

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Inhibiční aktivita rostlinných extraktů vůči
acetylcholinesteráze a butylcholinesteráze a jejich možné
využití při léčbě Alzheimerovy choroby**

Diplomová práce

Bc. Pavla Rezková

**Program kvality potravin a zpracování zemědělských
produktů**

Ing. Jan Tauchen, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Inhibiční aktivita rostlinných extraktů vůči acetylcholinesteráze a butylcholinesteráze a jejich možné využití při léčbě Alzheimerovy choroby" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala zejména vedoucímu diplomové práce Ing. Janu Tauchenovi, Ph.D. za jeho trpělivost při zpracování práce, strávený čas v laboratoři i na konzultacích, všechny cenné rady a vždy milou spolupráci. Zároveň mé díky patří i ostatním pracovníkům katedry za jejich vstřícný přístup a Bc. Marku Žinčákovi za poskytnutí rostlinného materiálu. Na závěr bych ráda poděkovala celé mé rodině za jejich nekonečnou podporu jak při studiu, tak při psaní diplomové práce.

Inhibiční aktivita rostlinných extraktů vůči acetylcholinesteráze a butylcholinesteráze a jejich možné využití při léčbě Alzheimerovy choroby

Souhrn

Celosvětový počet pacientů s neurodegenerativními poruchami stále stoupá a Alzheimerova choroba, jako jejich zástupce, každým rokem postihuje větší množství osob. Přesný původ onemocnění není stále úplně jasný, avšak výčet rizikových faktorů je poměrně dlouhý od věku a genetických předpokladů až po nedostatek spánku, chronický stres či oxidační stres neboli nadměrné množství reaktivních forem kyslíku.

Pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy choroby se běžně využívají inhibitory acetylcholinesterázy. Hydrolyzu acetylcholinu ovšem vyvolává také butyrylcholinesteráza, tudíž je vhodné testovat i blokátory tohoto enzymu. Běžná léčiva však často vyvolávají řadu silných vedlejších účinků a mohou být až naprosto nedostačující v důsledku vyššího věku pacientů. V kontextu těchto faktů se v poslední době identifikace a charakterizace přírodních neuroprotektiv těší velkému zájmu. Výzkum biologické aktivity léčivých rostlin je tedy důležitým prostředkem pro vývoj nových terapeutických cest.

V této studii bylo systematicky testováno 9 rostlinných druhů tradičně využívaných pro léčebné účely původem z oblasti Šumavy. Konkrétně se jednalo o *in vitro* inhibiční potenciál AChE a BuChE a antioxidační potenciál s využitím testů DPPH (2,2-difeny-1-pikrylhydrazyl) a ORAC (kapacita absorpce kyslíkových radikálů).

Z vybraných léčivých bylin nebyla prokázána inhibiční aktivita ani jedné cholinesterázy. Nicméně u čtyř rostlin byl zaznamenán značný antioxidační účinek u obou zmiňovaných testů. Jednalo se o Kinopád obecný (*Clinopodium vulgare* L., DPPH 205,25; ORAC 745,25 µg TE/mg extraktu), Devětsil lékařský (*Petasites hybridus* L., DPPH 178,42; ORAC 718,64 µg TE/mg ex.), Světlík lékařský (*Euphrasia officinalis* L., DPPH 248,45; ORAC 708,12 µg TE/mg ex.) a Vrbovku úzkolistou (*Epilobium angustifolium* L., DPPH 459,14; ORAC 657,68 µg TE/mg ex.). Na základě těchto výsledků by bylo možné využít jejich antioxidační potenciál ve formě doplňků stravy či bylinných preparátů. Bylo by však zapotřebí dalších výzkumů pro ověření jejich bezpečnosti a aktivity *in vivo*.

Klíčová slova: inhibice cholinesteráz, antioxidační aktivita, Alzheimerova choroba, doplňky stravy, léčivé rostliny, přírodní látky, oxidační stres

Acetylcholine- and butyrylcholine-inhibitory activities of plant extracts and their possible use in the treatment of Alzheimer's disease

Summary

Worldwide, the number of patients with neurodegenerative disorders continues to rise, and Alzheimer's disease, as their presenter, affects more people every year. The exact origins of the disease are still not entirely clear, but the list of risk factors is quite long, ranging from age and genetic predispositions to lack of sleep, chronic stress and oxidative stress, or excessive amounts of reactive oxygen species.

Acetylcholinesterase inhibitors are commonly used for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease. However, hydrolysis of acetylcholine is also induced by butyrylcholinesterase, so blockers of this enzyme may also be worth testing. However, common drugs often cause a number of strong side effects and may be totally insufficient due to the elderly age of the patients. In the context of these facts, the identification and characterization of natural neuroprotective agents has recently attracted a great deal of interest. Research on the biological activity of medicinal plants is therefore an important way to develop new therapeutic pathways.

In the present study, 9 plant species traditionally used for medicinal purposes and native to the Šumava region were systematically tested. Specifically, *in vitro* AChE and BuChE inhibitory potential and antioxidant potential using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ORAC (oxygen radical absorbance capacity) assays were investigated.

Among the selected medicinal herbs, none of the cholinesterase inhibitory activity was found. However, four plants showed significant antioxidant effect in both assays mentioned above. These were *Kinopodium vulgare* L. (DPPH 205,25; ORAC 745,25 µg TE/mg extract), *Petasites hybridus* L. (DPPH 178,42; ORAC 718,64 µg TE/mg extract), *Euphrasia officinalis* L. (DPPH 248,45; ORAC 708,12 µg TE/mg extract) and *Epilobium angustifolium* L. (DPPH 459,14; ORAC 657,68 µg TE/mg extract). Based on these results, their antioxidant potential could be exploited in the form of dietary supplements or herbal preparations. However, further research would be necessary to verify their safety and *in vivo* activity.

Keywords: cholinesterase inhibition, antioxidant activity, Alzheimer's disease, dietary supplements, medicinal plants, natural compounds, oxidative stress

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	12
3	Literární rešerše	13
3.1	Prevalence	13
3.1.1	Rizikové faktory	14
3.1.2	Rozdělení NDO.....	15
3.2	Alzheimerova choroba	15
3.2.1	Cholinergní systém	16
3.2.2	Biomarkery	18
3.2.3	Vliv oxidačního stresu na rozvoj AD	20
3.3	Léčba	22
3.3.1	Vývoj inhibitorů AChE.....	23
3.3.2	Klasifikace inhibitorů AChE	24
3.3.3	Využití přírodních zdrojů	26
3.4	Rostliny využití v této studii	29
4	Metodika	32
4.1	Rostlinný materiál	32
4.2	Příprava vzorků	33
4.3	Chemikálie a reagenty	33
4.4	Inhibice AChE a BuChE	33
4.5	Antioxidační aktivita	34
4.5.1	Inhibice DPPH radikálu	34
4.5.2	Test absorpční kapacity kyslíkových radikálů (ORAC).....	34
4.6	Statistická analýza	35
5	Výsledky	36
5.1	Inhibiční aktivita AChE a BuChE	36
5.2	Antioxidační aktivita (DPPH a ORAC)	36
6	Diskuze	38
7	Závěr	42
8	Literatura	43
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	47
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Neurologické poruchy byly během roku 2015 zodpovědné za 16,8 % celosvětových úmrtí, což z nich dělá druhou hlavní příčinu smrti na celém světě. S rostoucím průměrným věkem populace roste i zátěž neurodegenerativními onemocněními zejména za posledních 25 let a předpokládá se, že počet pacientů bude i nadále narůstat (Zeng et al., 2020). Nejčastější formou demence je Alzheimerova choroba, která celosvětově postihuje až 24 milionů lidí a tvoří 60-80 % všech případů demence. Pokud se vyskytuje před 65. rokem věku, je považována za časnou formu AD. Mezi ochranné faktory můžeme zařadit konzumaci středomořské stravy, pravidelné cvičení a vyšší kognitivní rezervu. Většina případů se projevuje typickou amnestickou formou, pouze 15 % je považován za atypické a projevují se výraznými zrakovými, motorickými nebo jinými příznaky (Erkkinen et al., 2018).

Běžným patologickým rysem je úbytek neuronů v mozku a je pravděpodobné, že náprava a prevence ztráty neuronů by mohla zlepšit příznaky. Apoptóza a nekróza mozku může být kromě jiného způsobena i vlivem reaktivních forem kyslíku, jejichž nadměrné množství má za následek oxidační stres organismu (Zeng et al., 2020). Kromě toho napomáhá oxidační stres při tvorbě β -amyloidů a špatném skládání proteinů. Oxidační stres je tedy jednou z příčin vzniku a následné sekundární patologie AD (Dubey et Singh, 2023).

Jako léčiva proti AD se v medicíně využívají především inhibitory acetylcholinesterázy (např. rivastigmin jež se získává semi-syntézou z fyzostigminu obsaženém ve *Fyzostigma venenosum*). V mozku jsou však dva typy cholinesteráz, acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE), přičemž hydrolýzu acetylcholinu účinně blokují oba (Singh et al., 2013). Tato léčba je však pouze symptomatická a účinná přibližně pouze u poloviny případů. Léky, které by AD dokázaly úplně zastavit nebo vyléčit bohužel zatím neexistuje (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Z těchto důvodů se v současné době k léčbě Alzheimerovy choroby využívá řada nových přístupů, jako je například terapie zabývající se oxidačním stresem nebo inhibicí amyloidních plaků (Singh et al., 2013).

V souladu s těmito fakty roste poptávka po neuroprotektivních lécích přírodního původu. Rostlinné produkty mohou různými mechanismy blokovat nebo zpomalovat progresi NDO a zároveň mají často nízkou toxicitu, kvůli čemuž jsou považovány za důležitý zdroj při vývoji nových léciv (Zeng et al., 2020).

Léčivé rostliny mají jedinečné složení bohaté na množství biologicky aktivních látek. Takové rostlinné druhy a v nich obsažené látky by mohly sloužit při vývoji nových terapeutik pro léčbu Alzheimerovy choroby a dalších onemocnění. Bohužel bylo zatím popsáno pouze

omezené množství léčivých rostlin, a proto zde existuje velký potenciál ve výzkumu látek s terapeutickým přínosem (Kopyt'ko et al., 2020). Právě to je jedním z cílů této práce, která zkoumá rostliny tradičně využívané k léčbě neurodegenerativních onemocnění pomocí *in vitro* metod založených na inhibici acetylcholinesterázy a stanovení antioxidační aktivity.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: systematické testování rostlinných druhů s tradičním využitím při léčbě a prevenci NDO, zejména Alzheimerovy choroby, může vést k získání extraktů se značnou inhibiční aktivitou vůči acetylcholinesteráze či butyrylcholinesteráze nebo s výrazným antioxidačním účinkem.

Cílem práce bude pomocí etnobotanické indikace vytipovat druhy rostlin, které mají využití v tradiční medicíně při léčbě a prevenci NDO, se zvláštním zájmem o AD. Pomocí *in vitro* metod (inhibice AChE a BuChE, antioxidační aktivita) potvrdit nebo vyvrátit tyto účinky a případně vytipovat druhy vhodné pro další, přesnější a hlubší testování. Zároveň s pomocí dalších zdrojů nastínit pravděpodobné fytochemické složení vybraných druhů a s tím posoudit, které sekundární metabolity by mohly být za potvrzenou aktivitu zodpovědné.

3 Literární rešerše

Neurodegenerativní onemocnění (NDO) jsou způsobena poruchami neuronálních spojení a komunikací mezi neurony, čímž je postihnuta centrální nervová soustava (CNS). Tyto poruchy způsobují velmi široké spektrum nemocí, neboť jsou součástí smyslových, motorických i kognitivních procesů. Postihují tedy zejména zrak, sluch, pohyb, jazyk, paměť a řeč. Obecně lze tyto poruchy charakterizovat postupnou degradací axonů a synapsí, které způsobují až smrt neuronů (Wareham et al., 2022).

3.1 Prevalence

Neurodegenerativní onemocnění jsou stále častější příčinou úmrtnosti na celém světě. Způsobují různé kognitivní poruchy a onemocnění u starších dospělých osob. Tyto poruchy mají různou klinickou symptomalogii, epidemiologii, neurologické a laboratorní znaky a neuropatii (Erkkinen et al., 2018). Příznaky spojené s NDO jsou do určité míry závislé na postihnuté tkáni CNS. Tato tkáň se u onemocnění jako jsou Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba či amyotrofická laterální skleróza liší. I přesto mají onemocnění určité společné mechanismy a molekulární změny, které nabízejí potenciál v možnostech výzkumu (Wareham et al., 2022).

Alzheimerova choroba (AD) představuje 60-80 % případů demence (Wareham et al., 2022). Onemocnění postihuje odhadem 24 milionů lidí na celém světě (Erkkinen et al., 2018). Tím se stává nejčastější formou NDO v západním světě a nejčastěji se vyskytuje u jedinců po 60. roce života (King et al., 2020). Prevalence onemocnění se zvyšuje s rostoucím věkem, konkrétně mezi 65. a 85. rokem života byl zaznamenán až patnáctinásobný nárůst. V konkrétních údajích se různé studie poměrně liší, nicméně jedna studie naznačuje, že u osob starších 85 let dosahuje prevalence AD až 50 %. Jiná studie však odhaduje prevalenci ve věku 90 let kolem 22 %. Zároveň se zdá že riziko vzniku AD je vyšší u žen z důvodu škodlivého genu ApoE e4, což potvrzuje i fakt, že Alzheimerovou demencí trpí více ženy (Erkkinen et al., 2018). Definitivní diagnóza ale závisí na neuropatologickém vyšetření, čímž se její diagnóza značně komplikuje (King et al., 2020).

Jako nejdůležitější mechanismy spojované s neurodegenerací je nutné zmínit neurozáněť, nerovnováhu v proteinové homeostázi a mitochondriální dysfunkci. Avšak konkrétní mechanismy stále nejsou známy, a proto ani neexistují účinné možnosti léčby (Peña-Bautista et al., 2020).

S ohledem na stárnutí světové populace se předpokládá růst počtu případů neurodegenerací a demencí. Je tedy aktuálním vědeckým cílem dosáhnout hlubšího pochopení vzniku, mechanismů a společných rysů těchto onemocnění a následným vyšetřením nových možností terapeutických cest (Wareham et al., 2022).

