,0 ± 1,1	0,70 ± 0,02	4,8
II-52	tetradecyl	H	4	19,0 ± 0,2	>10	25,0 ± 1,1	>10	4,4
II-53	4-metylpentyl	H	4	0	>10	87,0 ± 0,6	0,29 ± 0,03	4,8
II-58	propyl	H		0	>10	97,0 ± 0,4	0,04 ± 0,01	5,0
II-74	propyl	2-OH	3	0	>10	95,0 ± 0,7	0,220 ± 0,005	4,8
II-75	propyl	3-OH	3	0	>10	96,0 ± 0,8	0,16 ± 0,01	4,8
II-76	propyl	4-OH	3	0	>10	98,0 ± 0,3	0,07 ± 0,01	4,8
II-86	propyl	2-F	3	1,2 ± 1,3	>10	97,0 ± 1,0	0,020 ± 0,001	5,0
II-87	cyklobutyl	2-F	3	0	>10	99,0 ± 0,8	0,0038 ± 0,0002	4,9
II-88	cyklopentyl	2-F	3	4,4 ± 0,3	>10	99,0 ± 1,1	0,0057 ± 0,0015	4,9
II-89	propyl	3-F	3	4,7 ± 0,9	>10	97,0 ± 1,2	0,039 ± 0,001	5,0
II-90	propyl	4-F	3	1,2 ± 1,3	>10	96,0 ± 1,2	0,10 ± 0,01	5,0
galantamín ^d				80,0 ± 1,4	2,0 ± 0,1	29,0 ± 3,5	34,0 ± 2,7	5,0
eserín ^d				97,0 ± 0,6	0,200 ± 0,009	96,0 ± 0,3	0,30 ± 0,01	5,0

^a Testované pri koncentrácii zlúčeniny 10 μM; ^b Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaníach; ^c Vypočítané hodnoty BBB skóre; ^d Referenčná zlúčenina.

Za účelom podrobnejšej charakterizácie väzby **II-87** v aktívnom mieste hBChE sme realizovali kryštalografickú štúdiu. Kokryštalizáciou molekuly **II-87** s hBChE boli pripravené kryštály, ktoré boli difraktované a získané údaje boli spresnené na rozlíšenie 2,65 Å. Zlúčenina **II-87** sa nachádza na vrchole aktívneho miesta, interaguje najmä v cholínovej kapse (Trp82) a v menšej miere s acylovou kapsou (Trp231) (Obr. 17). Benzyloxy skupina

sa orientuje smerom k Trp82 v tvare T π - π interakciou so vzdialenosťou 4,7 Å. Druhý benzylový kruh smeruje svojou metoxylovú skupinou k Trp231 (3,3 Å). Atóm kyslíka metoxy skupiny a v menšej miere aj atóm kyslíka benzyloxy skupiny tvoria H-väzby s molekulou vody (červená guľa; 3,1 a 4,0 Å). Atóm dusíka nesúci cyklobutylovú skupinu sa spája H-väzbou s atómom kyslíka karbonylu Pro285 (3,5 Å). Benzylový kruh fragmentu C, ktorý nesie atóm fluóru, formuje π - π interakciu (4,1 Å) s benzyloxy kruhom fragmentu A. Na záver, benzylový kruh zapája atóm fluóru s Tyr332, ktorý tvorí periférne miesto BChE, so vzdialenosťou kyslík-fluór 3,1 Å.



Obr. 17. Röntgenová štruktúra **II-87** viazanej v hBChE (PDB 8CGO) zobrazuje **II-87** a kľúčové rezíduá hBChE ako tyčinky, s povrchom aktívneho miesta enzýmu v polopriehľadnej svetlošedej farbe. Uhlíkové atómy sú pre hBChE vo svetlošedej a pre **II-87** v oranžovej, dusík a kyslík v modrej a červenej, fluór v bledomodrej. Vodíkové väzby a interakcie kruh-kruh sú znázornené žltými a zelenými prerušovanými čiarami. Prevzaté z ref. [166].

V tejto štúdii bola aplikovaná šesťrozmerná kvantitatívna analýza vzťahu medzi štruktúrou a aktivitou (6D QSAR), keďže biologická aktivita zlúčenín závisí na celkovej interakcii rôznych chirálnych konfigurácií, konformačných stavov a protonácií ligandov s biologickým cieľom. V našom výpočtovom dizajne sme použili röntgenový model hBChE na dokovanie všetkých novo pripravených zlúčenín **II(1-90)** s využitím softvérov AutoDock a Schrodinger. Na základe štatistickej analýzy štyroch 6D QSAR modelov, vytvorených na základe piatich najlepších pozícií ligandov v hBChE, bola vybraná sada **II-87-X**, získaná röntgenovou analýzou zlúčeniny **II-87** v hBChE. Výsledky QSAR analýzy naznačujú,

že najlepší inhibičný účinok pravdepodobne spočíva v hydrofóbných interakciách medzi ligandom a enzýmom, vrátane π - π a kation/anión- π interakcií, a nie napríklad v solných mostíkoch. Zároveň donory H-väzieb v molekulách ligandov môžu zvýšiť inhibičnú účinnosť prostredníctvom interakcií s akceptormi H-väzieb enzýmu. Súhrnne možno konštatovať, že akákoľvek bezproblémová interpretácia 6D modelov QSAR je však ohrozená ich vysokou matematickou zložitosťou. Preto by najlepšou nereduktívnou aplikáciou 6D QSAR mohlo byť softvérové spojenie s generátorom ligandov *in silico*, ktorý by na základe modelu QSAR predložil nové štruktúry založené na core-hoppingu alebo bioizosterických náhradách. Napríklad rozhodnutie, či by nová zlúčenina odvodená bioizosterickou zámenou 2-F s 2-Cl v **II-87** viedla podľa modelu 6D QSAR k nižšej alebo vyššej IC_{50} , sa nedá urobiť intuitívne, ale musí sa vyhodnotiť výpočtom. V tomto prípade model 6D QSAR skutočne predpovedá, že výmena F-Cl by viedla k zníženiu IC_{50} vzhľadom na aktivitu **II-87**.

Pri overení schopnosti zlúčenín dosahovať CNS sme využili BBB skóre algoritmus. V rámci tejto štúdie všetkých 57 finálnych zlúčenín vykazuje hodnoty BBB skóre v rozmedzí 4,4 až 5,2 (Tab. 1 a 2), čo naznačuje ich schopnosť prenikať cez BBB. V rámci štúdie sme experimentálne stanovili schopnosť prestupu cez BBB u 15 najaktívnejších inhibítorov *hBChE* s hodnotou IC_{50} nižšou ako 100 nM (Tab. 4 a 5). Na tento účel sme využili metódu PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Testovanie odhadilo (Tab. 6), že takmer všetky skúmané zlúčeniny, s výnimkou **II-47**, prechádzajú cez BBB pasívnou difúziou, ako naznačujú vysoké hodnoty P_e a v porovnaní s liečivami so známym CNS profilom.

Skúmanie vybraných inhibítorov ukázalo minimálny rozdiel v cytotoxicite voči bunkovým líniam ľudského neuroblastómu (SH-SY5Y) a hepatocelulárneho karcinómu (HepG2), s výnimkou zlúčenín **II-58** a **II-90**, ktoré preukázali zvýšenú cytotoxicitu voči HepG2 (Tab. 6). Najaktívnejšie deriváty **II-87** a **II-88** vykazovali miernu cytotoxicitu s hodnotami IC_{50} 87,0 μ M a 55,0 μ M voči SH-SY5Y a 76,0 μ M a 28,0 μ M voči HepG2. Na základe získaných údajov možno konštatovať, že novo vyvinuté zlúčeniny možno považovať za bezpečné s ohľadom na ich mnohonásobne vyššiu inhibičnú účinnosť voči *hBChE*.

Tabuľka 6. Predikcia BBB penetrácie a údaje o cytotoxicite vybraných zlúčenín.

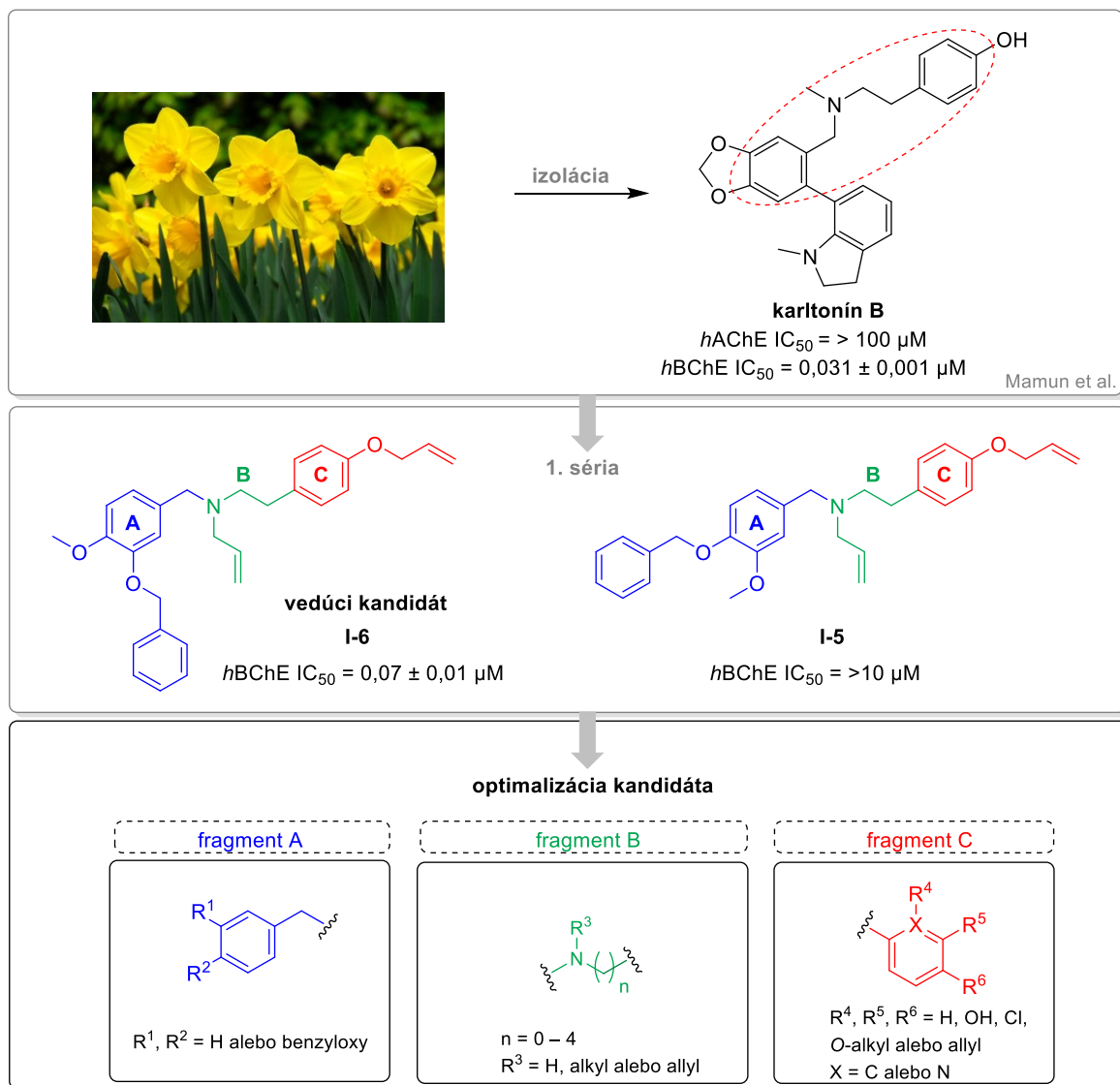
Zlúčenina	Odhad penetrácie BBB		Cytotoxicita	
	Pe ± SEM ^a ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$)	CNS(+/-) ^b	SH-SY5Y IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a	HepG2 IC ₅₀ ± SEM (μM) ^a
II-1	19,0 ± 1,9	CNS +	n.t. ^c	n.t.
II-8	14,0 ± 0,8	CNS +	44,0 ± 5,4	43,0 ± 9,8
II-37	21,0 ± 3,1	CNS +	8,9 ± 0,6	n.t.
II-44	28,0 ± 1,9	CNS +	> 200	> 200
II-47	0	CNS -	34,0 ± 4,0	23,0 ± 4,6
II-48	32,0 ± 3,5	CNS +	> 63	48,0 ± 6,2
II-49	33 ± 14	CNS +	131,0 ± 6,5	92,0 ± 6,9
II-50	9,0 ± 3,2	CNS +	110 ± 13	106,0 ± 1,6
II-58	41 ± 22	CNS +	174,0 ± 5,2	36,0 ± 1,6
II-76	16,0 ± 1,5	CNS +	44,0 ± 6,8	31,0 ± 0,3
II-86	85 ± 28	CNS +	49,0 ± 3,4	33,0 ± 5,7
II-87	60 ± 16	CNS +	87,0 ± 9,0	76,0 ± 8,9
II-88	61,0 ± 4,3	CNS +	55,0 ± 0,1	28,0 ± 0,8
II-89	27,0 ± 0,8	CNS +	123,0 ± 0,9	41,0 ± 3,6
II-90	61,0 ± 5,7	CNS +	170 ± 14	32,0 ± 6,3
furosemid	0,20 ± 0,07	CNS -	n.t.	n.t.
chlorotiazid	1,1 ± 0,5	CNS -	n.t.	n.t.
donepezil	22,0 ± 2,1	CNS +	n.t.	n.t.
rivastigmín	20,0 ± 2,1	CNS +	n.t.	n.t.
galantamín	6,7 ± 0,7	CNS +	4700 ± 210	4200 ± 200

^a Výsledky sú vyjadrené ako priemer minimálne troch experimentov. ^b CNS + (predpokladaná vysoká permeácia BBB): Pe ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) > 4,0; CNS - (predpokladaná nízka permeácia BBB): Pe ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) < 2,0; CNS +/- (BBB permeácia neistá): Pe ($\times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) od 4,0 do 2,0. ^c n.t. netestované.

