

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS PROGRAMMA

***VACCINIUM SPP. OGU SPIEDPALIEKU EKSTRAKTU
ACETILHOLĪNESTERĀZES INHIBĪCIJA IN VITRO***

MAGISTRA DARBS

Autors: **Nikita Sļozs**

Studenta apliecības Nr.: ns07025

Darba vadītājs: profesore Dr.habil.biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2019

ANOTĀCIJA

Vaccinium spp. ogas un to produkti tiek aktīvi pētīti pēdējo 10 gadu laikā. Tiem ir pierādīts kognīciju uzlabojošs efekts *in vivo*. Pēta arī ogu spiedpalieku aktīvo vielu sastāvu un ietekmi uz organismu. Darbā ir analizēti melleņu, krūmmelleņu, dzērveņu, purva dzērveņu un brūkleņu spiedpalieku ekstraktu efekti uz AchE aktivitāti *in vitro*, kā arī mijiedarbība ar AchE inhibitoriem – ipidakrīnu, donepezilu un neostigmīnu. AchE aktivitāte mērīta ar spektroskopisko Ellmana metodi. Iegūtie dati liecina, ka visi ekstrakti no koncentrācijas atkarīgā veidā inhibē AchE. Dzērveņu, purva dzērveņu, krūmmelleņu un brūkleņu ekstrakti potencē AchE inhibitorus, taču melleņu ekstrakts potencē tikai neostigmīna efektu un donepezila un ipidakrīna pat samazina. Iespējams, ka ogu ekstraktu *in vivo* kognīcijas uzlabošanu varētu skaidrot ar AchE inhibēšanu.

Atslēgvārdi: mellene, krūmmellene, dzērvene, purva dzērvene, brūklene, spiedpaliekas, acetilholīnesterāze, donepezils, ipidakrīns, neostigmīns.

ABSTRACT

Vaccinium spp. berries and their products are actively studied over the last 10 years. They have been shown to improve cognition *in vivo*. Berry pomace content and effects of the active substances on the organism have been also investigated. We studied the effects of bilberry, blueberry, American cranberry, bog cranberry and lingonberry pomace extracts on AChE activity *in vitro* as well as interaction with AChE inhibitors - ipidacrine, donepezil and neostigmine. AChE activity was measured by spectroscopic Ellman method. The data show that all extracts inhibit AChE in a concentration-dependent manner. Cranberry, bog cranberry, blueberry and lingonberry extracts potentiate AChE inhibitors, but bilberry extract potentiates only the neostigmine effect whereas donepezil and ipidacrine even reduce. The *in vivo* improvement of cognition by berry extracts may be explained by AChE inhibition.

Key words: blueberry, bilberry, cranberry, bog cranberry, lingonberry, press residues, acetylcholinesterase, donepezil, ipidacrine, neostigmine.

SATURS

Ievads.....	7
Darba mērķis un uzdevumi.....	9
1. Literatūras apskats	10
1.1. <i>Vaccinium spp.</i> augi, apraksts, izplatība, pētītās ogu daļas	10
1.2. Bioloģiski aktīvas vielas ogās	11
1.3. Galvenie ogu efekti lietojot tās pārtikā, uztura bagātinātājos un medicīnā	12
1.4. <i>Vaccinium spp.</i> ogu neiroprotektīvo efektu pētījumi un rezultāti	12
2. Acetilholīns un tā loma organismā	15
2.1. Acetilholīnesterāze	16
2.2. Slimības, saistītas ar acetilholīnu un holīnērgisko sistēmu	17
2.2.1. Alcheimera slimība.....	17
2.2.2. Miastēnija	18
2.2.3. Glaukoma	19
2.2.4. Parkinsona slimība un Levi ķermenīšu demences.....	19
2.2.5. Citas slimības.....	20
3. Pētījumi par ogu sastāvā esošām vielu grupām un mijiedarbību ar acetilholīnesterāzi	25
Flavonoīdi.....	26
Flavoni.....	27
Antocianidīni	28
Flavan-3-oli (katehīni).....	29
Flavonoli.....	29
Flavanoni	30
Izoflavoni.....	31
Halkoni	32
4. Materiāli un metodes	33
4.1. Materiāli	33

4.2. Reaģenti	33
4.3. Aparatūra un palīgierīces	33
4.4. Darba gaita.....	34
4.4.1. Ekstraktu šķīdināšana	34
4.4.2. Acetilholīnesterāzes inhibīcijas mērīšanas metode	35
4.4.3 Acetilholīnesterāzes inhibīcijas mērīšana acetilholīnesterāzes inhibitoriem.....	35
4.4.4. Datu analīze	36
5. Rezultāti.....	37
5.1. AChE inhibīcija un darba koncentrācijas izvēle zināmiem AChEi.....	37
5.2. Ogu spiedpalieku ekstraktu AChE inhibīcija	40
5.3. AChEi mijiedarbība ar <i>Vaccinium spp.</i> ogu spiedpalieku ekstraktiem	41
6. Diskusija	44
Ogu ekstraktu kognīcijas uzlabošanas efekti un AChE inhibīcijas potenciāls.....	44
7. Secinājumi	46
Pateicības	47
Literatūras avoti.....	48
Dokumentārā lapa.....	58

APZĪMĒJUMU SARAKSTS, SAĪSINĀJUMI

ACh – acetilholīns

AChE – acetilholīnesterāze

AChEi – acetilholīnesterāzes inhibitors

ChAT – holīna acetiltransferāze

CHT₁ – augstas afinitātes holīna transportproteīns-1

VACHT – vezikulārais acetilholīna transportproteīns

BChE – butirilholīnesterāze

mAChR – muskarīnērgisks receptors

nAChR – nikotīnērgisks receptors

Vaccinium spp. – viršu rindas ēriku dzimtas augi. Šī darba kontekstā - mellene (*Vaccinium myrtillus* L.), augstās krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.), brūklene (*Vaccinium vitis-idaea* L.), purva dzērvene (*Vaccinium oxycoccos microcarpus Turcz. ex Rupr.*), lielā dzērvene (*Vaccinium macrocarpon* Ait.).

cAMF – cikliskais adenoziņa monofosfāts

cGMF – cikliskais guanoziņa monofosfāts

LĶD – Levi (*Lewy*) ķermenīšu demences

TNB – 5-tio-2-nitrobenzoscābes

DTNB – 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoscābe

IEVADS

Ēriku dzimtas *Vaccinium spp.* augi ir daudz pētīti un tiem ir zināmi daži farmakoloģiskie efekti un augstā uzturvērtība – tie satur polifenolus – galvenokārt, flavonoīdus, vitamīnus, organiskās skābes, šķiedrvielas, augu izcelsmes taukus, olbaltumvielas, u.c. (Olas, 2018). Daži pētījumi pierāda, ka šo ogu pozitīvā iedarbība uz veselību ir saistīta ar minētajām vielām, it īpaši ar antociāniem. (Seeram, 2008).

Pēdējā laikā veikti daudzi pētījumi par ogu farmakoloģiskiem efektiem gan *in vivo*, gan *in vitro*, piemēram, noskaidroti to antioksidatīvie un epiģenētiskie efekti (Minju *et al.*, 2017), kas noris bez blakusparādībām. Īpašu uzmanību pētnieki pievērš polifenoliem, tai skaitā antociāniem un šo vielu kombinācijai ogās, izmantojot ekstraktus kā pētījumu objektu.

Šis ģints augu pētījumi ir īpaši interesanti, jo Latvijas dabā tie ir bieži sastopami, un to kultivēšana neprasa īpašus apstākļus. Tāpēc Latvijā attīstās ogu pārstrādes nozare. Visizplatītākās ogas Latvijā, kas pieder pie *Vaccinium spp.* un ir plaši pētītas ir mellene (*Vaccinium myrtillus* L.), augstās krūmmellenes (*Vaccinium corymbosum* L.), brūklene (*Vaccinium vitis-idaea* L.), purva dzērvene (*Vaccinium oxycoccos microcarpus Turcz. ex Rupr*), lielā dzērvene (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) un zilene (*Vaccinium uliginosum* L.) (Latvijasdaba.lv; Yang un Kortēsniemi, 2015). Iespējams, ka aktīvo vielu koncentrācija var atšķirties atkarībā no klimatiskās zonas, un pētījumu rezultāti, kuri veikti citās pasaules valstīs, būtu atšķirīgi.

Lielākoties ir pētītas sulu un ekstraktu īpašības, bet izspiežot sulas paliek pāri blakusprodukts – spiedpaliekas. Ražošanas procesā tās sastāda līdz 30% masas no izejvielas (Struck *et al.*, 2016). Šis blakusprodukts nav pētīts tik plaši, bet var pamatoti apgalvot, ka tajā ir pietiekami daudz uzturvielu un farmakoloģiski aktīvu vielu, un to var pētīt neatkarīgi no citām apstrādātām ogu formām. Ir pierādīts, ka ogu spiedpaliekas satur vairāk polifenolu nekā veselas ogas (Klavins *et al.*, 2018).

Teorētiski ogu spiedpaliekas var salīdzināt ar citrusaugiem, kuriem augļu mizā ir augstāka askorbīnskābes koncentrācija, nekā augļa vidusdaļā un tik pat daudz kā sulas ekstraktā (Chuku LC *et al.*, 2012). Daudz polifenolu ogās atrodas tieši mizā un sēklās, kas ir spiedpalieku pamatmasa, un to uzskata par blakusproduktu (White *et al.*, 2010, 2011). Ogu un augļu spiedpaliekas pašlaik uzskata par perspektīvu aktīvo vielu avotu funkcionālai pārtikai, uztura bagātinātajiem un zālēm. Tikai Latvijā vien pēdējā laikā tika pētīts spiedpalieku sastāvs ogām

un citiem augiem - aronijai (Tomsone, 2017), mārrutkiem (Tomsone, 2018), smiltsērķšķiem (Mieriņa, 2009) un citiem.

Vēl svarīgāks ir tas, ka pētījumos *in vivo* un klīnisko pētījumu gaitā ogu sulām un ekstraktiem nebija konstatēti nevēlamie blakusefekti vai toksiska iedarbība (Skrovankova *et al.*, 2015). Klīniskajos pētījumos ir pierādīta melleņu ekstrakta kognīciju un atmiņu uzlabojošā darbība (Boespflug *et al.*, 2018; Krikorian *et al.*, 2010).

Alcheimera slimība ir viena no biežākajām neurodeģeneratīvajām slimībām un visbiežākā senilās demences forma. Tā attīstās dažādu riska faktoru rezultātā, no kuriem nozīmīgākais ir vecums, taču 3—5 % gadījumu slimībai ir ģenētisks raksturs. Slimībai raksturīga ekstracelulāro amiloīda plātnīšu (jeb senilo plātnīšu) un intracelulāro neurofibrillu veidošanās, taču patoģenēzē nozīmīgi ir daudzi savstarpēji saistīti mehānismi. Izpētīts, ka acetilholīnesterāzes paaugstināta aktivitāte veicina šo plātnīšu agregāciju. To var novērot ar elektronu mikroskopu (Alvarez *et al.*, 1997). Zināms, ka acetilholīnesterāzes inhibitori šobrīd ir veismīgākā Alcheimera slimības terapija. Atgriezeniskie inhibitori donepezils, rivastigmīns, galantamīns un memantīns, kas ir arī NMDA receptoru antagonists, ir vieni no biežāk ieteiktajiem farmakoterapijas līdzekļiem (Čolovič *et al.*, 2013). Šie līdzekļi ir vienādi iedarbīgi, bet donepezilam ir mazāk gastrointestinālo blakusefektu.

Vaccinium spp. ogu un ogu ekstraktu lietošana parāda kognīcijas uzlabojošo efektu un aprakstītais efekts ilgtermiņā ir līdzīgs zāļu vielu terapijai (Boespflug *et al.*, 2018, Krikorian *et al.*, 2010), tomēr īsts darbības mehānisms vēl nav zināms.

Darba hipotēze ir: ogu ekstraktu kognīciju uzlabojošo spēju varētu skaidrot ar acetilholīnesterāzes inhibīciju, kā arī iespējama ogu aktīvo vielu potencējoša mijiedarbība ar klīnikā lietotajiem acetilholīnesterāzes inhibitoriem.

DARBA MĒRĶIS UN UZDEVUMI

Darba mērķis: Pētīt *Vaccinium spp.* ogu spiedpalieku ekstraktu ietekmi uz acetilholīnesterāzes aktivitāti *in vitro* eksperimentos.

Darba uzdevumi:

1. Noskaidrot, vai melleņu, krūmmelleņu, purva dzērveņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu ekstraktiem piemīt acetilholīnesterāzes inhibīcijas spēja un salīdzināt ekstraktu efektus.
2. Salīdzināt ekstraktu acetilholīnesterāzes inhibēšanas spēju ar zināmiem acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibitoriem.
3. Noskaidrot vai ogu spiedpalieku ekstrakti potencē acetilholīnesterāzes inhibitoru efektus *in vitro*.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. *Vaccinium spp.* augi, apraksts, izplatība, pētītās ogu daļas

Ogas sastāv no mizas, mīkstas un sulainas vidusdaļas, intracelulāras sulas un sēklām. Dažādo frakciju daļas attiecības pārsvarā ir atkarīgas no augšanas vietas – piemēram, mellenēm mizas un sēklu masas daļa attiecīgi sastāda apmēram 19% un 1,5% (Lee and Wrolstad, 2006). Šī ir pamata sastāvdaļa spiedpaliekām.

Agrāk spiedpaliekas neuzskatīja par vērtīgām, jo tām ir maza enerģijas uzturvērtība un augsts skābuma līmenis. Tieši tādēļ tās nevar izmantot kā pārtiku, un ir jāpapildina ar citām vielām – skābuma regulētājiem un ogļhidrātiem, vai jāekstrahē pārējās vērtīgās vielas. Apstrādes nepilnība bija viens no faktoriem, kas neļāva izdalīt un pētīt vērtīgās aktīvas vielas. Ražošanas procesā ogas tiek saspiestas, tām pievieno pektināzes un karsē pirms sulas izspiešanas (Mayer-Miebach *et al.*, 2012), un pēc procesa dažas ogu daļas paliek spiedpaliekās, galvenokārt sēklas, miza un stublāji (White *et al.*, 2010, 2011).

Tomēr ogu spiedpaliekās ir daudz bioloģisko vielu - polifenolu, nepiesātināto tauku, ogļhidrātu, vitamīnu. Uzlabotas vai jaunas ogu apstrādes metodes var atvieglot šo vielu izdalīšanu no spiedpaliekām un padarīt blakusproduktu par jaunu dabisku aktīvo vielu avotu hronisko slimību ārstēšanai un profilaksei.

Polifenolu saturs dažādās ogas daļās ir nevienmērīgs – apmēram 10% ir ogas mīkstumā, 30% ogu mizā, un 60% ir sēklās (Heinonen, 2007). Šī īpatnība padara spiedpaliekas par lielisku fenolu avotu, un tām ir potenciāls izmantošanai kā polifenolu bagātu produktu. Pētījumi pierāda, ka antociānīnu koncentrācija melleņu, brūkleņu un dzērveņu spiedpaliekās un veselās ogās ir līdzvērtīgas, bet krūmmelleņu gadījumā spiedpaliekās antociānu koncentrācija ir pat lielāka nekā veselās ogās (Kļaviņš *et al.*, 2018).

Pastāv arī problēma, kura ir saistīta ar spiedpalieku mikrobioloģisko piesārņojumu – spiedpaliekās ir pietiekami daudz uzturvielu un ūdens, lai šī vide būtu labvēlīga mikroorganismu vairošanai. Ir iespējams samazināt kontamināciju ar kaltēšanas metodēm – tas var ļaut uzglabāt izejvielas ilgāk. Šodien ir pieejamas dažādas kaltēšanas metodes – konvektīvā, mikroviļņu – vakuuma, sublimācijas, infrasarkanā, osmotiskā dehidratācija, kaltēšana augstfrekvences strāvas laukā, pulsējošā elektriskā laukā u.c. Tomēr eksperimentos ir pierādīts straujš fenolu samazinājums uzglabāšanas laikā (Tomsone *et al.*, 2013), un ir rekomendēts nodot spiedpaliekas tālākai apstrādei uzreiz pēc sulas izspiešanas. Tieši fenoliem piemīt stiprs antioksidatīvs efekts, un īpaši polifenolus ir svarīgi saglabāt tālākai lietošanai gan medicīnā,

gan funkcionālā pārtikā – to koncentrāciju var uzskatīt par kvalitātes rādītāju. Antociānīni spiedpaliekās ir lielā koncentrācijā, jo tie lielākoties ir saistīti ar ogu šūnu materiālu (mizu), un tā savukārt ir spiedpalieku pamatmasa (Horszwald *et al.*, 2013).

1.2. Bioloģiski aktīvas vielas ogās

Ogas kopumā ir viens no labākiem materiāliem fenolu neiroprotektīvo efektu noteikšanai un pētīšanai, jo *Vaccinium spp.* ogas satur vairākus polifenolus. Ogām piemīt vairāk nekā viens darbības mehānisms, kurš potenciāli var izraisīt neiroprotektīvu efektu – piemēram, jau apskatītie un agrākos pētījumos pierādītie antioksidatīvie un pretiekaisuma efekti, kā arī iespējamie acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibitorie efekti. Šie *in vitro* testi palīdz novērtēt ne tikai atsevišķo polifenolu iedarbību, bet arī iespējamo sinerģisko efektu neiroprotekcijā un uz organismu kopumā. Šīs ģints ogās visplašāk izplatītie un visvieglāk pamanāmie polifenoli ir antociānīni, kuriem ir krāsvielu loma ogās – sarkans, zils un violēts. Tieši antociānīniem ir pētījumos pierādītie pretiekaisuma un antioksidatīvi efekti, kā arī tie stimulē signālimpulsu pārvadi smadzenēs, stimulējot atmiņas funkciju, un uzlabo glikozes metabolismu. Šīs īpašības var nodrošināt neirodeģenerācijas samazināšanu (Ganesan and Hu, 2017; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2013).

Polifenoli ir liela ķīmisko elementu grupa, kura pārsvarā atrodama augos, bet flavanoīdi ir lielākā polifenolu apakšklase, kurā ir izdalīti flavoni, flavonoli, flavononi, flavanonoli, katehīni, antociānīni, izoflavoni un halkoni (Olas, 2018). Pašlaik ir zināmas apmēram 6000 šīs apakšklases vielas, kuras atrodas tieši augu pigmentos.

