

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Využitelnost rostlinných druhů při léčbě
neurodegenerativních onemocnění**

Bakalářská práce

Pavla Rezková

Ing. Jan Tauchen, Ph.D.

© 2020

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využitelnost rostlinných druhů při léčbě neurodegenerativních onemocnění" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Janu Tauchenovi Ph.D. za cenné rady, odborný dohled a čas věnovaný při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

Využitelnost rostlinných druhů při léčbě neurodegenerativních onemocnění

Souhrn

Identifikace rostlinných produktů potencionálně terapeuticky využitelných při léčbě neurodegenerativních onemocnění (jako např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, ALS) je v dnešní době stále značným vědeckým zájmem. Důvody jsou poměrně zřejmé, neboť počet pacientů postižených některým z NDO se neustále zvyšuje, velká část z těchto onemocnění má časté genetické podmínění a konvenční léčba bývá problematická či naprosto nedostačující z důvodu vážných vedlejších účinků.

Tato práce se v rešeršní části zabývá principem a klasifikací neurodegenerativních dysfunkcí se zaměřením na Alzheimerovu chorobu, popisem a rozdíly mezi konvenční a alternativní léčbou a v závěru charakteristikou vybraných 8 peruánských rostlinných druhů se slibnou predispozicí jako terapeutického prostředku pro léčbu NDO. V druhé části práce jsou tyto vybrané vzorky podrobeny laboratorní zkoušce inhibice enzymu acetylcholinesteráza. Konkrétně byly zkoušeny extrakty rostlinných druhů *Alternanthera brasiliana* (f. *Amaranthaceae*), *Alternanthera flavescens* (f. *Amaranthaceae*), *Ayapana triplinervis* (f. *Asteraceae*), *Dysphania ambrosioides* (f. *Amaranthaceae*), *Eleutherine bulbosa* (f. *Iridaceae*), *Mansoa alliacea* (f. *Bignoniaceae*), *Petiveria alliacea* (f. *Petiveriaceae*), *Phyllanthus niruri* (f. *Phyllanthaceae*) ve srovnání s konvenčně využívanými léčivy galanthaminem a neostigminem. Bohužel i přes velmi slibný potenciál těchto vzorků odpovídaly všechny výsledné hodnoty IC_{50} koncentracím vyšším než 512 $\mu\text{g/ml}$. Ve srovnání s konvenčními inhibitory nebyla tato interakce dostačující, neboť jejich reakční koncentrace dosáhly řádově nižších výsledků. Galanthamin vykazoval výslednou hodnotu pro IC_{50} 2,347 $\mu\text{g/ml}$ a neostigmin 1,268 $\mu\text{g/ml}$.

Výsledky vyjadřují vysokou specifitu enzymu AChE a s tím související náročnost hledání aktivních přírodních látek, které by byly schopny tento enzym inhibovat.

Klíčová slova: acetylcholinesteráza; Alzheimerova choroba; inhibitor; neurodegenerativní onemocnění; rostlinné extrakty

The role of plants in treatment of neurodegenerative diseases

Summary

The identification of plant products with potential therapeutically use in the treatment of neurodegenerative diseases (e.g. Alzheimer's disease, Parkinson's disease, ALS) is currently of interest in scientific circles. The reason being the ever-increasing number of patients with NDOs. Given the genetic causation of these diseases, conventional treatment can be problematic or completely insufficient due to the serious side effects.

In the research part of this study, the principle and classification of neurodegenerative dysfunctions with a focus on Alzheimer's disease are discussed, also description and differences between conventional and alternative treatment are presented and finally the characteristics of 8 the selected Peruvian plant species with a promising predispositions as a therapeutic agent for NDO are included. In the second part of this study, these samples are tested in a laboratory experiment for inhibition acetylcholinesterase enzyme. The sampled plants were namely *Alternanthera brasiliana* (f. *Amaranthaceae*), *Alternanthera flavescens* (f. *Amaranthaceae*), *Ayapana triplinervis* (f. *Asteraceae*), *Dysphania ambrosioides* (f. *Amaranthaceae*), *Eleutherine bulbosa* (f. *Iridaceae*), *Mansoa alliacea* (f. *Bignoniaceae*), *Petiveria alliacea* (f. *Petiveriaceae*), *Phyllanthus niruri* (f. *Phyllanthaceae*) and they were compared with conventionally used medication galanthamine and neostigmine. Unfortunately, all the results of IC_{50} corresponded to concentrations higher than 512 $\mu\text{g} / \text{ml}$ despite the very promising potential of all the samples. This interaction was not sufficient compared to the conventional inhibitors. Their active concentrations achieved range lower results. Galanthamine showed a final IC_{50} 2.347 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and neostigmine 1.268 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The results express the wide uniqueness of the AChE enzyme and the consequential difficulties of finding natural active species that would be able to inhibit this enzyme.