4.3 Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition

Táto štúdia vznikla v priamej nadväznosti na prvú sériu karltonínových derivátov. Základnou odlišnosťou novovzniknutých zlúčenín oproti predtým popisovaným štruktúram je absencia metoxy skupiny v *m*- alebo *p*-pozícii na fragmente A. Z chemického hľadiska sme sa riadili základnými princípmi SAR zameranými na štrukturálne modifikácie v štyroch oblastiach: i) polohová izoméria benzyloxy skupiny týkajúca sa prvej série do polôh *m*- a *p*- (Obr. 18, fragment A), ii) rozšírenie chemického priestoru medzi aromatickými kruhmi A a C pomocou metylénových linkerov rôznej dĺžky (v rozsahu 0 až 4), iii) skúmanie úlohy bázičného centra molekuly (sekundárny/terciárny amín), v prípade terciárnych amínov substitúcia krátkymi alkylovými reťazcami (Obr. 18, fragment B) a iv) substitúcia

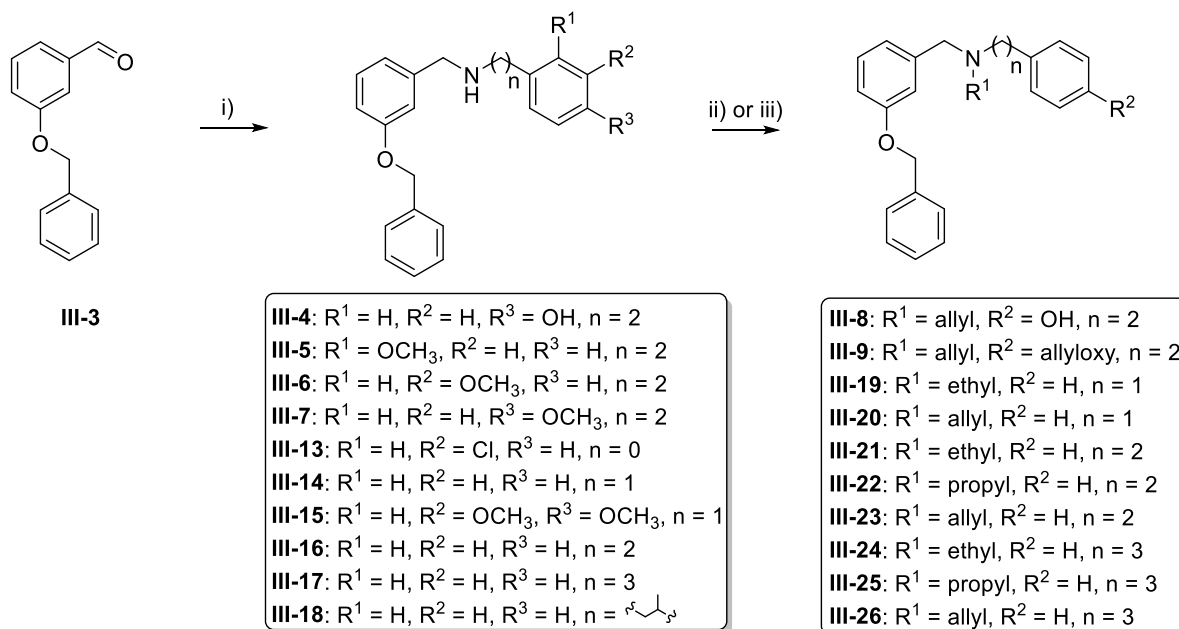
skupinami s elektrón-donorovými alebo elektrón-akceptorovými vlastnosťami na aromatickej časti (Obr. 18, fragment C). V tejto snahe bolo navrhnutých a syntetizovaných celkovo 41 nových potenciálnych inhibítorov hBChE.



Obr. 18. Chemické štruktúry predlohových štruktúr, konkrétne alkaloidu karltonínu B, vzorových zlúčenín I-5 a I-6, a návrh nových inhibítorov hBChE relevantných pre túto štúdiu.

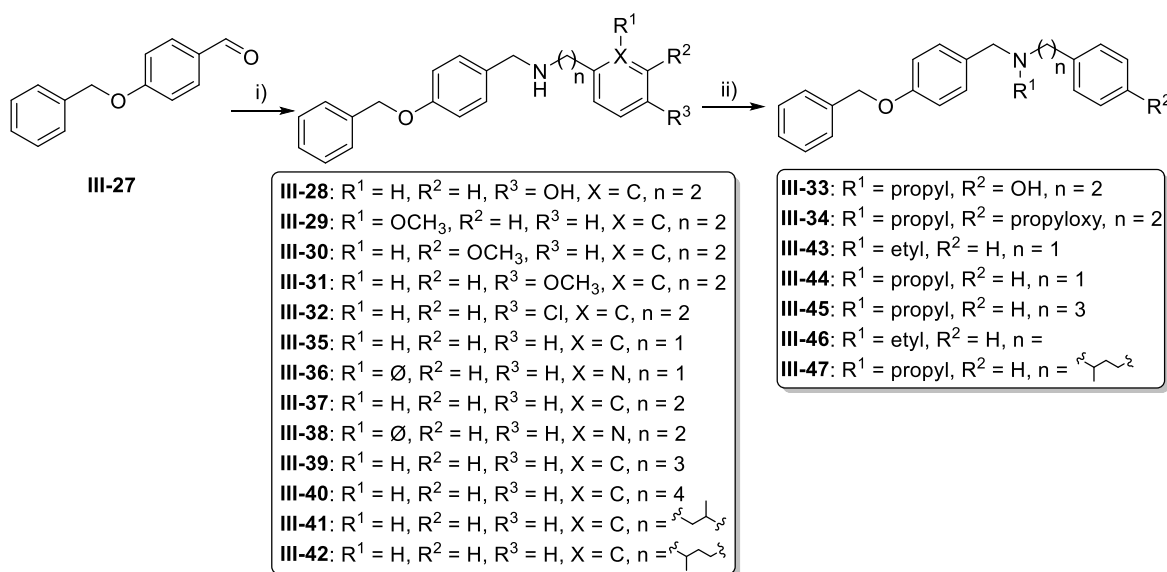
Syntetická cesta začala komerčne dostupným 3-benzyloxybenzaldehydom (III-3), ktorý bol spolu s tyramínom reductívnou amináciou prevedený na vedúcu zlúčeninu III-4 (Obr. 19). Tá bola ďalej modifikovaná allylovou substitúciou prednostne na nukleofilnejšom dusíku a následnou éterifikáciou fenolu za vzniku III-8 a III-9. Následne sme skúmali vplyv reťazca z hľadiska jeho dĺžky III(13-26) a rozvetvenia III-18, vrátane substitúcie

na fragmente C (Obr. 19). Pridaním allylových, etylových alebo propylových substituentov, bola sekundárna aminoskupina konvertovaná na terciárnu **III(19-26)** (Obr. 19).



Obr. 19. Syntéza finálnych zlúčenín **III(4-9)** a **III(13-26)** vychádzajúca z 3-benzyloxybenzaldehydu. Činidlá a podmienky: i) vybraný primárny amín, MeOH, RT, 24 h, následne NaBH₄, 0 °C → RT, 3 h, 79-100%; ii) pre **III-8**, **III-9**, **III-20**, **III-23** a **III-26**: allylbromid, THF, NaH, 0 °C, 30 min → RT, 24 h, 45-69%; iii) pre **III-19**, **III-21**, **III-22**, **III-24** a **III-25**: vybraný halogenalkán, CH₃CN, K₂CO₃, KI kat., reflux, 24 h, 25-95%.

V snahe zlepšiť požadovanú aktivitu, po neúspechoch s *m*-substituovanými zlúčeninami, sme sa zamerali na *p*-polohové izoméry s benzyloxy skupinou. Syntetický postup zahŕňal reductívnu amináciu aldehydu **III-27** s rôzne substituovanými amínmi za vzniku **III(28-32)** (Obr. 20). Najprv sme *N*/*O* alkylovali **III-28** za vzniku **III-33** a **III-34**. Reduktívna aminácia bola použitá pri syntéze zlúčenín **III(35-42)**, pričom sme skúmali vplyv rôznych linkerov (predĺženie a rozvetvenie) spájajúcich bázické centrum s fragmentom C v podobe fenylu alebo pyridín-2-ylu. V prípade **III-35**, **III-39** a **III-42** sme ďalej alkylovali dusík etyl alebo propyl substitúciou za vzniku **III(43-47)**.



Obr. 20. Syntéza finálnych zlúčenín **III(28-47)** vychádzajúca z 4-benzyloxybenzaldehydu. Činidlá a podmienky: i) vybraný primárny amín, MeOH, RT, 24 h, následne NaBH₄, 0 °C → RT, 3 h, 34-100%; ii) vybraný halogenalkán, CH₃CN, K₂CO₃, KI kat., reflux, 24 h, 47-96%.

Obdobne ako v predchádzajúcich štúdiách boli všetky finálne zlúčeniny podrobené skríningu pri 10 µM, čo nám umožnilo identifikovať kandidátov, ktorí vykazujú inhibičnú účinnosť >50% voči aspoň jednej ChE. Na základe našich predpokladov doložených *in vitro* testovaním nevykazovali všetky zlúčeniny žiadnu inhibičnú účinnosť pre hAChE a boli selektívne pre hBChE (Tab. 7 a 8).

Dva pilotné deriváty prvej série preukázali rozdielne vzory inhibície. Derivát **I-6** (hBChE IC₅₀ = 72 ± 5 nM) sa ukázal ako potentný inhibítor, naopak jeho polohový izomér **I-5** nevykazoval žiadnu aktivitu. Ďalšie štúdium SAR pokračujúcej série bolo zamerané na zjednodušenie štruktúry absenciou metoxy skupiny na fragmente A. Tieto prvotné snahy generovali hydroxy substituované polohové izoméry **III-4** a **III-28**, so zlepšeným inhibičným profilom (**III-4**: hBChE IC₅₀ = 0,193 ± 0,055 µM; **III-28**: hBChE IC₅₀ = 0,171 ± 0,063 µM) v porovnaní s 3 a 4-metoxy derivátmi prvej série (**I-1**: hBChE IC₅₀ = 0,36 ± 0,03 µM; **I-2**: hBChE IC₅₀ = 0,29 ± 0,02 µM). Následne sme sa u týchto zlúčenín zamerali na N/O substitúciu allylom a propylom. Monosubstitúcia allylom v prípade **III-8** viedla k miernemu zhoršeniu aktivity, zatiaľ čo monosubstitúcia propylom v prípade **III-33** nevykazovala takmer žiadny posun v aktivite. Disubstitúcia v prípade zlúčenín **III-9** a **III-34** však viedla k úplnej strate inhibičnej aktivity. Éterifikácia fenolu allylovou skupinou v **III-12** viedla k poklesu inhibičnej aktivity, čo poukázalo, že v prípade monosubstitúcie je preferované

formovanie terciárneho amínu. Na základe týchto zistení sme pozornosť presmerovali na fragment C, kde sme skúmali náhradu hydroxylovej skupiny metoxy skupinou v rôznych pozíciách **III(5-7)** a **III(29-31)**, alebo atómom chlóru **III-32**, pričom aktivita klesala v poradí *p*->*m*->*o*-pozície metoxy skupiny, avšak celkovo nevedli k zásadnému zlepšeniu inhibičnej aktivity. Ďalšie úsilie bolo zamerané na vplyv dĺžky spojovacieho linkeru medzi dvoma aromatickými kruhmi fragmentu B. Z rady zlúčenín odvodených od 3-benzyloxybenzaldehydu, boli pripravené zlúčeniny s linkerom od 0 do 4 metylénových jednotiek. Konkrétne **III-13**, odvodená z 3-chloroanilínu a **III-15** s 3,4-dimetoxy substitúciou sa ukázali byť úplne neaktívne. Naopak, **III-14**, **III-16** a **III-17** s 1 až 3 metylénovými jednotkami vykazovali takmer identické aktivity (**III-14**, **III-17**: *h*BChE IC₅₀ = 0,5 ± 0,1 μM; **III-16**: *h*BChE IC₅₀ = 0,6 ± 0,1 μM). Naopak, u zlúčenín **III(35-40)**, odvodených od 4-benzyloxybenzaldehydu, bolo pozorované zlepšenie inhibičnej aktivity s rastúcou dĺžkou linkeru, avšak vo výsledku boli menej aktívne ako zlúčeniny predchádzajúcej skupiny. Zavedenie pyridínového heterocyklu do fragmentu C u **III-36** a **III-38** malo negatívny dopad na aktivitu. Rozvetvenie spojovacieho linkeru v prvej skupine viedlo k zlepšeniu aktivity (**III-18**: *h*BChE IC₅₀ = 0,188 ± 0,023 μM. Pre druhú skupinu odvodenú od **III-27** bol pri použití rovnakého linkeru zaznamenaný pokles aktivity, ako ukazuje **III-41** (*h*BChE IC₅₀ = 1,6 ± 0,1 μM). S ďalším predĺžením a rozvetvením v prípade **III-42** došlo k miernemu zlepšeniu (*h*BChE IC₅₀ = 0,5 ± 0,1 μM). Po miernom úspechu alkylácie dusíka v prípade **III-33**, nasledovali pokusy o formovanie terciárneho amínu zavedením krátkych substituentov (*N*-allyl, *N*-etyl, *N*-propyl) za vzniku **III(19-26)** a **III(43-47)**. Tieto úpravy však priniesli len zanedbateľné zmeny v požadovanom efekte.

Na odhad spôsobu interakcie najaktívnejšieho derivátu **III-33** s *h*BChE bola realizovaná kinetická štúdia. Štatistická analýza ukázala zmiešaný typ inhibície a reverzibilný typ väzby na enzým.