Flavonoīdi interesē pētniekus visvairāk, jo gandrīz katrai grupai ir antioksidatīvas darbības potenciāls – tie pasargā substrātus no oksidēšanas procesiem - aizsargā vielas vai orgānu šūnas, sagrauj brīvos radikāļus un novērš šūnu bojājumus. (Lobo *et al.*, 2010)

Flavonoīdiem var būt svarīga loma enzimatiskā un sistemātiskā receptoru sistēmā smadzenēs, ietekmējot centrālo nervu sistēmu kopumā un uzrādot preventīvu darbību pret neirodeģenerāciju – Alzheimeru un Parkinsonu slimību. Flavonoīdi spēj inhibēt enzīmus – acetilholīnesterāzi, aldozes reduktāzi, ksantīna oksidāzi, fosfodiesterāzi, kalcija jonu ATF-āzi, lipoksigenāzi, ciklooksigenāzi. Šīs īpašības ir neirodeģeneratīvo slimību attīstības kavēšanās un profilakses pamatā (Panche *et al.*, 2016).

Salīdzinot antociānīnu saturu dažādās ogās atklāja, ka mellenēs ir ievērojami vairāk antociānu nekā jebkurās citās pētītās *Vaccinium spp.* ogās. Krūmmellenēs, savukārt, ir vairāk

antociānu nekā sarkanas krāsas ogās – brūklenēs, dzērvenēs, bet mazāk nekā mellenēs. Tas ir tādēļ, ka krūmmellenēm ir tumši zila miza un zaļgani dzeltena vidusdaļa. Mellenēs, savukārt, antociāni ir izplatīti visā ogā.

Dažās ogās – krūmmellenēs, dzērvenēs, brūklenēs – ir konstatēts lielāks antociānu daudzums spiedpaliekās nekā veselās ogās. (Muceniece *et al.* 2019). Teorētiski spiedpaliekas ir ogu substrāts, kas ir atbrīvots no cukuriem un ūdens. Tādēļ tas satur vairāk antociānu (svars/svars, %) nekā veselās ogas.

1.3. Galvenie ogu efekti lietojot tās pārtikā, uztura bagātinātājos un medicīnā

Ogu ekstrakti ir visplašāk izplatītie produkti, kurus pagatavo galvenokārt kā bioloģiski aktīvo fenolskābju un polifenolu avotus. Ogām un ogu sulām nav konstatētas blakusparādības, lietojot kā funkcionālu pārtiku, tas ļauj uzskatīt tās par perspektīvu produktu arī medicīnā. Blakusefektu neesamība sniedz lielāku darbības laukumu jauno zāļu aktīvo komponentu iegūšanā vai sintezē, jo jauno zāļu apstiprinājumu izsniedz tieši pēc riska un labuma (*risk/benefit*) novērtējuma.

Fenolu grupas vielu koncentrācija un izplatība augos pētniekus interesē jau kādu laiku, jo pētījumi liecina par šo vielu pozitīvo ietekmi uz veselību kā vēža kavējošo, kardiovaskulāro slimību mazinošo, pretdiabēta *diabetes mellitus* (Martineau *et al.*, 2006) un imunitāti uzlabojošo efektu (Balunkeswar *et al.*, 2011; Dhillon *et al.*, 2013; Ganesan un Xu, 2017; Rodriguez-Mateos *et al.*, 2013).

Neiroprotektīvie efekti ir gaidīti arī no spiedpaliekām, bet pētījumu rezultāti ir daļēji pretrunīgi vai nepietiekami ticami (Halliwell, 2006; Krikorian *et al.*, 2010; Olas, 2018).

1.4. *Vaccinium spp.* ogu neiroprotektīvo efektu pētījumi un rezultāti

Brūklenēs ir augsts polifenolu līmenis, un tās ir uzskatītas par antioksidantiem bagātām ogām (Droždž *et al.*, 2017). Iespējams tādēļ brūkleņu ekstraktiem atrada ievērojamu smadzeņu traumatisko bojājumu aizsargefektu pētījumā ar žurkām (Hossain *et al.*, 2016). Ogas kopumā ir viens no labākajiem polifenolu iespējamo neiroprotektīvo efektu pētījuma objektiem, jo tās satur daudzveidīgus fenolus, kuriem iedarbojoties kopā ir iespējams sinerģisks efekts. Kā arī ogu aktīviem komponentiem ir dažādi darbības mehānismi – antioksidatīvie, pretiekaisuma un acetilholīnesterāzes inhibīcija (Kelly *et al.*, 2017).

Agrāko pētījumu publikācijās ir informācija, ka ogu un lapu ekstraktiem piemīt superoksīda dismutāzei līdzīga iedarbība un tie samazina superoksīdu anjona līmeņus dzīvās šūnās un *in vitro* (Basu un Maier, 2016; Ferlemi un Lamari, 2016). Tieši superoksīda līmeņa nomākšana ir pamats antioksidatīvam efektam, kuram savukārt ir teorētiska neiroprotektīva iedarbība.

2016. gada dažādu augu metabolītu pētījumu apskats parāda, ka flavonoīdiem var būt vadošā loma enzimatiskā un receptoru sistēmā galvas smadzenēs, kas uzrāda nozīmīgu efektu uz centrālo nervu sistēmu – kavējot neurodeģenerāciju, kas ir saistīta ar Alcheimera vai Parkinsona slimībām (Panche *et al.*, 2016). Citā pētījumā ir secināts, ka fenoli var brīžiem darboties kā prooksidanti, vienlaicīgi demonstrējot anti- un prooksidatīvu darbību (Olas, 2018).

Pētījumā ar mērķi izpētīt, vai dzērveņu ekstraktu var uzskatīt par efektīvu vielu Alcheimera slimības attīstības kontrolei, eksperimentu veica ar tārpiem *C. elegans*. Eksperimenta gaitā vajadzēja parādīties efektam – terapeitiskam vai preventīvam. Amiloīda- β (toksiskā slimības mediatora) līmeņa rādītājs un atmiņa ir divi galvenie parametri, pēc kuriem noteica ekstrakta efektivitāti šajā modelī. Dzērveņu ekstrakts ir bagāts ar polifenoliem un ir spējīgs kavēt paralīzi, mazinot beta-amiloīdu toksicitāti tārpa modelī. Uz šo faktu var balstīties pētot neiroprotektīvus efektus zīdītājiem (Guo *et al.*, 2016).

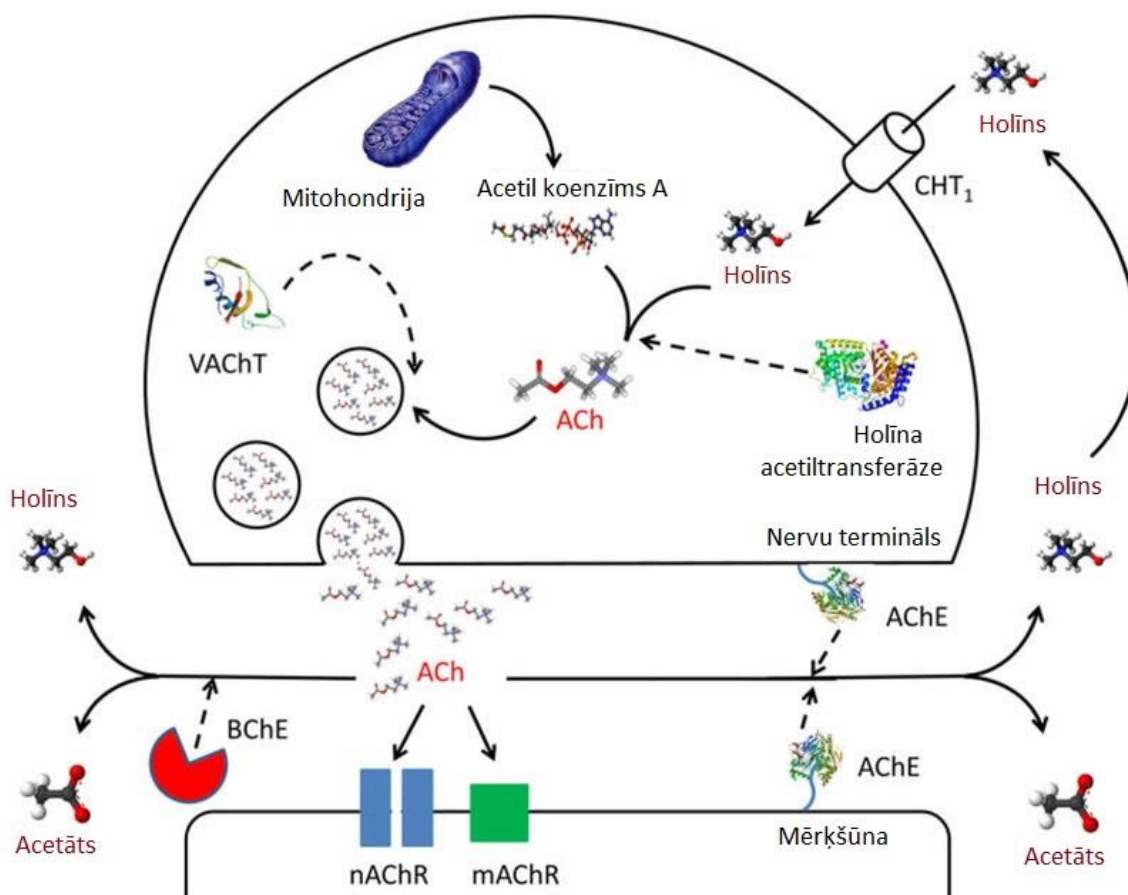
Šaurlapu mellenēm pētījumos ir noteikta antioksidatīva darbība. Oksidatīvais stress ir viens no faktoriem išēmiska insulta etioloģijā. Ogu ekstraktu spēju pasargāt neironus no insulta izraisītiem bojājumiem pārbaudīja eksperimentos, izmantojot žurkas. Eksperimentālo grupu žurku barībai piemaisīja 14,3% melleņu substrāta, bet kontroles grupai – 0%. Insultam līdzīgo hipoksisko efektu izsauca saspiežot labās puses miega artēriju. Pēc nedēļas paņēma plazmas un urīna paraugus, bet hipokampa neironu bojājumu analizēja histoloģiski. Rezultātā kontroles grupai konstatēja 40 \pm 2% neironu skaitu samazināšanos, salīdzinot hipokampa daļas labajā un kreisajā puslodē, bet eksperimentālai grupai šis skaitlis bija 17 \pm 2% (Sweeney *et al.*, 2002). Eksperiments pierādīja, ka melleņu lietošanai iespējams neiroprotektīvs efekts *in vivo* dzīvniekiem, tomēr pētījuma modelis ir relatīvi primitīvs.

Eksperimentā 19 mēnešu vecām žurkām, pievienojot barībai krūmmelenes 8-10 nedēļu laikā, analizēja žurku smadzenes un atklāja antocianīnu (*cyanidin-3- O - β -galactoside*, *cyanidin-3- O - β -glucoside*, *cyanidin-3- O - β -arabinose*, *malvidin-3- O - β -galactoside*, *malvidin-3- O - β -glucoside*, *malvidin-3- O - β -arabinose*, *peonidin-3- O - β -arabinose* and *delphinidin-3- O - β -galactoside*) klātbūtni. Tas liecina par šo polifenolu spēju šķērsot asins-

smadzeņu barjeru. Šī īpašība pierāda ogu potenciālu Alcheimera un citu neurodeģeneratīvo slimību ārstēšanā. *Morris water maze* ūdens labirinta tests parāda arī atmiņas un kognīcijas uzlabošanas spēju salīdzinot ar kontroles grupu (Andres-Lacueva *et al.*, 2005).

2. ACETILHOLĪNS UN TĀ LOMA ORGANISMĀ

Acetilholīns ir viela, ko nervu sistēma izmanto signālu pārraidei un dažādu organisma mehānismu aktivizēšanai. Acetilholīna molekulas saistās ar jonu kanālu receptoriem uz muskuļu šūnu membrānas, kas atver jonu kanālus. Kad joni (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) nonāk mērķšūnā, orgānā rodas sistēmisks efekts (Rockland *et al.*, 2000). Ķīmiski acetilholīns ir acetilēts holīns, kurš tiek sintezēts enzimatiski ar acetiltransferāzi holīnerģiskajos neironos, izmantojot kā izejvielas holīnu un acetil koenzīmu A (attēls 1).



Attēls 1. Acetilholīna sintēze, atbrīvošana, iedarbība uz holīnerģiskiem receptoriem, sadalīšanās. Adaptēts no Kummer *et al.*, 2006 (Avots: https://www.researchgate.net/figure/Diagram-demonstrating-the-mechanism-of-acetylcholine-synthesis-release-action-and_fig1_229012492L)

Piemēram, skeleta šķērsvītrotai muskulatūrai tas izsauc kontrakcijas, un kā rezultātu – kontrolējamās ķermeņa kustības (Kuo un Ehrlich, 2015).

Acetilholīns ir balts kristālisks savienojums, kas ir ļoti nestabils – sadalās gaisā, ilgstošas glabāšanas laikā, kā arī paaugstinātas temperatūras ietekmē (Rockland *et al.*, 2000). Farmakoloģiski viela iedarbojas kā holinomimētiķis – veic nervu impulsu pārraidi centrālajā nervu sistēmā, ganglijos, parasimpātiskajos un motorneironos, aktivizē sviedru dziedzerus.

Mijiedarbojoties ar N- un M- holīnoreceptoriem, izsauc membrānas depolarizāciju un atver membrānas caurlaidību nātrija joniem. Holīnoreceptoru stimulācija ģenerē darbības potenciālu nākamajā šūnu ķēdē, vai aktivizē funkcionālo aktivitāti orgāna šūnā, kas izpilda tai skaitā kognitīvas un metabolas funkcijas cilvēka nervu sistēmā. Holīnoreceptori (muskarīna - mAChR un nikotīna - nAChR) atrodas šūnu membrānā. Uzņemot perorāli acetilholīnam nav farmakoloģiska efekta, jo tas viegli hidrolizējas gastrointestinālā traktā (Baig *et al.*, 2017) Ievadot parenterāli iedarbojas ātri, bet īslaicīgi. Pašu acetilholīnu mūsdienās jau nelieto kā zāļu vielu, jo eksistē vairākas holīnerģiskās zāles ar garāku iedarbību un ērtāku uzņemšanas veidu. (Vardanyan un Hurby, 2006). Acetilholīna hlorīdu joprojām izmanto oftalmoloģijā acs operāciju gadījumā (drugbank.ca/drugs/DB03128).

Vielai ir stipri polāra amonija grupa, un tādēļ tas netiek caur membrānu lipīdiem. Tas nozīmē, ka uzņemtā viela paliek ekstracelulārā telpā un neiet cauri hematoencefāliskai barjerai (Brenner un Stevens, 2006).

Sistēmiski iedarbojoties uz M-holīnoreceptoriem paaugstinās cAMF un cGMF līmeņi, un parādās M-holīnomimētiskie efekti – bradikardija, asinsvadu paplašināšana, arteriālā spiediena samazināšanās, tonusa paaugstināšanās, gludās muskulatūras kontrakcijas – bronhos, kuņģa zarnu traktā, dzemdē, urīnpūslī un žultspūslī. Pastiprina sekrēciju dziedzeriem – bronhiāliem, gremošanas sistēmas, sviedru, asaru, sašaurina acu zīlītes, samazina intraokulāro spiedienu. (Rockland *et al.*, 2000).

2.1. Acetilholīnesterāze

AChE ir primārais B-tipa karboksilesterāzes enzīms, kas galvenokārt atrodas sinaptiskajā spraugā centrālajā un perifērajā nervu sistēmā. Cilvēkam alternatīva splaisinga dēļ veidojas 4 acetilholīnesterāzes izoformas – T, H, R, un 4. Acetilholīnesterāze katalizē hidrolīzi un metabolizē neiromediatoru acetilholīnu sadalot uz holīnu un acetātu (Robertson *et al.*, 2011). ACh molekulas, kuras nesaistījās ar receptoru, tiek hidrolizētas enzimatiski 1 ms laikā. Apmēram puse no izdalīta acetilholīna daudzuma tiek sadalīta ar AChE pirms tas sasniedz receptorus. Pārējais ACh tiek sadalīts signālprocesa galā. Šī enzimatiskā reakcija ir nepieciešama acetilholīna inaktivācijai sinaptiskajā spraugā. Tādā veidā mērķšūna nonāk miera stāvoklī, kas ir nepieciešams, piemēram, muskuļa atslābināšanai. Holīns tiek uzņemts šūnā ar transportproteīna palīdzību un atkārtoti izmantots ACh sintēzei (Edward *et al.*, 2013).

AChE pārmērīga aktivitāte krietni samazina ACh koncentrāciju galvas smadzenēs, kas novājina neurotransmisiju un izraisa atmiņas zudumu un citus blakusefektus, kas ir Alcheimera slimības simptomi (Taylor *et al.*, 2009).

Acetilholīnesterāze arī veicina β -amiloīdu uzkrāšanos un amiloīdu proteīnu veidošanos, kuri savukārt ir marķieri Alzheimerera slimībai (Inestrosa *et al.*, 1996). Acetilholīnesterāzei ir piemīt arī citas funkcijas, kuras nav tikai katalītiskas – piemēram, loma neironu apoptozes procesā (Taylor *et al.*, 2009).

2.2. Slimības, saistītas ar acetilholīnu un holīnērgisko sistēmu

2.2.1. Alzheimerera slimība

Alzheimerera slimība ir viena no visbiežāk sastopamām neurodeģeneratīvām slimībām, kura ir sastopama cilvēkiem sākot ar 65 gadu vecumu. 50-60% saslimšanas gadījumos tā ir konstatēta šajā vecuma grupā. Saslimšanas risks ir atkarīgs no ģenētiskiem faktoriem un riska faktoriem – galvas traumas un hipertensijas (Burns un Iliffe, 2009). Pētījumi un eksperimenti pierāda, ka slimības simptomi ir saistīti ar holīnērgiskas sistēmas darbības traucējumiem – samazinātu acetilholīna koncentrāciju sinaptiskās spraugās, samazinātu šūnu receptoru jutību pret acetilholīnu, un palielinātu acetilholīna degradāciju ar enzīmu acetilholīnesterāzi. Pēdējās dekādes pētījumi liecina, ka nav efektīvas ārstēšanas metodes, bet simptomu uzlabošanai izmanto zāles, kuru darbības veids pārsvarā ir enzīma acetilholīnesterāzes inhibīcija (Francis *et.al.*, 1999).