Keywords: acetylcholinesterase; Alzheimer 's disease; inhibitor; neurodegenerative disease; plant extracts

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	3
3. Hypotéza	4
4. Definice neurodegenerativních onemocnění	5
4.1. Princip dysfunkcí	5
4.2. Klasifikace NDO	6
4.2.1. Vybraná NDO	7
4.3. Léčba	9
4.3.1. Konvenční léčba	9
4.3.2. Alternativní léčba	11
4.4. Tradiční léčivé rostliny z Amazonie	15
5. Metodika	19
5.1. Výběr rostlinného materiálu	19
5.2. Chemikálie a reagenty	20
5.3. Příprava extraktů	20
5.4. Inhibice acetylcholinesterázy	20
6. Výsledky	21
7. Diskuze	24
8. Závěr	26
9. Literatura	27
10. Seznam použitých zkratk a symbolů	31

1. Úvod

Neurodegenerativní onemocnění neboli NDO lze jednoduše označit za choroby způsobené ztrátou neuronů a jejich selektivní dysfunkcí způsobenou ukládáním nefunkčních a pozměněných proteinů v mozku a v dalších orgánech (Kovacs, 2016). Do této skupiny poruch patří například i progresivní a komplexní neurodegenerace Alzheimerova choroba. V důsledku vysoké prevalence se obecně předpokládá zvýšení počtu pacientů postižených daným typem onemocnění. Zároveň je dostupná terapie značně nedostatečná, její účinnost bývá často omezená a zaměřená na léčbu symptomů nikoliv na příčiny vzniku poruchy (Guzior et al., 2014). Navíc je léčba terapeuticky omezená s dlouhodobou snášenlivostí, špatně biologicky dostupná a neselektivní, čímž podněcuje řadu negativních účinků (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Z těchto důvodů je výzkum zabývající se danou problematikou a hledáním nových účinných léčiv pro NDO potřebný (Guzior et al., 2014).

Jednou z možností hledání nových cest je doplňková a alternativní medicína neboli CAM (complementary and alternative medicine), která se v posledních několika letech stala značně populární. Díky pokroku v posledních desetiletích je možné pomocí experimentů a klinických studií dokázat fytotherapeutickou a ochrannou aktivitu různých rostlinných druhů a jejich účinných látek (Parvez, 2017). A právě identifikace rostlinných produktů potencionálně terapeuticky využitelných při léčbě neurodegenerativních onemocnění se v posledních letech vyznačuje značným vědeckým zájmem.

Jedním ze společných terapeutických projevů NDO může být vývoj demence. Charakteristické vlastnosti demence jsou postupný nástup a pokles kognitivních funkcí. Její již zmíněná nejběžnější forma se vyznačuje degenerací neurologických drah v souvislosti s věkem pacienta a známe ji pod názvem Alzheimerova choroba (Guzior et al., 2014). Tato degenerace je způsobena poklesem hladiny neurotransmiteru acetylcholinu v mozku. Avšak bylo zjištěno, že jeho nedostatečnou neurotransmisí lze obnovit pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy a následným zvýšením acetylcholinu v synaptických oblastech. Bohužel v současné době nemáme k dispozici látky, které by umožňovaly dostatečné zvýšení hladiny acetylcholinu, čímž by dosáhly terapeutické odpovědi bez nutnosti omezení dávky z důvodu vedlejších účinků. Jsou tedy dále hledány látky přírodního původu s vyšší účinností. Zároveň lze využít vlastností přírodních antioxidantů v rostlinách, které inhibují oxidační poškození buněk, a tím mohou zpomalovat jejich stárnutí a snižovat riziko neurodegenerativních onemocnění (Adewusi et al., 2011).