3.1.1 Rizikové faktory

Obecně lze říci, že mezi rizikové faktory vzniku neurodegenerací patří stárnutí, genetické předpoklady, traumatické poškození mozku, oxidační stres, zánět, expozice toxickými látkami a stres (Peña-Bautista et al., 2020).

Kromě toho byla potvrzena souvislost mezi nedostatkem hlubokého spánku a Alzheimerovou chorobou. V knize *Why We Sleep* (Walker, 2018) se této problematice autor podrobně věnuje. Bylo dokázáno, že spánkové poruchy se s AD navzájem doplňují. Plaky β -amyloidu totiž vznikají právě v té části mozku, která má zásadní roli při vzniku hlubokého NREM spánku, a naopak při nedostatku této spánkové fáze dochází k hromadění β -amyloidu v mozku. V rámci hluboké fáze se z mozku vyplavují nečistoty a toxické sloučeniny, s obsahem také β -amiloidů i tau proteinů, za pomoci mozkomíšního moku. Lze tedy konstatovat, že vážný nedostatek spánku v průběhu života zvyšuje výrazně riziko rozvoje Alzheimerovy poruchy (A. S. P. Lim et al., 2013).

Při hledání příčin NDO byly zjištěny společné rysy neurodegenerace a deprese, kdy se jako hlavní faktor projevů objevuje neurozánět. Jeho omezením prostřednictvím neuroprotektiv dochází ke snížení deprese a blokáce neurodegenerativního procesu. Nejslibněji působí neuroprotektiva přírodního původu, jako například nikotin, alkohol, resveratrol, kurkumin a ketamin. Princip jejich účinku spočívá v regulaci uvolňování cytokinů. Silnějších protektivních účinků bylo dosaženo jejich kombinací (např. kurkumin a resveratrol), kterou dojde k víceúrovňové mediaci zánětu, čímž se zvyšuje šance na ovlivnění projevů NDO a deprese (Hurley et Tizabi, 2013).

Dalším velmi důležitým rizikovým faktorem je stres, který je úzce spojován se současným životním stylem. Jeho vlivem dochází k nesespecifickým neurodegenerativním procesům v mozku, neboť byla prokázána korelace dlouhodobého stresu s visinin-like proteinem-1 v mozkomíšním moku. Spojení stresu a neurodegenerace by mohlo být charakterizováno dysfunkcí osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny, která vyvolává buněčné změny. Snížení stresových stavů již od dětství by mohlo snížit riziko demence a neurodegenerace v pozdějším věku. K tomu se využívají různé antistresové terapie, jako například cvičení jógy, meditace, hudební terapie či přírodní látky. Taková léčba u pacientů

s různými NDO však vykazovala spíše pozitivní vliv na kvalitu života, nikoliv oddálení patologických stavů. Snížení stresu by se tedy mohlo využívat spíše pro preventivní účely (Peña-Bautista et al., 2020).

3.1.2 Rozdělení NDO

Jednotlivé neurodegenerativní onemocnění se odlišují dle postihnuté tkáně CNS, s čímž jsou spojené i jejich příznaky. Lze však definovat společné rysy, jako jsou některé molekulární změny a mechanismy, díky kterým je zde potenciál výzkumu více těchto chorob dohromady (Wareham et al., 2022).

Jak bylo již výše zmíněno, celosvětově nejčastější formou neurodegenerace je Alzheimerova choroba tvořící 60–80 % všech případů demence (Erkkinen et al., 2018). Vzhledem k tomu, že se jedná o nejprevalentnější onemocnění z neurodegenerativních chorob, další literární rešerše se detailněji zabývá právě tímto onemocněním.

Mezi NDO řadíme kromě Alzheimerovy choroby také Huntingtonovu chorobu (HD), Parkinsonovu chorobu (PD), amyotrofickou laterální sklerózu (ALS) a další. Etiologie těchto i dalších demencí je však velmi komplexní. Patofyziologické změny lze pozorovat post mortem a řadíme sem hlavně ukládání nerozpustných proteinových agregací (Wareham et al., 2022).

3.2 Alzheimerova choroba

Nejčastější formou demence je tedy již zmíněna Alzheimerova choroba a postihuje spíše starší část populace (Wareham et al., 2022). Termín Alzheimerova choroba se často používá pro popis jak klinického syndromu, tak patologické nemoci. Pro klinický syndrom spojený se specifickými neuropatologickými procesy je však dle některých odborníků přesnější termín Alzheimerova demence. Obvykle se tedy používá k popisu klinického fenotypu (Erkkinen et al., 2018).

U pacientů s AD postupně dochází k progresivní ztrátě paměti a kognitivních funkcí dle lokalizace degenerace neuronů. Závažnost příznaků koreluje s patofyziologickými ději v kůře mozku. Jedná se o proteinové agregace histologicky prokázané jako fibrily a plaky β -amyloidu ($A\beta$) a neurofibrilární spleti s obsahem hyperfosforylovaného proteinu Tau (HP-Tau). Štěpením amyloidního prekursorového proteinu vznikají peptidy $A\beta$ o délce 38–43 aminokyselin. Takové monomery mají schopnost tvořit vzájemné vazby a vytvářet nerozpustné plaky či oligomery. Právě hromadění a ukládání těchto oligomerů se obecně považuje za hlavní faktor patogeneze AD. Zároveň jde o nejvíce toxický faktor pro neurony (Wareham et al., 2022).

Finální diagnóza však vyplývá až z neuropatologického vyšetření, kdy jsou neuritické plaky a neurofibrilární klubka společně s úbytkem neuronů jasnými neuropatologickými rysy. Dosud však není jasné, jaký vzájemný vztah mají proteiny amyloid beta a hyperfosforylovaný Tau. Hardy a spol. poprvé navrhli hypotézu amyloidové kaskády. Ta tvrdí, že prvotní příčinou onemocnění je β -amyloid, zatímco sekundárním jevem je akumulace HP-Tau ve neurofibrilárních spletech, neuritech a neuropilových vláknech. V posledních letech se díky většímu zájmu, častějšímu odběru vzorků post mortem nervové tkáně a rozsahu protilátek ukazuje i další patologie u pacientů s typickými znaky AD. Jedná se o infarkty, další cévní onemocnění, Lewyho tělíska a TDP-43. Přítomnost těchto jevů značně ovlivňuje studie se zájmem o prokázání hypotézy amyloidové kaskády, a také může mít vliv na vývoj dalších biomarkerů AD (King et al., 2020).

Pomocí anatomických nálezů z mozků pacientů byla objevena role cholinergního systému v AD. Jedná se o poškození cholinergních neuronů v jádrech, což vede ke ztrátě cholinergní aktivity, zejména v mozkových oblastech odpovědných za vyšší psychické funkce. Dále bylo zjištěno, že acetylcholinesteráza (AChE) je slabě homologní s peptidem β -amyloidu. To poukazuje na podíl AChE při tvorbě amyloidních fibril v neuritických placích, a tedy i na jejich toxicitě. *In vitro* bylo dokázáno, že AChE silně stimuluje tvorbu fibril peptidu β -amyloidu a urychluje jejich sestavování za vzniku komplexu amyloid-AChE. Další *in vivo* výzkumy ukazují, že komplexy $A\beta$ -AChE jsou neurotoxičtější než samotné fibrily $A\beta$. Dokonce zvířata po aplikaci tohoto komplexu vykazovala větší úbytek neuronálních buněk než v případě samotného β -amyloidu (Mushtaq et al., 2018).

3.2.1 Cholinergní systém

Mezi nejčastější neurotransmiterové změny v mozku pacientů s AD je ztráta acetylcholinesterázy a cholinergních markerů cholin acetyltransferázy (ChAT) (Talesa, 2001).

Cholinesterázy patří mezi serinové hydrolázy hydrolyzující různě účinné estery cholinu. V lidském těle se vyskytují dvě formy dle kódujícího genu, acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza (BuChE). AChE je přítomna v nervové tkáni, svalech, krevních buňkách a plazmě a její nejdůležitější funkcí je rychlá hydrolýza acetylcholinu v cholinergních synapsích (Schéma 1).

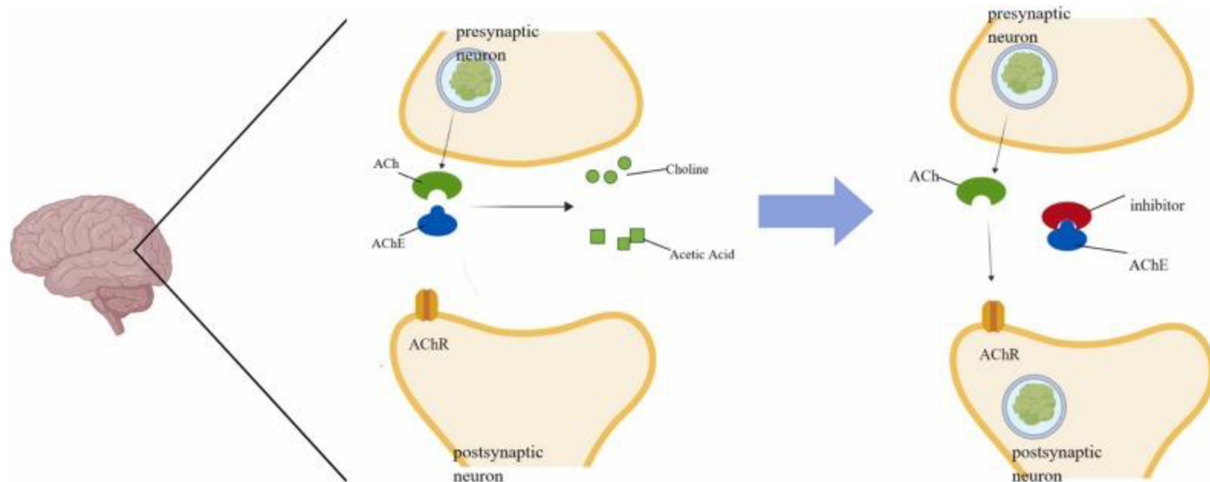


Schéma 1: Z presynaptického neuronu se ACh uvolňuje do synaptické štěrbině, kde se působením AChE rozkládá na cholin a kyselinu octovou, a tudíž nedojde k přenosu nervového vzruchu. V případě použití inhibitoru se AChE naváže na inhibitor, nerozloží ACh, která se naváže na receptor a vstupuje do postsynaptického neuronu (Peña-Bautista et al., 2020).

Její kvartérní struktura vykazuje složitý molekulární polymorfismus. U pacientů s AD tedy dochází k selektivní ztrátě jejích molekulárních forem. Ty lze rozdělit na asymetrické formy a globulární formy. Asymetrické formy AChE jsou lokalizovány převážně v nervosvalovém spojení v rámci extracelulárního matrix pomocí kolagenového konce. Globulární formy mohou být vyloučeny v rozpustné formě nebo připojeny k membráně. Některé jsou k membráně vázány hydrofobní vazbou převážně v CNS, jiné pomocí glykolipidové vazby ve svalech, nervech, erytrocytech a lymfocytech. Globulární formy se mohou vyskytovat jako monomery, dimery nebo katalytické tetramery (Talesa, 2001).

Druhý cholinesterázový enzym, butyrylcholinesteráza, je nescifického typu a hydrolyzuje různé typy cholinových esterů. Nazývá se také jako pseudocholinesteráza a vyskytuje se v celém těle. Nejvíce se lokalizuje v centrálním nervovém systému, játrech, krevním séru a slinivce břišní. V mozku je BuChE nejvíce spojována s endotelovými a gliovými buňkami. V souvislosti s AD může riziko onemocnění podporovat buď samostatně nebo v synergii BuChE-K s odpovídající alelou apolipoproteinu. Toto spojení zvyšuje riziko AD s pozdním nástupem, převážně ve věku pod 75 let. Kromě toho zvýšená hladina BuChE v mozku přispívá k patogenezi AD a pozitivně koreluje se vznikem neuritických neokortikálních plaků a neurofibrilárních klubek (Mushtaq et al., 2018).

BuChE se více hromadí s postupnou progresí AD a její hladina se zvyšuje s hustotou plaků a patogenitou. Zároveň její množství souvisí i s β -amyloidem v konformaci skládaného

listu. Plocha neuritických plaků vykazujících aktivitu BuChE byla pětikrát až šestkrát větší v případě mozku demenčních pacientů oproti jedincům nepostižených demencí. Dále se předpokládá, že se BuChE podílí na přeměně původní benigní formy β -amyloidu na konečnou maligní formu neuritických plaků, které způsobují degeneraci mozkové tkáně a klinickou demenci u AD (Mushtaq et al., 2018).

Výzkum inhibice acetylcholinesterázy se prvotně zabýval vývojem silných neurotoxinů (sarin, soman) s využitím pro válečné účely. V současnosti se jejich zaměření přetransformovalo a jedná se o výzkumy s terapeutickým zaměřením (fysostigmin). Role inhibitorů acetylcholinesterázy byla tedy nedávno přehodnocena z neurotoxinů na neuron-protektivní látky v případě onemocnění s poruchou neurotransmise acetylcholinem, mezi které patří i AD. AChE se tedy ukazuje jako nejperspektivnější terapeutický cíl pro symptomatickou léčbu AD (Singh et al., 2013). Do dnešního dne však stále neexistuje léčivo, které by kompletně vyléčilo Alzheimerovu chorobu.

Oba enzymy mají asi 65 % strukturní shodu. Za normálních okolností má v mozku BuChE pouze podpůrnou roli a zastupuje pouze asi 10 % cholinesterázové aktivity. BuChE se stejně jako AChE podílí na hydrolýze neurotransmiteru acetylcholin, a proto by mohl být také vhodným terapeutickým cílem u AD. AChE a BuChE mají různé kinetické reakce na koncentraci ACh. V případě nízké koncentrace acetylcholinu je AChE vysoce účinná oproti BuChE, zatímco při vyšší koncentraci acetylcholinu je AChE substrátově inhibována a BuChE se stává vysoce účinnou při hydrolýze (Mushtaq et al., 2018).

