Biljni ekstrakti kao inhibitori kolinesteraza

Jurić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:104923

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET SPLIT

I

KEMIJSKO TEHNOLOŠKI FAKULTET SPLIT

Petra Jurić

BILJNI EKSTRAKTI KAO INHIBITORI KOLINESTERAZA

Diplomski rad

Akademska godina: 2018. /2019.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo

Split, listopad, 2019. godine

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Medicinski fakultet i Kemijsko-tehnološki fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinska znanost
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Biokemija
Tema rada: je prihvaćena na LX. sjednici vijeća studija Farmacija te potvrđena na XIX. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i XIV. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo
Pomoć pri izradi: -

BILJNI EKSTRAKTI KAO INHIBITORI KOLINESTERAZE

Petra Jurić, broj indeksa 137

Sažetak: Cilj ovog rada je istražiti sposobnosti različitih ekstrakata i čistih spojeva koji dolaze kao sastavnice ekstrakata u inhibiciji dvaju enzima važnih u patogenezi Alzheimerove bolesti; acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Predmet istraživanja su bili fenolni spojevi, prvenstveno flavonoidi. S ovim ciljem, pretražene su znanstvene baze podataka (*ScienceDirect, Web of Science, PubMed, Google Scholar, PMC* i *PubChem*). AChE i BChE imaju važnu ulogu u hidroliziranju acetilkolina što omogućava prijenos živčanih impulsa. Inhibitori AChE i BChE koriste se kao lijekovi, ali zbog pratećih nuspojava znanstvenici su u potrazi za novim inhibitorima, izoliranim iz biljaka. Rezultati su pokazali da 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid, pomiferin, (2*S*)-5,2-dihidroksi-7,5-dimetoksiflavanon, hispidon, 3-metoksikvercetin i tilirozid imaju značajnu inhibicijsku aktivnost na AChE. Nadalje, od biljnih ekstrakata najbolji rezultat u inhibiciji AChE postigli su etanolni i metanolni ekstrakti korijena biljke *Moringa oleifera* i frakcije iz korijena biljke *Carpolobia lutea* (etil acetatna, vodena i metanolna).

Ključne riječi: biljni ekstrakt, inhibitor acetilkolinesteraze, fenoli, flavonoidi, Alzheimerova bolest
Rad sadrži: 71 stranicu, 22 slike, 17 tablica, 40 literaturnih referenca
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:
1. doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. doc. dr. sc. Lea Kukoč Modun - član
3. izv. prof. dr. sc. Olivera Politeo - član-mentor

Datum obrane: 25. listopada 2019**.**

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35 i Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Biochemistry
Thesis subject: was approved by Council of Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, session no. LX. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. XIX. and Faculty Council of School of Medicine, session no. XIV.
Mentor: Assoc. prof. Olivera Politeo, PhD
Technical assistance: -

HERBAL EXTRACTS AS CHOLINESTERASE INHIBITORS

Petra Jurić, index number 137

Summary: The aim of this paper is to investigate the ability of various herbal extracts and pure compounds which come as constituents of these extracts in the inhibition of two enzymes important in the pathogenesis of Alzheimer's disease; acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The subject of the study were phenolic compounds, primarily flavonoids. To this end, scientific databases (*ScienceDirect, Web of Science, PubMed, Google Scholar, PMC and PubChem*). AChE and BChE play an important role in the hydrolysis of acetylcholine resulting in nerve impulse transmission. AChE and BChE inhibitors are used as medicines, but because of the side effects, scientists are looking for new inhibitors, isolated from plants. The results showed that 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside, pomiferin, (2*S*)-5,2-dihydroxy-7,5-dimethoxyflavanone, hispidone, 3-methoxyquercetin and tiliroside have significant inhibitory activity on AChE. Furthermore, of all plant extracts, *Moringa oleifera* root extracts (ethanol and methanol) and *Carpolobia lutea* root extracts (ethyl acetate, aqueous and methanol) achieved the best results in AChE inhibition.

Keywords: plant extract**,** acetylcholinesterase inhibitor, phenols, flavonoids, Alzheimer's disease
Thesis consists of: 71 page, 22 figures, 17 tables, 40 references
Original in: Croatian

Defense committee:

1. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor – chair person
2. Lea Kukoč Modun, PhD, Assistant Professor – member
3. Olivera Politeo, PhD, Associate Professor - member – supervisor

Defense date: October 25th 2019

Printed and electronic (pdf format) version of the thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35 and Library of School of Medicine, Split, Šoltanska 2.

SADRŽAJ

1.UVOD 1

1.1 KOLINESTERAZE 2

1.1.1 Važnost kolinesteraza u patologiji bolesti 4

1.2 INHIBITORI KOLINESTERAZE U TERAPIJI BOLESTI 6

1.3 SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI 7

1.3.1 Flavonoidi i srodni fenolni i polifenolni spojevi 8

1.3.2 Biljni inhibitori kolinesteraze 8

1.4 TESTIRANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA KOLINESTERAZA 10

2.CILJ ISTRAŽIVANJA 12

3. MATERIJALI I METODE 14

4. REZULTATI 16

4.1 KRONOLOŠKI PRIKAZ REZULTATA INHIBICIJE KOLINESTERAZE FENOLNIH SPOJEVA IZOLIRANIH IZ BILJAKA 17

4.2 KRONOLOŠKI PRIKAZ REZULTATA DOBIVENIH IZ EKSTRAKATA BILJAKA S KOLINESTERAZNOM AKTIVNOŠĆU 37

5. RASPRAVA 48

5.1 SPOSOBNOST FENOLNIH SPOJEVA, SASTAVNICA BILJNIH EKSTRAKATA, DA INHIBIRAJU ENZIME KOLINESTERAZE 49

5.2 SPOSOBNOSTI RAZLIČITIH BILJNIH EKSTRAKATA DA INHIBIRAJU ENZIME KOLINESTERAZA 54

6. ZAKLJUČAK 59

7. POPIS CITIRANE LITERATURE 62

8. SAŽETAK 66

9. SUMMARY 68

10. ŽIVOTOPIS 70

1.UVOD

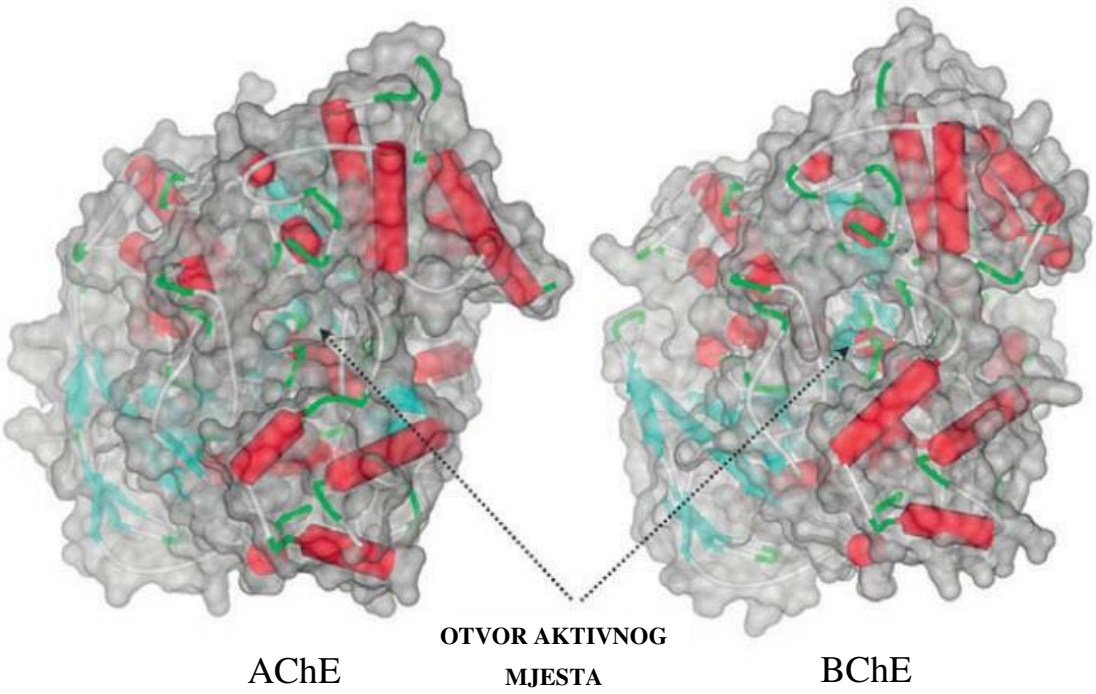
1.1 KOLINESTERAZE

Kolinesteraze su enzimi s esteraznom aktivnošću. Prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju se u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Postoje dvije vrste kolinesteraza, a to su acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE). Oba su enzima, prema *Enzyme Nomenclature* iz 1961. godine, uvrštena na popis enzima i dodijeljene su im klasifikacijske oznake: E.C. 3.1.1.7 za acetilkolinesterazu i E.C. 3.1.1.8 za butirilkolinesterazu koje se rabe i danas (1). Strukturno su homologni, dijele 65 % aminokiselinskog slijeda i strukturu aktivnog centra, ali nisu lokalizirani na istom kromosomu u ljudskom genomu; AChE je na kromosomu 7 (točnije 7q22), a BChE na kromosomu 3 (3q26). Razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, specifičnosti prema supstratima koje mogu hidrolizirati i selektivnosti za vezanje mnogih liganada. Glavna uloga AChE je brza hidroliza neurotransmitera acetilkolina u kolinergičkim sinapsama i jedan je od najbržih enzima u ljudskom organizmu. S druge strane, pojedinci kojima je enzim BChE odsutan nisu povezani s ikakvom abnormalnošću. Svejedno, BChE ima farmakološku i toksikološku važnost jer hidrolizira lijekove koji sadrže estere i uklanja inhibitore kolinesteraze (npr. potentni organofosfati) prije nego postignu učinak (2).

Acetilkolinesteraza ima važnu ulogu u homeostazi organizma zato što hidrolizira acetilkolin na acetatnu kiselinu i kolin što rezultira prijenosom živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava. Ispuštanje acetilkolina uzrokuje dolazak živčanog impulsa, a vezanjem acetilkolina pokreće se niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnim prijenosom živčanog impulsa. Upravo zbog brzog djelovanja AChE, koja razgradi acetilkolin u sinaptičkoj pukotini, polarizacija se ponovo uspostavlja i prijenos impulsa prestaje (3). Različite neurološke bolesti kao na primjer Alzheimerova demencija, mijastenija gravis i demencija Lewyevih tjelešaca povezane su sa sinaptičkom disfunkcijom koja dovodi do deficijencije neurotransmitera kao što su acetilkolin, serotonin, noradrenalin i somatostatin (4). Koštana srž, mozak i mišići mjesta su u organizmu gdje se sintetizira AChE, a nalazi se u živčanim stanicma, mišićima, mozgu i eritrocitima. Uloga ovog enzima u eritrocitima još nije poznata (3).

Nadalje, butirilkolinesteraza je enzim kojem fiziološki supstrat još nije pronađen pa njezina prava fiziološka uloga u organizmu do danas nije u potpunosti shvaćena. Kao i svoj sestrinski enzim, BChE djeluje kao esteraza, aril-acilamidaza i peptidaza. Dakle, slične su molekule, ali imaju različitu tkivnu distribuciju. BChE je u višoj koncentraciji prisutna u

centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini, crijevima, plućima, gušterači i jetri (3). U odsustvu AChE regulira kolinergičnu transmisiju tj. preuzima njenu ulogu. Budući da nema karboksiesteraze u ljudskoj plazmi, BChE ima važnu ulogu u obradi, katabolizmu i detoksikaciji brojnih spojeva koji sadrže ester. Otkriveno je da BChE hidrolizira brojne lijekove ili droge koje sadrže ester kao što su sukcinilkolin, kokain, heroin, aspirin, amitriptilin i irinotekan. Hidrolizira i neke prolijekove kao što su izosorbid diaspirinat i bambuterol. Također, reagira s otrovnim karbamatima i organofosfatima, djeluje kao prirodni hvatač ovih molekula i štiti organizam od toksičnog učinka. Zbog toga se razmatra mogućnost egzogenog korištenja ovog enzima kao profilaksa liječenja intoksikacije. Nadalje, aril acilamidazna i peptidazna aktivnost nemaju još otkriven farmakološki značaj, ali neenzimatska aktivnost BChE ima, u neurogenezi i neuralnim poremećajima,a pripisuje se njenim glikanima. Izgleda da se BChE ponaša kao šaperon u oblikovanju topljivih β-amiloidnih proteina, ali za razliku od AChE nema ulogu u integraciji amiloida u plak, karakterističan za Alzheimerovu bolest (2). Također, poznato je da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva (3). Novije istraživanje pokazuje da BChE ima ulogu kao sredstvo za uklanjanje peptida bogatih poliprolinom i na taj način štiti stanice od nepotrebnih interakcija, a ima i važnu ulogu u detoksikaciji otrova koji se se jedu ili udišu (5). Kod neurodegenerativnih bolesti primjećena je pojačana ekspresija BChE, ali njezina uloga u patologiji bolesti nije potpuno jasna (3). Važnost butirilkolinesteraze možemo shvatiti na pokusu provedenom na „knock-out“ miševima. Miševi koji imaju očuvanu funkciju AChE i BChE otporni su na toksične učinke donepezila, lijeka koji inhibira samo acetilkolinesterazu. S druge strane, „knock-out“ miševi koji imaju deficit BChE umiru od toničnih konvulzija, karakterističnog simptoma viška acetilkolina (5). Dokazano je da su pojedinci s deficitom BChE visoko osjetljivi na mišićne relaksanse kao što su suksametonij i mivakurij, supstrate BChE koji se koriste kao miorelaksansi. Iako mnoga stečena stanja mogu utjecati na aktivnost ovog enzima, ipak deficit najčešće potječe od mutacije na genu BCHE (OMIM 177400). Danas je poznato više od 70 mutacija na genu BCHE i te mutacije utječu na katalitičku funkciju i na ekspresiju proteina (6).

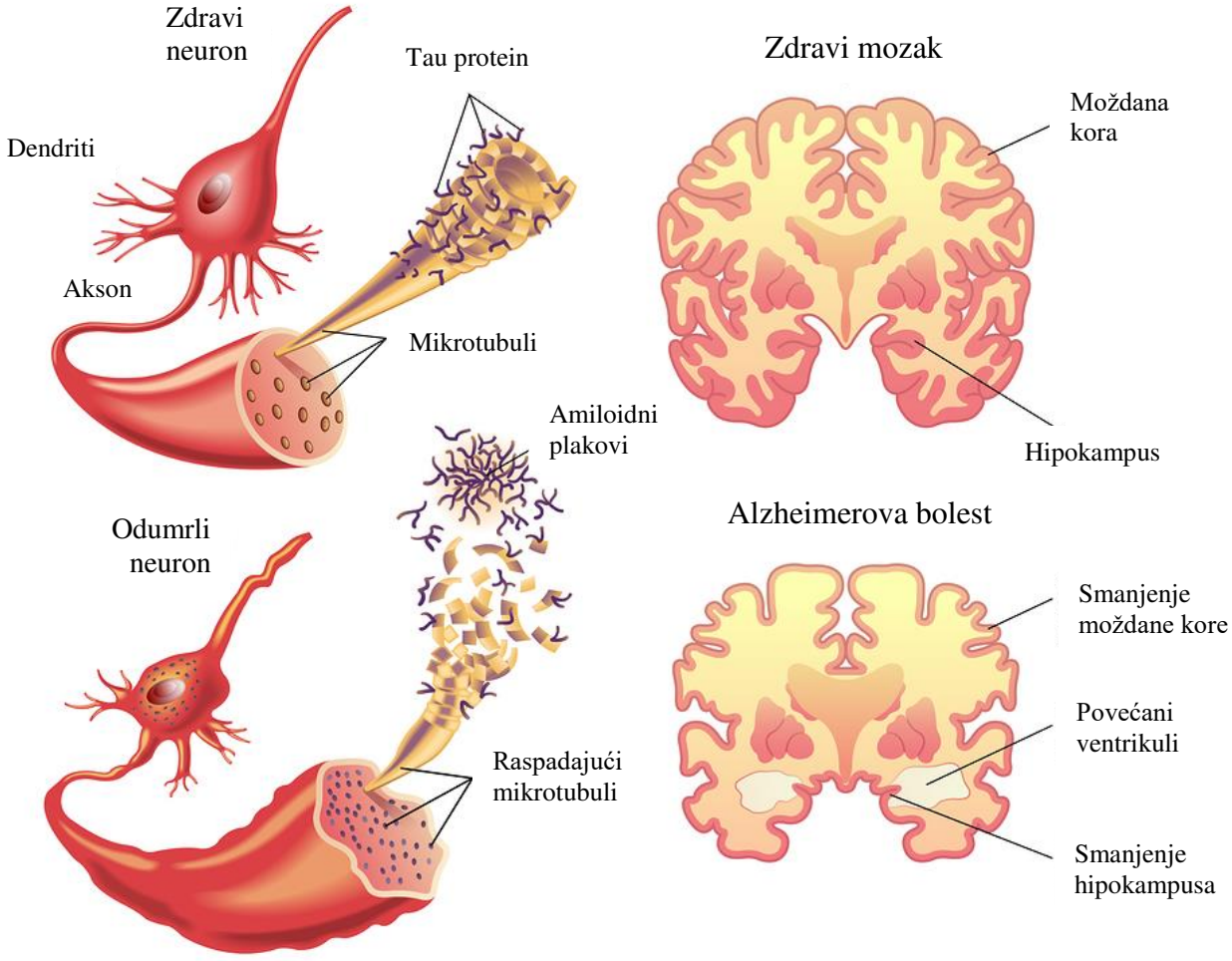


Slika 1. Kristalna struktura humane acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). *α*-uzvojnice – crvena boja, *β*-nabrane ploče – plava boja, petlje – zelena bolja, površina enzima dostupna vodi – siva površina. Otvor aktivnog mjesta svake od kolinesteraza prikazan je strelicom (3)

1.1.1 Važnost kolinesteraza u patologiji bolesti

Kolinergički sustav ima važnu ulogu u regulaciji procesa učenja i memorije i upravo zbog te uloge meta je lijekova za Alzheimerovu bolest (7). Ta bolest je najčešći neurodegenerativni poremećaj, u svijetu ima otprilike 24 milijuna oboljelih, a odgovorna je za 70 % demencija u svijetu. Sporo je progresivna bolest, ireverzibilna je, a može se prepoznati po simptomima kao što su gubitak pamćenja, teškoće s obavljanjem jednostavnih zadataka, problemi u razgovoru, dezorijentacija u vremenu i prostoru, slabije prosuđivanje, problemi s apstraktnim razmišljanjem, gubljenje stvari, promjene u raspoloženju i ponašanju, promjene osobnosti, gubitak inicijative (8). Te promjene nastaju zbog progresivne disfunkcije i odumiranja živčanih stanica odgovornih za pohranu i obradu informacija (9). Poremećaj je karakteriziran tvorbom, agregacijom i nakupljanjem beta amiloida, agregacijom τ (tau) proteina u mikrotubulima, poremećenom homeostazom metala (bakar, željezo, cink), oksidativnim stresom izazvanim metalom i nenormalnom aktivnošću acetilkolinesteraze. Određeni dijelovi mozga kod ovog poremećaja imaju abnormalno veće količine amiloidnih plakova i

neurofibrilarnih snopića (NFT), zatim povezanost između stanica je znatno lošija uspoređujući s pojedincima koji su zdravi i stare sukladno s godinama. Glavna komponenta NFT-a je τ (tau) protein, koji je zadužen za stabilizaciju mikrotubula. Trenutna farmakoterapija za pacijente s Alzheimerovom bolešću se bazira na pojačavanju kolinergičke neurotransmisije koja se postiže inhibitorima kolinesteraze (10). Inhibicija AChE i BChE dovodi do povećanja dostupnosti acetilkolina u mozgu i do smanjenja odlaganja amiloida (7).



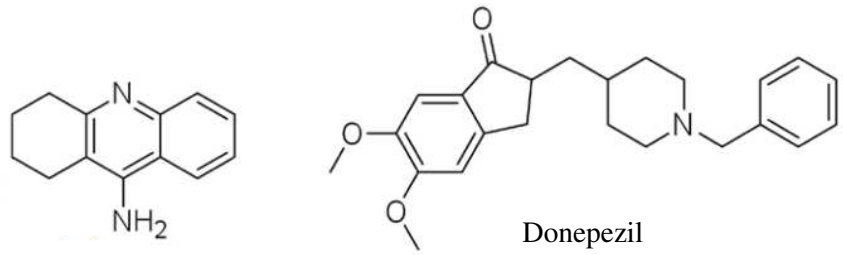
Slika 2. Usporedni prikaz živčanog tkiva i mozga u zdrave osobe i kod osobe oboljele od Alzheimeove bolesti (11)

S druge strane, inhibitori kolinesteraze koriste se i u terapiji mijastenije gravis. To je autoimuna bolest u kojoj se antitijela vežu na receptore acetilkolina ili na funkcionalno povezane molekule u postsinaptičkoj membrani. Jedina manifestacija bolesti je slabost skeletnih mišića, a induciraju je antitijela. Slabost se može pojaviti lokalno ili može biti opća slabost, a gotovo uvijek uključuje očne mišiće, uz prisutnu diplopiju i ptozu. Obično se povećava s vježbanjem i s češćim korištenjem mišića, varira tijekom dana i nije svaki dan ista, a, često, ujutro mišićna snaga bude normalna (12).