V současné době je schválených a předepsaných k léčbě Alzheimerovy choroby pět léků. Jedná se o galanthamin, rivastigmin, donepezil, memantin a huperzin A (v USA schválen pouze jako doplněk stravy) (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Některé z nich se projevují jako kompetitivní či reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy, nebo účinkují na principu nekonkurenčního antagonisty receptoru N-methyl-D-asparátu (Guzior et al., 2014). Nejedná se však pouze o syntetické látky, neboť některé z nich jsou izolovány z rostlinných produktů. Příkladem může být lék galanthamin, který má původ z rostlin rodu sněženek (*Galanthus spp.*; f. *Amaryllidaceae*), či inhibitor rivastigmin, karbamátový analog přírodního fyzostigminu izolovaného ze semen puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*; f. *Fabaceae*). Avšak pouze u 50 % pacientů s AD dojde k oddálení kognitivního projevu

poruchy a u závažných případů je jejich účinek téměř minimální (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Z výše uvedených důvodů se tato práce zabývá zevrubnou rešerší neurodegenerativních onemocnění, jejich principem, klasifikací a léčbou. Dále popisem 8 peruánských druhů rostlin, jejichž etnobotanická indikace a předešlé studie naznačují, že by mohly být využitelné při léčbě AD.

Experimentální část práce se věnuje zkoumání účinku určitých rostlinných výtažků jako acetylcholinesterázových (AChE) inhibitorů a přírodních antioxidantů využitelných u případů neurodegenerativních poruch. Rostlinné druhy pro testování byly vytipovány na základě jejich etnomedicinálních indikací spojených s NDO (dle dostupné literatury a vědeckých databází WOS, Scopus). Možné využití vybraných druhů pro léčbu NDO je následně stanoveno pomocí in vitro metody založené na inhibici AChE.

2. Cíl práce

Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) je celosvětově zdokumentováno zhruba 50 milionů případů neurodegenerativních onemocnění (NDO); každým rokem pak počet vzroste o dalších 10 milionů případů. Mnoho etnobotanických záznamů hovoří o možném využití rostlin při léčbě těchto onemocnění. I přes tento fakt, léčebný účinek mnoha rostlinných druhů nebyl dodnes prokázán pomocí moderních vědeckých metod.

Bakalářská práce bude sestávat ze zevrubné literární rešerše, jenž bude zohledňovat obecnou problematiku NDO, a experimentální části, která bude zahrnovat vytipování rostlinných druhů a nastínění jejich možného využití při léčbě NDO (např. v podobě doplňků stravy).

Cílem práce bylo stanovení inhibiční aktivity specifických rostlinných přípravků vůči acetylcholinesteráze (AChE) a vybrat vzorky s nejslibnější aktivitou, které by mohly dále sloužit pro vývoj prostředků pro prevenci či léčbu NDO, se speciálním ohledem na Alzheimerovu chorobu.

3. Hypotéza

Systematické zkoumání rostlin s etnomedicinální indikací a předešlými vědeckými záznamy (např. obsah alkaloidních látek, antioxidační potenciál) pomocí metody založené na inhibici AChE může vést k objevu extraktu se slibnou aktivitou a izolaci obsahových přírodních látek, které mohou sloužit jako prospektivní materiál při vývoji doplňků stravy/léků určených pro léčbu NDO.

4. Definice neurodegenerativních onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění neboli NDO, mezi něž patří např. Alzheimerova či Parkinsonova choroba, se kvůli problematické determinaci, nedostupnosti efektivní léčby a neustále častějším výskytem staly jedním z nejaktuálnějších problémů moderní medicíny. Všechna jsou ale charakterizována pozvolnou (jen výjimečně rychlou) ztrátou funkčnosti specifických skupin neuronů a jejich degenerací v mozku nebo v míše (Guzior et al., 2014; Kaňovský, 2005).

Tento úbytek je spojen s velmi vážnými psychickými a neurologickými příznaky a je následně určujícím faktorem při determinaci daného onemocnění. Z psychických změn lze u některých pacientů pozorovat různé formy poruch chování, celkový úpadek osobnosti, poruchy až ztrátu paměti, či degradaci rozumových schopností. V některých případech může dojít až k demenci, halucinacím a bludům (Horáček et Motlová, 1999). Neurologické příznaky se nejčastěji projevují jako špatná koordinace pohybu, problémy s řečí, změna svalového napětí, či poruchy hybnosti a mimovolní pohyby. Míra klinických příznaků jednotlivých onemocnění většinou odpovídá míře poškozených nervových buněk či vážnosti jejich postižení, avšak ani to není pravidlem (Konvalinka et Peichová, 2002).