Tabuľka 7. *In vitro* inhibícia hBChE III(4-9), III(12-26) a ich predpokladaná dostupnosť v CNS.

Zlúčenina	R ¹	R ²	n	% Inhibícia of hBChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^b	BBB skóre ^c
III-4	H	4-OH	2	96,0 ± 0,8	0,193 ± 0,055	4,9
III-5	H	2-OMe	2	94,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1	5,2
III-6	H	3-OMe	2	78,0 ± 0,4	2,7 ± 0,2	5,2
III-7	H	4-OMe	2	73,0 ± 0,6	4,8 ± 0,2	5,1
III-8	allyl	4-OH	2	92,0 ± 0,5	0,6 ± 0,1	5,1
III-9	allyl	4-allyloxy	2	46,0 ± 1,7	>10	5,0
III-12	H	4-allyloxy	2	76,0 ± 0,5	4,0 ± 1,0	5,1
III-13	H	3-Cl	0	7,5 ± 0,4	>10	4,8
III-14	H	H	1	92,0 ± 0,3	0,5 ± 0,1	5,3
III-15	H	3,4-diOMe	1	49,0 ± 1,4	>10	4,9
III-16	H	H	2	91,0 ± 0,9	0,6 ± 0,1	5,3
III-17	H	H	3	89,0 ± 1,8	0,6 ± 0,1	5,3
III-18	H	H		96,0 ± 0,3	0,188 ± 0,023	5,3
III-19	ethyl	H	1	88,0 ± 1,1	0,5 ± 0,1	5,1
III-20	allyl	H	1	36,0 ± 0,8	>10	5,1
III-21	ethyl	H	2	91,0 ± 0,4	0,4 ± 0,1	5,1
III-22	propyl	H	2	81,0 ± 0,8	0,7 ± 0,1	5,0
III-23	allyl	H	2	60,0 ± 0,4	7,7 ± 1,7	5,0
III-24	ethyl	H	3	94,0 ± 0,6	0,6 ± 0,1	5,0
III-25	propyl	H	3	89,0 ± 0,8	0,54 ± 0,03	4,9
III-26	allyl	H	3	76,0 ± 1,7	1,2 ± 0,3	5,0
galantamín ^d				29,0 ± 3,5	34,0 ± 2,7	5,0
eserín ^d				96,0 ± 0,3	0,30 ± 0,01	5,0

^a Testované pri koncentrácii zlúčeniny 10 μM; ^b Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaníach; ^c Vypočítané hodnoty BBB skóre; ^d Referenčná zlúčenina.

Tabuľka 8. *In vitro* inhibícia hBChE **III(28-47)** a ich predpokladaná dostupnosť v CNS.

Zlúčenina	R ¹	R ²	n	X	% Inhibícia of hBChE ± SEM ^a	IC ₅₀ , hBChE ± SEM (μM) ^b	BBB skóre ^c
III-28	H	4-OH	2	CH	97,0 ± 0,3	0,171 ± 0,063	4,9
III-29	H	2-OMe	2	CH	89,0 ± 0,9	0,8 ± 0,2	5,2
III-30	H	3-OMe	2	CH	66,0 ± 0,1	4,9 ± 1,0	5,1
III-31	H	4-OMe	2	CH	93,0 ± 0,2	3,0 ± 0,6	5,1
III-32	H	4-Cl	2	CH	85,0 ± 1,0	0,7 ± 0,2	5,2
III-33	propyl	4-OH	2	CH	95,0 ± 1,1	0,167 ± 0,018	5,1
III-34	propyl	4-propyloxy	2	CH	30,0 ± 0,9	>10	5,0
III-35	H	H	1	CH	60,0 ± 0,1	2,8 ± 0,6	5,3
III-36	H	H	1	N	18,0 ± 0,5	>10	5,1
III-37	H	H	2	CH	81,0 ± 1,4	2,0 ± 0,3	5,3
III-38	H	H	2	N	23,0 ± 1,0	>10	5,2
III-39	H	H	3	CH	90,0 ± 0,3	0,7 ± 0,1	5,3
III-40	H	H	4	CH	85,0 ± 0,6	0,8 ± 0,1	5,2
III-41	H	H		CH	88,0 ± 1,0	1,6 ± 0,1	5,2
III-42	H	H		CH	92,0 ± 0,5	0,5 ± 0,1	5,2
III-43	etyl	H	1	CH	50,0 ± 1,1	>10	5,1
III-44	propyl	H	1	CH	18,0 ± 0,3	>10	5,1
III-45	propyl	H	3	CH	93,0 ± 0,8	0,29 ± 0,04	4,9
III-46	etyl	H		CH	87,0 ± 1,5	0,5 ± 0,3	4,9
III-47	propyl	H		CH	93,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3	4,9
galantamín ^d					29,0 ± 3,5	34,0 ± 2,7	5,0
eserín ^d					96,0 ± 0,3	0,30 ± 0,01	5,0

^a Testované pri koncentrácii zlúčeniny 10 μM; ^b Koncentrácia zlúčeniny potrebná na zníženie aktivity enzýmu o 50 %; hodnoty sú priemer ± SEM troch nezávislých meraní, každé vykonané v troch opakovaniach; ^c Vypočítané hodnoty BBB skóre; ^d Referenčná zlúčenina.

Za účelom rozlíšiť hlavné determinanty zodpovedné za vysokú inhibičnú aktivitu zlúčeniny **III-33** a hBChE-neaktívnou **III-9** sme vykonali molekulové modelovanie v tandeme so simuláciou molekulovej dynamiky. Najlepšie hodnotená dokovacia pozícia **III-9** ukazuje U-tvarovaný ligand deformovaný v aktívnom mieste hBChE. Poskytuje hlavne hydrofóbne interakcie s aromatickými zvyškami AMK a pravdepodobný kontakt protonizovanej amóniovej časti s prolínom (P285). Deformáciu zlúčeniny hlavne ovplyvňuje fenylalanín (F329), pričom geometria molekuly s 3-benzyloxy substitúciou naznačuje nevhodné zapadnutie do enzýmovej úžiny. Aktívny hBChE ligand **III-33**, sa viaže v odlišnej pozícii aktívneho miesta v predĺženej konformácii. Molekula interaguje s dvoma tryptofanovými zvyškami (W82, W231) cez π-π interakciu. Ligand je ukotvený prostredníctvom amóniovej časti katión-π interakciou k tyrozínu (Y332). Voľná fenolická

hydroxylová skupina je kľúčová pre vysokú afinitu, keďže vytvára viaceré vodíkové väzby a prispieva k optimálnej orientácii v aktívnom mieste *hBChE*.

Algoritmus na výpočet BBB skóre sme opäť použili na predikciu prestupu do CNS. V tejto štúdii všetkých 41 finálnych zlúčenín preukázalo hodnoty skóre v rozsahu 4,8 až 5,3 (Tab. 7 a 8), čo indikuje ich potenciál efektívne prechádzať hematoencefalickou bariérou. Okrem toho sme experimentálne určili schopnosť 12 najaktívnejších inhibítorov *hBChE* prechádzať cez BBB pomocou PAMPA testu. Z meraní (Tab. 9) vyplýva, že všetky vybrané zlúčeniny by mali prechádzať cez BBB pasívnou difúziou. Metodika bola validovaná na súbore zlúčenín, ktoré sú známe svojou aktivitou v CNS.

Vzhľadom na to, že CNS je navrhovaným cieľovým miestom skúmaných zlúčenín, neurotoxicita najsilnejších inhibítorov *hBChE* (**III-4**, **III-5**, **III-18**, **III-28** a **III-33**) bola hodnotená voči SH-SY5Y bunečnej línii. Zároveň s ohľadom na chronický charakter AD, vyžadujúci dlhodobé užívanie liečiv, bola hodnotená hepatotoxicita na HepG2 línii. Všeobecne bola pozorovaná zvýšená citlivosť SH-SY5Y línie voči skúmaným derivátom, najmä v prípade **III-28** a **III-5**, ktoré vykázali najvýznamnejšiu cytotoxicitu ($IC_{50} = 13 \mu\text{M}$ a $16 \mu\text{M}$). Galantamín a vedúca zlúčenina **I-1** z prvej série boli použité ako referenčné zlúčeniny. Údaje naznačili, že napriek ich zvýšenej neurotoxicite možno novo syntetizované zlúčeniny považovať za bezpečné (podľa predpovede hodnôt indexu bezpečnosti SI, Tab. 9) vďaka ich výrazne vyššej inhibičnej účinnosti voči *hBChE*.

Najlepšie hodnotená zlúčenina **III-33** bola ďalej skúmaná z hľadiska „drug-likeness“, pričom sa testovala jej rozpustnosť vo vode, kde dosiahla koncentráciu $267 \mu\text{M}$. Zároveň bola študovaná stabilita v ľudských pečenejých mikrozómoch (HLM) a v plazmatických podmienkach. Ako referencie bol použitý diazepam a verapamil s nízkym, resp. vysokým metabolickým obratom. Verapamil vykazoval pri hodnotení HLM stability vysoký vnútorný klírens ($CL_{int} = 90,1 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) s krátkym polčasom ($T_{1/2} = 15,40 \text{ min}$), zatiaľ čo diazepam vykazoval nízky metabolický klírens ($CL_{int} = 4,6 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) a predĺžený polčas ($T_{1/2} = 301,30 \text{ min}$). V porovnaní s referenčnými zlúčeninami vykazovala **III-33** kratší polčas ($T_{1/2} = 8,62 \text{ min}$) podobne ako v prípade verapamilu. Zlúčenina **III-33** však vykazovala mierne zvýšený vnútorný klírens ($CL_{int} = 161,0 \mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) v porovnaní s verapamilom, čo znamená vyššiu rýchlosť metabolického obratu. Po inkubácii **III-33** s ľudskou plazmou

zostalo po 120 minútach 94,5 % zlúčeniny nezmenených, čo naznačuje stabilný plazmatický profil.

Tabuľka 9. Predikcia BBB penetrácie a údaje o cytotoxicite vybraných zlúčenín.

Zlúčenina	Odhad penetrácie BBB		Cytotoxicita		SI ^d
	Pe ± SEM ^a ($\times 10^{-6}$ cm s ⁻¹)	CNS(+/-) ^b	SH-SY5Y IC ₅₀ ± SEM (μ M) ^a	HepG2 IC ₅₀ ± SEM (μ M) ^a	
III-4	14,0 ± 0,4	CNS +	21,0 ± 2,4	60,0 ± 4,0	310
III-5	6,2 ± 0,7	CNS +	16,0 ± 2,8	52 ± 10	130
III-14	9,8 ± 2,9	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-18	8,1 ± 0,6	CNS +	36,0 ± 1,4	55,0 ± 6,9	290
III-19	36 ± 14	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-21	21,0 ± 0,6	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-25	33,0 ± 6,8	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-28	10,0 ± 0,5	CNS +	13,0 ± 1,2	85 ± 12	500
III-33	11,0 ± 2,2	CNS +	38,0 ± 3,5	93 ± 11	560
III-42	22,0 ± 4,2	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-45	25,0 ± 2,9	CNS +	n.t.	n.t.	–
III-46	36,0 ± 2,0	CNS +	n.t.	n.t.	–
I-1	n.t. ^c	–	> 125	n.t.	–
furosemid	0,20 ± 0,07	CNS -	n.t.	n.t.	–
chlorotiazid	1,1 ± 0,5	CNS -	n.t.	n.t.	–
donepezil	22,0 ± 2,1	CNS +	n.t.	n.t.	–
rivastigmín	20,0 ± 2,1	CNS +	n.t.	n.t.	–
galantamín	6,7 ± 0,7	CNS +	4700 ± 210	4200 ± 200	120

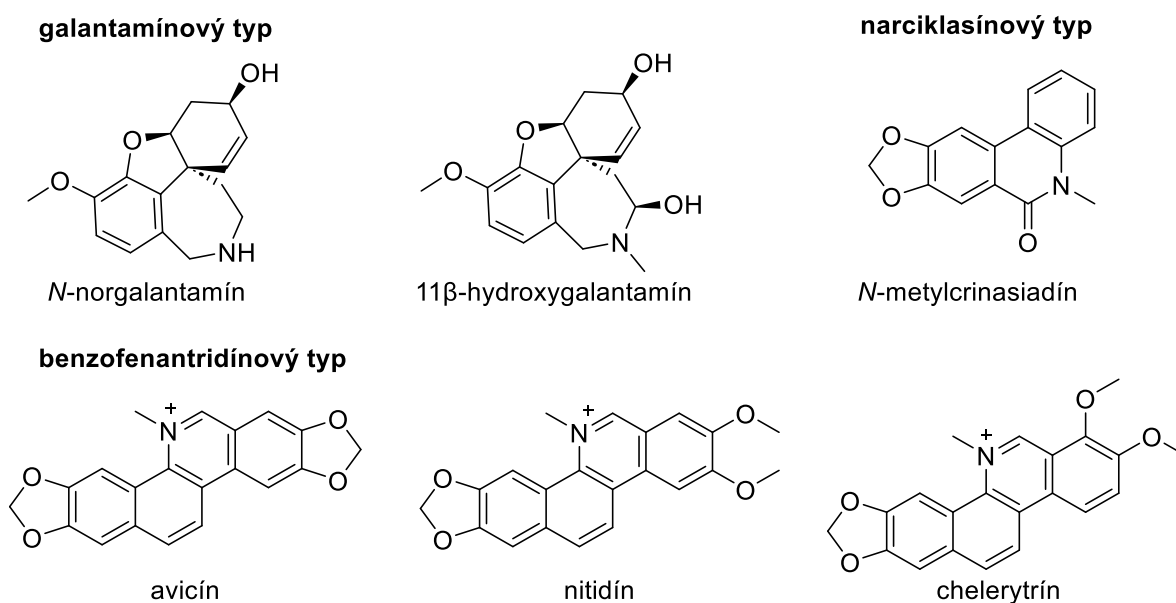
^a Výsledky sú vyjadrené ako priemer minimálne troch experimentov. ^b CNS + (predpokladaná vysoká permeácia BBB): Pe ($\times 10^{-6}$ cm s⁻¹) > 4,0; CNS - (predpokladaná nízka permeácia BBB): Pe ($\times 10^{-6}$ cm s⁻¹) < 2,0; CNS +/- (BBB permeácia neistá): Pe ($\times 10^{-6}$ cm s⁻¹) od 4,0 do 2,0. ^c n.t. netestované. Index bezpečnosti je počítaný ako HepG2 IC₅₀/hBChE IC₅₀.