1.2 INHIBITORI KOLINESTERAZE U TERAPIJI BOLESTI

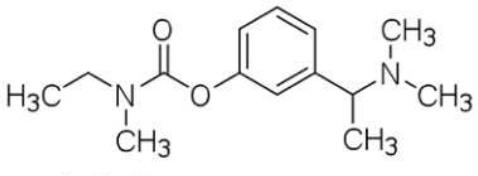
Trenutno odobreni lijekovi za kliničko liječenje Alzheimerove bolesti (AB) su inhibitori kolinesteraze kao npr. donepezil (preporučena doza 5-10 mg/dan), rivastigmin (preporučena doza 1.5-6 mg/dan), galantamin (preporučena doza 16-24 mg/dan), takrin i nekompetitivni antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamatnog receptora – memantin (preporučena doza 5-20 mg/dan). Ovi lijekovi poboljšavaju simptome bolesti, ali učinak je ograničen i slabi s vremenom. Također, nije moguće ni u potpunosti ukloniti simptome, a progresija bolesti se može samo usporiti. Kod ovih lijekova prisutne su mnoge nuspojave npr. proljev, mučnina, povraćanje, bradikardija i hepatotoksičnost (10). Upravo zbog tih razloga kontinuirano se pokušava sintetizirati nove spojeve koji bi bili potentniji i efikasniji, s manje nuspojava, a to zahtjeva klinička ispitivanja. Za primjer imamo takrin, prvi kojeg je odobrila FDA za liječenje AB, koji je povučen s tržišta zbog ozbiljnih nuspojava kao što je hepatotoksičnost. Da bi poboljšali njegovu aktivnost i smanjili toksičnost, znanstvenici su predstavili različite promjene u strukturi. Također, različita istraživanja pokazuju poboljšanja struktura donepezila, galantamina i rivastigmina, ali potrebna su daljnja klinička istraživanja (7).

Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration* - FDA) odobrila je korištenje donepezila i memantina za sve faze bolesti, a rivastigmin i galantamin dokazano djeluju na blage do umjerene simptome bolesti. Rivastigmin i takrin inhibiraju AChE i BChE, a donepezil i galantamin selektivni su na AChE. Bez obzira na to, niti jedan od tih lijekova nije pružio zadovoljavajući učinak u liječenju Alzheimerove bolesti, zato znanstvenici i dalje pokušavaju naći nove potencijalne lijekove istraživajući različite biljke i njihove ekstrakte, ali i modificirajući već postojeće biljne ekstrakte kako bi poboljšali njihova svojstva (8).

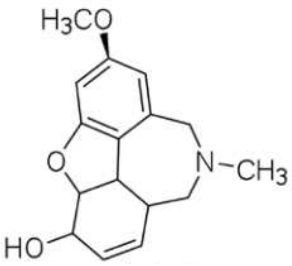


Takrin

Donepezil

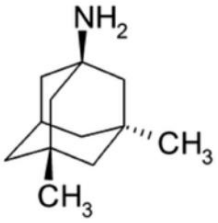


Rivastigmin



Galantamin

Slika 3. Strukture takrina, donepezila, rivastigmina i galantamina (8)



Memantin

Slika 4. Struktura memantina (8)

1.3 SEKUNDARNI BILJNI METABOLITI

Biljke sintetiziraju brojne organske spojeve, koji se tradicionalno klasificiraju kao primarni i sekundarni metaboliti. Primarni metaboliti sudjeluju u procesima fotosinteze, disanja, rasta i razvoja. To su: šećeri, aminokiseline, nukleotidi, organske kiseline, fitosteroli i lipidi. Sekundarni metaboliti su strukturno raznoliki i karakteristični za određene biljne vrste. Njihova funkcija u biljkama je još uvijek predmet proučavanja zato što je raznolika; od toga da štite biljke od biljojeda i privlače oprašivače do toga da djeluju kao signalne molekule i sastavnice podupirućih i zaštitnih tkiva, a ni to nisu sve funkcije (13).

Sekundarne biljne metabolite možemo podijeliti s obzirom na njihovo biosintetsko podrijetlo u tri glavne skupine: 1. flavonoidi i srodni fenolni i polifenolni spojevi, 2. terpeni i terpenoidi i 3. spojevi koji sadrže dušik - alkaloidi i spojevi koji sadrže sumpor (13).

1.3.1 Flavonoidi i srodni fenolni i polifenolni spojevi

Fenoli su spojevi koji imaju karakterističnu strukturu; posjeduju barem jedan aromatski prsten i na njemu jednu ili više hidroksilnih skupina. Široko su rasprostranjeni biljnim carstvom; otkriveno je više od 8000 struktura. To su spojevi koji mogu biti jednostavni, niskomolekularni, ali s druge strane postoje oni koji imaju kompleksne, polifenolne strukture. Dijele se na flavonoide, fenolne kiseline, stilbene, kumarine, tanine i lignine (13).

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma s dva aromatska prstena povezana mostom od 3 ugljikova atoma. Najbrojnija su skupina fenola i široko su rasprostranjeni. Prisutni su u epidermisu lišća i u kori voćki u visokoj koncentraciji. Štite biljke od UV zračenja, sudjeluju u procesima pigmentacije, stimuliraju nodule (korijenove kvržice) da fiksiraju dušik i imaju ulogu u otpornosti na bolest (13). Također, imaju značajna antioksidacijska i metal-kelirajuća svojstva. Postoji šest glavnih podgrupa flavonoida: flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, antocijanidini i izoflavoni (Tablica 1) (10).

Tablica 1. Podskupine fenolnih spojeva s primjerima spojeva (13)

FENOLI

1.Fenolne kiseline		2.Flavonoidi		3.Stilbeni	4.Kumarini	5.Tanini	6.Lignin
1.1	1.2	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6
Hidroksi-benzojeve kiseline	**Hidroksi-cimetne kiseline**	**Flavonoli**	**Flavoni**	**Flavan-3-oli**	**Flavanoni**	**Antocijanidini**	**Izoflavoni**
Galna Protokatehinska Vanilinska Siriginska	*p*-kumarinska Kafeinska Ferulinska Sinapinska	Kvercetin Kempferol Miricetin Galangin Fisetin	Apigenin Krisin Luteolin	Katehin Epikatehin Epikatehin galat	Erodiktiol Hesperitin Naringenin	Cijanidin Pelargonidin Peonidin Malvidin	Genistein Daidzein Glicitein Formononetin

1.3.2 Biljni inhibitori kolinesteraze

Mnogi biljni ekstrakti su istraženi i otkriveno je više mehanizama djelovanja; inhibicija AChE, antioksidacija i uklanjanje radikala i keliranje metala, inhibicija agregacije beta amiloida, inhibicija hiperfosforilacije tau proteina i protuupalna aktivnost. Za njihovo

djelovanje i efikasnost u AB važno je da prolaze krvno – moždanu barijeru (10). U ovome radu fokusirati ćemo se samo na inhibitore kolinesteraze. Kako bi se pronašla prirodna sredstva za liječenje Alzheimerove bolesti, znanstvenici su proučavali različite biljke npr. zvanikovke (porodica Amaryllidaceae), dimnjače (porodica Fumariaceae), makovke (porodica Papaveraceae) i usnače (porodica Lamiaceae). Od biljnih ekstrakata za sada su proučavani neki alkaloidi, terpenodi, terpeni i fenoli (8).

Jedan od alkaloida koji imaju inhibicijsku aktivnost na enzim AChE je fizostigmin. Izoliran je iz vrste *Physostigma venenosum* Balf. iz obitelji mahunarki, a zbog svog karbamatnog dijela reverzibilno inhibira AChE. Ipak, djelovanje mu nije selektivno, inhibira AChE i BChE u sličnom submikromolarnom rasponu; IC_{50}=0.015 i 0.016 μM. Prvi je poznati inhibitor AChE, ali kroz različite studije zaključilo se da nema dovoljno dokaza efikasnosti i da ima česte nuspojave. Da bi se poboljšao farmakokinetički i terapeutski profil, istraženi su sintetski derivati fizostigmina (8) i na taj način uspješno su sintetizirani lijekovi npr. piridostigmin za mijasteniju gravis (12). Nadalje, otkrivena je antikolinesterazna aktivnost kod huperzina A, seskviterpenskog alkaloida. Potječe iz biljke imena Kineska crvotočina (*Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis.), selektivan je i ireverzibilan inhibitor AChE. Huperzin A se koristio da bi poboljšao strukturu već postojećih lijekova; pod *in vitro* uvjetima pokazalo se da je takrin-huperzin A bio učinkovitiji inhibitor od samog takrina, a da su hibridi donepezila i huperzina A bili manje učinkoviti. Dokazano je da huperzin A ima povoljnije učinke na kratkoročnu nego na dugoročnu memoriju, da poboljšava kognitivne funkcije i pamćenje bolesnika sa Alzheimerovom bolešću, bez izazivanja nuspojava. Prirodni huperzin B je alkaloid izoliran iz iste ljekovite biljke, ali pokazuje manju aktivnost. Ipak, neka istraživanja pokazuju da derivati huperzina B imaju veću potenciju i aktivnost od huperzina A, galantamina i rivastigmina (10).

U grupu alkaloida spada i galantamin. Otkriven je u lukovici vrste *Galanthus woronowii* Losinsk. (Voronova visibaba) koja pripada porodici zvanikovki (Amaryllidacae). Kasnije je izoliran iz mnogih drugih biljaka te iste porodice. Komercijalno, prvi put je proizveden iz vrste *Galanthus nivalis L.* u Bugarskoj (14). Najreprezentativniji primjeri drugih izvora iz iste porodice su narcis (*Narcissus* spp.) i snježna pahuljica (*Leucojum aesstivum* L.). *Galanthus* vrste karakteristične su biljke na području Europe, istočne Turske i Kavkaza (15). Galantamin je selektivan i kompetitivan inhibitor acetilkolinesteraze (8). Prvi je registrirani lijek biljnog podrijetla za Alzheimerovu bolest. Upravo zbog toga što se već neke spojeve otkrilo,

znanstvenici dosta pažnje daju ispitivanju različitih biljaka i njihovih ekstrakata da bi pronašli nove učinkovite inhibitore kolinesteraze (16).

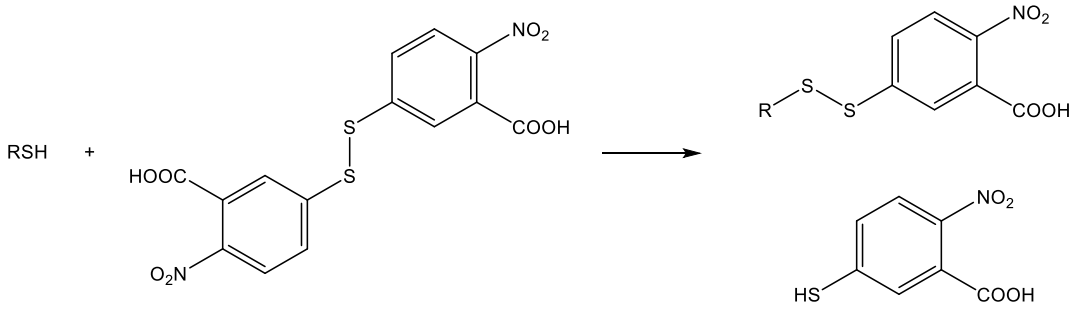
Antikolinesteraznu aktivnost pokazali su i triterpenoidi, poput ursolične kiseline i oleanolne kiseline, ginsenozida, ginkgolida i kanabinoida, ali još uvijek čekaju klinička ispitivanja (8). Također, monoterpeni (1,8-cineol i pulegon), seskviterpenoidi ((+)-(*S*)-dihidro-*ar*-turmeron) i fenilpropanoidi (*α* i *β*-asaron) pokazali su odlične rezultate u inhibiciji AChE u istraživanju Burčula i suradnika (17). Neki su također pokazali aktivnost, ali umjerenu: monoterpeni *δ*-3-karen, (-)-limonen, *cis*-ocimen, *β*-felandren, *α*-pinen; monoterpenoidi borneol, karvakrol, linalol, (-)-piperiton, (+)-piperitenon oksid, piperitenon, timol, timokvinon, timohidrokvinon; seskviterpenoidi elemol, (+)-(*S*)-*ar*-turmeron, (+)-(7*S*,9*R*)-dihidro-*ar*-turmerol, viridiflorol; fenilpropanoidi anetol, eugenol, *cis*-jasmon, i drugi kao *α*- i *β*-jonon, *β*-metil naftil keton, taksodion i ursolična kiselina. Neki su bili aktivni i u inhibiciji BChE, pokazali su umjereno djelovanje: monoterpen *α*-pinen, monoterpenoidi 1,8-cineol, linalol, terpinen-4-ol, linalil acetat, timol, *γ*-terpinen, seskviterepen *β*-kariofilen, fenilpropanoid eugenol i od drugih taksodion (17).

1.4 TESTIRANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA KOLINESTERAZA

Veći broj metoda koristi se s ciljem testiranja sposobnosti inhibicije enzima kolinesteraza ekstraktima biljaka te njihovim sastavnicama ili pak njima identičnim ili kemijskim putem modificiranim spojevima. To su sljedeće metode: Ellmanova metoda (18), Marstonova metoda u kojoj se koristi reagens Fast Blue B sol (19), fluorometrijske metode (20) ili on-line detekcija pomoću HPLC-a (eng. *High performance liquid cromatography* – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) (21).

Ellmanova metoda je najčešće korištena metoda kvantifikacije aktivnosti inhibicije AChE. To je jednostavna spektrofotometrijska metoda u kojoj se inhibicijska sposobnost AChE određuje *in vitro*. Temelji se na reakciji između Ellmanovog reagensa, DTNB-a (5,5′-ditiobis-(2-nitrobenzojeva) kiselina) s tiolnom skupinom koja se oslobađa u reakciji sintetskog supstrata acetilkolina (ACh) i enzima AChE. Reakcijom nastane 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB) (Slika 5). Kod neutralnog ili alkalnog pH TNB ionizira u vodi u TNB^- anion i taj nastali anion je žute boje. Na valnoj duljini od 412 nm prati se porast apsorbancije aniona TNB-a, a apsorbancijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm. Ovo je brza metoda u kojoj se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol TNB^- (18). Primarno su, u ovoj metodi, za

otapanje komponenata esencijalnog ulja korištena nepolarna otapala (DMSO, aceton), ali kasnije se otkrilo da upotreba organskog otapala s većom topljivošću rezultira gubitkom AChE aktivnosti. Prema jednom istraživanju polarna otapala, kao što su etanol i metanol, nisu pokazala utjecaj na AChE aktivnost u bilo kojoj koncetraciji. Ipak, utjecaj etanola na različite kolinesteraze je različit; niska koncentracija može značajno inhibirati humanu AChE, a nema utjecaja na AChE iz goveđih eritrocita ili humanu BChE (17).



Slika 5. Prikaz Ellmanove reakcije za određivanje tiola (22)

Aktivnost inhibicije AChE i BChE prikazuju se IC_{50} i Ki vrijednostima. Apsolutna IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju inhibitora koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju aktivnosti enzima. Vrijednost se dobiva ispitivanjem aktivnosti inhibitora kroz određeni raspon koncentracija postignut serijskim razrjeđenjem. Budući da se kod nekih lipofilnih spojeva ne može očekivati da će postići 100 % inhibicije zbog ograničenja topljivosti, IC_{50} koji se dobije istraživanjem u većini slučajeva je relativan i pokazuje koncentaciju koja je potrebna da bi se krivulja spustila na pola puta između gornje i donje vrijednosti krivulje. Nadalje, IC_{50} vrijednost ovisi o koncentraciji enzima, inhibitora i supstrata zajedno s ostalim eksperimentalnim uvjetima što otežava uspoređivanje između različitih ispitivanja. Ki vrijednost je konstanta disocijacije kompleksa EI u reakciji inhibitora i enzima. Ona ne ovisi o koncentraciji supstrata i enzima, a ovisi o vrsti enzima i inhibitoru pa je stoga prikladnija za usporedbu između ispitivanja (17).

2.CILJ ISTRAŽIVANJA

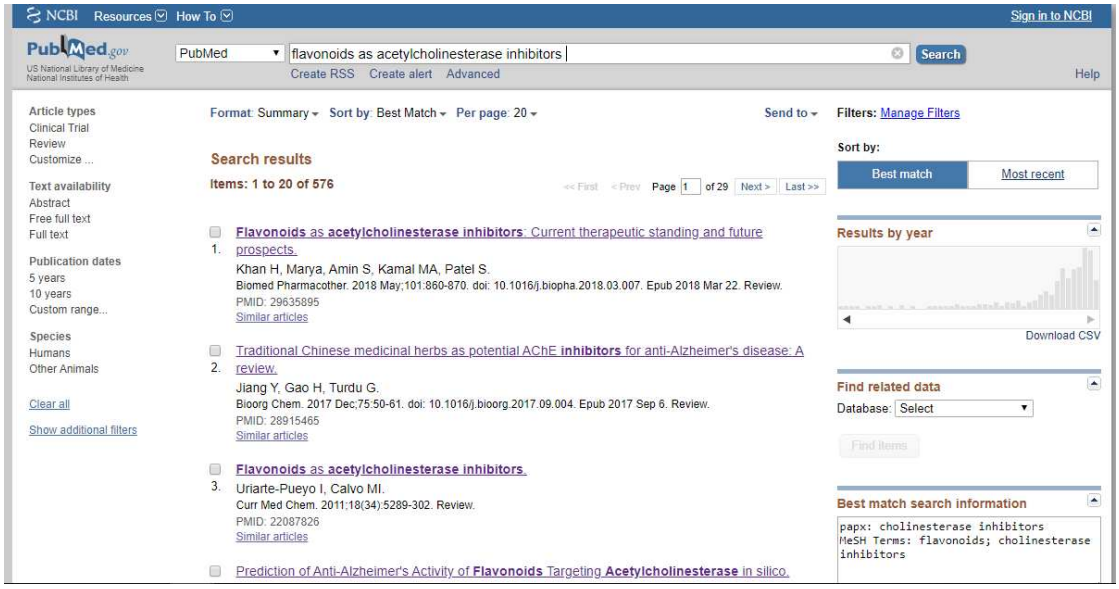
Cilj ovog rada je istraživanje sposobnosti biljnih ekstrakata (vodenih, etanolnih, metanolnih, etil acetatnih, butanolnih, kloroformnih, diklormetanskih, petrol-eterskih, *n*-heksanskih) u smislu inhibicije dvaju enzima važnih u patogenezi Alzheimerove bolesti; AChE i BChE. Jednako istražen je i inhibicijski potencijal čistih fenolnih, a osobito flavonoidnih spojeva koji dolaze kao sastavnice biljnih ekstrakata.

S ovim ciljem, pretražene su znanstvene baze podataka: *PubMed, ScienceDirect, Web of Science, Google Scholar, PMC i PubChem*.

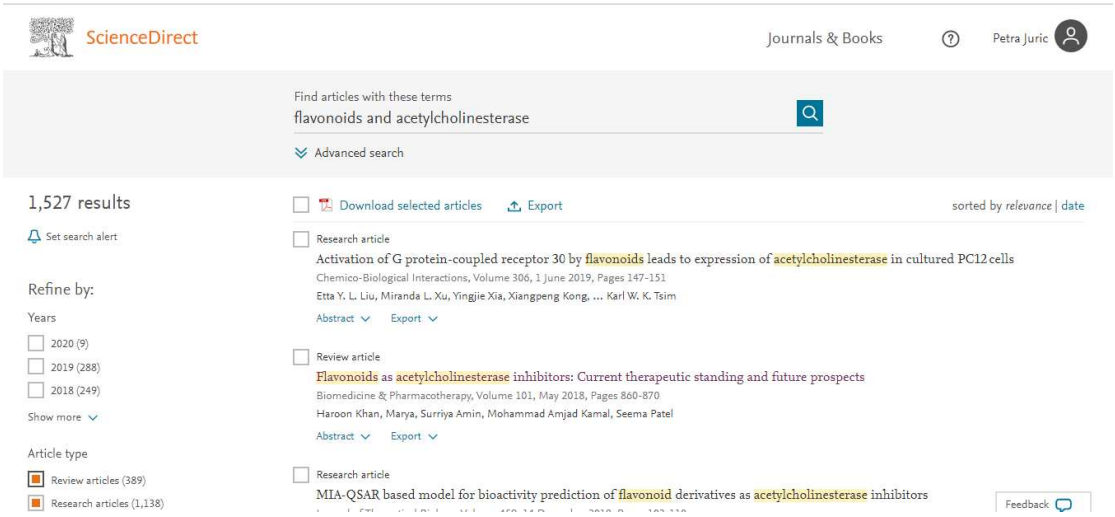
Nakon pregledane literature donešen je zaključak o tome koji su biljni ekstrakti i čisti spojevi, sastavnice ekstrakta, imali najbolje inhibicijsko djelovanje na kolinesteraze.

3. MATERIJALI I METODE

Cilj ovog rada je detaljan pregled stručne i znanstvene literature o inhibitorima kolinesteraze, enzimu koji razgrađuje acetilkolin. Prikupljeni su podatci biljnih ekstrakata iz grupe fenola, a ponajviše iz podgrupe flavonoida. Pretraživane su dostupne knjige i internetske baze podataka *ScienceDirect, Web of Science, PubMed, Google Scholar, PMC* i *PubChem.* Pri pretraživanju znanstvenih i stručnih članaka u bibliografskim bazama korištene su sljedeće ključne riječi: *plant extract, acetylcholinesterase, inhibitor, butyrylcholinesterase, flavonoids, flavones, flavanones, flavonols, isoflavones* i *Alzheimer's disease*. Sva dostupna literatura je proučena te su nakon sistematiziranja i obrade prikazani i interpretirani podaci prikupljeni istraživanjem.