3.2.2 Biomarkery

Příznaky neurodegenerace se u pacientů bohužel mohou projevit až v pozdní fázi. Využití neuroprotektivní léčby na počátku onemocnění tedy vyžaduje včasné a definitivní biomarkery. To je však omezeno našimi znalostmi dějů při progresi onemocnění, pleiotropním charakterem choroby a nedostatečnou citlivostí při detekci biomarkerů. Přesto, že genetické rizikové faktory označují vysoce rizikové pacienty, nemusí se onemocnění vždy projevit. Identifikace biomarkerů v časném stadiu umožní terapeutický zásah dříve než dojde k neurodegeneraci a poškození mozku (Wareham et al., 2022).

Definice termínu biomarker Národním institutem zdraví je následující: "charakteristika, která je objektivně měřena a vyhodnocována jako indikátor normálních biologických procesů, patogenních procesů nebo farmakologické odpovědi na terapeutický zásah". Hlavními znaky kvalitního biomarkeru jsou robustnost, reprodukovatelnost a spolehlivost klinických informací o onemocnění. Tedy o prognóze vzniku, progresi nebo výsledku terapie. Zároveň by

identifikace skupin pacientů se stejnými biomarkery mohla pomoci při hledání účinnějších terapií (Wareham et al., 2022).

Hlavní neuropatologické znaky AD jsou známé již více než sto let, avšak i přes to není diagnóza onemocnění jednoduchá. V posledních letech časté odběry vzorků z mozku a zároveň zavedení imunohistochemických technik způsobili neuropatologickou diagnózu velmi náročnou. Po smrti pacienta se v mozku běžně objevuje mozková atrofie a původní diagnóza byla tedy založena na detekci neuritických plaků a neurofibrilárních klubek pomocí barvení stříbrem. Až v 90. letech minulého století byla zavedena imunohistochemie. Hlavními používanými protilátkami jsou proti β -amyloidu, které zvýrazní plaky a hyperfosforylovaný protein Tau ve formě neuritických plaků, neurofibrilárních klubek a neuropilových vláken (King et al., 2020).

Protože onemocnění prochází řadou stádií, je potřeba stanovit diagnózu formou protokolu stagnace. Jednotlivé fáze jsou označeny 0–5 a zahrnují rozsah patologie A β , Braakovo skóre a označení CERAD plaku. Kombinace těchto znaků poskytuje pravděpodobnost stupně neuropatologických změn při AD v konkrétním případě. Pro konečné určení stupně je před finální diagnózou nutné zvážit řadu dalších faktorů. Například patologie s podobnými znaky AD, jako jsou různé tauopatie, které mohou koexistovat s AD a komplikovat její diagnózu (King et al., 2020).

V poslední době také značně pokročila detekce časných fází neurodegenerativních onemocnění pomocí biomarkerů v biologických tekutinách, jako jsou sliny, krev a mozkomíšní mok. Mezi primárně detekované cíle patří biomarkery patologie A β , tau, či α -synukleinu, proteiny související s neurodegenerací a markery gliové aktivity (Wareham et al., 2022).

Dalším účinným způsobem pro včasné odhalení neurodegenerativních onemocnění může být neurologické zobrazování. Mezi současně využívané zobrazovací metody patří magnetická rezonance (MRI) a analýza pozitronové emisní topografie (PET). Kombinace těchto dvou metod umožnila další posun v pochopení změn v neuronální tkáni u neurodegenerací. Stále však nedokáží odhalit neinvazivní progresi onemocnění nebo potvrdit účinnost terapie pacientů (Wareham et al., 2022).

Rozsáhlou neurodegeneraci v mozku je možné odhalit pomocí strukturální magnetické rezonance. MRI umožňuje přesně stanovit změny v objemech šedé a bílé mozkové hmoty, což je využíváno v klinických studiích. Bohužel však MRI nedokáže detekovat specifické buněčné populace, které právě mohou být velmi náchylné k neurodegeneracím. Jako další způsob detekce biomarkerů souvisejících s NDO se využívá neurofilamentový lehký protein (NfL). Pomocí NfL lze prokázat přítomnost poškození mozku u řady NDO, lyzozomální a

autofagozomální markery jako projevy buněčné degenerace a neurogranin, který je markerem postsynaptické degenerace. Objevením neurozánětlivých markerů by mohla být umožněna včasná detekce celé řady neurodegenerativních onemocnění, které mechanismus neurozánětu spojuje. Nové markery by mohly poskytnout identifikaci pacientů s časným i pozdním stádiem onemocnění a umožnit postupy pro nové terapeutické metody (Wareham et al., 2022).

3.2.3 Vliv oxidačního stresu na rozvoj AD

Přesto, že kyslík je pro život nezbytným prvkem, jeho nadměrné množství může působit toxicky a mít vliv na molekulární poškození. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou různě chemicky aktivní molekuly radikálových a neradikálových derivátů O_2 . Pojmy kyslíkové volné radikály a ROS jsou často mylně považovány za synonyma, neboť některé ROS, jako například peroxid vodíku, nejsou volnými radikály. Volný radikál obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů a zároveň je schopen samostatné existence. Protože volné radikály obsahují orbital s nepárovým elektronem, jsou chemicky reaktivní, a tudíž mají snahu se stabilizovat tím, že si navážou elektron nebo atom vodíku ze sousední molekuly, která se touto reakcí také mění na radikál. Tím vzniká nepřetržitý řetězec reakcí. Mezi reaktivní formy kyslíku patří superoxidázový aniontový radikál, superoxid, peroxid vodíku či hydroxylový radikál. Superoxidový aniont sice není vysoce reaktivní, ale může rychle reagovat s oxidem dusnatým za vzniku vysoce toxického peroxynitritu (Fatokun et al., 2008).

Nerovnováha mezi hladinou oxidativních stresorů a antioxidantů působí stav nazývaný jako oxidační stres. Lze popsat také jako zvýšená hladina nabitých částic, volných radikálů a reaktivních forem působících buněčné poškození. Neregulovaný nárůst oxidačního stresu je rizikovým pro strukturu a funkci neuronů v mozku (Dubey et Singh, 2023).

Oxidační procesy v biologii však nemají jen negativní a škodlivé projevy, neboť se účastní řady biologicky důležitých procesů. Jedná se například o mitochondriální oxidativní fosforylaci, buněčnou signalizaci, tvorbu různých biologicky aktivních molekul a fagocytózu. Zároveň bylo prokázáno, že patofyziologické poruchy mohou být důsledkem jak nadměrné, tak nedostatečné tvorby volných radikálů. Přesto, že tvorba volných radikálů je přirozená, jejich určité kombinace mohou způsobit řadu škodlivých projevů. Proto jsou v organismu vyvinuty antiradikálové ochranné systémy neboli antioxidantní systémy (Denisov et Afanas'ev, 2005). Mezi antioxidantní enzymové systémy řadíme superoxidodismutázy, superoxidreduktázy, katalázy, peroxidoredoxiny, glutathionperoxidázy a další glutathionové enzymy (Fatokun et al., 2008). Antioxidantní systémy dále zahrnují endogenní nízkomolekulární antioxidanty (glutathion, ubiquinon, kyselina močová atd.), exogenní antioxidanty, lapače volných radikálů,

cheláty získané s potravou nebo jako léčiva či vitamíny (vitamín E a C) (Denisov et Afanas'ev, 2005).

Jako ochrana před oxidačním poškozením a odumíráním buněk existuje řada strategií. Můžeme buď omezit hladinu ROS v mozku nebo snížit míru jeho poškození. Slibnou strategií je také podávání vitamínů, antioxidačních molekul nebo doplňků, jako je třeba vitamín C, E, melatonin, kyselina močová, kreatin, ubichonin, karotenoidy, flavonoidy a řada dalších. Vitamín C je důležitý pro funkci CNS ale má i další funkce, které vedou k neuroprotekcí. Po jeho podání však může působit i prooxidačně například za přítomnosti železa nebo mědi (Fatokun et al., 2008).

Bylo zjištěno, že oxidační stres přispívá k tvorbě β -amyloidů a hladinu oxidačního stresu lze snížit pomocí antioxidantů, které chrání buňky před neurotoxicitou v důsledku $A\beta$ nebo inhibují tvorbu jeho fragmentů. Zároveň v průběhu stárnutí dochází k postupné oxidaci bílkovin. Jednou z příčin patogeneze a následné sekundární patologie Alzheimerovy choroby je tedy i oxidační stres. Kromě toho způsobují toxické ROS v neuronech také špatné skládání proteinů. S patogenezí AD je spojeno několik druhů oxidačního stresu. Patří mezi ně například oxidační stres zprostředkovaný mitochondriemi, zprostředkovaný NMDA receptory, kinázami nebo tau-fosforylací (Zeng et al., 2020).

Dále byla v mozku pacientů s AD zaznamenána zvýšená hladina oxidovaných bází DNA (tj. 8-oxo-2-dehydroguaninu, 8-hydroxyadeninu, 5-hydroxyuracilu) v důsledku oxidace jaderné a mitochondriální DNA. Dokonce byly zvýšené hladiny 8-hydroxyguaninu zjištěny u pacientů s předklinickým stadiem AD. Oxidace DNA může mít za následek kromě oxidace bází i fragmentaci řetězce DNA, což by mohlo přispět ke vzniku neurofibrilárních spleť a tím podpořit rozvoj neurodegenerace. Pokud se na amyloid- β navážou redoxně aktivní kovové ionty, tak mohou produkovat ROS, zejména hydroxylový radikál, a tím přispět k oxidačnímu poškození jak samotného β amyloidu, tak okolních molekul, např. proteinů nebo lipidů (Cheignon et al., 2018).

Z toho důvodu se u pacientů s Alzheimerovou demencí používají antioxidanty jako součást terapie, za účelem omezení produkovaných ROS a kontroly oxidačního stresu (Dubey et Singh, 2023). Kromě toho nadměrné množství ROS ničí oxidací lipidů, proteinů a nukleových kyselin buněčné struktury a funkce až k vyvolání apoptózy nebo nekrózy. Peroxid vodíku, jakožto zdroj ROS může vyvolat právě apoptózu neuronů (Zeng et al., 2020).

3.3 Léčba

Za nejperspektivnější terapeutický cíl pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy choroby je aktuálně považována acetylcholinesteráza (Singh et al., 2013). Zároveň léčba pomocí inhibitorů cholinesteráz je dosud nejspolehlivější terapeutickou strategií. Již bylo dokázáno, že enzymy acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza nejen ovlivňují hladinu acetylcholinu, ale také jsou klíčové v časných stádiích tvorby plaku při agregaci β -amyloidu. Obtížnost léčby AD souvisí i s diagnostickými metodami a studiem patologických znaků. Některé výzkumy se zabývají i heterocyklickými molekulami, neboť jsou slibnými kandidáty při vzniku nových selektivních léčiv (Martorana et al., 2016).

Tato léčiva však poskytují pouze symptomatickou léčbu a pouze u přibližně 50 % pacientů oddalují pokles kognitivních funkcí. U těžkých nebo pokročilých případech AD je však jejich účinek velmi malý. Jejich omezená terapeutická účinnost a dlouhodobá snášenlivost je dána špatnou biologickou dostupností, hepatotoxicitou a neselektivitou. V současnosti bohužel neexistují schválené léky, které by progres AD dokázaly zastavit nebo úplně onemocnění vyléčit (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Většina výzkumů se však po schválení FDA inhibitoru acetylcholinesterázy, takrinu, jako léku na Alzheimerovu chorobu, věnuje právě této oblasti terapie (Singh et al., 2013). Dnes využívané léky donepezil, galanthamin, rivastigmin a huperzin A jsou reverzibilní nebo kompetitivní inhibitory AChE. Žádný z léků však neprokázal snášenlivost u širokého spektra pacientů (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Kromě inhibitorů AChE se k léčbě Alzheimerovy choroby používají i další terapie (Singh et al., 2013). Například FDA schválený lék memantin funguje na principu nekompetitivního antagonisty *N*-methyl-D-asparátových receptorů (NMDA). Principem je přeměna odpovědi mozku na glutamát, který se podílí na všech mozkových funkcích, včetně učení a paměti. Nadměrná stimulace NMDA receptorů totiž způsobuje vstup většího množství vápenatých iontů v buňce, což zapříčiní poškození až smrt neuronů. Nicméně memantin má na AD pouze mírný účinek (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Další terapie mohou být založené na Tau proteinu, zabývat se oxidativním stresem, cílit na transport Ca^{2+} v buňkách, zaměřené na amyloid (inhibitory β -sekretázy, modulátory γ -sekretázy) nebo protizánětlivé terapie. Terapie inhibicí β -sekretázy funguje na principu snížení hladiny β -amyloidu a blokády všech následujících kroků patogeneze AD. Oproti tomu modulátory γ -sekretázy snižují produkci pouze $\text{A}\beta_{42}$ bez vlivu na celkovou hladinu β -amyloidu (Singh et al., 2013). Přesto, že se tento typ terapie jeví poměrně slibně, byl zatím na trh uveden

pouze jeden lék na principu snížení množství β -amyloidu, Aduhelm. Schválení FDA získal v roce 2021 a stal se velmi kontroverzním tématem ve farmacii obecně (Maulden, 2022).

3.3.1 Vývoj inhibitorů AChE

První inhibitor acetylcholinesterázy byl nalezen bez znalosti mechanismu jeho účinku při léčbě glaukomu již v 19. století. Jednalo se konkrétně o látku fysostigmin. Inhibitory AChE byly později používány jako pesticidy a výzkumy se tak věnovaly jejich selektivnímu pesticidnímu působení. Selektivita těchto látek byla se začátkem války využita pro vývoj sarinu jako prvního nervového plynu. Výzkumy se tedy zabývaly jejich dalším hledáním včetně účinných protilátek. Z toho důvodu byly objeveny inhibitory AChE, převážně fosfáty, využívané jako nervové plyny a jako antidota oximy (Singh et al., 2013).