4.4 Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease

V tomto prehľadovom článku systematicky mapujeme dostupné farmakologické ciele v liečbe komplexného neurodegeneratívneho ochorenia AD. Zvláštnu pozornosť sme venovali nedávno izolovaným alebo novo skúmaným IAs v období rokov 2010 až 2021, ktoré vykázali potenciál v boji proti AD. V článku podrobne popisujeme niekoľko kľúčových enzýmov a receptorových cieľov, ktoré sú potenciálne využiteľné vo vývoji liekov proti AD, vrátane AChE a BChE, zohrávajúcich zásadnú úlohu v regulácii ACh, ako aj NMDAR, GSK-3 β , CDK5, POP a monoaminoxidáza (MAO). Je dôležité zdôrazniť, že výber zdroja enzýmov

pre *in vitro* hodnotenie inhibície ChE môže kriticky ovplyvniť výsledné hodnoty IC_{50} . Napríklad, odlišné výsledky IC_{50} pre jednu zlúčeninu môžu byť získané pri použití enzýmov z rôznych zdrojov, ako sú AChE z elektrického úhora (*EeAChE*), AChE z myšieho mozgu, BChE z konského séra (*EgBChE*), alebo ľudskej ChE. Na to je možné poukázať u acetylkaranínu, ktorý dosiahol zaujímavú aktivitu proti *EeAChE* ($IC_{50} = 11,7 \pm 0,7 \mu M$), ale jeho inhibičná účinnosť bola slabá pri testovaní s *hAChE* ($IC_{50} = 443,7 \pm 62,4$). Podobne, 1-*O*-acetyllykorín bol účinný proti *EeAChE* ($IC_{50} = 0,96 \pm 0,04 \mu M$), ale neaktívny voči *hAChE* ($IC_{50} > 1000 \mu M$).

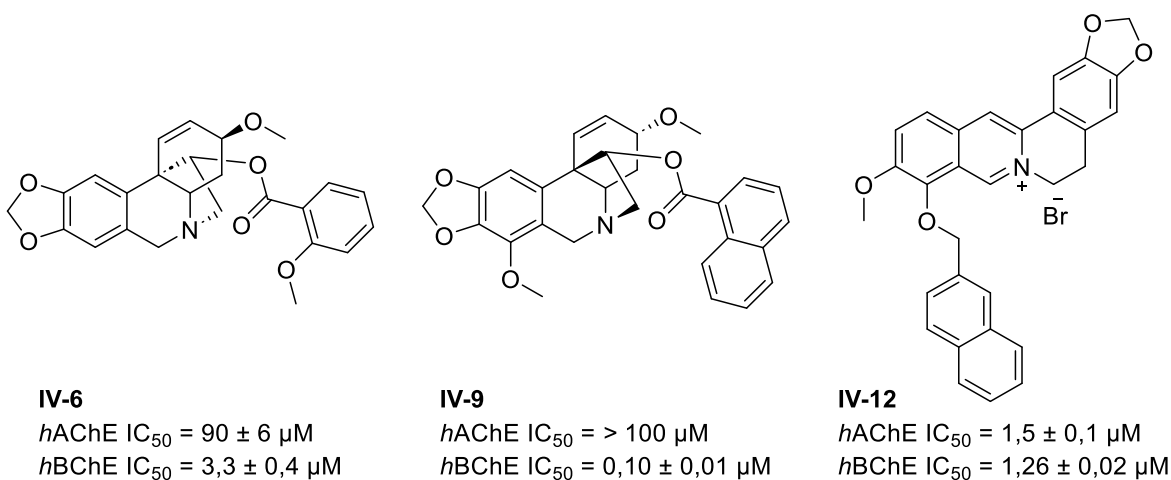
V posledných rokoch boli na našom pracovisku z rastlín čeľade Amaryllidaceae izolované dva nové štruktúrne typy AAs, pomenované narcikachnínový a karltonínový typ. Ako už bolo podrobne popísané v predchádzajúcich častiach tejto práce, oba typy alkaloidov preukázali sľubnú biologickú aktivitu v kontexte AD, preto sa ich detailný komentár v tomto odseku pre prehľadnosť opakovať nebude. Okrem toho boli izolované ďalšie alkaloidy patriace do známych štruktúrnych typov, ako sú alkaloidy galantamínového a narciklasínového typu, ktoré boli hodnotené z hľadiska ich ChE účinnosti (Obr. 21). Spomedzi nich najlepšiu inhibičnú aktivitu voči AChE preukázal *N*-norgalantamín (*EeAChE* $IC_{50} = 2,76 \pm 0,65 \mu M$) a 11 β -hydroxygalantamín (*EeAChE* $IC_{50} = 3,04 \pm 0,61 \mu M$), ktoré boli izolované z *Pancreatium maritimum* a *Lycoris longituba*. *N*-metylkrinasiadín, patriaci do narciklasínového typu a izolovaný z *L. longituba*, vykazoval taktiež zaujímavú inhibičnú aktivitu (*EeAChE* $IC_{50} = 4,23 \pm 1,13 \mu M$).



Obr. 21. Vybrané príklady AAs a IAs so zaujímavou biologickou aktivitou v súvislosti AD.

V priebehu poslednej dekády boli z rastlín mimo čel'ad' Amaryllidaceae izolované ďalšie IAs, ktoré boli predmetom štúdií zameraných na ich biologickú aktivitu súvisiacu s AD. Najúčinnnejšie príklady týchto alkaloidov, patria prevažne do benzofenantridínového typu (Obr. 21). Avicín a nitidín, oba izolované zo *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae), a chelerytrín izolovaný z *Chelidonium majus* (Papaveraceae) sú charakterizované ako multitargetné ligandy so sľubnou aktivitou voči ChE, MAO-A a antiagregačnou A β aktivitou (avicín: *hAChE* IC₅₀ = 0,52 \pm 0,05 μ M; *EqBChE* IC₅₀ = 0,88 \pm 0,08 μ M; MAO-A IC₅₀ = 0,41 \pm 0,02 μ M; A β IC₅₀ = 5,56 \pm 0,94 μ M), (nitidín: *hAChE* IC₅₀ = 1,25 \pm 0,09 μ M; *EqBChE* IC₅₀ = 5,73 \pm 0,60 μ M; MAO-A IC₅₀ = 1,89 \pm 0,17 μ M; A β IC₅₀ = 1,89 \pm 0,40 μ M) a (chelerytrín: *hAChE* IC₅₀ = 3,78 \pm 0,15 μ M; *EqBChE* IC₅₀ = 6,33 \pm 0,93 μ M; MAO-A IC₅₀ = 0,55 \pm 0,04 μ M; A β IC₅₀ = 4,20 \pm 0,43 μ M) (Obr. 21).

Inšpirácia významnou biologickou aktivitou AAs a IAs, sa stala podnetom k syntéze semisyntetických zlúčenín. Príklady esterových a éterových derivátov odvodených od AAs α - a β -krinanového typu využívajúce haemantamín (**IV-6**) a ambellín (**IV-9**) boli doplnené o IA berberín (**IV-12**) (Obr. 22). Tieto deriváty prispeli k vývoju nových derivátov s vyššou ChE aktivitou v porovnaní s východiskovými alkaloidmi. Uvedený prehľadový článok poukázal na to, že alkaloidy AAs a IAs predstavujú bohatý zdroj chemických štruktúr s nádejnými neurofarmakologickými vlastnosťami. Tie sú kľúčové pre ďalšie skúmanie a optimalizáciu chemického základu, čo môže viesť k vzniku potenciálnych kandidátov, ktorí sa môžu uplatniť vo výskume a jedného dňa prípadnej terapii AD.



Obr. 22. Vybrané príklady semisyntetických derivátov haemantamínu, ambellínu a berberínu.

5 ZÁVER

V historickom vývoji zdravotných výziev ľudskej populácie sme svedkami prechodu od akútnych k chronickým a neurodegeneratívnym ochoreniam. Tento trend odráža pokroky v medicíne, ako aj zmeny v životnom štýle, ktoré spolu prispeli k predĺženiu priemernej dĺžky života [167]. AD je najrozšírenejším typom demencie a stále je to ochorenie, ktorému chýba účinná liečba. Vzhľadom na nevyriešený stav tejto choroby je výskum a vývoj nových farmaceutických prípravkov veľmi potrebný a očakávaný.

Galantamín, selektívny a reverzibilný inhibítor *hAChE*, predstavuje najznámejší príklad z čeľade *Amaryllidaceae*. Vďaka svojim farmakologickým vlastnostiam zohráva kľúčovú úlohu v zlepšovaní kvality života pacientov trpiacich AD. Jeho úspech v terapeutickej praxi nás motivuje pokračovať vo výskume ďalších alkaloidov tejto čeľade s cieľom objaviť nové účinné látky, ktoré by mohli prispieť k rozvoju nových liečebných stratégií.

Na základe tejto premisy bola vykonaná izolačná fytochemická štúdia cibúľ *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, ktorá vyústila k identifikácii alkaloidov nových štruktúrnych typov. Pre alkaloidy karltonín A-E bol definovaný nový typ – karltonínový, zatiaľ čo narciabdulín bol zaradený do nedávno zavedeného narcikachnínového typu. Predovšetkým karltonín A a B vzbudili našu pozornosť svojou výnimočnou a selektívnou inhibíciou *hBChE*, pričom hodnoty IC_{50} dosahovali 910 ± 20 nM, resp. 31 ± 1 nM. Tieto alkaloidy sú však prítomné v rastlinnom materiáli len v stopových množstvách, čo komplikuje podrobnejšie skúmanie ich biologického profilu. Tento obmedzujúci faktor bol impulzom pre rozhodnutie ďalej rozvíjať molekuly štruktúrne odvodené od týchto nových alkaloidov.

Primárnym cieľom tejto štúdie bolo vyvinúť a posúdiť nové selektívne inhibítory *hBChE*. V rámci tejto práce boli syntetizované tri série derivátov, ktoré sú štruktúrne odvodené od karltonínov, pričom celkovo bolo pripravených 118 nových zlúčenín. Tieto zlúčeniny boli podrobené testovaniu na inhibičnú aktivitu voči ľudským ChE. Vďaka rozsiahlym štruktúrnym modifikáciám bol podrobne preskúmaný a definovaný SAR.

V rámci úvodnej fázy štúdie bola syntetizovaná séria 20 zlúčenín zameraných na zjednodušenie štruktúry karltonínových molekúl. Cieľom bolo overiť hypotézu, že signifikantná inhibičná aktivita voči *hBChE* je asociovaná s prítomnosťou

4-[2-(benzylamino)etyl]fenolového fragmentu. V štúdií sme sa zamerali na skúmanie vplyvu polohovej izomérie benzyloxy, metoxy resp. etoxy skupiny ako aj efekt substitúcie na *N/O* so zámerom zhodnotiť dopad na inhibičnú aktivitu. Analýzou týchto štruktúrnych variácií bol identifikovaný derivát **I-6** ako zlúčenina s najvýraznejšou inhibičnou aktivitou (*hBChE* $IC_{50} = 72 \pm 5$ nM). Zaujímavým zistením bolo, že v prípade zámeny polohy benzyloxy a metoxy skupín vzniká polohový izomér **I-5**, ktorý nevykazuje žiadnu inhibičnú aktivitu. Tieto zistenia boli ďalej podporené výsledkami *in silico* štúdie. Potenciál pre ďalšiu optimalizáciu týchto zlúčenín je ďalej doplnený kinetickou štúdiou zlúčeniny **I-6**, ktorá ukázala reverzibilný mechanizmus väzby na enzým. Navyše, najaktívnejší derivát preukázal priaznivý cytotoxický profil voči bunecnej línii SH-SY5Y.

Vzhľadom na to, že počiatočná štúdia poukázala na kritický význam polohovej izomérie pre inhibíciu *hBChE*, rozhodli sme sa túto problematiku podrobne preskúmať. V druhej sérii došlo k posunu substituentov na fragmente A, do polohy 2-benzyloxy-3-metoxy a teda do bezprostrednej blízkosti spojovacieho reťazca. Tento prístup viedol k príprave 57 finálnych zlúčenín, ktoré si zachovali selektívny *hBChE* inhibičný profil v mikromolárnom až jednocifernom nanomolárnom rozsahu. Identifikovali sme celú radu perspektívnych zlúčenín, pričom najzaujímavejších výsledkov dosiahli molekuly v prípade zavedenia substitúcie fluórom a cykloalkylového substituentu na centrálnom dusíku. Konkrétne, zlúčeniny **II-87** (*hBChE* $IC_{50} = 3,8 \pm 0,2$ nM) a **II-88** (*hBChE* $IC_{50} = 5,7 \pm 1,5$ nM) predstavujú najefektívnejšie inhibítory v rámci skupiny, bez aktivity voči *hAChE*, čím získavajú unikátny selektívny profil. Zo získaných výsledkov možno postulovať, že výrazná inhibičná účinnosť *hBChE* súvisí s prítomnosťou *N*-benzyl-3-fenylpropán-1-amínovej časti. Zavedenie fluóru do aromatickej oblasti (fragment C) a alifatických cyklických častí (amino substitúcia) do molekuly signifikantne ovplyvnilo inhibičný efekt. U zlúčenín, ktoré dosiahli inhibíciu pod 100 nM, bola s využitím PAMPA metódy potvrdená pasívna difúzia cez BBB. Z pohľadu bezpečnosti dosiahli vybrané molekuly priaznivý cytotoxický profil voči SH-SY5Y a HepG2 bunecným líniam. U najaktívnejšej zlúčeniny **II-87** bol enzýmovou kinetickou analýzou potvrdený reverzibilný väzbový profil do aktívneho miesta *hBChE*. Kryštalografická štúdia ďalej odhalila niekoľko kľúčových interakcií medzi **II-87** a *hBChE*. Vzhľadom na vysokú nanomolárnu inhibičnú účinnosť *hBChE*, nízku cytotoxicitu, potenciálny CNS prestup a jedinečné umiestnenie zlúčeniny **II-87** v aktívnom mieste *hBChE*,

predstavuje táto molekula cenný objav pre ďalšiu fázu výskumu liečiv s potenciálnym využitím na liečbu stredného až neskorého štádia AD.