Slika 6. PubMed baza podataka



Slika 7. ScienceDirect baza podataka

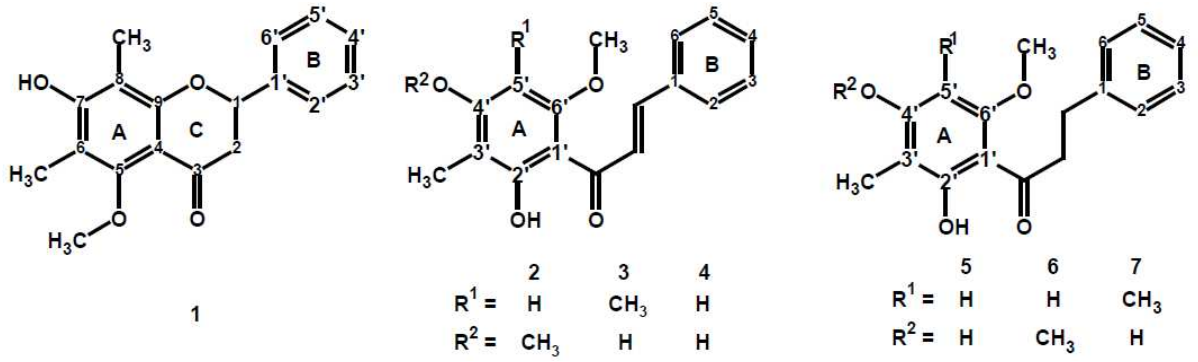
4. REZULTATI

4.1 KRONOLOŠKI PRIKAZ REZULTATA INHIBICIJE KOLINESTERAZE FENOLNIH SPOJEVA IZOLIRANIH IZ BILJAKA

S ciljem pretrage literature na temu inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) od strane polarnih biljnih ekstrakata te čistih komponenti koje dolaze kao sastavnice polarnih biljnih ekstrakata dobiveni su podatci koji su složeni kronološki, od najranijeg prema najnovijem.

Inhibitori kolinesteraza koji se koriste se u terapiji Alzheimerove demencije nisu ponekad dovoljno učinkoviti, a imaju i mnoge štetne nuspojave. Iz tog razloga znanstveni svijet je kontinuirano u potrazi za novim alternativnim bioaktivnim spojevima koji imaju inhibicijsku aktivnost na AChE i BChE,a uz to i manje nuspojave (23).

Amor E.C. i suradnici (23) 2005. godine istražili su aktivnost flavonoida izoliranih iz biljke *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M.Perry (vodena jabuka). Iz spektara masa identificirali su rijetke C-metilirane flavonoide iz *S. samarangense.* To su: 7-hidroksi-5-metoksi-6,8-dimetilflavanon (**1**), 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksi-3'-metilkalkon (**2**), 2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3',5'-dimetilkalkon (**3**), 2',4' -dihidroksi-6'-metoksi-3'- metilkalkon (**4**) i 2',4'- dihidroksi -6'- metoksi -3'- metildihidro kalkon (**5**), 2´-hidroksi-4´,6´-dimetoksimetoksi-3´-metildihidrokalkon (**6**), 2´,4´-dihidroksi-6´-metoksi-3´,5´-dimetil-dihidrokalkon (**7**) (**Slika 8**). Budući da su kalkoni (2-4) i dihidrokalkon (5) strukturno povezani, dihidrokalkonima (6 i 7) reducirana je dvostruka veza na Cα-Cβ2 u svrhu istraživanja odnosa strukturnih aktivnosti. U istraživanju koristila se Ellmanova metoda. Rezultati su prikazani u **tablici 2** (23).



Slika 8. Strukture spojeva 1-7 izoliranih iz *S. samarangense,* 7-hidroksi-5-metoksi-6,8-dimetilflavanon (**1**), 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksi-3'-metilkalkon (**2**), 2',4'-dihidroksi-6'-metoksi-3',5'-dimetilkalkon (**3**), 2',4' -dihidroksi-6'-metoksi-3'- metilkalkon (**4**) i 2',4'- dihidroksi -6'-metoksi -3'- metildihidro kalkon (**5**), dihidrokalkoni (**6**,**7**) (23)

Tablica 2. Sposobnost inhibicije spoja 7 u inhibiciji AChE

Spojevi	**% inhibicije kod 0.20 mM**	**% inhibicije kod 0.25 mM**
Spoj 7	68	98.5
Fizostigmin	100	100

Spoj 7 – 2′,4′-dihidroksi-6′-metoksi-3′,5′-dimetil-dihidrokalkon

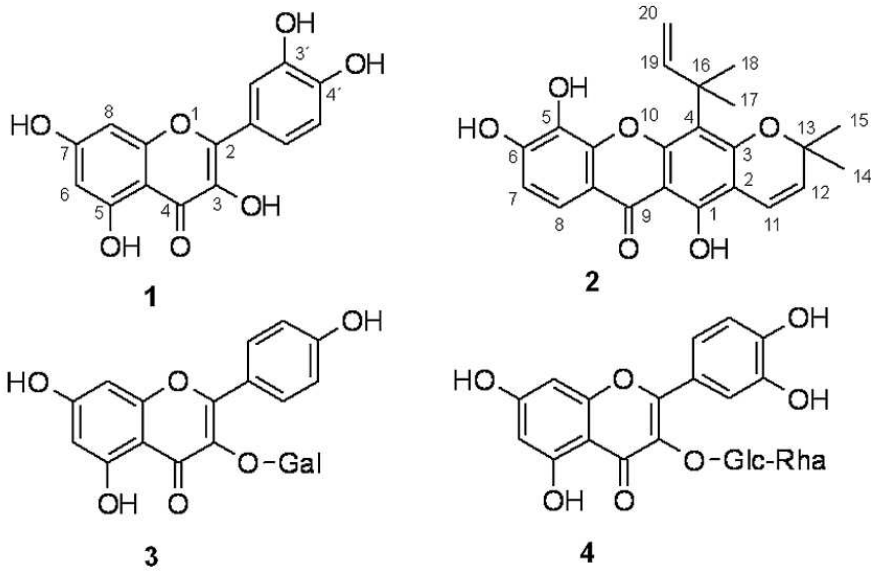
Orhan I. i suradnici (24). 2007. godine ispitali su inhibicijsku aktivnost na enzime AChE i BChE četiriju fenolnih kiselina (klorogenska, kafeinska, galna i kvinska kiselina) i raznih derivata flavonoida (apigenin, kvercetin, genistein, biokanin A, luteolin-7-*O*-rutinozid, kempferol-3-*O*-galaktozid, diosmin, naringin, silibinin i silimarin) u *in vitro* uvjetima koristeći Ellmanovu metodu, a rezultati su prikazani u **tablici 3**.

Tablica 3. Sposobnost fenola u inhibiciji AChE i BChE

Spoj	**% inhibicije AChE kod 1mg/mL**	**% inhibicije BChE kod 1mg/mL**
Klorogenska kiselina	-	30.8 ± 0.81
Kafeinska kiselina	-	-
Galna kiselina	15.7 ± 1.02	48.8 ± 0.88
Kvercetin	76.2 ± 0.99	46.8 ± 1.35
Kvinska kiselina	-	-
Apigenin	-	-
Genistein	-	65.7 ± 1.24
Biokanin A	-	-
Luteolin-7-*O*-rutinozid	24.7 ± 0.34	54.9 ± 0.98
Kempferol-3-*O*-galaktozid	-	-
Naringinin	-	13.7 ± 0.56
Diosmin	-	-
Silibinin	-	51.4 ± 1.05
Silimarin	-	43.2 ± 0.78
Galantamin	99.8 ± 0.31	80.3 ± 1.14

*Sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta i rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD

Nadalje, Khan M.T.H. i suradnici (25) 2009. godine ispitivali su *in vitro* antikolinesteraznu aktivnost različitih flavonoida Ellmanovom metodom. Testirana su četiri različita flavonoida – kvercetin, rutin, kempferol 3-*O*-*β*-D-galaktozid i makluraksanton (Slika 9). Rutin i kvercetin su komercijalno dostupne tvari, a drugi su izolirani. Kempferol je izoliran iz nadzemnog dijela biljke *Calluna vulgaris* L., a makluraksanton je izoliran iz nepolarne frakcije metanolnog ekstrakta biljke *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. Najbolji rezultati su prikazani u **tablici 4** (25).



Slika 9. Kemijske strukture derivata flavonoida; kvercetin (1), makluraksanton (2), kempferol-3-*O*-*β*-D-galaktozid (3) i rutin (4) (25)

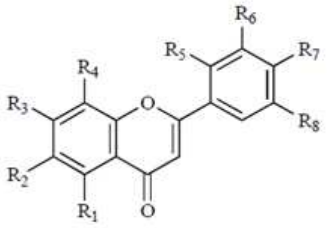
Tablica 4. Sposobnosti flavonoida u inhibiciji AChE i BChE

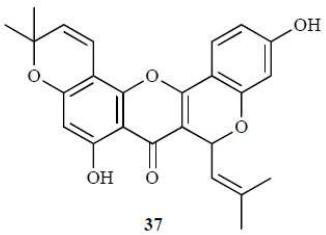
Spoj	AChE IC_{50}(μM)	AChE K_i(μM)	Mehanizam	BChE IC_{50}(μM)	BChE K_i(μM)	Mehanizam
Kvercetin	353.86	3.79	Kompetitivni	420.76	3.43	Kompetitivni
Makluraksanton	8.47	3.43	Ne-kompet.	29.8	2.12	Kompetitivni
Galantamin	0.75	$2.08x10^{-5}$	Kompetitivni	8.2	-	-

*IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima.

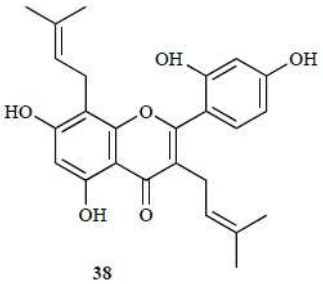
Istraživanje iz 2011. godine saželo je veliki broj znanstvenih članaka o prirodnim i sintetskim flavonoidima s antiacetilkolinesteraznom aktivnošću. 2006. godine prijavljeno je samo 14 flavonoida, a 2011. godine čak 128 flavonoida. U istraživanju prikazani su 41 flavon, 21 flavanon, 35 flavonola, 25 izoflavona i 6 kalkona, ali mi ćemo prikazati samo one ekstrakte koji su izolirani iz biljke ili komercijalno dostupni: flavoni, flavanoni, flavonoli i izoflavoni (slika 10-13). Rezultati toga istraživanja prikazani su u tablici (**Tablica 5**). Prikazana je lista tih flavonoida, biljni izvor, dio biljke korišten za ekstrakciju, otapalo korišteno za ekstrakciju, kvantifikacija aktivnosti i korištena metoda (26).

FLAVONI



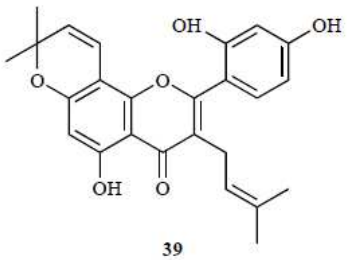


37

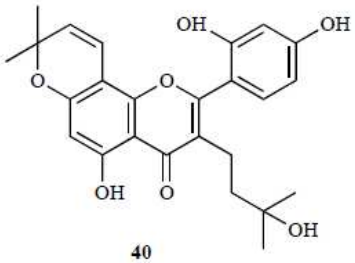


38

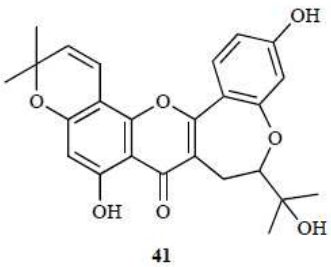
No.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
7	-OMe	-H	-OMe	-H	-H	-H	-OMe	-H
8	-OMe	-H	-OMe	-H	-H	-H	-H	-H
9	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OMe	-geranil
10	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-geranil
11	-OH	-H	-OMe	-H	-H	-H	-OMe	-H
16	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OMe	-H
17	-OH	-H	-OGal	-H	-H	-H	-OMe	-H
18	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
19	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H
20	-OH	-OH	-Oglukuronik	-H	-H	-H	-H	-H
21	-OH	-OMe	-OMe	-H	-H	-H	-OH	-H
22	-OH	-OMe	-OH	-H	-H	-OMe	-OMe	-H
23	-OH	-H	-OAloilAcetilGlu	-OH	-H	-OH	-OH	-H
24	-OH	-OMe	-O(2'''-Acetilrutinozid)	-H	-H	-H	-OMe	-H
25	-OH	-OMe	-O(3'''-Acetilrutinozid)	-H	-H	-H	-OMe	-H
26	-OH	-Glu	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
27	-OH	-Glu	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
28	-OH	-H	-OAloilAcetilGlu	-OH		-H	-OH	-H
29	-OH	-Glu	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
30	-OH	-Glu	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
31	-OH	-OMe	-O(4'''-cetilrutinozid)	-H	-H	-H	-OMe	-H
32	-OH	-H	-OGluRam	-H	-H	-H	-OMe	-H
33	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
34	-OH	-H	-OGluRam	-H	-H	-OH	-OH	-H
35	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
36	-OH	-H	-OGlu	-H	-H	-H	-OMe	-H



39



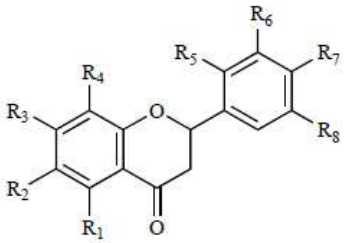
40

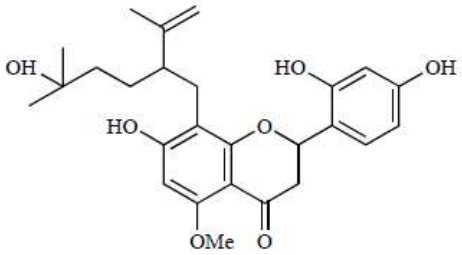


41

Slika 10. Kemijske strukture flavona koji imaju inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu (26)

FLAVANONI



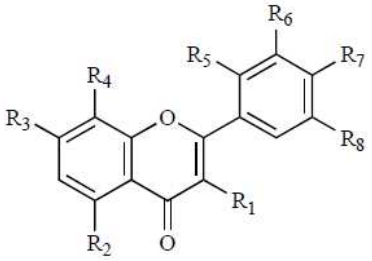


62

No.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
42	-OH	-H	-OMe	-H	-OH	-H	-H	-OMe
49	-OMe	-H	-OH	-lavandulil	-CH3	-H	-OH	-H
50	-H	-H	-H	-H	-H	-pirolidin-1-il-metil	-H	-H
54	-OMe	-H	-OH	-H	-H	-H	-H	-H
55	-OH	-Me	-OH	-Me	-H	-H	-OH	-H
56	-OH	-H	-OMe	-H	-H	-OMe	-OMe	-OMe
57	-OMe	-H	-OH	-prenil	-H	-H	-OH	-H
58	-OMe	-H	-OH	-lavandulil	-OH	-H	-OH	-H
59	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-geranil
60	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OMe	-geranil
61	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H

Slika 11. Kemijske strukture flavanona koji imaju inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu (26)

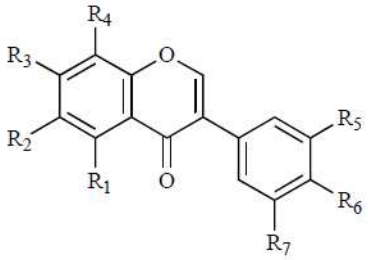
FLAVONOLI



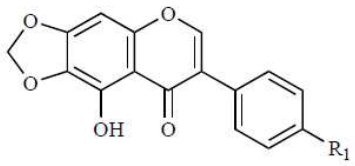
No.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
63	-OMe	-OMe	-OMe	-H	-H	-OMe	-OMe	-H
64	-OMe	-OMe	-OMe	-H	-H	-H	-OMe	-H
65	-OMe	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OMe	-H
66	-OMe	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
67	-OMe	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OMe	-OH
68	-OMe	-OH	-OH	-H	-H	-OMe	-OH	-H
69	-OH	-OH	-OH	-lavandulil	-H	-H	-OH	-H
70	-ORam	-OH	-ORam	-OMe	-H	-H	-OH	-H
71	-ORam	-OH	-ORam	-OMe	-H	-OH	-OH	-H
72	-OH	-OH	-OH	-prenil	-H	-H	-OMe	-H
73	-OMe	-OH	-OMe	-H	-H	-OH	-OMe	-H
74	-OH	-OH	-OH	-prenil	-H	-H	-OH	-H
75	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
76	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-H	-H
77	-OH	-OH	-ORam	-OH	-H	-OH	-OH	-H
78	-OGal	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
79	-OGlu	-OH	-OGlu	-H	-H	-H	-OH	-H
80	-OH	-OH	-OH	-prenil	-H	-H	-OH	-H
81	-OGlu	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
82	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
83	-ORut	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
84	-OGlu	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H
85	-OH	-OH	-OH	-lavandulil	-OH	-H	-OH	-H
86	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-OH
87	-OGal	-OH	-OH	-H	-H	-OMe	-OH	-OMe
88	-OGal	-OH	-OH	-H	-H	-OMe	-OH	-OH
89	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
90	-OGlu	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
91	-OGal	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
92	-ORam	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
93	-OH	-OH	-OGluRam	-OH	-H	-OH	-OH	-H
94	-ORut	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OH	-H
95	-OH	-OMe	-OH	-prenil	-H	-H	-OH	-H
96	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-OMe	-H
97	-OKafeoilGlu	-OH	-OH	-H	-H	-H	-OH	-H

Slika 12. Kemijske strukture flavonola koji imaju inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu (26)

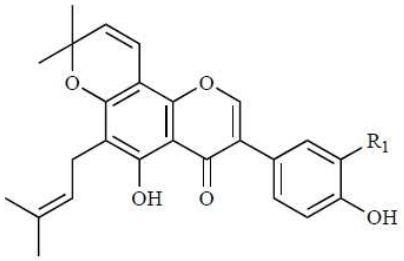
IZOFLAVONI



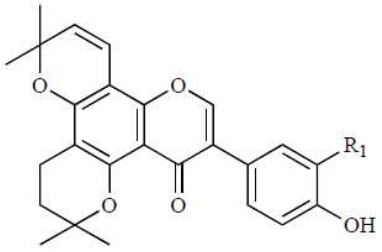
No.	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
108	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OMe	-H
109	-H	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H
110	-H	-H	-OGlu	-H	-H	-OH	-H
111	-H	-H	-OH	-H	-H	-OMe	-H
112	-OH	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H
113	-OH	-H	-OGlu	-H	-H	-OH	-H
114	-OH	-OMe	-OGlu	-H	-OH	-OMe	-OMe
115	-H	-H	-OH	-Glu	-H	-OH	-H



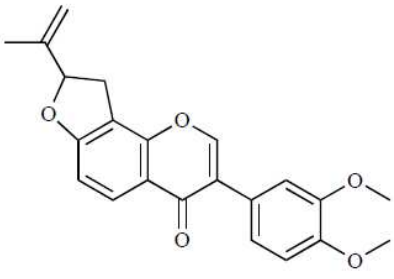
No.	R_1
116	-OH
117	-OGlu



No.	R_1
118	-H
119	-OH



No.	R_1
120	-H
121	-OH



122

Slika 13. Kemijske strukture izoflavona koji imaju inhibicijsku aktivnost na acetilkolinesterazu (26)

Tablica 5. Flavonoidi koji pokazuju inhibicijsku aktivnost na AChE

No.	Kemijsko ime	Biljka	Korišteni dio	Ekstrakt	AChEI IC_{50}/ %Inh.(Konc.)	Ref. Tvar (AChEI IC_{50} /%Inh.)	Kvantifikacijska metoda / AChE izvor
	Flavoni						
7	5,7,4′-Trimetoksiflavon	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	47,1 % (0,1 mg/mL)	94,0 % (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
8	5,7-Dimetoksiflavon	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	42,6 % (0,1 mg/mL)	94,0 % (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
9	5′-Geranil-4″-metoksi-5,7,2′-trihidroksiflavon	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	10,95 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
10	5′-Geranil-5,7,2′,4′-tetrahidroksiflavon	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	16,21 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
11	5-Hidroksi-7,4′-dimetoksiflavon	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	19,0 % (0,1 mg/mL)	94,0 % (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
16	Akacetin	*Chrysanthemum indicum*	Cvijet	Etanol	65,3 µM	0,64 µM Galantamin	EM / -
17	Akacetin-7-*O*-D-galaktopiranozid	*Chrysanthemum indicum*	Cvijet	Etanol	6,7 µM	0,64 µM Galantamin	EM / -
18	Apigenin	*Chrysanthemum indicum*	Cvijet	Etanol	15,6 % (100 µM)	0,64 µM Galantamin	EM / -
	Apigenin	Komercijalni Standard	-	-	21,54 % (10 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C54	EM / RB
	Apigenin	Komercijalni Standard	-	-	121,6 µM (Ki)	-	EM / HP
19	Baikalein	Komercijalni Standard	-	-	12,50 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C55	EM / RB
20	Baikalin	Komercijalni Standard	-	-	16,25 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C56	EM / RB
21	Cirsimaritin	*Salvia poculata*	Nadzemni dijelovi	Metanol	12,35 % (200 µM)	81,41 % (200 µM)	EM / -
22	Eupatilin	*Salvia poculata*	Nadzemni dijelovi	Metanol	11,00 % (200 µM)	81,41% (200 µM)	EM / -
23	Hipolaetin-4′-metileter-7-(2″- alosil)-glukozid monoacetiliran	*Galeopsis ladanum* L.	Listovi/korijen	Metanol	Kvalitativna	Galantamin	EM / HP
24	Izolinariin A	*Linaria reflexa*	Nadzemni dijelovi	Metanol	od 0,27 µM do 0,30 µM		EM / -
25	Izolinariin B	*Linaria reflexa*	Nadzemni dijelovi	Metanol	od 0,27 µM do 0,30 µM		EM / -
26	Izoorientin	*Iris pseudopumila*	Cvijet	Metanol	26,8 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
27	Izoorientin-6-*O″-β*-D-glukopiranozid	*Iris pseudopumila*	Cvijet	Metanol	60,8 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
28	Izoskutelarein-4′-metileter-7-(2″-alosil)-glukozid monoacetiliran	*Galeopsis ladanum* L.	Listovi/korijen	Metanol	Kvalitativna	Galantamin	EM / HP
29	Izoviteksin	*Iris pseudopumila*	Cvijet	Metanol	36,4 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
30	Izoviteksin-6-*O″-β*-D-glukopiranozid	*Iris pseudopumila*	Cvijet	Metanol	85,9 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
31	Linariin	*Linaria reflexa*	Nadzemni dijelovi	Metanol	od 0,27 µM do 0,30 µM		EM / -
32	Linarin (akacetin-7-*O-β*-D-rutinozid)	*Buddleja davidii*	List	Metanol	Kvalitativna	-	MM / EE
	Linarin (akacetin-7-*O-β*-D-rutinozid)	*Mentha arvensis*	Cvijet	Metanol	Kvalitativna	Galantamin	EM / -

*EM-Ellmanova metoda, MM-Martsonova metoda, IV-*in vivo* metode, RC-korteks mozga štakora, RB-mozak štakora, EE-električna jegulja, HP-ljudska plazma, BW284C-specifični AChE inhibitor

Tablica 5. nastavlja se...