Působení nervových plynů lze popsat jako interakci s acetylcholinesterázou pomocí fosforylace. To způsobí CNS, respirační selhání a záchvaty. Příkladem takových plynů jsou tabun, sarin, soman, cyklosarin a VX. Mezi další projevy patří například kašel, dušnost, pocení, slinění, zvracení, hyperglykémie, metabolická acidóza, ketóza, hypotenze, bolesti hlavy, závratě, poruchy paměti, úzkosti, letargie, emoční nestabilita, dechová deprese a silné svalové kontrakce následované paralýzou. Mechanismus účinku byl objeven za druhé světové války německými, anglickými a americkými vědci, ale publikace dosáhl až po válce. Principem těchto látek je tvorba reverzibilního komplexu s AChE. K jeho reaktivaci dojde pomocí antidotů, mezi něž řadíme i atropin, skopolamin a antikonvulzivní léky. Jako chemické reaktivátory inhibované acetylcholinesterázy působí oximy a musí být podány vždy po expozici nervovým plynem. Oximy reaktivují vazbu odstraněním organofosfátu z komplexu s AChE. Jako první vysoce toxický organofosfát byl v Německu vyvinut tabun za účelem výzkumu syntetických insekticidů. Další, již jako nervově paralytický, byl objeven soman. Poprvé byly nervové plyny použity v druhé světové válce. Nejsmrtelnější z nich je sloučenina VX (jedovaté sloučenina X) (Singh et al., 2013).

Za počátky farmakoterapie Alzheimerovy choroby je obvykle považováno objevení prvního cholinesterázového inhibitoru. Nejčastěji jsou používány cholinergní léky donepezil, galanthamin a rivastigmin. Všechny zmíněné léky jsou vhodné pro mírnou až středně těžkou formu AD. Přesto, že tyto léky mají mírně odlišné farmakologické vlastnosti, tak všechny působí na principu inhibitoru AChE. Posilují cholinergní neurotransmisi tím, že zpomalují odbourávání acetylcholinu uvolňovaného do synaptických štěrbin. Jejich maximální účinky se mohou projevit jako modifikace symptomů onemocnění. I přes mírné rozdíly ve způsobu účinku u zmíněných léků neexistují důkazy o rozdílech v jejich účinnosti. Ovšem jedna studie

poukazuje na menší množství nežádoucích účinků při léčbě donepezilem v porovnání s rivastigminem. Při studiích byla totiž léčba spojena s řadou velmi nepříjemných vedlejších účinků, které často způsobují opuštění od léčby pacienta. Jedná se například o nevolnost, zvracení, průjem, bolest hlavy a břicha a anorexii. U léků však byla prokázána účinnost na zlepšení v oblasti kognitivních funkcí, aktivit denního života, chování a celkového klinického stavu (Birks et al., 2006).

Léčiva AD lze obecně klasifikovat na základě jejich chemické struktury. Jedná se o různé přírodní, polosyntetické a syntetické deriváty (Singh et al., 2013).

3.3.2 Klasifikace inhibitorů AChE

První skupinou jsou deriváty tetrahydroakridinu. Takrin byl v roce 1993 prvním schváleným lékem pro léčbu Alzheimerovy choroby. Projevuje silnou inhibici AChE i BuChE. Jeho struktura byla modifikována na základě 4-aminopyridylové substituce na tetrahydroakridinový systém. Tato struktura se ukázala být podstatnou pro jeho silnou aktivitu (Singh et al., 2013). Takrin se však již nedoporučuje užívat z důvodu jeho hepatotoxicity (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Další skupinou jsou *N*-benzylpiperidinové deriváty. Patří mezi ně lék donepezil, který byl schválen pro léčbu mírné až středně těžké formy onemocnění v roce 1996. Byl vytvořen jako bivalentní inhibitor AChE. Základní struktura donepezilu byla modifikována dle vlivu na jeho inhibiční potenciál (Singh et al., 2013). V současnosti se jedná o nejrozšířenější lék proti Alzheimerově chorobě. Specifičnost benzylpiperidinů vůči AChE je dána rozdílem mezi periferními aniontovými místy AChE a BuChE. Vazba na molekuly cholinesterázových sloučenin je důsledkem objemnosti substituentsů na benzylovém nebo piperidylovém kruhu, délkou řetězce oddělující heterocyklický kruh a zásaditou povahou dusíku. Dusík v piperidinovém kruhu zvyšuje aktivitu a tím má ve sloučenině také důležitou roli. Přesná vazebná místa enzymu však nebyla doposud identifikována (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Deriváty benzofenonu jsou skupinou sloučenin s aromatickým jádrem spojeným s aminomolekulou. Konkrétně se jedná o benzofenonové jádro a *N,N*-benzylmethylamin. Sloučeniny na 25 a 26 místě mají optimální inhibiční potenciál AChE (Singh et al., 2013).

Skupina di-benzofuranových analogů je zastoupena lékem rivastigminem (Singh et al., 2013). Jedná se o karbamátový inhibitor AChE, který tvoří kovalentní vazby s enzymem. Vazba je tvořena karbonylovým uhlíkem z karbamátové části sloučeniny, zatímco arylová skupina interaguje s další částí enzymu. Protože je karbonylová skupina je nakonec hydrolyzována, označuje se rivastigmin jako pseudoirreverzibilní inhibitor (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Jedná se o malou molekulu, která snadno putuje krevním řečištěm do mozku, kde působí na AChE a BuChE. V roce 2000 byl schválen pro léčbu mírné až středně těžké Alzheimerovy choroby. V roce 2007 byl změněn způsob jeho podání na dermální náplast. To vedlo ke snížení nepříznivých vedlejších účinků na trávicí trakt ve srovnání s původními perorálními kapslemi a testovány byly různě modifikované struktury. Nejvyšší aktivitu vykazoval derivát 5-thia-1-azacyklopenta[a]naftalenu. Zatímco záměna methylového řetězce za ethylový vedla ke snížení inhibiční aktivity AChE až 23násobně a záměna za 1-fenylethylový substituent snížila dokonce inhibici AChE i BuChE (Singh et al., 2013).

Poslední skupinou jsou analogy galanthaminu. Tento lék byl schválen v roce 2001 pro léčbu mírné až středně těžké AD. Galanthamin je alkaloid izolovaný ze sněženky kavkazské (*Galanthus woronowii*) a z cibulek čeledi *Amaryllidaceae*. Je to selektivní, reverzibilní, centrální a kompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy a zároveň je modulátorem neuronálního nikotinového receptoru pro acetylcholin (Singh et al., 2013). Aktivací nikotinových ACh receptorů působí neuroprotektivně proti glutamátové toxicitě. Díky stimulaci tohoto nikotinového receptoru jsou méně náchylní k Parkinsonově chorobě kuřáci. Společným působením galanthaminu a memantinu vzniká synergický neuroprotektivní účinek. Je dokázáno, že na neuroprotektivním účinku galanthaminu proti neurotoxicitě způsobené NMDA se podílejí především nikotinové receptory. Kromě toho kombinace galanthaminu a memantinu může vést až k plné neuroprotekcii. Tento výzkum poskytuje strategii při vývoji nových léků, tzv. víceúčelových ligandů (MTDL) s maximálním účinkem. Dle této strategie byly navrženy hybridní sloučeniny se základem v duálním vazebném přístupu spojením dvou molekul léčiv (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Tím, jak populace stárne a výskyt Alzheimerova onemocnění roste bude účinná strategie léčby a prevence neuronodegenerativních onemocnění stále aktuálnějším tématem této společnosti. K dosažení těchto cílů bude nutné lépe pochopit společné patologické mechanismy napříč celým spektrem NDO. Většina aktuálních studií se tedy nezaměřuje pouze na propojení jednoho onemocnění s patologickými mechanismy, které by mohlo vést k izolovanému pohledu na problematiku a nedostatečným výsledkům nevyužitelných pro širší spektrum chorob. Společné mechanismy těchto onemocnění vedou od agregace přes mitochondriální dysfunkci a změny metabolismu až po poruchy neuronálně-vaskulární signalizace. Bude nutné se zabývat správným chápáním základních molekulárních dějů ke kterým v mozku dochází, ale také jejich načasováním. K objevení nových léčebných postupů a klinických strategií by bylo tedy dobré najít společné rysy jednotlivých onemocnění, které poskytují nové příležitosti pro výzkum (Wareham et al., 2022).

Dalším směrem ve vývoji nových léčiv AD je již zmíněná strategie víceúčelových ligandů (MTDL). Takové sloučeniny mají potenciál komplexněji zasáhnout dysfunkční cíle, které mají podíl na patogenezi AD. Jsou navrženy ze známých biologicky aktivních molekul s různými účely a místy působení. Zároveň tento přístup umožňuje současné podání léčiv s odlišnou biologickou dostupností, metabolismem a farmakokinetickými profily (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

3.3.3 Využití přírodních zdrojů

V posledních letech se velmi populární v léčbě chronických onemocnění stala alternativní a doplňková medicína. Přírodní produkty jsou využívány jako doplňky stravy či léky a zahrnují různé bylinné preparáty, fytoprodukty, minerály, vitaminy a probiotika. Jejich systematický výzkum byl zaveden až od 19. století a až v posledních desetiletích se podařilo experimentálními a klinickými studiemi prokázat jejich terapeutické hodnoty. Na rozdíl od syntetických léčiv se jedná o směs fytochemických sloučenin přítomných v rostlinných extraktech. Syntetické molekuly mají často omezený počet mateřských molekul a nižší sterickou složitost než přírodní metabolity, jejichž farmakokinetické vlastnosti a chemickou strukturu je možné ještě dále zdokonalit. Ve fytomedicínských výzkumech je největší pozornost věnována terapeutické roli přírodních antioxidantů, jako jsou alkaloidy, flavonoidy, triterpeny, saponiny a polyfenoly (Parvez, 2017).

Účinek antioxidantů je založen na tlumení poškození buněk, které je způsobeno hromaděním oxidačních sloučenin, především volnými radikály, jako jsou reaktivní oxidační formy (ROS). Právě jejich produkce a oxidační stres mají svou roli při poškození neuronálních buněk a jejich následné smrti, včetně patogeneze AD. Široké spektrum fytoproduktů působí v organismu několika mechanismy, například antiapoptické dráhy pomocí regulace α -synukleinu, dopaminu, prozánětlivých cytokinů a modifikace jaderné a buněčné zánětlivé signalizace, zlepšení neurotrofických faktorů a celkového antioxidantního stavu (Parvez, 2017).

Mezi přírodní sloučeniny, které vykazují inhibici acetylcholinesterázy patří například alkaloid fyzostigmin. Získává se izolací z rostliny *Physostigma venenosum* f. *Fabaceae*, konkrétně z jejích semen a je schopný průniku do CNS, kde vykazuje inhibiční aktivitu AChE. Zároveň se jedná o první inhibitor AChE, který byl zkoumán pro léčbu AD. Proto byl fyzostigmin vhodnou variantou pro výzkum derivátů. Díky tomu byly objeveny jeho analogy jako fenserin a geneserin. Fenserin má dokonce dva typy účinku. Snižuje množství proteinu pro prekurzor β -amyloidu a zároveň vykazuje reverzibilní inhibici AChE. Díky tomu dosáhl až III fáze v klinických studiích. Dalším analogem fyzostigminu je tolserin. Byl prokázán jeho vysoce

inhibiční účinek lidské AChE oproti jeho strukturním analogům. Zároveň je 200krát selektivnější vůči AChE oproti BuChE (Singh et al., 2013). Fyzostigmin jako takový má bohužel krátký poločas a úzký terapeutický index, což velmi omezuje jeho terapeutické využití. Místo toho se však často využívá jako referenční sloučenina v enzymatických testech. K léčbě AD se využívá jeho karbamátový analog, dříve zmíněný rivastigmin (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Další skupinou alkaloidů s inhibičním účinkem AChE jsou piperidinové alkaloidy. Patří mezi ně spektalin, který byl získán z květů rostliny *Senna spectabilis* sin. *Cassia spectabilis* f. *Fabaceae*. Ve struktuře těchto alkaloidů se podařilo rozpoznat acetylcholinový fragment, což podnítilo syntézu nových polysyntetických piperidinových alkaloidů a očekávání jejich inhibiční aktivity AChE. Tyto sloučeniny prokázaly selektivitu vůči AChE v mozku a slabou inhibici BuChE v tkáni potkanů (Singh et al., 2013).

Těmto sloučeninám příbuzný alkaloid piperin byl prokázán jako modulátor osy hypotalamu hypofýza-nadledviny pomocí inhibice enzymů monoaminoxidázy. Tím zvyšuje hladinu serotoninu a noradrenalinu v mozku. Berberin, patří do skupiny protoberberinů benzylochinolinových alkaloidů (Parvez, 2017). Jeho deriváty byly hodnoceny jako silné inhibitory acetylcholinesterázy. Ukázalo se, že jejich inhibiční účinnost úzce souvisí s délkou alkylenového řetězce. Nejlepšími inhibitory mezi těmito deriváty jsou sloučeniny se čtyřmi methylenovými skupinami mezi berberinovým a aromatickým kruhem (Singh et al., 2013). Berberin samotný má v několika studiích prokázány serotonergní, noradrenergní a dopaminergní účinek (Parvez, 2017).

K této skupině alkaloidů patří také deriváty huperzinu. Huperzin A a B se izolují z čínské byliny *Huperzia serrata* sin. *Lycopodium serratum* f. *Huperziaceae*. Využívá se v tradiční čínské medicíně a vyvolává značné zlepšení paměti u starších pacientů s Alzheimerovou chorobou. Oba alkaloidy jsou silnými reverzibilními inhibitory AChE, nicméně huperzin A je účinnější než huperzin B, který ale vykazoval vyšší terapeutický index. V rámci výzkumu byly syntetizovány hybridy takrinu a huperzinu A. V Číně je huperzin A schválen jako lék pro léčbu AD (Singh et al., 2013).