V tretej sérii, ktorá bezprostredne nadväzuje na prvú sériu derivátov, sme úspešne syntetizovali 41 nových zlúčenín. Tieto nové molekuly vznikli zjednodušením predlohových štruktúr, konkrétne absenciou metoxy skupiny v *m*- alebo *p*- pozícii na fragmente A. Prvá skupina derivátov, navrhnutá na základe SAR dát prvej série, bola charakterizovaná prítomnosťou benzyloxy skupiny v *m*- polohe. Na rozdiel od prvej série, kde postupná alkylácia viedla k najúčinnnejšej zlúčenine **I-6**, nová podskupina naopak vykázala postupný pokles inhibičnej účinnosti u zlúčenín **III-4** > **III-8** > **III-9** (**III-4**: $hBChE = 0,193 \pm 0,055 \mu M$; **III-8**: $hBChE = 0,6 \pm 0,1 \mu M$; **III-9**: $hBChE = > 10 \mu M$). V prípade izoméru **I-5**, neaktívnej zlúčeniny z prvej série s benzyloxy skupinou v *p*- polohe, sme v súvisiacej štúdii zaznamenali udržanie *hBChE* inhibičnej účinnosti pri *N*-propyl monosubstitúcii. Naopak, pri disubstitúcii došlo k úplnej strate inhibičnej účinnosti; **III-28** < **III-33** > **III-34** (**III-28**: $hBChE = 0,171 \pm 0,063 \mu M$; **III-33**: $hBChE = 0,167 \pm 0,018 \mu M$; **III-34**: $hBChE = > 10 \mu M$). Zlúčenina **III-33** bola identifikovaná ako najúčinnnejší zástupca tejto série. Na overenie získaných *in vitro* výsledkov sme realizovali *in silico* štúdiu, porovnávajúcu väzbové interakcie medzi vysoko aktívnou molekulou **III-33** a neaktívnou zlúčeninou **III-9**. Enzymová kinetická analýza zlúčeniny **III-33** potvrdila reverzibilný spôsob väzby na enzým. Schopnosť prestupu BBB bola s pozitívnym výsledkom overená u 12 najúčinnnejších derivátov, ktoré preukázali inhibíciu $hBChE \leq 0,54 \mu M$. Bezpečnostné hodnotenie, ktoré je zásadné pre dlhodobú farmakoterapiu, odhalilo zanedbateľné cytotoxické účinky na bunkové línie SH-SY5Y a HepG2 u piatich najaktívnejších zlúčenín. V rámci ďalšieho štúdia **III-33** sme stanovili jej rozpustnosť vo vode a potvrdili vysokú plazmatickú stabilitu aj uspokojivú HLM stabilitu.

V súčasnosti rozvíjame novú generáciu selektívnych inhibítorov *hBChE*, ktoré integrujú kľúčové aspekty preukázateľne dôležité pre inhibičný účinok na *hBChE*, a tým pokračujú v línii predchádzajúcich sérií zlúčenín. Hoci je naša štúdia ešte v počiatočných fázach, už teraz sme identifikovali radu sľubných nanomolárnych inhibítorov. Po podrobnejšom rozpracovaní syntetických postupov a vyhodnotení biologických testov sa chystáme na publikovanie získaných výsledkov. Tieto kroky nám umožnia poskytnúť vedeckej komunite nové informácie v oblasti ľudských ChE a zároveň nám poslúžia ako pevný základ pre ďalšie inovácie v tejto oblasti.

6 ZOZNAM PUBLIKÁCIÍ

6.1 Zoznam publikácií zahrnutých v dizertačnej práci

P1. Mamun, A.A.; **Pidany, F.**; Hulcova, D.; Marikova, J.; Kucera, T.; Schmidt, M.; Catapano, M.C.; Hrabínova, M.; Jun, D.; Muckova, L.; Kunes, J.; Janousek, J.; Andrys, R.; Novakova, L.; Perinova, R.; Maafi, N.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological activity evaluation, and docking studies. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 8308.

<https://doi.org/10.3390/ijms22158308>

IF₂₀₂₁ = 6,2; AIS₂₀₂₁ = 1,064

Q2_{2021/AIS} v BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY/ Q2_{2021/AIS} v CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY

Podiel autora: Design, syntéza a purifikácia časti zlúčenín. Sumarizácia a interpretácia získaných výsledkov. Finálna revízia publikácie.

P2. **Pidany, F.**; Kroustkova, J.; Mamun, A.A.; Suchankova, D.; Brazzolotto, X.; Nachon, F.; Chantegreil, F.; Dolezal, R.; Pulkrabkova, L.; Muckova, L.; Hrabínova, M.; Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Jenco, J.; Kunes, J.; Novakova, L.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids - Design, synthesis, and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, 252, 115301.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115301>

IF₂₀₂₂ = 6,7; AIS₂₀₂₂ = 0,965

Q1_{2022/AIS} v CHEMISTRY, MEDICINAL

Podiel autora: Design nových štruktúr a návrh ich syntézy. Syntéza a purifikácia všetkých zlúčenín. Príprava zlúčenín pre biologické testovanie. Testovanie inhibičného efektu voči obom ľudským cholinesterázam s vyhodnotením SAR. Interpretácia a sumarizácia výsledkov, hlavný podiel na príprave a revízii textu publikácie.

P3. **Pidany, F.**; Kroustkova, J.; Jenco, J.; Breiterova, K.; Muckova, L.; Novakova, L.; Kunes, J.; Fibigar, J.; Kucera, T.; Novak, M.; Sorf, A.; Hrabínova, M.; Pulkrabkova, L.; Janousek, J.;

Soukup, O.; Jun, D.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition. *RSC Medicinal Chemistry* **2024**, Advance article.

<https://doi.org/10.1039/D4MD00060A>

IF₂₀₂₂ = 4,1; AIS₂₀₂₂ = 0,892

Q2_{2022/AIS} v BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY/ Q1_{2022/AIS} v CHEMISTRY, MEDICINAL

Podiel autora: Design nových štruktúr a návrh ich syntézy. Syntéza a purifikácia časti zlúčenín. Príprava zlúčenín pre biologické testovanie. Testovanie inhibičného efektu voči obom ľudským cholinesterázam s vyhodnotením SAR. Interpretácia a sumarizácia výsledkov, hlavný podiel na príprave a revízii publikácie.

P4. Cahlikova, L.; Vrabec, R.; **Pidany, F.**; Perinova, R.; Maafi, N.; Mamun, A.A.; Ritomska, A.; Wijaya, V.; Blunden, G. Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules* **2021**, 26, 5240.

<https://doi.org/10.3390/molecules26175240>

IF₂₀₂₁ = 4,9; AIS₂₀₂₁ = 0,671

Q3_{2021/AIS} v BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY/ Q2_{2021/AIS} v CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY

Podiel autora: Účast na literárnej rešerši a selekcii vhodných publikácií. Tvorba chemických vzorcov, finálna revízia publikácie.

6.2 Zoznam publikácií nezahrnutých v dizertačnej práci

5. Koutova, D.; Maafi, N.; Muthna, D.; Kralovec, K.; Kroustkova, J.; **Pidany, F.**; Timbilla, A.A.; Cermakova, E.; Cahlikova, L.; Rezacova, M.; Havelek, R. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Amaryllidaceae alkaloid montanine on A549 and MOLT-4 human cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2023**, 166, 115295.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115295>

IF₂₀₂₂ = 7,5; AIS₂₀₂₂ = 0,966

Q1_{2022/AIS} v PHARMACOLOGY & PHARMACY/ Q2_{2022/AIS} v MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL

Podiel autora: Syntéza a purifikácia vybraných semisyntetických derivátov montanínového typu alkaloidov, konzultácia pri riešení syntetických problémov. Príprava zlúčenín pre biologické testovanie. Finálna revízia publikácie.

6. Maafi, N.; **Pidany, F.**; Marikova, J.; Korabecny, J.; Hulcova, D.; Kucera, T.; Schmidt, M.; Shammari, L.A.; Spulak, M.; Catapano, M.C.; Mecava, M.; Prchal, L.; Kunes, J.; Janousek, J.; Kohelova, E.; Jenco, J.; Novakova, L.; Cahlikova, L. Derivatives of montanine-type alkaloids and their implication for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological activity and *in silico* study. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2021**, 51, 128374.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128374>

IF₂₀₂₁ = 2,9; AIS₂₀₂₁ = 0,446

Q3_{2021/AIS} v CHEMISTRY, MEDICINAL/ Q2_{2021/AIS} v CHEMISTRY, ORGANIC

Podiel autora: Syntéza a purifikácia vybraných semisyntetických derivátov montanínového typu alkaloidov, konzultácia pri riešení syntetických problémov. Finálna revízia publikácie.

7 PREZENTÁCIA VÝSLEDKOV NA KONFERENCIÁCH

7.1 Prednášky

PIDANÝ, F.; BRAZZOLOTTO, X.; HRABINOVÁ, M.; KORÁBEČNÝ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Selective butyrylcholinesterase inhibitors structurally inspired by carltonine-type alkaloids – design, synthesis, and biological evaluation.

14. Postgraduální a postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 30.–31. 1. 2024, Hradec Králové.

PIDANÝ, F.; KORÁBEČNÝ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids – synthesis and biological evaluation.

13. Postgraduální a postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 1.–2. 2. 2023, Hradec Králové.

PIDANÝ, F.; MAMUN, A.A.; KŘOUSTKOVÁ, J.; HULCOVÁ, D.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Amaryllidaceae alkaloids as inspiration for the development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: the relationship between structure, effect, and toxicity.

12. Postgraduální a postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 1.–2. 2. 2022, Hradec Králové.

PIDANÝ, F.; MAMUN, A.A.; HULCOVÁ, D.; KŘOUSTKOVÁ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of selective butyrylcholinesterase inhibitors.

11. Postgraduální a postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, 27.–28. 1. 2021, Hradec Králové.

7.2 Posterové zdenia

PIDANÝ, F.; BRAZZOLOTTO, X.; HRABINOVÁ, M.; KORÁBEČNÝ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Synthesis and screening of carltonine mimetics for selective butyrylcholinesterase inhibition.

Bioactive Natural Products in Biology, Pharmacy and Cosmetics, PSE Young Scientists Meeting – Trends in Natural Products 2024, 21.–24. 5. 2024, Brno.

PIDANÝ, F.; KŘOUSTKOVÁ, J.; MAMUN, A.A.; BRAZZOLOTTO, X.; HRABINOVÁ, M.; KORÁBEČNÝ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors structurally inspired by Amaryllidaceae alkaloids – design, synthesis, and biological evaluation.

The 31st International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 11th International Congress on Biodiversity (ISCNP31 and ICOB11), 15.–19. 10. 2023, Neapol, Taliansko.

PIDANÝ, F.; MAMUN, A.A.; KŘOUSTKOVÁ, J.; HULCOVÁ, D.; BREITEROVÁ, K.H.; KORÁBEČNÝ, J.; CAHLÍKOVÁ, L.:

Amaryllidaceae alkaloids as inspiration for the development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: the relationship between structure, effect, and toxicity.

Recent Progress in Pharmacognosy and Phytochemistry Workshop, Charles University, Faculty of Pharmacy, 24.–25. 6. 2022, Hradec Králové.

7.3 Zahraničné stáže

Trojmesačná vedecká stáž na Inštitúte farmaceutických vied, Karl-Franzens-Universität Graz, Rakúsko. Pod vedením školiteľa prof. Rudolfa Bauera v rámci programu AKTION Rakúsko-Česká republika, (od 01.05.2023 – 31.07.2023).