Neokortekss un hipokamps ir visvairāk mentālos procesos iesaistītie smadzeņu reģioni, un tie ir visvairāk pakļauti Alzheimerera slimības patoloģijām. Slimība parasti ilgst ap 9 gadiem, kas sākas ar pirmajiem pre-deģeneratīvajiem simptomiem un beidzas ar nāvi. To var noteikt ar raksturīgām audu patoloģijām – beta-amiloīda proteīna plātnīšu veidošanos un intracelulāriem neurofibrilāriem bojājumiem – *tau* proteīna iniciēto mezglu veidošanos. Simptomus var novērot arī pēc kognitīvo, domāšanas un atmiņas funkciju traucējumiem, kuri ir saistīti vairāk ar neurofibrilāriem traucējumiem. Šie simptomi iekļauj arī agresiju, depresiju un murgus – tos ir grūti kontrolēt mājas apstākļos un pacientam ir nepieciešama hospitalizācija (Francis *et.al.*, 1993).

Pētījumi pierāda, ka AChE inhibīcija uzlabo gan kognitīvos simptomus, gan atmiņu Alzheimerera slimības pacientiem, tādēļ terapija parasti fokusējas uz holīnērgiskas neurotransmisijas uzlabošanu ar plaši lietotiem AChE inhibīcijas līdzekļiem – donepezilu, rivastigminu un galantamīnu. Terapija parāda uzlabošanos lielākai pacientu daļai, tomēr zālēm ir izteikti blakusefekti, kuri izpaužas ilgtermiņa lietošanā (Balkis *et.al.*, 2015; Nelson *et.al.*, 2012).

Apkopo sekojošus faktus par slimību:

- Cilvēkiem ar kognitīviem traucējumiem ir 15 reizes lielāks risks Alcheimera slimības attīstībai;
- Atmiņas zudums ir raksturīgs simptoms cilvēkiem, kuriem attīstās slimība;
- Īsts slimības cēlonis nav skaidrs, bet uzskata ka ģenētiskie un ārējie faktori ir vadošie;
- Holinesterāzes inhibitori ir droši un efektīvi līdzekļi slimības simptomātiskai ārstēšanai;
- Antipsihotiskie līdzekļi samazina uzbudināmības simptomus, bet lietošana ir saistīta ar palielinātu mirstības risku (Burns un Iliffe, 2009).

2.2.2. Miastēnija

Patoloģisks muskuļu vājums jeb *Myasthenia gravis* ir autoimūna slimība, kad antivielas bloķē vai sagrauj nikotīna atkarīgus acetilholīna receptorus. Šis stāvoklis traucē nervu impulsa pārraidei un neizraisa muskuļu saraušanos. Tas noved pie dažādas pakāpes skeleta muskulatūras vājuma, no kuriem raksturīgs ir acs plakstiņa noslīdējums. Arī bieži izraisa dubultotu redzi, apgrūtinātu norīšanu, runāšanu un staigāšanu. Atšķirībā no Alcheimera slimības simptomi var parādīties pēkšņi, bet var tikt diagnosticēti pirmajos dzīves mēnešos ar antivielu analīzi (Sanders *et al.*, 2016). Slimība skar sievietes no 40 un vīriešus no 60 gadu vecuma. Šobrīd slimība nav uzskatīta par ļoti izplatītu (ap 200 slimības gadījumu uz 1000000 cilvēku), bet to diagnosticē arvien biežāk (Jaunalksne *et al.*, 2015). Apmēram 10–15% miastēnijas pacientu konstatē tīmusa patoloģiju - lēni augošu audzēju timomu (Pelčere *et al.*, 2015; Burns *et al.*, 2010).

Slimības ārstēšanai kā pirmās izvēles medikamentus lieto acetilholīnesterāzes inhibitorus – neostigmīnu un piridostigmīnu. AChE inhibitorus lieto ka simptomātiskas zāles – tās ļauj pildīt ikdienas uzdevumus (Mehndiratta *et al.*, 2011). Imunosupresanti arī tiek izrakstīti kā zāles – prednizolons un azatioprīns. Saskaņā ar ASV slimības klasifikāciju izšķir no 1. līdz 5. smaguma pakāpes – no viegla acs plakstiņa vājuma līdz mākslīgas elpināšanas nepieciešamībai (Silvestri un Wolfe, 2018).

2.2.3. Glaukoma

Glaukoma ir acu slimība, kurai ir daži paveidi:

1. Primāra atvērta leņķa glaukoma - kapsulāra glaukoma ar lēcas pseidoeksfoliāciju; hroniska vienkārša glaukoma; zema spiediena glaukoma; pigmentglaukoma. Attīstās lēnām, bez sāpēm.
2. Primāra slēgta leņķa glaukoma - akūta slēgta leņķa glaukoma; hroniska slēgta leņķa glaukoma; intermitējoša slēgta leņķa glaukoma. Slimības simptomi var parādīties uzreiz, ar sāpēm, vai pakāpeniski.
3. Sekundārā glaukoma, kura parasti ir izraisīta acs traumas, iekaisuma, medikamentu, vai cita ārēja faktora ietekmes dēļ (spkc.gov.lv/ssk10/indexc316.html?p=%23144).

Tās rezultātā pasliktinās vai pilnīgi pazūd redze. Kā slimības cēloni un riska faktoru uzskata acs hipertensiju, kura izraisa optisko nervu bojājumu (Gupta un Chen, 2016). Visbiežāk glaukomas ārstēšanai vietēji lieto neatgriezeniskas AChE inhibitorus, piemēram, Diizopropila Fluorofosfātu. To lietošana nav droša (Čolović *et al.*, 2013). Primāro atvērta leņķa glaukomu ir iespējams kontrolēt ar acetilholīnesterāzes inhibitoriem - pētījumā (Almasieh *et al.*, 2013) ir pierādīts, ka galantamīns pasargā tīklenes asinsvadus un uzlabo asins apgādi un mazina glaukomas simptomus, tomēr mehānisms nebija skaidrs. Domā, ka AChE inhibitori ietekmē tīklenes ganglijas šūnas.

2.2.4. Parkinsona slimība un Levi ķermenīšu demences

Patofizioloģija un klīniskās pazīmes Levi ķermenīšu demencei (LĶD) un Parkinsona slimībai ir līdzīgas, tāpēc šīs slimības bieži apskata kopā. Abas pacientu grupas cieš no smaga ACh neiromediatora trūkuma kortikālā daļā, un patoloģiskā α -sinukleīna deponēšanas galvas smadzenēs. Parkinsona un Levi ķermenīšu demences ir vecuma atkarīgas slimības, un to aizsākums pirms 65 gadu vecumam nav tipisks. Abām slimībām vairāk pakļauti vīrieši nekā sievietes (Walker *et al.*, 2015).

Tomēr slimībām ir atšķirīgi simptomi un slimību etioloģija. Parkinsona slimība var noritēt bez demencēm, īpaši sākuma stadijā. Levi ķermenīšu demences var notikt gan bez parkinsonisma pazīmēm, gan kopā ar Parkinsona slimību. LĶD galvenā pazīme ir miega traucējumi, kuru laikā nenotiek muskuļu atslābums un notiek spontanās muskuļu kustības. Pirmās tipiskās pazīmes – ātras acs kustības miega laikā var parādīties dažus gadus pirms citiem simptomiem. Atšķirībā no LĶD, Parkinsona slimība sākuma stadijās neizraisa smagas

demences, kas traucē autonomai dzīvībai. Parkinsona slimība pirmkārt skar muskuļu sistēmu – parādās kustības un runas traucējumi (Walker *et al.*, 2015; Gomperts, 2016).

Samazinot ACh sabrukumu abām pacientu grupām var izraisīt klīnisko un simptomātisko uzlabošanu.

2.2.5. Citas slimības

Acetilholīnesterāzes inhibitorus lieto arī šādos gadījumos – ārstēšanā vai kā papildus terapiju:

- paralīzes, kas saistīta ar muguras smadzeņu bojājumiem
- Perifērās nervu sistēmas slimības (neirīts, polineirīts, polineuropātija, poliradikuloneuropātija)
- Atveseļošanās periods pēc organiskiem CNS bojājumiem ar kustību traucējumiem;
- Demielinizējošu slimību kompleksa ārstēšana
- Zarnu atonija.

(Neostigmīna zāļu apraksts)

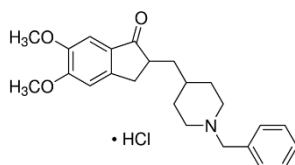
2.3. Zāļu vielas - Acetilholīnesterāzes inhibitori

Acetilholīnesterāzes inhibitori darbojas novēršot acetilholīna noārdīšanu sinaptiskajā spraugā. Rezultātā paliek vairāk acetilholīna funkcionālai reakcijai – neurotransmisijai. Placebo kontrolētā pētījumā bija pierādīts, ka ar šīs grupas zālēm ir iespējams sasniegt simptomātisko kognitīvo funkciju uzlabošanu un to uzturēšanu līmenī 2 gadu periodā. Eksistē pacientu grupas, kuras ir vairāk vai mazāk jutīgas pret šīm zālēm, bet precīza jutīguma atkarība nav noteikta (Stevens un Rodin, 2011).

No otras puses, neatgriezeniskie AChE inhibitori izraisa neiromediatora pārmērīgu uzkrāšanos un atbilstoši pārmērīgu holīnerģisko stimulāciju, kas noved pie krampjiem, elpošanas apstāšanās un nāves (Reddy, 2015).

Terapijā izmanto atgriezeniskos AChEi.

Donepezila hidrohlorīds - *Yasnal* 5 mg/10 mg mutē disperģejamās tabletes donepezila hidrohlorīda formā. Paredzēts vieglas un vidēji smagas Alcheimera demences simptomātiskai ārstēšanai. Terapiju sāk ar 5 mg/dienā (dozēšana vienu reizi dienā). Maksimālā ieteicamā dienas deva ir 10 mg.



Attēls 2. **Donepezila hidrohlorīda struktūrformula.**

Avots: sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d682

Darbības mehānisms: Donepezila hidrohlorīds ir specifisks acetilholīnesterāzes inhibitors ar atgriezenisku iedarbību. Acetilholīnestrāze ir dominējošā holīnesterāze galvas smadzenēs. Donepezila hidrohlorīds *in vitro* šo enzīmu inhibē vismaz 1000 reižu spēcīgāk nekā butirilholīnesterāzi, kas atrodama galvenokārt ārpus centrālās nervu sistēmas. Klīniskajos pētījumos ar Alcheimera demences pacientiem 5 mg vai 10 mg donepezila lietošana reizi dienā izraisīja stabilu acetilholīnesterāzes aktivitātes (mērīta eritrocītu membrānā) nomākumu attiecīgi par 63,6 % vai 77,3 %.

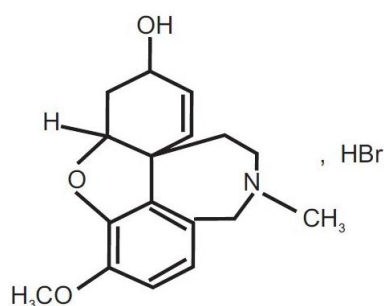
Mijiedarbība: Pētījumos *in vitro* noskaidrots, ka donepezila metabolismā piedalās citohroma P450 izoenzīmi 3A4 un nedaudz arī 2D6. Zāļu mijiedarbības pētījumos *in vitro* konstatēts, ka donepezila metabolismu kavē ketokonazols un hinidīns, kuri attiecīgi ir CYP3A4 un 2D6 inhibitori. Tādēļ donepezila metabolismu var kavēt arī citi CYP3A4 inhibitori, tādi kā itrakonazols un eritromicīns, un arī CYP2D6 inhibitori, piemēram, fluoksetīns. Pētījumos ar veselīgiem brīvprātīgajiem novērots, ka ketokonazols paaugstina donepezila koncentrāciju vidēji par aptuveni 30%.

Tādi enzīmu inducētāji kā rifampicīns, fenitoīns, karbamazepīns un alkohols var samazināt donepezila koncentrāciju. Tā kā inhibējošā vai inducējošā efekta intensitāte nav zināma, šādas kombinācijas jālieto piesardzīgi (*Yasnal* – zāļu apraksts, 2018; drugbank.ca/drugs/DB00843).

Galantamīna hidrobromīds - *Nivalin* 5mg/10mg tabletes galantamīna hidrobromīda veidā. Tā bija pirmā no augiem izolētā aktīvā viela, kurai piemīt spēcīgs acetilholīnesterāzes inhibīcijas efekts. Paredzēts vieglas līdz vidēji izteiktas Alcheimera tipa demences ārstēšanai, perifērās nervu sistēmas slimības gadījumā, paralīzes, kas saistīta ar muguras smadzeņu

bojājumiem, neiromuskulāro sinapšu slimību (*myasthenia gravis*, muskuļu distrofija) ārstēšanai (Roseiro *et al.*, 2012).

Darbības mehānisms: Galantamīns ir terciārs alkaloīds, kas pieder parasimpatomimētisko līdzekļu grupai, ar netiešu iedarbību. Papildus atgriezeniskam acetilholīnesterāzes nomākumam, galantamīns, iedarbojoties kā allostērisks ligands, stimulē visbiežāk sastopamos centrālās nervu sistēmas alfa4/bēta2 apakštipa nikotīna acetilholīna receptorus. Galantamīns palielina postsinaptisko membrānu jutību pret acetilholīnu. Galantamīns šķērso hematoencefālisko barjeru, sekmē CNS impulsu vadāmību un pastiprina uzbudinājuma procesus. Tas pastiprina holīnērgiskās sistēmas aktivitāti, ko var saistīt ar uzlabotu kognitīvo funkciju.

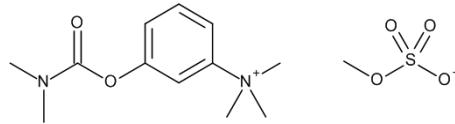


Attēls 3. **Galantamīna HBr struktūrformula.** Avots: [researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-galantamine-hydrobromide_fig1_259155950](https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-galantamine-hydrobromide_fig1_259155950)

Salīdzinot ar neostigmīnu, galantamīnam piemīt daudz vājāka iedarbība uz muskarīna receptoriem. Tas sekmē uzbudinājuma vadīšanu neiromuskulārajās sinapsēs un atjauno neiromuskulāro vadāmību, kad to bloķē nedepolarizējošie neiromuskulārie blokatori.

Mijiedarbība: Līdz pat 75 % galantamīna devas tiek metabolizēta aknās ar citohroma P450 (CYP3A4 un CYP2D6) starpniecību. *In vitro* pētījumi liecina, ka CYP2D6 ir iesaistīts O-desmetilgalantamīna un CYP3A4 – N-galantamīna oksīda veidošanā. Tas liecina par atkarību no citohromu P450 ietekmējošām zālēm attiecīgi ietekmējot uz zāļu metabolismu. Spēcīga CYP2D6 inhibitora lietošanas laikā galantamīna biopieejamība palielinās par aptuveni 40 %, bet vienlaicīgas lietošanas ar CYP3A4 inhibitoriem tā palielinās līdz 30% (Briz AS – Nivalin tab. zāļu apraksts, 2018; [drugbank.ca/drugs/DB00674](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Galantamine)).

Neostigmīna metilsulfāts - *Neostigmine-Kalceks* 0,5 mg/ml šķīdums injekcijām, neostigmīna metilsulfāta formā. Neostigmīns stimulē muskuļu darbību, kavējot acetilholīnesterāzes darbību. Lieto *myasthenia gravis* ārstēšanai, muskuļus atslābinošu zāļu efektu atcelšanai, zarnu trakta darbības uzlabošanai zarnu muskulatūras atslābuma gadījumā, urīnpūšļa funkciju atjaunošanai pēc ķirurģiskas iejaukšanās.

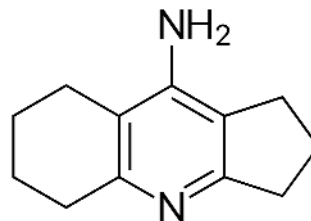


Attēls 4. **Neostigmīna metilsulfāta struktūrformula.** Avots: lgcstandards.com/ES/en/Neostigmine-methyl-sulfate/p/CDX-00014285-050

Darbības mehānisms: Neostigmīns ir sintētisks īslaicīgās darbības acetilholīnesterāzes inhibitors, fizostigmīna atvasinājums. Efekts ilgst aptuveni 4 stundas. Neostigmīns, atgriezeniski bloķējot acetilholīnesterāzi holīnērgiskajās sinapsēs, kavē acetilholīna sadalīšanos un līdz ar to pastiprina un pagarina tā darbību. Centrālie efekti ir maz izteikti, jo gandrīz nešķērso hematoencefālo barjeru. Neostigmīns darbojas arī tieši uz skeleta muskuļu šķiedru nikotīnjutīgajiem holīnoreceptoriem. Lieto anestēzijā nedepolarizējošo miorelaksantu izraisītas neiromuskulārās blokādes atcelšanai.

Mijiedarbība: Kolistīns un halogenētie inhalējamie anestēzijas līdzekļi (ciklopropāns, halotāns), var antagonizēt zāļu efektu. Propranolols mazina neostigmīna darbību. Antibakteriālie līdzekļi ar neiromuskulāro blokādi izraisošu darbību, piemēram, aminoglikozīdi, polimiksīni un klindamicīns antagonizē neostigmīna metilsulfāta darbību (KALCEKS AS - Neostigmine zāļu apraksts, 2016; www.drugbank.ca/drugs/DB01400).

Ipidakrīns – *Ipigrix/Neiromidin* – 5-20 mg tabletes un šķīdums injekcijām. Ipidakrīns ir atgriezenisks holīnesterāzes inhibitors. Tas tieši stimulē impulsu pārvadi CNS un neiromuskulārajās sinapsēs, bloķējot membrānas kālija kanālus.



Attēls 5. **Ipidakrīna struktūrformula.** Avots: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ipidacrine

Ipidakrīns pastiprina ne tikai mediatora acetilholīna, bet arī adrenalīna, serotonīna, histamīna un oksitocīna ietekmi uz gludo muskulatūru, kas ir saistīts ar kālija kanālu blokādi membrānās (Damulin *et. al.*, 2011).

Visu šo zāļu iedarbību pastiprina vienlaicīgi lietotas zāles ar tādu pašu darbības principu (holīnesterāzes inhibitori), vai tādas, kas aktivē parasimpātisko nervu sistēmu. Uzsūkšanās no kuņģa-zarnu trakta tiek traucēta, ja vienlaicīgi lieto metilcelulozi vai medicīniskās aktivētās ogles tabletes.