Další skupinou látek s inhibičním potenciálem vůči AChE jsou karbazolové alkaloidy. Mahanimbin se izoluje z listů rostliny *Murraya koenigii* f. *Rutaceae* a důvodem jeho aktivity je právě karbazolové jádro. Inhibiční aktivita vůči AChE karbazolových alkaloidů se uvádí Ellmanovou metodou, která je pro tyto účely nejpoužívanější. Dále byly identifikovány inhibiční vlastnosti při tvorbě β -amyloidních fibril u různých struktur karvediolu. Tento potenciál byl poté potvrzen i u dalších derivátů karbazolu, jako jsou 9-acetylkarbazol a

hydroxykarbazol. Vznikl tak cíl syntézy derivátu, který by byl zaměřen na inhibici AChE a agregace β -amyloidů zároveň. Sloučenina karbakrin je spojením karbazolové části karvediolu a derivátu takrinu. Karbakrin tedy je schopen inhibice AChE, blokovat agregaci β -amyloidů, antagonizovat NMDAR a zároveň snižovat oxidační stres (Singh et al., 2013).

Terpenoidy jsou velmi rozmanitou přirozeně se vyskytující skupinou organických sloučenin, které se již tradičně využívají k léčebným účelům. Ve vyšších rostlinách jsou všudypřítomné a již je známo více než 20 000 terpenoidů (Dai et al., 2022). Nové meroterpenoidní inhibitory AChE byly izolovány z mikrobiálních metabolitů *Aspergillus terreus* f. Trichocomaceae. Tyto inhibitory obsahují heterocyklus, který interaguje s katalytickým místem a substituenty na atomu dusíku, který se váže na periferní místo enzymu (Singh et al., 2013). Byly pojmenovány jako terreusterpeny A-D, přičemž terreusterpeny D vykazují velmi dobrou inhibiční aktivitu na AChE a tudíž mají potenciál ve vývoji vícecílových inhibitorů proti AD. *Aspergillus terreus* je z rodu *Aspergillus*, který patří mezi běžné půdní houby. Nevyužívá se však k fermentaci potravin, jako jiné houby z tohoto rodu. Její účel je v biochemickém průmyslu a medicíně jako průmyslová bakterie pro výrobu kyseliny a léčiv (Dai et al., 2022).

Další skupinou projevující inhibiční účinky vůči AChE jsou přírodní steroidy. Izolací ze *Sarcococca saligna* f. *Buxaceae* byly získány sloučeniny pregnanového typu se steroidním skeletem. U těchto látek byla prokázána inhibice AChE i BuChE v mikromolárním rozsahu. Důležitou roli v inhibici hrají aminodusíkaté atomy v polohách C-3 a/nebo C-20 ve struktuře zkoumaných steroidů (Singh et al., 2013).

Poslední zde zmíněnou skupinou látek jsou saponiny. Řadí se mezi glykosidy s komplexní strukturou. Mezi nejznámější saponiny patří ginsenosidy, izolované z ženšenu (*Panax sp.* f. *Araliaceae*), který se pěstuje převážně v severovýchodní Číně. Ve východní medicíně se využívá již tisíce let, mimo jiné i jako ochrana poškození mozku, pro zvýšení odolnosti a imunity a zlepšení paměti (Dai et al., 2022). Ginsenosidy vykazují velmi slibné neuroprotektivní účinky a dělí se na dvě kategorie, protopanaxadioly a protopanaxatrioly. Jejich neuroprotektivita se projevuje regulací synaptické plasticity, neurozánětlivých porcesů, uvolňováním neurotransmiterů, účinky proti neurozáněti a mozkovému oxidačnímu stresu (Parvez, 2017). Konkrétně u ginsenosidů Re a Rc byl experimentálně prokázán inhibiční účinek na AChE, což poukazuje na nové možnosti zaměření výzkumu v léčbě AD (Dai et al., 2022).

Využití alternativní a doplňkové medicíny je v poslední době populární právě u chronických onemocnění. Nicméně v případě léčby například geriatrických pacientů, refrakterních na konvenční léčbu nebo u jedinců s anesteziologickým rizikem je taková léčba

užitečná nejvíce. Zároveň jsou v takových případech důležité přírodní antioxidační sloučeniny, látky s vlivem na nervový systém a s protizánětlivými účinky (Parvez, 2017).

3.4 Rostliny využití v této studii

Černýš lesní (*Melampyrum sylvaticum* L.) z čeledi krtičníkovitých (*Scrophulariaceae*) je hemiparazitem a slouží jako teliální hostitel rzi vejmutovkové (Kaitera et Witzell, 2016). V tradiční medicíně se druhy rodu *Melampyrum* široce uplatňovaly jako sedativní, kardiovaskulární, protizánětlivé a antikonvulzivní látky. V rostlinách tohoto rodu byly identifikovány flavonoidy, fenyلكarboxylové kyseliny, alkaloidy, iridoidy, triterpenoidy a steroly. V důsledku toho mají rostliny tohoto rodu prokázán sedativní účinek na neurotransmisi, vlastnosti odstraňující volné radikály a antioxidační a protizánětlivý efekt (Háznagy-Radnai et al., 2018). Konkrétně u druhu černýše lesního byl v listech prokázán výskyt fenolických kyselin a flavonoidů, konkrétně kaempferol, luteoliny a chrysoerioly. Tyto sloučeniny mohou mít antagonistické účinky na patogeny a fungují také jako specifické signály a chemoatraktanty pro symbiotické houby (Kaitera et Witzell, 2016). V jiné studii potvrdili obsah iridoidů aukubinu a melampyrosidu (Ahn et Pachaly, 1974). Aukubin má rozsáhlé biologické účinky. Antioxidační, protizánětlivé, hepatoprotektivní, neuroprotektivní, osteoprotektivní a další. Zároveň bylo zjištěno, že zvyšuje životaschopnost buněk a antioxidační aktivitu enzymů, snižuje nekrózu a celkové poškození buněk. Výzkum také prokázal, že snižuje apoptózu neuronů v oblasti hypokampu (Zeng et al., 2020).

Do čeledi hluchavkovitých rostlin (*Lamiaceae*) patří rostlina Kinopád obecný (*Clinopodium vulgare* L.) nazývaný také divokou bazalkou. Rostlina kvete od června do října a obvykle se vyskytuje na okrajích lesů a vřesovišt'. V tradiční medicíně z oblasti Balkánu se tato bylina využívala při léčbě trávicí soustavy, zejména ve formě nálevů. Květy a listy rostliny měly své využití jako imunostimulanty, kardiotonikum a při léčbě kožních onemocnění. Již dříve analyzované rostliny byly bohaté na polyfenolové sloučeniny, které často vykazují potenciál v ochraně biologických molekul před oxidací či v inhibici enzymů cholinesterázy. Tyto výsledky poukazují na potenciál v léčbě onemocnění souvisejících s oxidačním stresem. Mezi identifikovanými sloučeninami v extraktech byly nejdominantnější kyseliny rosmarinová a elagová a zároveň byla prokázána dobrá antioxidační aktivita a potenciál v ochraně lipidů před oxidací (Bektašević et al., 2022).

Velmi rozšířený plevel Viola rolní (*Viola arvensis* Murray) z čeledi *Violaceae* se běžně vyskytuje například na polích. Květy mají krémovou barvu se žlutou skvrnou uprostřed spodního lístku a horní okvětní lístky mohou mít fialové zakončení (Cheptou et al., 2022). Rod

violek obsahuje kolem 500 druhů a je rozšířen po celém světě. V tradiční medicíně se nadzemní části využívají k léčbě různých kožních onemocnění, bronchitidy či revmatismu. Mají protizánětlivé, diuretické a expektorační vlastnosti způsobené přítomností řady účinných látek. Jedná se o saponiny, flavonoidy, slizy, salicylové deriváty, karotenoidy a cyklotidy. Tyto bioaktivní polypeptidy mají protinádorové, uterotonické a anti-HIV vlastnosti (Toiu et al., 2010). Ve violce rolní bylo konkrétně identifikováno množství alifatických látek, deriváty kyseliny šikimové, monoterpeny a seskviterpeny (Toiu et al., 2009).

Dalším rostlinným druhem s obsahem iridoidů je Zběhovec plazivý (*Ajuga reptans* L.) z čeledi hluchavkovitých. Bylina má modrofialové květy v důsledku antokyanových pigmentů. V tradiční medicíně se používal ve středomoří při kardiovaskulárních problémech a na kožní onemocnění. V Rakousku se využíval k léčbě potíží dýchacích cest ve formě čaje. Studie prokázaly, že přítomnost polyfenolů zajišťuje protizánětlivé účinky a iridoidy jsou zodpovědné za protiprůjmové, antiulcerogenní, hepatoprotektivní vlastnosti a hojení ran. Obecně rod *Ajuga* má dlouhou historii v tradiční medicíně jako přípravek na hojení ran, diuretikum, diaforetikum či antipyretikum. *In vitro* se uvádí také antimikrobiální, antioxidační, protizánětlivá, acetylcholinesterázová a butyrylcholinesterázová inhibiční aktivita (Göger et al., 2021).

Devětsil lékařský (*Petasites hybridus* L.), vytrvalá bylina z čeledi *Asteraceae* dorůstá až do výšky 3 metrů. Běžně roste u břehů řek, vlhkých loukách a dalších stinných a humidních místech. Bylinné přípravky z devětsilu se hojně využívaly v tradiční medicíně k léčbě kašle, bronchitidy, astmatu, migrény, vředů, nechutenství, zánětů trávicího a močového ústrojí a dalších. V současné době získává na popularitě pro své léčivé účinky jako doplněk stravy v podobě kapslí, extraktů, tinktur či softgelů. Obsahuje množství aktivních látek s terapeutickým potenciálem, ale zároveň i toxické pyrrolizidinové alkaloidy. Studie zaměřená na esenciální olej potvrdila jejich nepřítomnost, což naznačuje vhodné praktické využití oleje. Zároveň vykazoval protizánětlivou aktivitu, potenciál repelentu proti hmyzu a také v léčbě neurodegenerativních chorob, z důvodu reaktivity při inhibici acetylcholinesterázy (Mihajilov-Krstev et al., 2020).

Další rostlinou hojně využívanou v tradiční medicíně je Vrbovka úzkolistá (*Epilobium angustifolium* L.). Tato léčivka z čeledi pupalkovitých se mimo jiné hojně využívá v kosmetickém a potravinářském průmyslu. Připisují se jí vlastnosti jako například antioxidační, imunomodulační, analgetické, antimikrobiální, protizánětlivé, antiandrogenní a antiproliferační účinky. Tradičně se tedy využívá k léčbě močových cest, při apoptóze buněk rakoviny prostaty, průjmu, onemocnění gastrointestinálního traktu, onemocnění a podráždění kůže a sliznic, zánětů a epilepsie. Mezi bioaktivní látky, které Vrbovka úzkolistá bohatě

obsahuje patří hydrolyzované třísloviny, polyfenoly, flavonoidy, steroidy, mastné kyseliny a triterpeny. Konkrétně jde o myricetin, kvercetin, kaempferol, kyselinu ellagovou, kyselinu valonovou, kyselinu protokatechovou, dilakton, kyselinu chlorogenovou, kyselinu gallovou, kyselinu ferulovou, kyselinu skořicovou a kyselinu kávovou. V největším množství jsou zastoupeny ellagitanniny (Kavaz Yüksel et al., 2021).

Světlík lékařský (*Euphrasia officinalis* L.) je jednoletou, poloparazitickou bylinou taktéž hojně využívanou v lidovém léčitelství. Tradičně se využívá hlavně k léčbě očních onemocnění, jako jsou konjunktivitida, hordeolum, oční alergie a další. Kromě toho bylina vykazuje celou řadu biologických aktivit. Byly prokázány protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální, antivirové, hepatoprotektivní, antiepileptické a také regenerační účinky. Aktivita extraktů této byliny je založena na akumulaci silně účinných sloučenin, mezi které patří již výše zmiňované iridoidy, flavonoidy, fenolové kyseliny či éterické oleje (Paduch et al., 2014).

Již dlouho se ve formě nálevů, odvarů a lihových výluhů používá v tradiční medicíně Chrastavec rolní (*Knautia arvensis*, subsp. *Arvensis*) z čeledi štetkovitých (*Dipsacaceae*). Jeho široké lidové využití zahrnuje detoxikační a protizánětlivé preparáty, léčbu kožních onemocnění a antiparazitické látky ve veterinární medicíně, kde se využívá jako doplněk krmiva pro ovce. Mezi účinky prokazané u chrastavce patří antiproteolitická, protizánětlivá, antimikrobiální, diuretická, analgetická a antioxidační aktivita. Přestože chemické složení ještě nebylo dostatečně prozkoumáno, ve většině zkoumaných extraktů z rozdílných oblastí se vyskytovaly fenolkarboxylové kyseliny, flavonové glykosidy, flavonoidy, kumaroly, třísloviny a chlorogenová kyselina. Také bylo zjištěno, že polysacharidy chrastavce mají protizánětlivou aktivitu (Kopyt'ko et al., 2020).

Běžná, planě rostoucí, vytrvalá bylina Podběl lékařský (*Tussilago farfara* L.) je také běžně využívána v tradiční medicíně. Květní pupeny se používají k léčbě kašle a chrapotu. Extrakt z podbělu vykazuje řadu biologických aktivit, patří mezi ně také protizánětlivé, antioxidační, antimikrobiální a protirakovinné účinky. Jednou z hlavních chemických složek je seskviterpenoid tussilagon, který potlačuje expresi volných radikálů v mikroglálních buňkách a tím potlačuje aktivaci mikroglíí. Výsledky studie, ve které izolovali čtyři seskviterpenoidy (včetně tussilagonu) ukazují, že tyto sloučeniny mohou mít příznivý terapeutický potenciál při léčbě neurodegenerativních onemocnění (H. J. Lim et al., 2015).

4 Metodika

4.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál byl vybrán na základě předchozích etnobotanických údajů o tradičním využití k léčbě neurodegenerativních onemocnění souvisejících s inhibicí acetylcholinesterázy nebo oxidačním stresem. Jedná se o druhy *Melampyrum sylvaticum* L., *Clinopodium vulgare* L., *Viola arvensis* Murray, *Ajuga reptans* L., *Petasites hybridus* L., *Epilobium angustifolium* L., *Euphrasia officinalis* L., *Knautia arvensis* subsp. *Arvensis* a *Tussilago farfara* L. (Tabulka 1). Devět vzorků léčivých rostlin bylo nasbíráno v oblasti Šumavy v období od dubna do července roku 2022 Bc. Markem Žinčákem. Botanická identifikace byla provedena Ing. Karlem Boublíkem, Ph.D. (Fakulta životního prostředí, ČZU) pomocí taxonomických klíčů a porovnáním s herbářovými exempláři. Nomenklatura byla sjednocena dle Klíče ke květeně ČR.