8 LITERATÚRA

- [1] B.B. Petrovska, Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacog. Rev.*, 6 (2012) 1–5, <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>.
- [2] F. Dohnal, *Studijní texty k dějinám farmacie*. Univerzita Karlova; Karolinum, Praha (2014).
- [3] W. C. Evans, *Trease and Evans Pharmacognosy*. 16th edition. Elsevier health sciences: Edinburgh, UK, (2009).
- [4] G. Lockermann, Friedrich Wilhelm Serturmer: the discoverer of morphine, *J. Chem. Educ.*, 28 (1951) 277–279, <https://doi.org/10.1021/ed028p277>.
- [5] A.G. Pereira, L. Cassani, P. Garcia-Oliveira, P. Otero, S. Mansoor, J. Echave, J. Xiao, J. Simal-Gandara, M.A. Prieto, *Plant alkaloids: production, extraction, and potential therapeutic properties*, M. Caroch, S.A. Heleno, L. Barros (Eds.) Natural secondary metabolites: from nature, through science, to industry, Springer International Publishing, (2023) 157–200, https://doi.org/10.1007/978-3-031-18587-8_6.
- [6] A. Kornienko, A. Evidente, Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 1982–2014, <https://doi.org/10.1021/cr078198u>.
- [7] J.J. Nair, The plant family Amaryllidaceae: special collection celebrating the 80th birthday of professor Johannes van Staden, *Nat. Prod. Commun.*, 14 (2019) 1–3, <https://doi.org/10.1177/1934578X19872932>.
- [8] M. He, C. Qu, O. Gao, X. Hu, X. Hong, Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids, *RSC Adv.*, 5 (2015) 16562–16574, <https://doi.org/10.1039/C4RA14666B>.
- [9] S. Berkov, M. Atanasova, B. Georgiev, J. Bastida, I. Doytchinova, The Amaryllidaceae alkaloids: an untapped source of acetylcholinesterase inhibitors, *Phytochem. Rev.*, 21 (2022) 1415–1443, <https://doi.org/10.1007/s10072-023-07114-y>.
- [10] WHO, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (cit. 06. 02. 2024).
- [11] Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019, *Lancet Public Health*, 7 (2022) 105–125, [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8).
- [12] *Dementia in Europe yearbook 2019*. Estimating the prevalence of dementia in Europe. https://www.alzheimer-europe.org/sites/default/files/alzheimer_europe_dementia_in_europe_yearbook_2019.pdf (cit. 06.02.2024).
- [13] C.-S. Liang, D.-J. Li, F.-C. Yang, P.-T. Tseng, A.F. Carvalho, B. Stubbs, T. Thompson, C. Mueller, J.I. Shin, J. Radua, R. Stewart, T.K. Rajji, Y.-K. Tu, T.-Y. Chen, T.-C. Yeh, C.-K. Tsai, C.-L. Yu, C.-C. Pan, C.-S. Chu, Mortality rates in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's dementias: a systematic review and meta-analysis, *Lancet Healthy Longev.*, 2 (2021) 479–488, [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00140-9](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00140-9).
- [14] D.J. Newman, G.M. Cragg, Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019, *J. Nat. Prod.*, 83 (2020) 770–803, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
- [15] World Flora Online, <https://wfo.plantlist.org/taxon/wfo-7000000018-2023-12?page=1> (cit. 17.02.2024).

- [16] A. Evidente, Advances on the Amaryllidacea alkaloids collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean basin, *Molecules*, 28 (2023) 4055, <https://doi.org/10.3390/molecules28104055>.
- [17] Kvetena ČR, Amaryllidaceae, <http://www.kvetenacr.cz/celed.asp?IDceled=1> (cit. 17.02.2024).
- [18] J.J. Nair, J. Bastida, C. Codina, F. Viladomat, J. van Staden, Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a review, *Nat. Prod. Commun.*, 8 (2013) 1335–1350, <https://doi.org/10.1177/1934578X1300800938>.
- [19] Holubova D.: Botanická fotogalerie, [Galanthus nivalis :: BOTANICKÁ FOTOGALERIE \(botanickafotogalerie.cz\)](http://botanickafotogalerie.cz) (cit. 17.02.2024).
- [20] Holubova D.: Botanická fotogalerie, [Narcissus pseudonarcissus :: BOTANICKÁ FOTOGALERIE \(botanickafotogalerie.cz\)](http://botanickafotogalerie.cz) (cit. 17.02.2024).
- [21] Holubova D.: Botanická fotogalerie, [Leucojum vernum | bledule jarní :: BOTANICKÁ FOTOGALERIE \(botanickafotogalerie.cz\)](http://botanickafotogalerie.cz) (cit. 17.02.2024).
- [22] J.J. Nair, J. Van Staden, Traditional usage, phytochemistry and pharmacology of the South African medicinal plant *Boophone disticha* (L.f.) Herb. (Amaryllidaceae), *J. Ethnopharmacol.*, 151 (2014) 12–26, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.053>.
- [23] J.J. Nair, J. van Staden, S.L. Bonnet, A. Wilhelm, Distribution and diversity of usage of the Amaryllidaceae in the traditional remediation of infectious diseases, *Nat. Prod. Commun.*, 12 (2017) 635–639, <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200440>.
- [24] I. Desgagne-Penix, Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review, *Phytochem. Rev.*, 20 (2021) 409–431, <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>.
- [25] W. Li, C. Qiao, J. Pang, G. Zhang, Y. Luo, The versatile *O*-methyltransferase LrOMT catalyzes multiple *O*-methylation reactions in Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis, *Int. J. Biol. Macromol.*, 141 (2019) 680–692, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.011>.
- [26] D. Koutova, N. Maafi, R. Havelek, L. Opletal, G. Blunden, M. Rezacova, L. Cahlikova, Chemical and biological aspects of montanine-type alkaloids isolated from plants of the Amaryllidaceae family, *Molecules*, 25 (2020) 2337, <https://doi.org/10.3390/molecules25102337>.
- [27] T.-D. Nguyen, T.-T.T. Dang, Cytochrome P450 enzymes as key drivers of alkaloid chemical diversification in plants, *Front. Plant Sci.*, 12 (2021) 682181, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.682181>.
- [28] M. Koirala, K. Cristine Goncalves dos Santos, S.-E. Gelinias, S. Ricard, V. Karimzadegan, B. Lamichhane, N. Sameera Liyanage, N. Merindol, I. Desgagne-Penix, Auxin and light-mediated regulation of growth, morphogenesis, and alkaloid biosynthesis in *Crinum x powellii* ‘Album’ callus, *Phytochemistry*, 216 (2023) 113883, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2023.113883>.
- [29] J. Bastida, S. Berkov, L. Torras, N.B. Pigni, J.P. Andrade, V. Martinez, C. Codina, F. Viladomat, *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*; Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. D. Munoz-Torrero (Ed). Transworld Research Network: Kerala, India, (2011) 65–100.
- [30] A. Reis, K. Magne, S. Massot, L.R. Tallini, M. Scopel, J. Bastida, P. Ratet, J.A.S. Zuanazzi, Amaryllidaceae alkaloids: identification and partial characterization of montanine production in *Rhodophiala bifida* plant, *Sci. Rep.*, 9 (2019) 8471, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44746-7>.

- [31] S. Ka, M. Koirala, N. Mérindol, I. Desgagne-Penix, Biosynthesis and biological activities of newly discovered Amaryllidaceae alkaloids, *Molecules*, 25 (2020) 4901, <https://doi.org/10.3390/molecules25214901>.
- [32] M.B. Kilgore, T.M. Kutchan, The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery, *Phytochem. Rev.*, 15 (2016) 317–337, <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9451-z>.
- [33] V. Rao, *Phytochemicals: a global perspective of their role in nutrition and health*, R. Venketeshwer (Ed.) The genus *Galanthus*: a source of bioactive compounds. Rijeka, Croatia (2012) 235–254.
- [34] S. Berkov, E. Osorio, F. Viladomat, J. Bastida, *Chapter Two – Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids*, H.-J. Knölker (Ed.) The alkaloids: chemistry and biology, Academic Press, (2020), 113–185, <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002>.
- [35] E. Kohelova, *Alkaloidy Zephyranthes citrina (Amaryllidaceae): izolace, strukturní identifikace, biologická aktivita*. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta (2021). Prístupné 23.04.2024. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/150516>.
- [36] A.A. Mamun, *Amaryllidaceae alkaloidy rodu Narcissus a jejich biologická aktivita*. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta (2022). Prístupné 23.04.2024. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/172406>.
- [37] F. Carmona-Viglianco, D. Zaragoza-Puchol, G.E. Feresin, F.R. Bisogno, M. Kurina-Sanz, A.A. Orden, Fungal biotransformations of anticholinesterase norbelladine derivatives to obtain new products and mimic mammalian metabolism, *Phytochem. Lett.*, 51 (2022) 5–11, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2022.06.008>.
- [38] L. Cahlikova, S. Zavadil, K. Macakova, I. Valterova, A. Kulhankova, A. Hostalkova, J. Kunes, L. Opletal, Isolation and cholinesterase activity of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii*, *Nat. Prod. Commun.*, 6 (2011) 1827–1830, <https://doi.org/10.1177/1934578X110060121>.
- [39] J.J. Nair, W.E. Campbell, R. Brun, F. Viladomat, C. Codina, J. Bastida, Alkaloids from *Nerine filifolia*, *Phytochemistry*, 66 (2005) 373–382, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.12.009>.
- [40] J. Refaat, M. Kamel, A. Ramadan, A. Ali, *Crinum*; An endless source of bioactive principles: a review. Part III; *Crinum* alkaloids: Belladine-, galanthamine-, lycorenine-, tazettine-type alkaloids and other minor types, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 3 (2012) 3630–3638, [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(7\).1883-90](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(7).1883-90).
- [41] N.-T.-H. Le, S. De Jonghe, K. Erven, J. Neyts, C. Pannecouque, T. Vermeyen, W.A. Herrebout, L. Pieters, E. Tuentner, A new alkaloid from *Pancratium maritimum* - structure elucidation using computer-assisted structure elucidation (CASE) and evaluation of cytotoxicity and anti-SARS-CoV-2 activity, *Phytochem. Lett.*, 58 (2023) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2023.09.006>.
- [42] L. Cahlikova, K. Breiterova, L. Opletal, Chemistry and biological activity of alkaloids from the Genus *Lycoris* (Amaryllidaceae), *Molecules*, 25 (2020) 4797, <https://doi.org/10.3390/molecules25204797>.
- [43] T.U. Jayawardena, N. Merindol, N.S. Liyanage, I. Desgagne-Penix, Unveiling Amaryllidaceae alkaloids: from biosynthesis to antiviral potential - a review, *Nat. Prod. Rep.*, (2024) <https://doi.org/10.1039/D3NP00044C>.

- [44] J.B. Park, Synthesis and characterization of norbelladine, a precursor of Amaryllidaceae alkaloid, as an anti-inflammatory/anti-COX compound, *Bioorg. Med. Chem.Lett.*, 24 (2014) 5381–5384, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.051>.
- [45] M. Safratova, A. Hostalkova, D. Hulcova, K. Breiterova, V. Hrabcova, M. Machado, D. Fontinha, M. Prudencio, J. Kunes, J. Chlebek, D. Jun, M. Hrabanova, L. Novakova, R. Havelek, M. Seifrtova, L. Opletal, L. Cahlikova, Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity, *Arch. Pharm. Res.*, 41 (2018) 208–218, <https://doi.org/10.1007/s12272-017-1000-4>.
- [46] D. Hulcova, J. Marikova, J. Korabecny, A. Hostalkova, D. Jun, J. Kunes, J. Chlebek, L. Opletal, A. De Simone, L. Novakova, V. Andrisano, A. Ruzicka, L. Cahlikova, Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease, *Phytochemistry*, 165 (2019) 112055, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>.
- [47] E. Kohelova, J. Marikova, J. Korabecny, D. Hulcova, T. Kucera, D. Jun, J. Chlebek, J. Jenco, M. Safratova, M. Hrabanova, A. Ritomska, M. Malanik, R. Perinova, K. Breiterova, J. Kunes, L. Novakova, L. Opletal, L. Cahlikova, Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: isolation, structural elucidation and biological activity, *Bioorg. Chem.*, 107 (2021) 104567, <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>.
- [48] J. Marikova, A.A. Mamun, L.A. Shammari, J. Korabecny, T. Kucera, D. Hulcova, J. Kunes, M. Malanik, M. Vaskova, E. Kohelova, L. Novakova, L. Cahlikova, M. Pour, Structure elucidation and cholinesterase inhibition activity of two new minor Amaryllidaceae alkaloids, *Molecules*, 26 (2021) 1279, <https://doi.org/10.3390/molecules26051279>.
- [49] A. A. Mamun, J. Marikova, D. Hulcova, J. Janousek, M. Safratova, L. Novakova, T. Kucera, M. Hrabanova, J. Kunes, J. Korabecny, L. Cahlikova, Amaryllidaceae alkaloids of belladine-type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as new selective inhibitors of butyrylcholinesterase, *Biomolecules*, 10 (2020) 800, <https://doi.org/10.3390/biom10050800>.
- [50] J. Kroustkova, A. Ritomska, A. A. Mamun, D. Hulcova, L. Opletal, J. Kunes, L. Cahlikova, F. Bucar, Structural analysis of unusual alkaloids isolated from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton, *Phytochemistry*, 204 (2022) 113439, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113439>.
- [51] G. Cipriani, C. Dolciotti, L. Picchi, U. Bonuccelli, Alzheimer and his disease: a brief history, *Neurol. Sci.*, 32 (2011) 275–279, <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0454-7>.
- [52] N. Toodayan, Professor Alois Alzheimer (1864–1915): lest we forget, *J. Clin. Neurosci.*, 31 (2016) 47–55, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.12.032>.
- [53] A.A.D.T. Abeyasinghe, R.D.U.S. Deshapriya, C. Udawatte, Alzheimer's disease; a review of the pathophysiological basis and therapeutic interventions, *Life Sci.*, 256 (2020) 117996, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117996>.
- [54] B.J. Balin, A.P. Hudson, Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease, *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 14 (2014) 417, <https://doi.org/10.1007/s11882-013-0417-1>.
- [55] A.F.N. Rosenberger, R. Hilhorst, E. Coart, L. Garcia Barrado, F. Naji, A.J.M. Rozemuller, W.M. van der Flier, P. Scheltens, J.J.M. Hoozemans, S.M. van der Vies, Protein kinase activity decreases with higher braak stages of Alzheimer's disease pathology, *J. Alzheimers Dis.*, 49 (2016) 927–943, <https://doi.org/10.3233/JAD-150429>.