4.1. Princip dysfunkcí

Příčiny úbytku specifických skupin neuronů mohou být různé. Mezi nejdůležitější řadíme zánik neuronů na základě apoptózy a jejich následné nahrazování gliemi (Kaňovský, 2005). Dalším důvodem může být omezená produkce některé potřebné bílkoviny, nebo modifikace její sekundární struktury a tím i změna fyzikálně-chemických vlastností bílkoviny. Ta nemůže nadále plnit svou funkci, a proto dochází k jejímu ukládání nejen v mozku, ale i v řadě dalších orgánů a zároveň dochází k nedostatku funkčního proteinu (Konvalinka et Peichová, 2002). Tyto pozměněné proteiny, známé také jako nesprávně přeložené proteiny, jsou pro organismus patologické dokonce mohou být až toxické, ale lze je využít jako biomarkery, nebo při terapii (Kovacs, 2016).

K jejich vzniku může dojít genetickou mutací, ale i spontánním vývojem. V případě genetické predispozice může dojít k mutaci některého z chromozomů, neboť pořadí bází v DNA je určeno pořadím aminokyselin v peptidovém řetězci. Následkem je chybné sekundární uspořádání proteinu ve formě β -struktury neboli struktury skládaného listu. V některých případech pak může dojít k polymeracím nebo vzniku špatně rozpustné bílkoviny, což je důvodem většiny NDO. Patří mezi ně například Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Parkinsonova choroba, či Huntingtonova choroba (Konvalinka et Peichová, 2002).

Dále existuje mnoho dalších procesů, přispívajících k poškození neuronů, jako je oxidační stres a tvorba volných radikálů neboli reaktivních molekul kyslíku. Také neprozánětlivé procesy v lidském mozku, blízký vztah mikrogliaální aktivity s oxidem dusnatým, mitochondriální dysfunkce, poškozená bioenergetika a poškozená DNA, narušení

buněčného, nebo axonálního transportu. To vše mohou být příčiny spojeny s tvorbou toxických forem proteinů souvisejících s NDO (Kovacs, 2016).

4.2. Klasifikace NDO

Neurodegenerativní onemocnění můžeme dělit do skupin podle způsobu tvorby patologicky konformovaných proteinů s pozměněnou strukturou. Podle charakteru neuronálních inkluzí můžeme dělit neurodegenerace do několika skupin (Konvalinka et Peichová, 2002).

Mezi tauopatie řadíme poměrně vzácná onemocnění zapříčiněná mutací τ -proteinu. τ -protein je jednotka s tubulinem, která zpevňuje mikrotubuly. Avšak hyperfosforylovaná forma agreguje za vzniku amyloidu a neplní svou původní funkci. Příklady takových onemocnění jsou progresivní supranukleární obrna, kortikobazální degenerace, či Pickova nemoc (frontotemporální atrofie) (Kovacs, 2016).

Další skupinou jsou synukleinopatie. α -synuklein je ve velké míře přítomen v CNS avšak ve své patologické formě tvoří uvnitř buněk Lewyho tělíska a tím indukuje apoptózu. Mezi synukleinopatie můžeme řadit Parkinsonovu nemoc nebo demenci s Lewyho tělísky (Horáček et Motlová, 1999; Kaňovský, 2005).

TDP-43 proteinopatie jsou skupinou vyznačující se ubiquitinovými inkluzemi, jejichž hlavní součástí je TDP-43, neboli transaktivní DNA vázající protein o délce 43 kDa. Jedná se o jaderný protein kódovaný na chromozomu 1. Patří sem onemocnění jako jsou amyotrofická laterální skleróza (ALS) a frontotemporální lobární degenerace (FTLD) (Kovacs, 2016).

Druhý patogenní protein společný pro onemocnění ALS a FTLD se nazývá FUS protein (fused-in-sarcoma) podle nějž označujeme celou skupinu FUS/FET proteinopatie. FUS protein je kódovaný genem na chromozomu 16 a je charakteristický pro familiární případy ALS a vzácnou variantu choroby FTLD (Kovacs, 2016).

Další možností vzniku patologického proteinu je vlivem dědičné poruchy. Nefunkční protein je kódován genem s neurologickou poruchou opakování trinukleotidů. Principem této poruchy je expanze nestabilních trinukleotidových repetit. Jednou z variant vzniklé mutace je Huntingtonova choroba a ataxie (Kovacs, 2016).