Tabulka 1: Přehled vybraných rostlinných druhů

Rostl. část	Latinský název	Čeleď	Český název	Č. vzorku
herba	<i>Melampyrum sylvaticum</i> L.	<i>Orobanchaceae</i>	Černýš lesní	1
herba	<i>Clinopodium vulgare</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Kinopád obecný	2
herba	<i>Viola arvensis</i> Murray	<i>Violaceae</i>	Violka rolní	3
herba	<i>Ajuga reptans</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	Zběhovec plazivý	4
herba	<i>Petasites hybridus</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Devětsil	5
herba	<i>Epilobium angustifolium</i> L.	<i>Onagraceae</i>	Vrbovka úzkolistá	6
herba	<i>Euphrasia officinalis</i> L.	<i>Orobanchaceae</i>	Světlík lékařský	7
herba	<i>Knautia arvensis</i> , subsp. <i>Arvensis</i>	<i>Caprifoliaceae</i>	Chrastavec rolní	8
rhizoma	<i>Tussilago farfara</i> L.	<i>Asteraceae</i>	Podběl lékařský	9

4.2 Příprava vzorků

Vzorky rostlinného materiálu byly usušeny pomocí horkého vzduchu. Následně rozemleté vzorky byly extrahovány 80% ethanolem při pokojové teplotě po dobu 24 hodin pomocí laboratorní třepačky. Extrakty vzorků byly poté zfiltrány a rotační odparkou odpařeny do sucha ve vakuu při teplotě 40 °C. Vysušené zbytky byly rozpuštěny ve 100% dimethylsulfoxidu (DMSO). Tím byl vytvořen zásobní roztok každého extraktu s koncentrací 51,2 mg/ml. Extrakty byly skladovány až do testování při teplotě -20 °C.

4.3 Chemikálie a reagenty

Acetylcholinesteráza (AChE) typu VI-S, z elektrického úhoře, butyrylcholinesteráza (BuChE) z koňského séra, acetylcholinjodid, butyrylcholinjodid, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), neostigmin jako referenční sloučenina inhibice AChE, 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid (AAPH), floresceinová sodná sůl (FL), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová (Trolox) použitý jako referenční vzorek v antioxidačních metodách, byly zakoupeny komerčně u Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Organická rozpouštědla o analytické kvalitě jako například methanol, DMSO a další, byla pořízena u Penta Chemicals (Praha, Česká republika).

4.4 Inhibice AChE a BuChE

Inhibiční účinek extraktů na acetylcholinesterázu a butyrylcholinestrázu byl stanoven použitím Ellmanovy spektrofotometrické metody modifikované Eldeenem a kol. (2005). Do 96 jamkové mikrotitrační destičky byly napipetovány všechny vzorky, včetně referenční sloučeniny, po 25 μ l vždy v koncentračních řadách o konečné koncentraci od 512 do 4 μ g/ml. Po vytvoření koncentračních řad bylo do každé jamky přidáno 125 μ l 3mM DTNB (rozpuštěna v pufru C = 50 mM Tris-HCl, pH 8, s obsahem 0,1 M NaCl a 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 50 μ l pufru B (50 mM Tris-HCl, pH 8, s obsahem 0,1 % hovězího sérového albuminu-BSA) a nakonec 25 μ l 15 mM ATCI (rozpuštěn v ddH₂O). Poté byla destička inkubována po dobu 5 minut na tmavém místě (obrázky 1–2). Po uplynutí intervalu bylo do všech jamek přidáno 25 μ l čerstvě připravené AChE (0,2 IU/ml). Absorbance byla měřena při 405 nm (Synergy H1, BioTek, USA). Výsledné hodnoty vzorků byly vyjádřeny pomocí hodnoty IC₅₀ (koncentrace vzorku vykazující 50% inhibici AChE), která byla získána vynesemím procentuální inhibice neostigminu proti koncentraci extraktu.

V případě testování inhibice butyrylcholinesterázy byla příprava a průběh měření téměř shodné s rozdílem využití butyrylcholinjodidu a butyrylcholinesterázy namísto ATCI a acetylcholinesterázy.

4.5 Antioxidační aktivita

4.5.1 Inhibice DPPH radikálu

První test pro určení antioxidační aktivity vzorků byl proveden pomocí metody založené na inhibici DPPH radikálu (Sharma et Bhat, 2009). Nejprve byly připraveny zásobní roztoky extraktů a Troloxu (pozitivní kontrola) s počáteční koncentrací 1024 $\mu\text{g/ml}$ metanolu. Do 96jamkové mikrotitrační destičky byla poté připravena dvojnásobná seriová koncentrační řada vzorků. Následně bylo do všech jamek napipetováno 100 μl čerstvě připraveného 0,25 mM roztoku DPPH v metanolu. Tím bylo vytvořeno rozmezí koncentrací vzorků od 4 do 512 $\mu\text{g/ml}$ na konečný objem jamek 200 μl . Poté byla destička inkubována ve tmě po dobu 30 minut (obrázky 3–4) a následně spektrofotometricky naměřena absorbance při 517 nm pomocí čtečky Synergy H1 (BioTek, USA). Výsledky byly vyjádřeny jako poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC_{50} v $\mu\text{g/ml}$) a následně přepočítány na ekvivalenty Troloxu ($\mu\text{g TE/mg}$ extraktu).

4.5.2 Test absorpční kapacity kyslíkových radikálů (ORAC)

V testu absorpční kapacity kyslíkových radikálů byla využita mírně upravená metoda dříve popsána Ou et al. (2001). Černá absorpční 96jamková mikrotitrační destička byla nejprve naplněna 200 μl destilované vody do vnějších jamek, pro zajištění lepší tepelné stability vzorků. Vzorky a veškeré reagenty v tomto testu byly připraveny v 75 mM fosfátovém pufru s pH 7,0. Následně bylo na destičku napipetováno 25 μl Troloxu a extraktů, ke kterým bylo přidáno 150 μl FL (48 nM) a takto připravená destička byla inkubována 10 minut při 37 °C. Reakce byla následně zahájena přidáním 25 μl čerstvě připraveného AAPH (153 mM). Tím byl dosažen konečný objem 200 μl v každé jamce. Změny fluorescence byly měřeny s emisní a absorpční vlnovou délkou nastavenou na 487 nm a 528 nm v 1minutových intervalech po dobu 120 minut. Konečná koncentrace extraktů při testování byla 12,8 $\mu\text{g/ml}$. Standardní kalibrační křivky Troloxu byly naměřeny z pěti konečných koncentračních úrovní v rozmezí 0,5–8 $\mu\text{g/ml}$, tedy 0,5, 1, 2, 4 a 8 $\mu\text{g/ml}$. Antioxidační kapacita byla nakonec vypočtena kvantifikací plochy pod kalibrační křivkou (dle návrhu Cao a Piora 1998) a vyjádřena jako ekvivalenty Troloxu ($\mu\text{g TE/mg}$ extraktu). Absorbance byla měřena opět pomocí čtečky Synergy H1 (BioTek, USA).

4.6 Statistická analýza

Všechny analýzy byly provedeny ve třech až čtyřech (ORAC) nezávislých testech vždy po třech opakováních. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami (průměr \pm SD). Všechna data byla transformována na specifické parametry konkrétních testů pomocí Microsoft Office Excel 365.

5 Výsledky

V této práci bylo zkoumáno 9 léčivých rostlin s původem z oblasti Šumavy v České republice. Rostliny jsou tradičně používány při léčbě řady onemocnění souvisejících a oxidačním stresem, neurodegenerační poruchou nebo s předpokladem pro inhibiční aktivitu acetylcholinesterázy, butyrylcholinesterázy a antioxidační aktivitou *in vitro*. Žádný z druhů neprojevoval významnou inhibici vůči AChE či BuChE. Nicméně čtyři z vybraných druhů vykazovaly značnou antioxidační aktivitu. Jednalo se o Kinopád obecný (*Clinopodium vulgare* L.), Devětsil lékařský (*Petasites hybridus* L.), Světlík lékařský (*Euphrasia officinalis* L.) a Vrbovku úzkolistou (*Epilobium angustifolium* L.).

5.1 Inhibiční aktivita AChE a BuChE

Bohužel inhibiční aktivita vůči acetylcholinesteráze ani butyrylcholinesteráze Ellmanovou metodou nebyla prokázána u žádného z testovaných rostlinných druhů. Metoda se však potvrdila jako účinná v případě referenční sloučeniny neostigminu, který je běžně používán při léčbě Alzheimerovy choroby. Výsledky rostlinných extraktů nebyly statisticky významné, a proto nejsou v této práci konkrétně uvedeny.

5.2 Antioxidační aktivita (DPPH a ORAC)

Kompletní výsledky testovaných rostlin na antioxidační aktivitu jsou shrnuty v tabulce 2. Všechny výsledky jsou sjednoceně vyjádřeny v ekvivalentech Troloxu. V případě testu DPPH byly nejvyšší hodnoty zjištěny u druhu Vrbovka úzkolistá ($459,14 \pm 95,72 \mu\text{g TE/mg extraktu}$), dále měly poměrně vysokou aktivitu Světlík lékařský, Kinopád obecný a Devětsil lékařský ($248,45 \pm 31,91$; $205,25 \pm 30,72$ a $178,42 \pm 26,58 \mu\text{g TE/mg extraktu}$). U ostatních rostlin se ekvivalent Troloxu pohyboval v rozmezí $<0,01 - 101,43 \mu\text{g TE/mg extraktu}$. Nejlepší výsledky testu ORAC byly zjištěny u rostliny Kinopád obecný ($745,25 \pm 20,31 \mu\text{g TE/mg extraktu}$). Podobná aktivita byla zaznamenána také u Devětsilu lékařského a Světlíku lékařského ($718,64 \pm 47,15$ a $708,12 \pm 26,84 \mu\text{g TE/mg extraktu}$). Vrbovka úzkolistá měla v tomto testu až čtvrtou nejvyšší hodnotu ($657,68 \pm 28,24 \mu\text{g TE/mg extraktu}$). Jen o něco nižší aktivitu měl Chrastavec rolní ($601,23 \pm 111,32 \mu\text{g TE/mg extraktu}$), však s poměrně vysokou směrodatnou odchylkou, tudíž se jedná o značně nepřesný výsledek. Ostatní testované rostliny měly hodnotu ORAC v rozmezí $133,83 - 539,94 \mu\text{g TE/mg extraktu}$. Žádný z extraktů ale nevykazoval silnější antioxidační účinek než referenční sloučenina Trolox.

Tabulka 2: Celková antioxidační aktivita testovaných rostlinných extraktů

Č. vzorku	Název druhu	Antioxidační aktivita / průměr ± SD ^a	
		DPPH (μg TE ^b /mg extraktu)	ORAC (μg TE ^b /mg extraktu)
1	<i>Melampyrum sylvaticum</i> L.	> 0.01	133,83 ± 10,05
2	<i>Clinopodium vulgare</i> L.	205,25 ± 30,72	745,25 ± 20,31
3	<i>Viola arvensis</i> Murray	54,34 ± 6,37	539,94 ± 26,15
4	<i>Ajuga reptans</i> L.	38,23 ± 9,27	243,93 ± 11,48
5	<i>Petasites hybridus</i> L.	178,42 ± 26,58	718,64 ± 47,15
6	<i>Epilobium angustifolium</i> L.	459,14 ± 95,72	657,68 ± 28,24
7	<i>Euphrasia officinalis</i> L.	248,45 ± 31,91	708,12 ± 26,84
8	<i>Knautia arvensis</i> , subsp. <i>Arvensis</i>	101,43 ± 16,32	601,23 ± 111,32
9	<i>Tussilago farfara</i> L.	68,50 ± 18,28	450,38 ± 13,17

^a směrodatná odchylka, ^b ekvivalent Troloxu

6 Diskuze

Je již prokázáno, že zvýšená syntéza neurotransmiteru acetylcholinu vede k rozvoji Alzheimerovy choroby. Z toho důvodu se jako nejčastější léčivo tohoto onemocnění používají inhibitory AChE. Zároveň víme, že dochází ke zvýšené produkci antioxidantů při využívání inhibitorů AChE pro symptomatickou léčbu AD čímž chrání buňky před oxidačním poškozením (Kavaz Yüksel et al., 2021). Tato studie jako první přináší výsledky anticholinergní a antioxidační aktivity všech zmíněných rostlinných druhů, vybraných na základě využití v tradiční medicíně.

Inhibice acetylcholinesterázy je ve srovnání s ostatními biologickými aktivitami (např. právě antioxidační) poměrně specifickou reakcí. Je tedy zřejmé, že přírodní inhibitory AChE jsou velmi charakteristické sloučeniny a jejich přirozený výskyt není běžný, což naznačuje i to, že by se jednalo o potencionálně silné jedy. Pouze omezené množství přírodních rostlinných látek vykazuje *in vivo* anticholinergní aktivitu. Příkladem takových látek jsou galantamin či fyzostigmin.

V porovnání s touto studií byla již dříve prokázána slabá inhibiční aktivita AChE Ellmanovou metodou v případě rostlinného druhu Kinopádu obecného. Vodný roztok (14,6% inhibice AChE) vykazoval vyšší aktivitu než metanolový (6,3% inhibice AChE), avšak v porovnání s referenční sloučeninou byla inhibice velmi slabá (Bektašević et al., 2022). Tento rozdíl byl pravděpodobně ovlivněn způsobem testování inhibice AChE. Neprokázaná aktivita v této studii ve srovnání s výše zmíněným článkem mohla být ovlivněna například zvoleným rozpouštědlem extraktu.

V jiné studii měl rostlinný extrakt Vrbovky úzkolisté prokazatelný inhibiční účinek AChE (IC_{50} 0,14 mg/ml). Jednalo se však o ethanolový extrakt a postup testování se také lišil. Inkubační doba byla 15 minut a poměr jednotlivých činidel byl odlišný (Kavaz Yüksel et al., 2021).