- [56] M. Zverova, Clinical aspects of Alzheimer's disease, *Clin. Biochem.*, 72 (2019) 3–6, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.015>.
- [57] A.P. Porsteinsson, R.S. Isaacson, S. Knox, M.N. Sabbagh, I. Rubino, Diagnosis of early Alzheimer's disease: clinical practice in 2021, *J. Prev. Alzheimers Dis.*, 8 (2021) 371–386, <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.23>.
- [58] J.L. Cummings, J. Mackell, D. Kaufer, Behavioral effects of current Alzheimer's disease treatments: a descriptive review, *Alzheimers Dement.*, 4 (2008) 49–60, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.10.011>.
- [59] Alzheimer's Association Report, 2018 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement.*, 14 (2018) 367–429, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001>.
- [60] Y. Ju, K.Y. Tam, Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease, *Neural Regen. Res.*, 17 (2022) 543–549, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320970>.
- [61] T. Ashleigh, R.H. Swerdlow, M.F. Beal, The role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis, *Alzheimers Dement.*, 19 (2023) 333–342, <https://doi.org/10.1002/alz.12683>.
- [62] I. Costa-Laparra, E. Juarez-Escoto, C. Vicario, R. Moratalla, P. Garcia-Sanz, APOE ϵ 4 allele, along with G206D-PSEN1 mutation, alters mitochondrial networks and their degradation in Alzheimer's disease, *Front. Aging Neurosci.*, 15 (2023) 1087072, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1087072>.
- [63] 2023 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement.*, 19 (2023) 1598–1695, <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
- [64] C. Qiu, M. Kivipelto, E. von Strauss, Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention, *Dialogues Clin. Neurosci.*, 11 (2009) 111–128, <https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqiu>.
- [65] A.C. Raulin, S.V. Doss, Z.A. Trottier, T.C. Ikezu, G. Bu, C.C. Liu, ApoE in Alzheimer's disease: pathophysiology and therapeutic strategies, *Mol. Neurodegener.*, 17 (2022) 72, <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00574-4>.
- [66] C.C. Liu, C.C. Liu, T. Kanekiyo, H. Xu, G. Bu, Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy, *Nat. Rev. Neurol.*, 9 (2013) 106–118, <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>.
- [67] R. Cacace, K. Sleegers, C. Van Broeckhoven, Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited, *Alzheimers Dement.*, 12 (2016) 733–748, <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>.
- [68] 2022 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimers Dement.*, 18 (2022) 700–789, <https://doi.org/10.1002/alz.12638>.
- [69] H. Hampel, M.M. Mesulam, A.C. Cuello, A.S. Khachaturian, A. Vergallo, M.R. Farlow, P.J. Snyder, E. Giacobini, Z.S. Khachaturian, Cholinergic System Working Group, and for Alzheimer precision Medicine Initiative, Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: emerging evidence from translational and clinical research, *J. Prev. Alzheimers Dis.*, 6 (2019) 2–15, <https://doi.org/10.14283/jpad.2018.43>.
- [70] M.R. Picciotto, M.J. Higley, Y.S. Mineur, Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior, *Neuron*, 76 (2012) 116–129, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.036>.

- [71] N.Y. Ahmed, R. Knowles, N. Dehorter, New insights into cholinergic neuron diversity, *Front. Mol. Neurosci.*, 12 (2019) 204, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00204>.
- [72] P.V. Bagwe, S. Sathaye, Significance of choline acetyltransferase enzyme in tackling neurodegenerative diseases, *Curr. Mol. Biol. Rep.*, 8 (2022) 9–22, <https://doi.org/10.1007/s40610-022-00148-9>.
- [73] A. Szutowicz, H. Bielarczyk, A. Jankowska-Kulawy, T. Pawełczyk, A. Ronowska, Acetyl-CoA the key factor for survival or death of cholinergic neurons in course of neurodegenerative diseases, *Neurochem. Res.*, 38 (2013) 1523–1542, <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1060-x>.
- [74] F.M. Ribeiro, S.A.G. Black, V.F. Prado, R.J. Rylett, S.S.G. Ferguson, M.A.M. Prado, The “ins” and “outs” of the high-affinity choline transporter CHT1, *J. Neurochem.*, 97 (2006) 1–12, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03695.x>.
- [75] T.H. Ferreira-Vieira, I.M. Guimaraes, F.R. Silva, F.M. Ribeiro, Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system, *Curr. Neuropharmacol.*, 14 (2016) 101–115, <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>.
- [76] J. Korabecny, O. Soukup, M. Valis a kol., *Alzheimerova nemoc patofyziologie – klinika – farmakoterapie*. Maxdorf, Praha, (2020).
- [77] A.K.L. Liu, R.C.-C. Chang, R.K.B. Pearce, S.M. Gentleman, Nucleus basalis of Meynert revisited: anatomy, history and differential involvement in Alzheimer's and Parkinson's disease, *Acta Neuropathol.*, 129 (2015) 527–540, <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1392-5>.
- [78] G. Marucci, M. Buccioni, D.D. Ben, C. Lambertucci, R. Volpini, F. Amenta, Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease, *Neuropharmacol.*, 190 (2021) 108352, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108352>.
- [79] H. Soreq, E. Podoly, *Encyclopedia of molecular pharmacology, Cholinesterases*; S. Offermanns, W. Rosenthal (Eds). Springer, Berlin, Heidelberg (2008) 357–361, https://doi.org/10.1007/978-3-540-38918-7_184.
- [80] S. Xing, Y. Chen, B. Xiong, W. Lu, Q. Li, Y. Wang, M. Jiao, F. Feng, Y. Chen, W. Liu, H. Sun, Synthesis and bio-evaluation of a novel selective butyrylcholinesterase inhibitor discovered through structure-based virtual screening, *Int. J. Biol. Macromol.*, 166 (2021) 1352–1364, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.015>.
- [81] N. Atatreh, S. Al Rawashdah, S.S. Al Neyadi, S.M. Abuhamdah, M.A. Ghattas, Discovery of new butyrylcholinesterase inhibitors via structure-based virtual screening, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 34 (2019) 1373–1379, <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1644329>.
- [82] S. Darvesh, D.A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase, *Nat. Rev. Neurosci.*, 4 (2003) 131–138, <https://doi.org/10.1038/nrn1035>.
- [83] P. Masson, Z. Shaihtudinova, O. Lockridge, Drug and pro-drug substrates and pseudo-substrates of human butyrylcholinesterase, *Biochem. Pharmacol.*, 218 (2023) 115910, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115910>.
- [84] D.X. Du, N.H.D. Khang, N.H. Tri, P.C. Nam, N.M. Thong, Exploring the multitarget activity of wedelolactone against Alzheimer's Disease: insights from *in silico* study, *ACS Omega*, 8 (2023) 15031–15040, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c08014>.
- [85] Q. Li, B. Xiong, Y. Wang, W. Lyu, S. Xing, Y. Chen, Q. Liao, S. He, F. Feng, W. Liu, Y. Chen, H. Sun, A highly effective and stable butyrylcholinesterase inhibitor with multi-faceted

- neuroprotection and cognition improvement, *Eur. J. Med. Chem.*, 239 (2022) 114510, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114510>.
- [86] Q. Li, Y. Chen, S. Xing, Q. Liao, B. Xiong, Y. Wang, W. Lu, S. He, F. Feng, W. Liu, Y. Chen, H. Sun, Highly potent and selective butyrylcholinesterase inhibitors for cognitive improvement and neuroprotection, *J. Med. Chem.*, 64 (2021) 6856–6876, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00167>.
- [87] A. Tasker, E.K. Perry, C.G. Ballard, Butyrylcholinesterase: impact on symptoms and progression of cognitive impairment, *Expert. Rev. Neurother.*, 5 (2005) 101–106, <https://doi.org/10.1586/14737175.5.1.101>.
- [88] D. Panek, A. Pasięka, G. Latacz, P. Zareba, M. Szczech, J. Godyn, F. Chantegreil, F. Nachon, X. Brazzolotto, A. Skrzypczak-Wiercioch, M. Walczak, M. Smolik, K. Salat, G. Hofner, K. Wanner, A. Wieckowska, B. Malawska, Discovery of new, highly potent and selective inhibitors of BuChE - design, synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation and crystallography studies, *Eur. J. Med. Chem.*, 249 (2023) 115135, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115135>.
- [89] M.Z. Pipan, S.P. Mihevc, M. Strbenc, U. Kosak, I.G. Ilic, J. Trontelj, S. Zakelj, S. Gobec, D. Pavlin, G. Majdic, Treatment of canine cognitive dysfunction with novel butyrylcholinesterase inhibitor, *Sci. Rep.*, 11 (2021) 18098, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97404-2>.
- [90] S. Xing, Q. Li, B. Xiong, Y. Chen, F. Feng, W. Liu, H. Sun, Structure and therapeutic uses of butyrylcholinesterase: application in detoxification, Alzheimer's disease, and fat metabolism, *Med. Res. Rev.*, 41 (2021) 858–901, <https://doi.org/10.1002/med.21745>.
- [91] L. Furtado-Alle, L.V. Tureck, C.S. de Oliveira, J.V.M. Hortega, R.L.R. Souza, Butyrylcholinesterase and lipid metabolism: possible dual role in metabolic disorders, *Chem.-Biol. Interact.*, 383 (2023) 110680, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110680>.
- [92] L. Santarpia, I. Grandone, F. Contaldo, F. Pasanisi, Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 4 (2013) 31–39, <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5>.
- [93] S. Brimijoin, V.P. Chen, Y.-P. Pang, L. Geng, Y. Gao, Physiological roles for butyrylcholinesterase: a BChE-ghrelin axis, *Chem.-Biol. Interact.*, 259 (2016) 271–275, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.013>.
- [94] A. Meden, D. Knez, X. Brazzolotto, F. Nachon, J. Dias, J. Svete, J. Stojan, U. Groselj, S. Gobec, From tryptophan-based amides to tertiary amines: optimization of a butyrylcholinesterase inhibitor series, *Eur. J. Med. Chem.*, 234 (2022) 114248, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114248>.
- [95] Q. Li, S. Xing, Y. Chen, Q. Liao, B. Xiong, S. He, W. Lu, Y. Liu, H. Yang, Q. Li, F. Feng, W. Liu, Y. Chen, H. Sun, Discovery and biological evaluation of a novel highly potent selective butyrylcholinesterase inhibitor, *J. Med. Chem.*, 63 (2020) 10030–10044, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01129>.
- [96] N. Znidarsic, M. Strbenc, N. Grgurevic, T. Snoj, Potential revival of cholinesterase inhibitors as drugs in veterinary medicine, *Front. Vet. Sci.*, 10 (2023) 1125618, <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1125618>.
- [97] R. Crupi, D. Impellizzeri, S. Cuzzocrea, Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders, *Front. Mol. Neurosci.*, 12 (2019) 20, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00020>.

- [98] F.M. Ribeiro, L.B. Vieira, R.G.W. Pires, R.P. Olmo, S.S.G. Ferguson, Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases, *Pharmacol. Res.*, 115 (2017) 179–191, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>.
- [99] J. Lewerenz, P. Maher, Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—what is the evidence?, *Front. Neurosci.*, 9 (2015) 469, <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>.
- [100] A.P. Burada, R. Vinnakota, B. Lambolez, L. Tricoire, J. Kumar, Structural biology of ionotropic glutamate delta receptors and their crosstalk with metabotropic glutamate receptors, *Neuropharmacol.*, 196 (2021) 108683, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108683>.
- [101] M.R. Hynd, H.L. Scott, P.R. Dodd, Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Neurochem. Int.*, 45 (2004) 583–595, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>.
- [102] R. Wang, P.H. Reddy, Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers. Dis.*, 57 (2017) 1041–1048, <https://doi.org/10.3233/JAD-160763>.
- [103] P. Babaei, NMDA and AMPA receptors dysregulation in Alzheimer's disease, *Eur. J. Pharmacol.*, 908 (2021) 174310, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174310>.
- [104] M. Fricker, A.M. Tolkovsky, V. Borutaite, M. Coleman, G.C. Brown, Neuronal cell death, *Physiol. Rev.*, 98 (2018) 813–880, <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>.
- [105] C.G. Parsons, A. Stöffler, W. Danysz, Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system - too little activation is bad, too much is even worse, *Neuropharmacol.*, 53 (2007) 699–723, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.013>.
- [106] J. Liu, L. Chang, Y. Song, H. Li, Y. Wu, The role of NMDA receptors in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, 13 (2019) 00043, <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00043>.
- [107] C. Ortiz-Sanz, U. Balantzategi, T. Quintela-Lopez, A. Ruiz, C. Luchena, J. Zuazo-Ibarra, E. Capetillo-Zarate, C. Matute, J.L. Zugaza, E. Alberdi, Amyloid β / PKC-dependent alterations in NMDA receptor composition are detected in early stages of Alzheimer's disease, *Cell Death Dis.*, 13 (2022) 253, <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04687-y>.
- [108] Z. Arvanitakis, R.C. Shah, D.A. Bennett, Diagnosis and management of dementia: review, *JAMA*, 322 (2019) 1589–1599, <https://doi.org/10.1001/jama.2019.4782>.
- [109] M. Tian, M. Qi, Z. Liu, D. Xu, H. Chen, M.G. Kong, Cold atmospheric plasma elicits neuroprotection against glutamate excitotoxicity by activating cellular antioxidant defense, *Plasma Chem. Plasma Process.*, 41 (2021) 945–954, <https://doi.org/10.1007/s11090-021-10172-9>.
- [110] M. Goedert, Oskar Fischer and the study of dementia, *Brain*, 132 (2008) 1102–1111, <https://doi.org/10.1093/brain/awn256>.
- [111] R. Coronel, C. Palmer, A. Bernabeu-Zornoza, M. Monteagudo, A. Rosca, A. Zambrano, I. Liste, Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved, *Neural Regen. Res.*, 14 (2019) 1661–1671, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.257511>.
- [112] U.C. Muller, T. Deller, M. Korte, Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family, *Nat. Rev. Neurosci.*, 18 (2017) 281–298, <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.