3. PĒTĪJUMI PAR OGU SASTĀVĀ ESOŠĀM VIELU GRUPĀM UN MIJIEDARBĪBU AR ACETILHOLĪNESTERĀZI

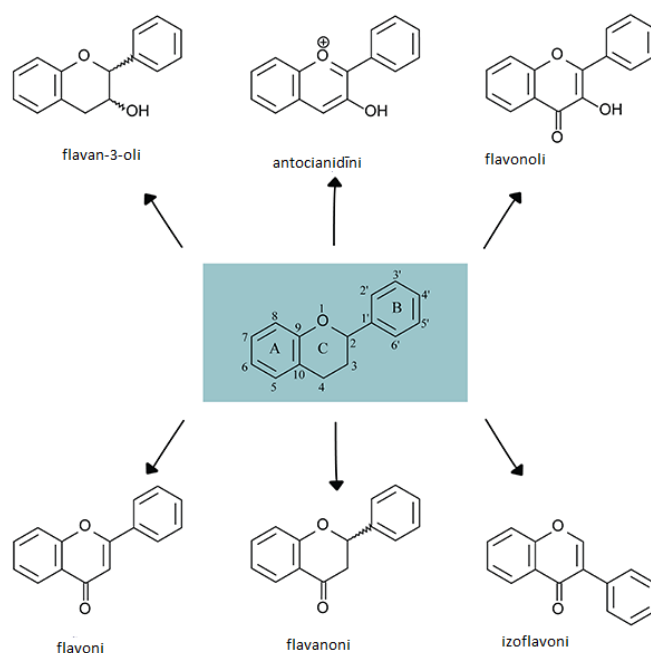
Uzturs ir svarīgs ne tikai organismu izdzīvošanai, tas arī ietekmē ķīmisko vielu daudzumu, ko cilvēks uzņem. Tajā skaitā ir dabīgas vielas, kuras var gan aktivēt, gan inhibēt acetilholīnesterāzes darbību (Botchway *et al.*, 2018). Kā bija minēts, *Vaccinium spp.* ogas satur vairākus polifenolus, kurus var sadalīt atsevišķās grupās. Šīs vielas ir ogu sastāvā un tiek pētītas, un daļai no tām ir pierādīta antioksidatīva darbība (Minju *et al.*, 2017; Skrovankova *et al.*, 2015). Ogām un ogu ekstraktiem piemīt arī neiroprotektīva darbība, kas bija pierādīta pētījumos *in vivo*. Turklāt *Vaccinium spp.* ogu ekstraktiem arī ir pierādīts kognīcijas uzlabojošs efekts *in Vivo* (Boespflug *et al.*, 2018). Bija veikti arī *in Vitro* pētījumi, kuros apskatīja atsevišķo vielu grupu lomu acetilholīnesterāzes inhibīcijā (Panche *et al.*, 2016). Šie pētījumi var palīdzēt noskaidrot, kurai vielu grupai ir jāpievērš vairāk uzmanības *in vitro* un *in vivo* pētījumos AChE inhibīcijas efekta novērtēšanai turpmāk.

Pašlaik *Vaccinium spp.* ogu ķīmiskais sastāvs ir zināms – izmantojot HPLC metodi tika noskaidrots gan kvantitatīvais, gan kvalitatīvais sastāvs – antociānīni, katehīni, flavonoli, hidroksikanēļskābe un citi polifenoli. Salīdzinot vienas sugas augus arī secināts, ka tiešas saules staros augošiem bija augstāka vielu koncentrācija. Kvantitatīvi vērtīgāks sastāvs noteikts vēsākā klimatā audzētām ogām (Jaakola *et al.*, 2004).

Delfinidīna-3-O-glikozīds atrasts lielākā koncentrācijā no visiem antociānīniem melleņu ekstraktā (14%), peonidīna-3-O-arabinoze ir dominējošs antociānīns krūmmellenēs (31%). Antociānu sastāvs dzērvenēs un lielogu dzērvenēs ir līdzīgs, bet atšķiras koncentrācijas. Salīdzinot antociānu daudzumu mellenēm un dzērvenēm, secināja, ka vidēji tikai 10mg antociānu ir atrodams 1g ekstrakta. Dzērveņu sastāvā galvenokārt ir peonidīna un cianidīna glikozīdi (Khoo *et al.*, 2017).

Brūklenēm lielākā daļā (70%) no antociānīniem ir peonidīna-3-O-galaktozīds. Kopējā antociānu koncentrācija *Vaccinium* ogu spiedpaliekās ir ļoti atšķirīga - 284.95 ± 25.18 mg/g mellenēs, 43.53 ± 0.70 mg/g dzērvenēs, 7.08 ± 0.97 mg/g lielogu dzērvenēs un 27.58 ± 2.63 mg/g brūklenēs (Drózdź *et al.*, 2017).

Flavonoīdi



Attēls 6. **Flavonoīdu klasifikācija.** *Adaptēts no: pi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids*

Flavonoīdu acetilholīnesterāzes inhibīcijas efektu pašlaik plaši pēta un šī īpašība ir pētnieku uzmanības centrā. Tā ir liela grupa, kuras lielākās apakšgrupas ir parādītas attēlā 10. Pētījumā, kuros ir aprakstīta tieši molekulāras struktūras un acetilholīnesterāzes inhibīcijas spēju atkarība *Vaccinium spp.* ogām nav daudz.

Viens pētījums liecina par to, ka hidroksila (OH-) grupas flavonoīdu "A" – fenola gredzenā pozitīvi ietekmē šo īpašību. Hidroksilo grupu skaita palielināšana "A" gredzenā palielina molekulu afinitāti un spēju inhibēt AChE, bet metoksi- grupas (-O-CH₃) efekts nav viennozīmīgs – tas var gan palielināt, gan samazināt AChE inhibīciju atkarībā no fenola apakšgrupas tipa. Flavonoīdu glikolizācija mazina to AChE inhibīcijas spēju, mazinot afinitāti līdz 5 reizēm. Ūdeņraža atoma pievienošana C2-C3 apigenīnam samazina saistīšanās afinitāti ar acetilholīnesterāzi un tādēļ mazinās inhibīcijas aktivitāte. No tā var secināt, ka ūdeņraža saitēm ir svarīga loma flavonoīdu afinitātes pakāpē. AChE inhibīcijas īpašība parasti uzlabojas, palielinoties flavonoīdu afinitātei, ko īpaši novēro flavoniem un flavonoliem (Xie *et al.*, 2014).

Citā pētījumā *in vitro*, kurš bija veikts izmantojot žurku kaulu šūnas, analizēja flavonoīdu spēju inducēt AChE aktivitāti. Bija pierādīts, ka daļa no flavonoīdiem, izolētiem no Ķīnas tradicionālajiem garšaugiem, inducē acetilholīnesterāzes aktivitāti, it īpaši baikalīns,

kalikoziņš, genistiņš, hiperiņš un pratenseiņš. Tas nozīmē, ka vienas grupas molekulām var būt pretēja efektivitāte (Xu *et al.*, 2016).

Izolējot un analizējot tilirozīdu, kvercetiņu, kvercitrīnu un 3-metoksikvercetiņu no *Agrimonia pilosa* un apskatot to AChE inhibīcijas aktivitāti, kā references vielu pieņēma dihidroksiestra-1,4-dien-3-ons (*DHED*), un konstatēja, ka kvercetiņa atvasinājumiem bija divreiz lielāka aktivitāte nekā references vielai. (Jung un Park, 2007)

Pētījumu apkopojums par flavonoīdiem, izolētiem no augiem liecina par ievērojamu efektivitāti un potenciālu AChE inhibīcijas terapijā. Efektivitātes un drošības pētījumi turpmāk ir nepieciešami katrai atsevišķai izolētai vielai, lai noteiktu savienojumus ar labākiem farmakokinētikas parametriem (Khan *et al.*, 2018).

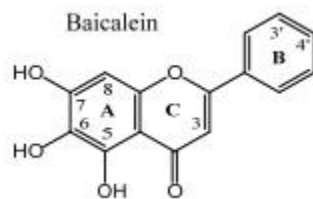
Flavoni

Pēc uzbūves flavoni atšķiras ar –OH un –OCH₃ grupu izvietojumu un skaitu. AChE inhibīcijas efektivitāte bija pētīta flavoniem, kuri bija izolēti no parasta akļa. Tika atklāts, ka vislielākā AChE inhibīcijas iedarbība ir flavonam, kurš ir metilēts pie 4'-OH grupas un satur vienu acetilgrupu. Vielai nav citotoksiska efekta un ir neiroprotektīvs efekts (Uriarte-Pueyo un Calvo, 2010).

Sintezēta flavonu grupa bija novērtēta tai skaitā kā (AChE) inhibitori. Rezultātā bija noteikts, ka flavoni bija pietiekami efektīvi ar labākiem rezultātiem IC₅₀ 21,5 un 26,8 μg/mL, un pētnieki domā, ka nitrogrupas esamība molekulā veicina šo efektu (Díaz-Rubio *et al.*, 2019).

Tabula 1. **Flavonu AChE inhibīcijas potenciāls.** Avots: Ruy *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012.

Viela	% inhibīcija, 100 μM koncentrācijai	IC ₅₀ (μM)
Flavoni		
Krizīns	93.3±4.7	18.2±2.1
Apigenīns	91.5±3.1	7.72±0.15
Baikaleīns	99.6±0.34	0.61±0.12
Baikalīns	35.8±6.6	-
Oroksilīns A	31.3±1.8	-
Kontrole		
Takrīns		0.0254±0.0032I



Attēls 7. **Baikaleīna struktūrformula.** *Adaptēts no Balkis et al., 2015*

Fenolu un polifenolu grupu vielām bija veikts skrīnings par mijiedarbību ar elektrisko zušu acetilholīnesterāzi, kas parādīja, ka baikaleīns uzrāda efektīvāko inhibīcijas aktivitāti ar IC_{50} pie $0,61 \mu M$. Struktūras un aktivitātes atkarība parāda, ka fenoliem AChE inhibēšanai ir nepieciešams nepiesātināts 2-fenil-hromēna, hidroksilētam A-fenola gredzens, un tam jābūt pēc iespējas mazāk glikolizētam pie C fenola gredzena. B fenola gredzena hidroksogrupu esamība neietekmē AChE inhibīcijas potenciālu (Balkis *et al.*, 2015). Tomēr pat izolētam baikaleīnam ir 25,5 reizes mazāka AChE inhibīcijas spēja nekā takrīnam.

Antocianidīni

Ir veikti daži pētījumi, kuru rezultātā tika pierādīta antociānu efektivitāte AChE aktivitātes mazināšanā. Sintezētie antocianīni nomāc skopolamīna inducētos efektus un neļauj mazināties Na^+ un K^+ ATF-āzes koncentrācijai, un palielināties Ca^{2+} ATF-āzes aktivitātei hipokampā (Gutierrez *et al.*, 2014).

Prenilētie flavonoli parādīja devas atkarīgo acetilholīnesterāzes inhibīcijas efektu ar IC_{50} no $0,8$ līdz $3,1 \mu M$, bet kvercetīna efektivitāte pret enzīmu netika pierādīta ($IC_{50} > 500 \mu M$) (Ruy *et al.*, 2011).

Antocianīniem – cukuru saturošiem antocianidīniem, kas ir atrastas tai skaitā vīnogu mizas sastāvā, pārbaudīja AChE inhibīcijas efektu salīdzinot ar takrīnu kā references vielu. 31.25 – $500 \mu g/mL$ koncentrācijās tas parādīja līdz $55,58\%$ efektivitāti un $IC_{50} = 363,61 \mu g/mL$. Takrīnam pie $10 \mu M$ bija 66.3% AChE inhibīcijas iedarbība. Tas ļauj domāt, ka izvēloties pareizo antociānu koncentrāciju var sasniegt vēlamu efektu, bet tomēr takrīns ir daudz efektīvāks.

Antocianīnu sastāvs *Vaccinium spp.* kvalitatīvi un kvantitatīvi jau bija pētīts un ir zināmas ogu kopīgās un atšķirīgās ķīmiskās vielas. Melleņu ekstraktos lielākās koncentrācijās bija noteiktas protokatehīnskābe un ferulskābe, katehīni, procianidīni un miricetīns. Analīze bija veikta ar HPLC metodi, uzņemot absorbcijas spektru un salīdzinot ar references vielu spektriem (Huang *et al.*, 2012).

Tabula 2. **Antocianidīnu AChE inhibīcija.** *Avots: Ruy et al., 2011; Huang et al., 2012.*

Antocianidīni	Inhibīcija, % 100 μM	IC50 (μM)
Pelargonidīns	92.78±0.21	14.27±0.68
Cianidīns	92.5±1.0	14.43±0.31
Delfinidīns	93.73±0.50	44.67±0.49
Malvidīns	90.60±0.82	41.1±1.1
Kontrole		
Takrīns		0.0254±0.0032I

Flavan-3-oli (katehīni)

Katehīnu antioksidatīvā darbība bija pētīta un apskatīta pētījumos. Vienā bija pierādīta antioksidantu aktivitāte *in vivo*, izmantojot oksidatīvus marķierus asins plazmā, lietojot tēju ekstraktus (Higdon un Frei, 2003). Secināts, ka 3 hidoksila grupa samazina inhibēšanas aktivitāti un mazina AChE inhibēšanas īpašības, un flavan-3-oli ir vismazāk efektīva flavonoīdu apakšgrupa starp polifenoliem kopumā (Szwajgier, 2014).

Tāds rezultāts pieļauj izslēgt šo flavonoīdu grupu no turpmākiem pētījumiem kā neefektīvu, neskatoties uz pierādīto antioksidatīvo darbību.

Flavonoli

Daži flavonoli – kvercetin, miricetin, galangin, fisetin un kemferols ir zināmi AChE inhibitori, bet diemžēl vēl lielāks potenciāls pierādīts butirilholīnesterāzes inhibēšanai (Katalinič *et al.*, 2009). Flavonoli 2-4 parāda mainīgu atgriezenisko inhibīcijas kinētiku ar hidrofobu acetilholīnesterāzi (Ruy *et al.*, 2011).

In silico analīzes pierāda, ka arī citi flavonoli – izoramnetin, gosipetin, ramnetin, kemferīds, ramnazin, azaletin un natsudaidain uzrāda AChE inhibīcijas efektu. Molekulāra dokinga analīze pierāda, ka šīs vielas var saistīties ar aktīvām AChE saitēm un perifērām anjonus saitēm vienlaicīgi, inhibējot to abos gadījumos (Remya *et al.*, 2013). 3-O-flavonol glikozīdi bija sintezēti un tika analizēti to AChE inhibīcijas potenciāls (tabula 3).

Tabula 3. **Flavonolu acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibīcija.** *Avots: Balkis et.al., 2015.*

Flavonoli	Inhibīcija, % pie 100 μM	IC50 (μM)
<i>Baohouaside I</i>	38.1±3.9	89±15
Ikarīns	ND	-
Galangīns	98.0±2.5	19.1±1.3
Kemferols	97.97±1.3	3.05±0.77
Kvercetīns	98.38±0.39	3.60±0.61
Miricetīns	99.4±0.37	3.95±0.61
Fisetīns	71.2±3.6	-
Izokvercetīns (quercetin 3-O-β-D-glucoside)	ND	-
Rutīns (quercetin 3-O-β-D-rutinoside)	ND	-
Kontrole		
Takrīns		0.0254±0.0032I

Pēc skrīninga datiem ir redzams, ka kemferols, kvercetīns un miricetīns parāda relatīvi lielu AChE inhibīcijas aktivitāti - IC50 variē ap 3.05-3.95 μM (tabula 3). Šīs grupas vielas ir sastopamas dzērvenēs un citās *Vaccinium spp.* ogās. Citi flavonoli izrāda mazāku inhibīcijas aktivitāti, bet *Guo et. al.* eksperimentā galangāns parādīja inhibīciju ap 55% un IC50 - 120 μM (*Guo et al., 2010*). Pēc šī skrīninga rezultātiem izokvercitīnam un rutīnam AChE inhibīcijas īpašība nepiemīt.

Flavonoliem kopumā ir vājākas inhibīcijas spējas nekā baikaleīnam, kas varētu būt molekulāras struktūras dēļ – hidroksilgrupa pie B fenolgredzena un mazāks –OH skaits pie A fenolgredzena (*Balkis et al., 2015*).

Flavanoni

Parasti par flavanonu avotu uzskata citrusa augus, jo to masas daļa ir ievērojama tādos augļos kā greipfrūts, citrons, apelsīns un mandarīns. Citrusa augļu sulas arī parāda acetilholīnesterāzes inhibīcijas efektu (*Ademosun un Oboh, 2012*).

Paulownia tomentosa augļi, kas satur tai skaitā lielu flavanolu daudzumu un dažādību, parāda ievērojamu acetilholīnesterāzes inhibēšanas efektu. Izolētie flavoni bija noteikti kā aktīvas vielas, un parādīja devas un laika atkarīgo inhibīcijas efektu hidrofobai

acetilholīnesterāzei (hAChE), izmantojot fluorescences iekrāsoto enzīmu monitringu (Ting *et al.*, 2016; Yung *et al.*, 2012).

Tabula 4. **Flavononu acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibīcija.** Avots: *Balkis et.al., 2015.*

Flavanoni	Inhibīcija, % pie 100 μM	IC ₅₀ (μM)
Pinocebrīns	17.2±1.7	446
Naringīns	24.8±7.3	-
Kontrole		
Takrīns		0.0254±0.0032I

No struktūras atkarīgās aktivitātes analīze atklāja, ka flavanonu glikozīds veido ligandus un neļauj acetilholīnam saistīties ar enzīmu. Dati parāda, ka naringīnam no flavanonu glikozīdiem ir visstiprāka afinitāte pret AChE ($IC_{50} = 446 \mu\text{M}$, tabula 4.), tomēr mehānisms šai vielu grupai ir vienlīdzīgs. Pētījumi pierāda, ka šai polifenolu apakšgrupai piemīt ne tikai vien AChE inhibīcijas efekti, bet arī spēja šķērsot hematoencefalītisko barjeru (Feng *et al.*, 2018; Remya *et al.*, 2014).

Izoflavoni

Šo vielu grupu arī analizēja skrīningā fiksējot rezultātus (tabula 5.). Genisteīns parāda augstu AChE afinitāti un inhibīciju. Citā pētījumā *in silico* izoflavonu derivāti, kuri bija sintezēti no patentēta komponenta *Compound G* bija mērķēti uz AChE un BuChE inhibīciju. 5 no 20 apstiprinājās efektivitāte *in vitro*, 3 no tiem bija spējīgi šķērsot asins smadzeņu barjeru (Song *et al.*, 2017).