Mírnou anticholinesterázovou aktivitu prokázaly také esenciální oleje z listů a oddenků Devětsílu lékařského (Mihajilov-Krstev et al., 2020). Rozdíly mezi využitou formou bylinného preparátu (esenciální olej a extrakt) mohou mít určitě vliv na výsledky této studie z důvodu jejich fytochemického složení.

Všechny zmíněné aspekty mohou hrát svou roli na výsledky *in vitro* testů. Zároveň je zde určitá pravděpodobnost, že extrakty s koncentrací 512 μ g/ml mají tak silnou pigmentaci (obrázek 1-2), že při použití spektrofotometrické metody není možné jejich inhibiční aktivitu zaznamenat. Bylo by tedy vhodné v případě opakování testování podobných extraktů nejprve

odstranit barviva pomocí vhodné metody, jako je například frakcionace pomocí semipreparativního-HPLC nebo zhodnotit využití jiné metody či její modifikace.

Inhibiční účinek cholinesteráz byl doposud testován na různých fotochemikáliích. Řada studií také uvádí, že fenolové sloučeniny a flavonoidy mají inhibiční aktivitu acetylcholinesterázy (Kavaz Yüksel et al., 2021). Nejvyšší inhibiční aktivitu AChE z flavonoidů vykazují flavony a isoflavony (např. pomiferin) (Bektašević et al., 2022). Flavanon naringenin vykazuje inhibiční aktivitu AChE *in vitro* až při vyšších koncentracích ($IC_{50} = 2045 \mu M$) (Pinho et al., 2013). V inhibici BuChE je silnější flavonol galangin než myricetin, kvercetin, kaempferol, luteolin, apigenin a rutin a je dvanáctkrát lepším inhibitorem BuChE ve srovnání s inhibicí AChE. Kvercetin inhibuje AChE i BuChE kompetitivním způsobem. Dalšími inhibitory AChE jsou kyselina chlorogenová, rutin, kyselina rozmarýnová, gallová a ellagová (Bektašević et al., 2022). Kyselina ellagová má silný inhibiční účinek nejen na AChE, ale také na tyrozinázu. Zároveň však účinek konvenčního léku donepezilu je přibližně 10 000krát silnější při inhibici AChE než kyselina ellagová. Ale vzhledem k nežádoucím účinkům syntetických inhibitorů je důležité identifikovat sloučeniny přírodního původu s touto aktivitou (Kavaz Yüksel et al., 2021).

Stejně jako v této studii byla dříve popsána *in vitro* antioxidační aktivita Kinopádu obecného v testu DPPH (Bektašević et al., 2022). Výsledky jsou dokonce téměř shodné, kdy pro metanolový extrakt vyšla výsledná hodnota IC_{50} 25,7 $\mu g/ml$ a pro vodný extrakt 32,4 $\mu g/ml$ (v této studii 30,04 $\mu g/ml$). Antioxidační aktivita ORAC testu v této studii měla u extraktu z Kinopádu obecného nejslibnější výsledek, 745,25 μg TE/mg extraktu. Dle studie Bektašević et al. (2022) je v metanolovém extraktu Kinopádu obecného nejvíce zastoupena kyselina rozmarýnová, poté kyselina ellagová a ferulová. Právě kyselina rozmarýnová je známá účinnou inhibicí oxidace lipidů s nízkou hustotou a proto je možné, že výsledky antioxidační aktivity souvisí s obsahem této sloučeniny.

Antioxidační aktivita Devětsilu lékařského byla již dříve prokázána u jeho esenciálního oleje získaného z listů a oddenků v hodnotách IC_{50} 154,23 a 79,99 mg/ml (Mihajilov-Krstev et al., 2020), přičemž účinek extraktu v této studii byl násobně silnější (IC_{50} 34,58 mg/ml v testu DPPH, 718,64 μg TE/mg extraktu v testu ORAC). Je to pravděpodobně způsobeno rozdílným fytochemickým složením. Esenciální oleje však nezpůsobily ve zmíněné studii podráždění kůže, což vypovídá o tom, že neobsahují toxické sloučeniny. Devětsil lékařský obsahuje pyrrolizidinové alkaloidy, které jsou zodpovědné za jeho toxicitu. Obsahuje však také řadu dalších účinných látek, mezi které patří seskviterpenové estery petasinu a isopetasinu a seskviterpenové laktony, které mají léčivé vlastnosti (Mihajilov-Krstev et al., 2020). S ohledem

na diskuzi je tedy potřeba poznamenat, že pro další využití by byla potřeba i přesnější analýza fytochemického složení extraktu Devětsilu lékařského ze stejné oblasti jako v této studii.

Testování antioxidační aktivity pomocí DPPH bylo také již dříve prokázáno u byliny Světlík lékařský. V experimentu Paduch et al. (2014) naměřili hodnotu IC_{50} 99,68 $\mu\text{g/ml}$, zatímco v této studii byly výsledky silnější (24,74 $\mu\text{g/ml}$). Zároveň ve zmíněné studii testovali aktivitu ve více rozpouštědlech a metanolvý extrakt měl aktivitu nejsilnější, což poukazuje na vliv rozdílů v polaritě pracovního media a extraktu na výsledek (Paduch et al., 2014). Také v hodnocení testu ORAC v této studii měl Světlík lékařský třetí nejsilnější účinek z testovaných extraktů. Jeho antioxidační aktivita zřejmě souvisí s bohatým obsahem biologicky účinných látek. Mezi tyto aktivní látky patří například iridoid aukubin, třísloviny, fenolové kyseliny, éterické oleje a flavonoidy (Paduch et al., 2014). Aukubin je iridoidní glykosid s širokou škálou farmakologických vlastností. Studie prokázaly jeho neuroprotektivní účinky prostřednictvím antioxidační a protizánětlivé aktivity. Ve studii Wang a kol. (2020) prokázali, že aukubin má inhibiční schopnost proti tvorbě ROS a zároveň zvyšuje hladinu antioxidačních enzymů v mozku. Pravděpodobně tedy aukubin aktivuje antioxidační odpověď, čímž dochází k regulaci oxidačně-antioxidační rovnováhy (Wang et al., 2020). Další studie prokazuje preventivní potenciál aukubinu proti diabetu. Kromě antioxidačního účinku totiž přispívá ke kontrole hyperglykémie a k ochraně β -buněk pankreatu (Jin et al., 2008)

Podobné výsledky jako v této studii pro antioxidační aktivitu Vrbovky úzkolisté byly dokázány ve studii Kavaz Yüksel et al. (2021). Výsledky obou studií dokázaly, že extrakt Vrbovky úzkolisté je schopen vychytávat volné radikály a mohl by mít schopnost zabránit šíření některých řetězových reakcí způsobených volnými radikály. Zmíněná studie přisuzuje antioxidační aktivitu tohoto druhu vysokému obsahu ellagititaninu a dalších fenolických sloučenin, neboť struktura fenolických sloučenin má klíčovou roli při vychytávání volných radikálů. Říká také, že Vrbovka úzkolistá by díky těmto výsledkům mohla dosáhnout terapeutického využití při snižování oxidačního stresu (Kavaz Yüksel et al., 2021).

Avšak je nutné doplnit, že rostlinné extrakty jsou mírně proměnlivou směsí různě aktivních sloučenin, což má za následek jejich synergický a antagonistický efekt, který může být dalším faktorem pro získané výsledky.

7 Závěr

Závěrem lze říci, že u vybranných devíti rostlinných druhů nebyla prokázána inhibiční aktivita acetylcholinesterázy ani butyrylcholinesterázy. Nicméně u čtyř z těchto druhů byl potvrzen *in vitro* antioxidační účinek. Jednalo se o rostliny Vrbovka úzkolistá, Světlík lékařský, Kinopád obecný a Devětsil lékařský. Na základě získaných výsledků by mohly tyto druhy být využity jako perspektivní materiál pro další vývoj nových rostlinných antioxidačně aktivních látek. Jejich antioxidační potenciál by bylo možné využít ve formě doplňků stravy nebo jiných rostlinných preparátů. Pro ověření praktického využití těchto druhů by však bylo zapotřebí dalších výzkumů, podrobná analýza chemického složení a výzkum antioxidační aktivity *in vivo*.

8 Literatura

- Agatonovic-Kustrin, S., Kettle, C., Morton, D. W. 2018. A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 106 (May). 553–565. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.147.
- Ahn, B. Z., Pachaly, P. 1974. *Melampyrum b. 2.* . 30 .
- Bektašević, M., Politeo, O., Roje, M., Jurin, M. 2022. Polyphenol Composition, Anticholinesterase and Antioxidant Potential of the Extracts of *Clinopodium vulgare* L. *Chemistry and Biodiversity*. 19 (5). 1–13. doi: 10.1002/cbdv.202101002.
- Birks, J., Js, B. 2006. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease (Review). *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2006 (1). CD005593. doi: 10.1002/14651858.CD005593. www.cochranelibrary.com.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., Collin, F. 2018. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*. 14 (September 2017). 450–464. doi: 10.1016/j.redox.2017.10.014.
- Cheptou, P. O., Imbert, E., Thomann, M. 2022. Rapid evolution of selfing syndrome traits in *Viola arvensis* revealed by resurrection ecology. *American Journal of Botany*. 109 (11). 1838–1846. doi: 10.1002/ajb2.16028.
- Dai, R., Sun, Y., Su, R., Gao, H. 2022. Anti-Alzheimer's disease potential of traditional chinese medicinal herbs as inhibitors of BACE1 and AChE enzymes. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 154 (July). 113576. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113576.
- Denisov, E. T., Afanas'ev, I. B. 2005. *Oxidation and Antioxidants Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. 1st ed. CRC Press. ISBN: 9781498744850.
- Dubey, S., Singh, E. 2023. Antioxidants: an approach for restricting oxidative stress induced neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*. doi: 10.1007/s10787-023-01173-5.
- Erkkinen, M. G., Kim, M., Geschwind, M. D. 2018. *Major Neurodegenerative Diseases*. .
- Fatokun, A. A., Stone, T. W., Smith, R. A. 2008. Division of Neuroscience and Biomedical Systems, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK. . (10). 3288–3311.
- Göger, G., Köse, Y. B., Demirci, F., Göger, F. 2021. Phytochemical characterization of phenolic compounds by lc-ms/ms and biological activities of *ajuga reptans* l., *ajuga salicifolia* (l.) schreber and *ajuga genevensis* l. from turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 18 (5). 616–627. doi: 10.4274/tjps.galenos.2021.33958.

- Háznagy-Radnai, E., Fási, L., Wéber, E., Pinke, G., Király, G., Sztojkov-Ivanov, A., Gáspár, R., Hohmann, J. 2018. Anti-inflammatory activity of *Melampyrum barbatum* and isolation of iridoid and flavonoid compounds. *Natural Product Communications*. 13 (3). 235–236. doi: 10.1177/1934578x1801300301.
- Hurley, L. L., Tizabi, Y. 2013. Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression. *Neurotoxicity Research*. 23 (2). 131–144. doi: 10.1007/s12640-012-9348-1.
- Jin, L., Xue, H. Y., Jin, L. J., Li, S. Y., Xu, Y. P. 2008. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *European Journal of Pharmacology*. 582 (1–3). 162–167. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.12.011.
- Kaitera, J., Witzell, J. 2016. Phenolic profiles of two *Melampyrum* species differing in susceptibility to *Cronartium rust*. *European Journal of Plant Pathology*. 144 (1). 133–140. doi: 10.1007/s10658-015-0757-x.
- Kavaz Yüksel, A., Dikici, E., Yüksel, M., Işık, M., Tozoğlu, F., Köksal, E. 2021. Phytochemical, phenolic profile, antioxidant, anticholinergic and antibacterial properties of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15 (6). 4858–4867. doi: 10.1007/s11694-021-01050-1.
- King, A., Bodi, I., Troakes, C. 2020. The neuropathological diagnosis of Alzheimer’s disease—the challenges of pathological mimics and concomitant pathology. *Brain Sciences*. 10 (8). 1–23. doi: 10.3390/brainsci10080479.
- Kopyt’ko, Y. F., Dargaeva, T. D., Rendyuk, T. D. 2020. Composition of the Field Scabious (*Knautia arvensis* L.). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 54 (7). 725–733. doi: 10.1007/s11094-020-02263-2.
- Lim, A. S. P., Kowgier, M., Yu, L., Buchman, A. S., Bennett, D. A. 2013. Sleep Fragmentation and the Risk of Incident Alzheimer’s Disease and Cognitive Decline in Older Persons. *Sleep*. 36 (7). 1027–1032. doi: 10.5665/sleep.2802.
- Lim, H. J., Dong, G. Z., Lee, H. J., Ryu, J. H. 2015. In vitro neuroprotective activity of sesquiterpenoids from the flower buds of *Tussilago farfara*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 30 (5). 852–856. doi: 10.3109/14756366.2014.965701.
- Martorana, A., Giacalone, V., Bonsignore, R., Pace, A., Gentile, C., Pibiri, I., Buscemi, S., Lauria, A., Piccionello, A. P. 2016. Heterocyclic Scaffolds for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 22 (26). 3971–3995. doi: 10.2174/1381612822666160518141650.
- Maulden, A. 2022. Ignoring the Experts: Implications of the FDA’s Aduhelm Approval. *American Journal of Law & Medicine*. 48 (1). 108–133. doi: 10.1017/amj.2022.15.