- [113] N.J. Dar, G.W. Glazner, Deciphering the neuroprotective and neurogenic potential of soluble amyloid precursor protein alpha (sAPP α), *Cell. Mol. Life Sci.*, 77 (2020) 2315–2330, <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03404-x>.
- [114] G.F. Chen, T.H. Xu, Y. Yan, Y.R. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development, *Acta. Pharmacol. Sin.*, 38 (2017) 1205–1235, <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>.
- [115] H. Hampel, J. Hardy, K. Blennow, C. Chen, G. Perry, S.H. Kim, V.L. Villemagne, P. Aisen, M. Vendruscolo, T. Iwatsubo, C.L. Masters, M. Cho, L. Lannfelt, J.L. Cummings, A. Vergallo, The amyloid- β pathway in Alzheimer's disease, *Mol. Psychiatry*, 26 (2021) 5481–5503, <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.
- [116] M.A. Fernandez, K.M. Biette, G. Dolios, D. Seth, R. Wang, M.S. Wolfe, Transmembrane substrate determinants for γ -secretase processing of APP CTF β , *Biochemistry*, 55 (2016) 5675–5688, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00718>.
- [117] M.S. Wolfe, Targeting γ -secretase for familial Alzheimer's disease, *Med. Chem. Res.*, 30 (2021) 1321–1327, <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02744-3>.
- [118] S. Ghosh, R. Ali, S. Verma, A β -oligomers: a potential therapeutic target for Alzheimer's disease, *Int. J. Biol. Macromol.*, 239 (2023) 124231, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124231>.
- [119] M. Tolar, J. Hey, A. Power, S. Abushakra, Neurotoxic soluble amyloid oligomers drive Alzheimer's pathogenesis and represent a clinically validated target for slowing disease progression, *Int. J. Mol. Sci.*, 22 (2021) 6355, <https://doi.org/10.3390/ijms22126355>.
- [120] A. Nutini, Amyloid oligomers and their membrane toxicity - a perspective study, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 187 (2024) 9–20, <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2024.01.002>.
- [121] J. Fantini, H. Chahinian, N. Yahi, Progress toward Alzheimer's disease treatment: leveraging the Achilles' heel of A β oligomers?, *Protein Sci.*, 29 (2020) 1748–1759, <https://doi.org/10.1002/pro.3906>.
- [122] S. Asher, R. Priefer, Alzheimer's disease failed clinical trials, *Life Sci.*, 306 (2022) 120861, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120861>.
- [123] J.E. Luo, Y.-M. Li, Turning the tide on Alzheimer's disease: modulation of γ -secretase, *Cell Biosci.*, 12 (2022) 2, <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00738-7>.
- [124] Y. Zhang, H. Chen, R. Li, K. Sterling, W. Song, Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future, *Signal Transduct. Target. Ther.*, 8 (2023) 248, <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01484-7>.
- [125] T.E. Golde, Disease-modifying therapies for Alzheimer's disease: more questions than answers, *Neurotherapeutics*, 19 (2022) 209–227, <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01201-2>.
- [126] A. Venkatramani, D. Panda, Regulation of neuronal microtubule dynamics by tau: implications for tauopathies, *Int. J. Biol. Macromol.*, 133 (2019) 473–483, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.120>.
- [127] M.G. Spillantini, M. Goedert, Tau pathology and neurodegeneration, *Lancet Neurol.*, 12 (2013) 609–622, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- [128] W. Noble, D.P. Hanger, C.C. Miller, S. Lovestone, The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases, *Front. Neurol.*, 4 (2013) 00083, <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00083>.

- [129] N.N. Naseri, H. Wang, J. Guo, M. Sharma, W. Luo, The complexity of tau in Alzheimer's disease, *Neurosci. Lett.*, 705 (2019) 183–194, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.04.022>.
- [130] M. Morel, C. Heraud, C. Nicaise, V. Suain, J.-P. Brion, Levels of kinesin light chain and dynein intermediate chain are reduced in the frontal cortex in Alzheimer's disease: implications for axoplasmic transport, *Acta Neuropathol.*, 123 (2012) 71–84, <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0901-4>.
- [131] P. Saha, N. Sen, Tauopathy: a common mechanism for neurodegeneration and brain aging, *Mech. Ageing Dev.*, 178 (2019) 72–79, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.007>.
- [132] G. Devi, *Handbook of Clinical Neurology*, Chapter 12 - The tauopathies, D.S. Younger (Ed.), Elsevier, (2023), pp. 251–265, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-98817-9.00015-6>.
- [133] K.B.E. Moore, T.-J. Hung, J.S. Fortin, Hyperphosphorylated tau (p-tau) and drug discovery in the context of Alzheimer's disease and related tauopathies, *Drug Discov. Today*, 28 (2023) 103487, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103487>.
- [134] T. Guo, W. Noble, D.P. Hanger, Roles of tau protein in health and disease, *Acta Neuropathol.*, 133 (2017) 665–704, <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- [135] R. Rajmohan, P.H. Reddy, Amyloid-beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons, *J. Alzheimers Dis.*, 57 (2017) 975–999, <https://doi.org/10.3233/JAD-160612>.
- [136] Y. Chen, Y. Yu, Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation, *J. Neuroinflammation*, 20 (2023) 165, <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02853-3>.
- [137] M.A. Busche, B.T. Hyman, Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease, *Nat. Neurosci.*, 23 (2020) 1183–1193, <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0687-6>.
- [138] A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, S. Kukreti, Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases, *Molecules*, 24 (2019) 1583, <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.
- [139] A.H. Bhat, K.B. Dar, S. Anees, M.A. Zargar, A. Masood, M.A. Sofi, S.A. Ganie, Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight, *Biomed. Pharmacother.*, 74 (2015) 101–110, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>.
- [140] S. Briyal, A.K. Ranjan, A. Gulati, Oxidative stress: a target to treat Alzheimer's disease and stroke, *Neurochem. Int.*, 165 (2023) 105509, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2023.105509>.
- [141] A.M. Pisoschi, A. Pop, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review, *Eur. J. Med. Chem.*, 97 (2015) 55–74, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- [142] E. Tonnes, E. Trushina, Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, 57 (2017) 1105–1121, <https://doi.org/10.3233/JAD-161088>.
- [143] J.N. Cobley, M.L. Fiorello, D.M. Bailey, 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress, *Redox Biol.*, 15 (2018) 490–503, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>.

- [144] X. Wang, W. Wang, L. Li, G. Perry, H.-g. Lee, X. Zhu, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, 1842 (2014) 1240–1247, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.015>.
- [145] S. Dewanjee, P. Chakraborty, H. Bhattacharya, L. Chacko, B. Singh, A. Chaudhary, K. Javvaji, S.R. Pradhan, J. Vallamkondu, A. Dey, R.S. Kalra, N.K. Jha, S.K. Jha, P.H. Reddy, R. Kandimalla, Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, 193 (2022) 134–157, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032>.
- [146] C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, F. Collin, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease, *Redox Biol.*, 14 (2018) 450–464, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.
- [147] A. Abelein, Metal binding of Alzheimer's amyloid- β and its effect on peptide self-assembly, *Acc. Chem. Res.*, 56 (2023) 2653–2663, <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00370>.
- [148] R. Bai, J. Guo, X.-Y. Ye, Y. Xie, T. Xie, Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease, *Ageing Res. Rev.*, 77 (2022) 101619, <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>.
- [149] J. Cummings, New approaches to symptomatic treatments for Alzheimer's disease, *Mol. Neurodegener.*, 16 (2021) 2, <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00424-9>.
- [150] J. Zdarova Karasova, O. Soukup, J. Korabecny, M. Hroch, M. Krejciova, M. Hrabnova, J. Misik, L. Novotny, V. Hepnarova, K. Kuca, Tacrine and its 7-methoxy derivate; time-change concentration in plasma and brain tissue and basic toxicological profile in rats, *Drug Chem. Toxicol.*, 44 (2021) 207–214, <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1566350>.
- [151] M. Novak, M. Vajrychova, S. Koutsilier, D.-C. Sismanoglou, T. Kobrlova, L. Prchal, B. Svobodova, J. Korabecny, T. Zarybnicky, L. Raisova-Stuchlikova, L. Skalova, V.M. Lauschke, R. Kucera, O. Soukup, Tacrine first-phase biotransformation and associated hepatotoxicity: a possible way to avoid quinone methide formation, *ACS Chem. Biol.*, 18 (2023) 1993–2002, <https://doi.org/10.1021/acscchembio.3c00219>.
- [152] M. Dooley, H.M. Lamb, Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease, *Drugs Aging*, 16 (2000) 199–226, <https://doi.org/10.2165/00002512-200016030-00005>.
- [153] I. Vecchio, L. Sorrentino, A. Paoletti, R. Marra, M. Arbitrio, The state of the art on acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease, *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.*, 13 (2021) 11795735211029113, <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>.
- [154] L.J. Scott, K.L. Goa, Galantamine, *Drugs*, 60 (2000) 1095–1122, <https://doi.org/10.2165/00003495-200060050-00008>.
- [155] E. Scarpini, P. Schelterns, H. Feldman, Treatment of Alzheimer's disease; current status and new perspectives, *Lancet Neurol.*, 2 (2003) 539–547, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00502-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00502-7).
- [156] S.A. Lipton, Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5 (2006) 160–170, <https://doi.org/10.1038/nrd1958>.
- [157] W.J. Deardorff, G.T. Grossberg, A fixed-dose combination of memantine extended-release and donepezil in the treatment of moderate-to-severe Alzheimer's disease, *Drug Des. Devel. Ther.*, 10 (2016) 3267–3279, <https://doi.org/10.2147/DDDT.S86463>.

- [158] T. Behl, I. Kaur, A. Sehgal, S. Singh, N. Sharma, H.A. Makeen, M. Albratty, H.A. Alhazmi, S.G. Felemban, A.M. Alsubayiel, S. Bhatia, S. Bungau, "Aducanumab" making a comeback in Alzheimer's disease: an old wine in a new bottle, *Biomed. Pharmacother.*, 148 (2022) 112746, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112746>.
- [159] L. Kleinova, J. Cerman, J. Hlavka, J. Hort, Nové farmakologické možnosti v léčbě Alzheimerovy nemoci, *Ces. Slov. Neurol. Neurochir.*, 85 (2022) 462–469, <https://doi.org/10.48095/cccsnn2022462>.
- [160] A. Rahman, M.A. Hossen, M.F.I. Chowdhury, S. Bari, N. Tamanna, S.S. Sultana, S.N. Haque, A. Al Masud, K.M. Saif-Ur-Rahman, Aducanumab for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review, *Psychogeriatr.*, 23 (2023) 512–522, <https://doi.org/10.1111/psyg.12944>.
- [161] D.J. Rinauro, F. Chiti, M. Vendruscolo, R. Limbicker, Misfolded protein oligomers: mechanisms of formation, cytotoxic effects, and pharmacological approaches against protein misfolding diseases, *Mol. Neurodegener.*, 19 (2024) 20, <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00651-2>.
- [162] EMA marketing authorisation application for lecanemab, <https://www.bioarctic.se/en/the-european-medicines-agencys-scientific-advisory-group-sag-to-discuss-the-marketing-authorisation-application-for-lecanemab/> (cit.19.03.2024).
- [163] E. Joe, J.M. Ringman, Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: clinical management and prevention, *B.M.J.*, 367 (2019) 16217, <https://doi.org/10.1136/bmj.l6217>.
- [164] M. Heinrich, H. Lee Teoh, Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge, *J. Ethnopharmacol.*, 92 (2004) 147–162, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.012>.
- [165] K. Babkova, J. Korabecny, O. Soukup, E. Nepovimova, D. Jun, K. Kuca, Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors, *Future Med. Chem.*, 9 (2017) 1015–1038, <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0030>.
- [166] F. Pidany, J. Kroustkova, A. Al Mamun, D. Suchankova, X. Brazzolotto, F. Nachon, F. Chantegreil, R. Dolezal, L. Pulkrabkova, L. Muckova, M. Hrabanova, V. Finger, M. Kufa, O. Soukup, D. Jun, J. Jenco, J. Kunes, L. Novakova, J. Korabecny, L. Cahlikova, Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids - Design, synthesis, and biological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.*, 252 (2023) 115301, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115301>.
- [167] Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *Lancet Neurol.*, 18 (2019) 459–480, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30499-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30499-X).

9 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha č. 1

Mamun, A.A.; **Pidany, F.**; Hulcova, D.; Marikova, J.; Kucera, T.; Schmidt, M.; Catapano, M.C.; Hrabnova, M.; Jun, D.; Muckova, L.; Kunes, J.; Janousek, J.; Andrys, R.; Novakova, L.; Perinova, R.; Maafi, N.; Soukup, O.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Amaryllidaceae alkaloids of norbelladine-type as inspiration for development of highly selective butyrylcholinesterase inhibitors: synthesis, biological activity evaluation, and docking studies. *International Journal of molecular sciences* **2021**, 22, 8308. <https://doi.org/10.3390/ijms22158308>

Príloha č. 2

Pidany, F.; Kroustkova, J.; Mamun, A.A.; Suchankova, D.; Brazzolotto, X.; Nachon, F.; Chantegreil, F.; Dolezal, R.; Pulkrabkova, L.; Muckova, L.; Hrabnova, M.; Finger, V.; Kufa, M.; Soukup, O.; Jun, D.; Jenco, J.; Kunes, J.; Novakova, L.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Highly selective butyrylcholinesterase inhibitors related to Amaryllidaceae alkaloids - Design, synthesis, and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2023**, 252, 115301. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115301>

Príloha č. 3

Pidany, F.; Kroustkova, J.; Jenco, J.; Breiterova, K.; Muckova, L.; Novakova, L.; Kunes, J.; Fibigar, J.; Kucera, T.; Novak, M.; Sorf, A.; Hrabnova, M.; Pulkrabkova, L.; Janousek, J.; Soukup, O.; Jun, D.; Korabecny, J.; Cahlikova, L. Carltonine-derived compounds for targeted butyrylcholinesterase inhibition. *RSC Medicinal Chemistry* **2024**, Advance article. <https://doi.org/10.1039/D4MD00060A>

Príloha č. 4

Cahlikova, L.; Vrabec, R.; **Pidany, F.**; Perinova, R.; Maafi, N.; Mamun, A.A.; Ritomska, A.; Wijaya, V.; Blunden, G. Recent progress on biological activity of Amaryllidaceae and further isoquinoline alkaloids in connection with Alzheimer's disease. *Molecules* **2021**, 26, 5240. <https://doi.org/10.3390/molecules26175240>