No.	Kemijsko ime	Biljka	Korišteni dio	Ekstrakt	AChEI IC_{50}/ %Inh.(Konc.)	Ref. Tvar (AChEI IC_{50} /%Inh.)	Kvantifikacijska metoda / AChE izvor
33	Luteolin	*Chrysanthemum indicum*	Cvijet	Etanol	20,5 % (100 µM)	0,64 µM Galantamin	EM / -
	Luteolin	Komercijalni Standard	-	-	15,56 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C53	EM / RB
	Luteolin	Komercijalni Standard	-	-	65,8 µM (Ki)	-	EM / HP
	Luteolin	*Phagnalon saxatile* L.	Nadzemni dijelovi	Metanol	25,2 µM	-	EM / -
34	Luteolin-7-*O*-rutinozid	*Gonocytisus angulatus*	Nadzemni dijelovi	Metanol	24,7% (1 mg/mL)	99,8 % (1 m/mL) Galantamin	EM / EE
35	Skutelarin	Komercijalni Standard	-	-	18,67 % (50 µM)	99,24% (20 µM) BW284C57	EM / RB
36	Tilianin	*Buddleja davidii*	List	Metanol	Kvalitativna	-	MM / EE
37	Ciklomoruzin	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	31,69 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
38	Kuvanon C	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	25,06 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
39	Moruzin	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	36,40 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
40	Moruzinol	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	173,49 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
41	Neociklomoruzin	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	26,69 µM	0,52 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
	Flavanoni						
42	(2*S*)-5,2´-Di-hidroksi-7,5-dimetoksiflavanon	*Onosma hispida*	Cijela biljka	Metanol	28,0 µM	32,2 µM Galantamin	EM / EE
49	2´-Metoksikurarinon	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	9,59 µM	0,015 µM Fizostigmin (eserin)	EM / EE
54	Alpinetin	Komercijalni Standard	-	-	10,3 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C51	EM / RB
55	Farerol	Komercijalni Standard	-	-	8,98 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C52	EM / RB
56	Hispidon	*Onosma hispida*	Cijela biljka	Metanol	11,6 µM	32,2 µM Galantamin	EM / EE
57	Izoksantohumol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	10,96 µM	0,015 µM Fizostigmim (eserin)	EM / EE
58	Kurarinon	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	74,28 µM	0,015 µM Fizostigmim (eserin)	EM / EE
59	Kuvanon E	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	23,79 µM	0,52 µM Fizostigmim (eserin)	EM / -
60	Kuvanon U	*Morus lhou* L.	Korijen	Metanol	19,69 µM	0,52 µM Fizostigmim (eserin)	EM / -
61	Naringenin	*Citrus junos*	Mezokarp	Metanol	Kvalitativna	-	EM / -
62	Kurarinol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	79,33 µM	0,015 µM Fizostigmin (eserin)	EM / EE
	Flavonoli						
63	3,5,7,3´,4´-Pentametoksiflavon	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	26,2 % (0,1 g/mL)	94,0 % (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
64	3,5,7,4´- Tetrametoksiflavon	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	25,9 % (0,1 mg/mL)	94,0% (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE

*EM-Ellmanova metoda, MM-Martsonova metoda, IV-*in vivo* metode, RC-korteks mozga štakora, RB-mozak štakora, EE-električna jegulja, HP-ljudska plazma, BW284C-specifični AChE inhibitor

Tablica 5. nastavlja se...

No.	Kemijsko ime	Biljka	Korišteni dio	Ekstrakt	AChEI IC_{50}/ %Inh.(Konc.)	Ref. Tvar (AChEI IC_{50} /%Inh.)	Kvantifikacijska metoda / AChE izvor
65	3′,5,7-Tridroksil-3,4-dimetoksiflavon	*Blumea gariepina*	Nadzemni dijelovi	Diklorometan	Kvalitativna	-	MM / EE
66	3-Metoksikvercetin	*Agrimonia pilosa*	Cijela biljka	Etil acetat	37,9 µM	37,8 µM Dehidroevodiamin	EM / EE
67	5,7,2′,5 -Tetrahidroksi-3,4′- dimetoksiflavon	*Blumea gariepina*	Nadzemni dijelovi	Diklorometan	Kvalitativna	-	MM / EE
68	5,7,4'-Trihidroksi-3,3'-dimetoksiflavon	*Psiadia trinervia*	List	Diklorometan	20,6 µM (Ki)	0,66 µM (Ki) Galantamin	EM / EE
69	8-*C*-Lavandulilkempferol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	5,16 µM	0,13 µM Galantamin	EM / EE
	8-Lavandulilkempferol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	8,11 µM	0,015 µM Fizostigmin (eserin)	EM / EE
70	8-Metoksikempferol-3,7-di-*O*-ramnopiranozid	*Kalanchoe brasiliensis*	List	Etill acetat	Kvalitativna	Galantamin	EM / -
71	8-metoksikvercetin-3,7-di-*O*-ramnopiranozid	*Kalanchoe brasiliensis*	List	Etil acetat	Kvalitativna	Galantamin	EM / -
72	Akacin	*Chrysanthemum indicum*	Cvijet	Etanol	3,2 µM	0,64 µM Galantamin	EM / -
73	Ajanin (5,3′-dihidroksi-3,7,4′-trimetoksiflavon)	*Kaempferia parviflora*	Podanak	Metanol	14,3 % (0,1 mg/mL)	94,0 % (0,1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
74	Dezmetillanhidroikaritin	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	6,67 µM	0,13 µM Galantamin	EM / EE
75	Fisetin	Komercijalni Standard	-	-	100,2 µM (Ki)	-	EM / HP
76	Galangin	*Alpiniae officinarum*	Podanak	Etanol	56,53 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C59	EM / RB
	Galangin	Komercijalni Standard	-	-	85,6 µM (Ki)	-	EM / HP
77	Gosipetin-7-*O*-L-ramnopiranozid	*Rhodiola rosea*	Korijen	Etanol (95 %)	58 % (5 g/L)	99,7 % (10 g/L) Galantamin	EM / -
78	Hiperozid	Komercijalni Standard	Cijela biljka	Voda	86 µg/mL	0,21 µg/mL Galantamin	EM / EE
79	Ikarin	Komercijalni Standard	-	-	17,34 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C58	EM / RB
80	Ikaritin	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	6,47 µM	0,13 µM Galantamin	EM / EE
81	Izokvercitrin	Komercijalni Standard	Cijela biljka	Voda	66 µg/mL	0,21 µg/mL Galantamin	EM / EE
82	Kempferol	*Cleistocalyx operculatus*	Pupoljak	Metanol	30,4 µM	0,1 µM Galantamin	EM / -
	Kempferol	Komercijalni Standard	-	-	14,60 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C61	EM / RB
	Kempferol	Komercijalni Standard	-	-	92,8 µM (Ki)	-	EM / HP
	Kempferol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	3,31 µM	0,13 µM Galantamin	EM / EE
83	Kempferol-3-*O*-rutinozid	*Catharanthus roseus*	Cijela biljka	Voda	Kvalitativna	-	EM / EE
84	Kempferol-3-*O*-*β*-D-glukopiranozid	*Iris pseudopumila*	Podanak	Metanol	50,4 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
85	Kušenol C	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	33,13 µM	0,015 µM Fizostigmin (eserin)	EM / EE

*EM-Ellmanova metoda, MM-Martsonova metoda, IV-*in vivo* metode, RC-korteks mozga štakora, RB-mozak štakora, EE-električna jegulja, HP-ljudska plazma, BW284C-specifični AChE inhibitor

Tablica 5. nastavlja se...

No.	Kemijsko ime	Biljka	Korišteni dio	Ekstrakt	AChEI IC_{50}/ %Inh.(Konc.)	Ref. Tvar (AChEI IC_{50} /%Inh.)	Kvantifikacijska metoda / AChE izvor
86	Miricetin	Komercijalni Standard	-	-	37,8 μM (Ki)	-	EM / HP
87	Miricetin-3´,5´-dimetileter 3-*O*-*β*-D-galaktopiranozid	*Cleistocalyx operculatus*	Pupoljak	Metanol	37,8 μM	0,1 μM Galantamin	EM / -
88	Miricetin-3´-metileter 3-*O*-*β*-D-galaktopiranozid	*Cleistocalyx operculatus*	Pupoljak	Metanol	19,9 μM	0,1 μM Galantamin	EM / -
89	Kvercetin	*Agrimonia pilosa*	Cijela biljka	Etil acetat	19,8 μM	37,8 μM Dehidroevodiamin	EM / EE
	Kvercetin	*Cleistocalyx operculatus*	Pupoljak	Metanol	25,9 μM	0,1 μM Galantamin	EM / -
	Kvercetin	Komercijalni Standard	-	-	Kvalitativna	-	IV / -
	Kvercetin	Komercijalni Standard	-	-	25,75 % (50 μM)	99,24 % (20 μM) BW284C62	EM / RB
	Kvercetin	Komercijalni Standard	-	-	38,3 μM (Ki)	-	EM / HP
	Kvercetin	Komercijalni Standard	-	-	353,86 μM	0,75 μM Galantamin	EM / EE
	Kvercetin	Komercijalni Standard	-	-	76,2 % (1 mg/mL)	99,8 % (1 mg/mL) Galantamin	EM / EE
	Kvercetin	*Polygonum sachalinensis*	Cijela biljka	Metanol	0,060 mM	0,0009 mM Galantamin	EM / EE
90	Kvercetin-3´-*O*-glukozid	Komercijalni Standard	-	-	19,63 % (50 μM)	99,24 % (20 μM) BW284C63	EM / RB
91	Kvercetin-3-*O*-*β*-D-galaktopiranozid	*Polygonum sachalinensis*	Cijela biljka	Metanol	0,068 mM	0,0009 mM Galantamin	EM / EE
92	Kvercitrin	*Agrimonia pilosa*	Cijela biljka	Etil acetat	66,9 μM	37,8 μM Dehidroevodiamin	EM / EE
	Kvercitrin	Komercijalni Standard	Cijela biljka	Voda	63 μg/mL	0,21 μg/mL Galantamin	EM / EE
93	Rodioflavonozid	*Rhodiola rosea*	Korijen	Etanol (95 %)	38 % (5 g/L)	99,7 % (10 g/L) Galantamin	EM / -
94	Rutin	Komercijalni Standard	-	-	Kvalitativna	-	IV / -
	Rutin	Komercijalni Standard	-	-	17,53 % (50 μM)	99,24 % (20 μM) BW284C64	EM / RB
	Rutin	Komercijalni Standard	Cijela biljka	Voda	196 μg/mL	0,21 μg/mL Galantamin	EM / EE
95	Sofoflavescenol	*Sophora flavescens*	Korijen	Metanol	8,37 μM	0,13 μM Galantamin	EM / EE
96	Tamariksetin	*Cleistocalyx operculatus*	Pupoljak	Metanol	22,3 μM	0,1 μM Galantamin	EM / -
97	Tilirozid	*Agrimonia pilosa*	Cijela biljka	Etil acetat	23,5 μM	37,8 μM Dehidroevodiamin	EM / EE
	Tilirozid	Komercijalni Standard	-	-	13,48 % (50 μM)	99,24 % (20 μM) BW284C60	EM / RB

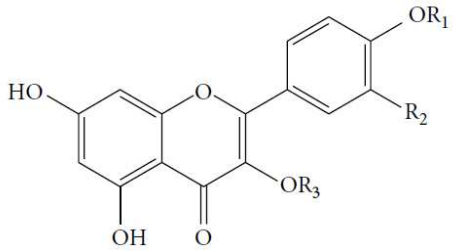
*EM-Ellmanova metoda, MM-Martsonova metoda, IV-*in vivo* metode, RC-korteks mozga štakora, RB-mozak štakora, EE-električna jegulja, HP-ljudska plazma, BW284C-specifični AChE inhibitor

Tablica 5. nastavlja se...

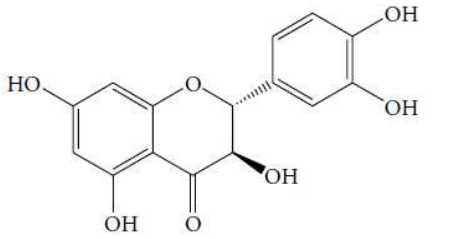
No.	Kemijsko ime	Biljka	Korišteni dio	Ekstrakt	AChEI IC_{50}/ %Inh.(Konc.)	Ref. Tvar (AChEI IC_{50}/%Inh.)	Kvantifikacijska metoda / AChE izvor
	Izoflavoni						
108	Kalikozin	Komercijalni Standard	-	-	22,76 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C71	EM / RB
109	Daidzein	Komercijalni Standard	-	-	14,44 % (50 µM)	99,24% (20 µM) BW284C65	EM / RB
110	Daidzin	Komercijalni Standard	-	-	15,04 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C66	EM / RB
111	Formononetin	Komercijalni Standard	-	-	17,02 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C67	EM / RB
112	Genistein	Komercijalni Standard	-	-	16,19 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C68	EM / RB
113	Genistin	Komercijalni Standard	-	-	7,78 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C69	EM / RB
114	Irigenin-7-*O*-*β* -D-glukopiranozid	*Iris pseudopumila*	Podanak	Metanol	94,1 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
115	Puerarin	Komercijalni Standard	-	-	12,87 % (50 µM)	99,24 % (20 µM) BW284C70	EM / RB
116	Irilon	*Iris pseudopumila*	Podanak	Metanol	93,6 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
117	Irizolon-4′-*O*-*β*-D-glukopiranozid	*Iris pseudopumila*	Podanak	Metanol	93,2 µM	0,07 µM Fizostigmin (eserin)	EM / -
118	Izo-osajin	*Maclura pomifera*	Cijela biljka	Metanol	1,350 mM	Galantamin	EM / EE
119	Izo-pomiferin	*Maclura pomifera*	Cijela biljka	Metanol	2,670 mM	Galantamin	EM / EE
120	Osajin	*Maclura pomifera*	Cijela biljka	Metanol	2,239 mM	Galantamin	EM / EE
121	Pomiferin	*Maclura pomifera*	Cijela biljka	Metanol	0,096 mM	Galantamin	EM / EE
122	Rotenon	Komercijalni standard	-	-	15%	-	IV / -

*IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima, EM-Ellmanova metoda (17), MM-Martsonova metoda (18), IV-*in vivo* metode, RC-korteks mozga štakora, RB-mozak štakora, EE-električna jegulja, HP-ljudska plazma, BW284C-specifični AChE inhibitor

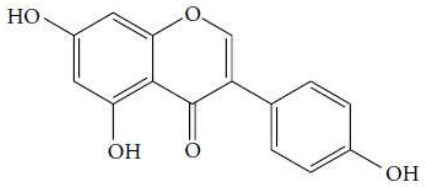
Ding X. i suradnici (27) 2013. godine izolirali su 13 derivata flavonoida (Slika 14) i 2 ginkolida iz listova biljke *Ginkgo biloba* L. i ispitali su njihovu antiacetilkolinesteraznu aktivnost *in vitro*. Izolirano je 13 flavonoida: kempferol (**1**), kvercetin (**2**), ermanin (**3**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozid (**4**), kvercetin-3-*O*-*α*-D-glukopiranozid (**5**), kvercetin-3-*O*-*β*-D-glukopiranozid (**6**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→2)-*β*-D-glukopiranozid (**7**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**8**), akacetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**9**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-*β*-D-glukopiranozid (**10**), kempferol-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**11**), taksolin (**12**) i genistein (**13**) i dva ginkolida, ginkolid B (**14**) i ginkolid C (**15**). Strukture izoliranih flavonoida prikazane su na slici 14, a rezultati inhibicijske aktivnosti na AChE ovih flavonoida u **tablici 6** (27).



	R_1	R_2	R_3
1	H	H	H
2	H	OH	H
3	CH_3	H	CH_3
4	H	OH	Ramnoza
5	H	OH	*α*-Glukoza
6	H	OH	*β*-Glukoza
7	H	OH	Ram-(1→2)-Glu-
8	H	OH	Ram-(1→6)-Glu-
9	CH_3	H	Ram-(1→4)-Ram-(1→6)-Glu
10	H	OH	Ram-(1→4)-Ram-(1→6)-Glu
11	CH_3	H	Ram-(1→6)-Glu-



12



13

Slika 14. Strukture izoliranih flavonoida, kempferol (**1**), kvercetin (**2**), ermanin (**3**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozid (**4**), kvercetin-3-*O*-*α*-D-glukopiranozid (**5**), kvercetin-3-*O*-*β*-D-glukopiranozid (**6**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→2)-*β*-D-glukopiranozid (**7**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**8**), akacetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**9**), kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→2)-*β*-D-glukopiranozid (**10**), kempferol-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (**11**), taksolin (**12**) i genistein (**13**) (27)

Tablica 6. Inhibicijska aktivnost spojeva 1-15 na AChE

Spoj	**IC_{50} (μg/mL)**[a]
1	100.5
2	95.8
3	88.5
4	110.9
5	79.4
6	57.8
7	77.5
8	73.1
9	97.8
10	112.6
11	101.7
12	133.1
13	103.8
14	-[b]
15	-
Klorpirifos	12.4

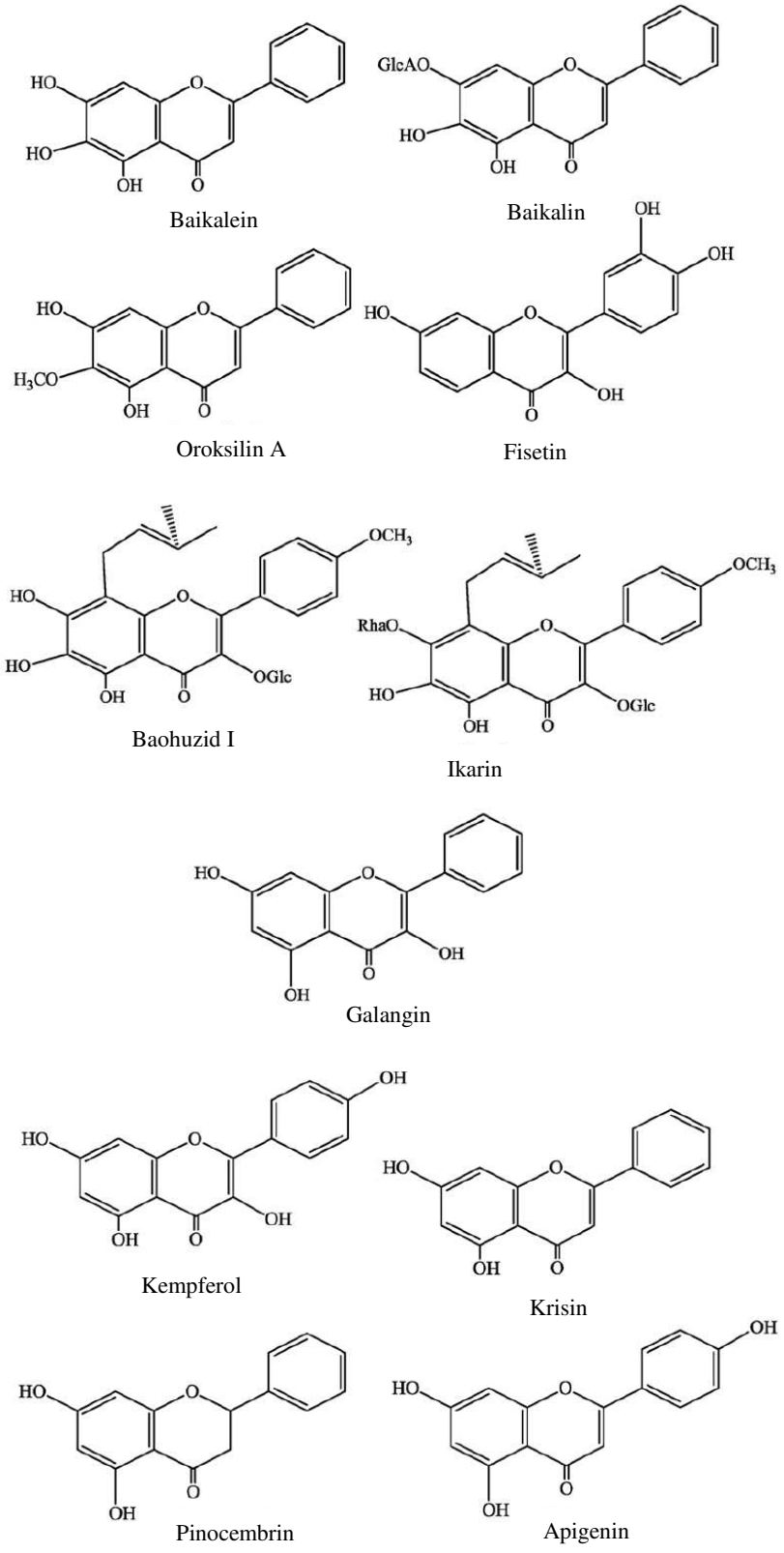
- [a]Sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta, IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima. [b] Nema inhibicijsku aktivnost, kempferol (**1**), kvercetin (**2**), ermanin (**3**), kvercetin-3-*O*-α-L-ramnopiranozid (**4**), kvercetin-3-*O*-α-D-glukopiranozid (**5**), kvercetin-3-*O*-β-D-glukopiranozid (**6**), kvercetin-3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozid (**7**), kvercetin-3-*O*-α-L-ramnopiranozil- (1→6)-β-D-glukopiranozid (**8**), akacetin-3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-glukopiranozid (**9**), kvercetin-3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→2)-β-D-glukopiranozid (**10**), kempferol-3-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranozil-(1→6)-β-D-glukopiranozid (**11**), taksolin (**12**), genistein (**13**), ginkolid B (**14**) i ginkolid C (**15**)

Nadalje, 2015. godine Balkis A. i suradnici (28) ispitali su inhibicijsku aktivnost brojnih fenolnih i polifenolnih spojeva (**Slika 15 i 16**) na AChE iz električne jegulje Ellmanovom metodom. Rezultati su prikazani u **tablici 7**.