Poslední skupinou jsou prionová onemocnění, u kterých není chybně sbalený protein vyvolaný genetickou mutací a chybným pořadím aminokyselin, nýbrž v důsledku působení prionů. To jsou nesprávně uspořádané proteiny, které vyvolávají změny u funkčních proteinů, čímž způsobují jejich nerozpustnost a snadnou tvorbu agregátů. Tato změna je infekčního charakteru, a proto jsou patologicky konformované bílkoviny označovány jako priony. Mohou způsobovat různá onemocnění jako například chorobu kuru, Creutzfeldt-Jakobovu nemoc, či bovinní spongiformní encefalopatii (Konvalinka et Peichová, 2002).

Mimo toto rozdělení stojí Alzheimerova choroba, která svými vlastnostmi nespadá do charakteristiky žádné skupiny. V mozku chorobou postiženého jedince vznikají minimálně dva druhy agregátů ze špatně štěpeného β -amyloidního prekurzorového proteinu. Těmito agregáty jsou chybně složený cytoskeletární protein tau a fragmenty membránového proteinu β -APP tvořící plaky (Kovacs, 2016).

Zmíněná klasifikace těchto chorob respektuje v názvosloví nejvýznamnější patofyziologické děje, a proto bývá v názvu zastoupen i klíčový protein. I přes obrovské množství určených modifikací proteinů se v molekulární klasifikaci onemocnění spoléhá na určení místa jejich uložení, distribuci v mozku a vzájemný vztah s klinickými příznaky spolu s určitými genetickými změnami v organismu. Jako další aspekt klasifikace založené na neuropatologii vnímáme fakt, že mnoho bílkovinných uložišť má dominantní vliv na určité mozkové oblasti. Tato skutečnost byla prokázána u Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby a některých forem tauopatie (Kaňovský, 2005; Kovacs, 2016).

4.2.1. Vybraná NDO

Jak již bylo zmíněno, mezi taupatie řadíme progresivní supranukleární obrnu. Jedná se o sporadické onemocnění, které se vyznačuje dopaminerním deficitem postsynaptického charakteru. Klinický projev je charakterizován parkinsonským syndromem s akcentovanou rigiditou bez charakteristického třasu, posturální nestabilitou, která s postupujícím onemocněním způsobuje časté pády. Dále se vyznačuje kognitivním deficitem, zpočátku se projevující dysfunkcí plynulosti řeči či rychlou výbavností slov. Postupem času se deficit vyvíjí přes poruchy pozornosti až v demenci subkortikálního typu, provázející poruchy prostorové orientace, výbavnosti vykonaných činností či apatií (Kaňovský, 2005).

Kortikobazální degenerace neboli CBDG je vzácné neurodegenerativní onemocnění, řadí se také mezi taupatie. Díky velmi typickým klinickým projevům bývá poměrně snadno diagnostikováno. Projevuje se jednostrannou kortikální atrofií způsobující hemianestézie, hemihypestézie, hemidysestézie, postižení končetin či kortikální třes. Demence u tohoto onemocnění má poměrně rychlý postup a udává se, že do tří let postihne 100 % pacientů. Odhadem je touto poruchou postihnuto asi 0,5 % pacientů s parkinsonskými symptomy (Kaňovský, 2005).

Do další zmíněné skupiny synukleinopatií, patří Parkinsonova choroba (PD). Zmíněné onemocnění je charakteristické třesem končetin a s jeho postupem dochází ke stále větší nemožnosti kontroly nad pohyby těla. Třes se stává výraznější, pohyb se obtížně zahajuje, je velmi pomalý a bývá doprovázen svalovou rigiditou. V případě PD jsou postiženy neurony v mozkové oblasti, která je zodpovědná za produkci noradrenalinu a jeho hladina rapidně klesá. V důsledku toho, se v postižené oblasti hromadí pigment neuromelanin, který je redoxně aktivní (Zecca et al., 2003). Mimoto se s rozvojem onemocnění shlukují v mozku další k oxidaci náchylné agregované proteiny. Výskyt těchto sloučenin napovídá o pravděpodobně možné návaznosti na využití látek se zvýšenou antioxidační aktivitou. Z většiny případů je PD spontánním onemocněním, avšak vzácně již došlo ke geneticky podmíněnému výskytu u mladších osob. Stále však není jasné, co je příčinou nástupu onemocnění (Tauchen, 2016).