Tabula 5. **Izoflavonu acetilholīnesterāzes aktivitātes inhibīcija.** Avots: *Balkis et.al., 2015.*

Izoflavoni	Inhibīcija, % pie 100 μM	IC ₅₀ (μM)
Genisteīns	59.03±0.11	-
Daidzeīns	2.64±0.28	-
Kontrole		
Takrīns		0.0254±0.0032I

Aktīvas vielas dizainā un skrīningā tika atrasts izoflavons (*Para-Pyrrolidine-1-yl*) ar augstu AChE selektivitāti un IC₅₀ pie 4 nM koncentrācijas, kura efektivitāte ir trīskārt augstāka nekā references zāļu vielai donepezilam (Sheng *et al.*, 2009a.), kā arī šis rādītājs ir augstāks nekā rivastigmīnam (Sheng *et al.*, 2009b).

Halkoni

Halkonu grupas vielas novērtēja kā AChE inhibitorus un antioksidantus atkrāsošanas eksperimentā, salīdzinot ar dažiem citiem polifenoliem. Labākie rezultāti bija halkonu savienojumiem ar –OH un –NO₂ grupām vienlaicīgi – nitrogrupai ir teorētiska aktivitātes paaugstināšanas spēja (IC₅₀ 21.5...26.8 μg/mL) (Díaz-Rubio *et al.*, 2019). Tomēr, salīdzinot ar līdzīgiem flavonu savienojumiem, flavonu AChE inhibīcijas potenciāls bija lielāks.

4. MATERIĀLI UN METODEDES

4.1. Materiāli

1. Ogu spiedpalieku ekstrakti:

1. Mellene (*Vaccinium myrtillus L.*)
2. Krūmmellene (*Vaccinium corymbosum L.*)
3. Dzērvene (*Vaccinium oxycoccos L.*)
4. Lielogu dzērvene jeb dižbrūklene (*Vaccinium macrocarpon Ait.*)
5. Brūklene (*Vaccinium vitis-idaea L.*)

Ekstrakti bija iepriekš pagatavoti pēc rakstā “*Antioxidative, hypoglycaemic and hepatoprotective properties of five Vaccinium spp. berry pomace extracts*” (R. Muceniece *et. al.*, 2019) aprakstītām metodēm un saņemti gatavi lietošanai no Latvijas Universitātes Ģeogrāfijas un Zemes zinātņu fakultātes pētniekiem sausu ekstraktu veidā.

4.2. Reāģenti

1. Acetilholīnesterāze (Sigma-Aldrich)
2. Acetiltioholīns (Sigma-Aldrich)
3. Elmana reaģents jeb 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojskābe) (*DTNB*) (Sigma-Aldrich)
4. Nātrija bikarbonāts (Sigma-Aldrich)
5. 1 M fosfātbufersšķīdums (Sigma-Aldrich)
6. AChE inhibitori:
 - 6.1. Donepezila hidrohlorīda pulveris >98% (Sigma-Aldrich)
 - 6.2. Galantamīna hidrobromīds pulv. (Sigma-Aldrich)
 - 6.3. Ipidakrīns pulv. (Olainfarm)
 - 6.4. Neostigmīna hidrobromīds pulv. (Sigma-Aldrich)
7. Destilēts dejonizēts ūdens

4.3. Aparatūra un palīgierīces

1. 96 lauciņu mikroplates
2. Automātiskās pipetes *Sartorius*
3. Pipešu uzgaļi *Sartorius*
4. Eppendorf mēģenes
5. Eppendorf mēģenu turētājs

6. Analītiskie sviri

7. Mikroplašu absorbcijas lasītājs *BioTek® ELx808*, savienots ar datora programmatūru *Gen5 ELISA*

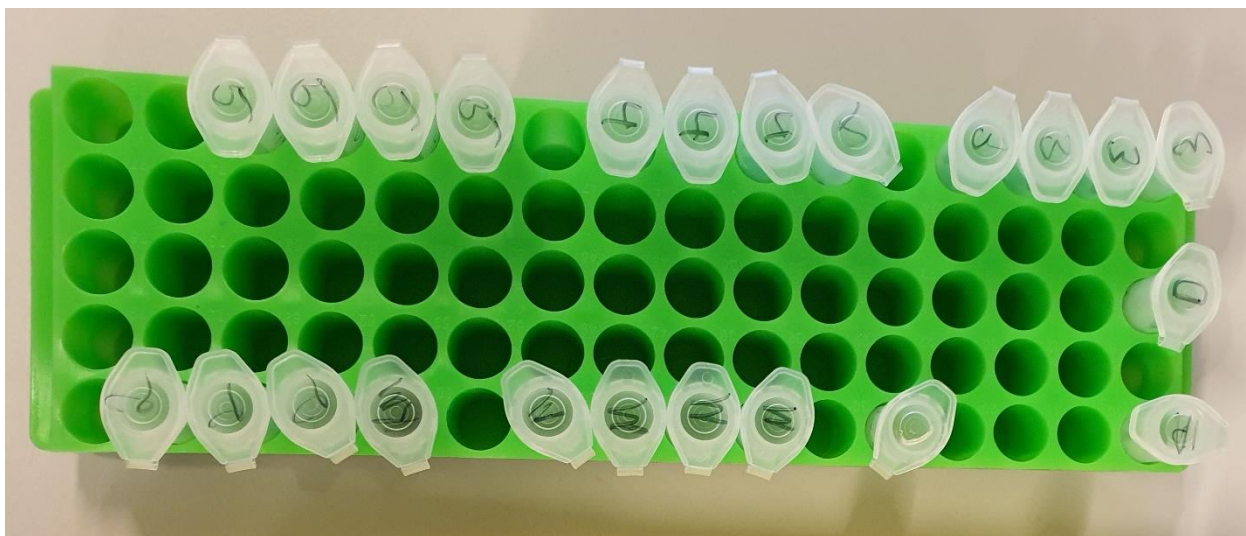
8. Centrifūgāls maisītājs Eppendorf mēģenēm *BioSan BioVortex VI*

4.4. Darba gaita

4.4.1. Ekstraktu šķīdināšana

Pulverveida ekstraktus nosvērām ar analītiskajiem svariem un šķīdinājām koncentrācijā 100 mg/ml metanolā. Pēc tam atšķaidījām ar fosfātbuferi buferētu ar nātrija hlorīdu pH 7,4 līdz 10 mg/ml. Šādas koncentrācijas šķīdumus uzglabājām ledusskapī un eksperimentiem atšķaidījām ar buferi vēlamajās koncentrācijās. Tādējādi 1 mg/ml šķīduma ir tikai 1% metanola.

Pirms eksperimenta koncentrātus (10 mg/ml ekstraktus) samaisa ar centrifugālo maisītāju BioVortex un atšķaida līdz darba koncentrācijām – 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml un 0,125 mg/ml. Darba koncentrācijas šķīdumus pagatavo Eppendorfa mēģenēs, sākumā ielejot dejonizēto ūdeni un pievienojot nepieciešamo ekstraktu tilpumu ar mikropipetēm. Mēģenes marķē attiecīgi ogu sugai un ekstraktu koncentrācijām (attēls 12).

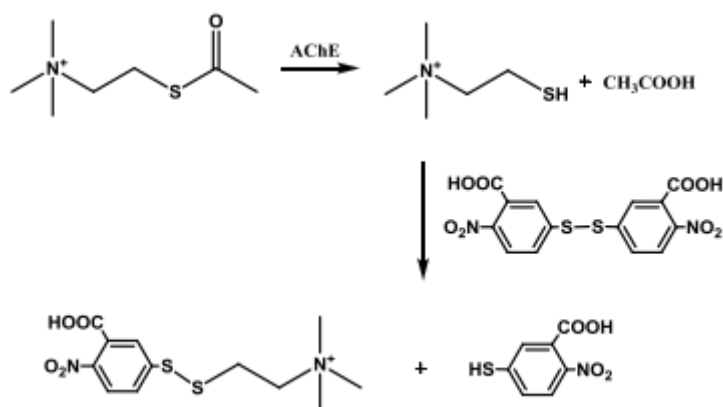


Attēls 8. Sagatavotie ekstraktu šķīdumi. Avots: autora darbs.

Sagatavotu ekstraktu atšķaidījumus vēlreiz samaisa ar centrifugālo maisītāju tieši pirms pipetēšanas mikroplatēs.

4.4.2. Acetilholinesterāzes inhibīcijas mērīšanas metode

Eksperimenta pamatā ir Ellmana metode, kura ir bāzēta uz dzeltenas krāsas TNB (5-tio-2-nitrobenzoscābes) jonu veidošanos, kuri veidojas hidrolizējot DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoscābe) ar substrātu (acetiltioholīnu). Šādā veidā var noteikt, cik TNB jonu veidojas no sākotnēji reakcijā pievienotā DTNB reaģenta. Iekrāsošanas reakcija notiek stehiometriski 1:1 attiecībā, un no tās, izmantojot iepriekš veidotās kalibrēšanas taisnes, var izrēķināt AChE inhibēšanas spēju noteiktām vielām noteiktās koncentrācijās, atbilstoši absorbcijas mērīšanas rezultātiem. Absorbciiju mēra pie redzamās gaismas 412 nm viļņa garuma (Ellman *et al.*, 1961). Ķīmiskā reakcija ir redzama attēlā 13. Metode ir relatīvi viegla, ātra un plaši lietota daudzos pētījumos kā pamata reakcija dažādu vielu AChEi potenciāla noskaidrošanai (Sinko *et al.*, 2007).



Attēls 9. Ellmana metodē izmantotās reakcijas mehānisms. Avots: *Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method.* M.Pohanka *et. al.*

4.4.3 Acetilholinesterāzes inhibīcijas mērīšana acetilholinesterāzes inhibitoriem

Zināmus AChE inhibitorus (neostigmīnu, galantamīnu un ipidakrīnu) izmanto kā references vielas, kuru darbību varētu potencēt pētamie ekstrakti. Eksperimentos ir nepieciešams noteikt references vielu koncentrācijas, ar kurām ir ērtāk strādāt – inhibīcijai nav jābūt pārāk vājai vai stiprai. Mērķa koncentrācija zināmajiem enzīma inhibitoriem bija tāda, lai sasniegtu apmēram 50% AChE inhibīcijas līmeni.

Sākumā pagatavo DTNB šķīdumu – izšķīdina 3,96 mg DTNB pulvera un 1,5 mg nātrija bikarbonāta 10 ml 20mM fosfātbufera. Katrai mikroplatei ir nepieciešami 5 ml DTNB šķīduma. Tad mikroplates lauciņos iemēra 100μl fosfātbufera ar koncentrāciju 200mM un pH 7,4 vai

destilēto dejonizēto ūdeni, tad pievieno enzīmu AChE (2 U/ml), 10 µl analizējamās vielas vai ekstrakta ar vajadzīgo koncentrāciju katrā lauciņā, tad pievieno 50µl DTNB šķīduma. Inkubē 20 minūtes istabas (25°C) temperatūrā. Tad pieliek 15µl substrāta (10,85 mg acetiltioholīna + 5µl fosfātbufēra). Parādās dzeltena krāsa no anjona 5-tio-2-nitrobenzoāta, kas veidojas acetiltioholīna un DTNB reakcijas rezultātā. Katru vielas koncentrāciju mēra triplikātos, lai samazinātu pipetēšanas un mērīšanas kļūdu iespēju. Plati atkal inkubē 15 minūtes istabas temperatūrā un mēra absorbciju ar mikroplašu lasītāju. Lai redzētu reakcijas kinētiku, vēl pēc 15 minūtēm mērīšanu atkārto. Tādējādi vielu efektu nosaka pēc 15 min un 30 min. Rezultātus saglabā .xlsx tabulas formātā un apstrādā.

AChE inhibīciju sākumā noteicām inhibitoriem atšķirīgās koncentrācijās. Donepezilam, ipidakrīnam un neostigmīnam pārbaudījām AChE inhibīciju koncentrācijā 1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml, 0,0125 mg/ml, 0,00625 mg/ml, 0,003125 mg/ml. Pēc aktivitātes noteikšanas ipidakrīns tika atšķaidīts līdz koncentrācijai 0,0015625 mg/ml un donepenzils līdz 0,0001953125 mg/ml, kas ir apmēram to IC50. Tāds atšķaidījums tikai izmantots ogu ekstraktu AChEi potencēšanas pētījumiem. Ogu spiedpalieku ekstraktiem inhibīcijas spēju pārbaudījām koncentrācijās 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, un 0,125 mg/ml. Pirms atšķaidīt, vielu un ekstraktu šķīdumus sakrata ar centrifugālo maisītāju (vorteksē).

Ogu spiedpalieku ekstraktu AChE inhibīcijas efekta potencēšanu, lietojot tos kopā ar zināmiem AChE inhibitoriem (zālēm) pētījām, ņemot zināmo inhibitoru koncentrācijā ap IC50 un pievienojot dažādas ekstraktu koncentrācijas.

4.4.4. Datu analīze

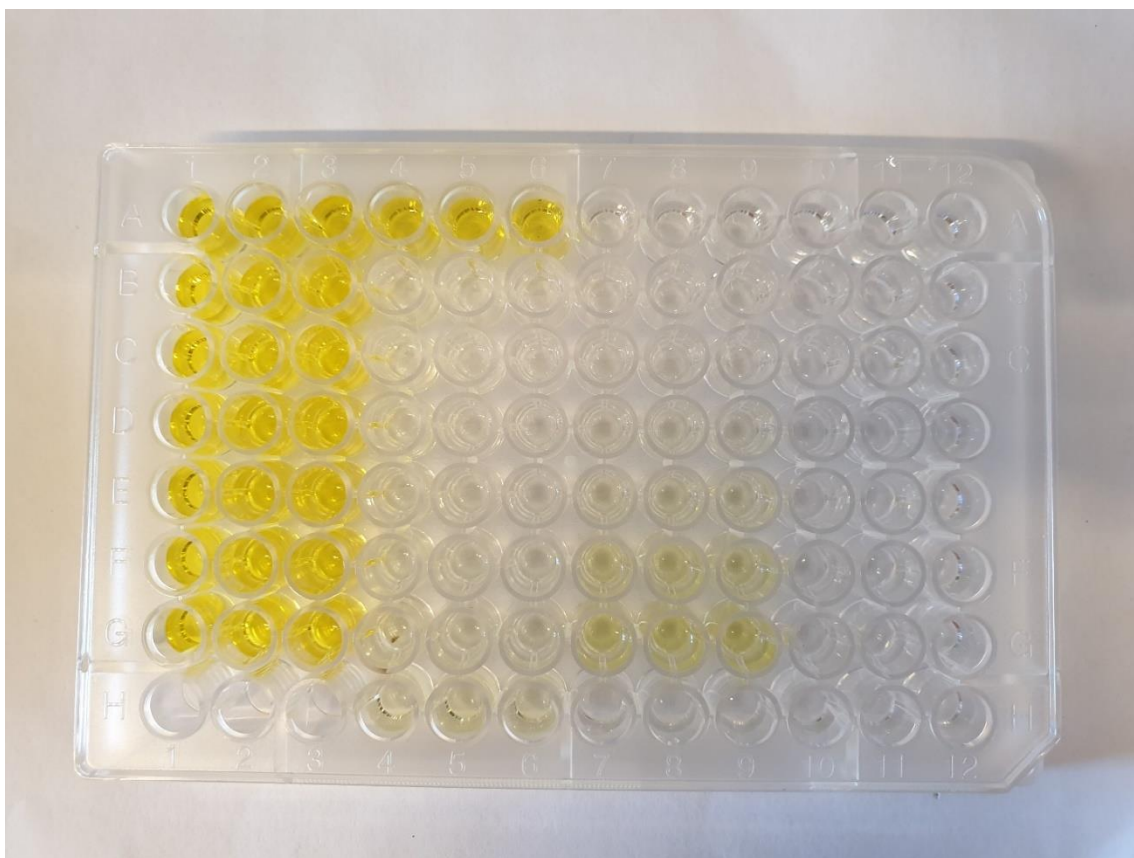
Rezultāti tika apkopoti un analizēti MS Excel un GraphPad Prism 8.1.1. programās ar ANOVA analīzi ar Dunneta multisalīdzinājuma testu ņemot vērā standartnovirzi. Statistiskā ticamība izteikta kā $P \leq 0.05$.

5. REZULTĀTI

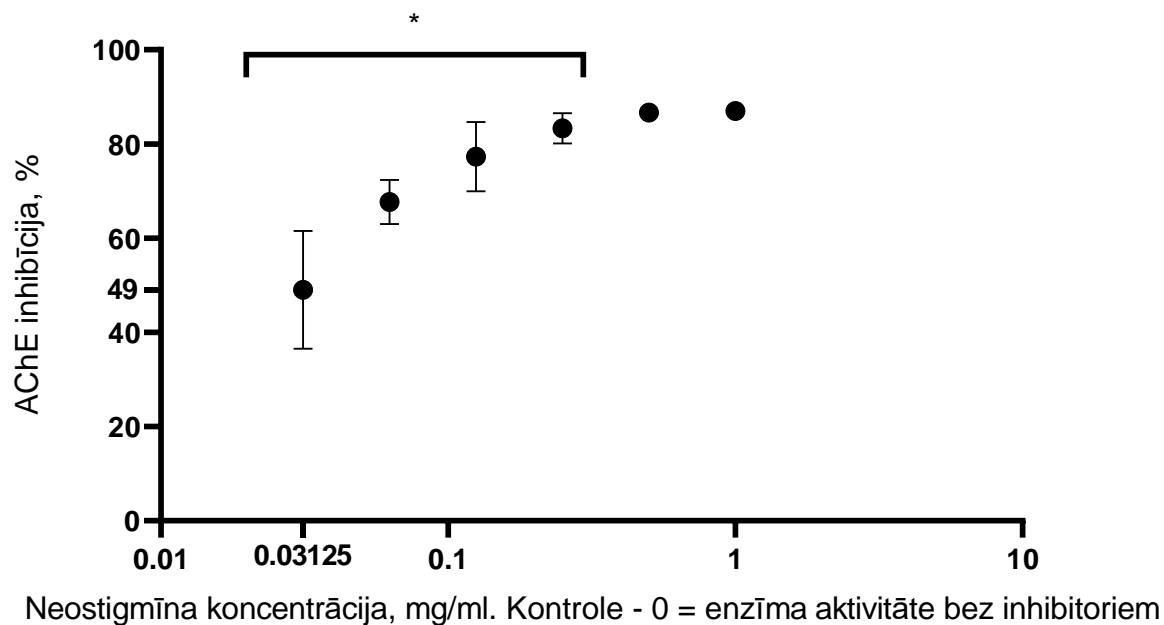
5.1. AChE inhibīcija un darba koncentrācijas izvēle zināmiem AChEi

AChE inhibitoriem enzīma inhibēšanas efekts ir zināms un pierādīts, tomēr katrā eksperimentā jāpārbauda atbilstošās kontroles un jāatrod IC50 konkrētos apstākļos. Izmantojot donepezilu, ipidakrīnu un neostigmīnu kā references vielas, ir jāpārbauda efektivitāti ar tādām pašām metodēm kā ekstraktiem. Šie dati arī ir nepieciešami potencēšanas pētījumiem, kad AChEi pievieno enzīmam kopā ar ogu spiedpalieku ekstraktiem.