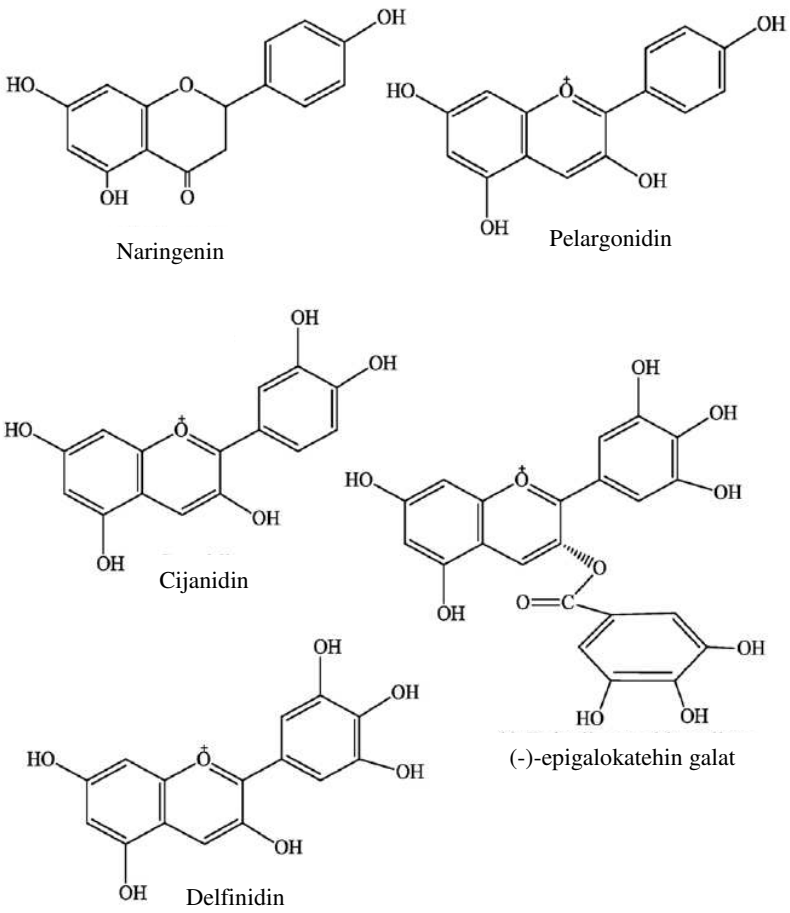
Tablica 7. Inhibicija aktivnosti fenolnih i polifenolnih spojeva na AChE iz električne jegulje

Spojevi	**% inhibicije kod 100 µM**	**IC_{50} (µM)**
Flavoni		
Krisin	93.3±4.7	18.2±2.1
Apigenin	91.5±3.1	7.72±0.15
Baikalein	99.6±0.34	0.61±0.12
Baikalin	35.8±6.6	-
Oroksilin A	31.3±1.8	-
Izoflavoni		
Genistein	59.03±0.11	-
Daidzein	2.64±0.28	-
Flavonoli		
Baohuzid I	38.1±3.9	89±15
Ikarin	*ND*	-
Galangin	98.0±2.5	19.1±1.3
Kempferol	97.97±1.3	3.05±0.77
Kvercetin	98.38±0.39	3.60±0.61
Miricetin	99.4±0.37	3.95±0.61
Fisetin	71.2±3.6	-
Izokvercetin (kvercetin 3-*O*-*β*-D-glukozid)	*ND*	-
Rutin (rutin 3-*O*-*β*-D-rutinozid)	*ND*	-
Flavanoni		
Pinocembrin	17.2±1.7	-
Naringenin	24.8±7.3	-
Flavanoli		
(-)-Epigalokatehin	41.35±0.59	-
(-)-Epigalokatehin galat	96.05±0.16	16.83±0.12
Antocijanidini		
Pelargonidin	92.78±0.21	14.27±0.68
Cijanidin	92.5±1.0	14.43±0.31
Delfinidin	93.73±0.50	44.67±0.49
Melvidin	90.60±0.82	41.1±1.1
Kurkuminoidi		
Kurkumin	76.6±2.4	-
Stilbeni		
Reservatrol	55.0±1.2	-
Hidroksibenzoati		
4-hidroksibenzoatna kiselina	*ND*	-
3,4-hidroksibenzoatna kiselina	*ND*	-
3,4,5-hidroksibenzoatna kiselina (galna)	*ND*	-
Hidroksicinamati		
trans-4-hidroksicinamatnakiselina (*p*-kumarinska)	*ND*	-
trans-3,4-dihidroksicinamatna kiselina (ferulična)	*ND*	-
Kontrola		
Takrin	-	0.0254±0.0032

*ND-nije detektiran (nema inhibicijsku aktivnost), sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta i rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD, IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima

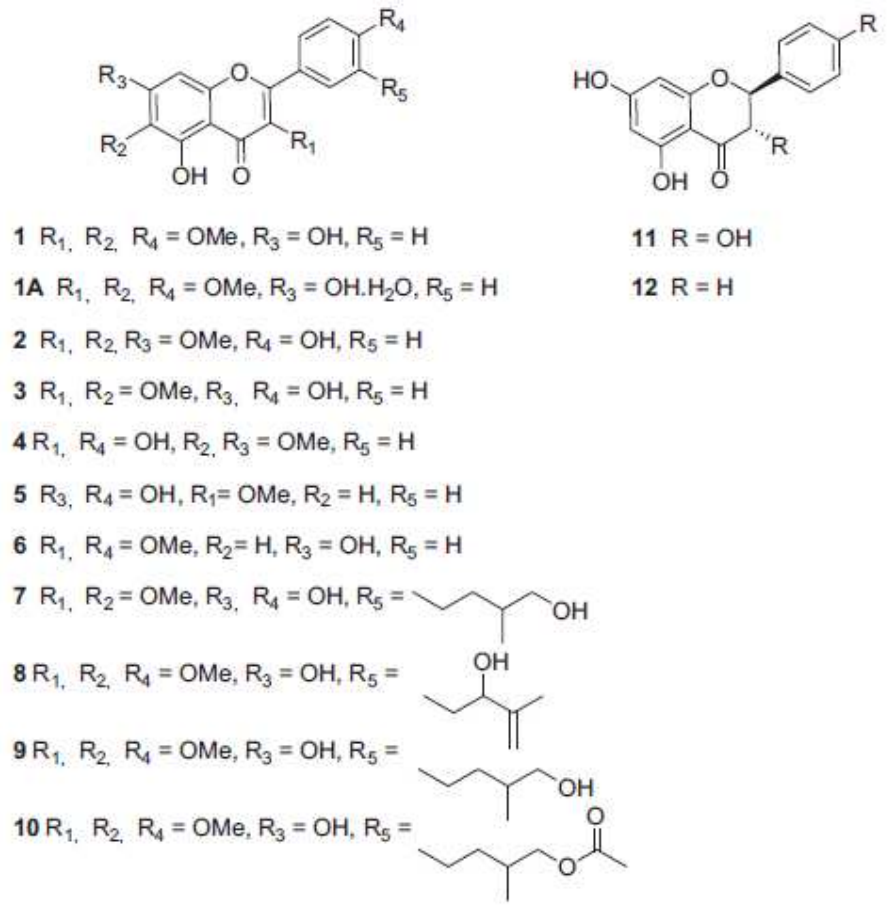


Slika 15. Strukture flavonoida korištenih u istraživanju (28)



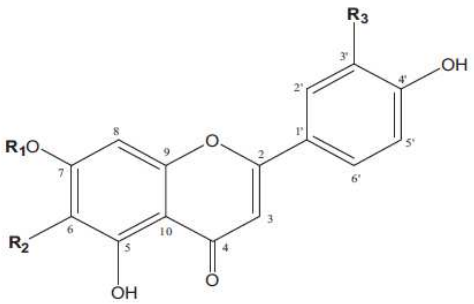
Slika 16. Strukture flavonoida korištenih u istraživanju (28)

Muhammad A. i suradnici (29) 2015. godine izolirali su flavonoide iz biljke *Dodonaea viscosa L.* kako bi ispitali njihovu antiacetilkolinesteraznu i antioksidacijsku aktivnost. Ta biljka se koristi u tradicionalnoj medicini zbog svog analgetskog, antiviralnog, protuupalnog i antioksidacijskog djelovanja. Koristila se modificirana Ellmanova metoda. Iz nadzemnih dijelova biljke izolirani su redom: santin (**1**), penduletin (**2**), viskozin (**3**), 6,7-dimetilkempferol (**4**), kempferol- 3- metileter (**5**), 3,4′-dimetoksi-5,7-dihidroksiflavon (**6**), 5,7,4′-trihidroksi-3′-(3-hidroksimetilbutil)-3,6-dimetoksiflavon (**7**), 5,7-dihidroksi-3′-(2-hidroksi-3-metil-3-butenil)-3,6,4′-trimetoksi-flavon (**8**), 5,7-dihidroksi-3′-(3-hidroksi-metilbutil)-3,6,4′-trimetoksiflavon (**9**), 5,7-dihidroksi-3′-(4″-acetoksi-3″-metilbutil)-3,6,4′-trimetoksiflavon (**10**), aromadendrin, (2*S*,3*S*)-3,4′,5,7-tetrahidroksiflavanon (**11**) i pinocembrin (**12**). Uz njih analizirana su i dva kristala: vodeni (**1A**) i bezvodni (**3A**). Njihove strukture prikazane su na **slici 17**. Rezultati su prikazani **u tablici 8** (29).



Slika 17. Strukture izoliranih flavonoida iz biljke *Dodonea viscosa* L. (29)

Sevindik H.G. i suradnici (30) 2015. godine izolirali su flavonoidne spojeve iz biljke *Achillea millefolium* L. (stolisnik) kako bi ispitali njihova antilkolinesteraznu aktivnost Ellmanovom metodom. Iz nadzemnih dijelova biljke izolirali su: luteolin (**1**), apigenin-7-*O*-*β*-D-glukozid (**2**), luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (**3**), 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (**4**) (**Slika 18**). Kao ekstrakcijsko otapalo korišten je metanol, a rezultati su prikazani u **tablici 9** (30).



1.	**R1**: H	**R2**: H	**R3**: OH
2.	**R1**: Glukoza	**R2**: H	**R3**: H
3.	**R1**: Glukoza	**R2**: H	**R3**: OH
4.	**R1**: Glukoza	**R2**: OH	**R3**: OH

Slika 18. Kemijske strukture flavonoida izoliranih iz *Achillea millefolium:* luteolin (1), apigenin-7-*O*-*β*-D-glukozid (2), luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (3), 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (4)

Tablica 8. Inhibicijska aktivnost izoliranih spojeva na AChE i BChE

Flavonoidi	AChEI (%) kod 200 µM	AChEI IC_{50} (µM)	BChEI (%) kod 200 µM	BChEI IC_{50} (µM)
1	7.51±0.72	>300	36.06±1.14	274.07 ± 1.68
1A	8.79±0.88	>300	42.48±0.43	257.29 ± 1.36
2	54.85±1.33	175.11 ± 1.36	87.28±1.50	55.78 ± 1.01
3	52.97±0.49	182.97 ± 1.25	98.22±1.55	47.07 ± 0.54
3A	45.34±1.31	219.77 ± 1.45	76.85±2.34	58.72 ± 1.02
4	17.39±1.69	>300	66.22±2.03	145.65 ± 1.45
5	38.38±0.82	270.25 ± 1.16	71.85±1.15	115.97 ± 1.18
6	28.14±1.72	>300	40.05±1.54	298.40 ± 2.01
7	19.35±1.82	>300	45.49±0.63	222.54 ± 1.64
8	9.41±1.49	>300	39.72±0.52	>300
9	31.51±2.00	>300	51.16±1.78	192.60 ± 1.96
10	12.40±1.46	>300	43.46±2.85	>300
11	55.42±1.78	173.22 ± 1.07	76.55±1.37	95.13 ± 1.24
12	19.99±1.00	>200	54.92±1.96	99.36 ± 0.87
Galantamin	65.80 ± 1.08	4.48 ± 0.78	79.95 ± 0.86	6.03 ± 0.14

* Sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta i rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD, IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima, santin (**1**), penduletin (**2**), viskozin (**3**), 6,7-dimetilkempferol (**4**), kempferol-3-metileter (**5**), 3,4′-dimetoksi-5,7-dihidroksiflavon (**6**), 5,7,4′-trihidroksi-3′-(3-hidroksimetilbutil)-3,6-dimetoksiflavon (**7**), 5,7-dihidroksi-3′-(2-hidroksi-3-metil-3-butenil)-3,6,4′-trimetoksi-flavon (**8**), 5,7-dihidroksi-3′-(3-hidroksi-metilbutil)-3,6,4′-trimetoksiflavon (**9**), 5,7-dihidroksi-3′-(4″-acetoksi-3″-metilbutil)-3,6,4′-trimetoksiflavon (**10**), aromadendrin, (2*S*,3*S*)-3,4′,5,7-tetrahidroksiflavanon (**11**) i pinocembrin (**12**), vodeni kristal (**1A**) i bezvodni kristal (**3A**).

Tablica 9. *In vitro* inhibicijska aktivnost izoliranih flavonoida iz biljke *Achillea millefolium* na AChE i BChE

Spoj	IC_{50} AChEI / µM*	IC_{50} BChEI / µM*
1	2.12 ± 0.145	2.45 ± 0.099
2	1.89 ± 0.067	2.13 ± 0.440
3	1.67 ± 0.302	2.20 ± 0.058
4	1.65 ± 0.122	1.97 ± 0.220
Neostigmin	1.08 ± 0.056	4.36 ± 0.028

*Sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta i rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD , IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima, luteolin (**1**), apigenin-7-*O*-*β*-D-glukozid (**2**), luteolin 7-*O*-*β*-D-glukozid (**3**), 6-OH-luteolin 7-*O*-*β*-D-glukozid

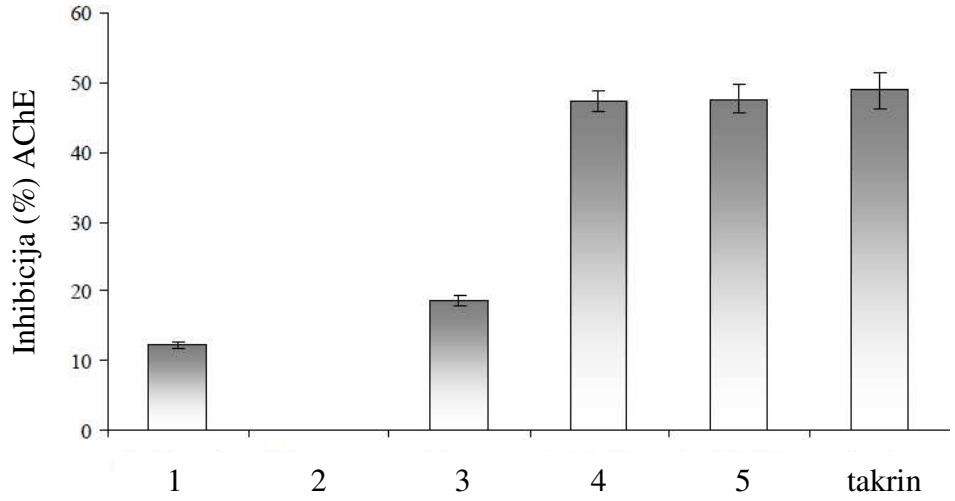
4.2 KRONOLOŠKI PRIKAZ REZULTATA DOBIVENIH IZ EKSTRAKATA BILJAKA S KOLINESTERAZNOM AKTIVNOŠĆU

Jukić i suradnici (31) 2011. godine ispitali su antikolinesterazno djelovanje različitih hrvatskih biljaka koristeći Ellmanovu metodu. Ekstrakcijska otapala koja su se koristila su metanol, etil acetat i kloroform, a ekstrakti su se uzimali iz različitih dijelova sljedećih biljaka: *Taraxacum officinale* L. *Helichrysum italicum*, *Achillea millefolium* L., *Inula verbascifolia*, *Pallenis spinosa* L., *Cynara scolymus* L., *Salix alba* L., *Paliurus spinachristi* Mill., *Tamus communis* L., *Spartium junceum* L., *Prunus mahaleb* L., *Clematis flammula* L., *Sambucus nigra* L., *Ephedra campylopoda* C.A.May, *Vinca major* L., a dio biljke koji se koristio za daljnju analizu odabran je na osnovi upotrebe u lokalnoj tradicionalnoj medicini. Svim analiziranim ekstraktima određen je ukupni sadržaj fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline po gramu ekstrakta. Najznačajniji rezultat prikazan je u **tablici 10** (31).

Tablica 10. Inhibicijska aktivnost metanolnog ekstrakta kore biljke *Salix alba*

Ekstrakt	**Inhibicija AChE (%) kod 1mg/mL**
Metanolni ekstrakt kore biljke *Salix alba*	50.70

Generalić Mekinić i suradnici (32) 2012. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje različitih biljka iz porodice Asteraceae koristeći Ellmanovu metodu. Koristili su komercijalno dostupne dijelove biljaka: cvijetove biljke *Calendula officinalis* L., lišće biljke *Arctium lappa* L., korijen biljke *Inula helenium* L., zelen biljke *Artemisia absinthium* L. i zelen biljke *Achillea millefolium* L., podrijetlom iz Hrvatske. Rezultati su prikazani grafički, na **slici 19** (32).



Slika 19. Prikaz inhibicijske aktivnosti biljaka *C.officinalis* (1), *I.helenium* (2), *A.lappa* (3), *A.absinthium* (4), *A.millefolium* (5) u usporedbi s takrinom (33)

Asaduzzaman i suradnici (33) 2014. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje esktrakta lista biljke *Aegle marmelos* L. Biljka pripada porodici Rutaceae i široko je rasprostranjena na području Bangladeša. Koristi se tradicionalnoj indijskog medicini za vrućicu, dijareju, dijabetes i ugrize od zmija. Iz listova biljke pripremili su kruti metanolni ekstrakt (CME) i četiri frakcije: frakcija petrol-etera (PEF), kloroforma (CLF), etil acetata (EAF) i vode (AQF). Određivanje inhibicijske aktivnosti AChE provedeno je Ellmanovom metodom na homogenizatu tkiva mozga štakora. Rezultati su prikazani u **tablici 11** (33).

Tablica 11. Inhibicijska aktivnost ekstrakata iz biljke *Aegle marmelos*

Ekstrakt ili frakcija	**Inhibicija AChE (%) / 100 µg/mL**
CME	29.55
PEF	14.07
CLF	22.06
EAF	36.95
AQF	31.46
Donepezil	97.14

*kruti metanolni ekstrakt (CME), frakcija petrol-etera (PEF), kloroforma (CLF), etil acetata (EAF) i vode (AQF) biljke *Aegle marmelos*

Kamal i suradnici (34) 2015. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakta biljke *Atriplex laciniata* L. kako bi provjerili njezinu efikasnost kod neurodegenerativnih poremećaja. Iz potporodice je Chenopodiaceae, podrijetlom iz Australije, Sjeverne Amerike, Južne Amerike i Euroazije. Ispitivane su sljedeće frakcije: sirovi metanolni ekstrakt (Al.MeF), frakcija *n*-heksana (Al.HxF), kloroforma (Al.CfF), etil acetata (Al.EaF), vodena frakcija (Al.WtF), frakcija saponina (Al.SPF) i flavonoida (Al.FLVF). Određen je sadržaj fenola i flavonoida u svakoj od frakcija i izražen kao ekvivalent galne kiseline (EGK) za ukupne fenole i ekvivalent rutina (ER) za flavonoide (**Tablica 12**). Za određivanje inhibicijske aktivnosti AChE i BChE koristila se Ellmanova metoda, rezultati su prikazani u **tablici 13** (34).