Dalším zástupcem z této kategorie je onemocnění známé jako demence s Lewyho tělísky neboli DLBD (diffuse Lewy body disease). Pravděpodobně se jedná o druhé nejvyskytovanější neurodegenerativní onemocnění projevující se demencí a lze jej označit za difuzní mozkovou atrofií. Choroba se vyznačuje výskytem Lewyho tělísek v mozku někdy společně s depozity senilních plaků a β -amyloidu. Avšak výskyt neurofibrilárních klubek je

spíše vzácný, což je hlavním rozlišovacím znakem vůči Alzheimerově chorobě. Charakteristickým projevem DLBD jsou demence, poruchy kognitivních funkcí, bezpříčinné pády, synkopy a neuroleptická senzitivita. K jasné diagnóze je však potřeba výskyt ještě jednoho z příznaků: Vizuální halucinace, Fluktuační kognitivních příznaků, či parkinsonská motorická symptomatologie (Kaňovský, 2005).

Do další uvedené kategorie TDP-43 proteinopatií spadá následující onemocnění, amyotrofická laterální skleróza (ALS). U onemocnění byl prokázán spontánní i genetický původ, přičemž pouze 10 % případů je podmíněno dědičně (Casoni et al., 2005). Choroba se projevuje degenerací motorických neuronů, což u pacientů způsobuje v počátcích bezbolestnou svalovou slabost a zhoršený tonus časem vedoucí k atrofii, problémy s řečí a polykáním. K úmrtí dochází v důsledku svalové paralýzy, která může zapříčinit například fatální selhání dýchacích orgánů. Onemocnění má velmi rychlý vývoj a k úmrtí dochází často již pár let od prvních příznaků, které se průměrně objevují kolem 57. roku života (Halliwell, 2006).

Huntigtonova choroba (HD) patří do skupiny dědičných onemocnění. Jedná se o mutaci genu na chromozomu 4, který kóduje protein huntigtin. Funkce tohoto proteinu není stále naprosto jasná, nicméně jeho zmutovaná forma se vyznačuje neurotoxicitou, tendencí k tvorbě ubikvitinových inkluzí a agregací. Obvyklý vývoj onemocnění je progresivní a může trvat více než 20 let života, přičemž k prvním projevům většinou nedochází před dosažením 30 let (Huntington, 2003). HD způsobuje řadu psychických obtíží, demenci, svíjení a další mimovolní pohyby (Tauchen, 2016).

Jako poslední, s ohledem na experimentální část práce nejpodstatnější, Alzheimerova choroba (AD). Jedná se o nejobvyklejší formu demence, klasifikovanou jako progresivní neurodegenerativní poruchu (Guzior et al., 2014). V tomto případě dochází k synaptickému poškození až ztrátě neuronů v několika oblastech mozku. Konkrétně v hippocampu a bazálním předním mozku, jejichž funkcí je podpora učení a paměti. Zmíněné poškození pak způsobuje pokles kognitivních funkcí včetně komunikace, paměti, sociálního chápání, kontroly emocí a může vést až k neschopnosti samostatného života (Tauchen, 2016). Na projev a průběh onemocnění má velmi silný vliv věk. Odhaduje se, že postihuje asi 6 % osob starších 65 let, což tvoří asi 35 milionu pacientů na celém světě s AD. Za předpokladu, že se průměrný věk populace bude nadále zvyšovat, poroste i počet pacientů s diagnostikovanou AD, jejíž účinná léčba zatím není k dispozici (Guzior et al., 2014).

Klíčový vliv na výskyt a vývoj onemocnění má genetika, ale známe již i další činitele s vysokým vlivem, mezi které můžeme zařadit vysokou hladinu cholesterolu v krevní plazmě, chudou skladbu potravy, zejména nedostatek kyseliny listové, nedostatečnou mozkovou aktivitu, případně malé opakované mozkové příhody. Charakteristickým znakem AD jsou tzv. senilní plaky, vyskytující se v degenerujících částech mozku. Jsou tvořeny z agregovaných β -amyloidních peptidů ($A\beta$) obklopených degenerujícími axony, neurony a gliemi. Jejich výskyt je v mozku starších osob naprosto běžným jevem, avšak v mozku pacientů s AD se jejich množství 5 až 100 násobí (Piccini et al., 2005). Mimo to $A\beta$ proteiny produkují reaktivní oxidační druhy (ROS), které dále v mozku mohou způsobovat oxidační stres a následnou neurotoxicitu a poškození synapsí (Abramov et al., 2004).