Sākumā tika mērīts neostigmīna, ipidakrīna un donepezila AChE inhibīcijas līmenis atkarībā no koncentrācijas.

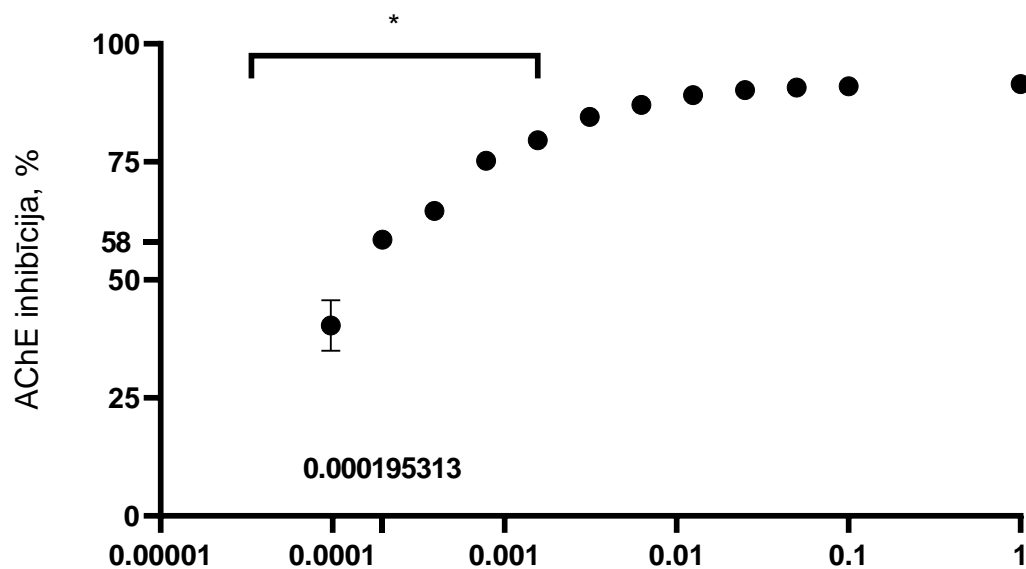


Attēls 10. AChE inhibīcijas mērīšana donepezilam (B4-6 – H4-6) un ipidakrīnam (A7-9 – G7-9) *in vitro* mikroplatē ar Ellmana metodi. Autora darbs.



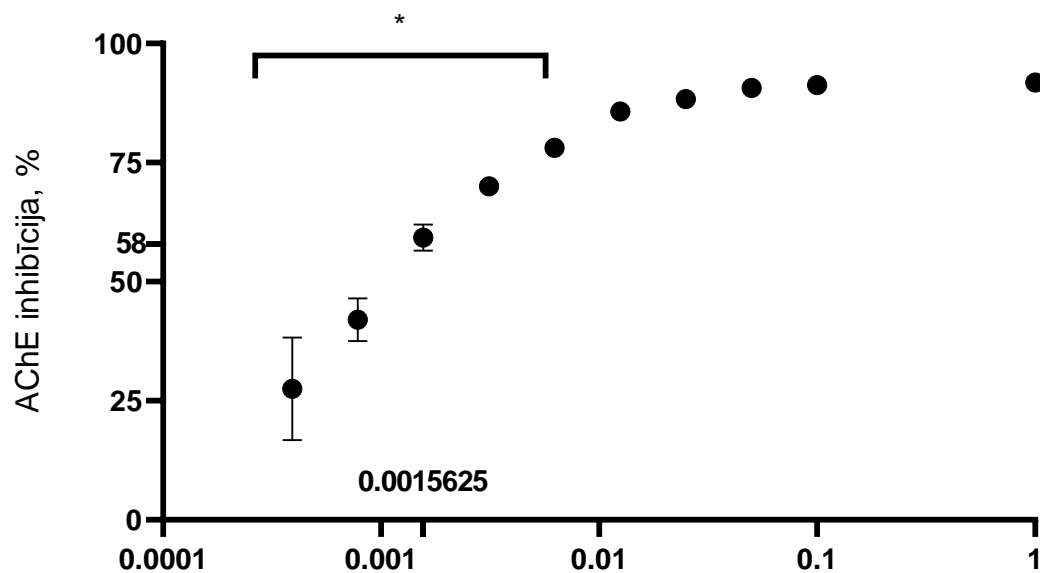
Grafiks 1. Neostigmīna AChE inhibīcija atkarībā no koncentrācijas. * $P \leq 0.05$ vs. kontrole enzīma aktivitāte bez inhibitora, inhibīcija 0%.

Ogu ekstraktu neostigmīna potencēšanas efekta noteikšanai neostigmīnam bija izvēlēta koncentrācija 0,03125 jeb 31,25 $\mu\text{g/ml}$, pie kuras notiek 49-50% AChE aktivitātes inhibīcija.



Donepezīla koncentrācija, mg/ml. Kontrole - 0 = enzīma aktivitāte bez inhibitoriem

Grafiks 2. Donepezila AChE inhibīcija atkarībā no koncentrācijas. * $P \leq 0.05$ kontrole enzīma aktivitāte bez inhibitora, inhibīcija 0%.



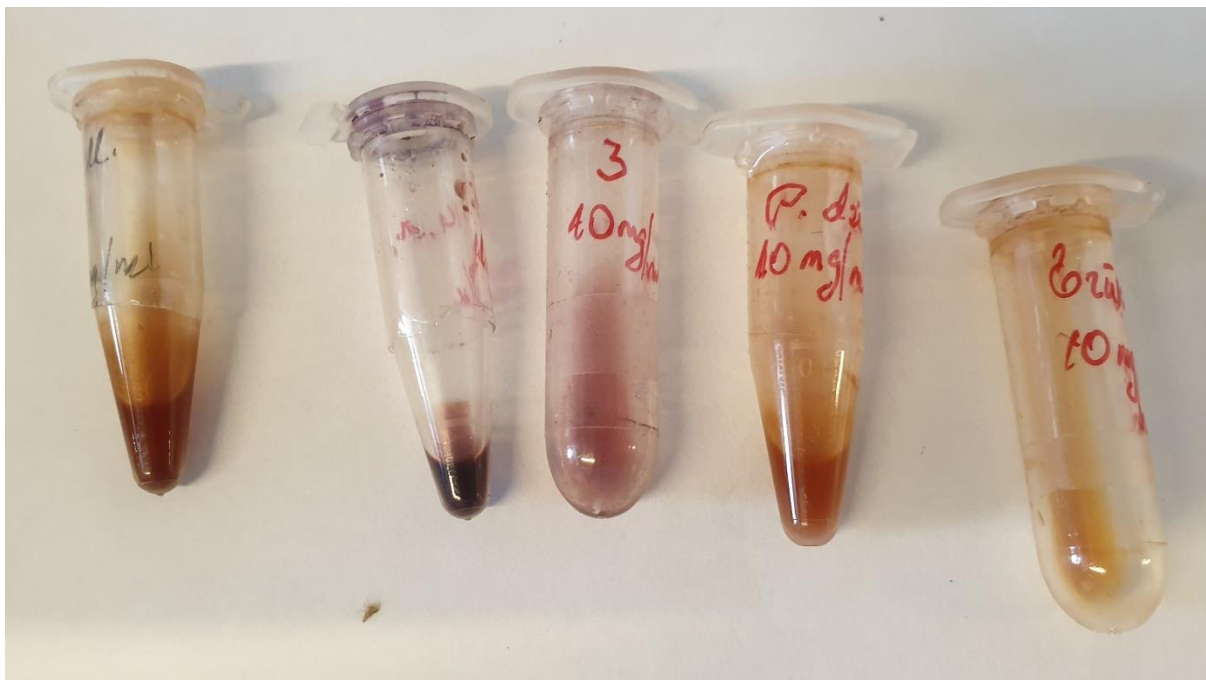
Ipidakrīna koncentrācija, mg/ml. Kontrole - 0 = enzīma aktivitāte bez inhibitoriem

Grafiks 3. **Ipidakrīna AChE inhibīcija atkarībā no koncentrācijas.** * $P \leq 0.05$ kontrole enzīma aktivitāte bez inhibitora, inhibīcija 0%.

Ipidakrīnam un donepezilam ir ļoti spēcīga inhibīcijas spēja, tāpēc bija jāatšķaidā vairāk nekā neostigmīns. Donepezils inhibē 58% enzīma aktivitātes pie koncentrācijas 0,000195313 mg/ml jeb 0,2 µg/ml, ipidakrīns – 58% pie koncentrācijas 0,0015625 mg/ml jeb 1,6 µg/ml. Tālāk potencēšanas eksperimentā IC50 koncentrācijas izmantotas kā kontrole.

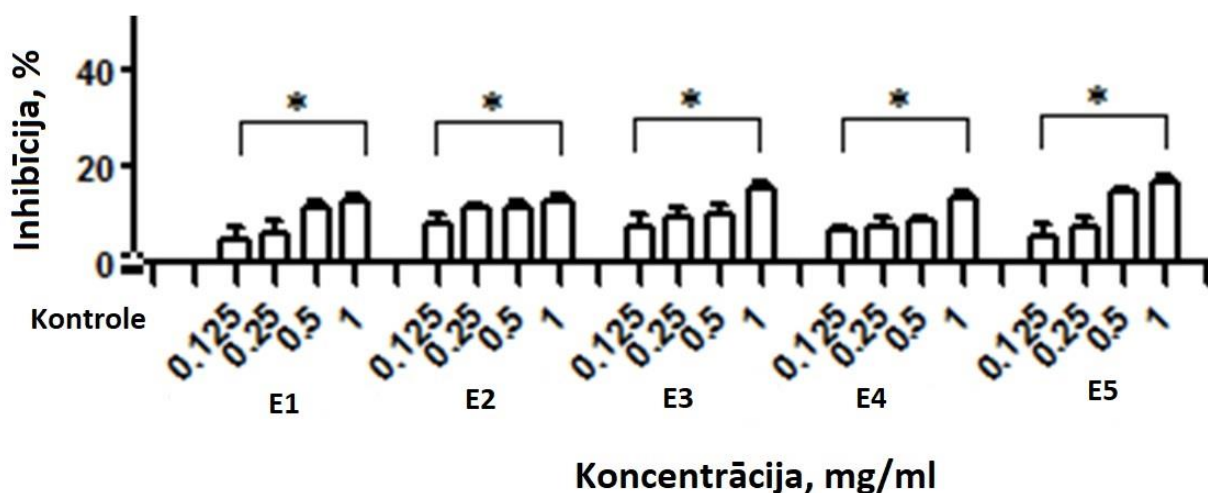
5.2. Ogu spiedpalieku ekstraktu AChE inhibīcija

Ekstraktu AChE inhibīcijas līmeņa noteikšanas ar absorbcijas mērītāju aprēķinos ir jāiekļauj kontrole – pašu ekstraktu krāsojums (att. 15). Tādēļ pirms substrāta pielikšanas un dzeltenās krāsas rašanās izmēra platei OD un to kā reaģentu krāsas fonu atņem no reakcijas rezultātā izmērītās absorbcijas.



Attēls 11. Ekstraktu krāsas koncentrācijā 10 mg/ml. Autora darbs.

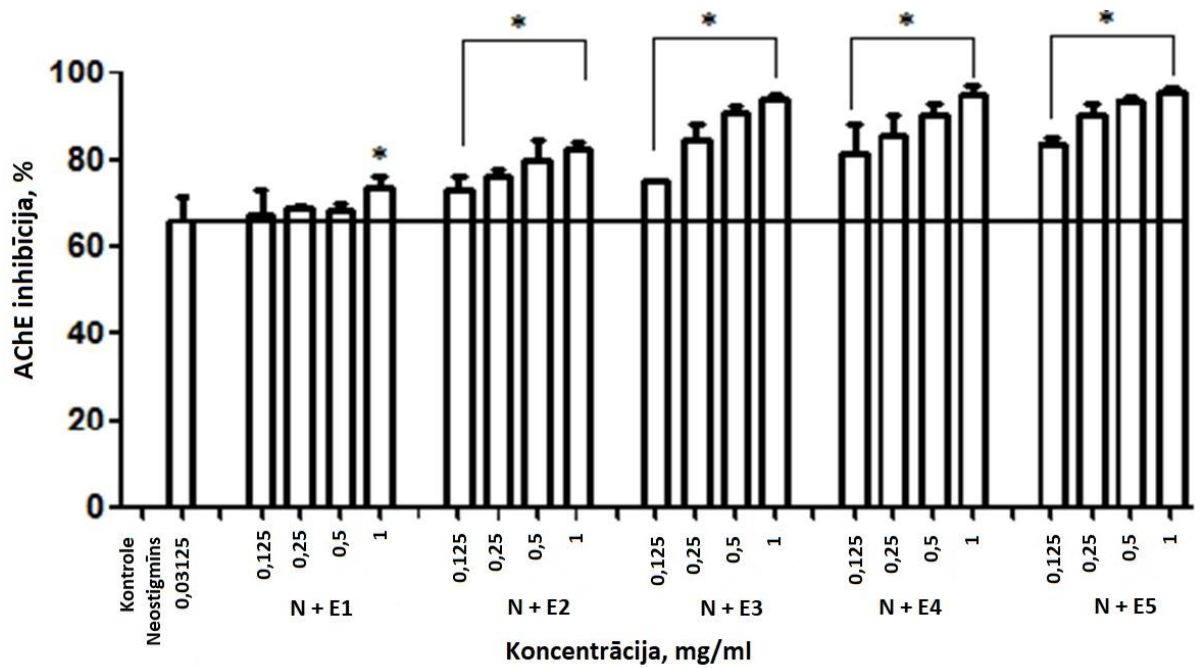
Visi *Vaccinium spp.* ogu spiedpalieku ekstrakti parādīja no koncentrācijas atkarīgo AChE inhibīciju un tās līmenis 1 mg/ml koncentrācijā bija no 11% līdz 20%. Inhibīcijas rezultāti ir redzami grafikā 1. Nedaudz spēcīgāku inhibīciju parāda brūkleņu spiedpalieku ekstrakts.



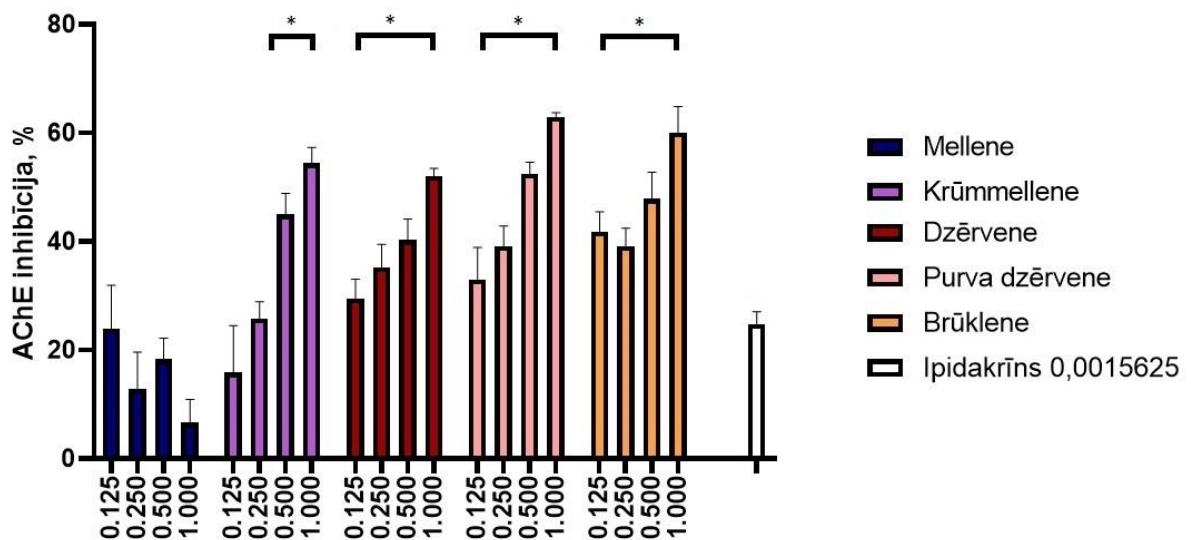
Grafiks 4. Acetilholīnesterāzes inhibīcija ogu spiedpalieku ekstraktiem atkarībā no koncentrācijas. Inkubācijas laiks – 30 minūtes. Kontrole – enzīma aktivitāte bez inhibitora – 0% inhibīcijas. * $P \leq 0.05$. E1 – mellene, E2 – krūmmelene, E3 – dzērvene, E4 – lielogu dzērvene, E5 – brūkle.

5.3. AChEi mijiedarbība ar *Vaccinium spp.* ogu spiedpalieku ekstraktiem

Novērojām neostigmīna bromīda un ekstraktu AChE inhibīcijas potencēšanas efektu. Neostigmīna HBr koncentrācijā 0,03125 mg/ml kopā ar ekstraktiem koncentrācijās 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, un 0,125 mg/ml uzrādīja labāku AChE inhibīciju nekā viens pats. Krūmmelleņu, dzērveņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu ekstrakti potencēja neostigmīna efektu visās koncentrācijās, bet melleņu ekstrakts tikai 1 mg/ml. Statistiskā ticamība aprēķināta pret neostigmīna viena paša efektu IC50 koncentrācijā.