Tablica 12. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida krutog metanolnog ekstrakta i te različitih frakcija biljke *Atriplex laciniata*

Uzorci	Ukupni fenoli (mg EGK/g po uzorku)	Ukupni flavonoidi (mg ER/g po uzorku)
Al.MeF	311.32 ± 0.54	144.37 ± 0.52
Al.HxF	152.59 ± 0.48	14.38 ± 0.51
Al.CfF	231.12 ± 0.58	160.41 ± 0.55
Al.EaF	278.79 ± 0.45	52.33 ± 0.46
Al.WtF	190.62 ± 0.62	82.25 ± 0.55

*EGK = ekvivalent galne kiseline, ER = ekvivalent rutina, sve vrijednosti u tablici su srednja vrijednost eksperimenta koji je proveden tri puta, metanolni ekstrakt (Al.MeF), frakcija *n*-heksana (Al.HxF), frakcija kloroforma (Al.CfF), frakcija etil acetata (Al.EaF), vodena frakcija (Al.WtF), frakcija saponina (Al.SPF), frakcija flavonoida (Al.FLVF)

Tablica 13. Inhibicijska aktivnost frakcija biljke *Atriplex laciniata* prema AChE i BChE

Uzorci	Konc.(µg/mL)	% inhibicije (AChE)	AChE IC_{50} (µg/mL)	% inhibicije (BChE)	BChE IC_{50} (µg/mL)
Al.MeF	1000	78.65 ± 0.70	280	82.68 ± 0.60	220
	500	67.25 ± 0.55		69.42 ± 0.60	
	250	47.21 ± 0.62		52.51 ± 0.66	
	125	31.55 ± 0.56		41.27 ± 0.62	
Al.HxF	1000	72.51 ± 0.62	310	64.36 ± 0.61	400
	500	63.44 ± 0.44		53.40 ± 0.52	
	250	42.46 ± 0.47		39.46 ± 0.60	
	125	23.68 ± 0.64		22.52 ± 0.49	
Al.EaF	1000	77.45 ± 0.55	270	74.41 ± 0.60	260
	500	57.63 ± 0.64		61.53 ± 0.71	
	250	48.45 ± 0.66		49.45 ± 0.77	
	125	36.36 ± 0.50		31.75 ± 0.58	
Al.CfF	1000	67.42 ± 0.46	390	83.49 ± 0.46	160
	500	53.53 ± 0.41		72.48 ± 0.50	
	250	40.62 ± 0.69		59.59 ± 0.66	
	125	18.46 ± 0.67		45.57 ± 0.63	
Al.WtF	1000	72.44 ± 0.58	263	78.62 ± 0.36	210
	500	60.51 ± 0.59		69.22 ± 0.47	
	250	48.62 ± 0.70		52.52 ± 0.71	
	125	31.47 ± 0.55		43.52 ± 0.70	
Al.SPF	1000	84.36 ± 0.64	90	80.37 ± 0.54	120
	500	77.34 ± 0.65		73.44 ± 0.50	
	250	65.58 ± 0.67		62.51 ± 0.72	
	125	53.60 ± 0.50		49.28 ± 0.61	
Al.FLVF	1000	88.31 ± 0.57	70	85.46 ± 0.62	100
	500	79.46 ± 0.63		76.58 ± 0.69	

	250	67.53 ± 0.49		65.68 ± 0.42	
	125	59.38 ± 0.50		52.46 ± 0.72	
Galantamin	1000	91.37 ± 0.65	52	94.50 ± 0.71	47
	500	83.33 ± 0.55		85.47 ± 0.59	
	250	73.31 ± 0.60		71.72 ± 0.51	
	125	61.32 ± 0.54		65.37 ± 0.69	

*Sve komponente ispitane su u setu eksperimenata ponovljenih tri puta i rezultat je prikazan kao srednja vrijednost ± SD, IC_{50} vrijednost predstavlja koncentraciju koja je uzrokovala 50 %-tnu inhibiciju enzima, metanolni ekstrakt (Al.MeF), frakcija *n*-heksana (Al.HxF), frakcija kloroforma (Al.CfF), frakcija etil acetata (Al.EaF), vodena frakcija (Al.WtF), frakcija saponina (Al.SPF), frakcija flavonoida (Al.FLVF)

Nwidu L.L. i suradnici (35) 2017. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakata biljke *Carpolobia lutea* G. Don. Stabljika, lišće i korijenje biljke podvrgnuti su sekvencijalnim ekstrakcijama otapalima i pregledani na anti-AChE aktivnost u rasponu koncentracija od 0,02–200 μg/mL.

Napravljene su sljedeće frakcije iz stabljike: frakcija *n*-heksana (n-HSF), diklormetana (DCSF), etil acetata (EASF) i metanola (MTSF). Nadalje, napravljene su i frakcije iz uljnog ekstrakta stabljike: etanolna uljna frakcija (cETSE oil), uljna frakcija *n*-heksana (n-HSF oil), etil acetatna uljna frakcija (EASF oil) i metanolna uljna frakcija (MTSF oil). Zatim im je smanjen volumen koristeći rotacijski parni uparivač i sušeni u struji dušika te je napravljena etil acetatna frakcija (HASE). Iz korijena biljke napravljene su sljedeće frakcije: sirovi metanolni ekstrakt (cMTRE), frakcija *n*-heksana (n-HRF), kloroform frakcija (CHRF), etil acetatna frakcija (EARF), butanolna frakcija (BURF) i vodena frakcija (AQRF). Iz lišća biljke napravljene su sljedeće frakcije: frakcija *n*-heksana (n-HLF), kloroform frakcija (CHLF), etil acetatna frakcija (EALF), etanolna frakcija (ETLF). Nakon 72 sata maceracije napravljene su i čvrste frakcije: etil acetatni kruti ekstrakt (cEALE) i etanolni kruti ekstrakt (cETLE) i butanolni kruti ekstrakt (cBULE). Frakcijama je određen ukupni fenolni i flavonoidni sadržaj izražen kao ekvivalent galne kiseline (GK) i ekvivalent kvercetina (KV) (**Slika 20**). Iz pet ispitivanih koncentracija (0,02–200 μg/mL) izračunata je približna koncentracija IC_{50} i vrijednosti su prikazane na **slici 21** (35).

	Ekstrakt ili frakcija	Ukupni fenolni sadržaj (mg GK E/g)	Ukupni flavonoidni sadržaj (mg KV E/g)
STABLJIKA	cETSE	235.33 ± 0.01	30.59 ± 0.01
	EASF	177.23 ± 0.01	100.37 ± 0.20
	n-HSF oil	632.28 ± 0.00	196.21 ± 0.10
	EASF oil	3.00 ± 0.00	29.54 ± 0.20
	n-HSF	226.46 ± 0.00	176.87 ± 0.20
	MTSF	234.99 ± 0.02	1.75 ± 0.01
	MTSF oil	128.42 ± 0.01	116.49 ± 0.04
	cSSE	26.0 ± 0.00	78.72 ± 0.30
	DCSF	581.49 ± 0.00	19.59 ± 0.01
	cETSE oil	198.50 ± 0.00	40.85 ± 0.01
	HASE	178.37 ± 0.00	11.94 ± 0.02
LIST	cHALE	256.04 ± 0.01	17.04 ± 0.00
	cETLE	257.02 ± 0.02	24.69 ± 0.02
	CHLF	144.67 ± 0.01	296.68 ± 0.03
	cETLF	120.32 ± 0.01	63.28 ± 0.02
	cBULE	292.29 ± 0.01	19.21 ± 0.00
	n-HLF	285.63 ± 0.00	246.22 ± 0.20
	cEALE	100.85 ± 0.00	118.23 ± 0.00
KORIJEN	cMTRE	246.28 ± 0.00	9.36 ± 0.01
	CHRF	33.40 ± 0.00	104.52 ± 0.08
	BURF	462.00 ± 0.00	193.02 ± 0.00
	n-HRF	357.00 ± 0.00	123.06 ± 0.00
	EARF	296.50 ± 0.00	53.55 ± 0.01
	AQRF	28.00 ± 0.00	44.39 ± 0.00

Slika 20. Prikaz ukupnog fenolnog i flavonoidnog sadržaja biljke *Carpolobia lutea,* stabljika: frakcija n-heksana (n-HSF), diklormetana (DCSF), etil acetata (EASF) i metanola (MTSF), uljni ekstrakt stabljike: etanolna uljna frakcija (cETSE oil), uljna frakcija n-heksana (n-HSF oil), etil acetatna uljna frakcija (EASF oil) i metanolna uljna frakcija (MTSF oil), etil acetatna frakcija (HASE), korijen: sirovi metanolni ekstrakt (cMTRE), frakcija n-heksana (n-HRF), kloroform frakcija (CHRF), etil acetatna frakcija (EARF), butanolna frakcija (BURF) i vodena frakcija (AQRF), list: frakcija n-heksana (n-HLF), kloroform frakcija (CHLF), etil acetatna frakcija (EALF), etanolna frakcija (ETLF), čvrste frakcije: etil acetatni kruti ekstrakt (cEALE) i etanolni kruti ekstrakt (cETLE) i butanolni kruti ekstrakt (cBULE) (36)

Ekstrakt ili frakcija	AChE / IC_{50} /μg/mL
cETSE	140
EASF	472
n-HSF oil	140
EASF oil	503
n-HSF	912
MTSF	142
MTSF oil	472
cSSE	811
DCSF	>1000
cETSE oil	840
HASE	547
cHALE	>1000
cETLE	478
CHLF	60
cETLF	81
cBULE	738
n-HLF	461
cEALE	500
cMTRE	3
CHRF	137
BURF	247
n-HRF	173
EARF	0.3
AQRF	2

Slika 21. Prikaz antiacetilkolinesterazne aktivnosti ekstrakata biljke *Carpolobia lutea,* frakcija n-heksana (n-HSF), diklormetana (DCSF), etil acetata (EASF) i metanola (MTSF), uljni ekstrakt stabljike: etanolna uljna frakcija (cETSE oil), uljna frakcija n-heksana (n-HSF oil), etil acetatna uljna frakcija (EASF oil) i metanolna uljna frakcija (MTSF oil), etil acetatna frakcija (HASE), korijen: sirovi metanolni ekstrakt (cMTRE), frakcija n-heksana (n-HRF), kloroform frakcija (CHRF), etil acetatna frakcija (EARF), butanolna frakcija (BURF) i vodena frakcija (AQRF), list: frakcija n-heksana (n-HLF), kloroform frakcija (CHLF), etil acetatna frakcija (EALF), etanolna frakcija (ETLF), čvrste frakcije: etil acetatni kruti ekstrakt (cEALE) i etanolni kruti ekstrakt (cETLE) i butanolni kruti ekstrakt (cBULE) (36)

Barut E.N. i suradnici (36) 2017. godine ispitali su antikolinesteraznu aktivnost biljke *Achillea millefolium* L. iz porodice Asteraceae. Za potrebe istraživanja izolirali su metanolni (ME) i etanolni ekstrakt (EE) biljke *Achilea millefolium*. Odredili su ukupni sadržaj fenolnih kiselina izražen kao ekvivalent galne kiseline i ukupni sadržaj flavonoida izražen kao ekvivalent kvercetina. Testiranje antikolinesterazne aktivnosti proveli su na AChE iz električne jegulje koristeći Ellmanovu metodu, a pozitivna kontrola bio je galantamin (IC_{50}=17.05 μg/mL), rezultati su prikazani u **tablici 14** (36).

Tablica 14. Prikaz ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antikolinesterazne aktivnosti ekstrakta biljke *A.millefolium*

Uzorci	Ukupni fenoli (mg EGK/g po uzorku)	Ukupni flavonoidi (mg EKV/g po uzorku)	AChEI / IC_{50} / µg/mL
ME	53.11	35.88	105.05
EE	19.40	14.62	224.33
Galantamin	-	-	17.05

ME-metanolni ekstrakt, EE-etanolni ekstrakt biljke *Achillea millefolium,* EGK-ekvivalent galne kiselina, EKV-ekvivalent kvercetina

Reza i suradnici (37) su 2018. godine *in vitro* ispitali antikoliesteraznu i antioksidacijsku aktivnost biljke *Elatostema papillosum* Wedd. Biljka pripada porodici Urticaceae, a njene mnoge vrste rasprostranjene su u Africi, Aziji, Australiji i Oceaniji. Od biljke su uzeli listove, napravili fin prašak, ekstrakciju obavili s metanolom i izolirali suhi ekstrakt lista biljke *Elatostema papillosum*. Ukupni fenolni sadržaj izražen je kao ekvivalent galne kiseline (hidroksi-benzojeva kiselina) i kao ekvivalent katehina (flavan-3-ol). Metoda koja se koristila određivanje inhibicijske aktivnosti na AChE i BChE je Ellmanova metoda. Enzimi AChE i BChE ekstrahirani su iz miševa i onda je u *in vitro* uvjetima napravljeno testiranje, a rezultati su prikazani u **tablici 15** (37).

Tablica 15. . Prikaz ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antikolinesterazne aktivnosti ekstrakta biljke *E.papillosum*

Uzorci	Ukupni fenoli (mg EGK/g po uzorku)	Ukupni flavonoidi (mg EKH/g po uzorku)	AChEI / IC_{50} / µg/mL	BChEI / IC_{50} / µg/mL
EPL	23.74	31.18	165.40	213.83
Donepezil	-	-	17.01	-
Galantamin	-	-	-	19.64

EPL-suhi ekstrakt lista biljke *Elatostema papillosum*, EGK-ekvivalent galne kiseline, EKH- ekvivalent katehina

Nwidu L.L. i suradnici (38) 2018. godine *in vitro* su ispitali antikolinesteraznu i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta biljke *Moringa oleifera* Lam. Pripada porodici Moringaceae i autohtona je na području sjeverozapadne Indije, mnogih zemalja Afrike, jugoistočne Azije, Arabije, Tihog oceana, Južne Amerike i Karipskog otočja.

Za potrebe ovog istraživanja pripremljeni su ekstrakti i određen im je ukupni fenolni i flavonoidni sadržaj. Metanolni ekstrakti: metanolni ekstrakt kore (MOBME), metanolni ekstrakt cvijeta (MOFME), metanolni ekstrakt kore drveta (MOSME), metanolni ekstrakt praha za hranu (MOFPME); metanolni vrući ekstrakt stabljike (MOSME (h)), metanolni ekstrakt lista (MOLME), metanolni hladni ekstrakt stabljike (MOSME (c)), metanolni ekstrakt korijena (MORME). Vodeni ekstrakti: vodeni ekstrakt korijena (MORAE), vodeni ekstrakt cvijeta (MOFAE), vodeni ekstrakt kore (MOBAE). Etanolni ekstrakti: etanolni ekstrakt lista (MOLEE), etanolni ekstrakt korijena 1 (MOREE1), etanolni ekstrakt korijena 2 (MOREE2), , etanolni ekstrakt cvijeta (MOFEE1), etanolni ekstrakt cvijeta 2 (MOFEE2), etanolni ekstrakt kore (MOBEE), etanolni ekstrakt sjemena 1 (MOSEE1), etanolni ekstrakt sjemena 2 (MOSEE2). Ekstrakti označeni 1 su *Moringa oleifera* iz nizine, a ekstrakti označeni 2 iz zaleđa delte Nigera. Ukupni sadržaj fenola iskazan je kao ekvivalent galne kiseline, a flavonoida kao ekvivalent kvercetina (**Tablica 16**). Inhibicijska aktivnost na AChE homogenata mozga štakora određena je modificiranom Ellmanovom metodom, a eserin (fizostigmin) bio je pozitivna kontrola i u koncentraciji od 0.02 µg/mL gotovo potpuno je inhibirao AChE iz mozga električne jegulje i štakora. Za biljne ekstrakte izmjerena je relativna inhibicija AChE u odnosu na eserin (**Tablica 16**) (38).

Politeo O. i suradnici (39) 2018. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakta biljke *Mentha pulegium* L. iz porodice Lamiaceae. Biljka je rasprostranjena je na području Europe i Sredozemlja. Ispitani su metanolni (MpME) i vrući vodeni ekstrakti (MpHWE) biljke *M. pulegium* s područja Bosne i Hercegovine. Određen je ukupni fenolni i flavonoidni sadržaj izražen kao ekvivalent galne kiseline i kvercetina (**Tablica 17**). Inhibicijska aktivnost na AChE i BChE je slaba do umjerena (**Tablica 17**) (39).

Tablica 16. Prikaz ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antiacetilkolinesterazne aktivnosti ekstrakta biljke *Moringa oleifera*

Moringa oleifera ekstrakt	**Ukupni sadržaj fenola (mg GK E/g)**	**Ukupni sadržaj flavonoida (mg KV E/g)**	**AChE /IC_{50}/ µg/mL**
Metanolni			
MOBME	212.3 ± 2.30	112.5 ± 2.40	0.1740
MOFME	175.6 ± 0.09	84.3 ± 2.30	0.2750
MOSME	187.4 ± 2.00	52.0 ± 0.60	0.3425
MOFPME	100.4 ± 0.08	7.3 ± 1.90	0.4335
MOSME (h)	123.2 ± 1.10	57.0 ± 3.30	0.3863
MOLME	113.3 ± 1.90	91.2 ± 0.90	0.2615
MOSME (c)	94.5 ± 0.90	18.0 ± 0.09	0.08723
MORME	287.1 ± 0.00	254.3 ± 2.30	0.00845
Vodeni			
MOFAE	165.2 ± 0.80	27.0 ± 3.00	0.00845
MOBAE	153.3 ± 0.08	87.2 ± 3.60	0.3784
MORAE	187.0 ± 1.90	67.2 ± 2.00	0.2764
Etanolni			
MOLEE	201.0 ± 2.30	102.2 ± 1.50	0.2105
MOREE2	203.2 ± 0.02	342.5 ± 1.70	0.00175
MOREE1	223.2 ± 1.01	185.4 ± 2.70	0.0563

Moringa oleifera ekstrakt	Ukupni sadržaj fenola (mg GK E/g)	Ukupni sadržaj flavonoida (mg KV E/g)	AChE /IC_{50}/ µg/mL
MOFEE1	186.3 ± 2.00	75.0 ± 0.30	0.2756
MOFEE2	176.3 ± 0.30	69.7 ± 1.70	0.2654
MOBEE	187.2 ± 2.00	202.3 ± 3.10	0.0173
MOSEE1	146.3 ± 0.20	95.3 ± 2.5	0.2864
MOSEE2	109.2 ± 0.80	87.2 ± 3.60	0.2464

*GK E- ekvivalent galne kiseline, KV E-ekvivalent kvercetina, metanolni ekstrakt kore (MOBME), metanolni ekstrakt cvijeta (MOFME), metanolni ekstrakt kore drveta (MOSME), metanolni ekstrakt praha za hranu (MOFPME); metanolni vrući ekstrakt stabljike (MOSME (h)), metanolni ekstrakt lista (MOLME), metanolni hladni ekstrakt stabljike (MOSME (c)), metanolni ekstrakt korijena (MORME), vodeni ekstrakt korijena (MORAE), vodeni ekstrakt cvijeta (MOFAE), vodeni ekstrakt kore (MOBAE), etanolni ekstrakt lista (MOLEE), etanolni ekstrakt korijena 1 (MOREE1), etanolni ekstrakt korijena 2 (MOREE2), etanolni ekstrakt cvijeta (MOFEE1), etanolni ekstrakt cvijeta 2 (MOFEE2), etanolni ekstrakt kore (MOBEE), etanolni ekstrakt sjemena 1 (MOSEE1), etanolni ekstrakt sjemena 2 (MOSEE2)

Tablica 17. Prikaz ukupnog sadržaja fenola i flavonoida i antikolinesterazne aktivnosti ekstrakta biljke *M. pulegium*

Uzorci	Ukupni fenoli (mg EGK/g po uzorku)	Ukupni flavonoidi (mg EKV/g po uzorku)	Inhibicija (%) AChE kod konc. 1 g/L	Inhibicija (%) BChE kod konc. 1 g/L
MpHWE	124.27 ± 0.55	12.70 ± 0.00	18.73 ± 1.43	8.50 ± 4.77
MpME	157.92 ± 1.91	18.58 ± 0.08	13.65 ± 2.60	ND
Eserin (0.1 g/L)	-	-	95.92 ± 1.47	79.12 ± 0.00

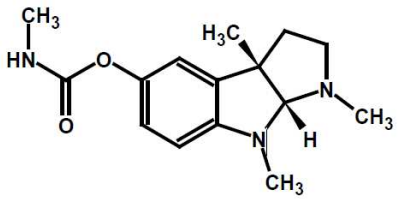
*MpHWE- vrući vodeni ekstrakt, MpME-metanolni ekstrakt biljke *M. pulegium,* EGK-ekvivalent galne kiseline, EKV- ekvivalent kvercetina, ND-nije detektirana, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD

5. RASPRAVA

5.1 SPOSOBNOST FENOLNIH SPOJEVA, SASTAVNICA BILJNIH EKSTRAKATA, DA INHIBIRAJU ENZIME KOLINESTERAZE

Inhibitori kolinesteraze koriste se u terapiji neurodegenerativnih poremećaja kao što je Alzheimerova demencija. Budući da postojeći lijekovi imaju nuspojave znanstvenici kontinuirano traže nove alternativne bioaktivne spojeve koji imaju inhibicijsku aktivnost na AChE i BChE (23).

Amor E.C. i suradnici (23) 2005. godine istražili su aktivnost flavonoida izoliranih iz biljke *Syzygium samarangense* (vodena jabuka). Iz spektara masa identificirali su rijetke C-metilirane flavonoide iz *S. samarangense.* Samo je spoj broj 7 (2′,4′-dihidroksi-6′-metoksi-3′,5′-dimetil-dihidrokalkon) pokazao značajnu inhibicijsku aktivnost na AChE. Rezultat je bio 98,5 % inhibicije u koncentraciji od 0,25 mM i 68 % inhibicije u koncentraciji od 0,20 mM (**Tablica 2**). Fizostigmin, pozitivna kontrola, pokazivao je gotovo 100 %-tnu inhibiciju u obje koncentracije. Podaci dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na to da je aktivnost spoja 7 vrlo specifična zato što se radi o jednom spoju koji je jako sličan ovim drugima, a jedini pokazuje značajnu inhibicijsku aktivnost. Dakle, za aktivnost je bitna CH_3 skupina na C-5′ i jednostruka veza na Cα-Cβ. Nadalje, primjećena je strukturna sličnost spoja 7 i pozitivne kontrole, fizostigmina kao npr. prisutnost –C=O skupine, - CH_3 i -C_6H_6 skupine u blizini –C=O grupe (**Slika 22**). Boljoj interakciji enzim-inhibitor možda doprinosi i rotacija Cα-Cβ skupina. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se to dokazalo, kao npr. istraživanja kinetičkog i molekularnog modeliranja (23).



Slika 22. Struktura fizostigmina (22)

Orhan I. i suradnici (24) 2007. godine ispitali su inhibicijsku aktivnost na enzime AChE i BChE četiriju fenolnih kiselina (klorogenska, kafeinska, galna i kvinska kiselina) i raznih derivata flavonoida (apigenin, kvercetin, genistein, biokanin A, luteolin-7-*O*-rutinozid, kempferol-3-*O*-galaktozid, diosmin, naringin, silibinin i silimarin) u *in vitro* uvjetima koristeći

Ellmanovu metodu. Rezultati istraživanja pokazali su da je kvercetin najpotentniji inhibitor AChE, s 76.2 % inhibicije kod testirane koncentracije 1 mg/mL, a genistein je imao najveću vrijednost inhibicije BChE, 65.7 % pri koncentraciji 1 mg/mL, iza njega luteolin-7-*O*-rutinozid i silibin (54.9 % i 51.4 %). Ostali flavonoidi su bili slabo aktivni ili inaktivni (**Tablica 3**) (24).