- Mihajilov-Krstev, T., Jovanović, B., Zlatković, B., Matejić, J., Vitorović, J., Cvetković, V., Ilić, B., Đorđević, L., Joković, N., Miladinović, D., Jakšić, T., Stanković, N., Jovanović, V. S., Bernstein, N. 2020. Phytochemistry, toxicology and therapeutic value of petasites hybridus subsp. Ochroleucus (common butterbur) from the Balkans. *Plants*. 9 (6). doi: 10.3390/plants9060700.
- Mushtaq, G., Greig, N. H., Khan, J. A., Kamal, M. A., Arabia, S., Section, D., Branch, T. G., Medical, F. 2018. HHS Public Access. . 1–16.
- Paduch, R., Woźniak, A., Niedziela, P., Rejdak, R. 2014. Assessment of eyebright (*Euphrasia officinalis* L.) extract activity in relation to human corneal cells using in vitro tests. *Balkan Medical Journal*. 31 (1). 29–36. doi: 10.5152/balkanmedj.2014.8377.
- Parvez, M. K. 2017. Natural or Plant Products for the Treatment of Neurological Disorders: Current Knowledge. *Current Drug Metabolism*. 18 . 424–428. doi: 10.2174/1389200218666170710190249.
- Peña-Bautista, C., Casas-Fernández, E., Vento, M., Baquero, M., Cháfer-Pericás, C. 2020. Stress and neurodegeneration. *Clinica Chimica Acta*. 503 (January). 163–168. doi: 10.1016/j.cca.2020.01.019.
- Pinho, B. R., Ferreres, F., Valentão, P., Andrade, P. B. 2013. Nature as a source of metabolites with cholinesterase-inhibitory activity: An approach to Alzheimer's disease treatment. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 65 (12). 1681–1700. doi: 10.1111/jphp.12081.
- Sharma, O. P., Bhat, T. K. 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113 (4). 1202–1205. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008.
- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O., Singh, D. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 70 . 165–188. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.050.
- Talesa, V. N. 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*. 122 (16). 1961–1969. doi: 10.1016/S0047-6374(01)00309-8.
- Toiu, A., Oniga, I., Tămaș, M. 2010. Morphological and anatomical researches on *Viola arvensis* murray (Violaceae). *Farmacia*. 58 (5). 654–659.
- Toiu, A., Verite, P., Oniga, I., Tamas, M. 2009. Composition of essential oils of *Viola tricolor* and *V. arvensis* from Romania. *Chemistry of Natural Compounds*. 45 (1). 91–92. doi: 10.1007/s10600-009-9244-y.
- Walker, M. 2018. *Why We Sleep*. Simon&Schuster Inc. p. 368. ISBN: 978-15-0114-432-5.

- Wang, H., Wang, H., Zhou, X. M., Wu, L. Y., Liu, G. J., Xu, W. D., Zhang, X. S., Gao, Y. Y., Tao, T., Zhou, Y., Lu, Y., Wang, J., Deng, C. L., Zhuang, Z., Hang, C. H., Li, W. 2020. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*. 17 (1). 1–18. doi: 10.1186/s12974-020-01863-9.
- Wareham, L. K., Liddelow, S. A., Temple, S., Benowitz, L. I., Di Polo, A., Wellington, C., Goldberg, J. L., He, Z., Duan, X., Bu, G., Davis, A. A., Shekhar, K., Torre, A. La, Chan, D. C., Canto-Soler, M. V., Flanagan, J. G., Subramanian, P., Rossi, S., Brunner, T., Bovenkamp, D. E., Calkins, D. J. 2022. Solving neurodegeneration: common mechanisms and strategies for new treatments. *Molecular Neurodegeneration*. 17 (1). 1–29. doi: 10.1186/s13024-022-00524-0.
- Zeng, X., Guo, F., Ouyang, D. 2020. A review of the pharmacology and toxicology of aucubin. *Fitoterapia*. 140 (November 2019). 104443. doi: 10.1016/j.fitote.2019.104443.

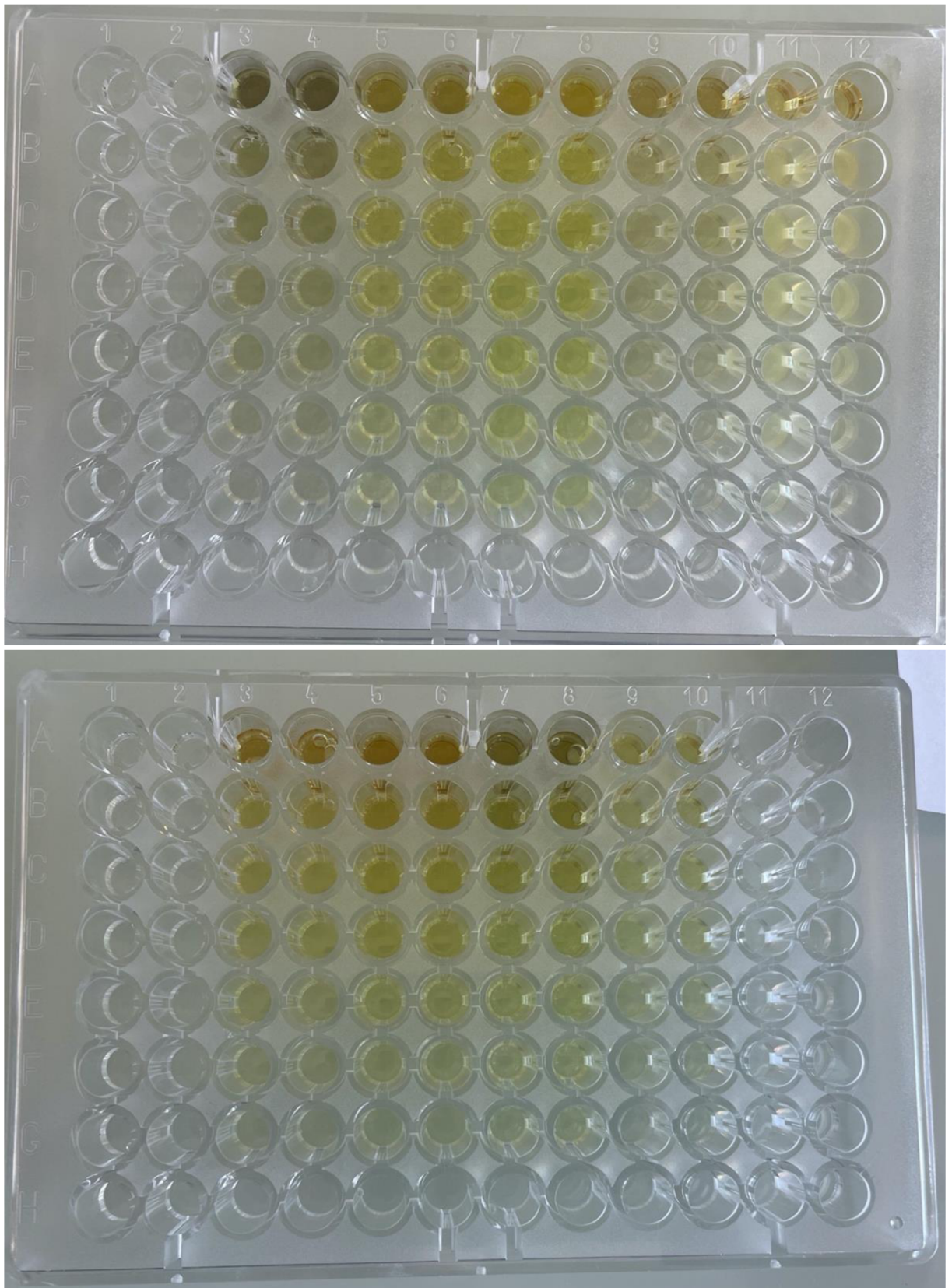
Literatura byla generována pomocí volně dostupného citačního manažeru Mendeley - <https://www.mendeley.com/download-desktop/>

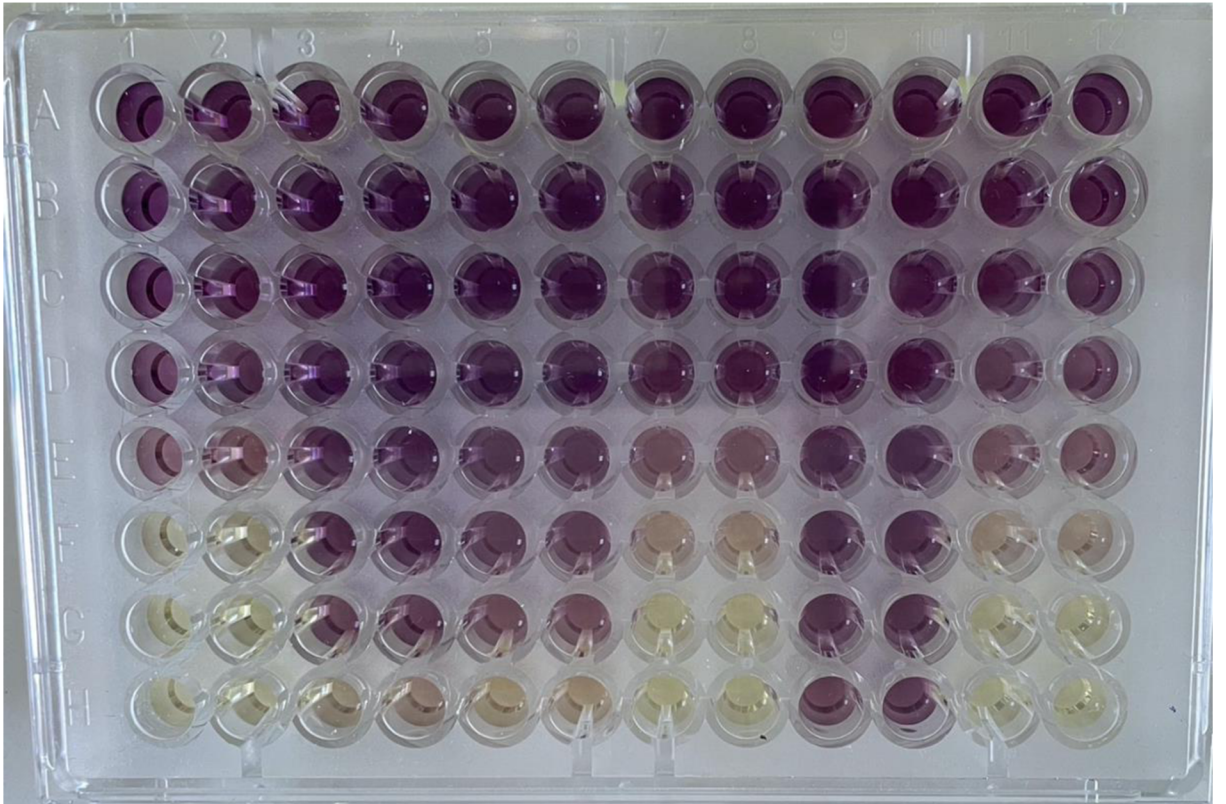
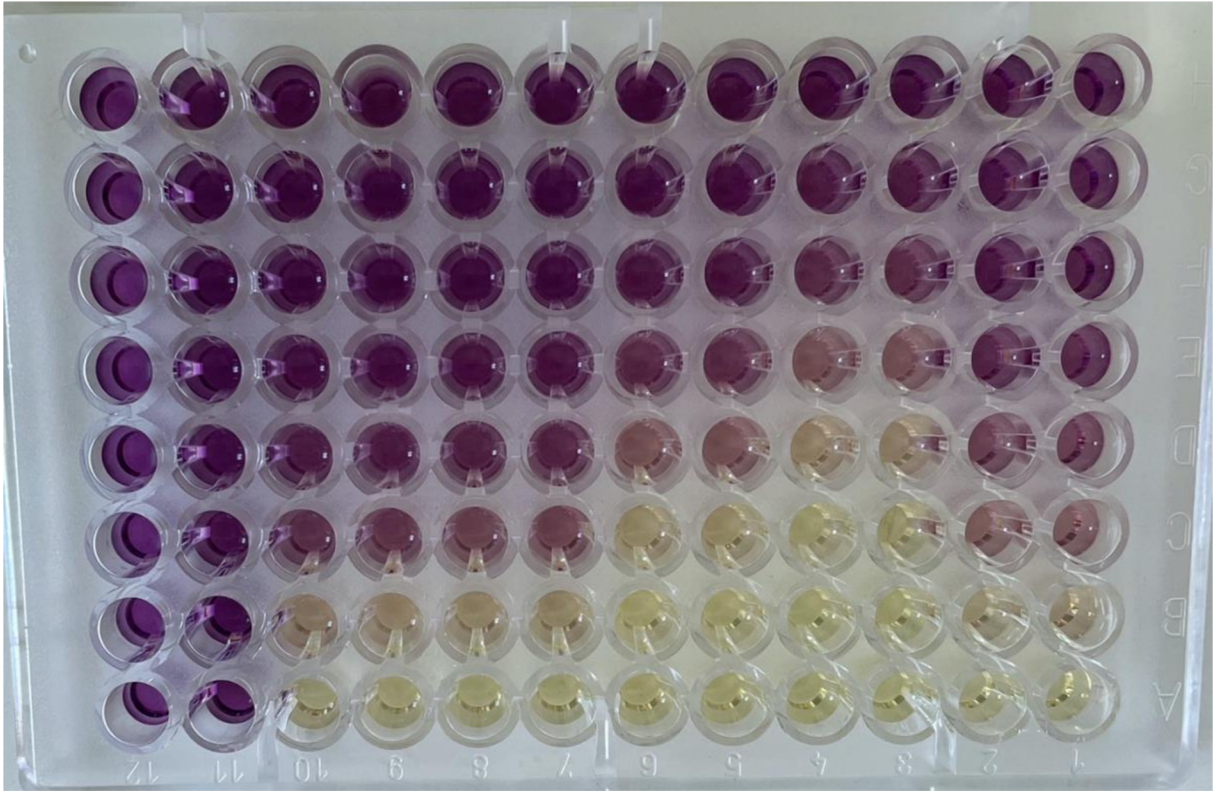
9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AD	Alzheimerova demence
AChE	Acetylcholinesteráza
ATCI	Acetylcholinjodid
AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CNS	Centrální nervová soustava
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FL	Fluorescein
IC ₅₀	Koncentrace vzorku vykazující 50% účinek
MTDL	Multi-Target-Directed-Ligands
MRI	Magnetická rezonance
NDO	Neurodegenerativní onemocnění
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparátový receptor
ORAC	Kapacita absorpce kyslíkových radikálů
PET	Pozitronové emisní topografie
ROS	Reaktivní formy kyslíku
SD	Směrodatná odchylka
TE	Ekvivalent Troloxu

10 Samostatné přílohy

Obrázek 1 a 2: Připravené mikrotitrační destičky v testu inhibice AChE před přidáním AChE





Obrázek 3 a 4: Mikrotitrační destičky v testu DPPH po inkubaci před měřením