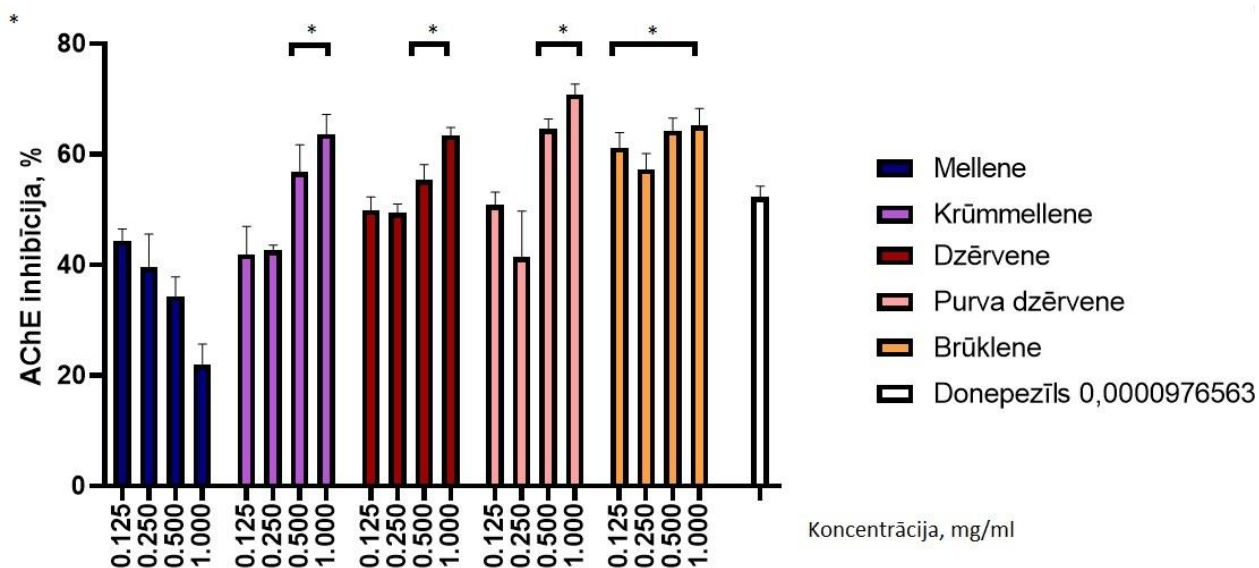
Grafiks 5. Ogu spiedpalieku ekstraktu AChE inhibīcijas neostigmīna potencēšanas efekts. Inkubācijas laiks – 30 minūtes. Kontrolē – enzīma 100% aktivitāte bez inhibitoriem, pieņemta kā 0% inhibīcijas. * $P \leq 0.05$. E1 – mellene, E2 – krūmmellene, E3 – dzērvene, E4 – Lielogu dzērvene, E5 – brūklene, salīdzinot ar N – neostigmīna hidrobromīds.



Grafiks 6. Ogu spiedpalieku ekstraktu AChE inhibitora ipidakrīna efekta potencēšana. Inkubācijas laiks - 30 minūtes. Kontrolē – ipidakrīna efekts, * $P \leq 0.05$ vs ipidakrīna efektam.

Grafikā 6. ir redzams, ka brūkleņu, dzērveņu un purva dzērveņu spiedpalieku ekstrakti potencē ipidakrīna efektu no koncentrācijas atkarīgā veidā. Krūmmellene potencē 0,5 un 1,0

mg/ml koncentrācijās. Melleņu spiedpalieku ekstrakts koncentrācijā 0,125 mg/ml neietekmē ipidakrīna efektu, bet lielākās pat samazina.



Grafiks 7. Ogu spiedpalieku ekstraktu donepezila efekta potencēšana. Inkubācijas laiks - 30 minūtes. Kontrolē – donepezila efekts IC50 koncentrācijā. * $P \leq 0.05$ vs. donepezila efekts.

Dzērveņu, purva dzērveņu un krūmmelleņu spiedpalieku ekstrakti potencē AChE inhibīciju koncentrācijā 1,0 mg/ml un 0,5 mg/ml. Brūkleņu ekstrakts visās koncentrācijās potencē donepezila efektu, bet mellenēm ir izteikts no koncentrācijas atkarīgs donepezila darbības inhibēšanas efekts.

6. DISKUSIJA

Ogu ekstraktu kognīcijas uzlabošanas efekti un AChE inhibīcijas potenciāls

2005. gada pētījumā (Ramirez *et.al.*, 2005) tika analizēta liofilizēto melleņu un krūmmelleņu ietekme uz kognitīvām spējām žurkām. Žurkām iebaroja liofilizētos preparātus 3,2 mg/kg katru dienu 30 dienu laikā. Bija konstatēti uzlabojumi atsevišķos aspektos – īstermiņa atmiņā un radiālā labirinta iziešanā, kas pierāda pozitīvu kognīcijas uzlabošanas iedarbību *in vivo*. Citā kombinētā *in vivo* un *in vitro* pētījumā (Papandreou *et al.*, 2009) bija apskatīta peļu apmācības spēja un atmiņa ievadot melleņu ekstraktu 7 dienu laikā. Ekstraktu injicēja intraperitoneāli 30 (PrB30) un 60 (PrB60) mg/kg katru dienu. Kognitīvas spējas analizēja salīdzinot ar kontroles grupu un tika pierādīts ievērojams apmācības spējas un atmiņas uzlabošanas efekts. Tām pašām grupām salīdzināja AChE līmeni žurku smadzenēs un eksperimentālai grupai tika atrasts 31% enzīma inhibīcijas līmenis salīdzinot ar kontroli. Tajā pašā laikā novēroja samazinātu lipīdu peroksīdu līmeni un augstāku askorbīnskābes līmeni, kas liecina par melleņu ekstrakta antioksidatīvo efektu. Literatūrā (Benzie un Watchel-Galo, 2011) ir aprakstīts iespējamais mehānisms, kura pamatā ir dažu polifenolu spēja šķērsot asins smadzeņu barjeru un smadzenēs izraisīt vazodilatējošo, pretiekaisuma, antioksidatīvo un acetilholīnesterāzes inhibējošo aktivitāti. Pētījumos *in vivo* melleņu ekstrakti tika ievadīti žurkām ilgstoši. Intraperitoneālais ievadīšanas ceļš ļauj tūlīt vielām uzsūkties asinīs. Pētījumi ar dzīvniekiem parāda, ka kognīcijas uzlabošanās mehānisms varētu būt saistīts ar AChE inhibēšanu. *In vivo* eksperimentos nevar pateikt vai notiek saistīšanās ar enzīmu, vai AChE aktivitātes samazināšanās ir notikusi ar citu signālceļu palīdzību. *In vitro* eksperimenti ar izolētu enzīmu ļoti precīzi parāda vielu spēju saistīties ar enzīma aktīvajiem centriem. Mūsu dati parāda, ka melleņu spiedpalieku ekstraktiem ir statistiski ticama AChE inhibēšanas spēja un tas apstiprina *in vivo* pētījumos atrasto efektu molekulāro darbības mehānismu. Melleņu polifenoli spēj saistīties pie enzīma aktīvajiem centriem un nobloķēt to pieejamību substrātam. Melleņu ekstraktiem *in vivo* piemīt arī citi darbības mehānismi kā acetilholīna jutības atjaunošana, kad receptoru atbilde ir nomākta, oksidatīvā stresa mazināšana un kalcija homeostāzes regulēšana (Joseph *et al.*, 2006; 2010a). Citi autori arī uzskata, ka krūmmelleņu polifenoli uzlabo holīnērgisko signālpārraidi tāpēc, ka inhibē AChE (Papandreou *et al.*, 2009). Mūsu eksperimentā neizskaidrojama ir melleņu ekstrakta ipidakrīna un donepezila AChE inhibīcijas spējas samazināšana gaidītās potencēšanas ziņā. Iespējams, ka ekstraktvielām un šiem inhibitoriem ir ķīmiska nesaderība vai vajadzīgs cits inkubēšanas ar enzīmu laika intervāls un neder vienlaicīga pievienošana enzīmam.

Pētot dzērveņu sulas iespējamo neiroprotektīvo darbību (Crews *et al.*, 2005), pētījumā iesaistīja cilvēkus vismaz 60 gadu vecumā bez demences pazīmēm. Tomēr eksperimenta grupai, kuri dzēra 27% dzērveņu sulu katru dienu 6 nedēļas, neatrada statistiski ticamu atmiņas uzlabojumu salīdzinot ar kontroles grupu. Mūsu eksperimentos abu dzērveņu spiedpalieku ekstrakti uzrādīja AChE inhibīciju un potencēja AChEi efektus. Var piezīmēt, ka pētījumos bieži neatzīmē atšķirību starp lielo dzērvenēm un purva dzērvenēm un uzskata, ka sastāvs ir identisks un vairāk ir atkarīgs no ogu augšanas vietas (Lee and Wrolstad, 2006). Mūsu eksperimentos spiedpalieku ekstrakti saturēja daudz vairāk aktīvo vielu nekā 27% sula. Bez tam cilvēku organismā lielu lomu spēlē biopieejamība. *In vitro* eksperimentos notiek tieša ekstraktu aktīvo vielu saskarsme ar enzīmu. Iespējams, tāpēc cilvēku eksperimentā nenovēroja nekādu efektu, un pētījumi būtu jāveic ar spiedpalieku ekstraktiem, kuros atrodas koncentrēts aktīvo vielu daudzums.

Dzērveņu, brūkleņu un krūmmelleņu ekstrakti potencēja AChEi neostigmīna, ipidakrīna un donepezila efektus, taču melleņu ekstrakts tikai neostigmīna efektu. Krūmmellenēm un mellenēm ir ļoti līdzīgs aktīvo vielu sastāvs, un pašreiz nevaram izskaidrot to atšķirīgo mijiedarbību ar AChEi un AChE inhibēšanas efektivitāti. Tomēr ir arī atšķirības. Piemēram, krūmmellenēm ir izteikti vairāk ceriņskābes un malvidīna, bet mellenēm ir epikatehīns un procianidīni B, kas nav krūmmellenēs. Krūmmellenēm ir apmēram trīs reizes lielāks kopējo antocianīnu saturs nekā melleņu spiedpalieku ekstraktam (Muceniece *et al.*, 2019). Malvidīnam 100 μM koncentrācijā ir novērota 90% AChE inhibīcija (Ruy *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012).

Pieļaujam, ka, ja kāda šo ogu spiedpalieku ekstrakta AChEi potencējošā darbība tiktu novērota *in vivo* eksperimentos un cilvēkiem, tad varētu samazināt AChEi devas un novērst blakus efektus. Sintezētajiem inhibitoriem fizostigmīnam, takrīnam un donepezilam atrasta hepatotoksicitāte un kuņģa-zarnu trakta traucējumi kā nepatīkamākie blakus efekti.

Neiroprotektīvie efekti tiek pētīti ne tikai kā kognīcijas uzlabošana, bet arī kā nervu šūnu aizsardzība pret glutamāta izraisītu citotoksicitāti. Pētot melleņu un brūkleņu lapu ekstraktu (Vyas *et al.*, 2013) efektivitāti eksperimentā ar žurku smadzeņu šūnām, protekciju *in vitro* pret glutamāta inducēto citotoksicitāti brūkleņu lapu ekstraktam nenovēroja, bet melleņu lapu ekstrakts bija ļoti aktīvs. Uzskata, ka melleņu lapās ir vairāk aktīvo vielu nekā ogās.

7. SECINĀJUMI

1. Melleņu, krūmmelleņu, purva dzērveņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu spiedpalieku ekstraktiem piemīt acetilholīnesterāzes inhibīcijas spēja *in vitro*. Visiem ekstraktiem ir samērā līdzīgi efekti, un koncentrācijā 1 mg/ml tie inhibē enzīma aktivitāti 11-20% diapazonā.
2. Šajā eksperimentu dizainā neostigmīnam atrastā IC50 koncentrācija ir 31,25 µg/ml, donepezilam 0,2 µg/ml, ipidakrīnam –1,6 µg/ml. Ogu spiedpalieku ekstraktiem IC50 netika sasniegta.
3. Ogu spiedpalieku ekstrakti potencē acetilholīnesterāzes inhibitoru efektus, tomēr novēro atšķirības. Visi ekstrakti potencē neostigmīna efektu *in vitro*, taču melleņu ekstrakts tikai 1 mg/ml koncentrācijā. Ipidakrīna un donepezila efektus potencē visi ekstrakti, izņemot melleņu ekstraktu, kurš samazina šo acetilholīnesterāzes inhibitoru efektus..
4. Nepieciešami turpmākie pētījumi *in vivo*, lai apstiprinātu ogu spiedpalieku ekstraktu acetilholīnesterāzes inhibīciju un tās inhibitoru potencējošo darbību.

PATEICĪBAS

Izsaku pateicību profesorei Rutai Mucenieci par iespēju rakstīt šo darbu un darba vadīšanu, Reinim Reinbergam par palīdzību pētījuma veikšanā Latvijas Universitātes laboratorijā.

LITERATŪRAS AVOTI

1. **Ademosun AO, Oboh G.** “Inhibition of acetylcholinesterase activity and Fe²⁺-induced lipid peroxidation in rat brain in vitro by some citrus fruit juices”. *J Med Food*. 2012 May;15(5):428-34. doi: 10.1089/jmf.2011.0226. Epub 2012.
2. **Almasieh M, MacIntyre JN, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly ME, Di Polo A.** “Acetylcholinesterase inhibition promotes retinal vasoprotection and increases ocular blood flow in experimental glaucoma.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 May 3;54(5):3171-83. doi: 10.1167/iovs.12-11481 DOI: 10.1167/iovs.12-11481 2013.
3. **Alvarez A., C. Opazo, R. Alarco, J. Garrido and N. C. Inestrosa.** “Acetylcholinesterase Promotes the Aggregation of Amyloid- β -Peptide Fragments by Forming a Complex with the Growing Fibrils”. *J. Mol. Biol.* (1997) 272, 348-361. 1997 Academic Press Limited.
4. **Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA.** “Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory”. *Nutr Neurosci*. 2005 Apr;8(2):111-20. PMID: 16053243 DOI: 10.1080/10284150500078117 2005.
5. **Baig AM, Rana Z, Tariq S, Lalani S, Ahmad HR.** “Traced on the Timeline: Discovery of Acetylcholine and the Components of the Human Cholinergic System in a Primitive Unicellular Eukaryote *Acanthamoeba* spp.” *ACS Chem Neurosci*. 2018 Mar 21;9(3):494-504. doi: 10.1021/acchemneuro.7b00254. 2017.
6. **Balkis A., K. Tran, Y.Z. Lee, K. Ng.** “Screening Flavonoids for Inhibition of Acetylcholinesterase Identified Baicalein as the Most Potent Inhibitor”. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 7, No. 9; 2015. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v7n9p26> 2015.
7. **Balunkeswar N., R. H. Liu, J. Tang.** “Effect of Processing on Phenolic Antioxidants of Fruits, Vegetables, and Grains—A Review”. *Food Science and Nutrition*. 55:7, 887-919, DOI:10.1080/10408398.2011.654142 2011.
8. **Basu P. and C. Maier.** “In vitro Antioxidant Activities and Polyphenol Contents of Seven Commercially Available Fruits”. *Pharmacognosy Res*. 2016 Oct-Dec; 8(4): 258–264. doi: 10.4103/0974-8490.188875 2016.
9. **Benzie I. F. F., Sissi W.-G.** “Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects, Second Edition”, Taylor and Francis group LLC, CRC London press, 2011.)
10. **Boespflug E.L., J.C. Eliassen, J.A. Dudley, M.D. Shidler, W. Kalt, S.S. Summer, A.L. Stein, A.N. Stover, R. Krikorian.** “Enhanced neural activation with blueberry

- supplementation in mild cognitive impairment” *Nutr. Neurosci.*, 21 (2018), pp. 297-305. 2018
11. **Botchway B., M. Masania, A. Faith, I. Ishwari, F. Maronga.** “Nutrition: Review on the Possible Treatment for Alzheimer’s Disease”. *J Alzheimers Dis.* 2018;61(3):867-883. doi: 10.3233/JAD-170874. DOI: 10.3233/JAD-170874. 2018.
 12. **Brenner, G.M.; Stevens, C.W.** “Pharmacology (2nd ed.)”. Philadelphia PA: W.B. Saunders. ISBN 1-4160-2984-2.) 2006.
 13. **Burns A. and Iliffe S.** “Alzheimer’s disease” - Clinical Review. *BMJ* 2009; 338 doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.b158> *BMJ* 2009;338:b158 2009.
 14. **Burns TM, Conaway M, Sanders DB; MG Composite, MG-QOL15 Study Group.** “The MG Composite: A valid and reliable outcome measure for myasthenia gravis.” *Neurology.* 2010 May 4;74(18):1434-40. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dc1b1e. PMID: 20439845 2010.
 15. **Chuku LC, Obara L, Chinaka NC.** “Comparison of vitamin c content of lemon leaf, bark, root and fruit juice extract”. *Discovery life*, Volume 2, Number 4, October 2012.
 16. **Čolović M.B, D.Z. Krstić, T.D. Lazarević-Pašti, A.M. Bondžić, V.M. Vasić.** “Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology”. *Curr Neuropharmacol.* 2013 May; 11(3): 315–335. Published online 2013 May. doi: [10.2174/1570159X11311030006](https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006) PMID: [24179466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24179466/)
 17. **Crews W. David Jr., David W. Harrison, Melanie L. Griffin, Katherine Addison, Alyssa M. Yount, Maria A. Giovenco, Jessica Hazell.** “A Double-Blinded, Placebo-Controlled, Randomized Trial of the Neuropsychologic Efficacy of Cranberry Juice in a Sample of Cognitively Intact Older Adults: Pilot Study Findings”. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* Vol. 11, No. 2. <https://doi.org/10.1089/acm.2005.11.305> 2005.)
 18. **Damulin, IV; Stepkina, DA; Lokshina, AB.** "Neuromidin in mixed vascular and Alzheimer's dementia". *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii Imeni S.S. Korsakova.* 111 (2): 40–3. PMID 21350422 2011.
 19. **Dhillon G.K., Ahluwalia P, Kaur A.** “Effect of Oregano Herb on Dough Rheology and Bread Quality”. *Int J Food Sci Nutr Diet.* 2(4), 40-44. DOI: 10.19070/2326-3350-130008. 2013.
 20. **Díaz-Rubio L., R. Hernández-Martínez, A. Estolano-Cobián, D. Chávez-Velasco, R. Salazar-Aranda, N. Waksman de Torres, I. A. Rivero, V. Gar.** “Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies of Chalcone and Flavone Analogs as Antioxidants and

- Acetylcholinesterase Inhibitors”. *Appl. Sci.* 2019, 9(3), 410;
<https://doi.org/10.3390/app9030410> 2019.
21. **Drózdź P., V. Sirgedaitė-Šėžienė, J. Wójcik, K. Pyrzynska.** “Evaluation of Bioactive Compounds, Minerals and Antioxidant Activity of Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Fruits”. *Molecules* 23(1):53 DOI: 10.3390/molecules23010053. December 2017.
 22. **Drózdź P., V. Šėžienė, K. Pyrzynska.** “Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Extracts from Wild Blueberries and Lingonberries”. *Plant Foods Hum Nutr.* 2017; 72(4): 360–364. doi: [10.1007/s11130-017-0640-3](https://doi.org/10.1007/s11130-017-0640-3) 2017.
 23. **Edward A., Bittner J.A., Jeevendra Martyn.** “Chapter 18 - Neuromuscular Physiology and Pharmacology”. *Pharmacology and Physiology for Anesthesia.* 2013, Pages 309-324.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1679-5.00018-1> 2013.
 24. **ELLMAN G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES JR, R. M. FEATHERSTONE.** “A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY”. *Biochemical Pharmacology*, 1961, Vol. 7, pp 88-95. Pergamon Press Ltd., Great Britain. 1961.
 25. **Feng J, Chen X, Lu S, Li W, Yang D, Su W, Wang X, Shen J.** “Naringin Attenuates Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibiting Peroxynitrite-Mediated Mitophagy Activation” *Mol Neurobiol.* 2018 Dec;55(12):9029-9042. doi: 10.1007/s12035-018-1027-7. Epub 2018.
 26. **Ferlemi A.-V. and L. Fotini N.** “Berry Leaves: An Alternative Source of Bioactive Natural Products of Nutritional and Medicinal Value”. *Antioxidants* 2016, 5(2), 17;
<https://doi.org/10.3390/antiox5020017> 2016.
 27. **Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK.** “The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress”. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999 Feb;66(2):137-47. PMID: 10071091 1999.
 28. **Francis PT, Sims NR, Procter AW, Bowen DM.** “Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives”. *J Neurochem.* 1993 May;60(5):1589-604. PMID: 8473885 1993.
 29. **Ganesan, K.; Xu, B.** “A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans”. *Nutrients* 2017, 9, 455. DOI <https://doi.org/10.3390/nu9050455> 2017.
 30. **Gomperts S. N..** “Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia”. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2016 Apr; 22(2 Dementia): 435–463. doi: 10.1212/CON.0000000000000309 2016.