Nadalje, Khan M.T.H. i suradnici (25) 2009. godine ispitivali su *in vitro* antikolinesteraznu aktivnost različitih flavonoida Ellmanovom metodom. Testirana su četiri različita flavonoida – kvercetin, rutin, kempferol 3-*O*-*β*-D-galaktozid i makluraksanton (**Slika 10**). Rutin i kvercetin su komercijalno dostupne tvari, a drugi su izolirani. Kempferol je izoliran iz nadzemnog dijela biljke *Calluna vulgaris* L., a makluraksanton je izoliran iz nepolarne frakcije metanolnog ekstrakta biljke *Maclura pomifera* (Raf) Scheind.. Među njima su se samo aglikoni – kvercetin i makluraksanton pokazali kao potentni inhibitori kolinesteraze prema AChE (IC_{50} = 353.86 i 8.47 μM) i prema BChE (IC_{50} = 420.76 i 29.8 μM) (**Tablica 4**). Enzimske kinetičke studije ukazale su na to da su kvercetin i makluraksanton kompetitivni inhibitori BChE, kvercetin je takav i na AChE, a makluraksanton nekompetitivno inhibira AChE. Galantamin, koji se koristio kao pozitivna proba, pokazuje snažnu kompetitivnu inhibiciju (25).

Možemo primjetiti da ova dva spoja inhibiraju oba enzima; AChE i BChE. Dobra ravnoteža između inhibicije ova dva enzima može rezultirati boljom efikasnošću. Giacobini E. i suradnici (40) su ispitali povezanost inhibicije enzima u cerebrospinalnoj tekućini i kognitivnih promjena. Rezultati su pokazali da do značajnog poboljšanja kognitivnih sposobnosti dolazi inhibicijom oba enzima, koristeći rivastigmin, inhibitor AChE i BChE. Nadalje, poboljšanja u brzini, pažnji i pamćenju značajno su korelirala s inhibicijom BChE u cerebrospinalnoj tekućini što potvrđuje važnost inhibicije BChE (40).

Uriarte-Pueyo i Calvo (26) 2011. godine prikazali su brojne flavonoidne spojeve s antiacetilkolinesteraznom aktivnošću. Rezultati ovog pregleda pokazali su da od svih flavonoida koji su ispitani najbolju antiacetilkolinesteraznu aktivnost ima izoflavon pomiferin (spoj 121) dobiven iz metanolnog ekstrakta biljke *Maclura pomifera* (Raf) Scheind. (IC_{50}=0.096 mM). Iz iste biljke izoflavoni izo-osajin (spoj 118), osajin (spoj 120) i izo-pomiferin (119) imali su značajne rezultate u inhibiciji AChE (IC_{50} = 1.350, 2.239 i 2.670 mM). Također, odličan rezultat imali su (2*S*)-5,2-dihidroksi-7,5-dimetoksiflavanon (spoj 42) i hispidon (spoj 56) dobiveni iz metanolnog ekstrakta biljke *Onosma hispida* Wall. Ex G. Don (IC_{50}=28.0 i 11.6 μM) u usporedbi s galantaminom (IC_{50}=32.2 μM). Nadalje, 3-

metoksikvercetin (spoj 66) i tilirozid (spoj 97) dobiveni iz etil acetatnog ekstrakta biljke *Agrimonia pilosa* Ledeb. pokazali su značajnu antiacetilkolinesteraznu aktivnost (IC_{50}=37.9 i 23.5 μM) u usporedbi s dehidroevodiaminom (IC_{50}=37.8 μM). Kvercetin (spoj 89) i kvercetin-3-*O*-*β*-D-galaktopiranozid (spoj 91) dobiveni iz metanolnog ekstrakta biljke *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim. također su pokazali značajnu inhibicijsku aktivnost na AChE (IC_{50}=0.060 i 0.068 mM) u usporedbi s galantaminom (IC_{50}=0.0009 mM) (**Tablica 5**). Rezultati nam ukazuju da su derivati izoflavona najperspektivniji flavonoidi s visokom inhibicijskom aktivnošću prema AChE, ali i da su se derivati flavonola i flavanona pokazali vrijedni daljnjeg istraživanja u svrhu pronalaženja novih lijekova za Alzheimerovu bolest (26).

Ding X. i suradnici (27) 2013. godine izolirali su 13 derivata flavonoida (Slika 18) i 2 ginkolida iz listova biljke *Ginkgo biloba* L. i ispitali su njihovu antiacetilkolinesteraznu aktivnost *in vitro*. Rezultati su pokazali da flavonoidi inhibiraju AChE u rasponu IC_{50} vrijednosti od od 57,8 do 133,1 *μ*g/mL, a da su ginkolidi inaktivni (**Tablica 6**). Kao što vidimo u tablici, kvercetin-3-*O*-*β*-D-glukopiranozid (spoj 6) se pokazao najboljim inhibitorom s IC_{50} vrijednostima od 57,8 *μ*g/mL u usporedbi s pozitivnom kontrolom, klorpirifosom (IC_{50}=12,4 *μ*g/mL). Klorpirifos je organofosforni pesticid koji ireverzibilno inhibira AChE. Dobar rezultat imao je i kvercetin-3-*O*-*α*-L-ramnopiranozil-(1→6)-*β*-D-glukopiranozid (spoj 8) (IC_{50}=73,1 *μ*g/mL), a ostali spojevi pokazali su slabo inhibicijsko djelovanje (27).

Nadalje, 2015. godine Balkis A. i suradnici (28) ispitali su inhibicijsku aktivnost brojnih fenolnih i polifenolnih spojeva na AChE iz električne jegulje Ellmanovom metodom. Rezultati su pokazali da je baikalein, izoliran iz biljke *Scutellaria baicalensis* L., najpotentniji inhibitor AChE s IC_{50} vrijednosti od 0.61 μM, a pozitivna kontrola bio je takrin s s IC_{50} vrijednosti od 25.4 nM. IC_{50} vrijednost za baikalein je 25.5 viša od vrijednosti IC_{50} za takrin što znači da je slabiji od takrina. Baikalein se pokazao kao spoj kompetitivnog i nekompetitivnog inhibitora. Ostali flavonoidi kao npr. kempferol, kvercetin, miricetin, apigenin, pelargonidin, cijanidin, (-)-epigalokatehin galat, krisin i galangin također su pokazali značajnu inhibicijsku aktivnost s IC_{50} vrijednosti od 3.05 do 19.1 μM. S druge strane, melvidin, delfinidin i baohuzid I pokazali su slabu inhibicijsku aktivnost s IC_{50} vrijednosti od 41.1 do 89 μM (**Tablica 7**). Dobiveni rezultati sugeriraju da je za inhibiciju AChE potrebna barem sturktura fenilkromana, ali ipak inhibicijsku aktivnost pokazuju kurkumin i resveratrol, a nemaju unutar svoje strukture fenilkroman. Svejedno, njihova inhibicijska aktivnost je slabija; 76.6 % i 55.0 % inhibicije na 100 μM. Mnogi flavonoidi inhibirali su više od 90 % aktivnosti AChE ko što su baikalein,

miricetin, kvercetin, galangin, kempferol, (-)-epigalokatehin galat, krisin, apigenin, delfinidin, cijanidin, pelargonidin i melvidin. Neki su se pokazali neaktivnima npr. ikarin, rutin i izokvercetin (**Tablica 7**) (28).

Rezultati ovog istraživanja razlikuju se od prijašnjeg istraživanja A.J.Y Guo-a i suradnika iz 2010. godine, uvrštenih u tablicu 5 (26), zato što su oni za rezultat dobili da je baikalein slabiji inhibitor, a galangin jači, a ispitivanje je provedeno na homogenatu tkiva mozga odraslog štakora. Osim razlike u tkivu (mozak štakora naspram električnoj jegulji) i obliku (homogenati naspram čistog enzima) korištene AChE, to istraživanje je koristilo puno veće koncentracije supstrata acetilkolina (0.5 M) i inhibicija se određivala kod jedne koncentracije inhibitora (20 μM) (28).

Dobivene IC_{50} vrijednosti omogućile su da se procijeni odnos strukture i aktivnosti. Zaključeno je da je za jaku inhibicijsku aktivnost flavonoida potrebno prisustvo hidroksilne (OH) grupe na prstenu A i B, kao i nezasićenog prstena C. Snažna inhibicija koju je pokazao baikalein sugerira da su za aktivnost vrlo važne hidroksilne grupe na poziciji 5, 6 i 7 prstena A. Nadalje, gubitak bilo koje od tih grupa koji vidimo na primjeru baikalina (-OH grupa na poziciji 7 je glukuronidirana), oroksilina A (-OH grupa na poziciji 6 je metilirana), fisetina (nedostaje -OH grupa na poziciji 5 i 7) i galangina (nedostaje –OH grupa na poziciji 6) dovelo je do značajnog smanjenja aktivnosti u odnosu na baikalein (28).

Važnost hidroksilne skupine na poziciji 7 prstena A možemo vidjeti uspoređujući ikarin i baohuzid I.; ikarin nema slobodnu –OH grupu na poziciji 7 i inaktivan je, a baohuzid I ima i aktivan je. Oba spoja posjeduju prenilnu skupinu na poziciji 8 prstena A. Uspoređujući baohuzid I i baikalein vidimo da prenilna skupina na toj poziciji negativno utječe na aktivnost spoja. Nadalje, na inhibicijsku aktivnost AChE može utjecati i prisutnost hidroksilne grupe na poziciji 4′ prstena B. Galangin koji nema –OH grupu na tom mjestu puno je slabiji inhibitor od kempferola, kvercetina i miricetina. Također, inhibicijska aktivnost flavonoida može biti povećana prisutnošću dvostruke veze između C_3 i C_4 na prstenu C. To može biti razlog toga da je krizin jači inhibitor od pinocembrina, a apigenin od naringenina (28).

Muhammad A. i suradnici (29) 2015. godine izolirali su flavonoide iz biljke *Dodonaea viscosa* L. kako bi ispitali njihovu antiacetilkolinesteraznu i antioksidacijsku aktivnost. Rezultati ove studije pokazali su da spojevi 11 (3,4′,5,7-tetrahidroksiflavanon), 2 (penduletin) i 3 (viskozin) imaju značajnu inhibicijsku aktivnost na AChE, ovisnu o koncentraciji. Njihove

vrijednosti IC_{50} su redom 173.22, 175.11 i 182.97 μM i uspoređivane su sa standardnim galantaminom (IC_{50}=6.03 μM) (**Tablica 8**). Ipak, bolje rezultate su pokazali inhibirajući aktivnost BChE, također ovisne o koncentraciji. U inhibiciji BChE spojevi 3 (viskozin), 2 (penduletin) i 3A (bezvodni kristal) postigli su najbolji rezultat s IC_{50} vrijednostima od 47.07, 55.78 i 58.72 μM (29).

Na temelju dobivenih vrijednosti Muhammad i suradnici su opisali odnos između strukture i aktivnosti. Boljoj inhibicijskoj aktivnosti na AChE pridonosi prisutnost hidroksilih skupina (-OH) na pozicijama 5 i 7 prstena A, poziciji 4 prstena B i poziciji 5 prstena C što možemo vidjeti na primjeru najpotentnijeg inhibitora, 3,4′,5,7-tetrahidroksiflavanona. Njega, po aktivnosti, prate penduletin i viskozin. Smanjenje njihovih aktivnosti možemo objasniti promjenom u strukturi; penduletin na pozicijama 6 i 7 prstena A i poziciji 3 prstena C ima umjesto hidroksilne skupine metilnu, a viskozin metilnu skupinu sadrži na poziciji 6 prstena A i poziciji 3 prstena C (29).

Sevindik H.G. i suradnici (30) 2015. godine izolirali su flavonoidne spojeve iz biljke *Achillea millefolium* L. (stolisnik) kako bi ispitali njihova antilkolinesterazna i antioksidacijska svojstva. Iz nadzemnih dijelova biljke izolirali su: luteolin (1), apigenin-7-*O*-*β*-D-glukozid (2), luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (3), 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid (4) (**Slika 18**). Rezultati *in vitro* i *in silico* su pokazali da spoj 4 ima izvanrednu inhibicijsku aktivnost na AChE i BChE, IC_{50} vrijednosti od 1.65 i 1.97 μM uspoređujući s pozitivnom kontrolom, neostigminom (IC_{50} vrijednosti 1.08 i 4.36 μM) (**Tablica 9**). Svi su izolirani flavonoidi pokazali aktivno djelovanje, ali je bilo slabije od djelovanja spoja 4 što možemo objasniti razlikama u strukturi i u različitoj interakciji s aktivnim mjestima enzima. Flavonoidi imaju hidroksilne grupe na aromatskom prstenu što im omogućava bolju interakciju s aktivnim mjestom enzima, također kateholna skupina na prstenu B ima pozitivan utjecaj na inhibicijsku aktivnost. Iako kateholnu skupinu imaju spojevi 1, 3 i 4, spoj 1 ima najmanju inhibicijsku aktivnost. Istraživanjem se potvrdilo da je za djelovanje ipak bitnija šećerna komponenta (glukoza) u strukturi od kateholne. Rezultati ovog istraživanja sugeriraju nam da bi se 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-glikozid trebao dalje istraživati i možda uvrstiti u liječenje Alzheimerove bolesti (30).

5.2 SPOSOBNOSTI RAZLIČITIH BILJNIH EKSTRAKATA DA INHIBIRAJU ENZIME KOLINESTERAZA

Jukić i suradnici (31) 2011. godine u inhibiciji AChE izdvojili su metanolni ekstrakt kore biljke *Salix alba* L. Ostvario je 50.70 % inhibicije AChE kod koncentracije 1 mg/mL, a svi drugi ekstrakti su imali manje od 20 % pri istoj koncentraciji (**Tablica 10**). Svim analiziranim ekstraktima određen je ukupni sadržaj fenola izražen kao ekvivalent galne kiseline po gramu ekstrakta, a metanolni ekstrakt kore biljke *Salix alba* imao je najviši sadržaj fenola što nam ukazuje da su fenoli zaslužni za djelovanje (31).

Generalić Mekinić i suradnici (32) 2012. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje različitih biljka iz porodice Asteraceae koristeći Ellmanovu metodu. Koristili su komercijalno dostupne dijelove biljaka: cvijetove biljke *Calendula officinalis* L., lišće biljke *Arctium lappa* L., korijen biljke *Inula helenium* L., zelen biljke *Artemisia absinthium* L. i zelen biljke *Achillea millefolium* L., podrijetlom iz Hrvatske. Najbolji rezultat pokazali su etanolni ekstrakti dobiveni iz *A.millefolium* i *A.absinthium*; inhibirali su kod koncentracije 0.5 mM 46 % aktivnosti enzima. Za usporedbu, pozitivna kontrola, takrin, kod iste koncentracije inhibirao je 50 % aktivnosti AChE. Svi su drugi etanolni ekstrakti pokazali inhibiciju manju od 20 % (**Slika 19**). Najbolji rezultat ostvarili su ekstrakti s najvišim udjelom fenola što nam ukazuje na to da bi fenolni spojevi mogli biti odgovorni za djelovanje (32).

Asaduzzaman i suradnici (33) 2014. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje esktrakta lista biljke *Aegle marmelos* L. Rezultati su pokazali da ekstrakti dobiveni iz lišča biljke imaju umjereno inhibicijsko djelovanje. Inhibicijska aktivnost ispitana je u rasponu koncentracija 50-200 µg/mL i u ovisnosti je s koncentracijom. Najbolji rezultat pokazala je etil acetatna frakcija lišća biljke; inhibirala je 36.95 % aktivnosti enzima kod koncentracije od 100 µg/mL, a donepezil koji se koristio kao kontrola ostvario je 97.14 % inhibicije pod istim eksperimentalnim uvjetima. Sljedeći po aktivnosti bili su vodena frakcija, kruti metanolni ekstrakt, kloroform frakcija i petrol-eter frakcija s rezultatima inhibicije 31.46, 29.55, 22.06 i 14.07 % kod koncentracije od 100 µg/mL (**Tablica 11**) (33).

Nadalje, određen je sadržaj u ekstraktu lišća biljke *Aegle marmelos*; kruti metanolni ekstrakt imao je najviši sadržaj fenola i flavonoida izražen kao ekvivalent galne kiseline (EGK). Etil acetatna frakcija bila druga po sadržaju fenola i flavonoida, a pokazala je najbolje

inhibicijsko djelovanje što nam ukazuje da su bi fenoli i flavonoidi mogli biti odgovorni za postignuto djelovanje (33).

Kamal i suradnici (34) 2015. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakta biljke *Atriplex laciniata* L. Izolirane frakcije pokazale su inhibicijsku aktivnost ovisnu o dozi; na najvišoj koncentraciji sve su frakcije imale bolji rezultat inhibicije AChE i BChE. Najbolji rezultat u inhibiciji AChE imala je flavonoidna frakcija ekstrakta Al.FLVF (IC_{50}=70 μg/mL) u usporedbi s galantaminom (IC_{50}=52 μg/mL). Iza nje su saponinska frakcija Al.SPF, biljni sirovi metanolni ekstrakt Al.MeF, etil acetatna frakcija Al.EaF, frakcija n-heksana Al.HxF, vodena frakcija Al.Wtf i najmanji rezultat kloroform frakcija Al.CfF. BChE su frakcije inhibirale sljedećim redosljedom, počevši od najbolje: Al.FLVF (IC_{50}=100 μg/mL), Al.CfF, Al.MeF, Al.SPF, Al.Wtf, Al.EaF i Al.HxF, a uspoređivale su se s galantaminom (IC_{50}=47 μg/mL) (**Tablica 12**). Niska IC_{50} vrijednost je pokazatelj dobre inhibicije enzima. U tablici vidimo da su neke od frakcija ostvarile značajan rezultat u inhibiciji i da bi se spojevi ove biljke trebali još izolirati i karakterizirati kako bi se pronašli novi kandidati za liječenje Alzheimerove bolesti (34).

Nwidu L.L. i suradnici (35) 2017. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakata biljke *Carpolobia lutea*. Ukupni sadržaj fenola bio je najviši u uljnoj *n*-heksan frakciji stabljike; 632 mg ekvivalenta galne kiseline po gramu ekstrakta. Najveći ukupni sadržaj flavonoida bio je u lišću, u kloroform frakciji; 297 mg ekvivalenta kvercetina na gram ekstrakta (**Slika 20**).

Navedene frakcije inhibirale su aktivnost AChE ovisno o koncentraciji. Kod najviše koncentracije (200 μg/mL) frakcije EASF oil, cSSE, CHLF, BURF, n-HRF i AQRF inhibirale su 90-100 % aktivnosti enzima u usporedbi s pozitivnom kontrolom, eserinom koji je u koncentraciji 0.02 μg/mL ostvario 100 %-tnu inhibiciju AChE iz električne jegulje. Frakcije iz korijena biljke *Carpolobia lutea* pokazale su najveću inhibicijsku aktivnost (najniže IC_{50} koncentracije); etil acetatna, vodena i metanolna frakcija s IC_{50} vrijednostima 0.3, 2 i 3 μg/mL. Sljedeće po aktivnosti su frakcije iz lišća biljke; kloroform frakcija i etanolna frakcija s IC_{50}=60 i 81 μg/mL (**Slika 21**). Eserin koji se koristio kao pozitivna kontrola 72 puta je jači inhibitor kolinesteraze od takrina (35).

Barut E.N. i suradnici (36) 2017. godine ispitali su antikolinesteraznu aktivnost biljke *Achillea millefolium* L. Biljka pripada porodici Asteraceae, a u tradicionalnoj medicini

upotrebljava se za glavobolju, hemoroide, dijabetes, kožne ekceme i upalu. Biljka sadrži tokoferole, askorbinsku kiselinu, flavonoide (apigenin, kvercetin) i fenolne kiseline. Za potrebe istraživanja izolirali su metanolni (ME) i etanolni ekstrakt (EE) biljke *Achilea millefolium*. Ukupni fenolni sadržaj ME i EE je 53,11 mg i 19.40 mg ekvivalenta galne kiseline po gramu suhog ekstrakta. ME (35,88 mg ekvivalenta kvercetina po gramu suhog ekstrakta) imao je veći ukupni sadržaj flavonoida od EE (14.62 mg ekvivalenta kvercetina po gramu suhog ekstrakta). Protokatehinska, klorogenska, vanilinska i kofeinska kiselina detektirane su u EE, a protokatehinska i klorogenska kiselina u ME. Testiranje antikolinesterazne aktivnosti proveli su na AChE iz električne jegulje, a pozitivna kontrola bio je galantamin (IC_{50}=17.05 μg/mL). Rezultati su pokazali da je ME (IC_{50}=105.05 μg/mL) potentniji od EE (IC_{50}=224.33 μg/mL) (**Tablica 14**). Iako su ekstrakti pokazali značajnu antiacetilkolinesteraznu aktivnost potrebna su daljnja ispitivanja kako bi se utvrdio terapijski potencijal kod Alzheimerove bolesti (36).

Reza i suradnici (37) su 2018. godine *in vitro* ispitali antikoliesteraznu i antioksidacijsku aktivnost biljke *Elatostema papillosum* Wedd. Koristi se u tradicionalnoj medicini za liječenje nervoza i bolova u trbuhu. To je potaklo na istraživanje njene aktivnosti i relevantnosti u liječenju Alzheimerove bolesti. Određeno je da suhi ekstrakt lista po gramu sadrži 23.74 mg ekvivalenta galne kiseline i 31.18 mg ekvivalenta katehina. Rezultati su pokazali da suhi ekstrakt lista biljke (EPL – *Elatostema papillosum* list) značajno inhibira oba enzima u usporedbi s kontrolom. U inhibiciji AChE EPL je ostvario IC_{50} vrijednost 165.40 μg/mL u usporedbi s donepezilom (IC_{50}=17.01 μg/mL). U inhibiciji BChE rezultat je 213.83 μg/mL, kontrola je bio galantamin (IC_{50}=19.64 μg/mL) (**Tablica 15**). Inhibicijska aktivnost AChE i BChE koncentracijski je ovisna. Postignuta inhibicija kolinesteraze bolja je od biljaka prethodno ispitanih, npr. *Andrographis paniculata*, *Nelumbo nucifera*, *Myrstica fragrans* i *Aegle marmelos*. To nam ukazuje da bi ovaj ekstrakt mogao biti efektivan inhibitor i da bi mogao poslužiti u liječenju Alzheimerove bolesti (37).