31. **Guo AJ, Xie HQ, Choi RC, Zheng KY, Bi CW, Xu SL, Dong TT, Tsim KW.** “Galangin, a flavonol derived from *Rhizoma Alpiniae Officinarum*, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro”. *Chem Biol Interact.* 2010 Sep 6;187(1-3):246-8. doi: 10.1016/j.cbi.2010.05.002. Epub 2010
32. **Guo H, Dong YQ, Ye BP.** “Cranberry extract supplementation exerts preventive effects through alleviating A β toxicity in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease”. *Chin J Nat Med.* 2016 Jun;14(6):427-33. doi: 10.1016/S1875-5364(16)30039-5. 2016.
33. **Gupta D, Chen PP.** “Glaucoma”. *Am Fam Physician.* 2016 Apr 15;93(8):668-74. PMID: 27175839 2016.
34. **Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MR, Agostinho P, Marisco PC, Vieira JM, Rosa MM, Bohnert C, Rubin MA, Morsch VM, Spanevello R, Mazzanti CM.** “Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats.” *Int J Dev Neurosci.* 2014 Apr;33:88-97. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.12.006. Epub 2013.
35. **Heinonen M.** “Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - A Finnish perspective”. *Molecular Nutrition & Food Research* 51(6):684-91. DOI: 10.1002/mnfr.200700006. 2007.
36. **Higdon JV, Frei B.** “Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions”. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(1):89-143. PMID: 12587987 DOI: 10.1080/10408690390826464 2003.
37. **Horszwald A, Julien H, Andlauer W.** “Characterization of *Aronia* powders obtained by different drying process”. *Food Chem.* 2013;141:2858–63. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.10. 2013.
38. **Hossain M, E Shea, M Daneshtalab, J Weber.** “Chemical Analysis of Extracts from Newfoundland Berries and Potential Neuroprotective Effects”. *Antioxidants* 2016, 5(4), 36; <https://doi.org/10.3390/antiox5040036> 2016.
39. **Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J.** “Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme”. 1996 Apr;16(4):881-91.
40. **Yang B., M. Kortensniemi.** “Clinical evidence on potential health benefits of berries”. *Food Science* Volume 2, April 2015, Pages 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.002>

41. **Jaakola L, Määttä-Riihinen K, Kärenlampi S, Hohtola A.** “Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L) leaves”. *Planta*. 2004 Mar;218(5):721-8. Epub 2003 Dec 10. DOI: 10.1007/s00425-003-1161-x 2004.
42. **Jaunalksne I., M. S. Naudiņa, T. Romanova, E. Hagina, J. Serova, L. Kovaļčuka, I. Koreļina.** “Myasthenia gravis laboratoriski diagnostiskie aspekti”. ISBN 978-9984-793-69-6 RSU ZINĀTNISKĀ KONFERENCE 2015.
43. **Jung Keun Cho, Young Bae Ryu, Marcus J Curtis-Long, Hyung Won Ryu.** “Cholinestrerase inhibitory effects of geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* fruits”. Article in *Bioorganic & medicinal chemistry* 20(8):2595-602DOI: 10.1016/j.bmc.2012.02.044 2012.
44. **Jung M., Park Moonsoo.** “Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*”. *Molecules* 2007, 12, 2130-2139 ISSN 1420-3049. 2007.
45. **Katalinić M, Rusak G, Domaćinović Barović J, Sinko G, Jelić D, Antolović R, Kovarik Z.** “Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase”. *Eur J Med Chem*. 2010 Jan;45(1):186-92. doi: 10.1016/j.ejmech.2009.09.041. Epub 2009.
46. **Kelly E., P. Vyas, J.T. Weber.** “Biochemical Properties and Neuroprotective Effects of Compounds in Various Species of Berries”. *Molecules* 2018, 23, 26; doi:10.3390/molecules23010026. 2017.
47. **Khan H.M., Amin S, Kamal MA, Patel S.** “Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects”. *Biomed Pharmacother*. 2018 May;101:860-870. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.007. Epub 2018.
48. **Khoo H.E., A. Azlan, S. Teng Tang, S. Meng Lim** “Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits” *Food Nutr Res*. 2017; 61(1): 1361779. doi: [10.1080/16546628.2017.1361779](https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779) 2017.
49. **Klavins L., J. Kviesis, I. Nakurte, M. Klavins.** “Berry press residues as a valuable source of polyphenolics: Extraction optimisation and analysis”. *LWT*. Volume 93, Pages 583-591. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.021> July 2018.
50. **Krikorian R, Shidler MD, Nash TA, Kalt W, Vinqvist-Tymchuk MR, Shukitt-Hale B, Joseph JA.** “Blueberry supplementation improves memory in older adults”. *J Agric Food Chem*. 2010 Apr 14;58(7):3996-4000. doi: 10.1021/jf9029332. 2010.
51. **Kuo I. Y. and B. E. Ehrlich.** “Signaling in Muscle Contraction”. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Feb; 7(2): a006023. doi: 10.1101/cshperspect.a006023 PMID: 25646377. 2015.

52. **Lee J. and R.E. Wrolstad.** “Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste”. Food Science Volume69, Issue7.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb13651.x> 31 May 2006.
53. **Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.** “Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health”. Pharmacogn Rev. 2010 Jul;4(8):118-26. doi: 10.4103/0973-7847.70902. 2010.
54. **Mayer-Miebach E., M. Adamiuk, D. Behsnilian.** “Stability of Chokeberry Bioactive Polyphenols during Juice Processing and Stabilization of a Polyphenol-Rich Material from the By-Product”. Agriculture 2012, 2, 244-258; doi:10.3390/agriculture2030244. 2012.
55. **Martineau LC, Couture A, Spoor D, Benhaddou-Andaloussi A, Harris C, Meddah B, Leduc C, Burt A, Vuong T, Mai Le P, Prentki M, Bennett SA, Arnason JT, Haddad PS.** “Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait.” Phytomedicine. 2006 Nov;13(9-10):612-23. DOI: 10.1016/j.phymed.2006.08.005 2006 Sep 18.
56. **Mehndiratta MM, Pandey S, Kuntzer T.** “Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis.” Cochrane Database Syst Rev. 2011 Feb 16;(2):CD006986. doi: 10.1002/14651858.CD006986.pub2. 2011.
57. **Mieriņa I., R. Seržane, M. Jure.** “Smiltsērķšķu spiedpaliekas un sēklas – potenciāli antioksidantu avoti”. RTU izdevniecība, Rīga – 2009. Konferences materiāli.
58. **Minju K., Hyunkyung Na, H. Kasai, K. Kawai, Y. Li, and M. Yang.** “Comparison of Blueberry (*Vaccinium* spp.) and Vitamin C via Antioxidative and Epigenetic Effects in Human”. J Cancer Prev. 2017 Sep; 22(3): 174–181. Published online 2017 Sep 30. doi: 10.15430/JCP.2017.22.3.174 PMID: 29018782
59. **Muceniece R., Klavins L., Kviesis J., Jekabsons K., Rembergs R., Saleniece K., Dzirkale Z., Saulite L., Riekstina U., Klavins M.** “Antioxidative, hypoglycaemic and hepatoprotective properties of five *Vaccinium* spp. berry pomace extract”. Journal of Berry Research, vol. pp. 1-16, 2018. DOI: 10.3233/JBR-180351. Published: 13 February 2019.
60. **Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG.** “Correlation of Alzheimer

- disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature”. J Neuropathol Exp Neurol. 2012 May;71(5):362-81. doi: 10.1097/NEN.0b013e31825018f7. PMID: 22487856 2012.
61. **Olas B.** “Berry Phenolic Antioxidants – Implications for Human Health?” Front Pharmacol. 2018; 9: 78. Published online 2018 Mar 26. doi: 10.3389/fphar.2018.00078. PMID: 29662448.
 62. **Panche AN, Diwan AD, Chandra SR.** “Flavonoids: an overview”. J Nutr Sci. 2016 Dec 29;5:e47. doi: 10.1017/jns.2016.41. 2016.
 63. **Papandreou M.A., A. Dimakopoulou, Z.I. Linardaki, P. Cordopatis, D. Klimis-Zacas, M. Margarity, F.N. Lamari.** “Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity”. Behavioural Brain Research, Volume 198, Issue 2, 17 March 2009, Pages 352-358, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.11.013> 2009.
 64. **Pelčere L., K. Rāviņa, A. Zieda, M.S. Naudiņa, I. Kamša, I. Jaunalksne, N. Kurjāne, I. Mansurova, V. Kēniņa.** “Timektomijas rezultāti pacientiem ar myasthenia gravis: 11 gadījumu analīze”. RSU ZINĀTNISKĀ KONFERENCE 2015.
 65. **Ramirez M.R., Ivan I., M. Carmo, B. Raseira, J. Â. Zuanazzi, D. Barros, A.T. Henriques.** “Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats”. Pharmacological Research. Volume 52, Issue 6, December 2005, Pages 457-462. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.07.003> 2005.
 66. **Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK.** “*Pharmacology (5th ed.)*”. Edinburgh: Churchill Livingstone. [ISBN 978-0-443-07145-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-443-07145-4) 2003.
 67. **Reddy V. P.** “Chapter 2 - Fluorinated Compounds in Enzyme-Catalyzed Reactions”. 2015, Pages 29-57, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53748-5.00002-2> 2015.
 68. **Remya C, Dileep KV, Tintu I, Variyar EJ, Sadasivan C.** “Flavanone glycosides as acetylcholinesterase inhibitors: computational and experimental evidence”. Indian J Pharm Sci. 2014 Nov-Dec;76(6):567-70. PMID: 25593395 2014.
 69. **Remya C., K. V. Dileep , I. Tintu , E. J. Variyar & C. Sadasivan.** “Design of potent inhibitors of acetylcholinesterase using morin as the starting compound”. J. Frontiers in Life Science. Pages 107-117. <https://doi.org/10.1080/21553769.2013.815137> 16 Aug 2013.
 70. **Ryu HW, Curtis-Long MJ, Jung S, Jeong IY, Kim DS, Kang KY, Park KH.** “Anticholinesterase potential of flavonols from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) and their kinetic studies.” Food Chem. 2012 Jun 1;132(3):1244-1250. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.093. Epub 2011.

71. **Robertson David, Phillip Low, Ronald Polinsky.** “Primer on the Autonomic Nervous System, 3rd Edition”. eBook ISBN: 9780123865267 Academic Press Published Date: 15th November 2011
72. **Rockland, K. S. Brain. In A. E. Kazdin (Ed.).** “Encyclopedia of psychology” (Vol. 1, pp. 447—455). Washington, DC: American Psychological Association. 2000.
73. **Rodriguez-Mateos A., C. Rendeiro, T. Bergillos-Meca, S. Tabatabaee, T. W George, C. Heiss, J. PE Spencer.** “Intake and time dependence of blueberry flavonoid–induced improvements in vascular function: a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study with mechanistic insights into biological activity”. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 98, Issue 5, November 2013, Pages 1179–1191, <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.066639>. 2013.
74. **Roseiro L. B., A. P Rauter, M. L. Serralheiro.** “Polyphenols as acetylcholinesterase inhibitors: Structural specificity and impact on human disease”. Researchgate DOI: 10.3233/NUA-2012-0006 2012.
75. **Sanders DB, Wolfe GI, Benatar M, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, Kuntz N, Massey JM, Melms A, Murai H, Nicolle M, Palace J, Richman DP, Verschuuren J, Narayanaswami P.** “International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary.” *Neurology*. 2016 Jul 26;87(4):419-25. doi: 10.1212/WNL.0000000000002790. 2016.
76. **Seeram N. P.** ”Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease”. Center for Human Nutrition, David Geffen School of Medicine. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (3), pp 627–629. DOI: 10.1021/jf071988k
77. **Sheng R., Lin X, Zhang J, Chol KS, Huang W, Yang B, He Q, Hu Y.** “Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potent AChE inhibitors”. *Bioorg Med Chem*. 2009 Sep 15;17(18):6692-8. doi: 10.1016/j.bmc.2009.07.072. Epub 2009.
78. **Silvestri N. J., Wolfe G. I.** “Myasthenia Gravis: Classification and Outcome Measurements”. Humana Press, Cham. DOI https://doi.org/10.1007/978-3-319-73585-6_19 2018.
79. **Sinko G, Calić M, Bosak A, Kovarik Z.** “Limitation of the Ellman method: cholinesterase activity measurement in the presence of oximes”. *Anal Biochem*. 2007 Nov 15;370(2):223-7. DOI: 10.1016/j.ab.2007.07.023 Epub 2007.
80. **Skrovankova S., D. Sumczynski , J. Mlcek, T. Jurikova, J. Sochor.** “Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries”. *Int. J. Mol. Sci*. 2015, 16(10), 24673-24706; <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>

81. **Song W., B. Feng, X. Li, J. Xia.** “Discovery of novel isoflavone derivatives as AChE/BuChE dual-targeted inhibitors: synthesis, biological evaluation and molecular modelling”. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1347163>. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry Volume 32, 201. Pages 968-977 2017.
82. **Stevens L., Rodin I.** “Benzodiazepines and drugs for dementia”. Psychiatry (Second Edition). 2011, Pages 30-31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3396-4.00019-6> 2011.
83. **Struck S., M. Plaza, C. Turner, H. Rohm.** “Berry pomace – a review of processing and chemical analysis of its polyphenols”. Food science technology. 15 April 2016. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13112>
84. **Sweeney MI, Kalt W, MacKinnon SL, Ashby J, Gottschall-Pass KT.** “Feeding rats diets enriched in lowbush blueberries for six weeks decreases ischemia-induced brain damage”. Nutr Neurosci. 2002 Dec;5(6):427-31. PMID: 12509072 DOI: 10.1080/1028415021000055970 2002.
85. **Szwajgier D.** “Anticholinesterase Activities Of Selected Polyphenols – A Short Report”. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10222-012-0089-x> 2014.
86. **Taylor P., Camp S., Radić Z.** “Acetylcholinesterase”. Encyclopedia of Neuroscience. 2009, Pages 5-7. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01132-3> 2009.
87. **Ting H., Brajesh N. Vaidya, Zachary D. Perry, Prahlad P., Nirmal Joshee.** “Paulownia as a Medicinal Tree: Traditional Uses and Current Advances”. European Journal of Medicinal Plants, ISSN: 2231-0894, Vol.: 14, DOI : 10.9734/EJMP/2016/25170 2016.
88. **Tomsone L., S. Kampuse, T. Ķince.** “Effect of Drying on the Biologically Active Compounds of Aronia” Lauksaimniecības zinātne Latvijas simtgades gaidās. LLU Pārtikas tehnoloģijas fakultāte. 2017.
89. **Tomsone L., Z. Kruma.** “INFLUENCE OF FREEZING AND DRYING ON THE PHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HORSERADISH AND LOVAGE” Latvia University of Agriculture. FOODBALT 2014 material. http://llufb.llu.lv/conference/foodbalt/2014/FoodBalt_Proceedings_2014-192-197.pdf
90. **Uriarte-Pueyo I., M. I. Calvo.** “Structure–activity relationships of acetylated flavone glycosides from Galeopsis ladanum L. (Lamiaceae)”. Food Chemistry. Volume 120, Issue 3, 1 June 2010, Pages 679-683. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.060> 2010.

91. **Vardanyan R. and Hruby V.** “Synthesis of Essential Drugs”. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. ISBN 10 0-444-52166-6. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006 49 (25), 7554-7555. DOI: 10.1021/jm0680373 2006.
92. **Walker Z., Katherine L P., Bradley F B., Dag A.** “Lewy body dementias”. *NON-ALZHEIMER'S DEMENTIA. VOLUME 386, ISSUE 10004*, P1683-1697, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00462-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00462-6) 2015.
93. **White, B. L., Howard, L. R., & Prior, R. L.** Impact of different stages of juice processing on the anthocyanin, flavonol, and procyanidin contents of cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4692-4698. <http://dx.doi.org/10.1021/jf200149a>. PMID:21438531. 2011.
94. **White, B. L., Howard, L. R., & Prior, R. L.** Proximate and polyphenolic characterization of cranberry pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4030-4036. <http://dx.doi.org/10.1021/jf902829g>. PMID:20020689. 2010.
95. **Wu-yang H., H. Zhang, W. Li, C. Li.** “Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing”. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2012 Feb; 13(2): 94–102. doi: 10.1631/jzus.B1100137 2012.
96. **Xie Y, Yang W, Chen X, Xiao J.** “Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship”. *Food Funct.* 2014 Oct;5(10):2582-9. doi: 10.1039/c4fo00287c. DOI: 10.1039/c4fo00287c 2014.
97. **Xu ML, Bi CWC, Kong AYY, Dong TTX, Wong YH, Tsim KWK.** “Flavonoids induce the expression of acetylcholinesterase in cultured osteoblasts.” *Chem Biol Interact.* 2016 Nov 25;259(Pt B):295-300. doi: 10.1016/j.cbi.2016.03.025. Epub 2016.