Nwidu L.L. i suradnici (38) 2018. godine *in vitro* su ispitali antikolinesteraznu i antioksidacijsku aktivnost ekstrakta biljke *Moringa oleifera* Lam. To je stablo malih ili srednjih dimenzija visine 10-15 metara. Gotovo svi dijelovi biljke: korijen, kora, guma, list, voće (mahune), cvijeće, sjeme i sjemensko ulje koriste se za razne bolesti u Nigeriji. Zbog potencijalne terapijske vrijednosti protiv raka, dijabetesa, reumatoidnog artritisa i drugih bolesti dobila je ime „stablo čuda“ u Tajlandu. Ekstrakti iz *M. oleifera* pokazuju različita farmakološka djelovanja kao npr. protuupalno, antibakterijsko, antioksidativno, antikancerogeno, hepatoprotektivno i neuroprotektivno djelovanje. U ovoj biljci prisutno je puno fitokemikalija

koje mogu pridonijeti širokom biološkom djelovanju. Na primjer, tanini, saponini, alkaloidi, flavonoidi, fenoli i glikozidi nalaze se u lišću; tanini, steroidi, flavonoidi, alkaloidi, glikozidi, kvercetin i terpenoidi u cvjetovima; galna kiselina, katehini, epikatehin, ferulinska kiselina, vanilin, kofeinska kiselina, protokatekuinska kiselina, cimetna kiselina, fitosterol, kvercetin, glikozidi i fenoli u sjemenu; procijanidini, arantiamid acetat, 3-dibenzilurea, kvercetin glikozid, ranoglukozid kvercetin i klorogena kiselina u korijenu; procijanidin, steroli, triterpenoidi, glikozidi, tanini, alkaloidi, *p*-sitosterol i oktakozanska kiselina u kori stabljike. Određen je ukupni sadržaj fenola i flavonoida, a metanolni ekstrakt korijena biljke *Moringa oleifera* (MORME) imao je najviši udio fenola, 287 mg ekvivalenta galne kiseline po gramu ekstrakta, i flavonoida, 254 mg ekvivalenta kvercetina po gramu ekstrakta (**Tablica 16**).

Najbolji rezultat od svih 19 skeniranih ekstrakata ostvarili su etanolni ekstrakt korijena 1 (MOREE1), metanolni ekstrakt korijena (MORME), etanolni ekstrakt korijena 2 (MOREE2) i etanolni ekstrakt kore (MOBEE) i pokazali su se kao najaktivniji inhibitori acetilkolinesteraze s IC_{50} vrijednostima od 0.00175, 0.00845, 0.0173 i 0.0563 µg/mL u usporedbi s eserinom (IC_{50}=0.02 µg/mL) (**Tablica 15**). Ekstrakti označeni 1 su *Moringa oleifera* iz nizine, a ekstrakti označeni 2 iz zaleđa delte Nigera. Ove frakcije ostvarile su značajan rezultat i otvorile su interes za daljnji razvoj i pročišćavanje, jer su u djelomično pročišćenom obliku bili snažniji inhibitori AChE od eserina. Po dobivenim rezultatima vidimo da su ekstrakti iz korijena najpotentniji, a dalje su redom ekstrakti iz kore, stabljike, listova, cvjetova i sjemena. Također, možemo primjetiti da su ekstrakti s najboljim rezultatom imali visok sadržaj fenola i flavonoida što nam ukazuje da bi oni mogli biti zaslužni za takav rezultat (38).

Politeo O. i suradnici (39) 2018. godine ispitali su antioksidacijsko i antikolinesterazno djelovanje ekstrakta biljke *Mentha pulegium* L. iz porodice Lamiaceae. Ukupni udio fenola iznosio je 124,27 i 157,92 mg ekvivalenta galne kiseline (EGK) po gramu vrućeg vodenog (MpHWE), odnosno metanolnog ekstrakta (MpME). Ukupni sadržaj flavonoida bio je 12,70 i 18,58 mg ekvivalenta kvercetina (EKV) po gramu MpHWE i MpME (**Tablica 17**).

Ekstrakti su pokazali slabu inhibicijsku aktivnost u usporedbi s pozitivnom kontrolom, eserinom. Vrući vodeni i metanolni ekstrakt biljke *M. pulegium* prema AChE su ostvarili inibiciju od 18.73 % i 13.65 % kod koncentracije 1 g/L, a eserin 95.92 % kod koncentracije 0.1 g/L. Metanolni ekstrakt nije inhibirao BChE, a vodeni vrući ekstrakt je inhibirao 8.50 % aktivnosti BChE kod koncentracije 1 g/L, a eserin 79.12 % kod koncentracije 0.1 g/L. Nadalje, HPLC-DAD analizom vodenog vrućeg i metanolnog ekstrakta biljke *M.pulegium* identificirano

je i kvantificirano petnaest spojeva,od toga; flavonoidi: kempferol, miricetin, apigenin, diosmetin, luteolin, naringenin, eriodiktiol i fenolne kiseline: siringinska, elaginska, ferulinska, kafeinska, klorogenska, *p*-kumarinska, ružmarinska i protokatehinska kiselina. Među identificiranim spojevima glavni spoj u oba ekstrakta bila je ružmarinska kiselina. Neki od identificiranih fenolnih spojeva u prijašnjim su istraživanjima pokazali inhibicijsku aktivnost na ChE (npr. kafeinska, elaginska, klorogenska kiselina, naringenin i kvercetin), ali ispitani ekstrakti biljke *M. pulegium* svejedno su pokazali nisku inhibicijsku aktivnost prema AChE i BChE (**Tablica 17**). Vjerojatno je to bio rezultat antagonističkog djelovanja između različitih spojeva u ekstraktu (39).

6. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je načiniti pregled stručne i znanstvene literature na temu sposobnosti biljnih ekstrakata da inhibiraju važne enzime u patogenezi Alzheimerove demencije; acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE). Pregledom je utvrđeno da različite frakcije biljnih ekstrakata, kao i čisti spojevi koji dolaze kao sastavnice ovih ekstrakata imaju potentnu inhibicijsku aktivnost na AChE i BChE. U ovom radu fokus istraživanja bili su polarni biljni ekstrakti te fenolni, odnosno flavonoidni spojevi, kao sastavnice biljnih ekstrakata. Znanstvenici su tijekom istraživanja koristili različite metode testiranja sposobnosti ekstrakata ili čistih spojeva da inhibiraju AChE i BChE. Uočeno je da je najčešće korištena Ellmanova metoda. Kao izvor kolinesteraze pri testiranju najčešće se koristila AChE iz električne jegulje i mozga štakora, a BChE iz konjskog i ljudskog seruma.

Među istraženim spojevima te smjesama tvari, kao najbolji inhibitor enzima acetilkolinesteraze (AChE) te butirilkolinesteraze (BChE) od svih čistih spojeva pokazao se 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glukozid izoliran iz biljke *Achillea millefolium* s IC_{50} vrijednosti prema AChE i BChE 1.65 i 1.97 μM, uspoređen s neostigminom (IC_{50}=1.08 i 4.36 μM) (30). Uz njega odličan rezultat postigao je i pomiferin dobiven metanolnom ekstrakcijom iz biljke *Maclura pomifera* s IC_{50} vrijednosti prema AChE od 0.096 mM uspoređen s galantaminom. Također, značajan rezultat imali su (2*S*)-5,2-dihidroksi-7,5-dimetoksiflavanon i hispidon dobiveni iz metanolnog ekstrakta biljke *Onosma hispida* (IC_{50}=28.0 i 11.6 μM) u usporedbi s galantaminom (IC_{50}=32.2 μM). Nadalje, 3-metoksikvercetin i tilirozid dobiveni iz etil acetatnog ekstrakta biljke *Agrimonia pilosa* pokazali su značajnu antiacetilkolinesteraznu aktivnost (IC_{50}=37.9 i 23.5 μM) u usporedbi s dehidroevodiaminom (IC_{50}=37.8 μM).

Od biljnih ekstrakata najbolji rezultat postigli su etanolni i metanolni ekstrakti korijena biljke *Moringa oleifera* s IC_{50} vrijednostima prema AChE od 0.00175 i 0.00845 μg/mL u usporedbi sa eserinom (IC_{50}=0.02 μg/mL). Također, frakcije iz korijena biljke *Carpolobia lutea* (etil acetatna, vodena, metanolna) pokazale su izvrsnu inhibicijsku aktivost prema AChE (IC_{50}=0.3, 2 i 3 μg/mL) u usporedbi sa eserinom (IC_{50}=0.02 μg/mL).

Nadalje, dobivene IC_{50} vrijednosti omogućile su da se procijeni odnos strukture i aktivnosti. Zaključeno je da je za jaku inhibicijsku aktivnost flavonoida potrebno prisustvo hidroksilne (OH) grupe na prstenu A i B, kao i nezasićenog prstena C. Snažna inhibicija koju je pokazao baikalein (IC_{50}=0.61 μM) sugerira da su za aktivnost vrlo važne hidroksilne grupe na poziciji 5, 6 i 7 prstena A. Gubitak bilo koje od tih grupa viđenih na primjeru baikalina (-OH grupa na poziciji 7 je glukuronidirana), oroksilina A (-OH grupa na poziciji 6 je

metilirana), fisetina (nedostaje -OH grupa na poziciji 5 i 7) i galangina (nedostaje –OH grupa na poziciji 6) dovelo je do značajnog smanjenja aktivnosti u odnosu na baikalein.

Važnost hidroksilne skupine na poziciji 7 prstena A možemo viđena je kod usporedbe ikarina i baohuzida I.; ikarin nema slobodnu –OH grupu na poziciji 7 i inaktivan je, a baohuzid I ima i aktivan je. Oba spoja posjeduju prenilnu skupinu na poziciji 8 prstena A. Uspoređujući baohuzid I i baikalein uočeno je da prenilna skupina na toj poziciji negativno utječe na aktivnost spoja. Nadalje, na inhibicijsku aktivnost AChE može utjecati i prisutnost hidroksilne grupe na poziciji 4′ prstena B. Galangin koji nema –OH grupu na tom mjestu puno je slabiji inhibitor od kempferola, kvercetina i miricetina. Također, inhibicijska aktivnost flavonoida može biti povećana prisutnošću dvostruke veze između C_3 i C_4 na prstenu C. To može biti razlog toga da je krizin jači inhibitor od pinocembrina, a apigenin od naringenina.

Dakle, izvanredna pretklinička učinkovitost ovih biljnih ekstrakata ukazuje na to da su potrebna daljnja *in vivo* te klinička i citotoksična ispitivanja kako bi se utvrdio terapijski potencijal u liječenju Alzheimerove bolesti. Različite nedostatke u djelovanju može se korigirati sintezom derivata tih spojeva i na takav način poboljšati farmakokinetički profil samog spoja.

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Tipton KF. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement: corrections and additions. Eur J Biochem. 01. srpanj 1994.;223(1):1–5.

2. Masson P, Carletti E, Nachon F. Structure, activities and biomedical applications of human butyrylcholinesterase. Protein Pept Lett. 2009.;16(10):1215–24.

3. Bosak A, Katalinić M, Kovarik Z. Cholinesterases: Structure, Role, and Inhibition. Arh Hig Rada Toksikol. 17. lipanj 2011.;62(2):175–89.

4. Khan H, Marya null, Amin S, Kamal MA, Patel S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother. svibanj 2018.;101:860–70.

5. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. Pharmacol Ther. travanj 2015.;148:34–46.

6. Delacour H, Dedome E, Courcelle S, Hary B, Ceppa F. Butyrylcholinesterase deficiency. Ann Biol Clin (Paris). 01. lipanj 2016.;74(3):279–85.

7. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Arch Pharm Res. travanj 2013.;36(4):375–99.

8. Topcu G, Kusman T. Lamiaceae Family Plants as a Potential Anticholinesterase Source in the Treatment of Alzheimer's Disease. Bezmialem Sci. 24. srpanj 2014.;2:1–25.

9. Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Kindl M, Vladić J, Lower-Nedza AD, Brantner AH. Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. Mol Basel Switz. 09. siječanj 2014.;19(1):767–82.

10. Simunkova M, Alwasel SH, Alhazza IM, Jomova K, Kollar V, Rusko M, i ostali. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. Arch Toxicol. 22. kolovoz 2019.;

11. The Role of Our Immune System in Alzheimer's – Columbia Science Review [Internet]. [citirano 02. listopad 2019.]. Dostupno na: https://columbiasciencereview.com/2017/04/07/the-role-of-our-immune-system-in-alzheimers/

12. Gilhus NE. Myasthenia Gravis. N Engl J Med. 29 2016.;375(26):2570–81.

13. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. John Wiley & Sons; 2008. 387 str.

14. Sidjimova B, Berkov S, Popov S, Evstatieva L. Galanthamine distribution in Bulgarian Galanthus spp. Pharm- Int J Pharm Sci. 2003.;58(12):935–936.

15. Heinrich M. Galanthamine from Galanthus and other Amaryllidaceae–chemistry and biology based on traditional use. U: The Alkaloids: Chemistry and Biology. Elsevier; 2010. str. 157–165.

16. Guo AJY, Xie HQ, Choi RCY, Zheng KYZ, Bi CWC, Xu SL, i ostali. Galangin, a flavonol derived from Rhizoma Alpiniae Officinarum, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro. Chem Biol Interact. 06. rujan 2010.;187(1–3):246–8.

17. Burčul F, Blažević I, Radan M, Politeo O. Terpenes, phenylpropanoids, sulfur and other essential oil constituents as inhibitors of cholinesterases. Curr Med Chem. 2019.;

18. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 1961.;7(2):88–95.

19. Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochem Anal Int J Plant Chem Biochem Tech. 2002.;13(1):51–54.

20. Rhee IK, Appels N, Luijendijk T, Irth H, Verpoorte R. Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plant extracts using a fluorimetric flow assay. Phytochem Anal Int J Plant Chem Biochem Tech. 2003.;14(3):145–149.

21. Ingkaninan K, De Best CM, Van Der Heijden R, Hofte AJP, Karabatak B, Irth H, i ostali. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. J Chromatogr A. 2000.;872(1–2):61–73.

22. Caldeira E, Piskin E, Breitenfeld L, Silva F, Gouveia I. Biofunctionalization of cellulosic fibres with L-cysteine: Assessment of antibacterial properties and mechanism of action against Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae. J Biotechnol. 01. prosinac 2013.;168:426–35.

23. A Dihydrochalcone from Syzygium samarangense with Anticholinesterase Activity [Internet]. [citirano 05. listopad 2019.]. Dostupno na: http://philjournalsci.dost.gov.ph/home-1/22-vol-134-no-2-december-2005/309-a-dihydrochalcone-from-syzygium-samarangense-with-anticholinesterase-activity

24. Orhan I, Kartal M, Tosun F, Şener B. Screening of Various Phenolic Acids and Flavonoid Derivatives for their Anticholinesterase Potential. Z Für Naturforschung C. 2014.;62(11–12):829–832.

25. Khan MTH, Orhan I, Senol FS, Kartal M, Sener B, Dvorská M, i ostali. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. Chem Biol Interact. 30. listopad 2009.;181(3):383–9.

26. Uriarte-Pueyo I, Calvo MI. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. Curr Med Chem. 2011.;18(34):5289–302.

27. Ding X, Ouyang M-A, Liu X, Wang R-Z. Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Flavonoids from the Leaves of Ginkgo biloba against Brown Planthopper. J Chem. 17. travanj 2013.;2013.

28. Balkis A, Tran K, Lee Y, Ng K. Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor. J Agric Sci. 15. kolovoz 2015.;7(9):p26.

29. Muhammad A, Tel-Cayan G, Ozturk M, Nadeem S, Duru ME, Anis I, i ostali. Biologically active flavonoids from Dodonaea viscosa and their structure-activity relationships. Ind Crops Prod. 2015.;78:66–72.

30. Sevindik HG, Güvenalp Z, Yerdelen KÖ, Yuca H, Demirezer LÖ. The discovery of potential anticholinesterase compounds from Achillea millefolium L. Ind Crops Prod. 2015.;76:873–879.

31. Jukic M, Burcul F, Carev I, Politeo O, Milos M. Screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of selected plants from Croatia. Nat Prod Res. 2012.;26(18):1703–1707.

32. Generalić Mekinić I, Burčul F, Blažević I, Skroza D, Kerum D, Katalinić V. Antioxidative/Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Asteraceae Plants. Nat Prod Commun. 01. travanj 2013.;8:471–4.

33. Asaduzzaman Md, Uddin MdJ, Kader M a., Alam A h. m. k., Rahman AA, Rashid M, i ostali. In vitro acetylcholinesterase inhibitory activity and the antioxidant properties of Aegle marmelos leaf extract: implications for the treatment of Alzheimer's disease. Psychogeriatrics. 01. ožujak 2014.;14(1):1–10.

34. Kamal Z, Ullah F, Ayaz M, Sadiq A, Ahmad S, Zeb A, i ostali. Anticholinesterse and antioxidant investigations of crude extracts, subsequent fractions, saponins and flavonoids of atriplex laciniata L.: potential effectiveness in Alzheimer's and other neurological disorders. Biol Res. 01. travanj 2015.;48(1):21.

35. Nwidu LL, Elmorsy E, Thornton J, Wijamunige B, Wijesekara A, Tarbox R, i ostali. Anti-acetylcholinesterase activity and antioxidant properties of extracts and fractions of Carpolobia lutea. Pharm Biol. prosinac 2017.;55(1):1875–83.

36. Barut EN, Barut B, Engin S, Yıldırım S, Yaşar A, Türkiş S, i ostali. Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of Achillea millefolium. Turk J Biochem. 2017.;42(4):493–502.

37. Reza AA, Hossain MS, Akhter S, Rahman MR, Nasrin MS, Uddin MJ, i ostali. In vitro antioxidant and cholinesterase inhibitory activities of Elatostema papillosum leaves and correlation with their phytochemical profiles: a study relevant to the treatment of Alzheimer's disease. BMC Complement Altern Med. 2018.;18(1):123.

38. Nwidu LL, Elmorsy E, Aprioku JS, Siminialayi I, Carter WG. In Vitro Anti-Cholinesterase and Antioxidant Activity of Extracts of Moringa oleifera Plants from Rivers State, Niger Delta, Nigeria. Medicines. rujan 2018.;5(3):71.

39. Politeo O, Bektašević M, Carev I, Jurin M, Roje M. Phytochemical Composition, Antioxidant Potential and Cholinesterase Inhibition Potential of Extracts from Mentha pulegium L. Chem Biodivers. 2018.;15(12):e1800374.

40. Giacobini E, Spiegel R, Enz A, Veroff AE, Cutler NR. Inhibition of acetyl- and butyryl-cholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. J Neural Transm Vienna Austria 1996. srpanj 2002.;109(7–8):1053–65.

8. SAŽETAK

Cilj ovog rada je istražiti sposobnosti različitih ekstrakata i čistih spojeva koji dolaze kao sastavnice ekstrakata u inhibiciji dvaju enzima važnih u patogenezi Alzheimerove bolesti; acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Predmet istraživanja su bili fenolni spojevi, prvenstveno flavonoidi. S ovim ciljem, pretražene su znanstvene baze podataka (*ScienceDirect, Web of Science, PubMed, Google Scholar, PMC* i *PubChem*). AChE i BChE imaju važnu ulogu u hidroliziranju acetilkolina što rezultira prijenosom živčanih impulsa. Inhibitori AChE i BChE koriste se kao lijekovi, ali zbog pratećih nuspojava znanstvenici su u potrazi za novim inhibitorima, izoliranim iz biljaka. Rezultati su pokazali da 6-OH-luteolin-7-*O*-β-D-glukozid, pomiferin, (2*S*)-5,2-dihidroksi-7,5-dimetoksiflavanon, hispidon, 3-metoksikvercetin i tilirozid imaju značajnu inhibicijsku aktivnost na AChE. Nadalje, od biljnih ekstrakata najbolji rezultat u inhibiciji AChE postigli su etanolni i metanolni ekstrakti korijena biljke *Moringa oleifera* i frakcije iz korijena biljke *Carpolobia lutea* (etil acetatna, vodena i metanolna).

9. SUMMARY

The aim of this paper is to investigate the ability of various herbal extracts and pure compounds which come as constituents of these extracts in the inhibition of two enzymes important in the pathogenesis of Alzheimer's disease; acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The subject of the study were phenolic compounds, primarily flavonoids. To this end, scientific databases (*ScienceDirect, Web of Science, PubMed, Google Scholar, PMC and PubChem*). AChE and BChE play an important role in the hydrolysis of acetylcholine resulting in nerve impulse transmission. AChE and BChE inhibitors are used as medicines, but because of the side effects, scientists are looking for new inhibitors, isolated from plants. The results showed that 6-OH-luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside, pomiferin, (2*S*)-5,2-dihydroxy-7,5-dimethoxyflavanone, hispidone, 3-methoxyquercetin and tiliroside have significant inhibitory activity on AChE. Furthermore, of all plant extracts, *Moringa oleifera* root extracts (ethanol and methanol) and *Carpolobia lutea* root extracts (ethyl acetate, aqueous and methanol) achieved the best results in AChE inhibition.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Petra Jurić

Datum rođenja: 11. rujna 1995.

Mjesto rođenja: Split

Državljanstvo: hrvatsko

e-mail: jur.petra13@gmail.com

Adresa stanovanja: Don Luke Jelića 1

OBRAZOVANJE:

Osnovna škola: OŠ Vjekoslava Paraća (2002.-2010.)

Srednja škola: Opća gimnazija Vladimir Nazor (2010.-2014.)

Fakultet: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, smjer: integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacija (2014.-2019.)

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE:

Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije; ljekarnička jedinica Solin (25. veljače – 30. kolovoza 2019.)

DRUGE AKTIVNOSTI:

- Aktivan član Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA)
- Praktična znanja za studente – Split 2017. god.
- Praktična znanja za studente – Split 2018. god.