4.3. Léčba

Zvyšující se počty jedinců trpících neurodegenerací často spojenou s demencí, vyvolávají potřebu nových léků a stále trvajících výzkumu. Největší problémy nyní dostupných léčiv jsou jejich závažné vedlejší účinky a jejich velmi nízká účinnost, která způsobuje pouze zpomalení průběhu onemocnění, nikoliv jeho úplnou léčbu (Guzior et al., 2014).

U jedinců postižených demencí, a její nejčastější formou Alzheimerovou chorobou, dochází k postupnému poklesu kognitivního vývoje (Adewusi et al., 2011). Demence se objevuje také v pozdějších stádiích Parkinsonovy choroby a provází frontotemporální atrofii neboli Pickovu nemoc, či demenci s Lewyho tělisky. Onemocnění je progresivní a je důsledkem ukládání neurofibrilárních klubek intracelulárně a extracelulárního hromadění β -amyloidových plaků. Tyto látky mají za následek neurotoxicitu a ztráty synapsí (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

4.3.1. Konvenční léčba

V současné době je schváleno a předepsáno léků na léčbu Alzheimerovy demence pět. Patří mezi ně kompetitivní nebo reverzibilní inhibitory enzymu acetylcholinesterázy, které katalyzují rozpad neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a acetát (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Navíc vzniká nízká hladina acetylcholinu degenerací cholinergních neuronů, což vede k behaviorálním, kognitivním a funkčním symptomům AD. Inhibicí se koncentrace acetylcholinu zvyšuje, což urychluje cholinergní přenos (Guzior et al., 2014). Jedná se o donepezil, galantamin, rivastigmin a huperzin A (v Číně je schválen jako léčivo AD, zatímco v USA jako doplněk stravy). Některé z těchto látek byly dříve využívány jako insekticidy a chemické zbraně (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Nejedná se však o totálně syntetické látky, neboť některé z těchto inhibitorů se získávají z přírodních produktů semi-syntézou. Například galantamin se běžně vyskytuje v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Konkrétně je izolován z některých druhů rodu sněženky (*Galanthus spp.*) (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Další vlastností galantaminu je schopnost regulace acetylcholinových receptorů pro nikotin (Guzior et al., 2014).

Z rostliny *Physostigma venenosum* se také izoluje cholinesterázový inhibitor, fyzostigmin. Jeho praktické využití v terapii je však silně omezeno krátkým poločasem rozpadu a úzkým terapeutickým indexem látky. Nicméně byl vyvinut karbamátový analog rivastigmin, u kterého byly tyto problémy potlačeny (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Mimo inhibice acetylcholinesterázy se rivastigmin navíc vyznačuje schopností blokovat butyrylcholinesterázu (Guzior et al., 2014).

Další látka, seskviterpenový alkaloid hupezin A, se získává z rostliny tradičně využívané v čínské medicíně k léčbě horečky, zánětu, poruch krve a schizofrenie. Jedná se o rostlinu *Huperzia serrata* z čeledi plavuňovitých (*Lycopodiaceae*) (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Poslední schválený lék s názvem memantin hraje roli nekonkurenčního antagonisty receptoru N-methyl-D-asparát (Guzior et al., 2014). Mění mozkovou odpověď na glutamát,

který funguje jako chemický posel u všech funkcí mozku, jako jsou učení a paměť. Při nadměrné stimulaci N-methyl-D-asparátu dochází k uvolňování většího množství vápníkových iontů do buněk, které následně způsobí neuronální poškození až smrt (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Avšak žádný z uvedených léků neprokázal dostatečnou terapeutickou účinnost a dlouhodobou snášenlivost u velkého množství pacientů (Guzior et al., 2014). A to z důvodu nízké biologické dostupnosti, hepatotoxicity a neselektivity vedoucích k nežádoucím účinkům, jako jsou závratě, průjem a zvracení. U přibližně poloviny případů s AD došlo pouze k potlačení symptomů a dočasnému poklesu kognitivních funkcí, nikoliv k léčbě nemoci jako takové. Bohužel u pokročilejších stádií je účinek ještě menší. V současné době tedy bohužel neexistují žádné léky zpomalující, nebo úplně zastavující průběh Alzheimerovy choroby (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Nedostatečnost těchto léků může být mimo jiné způsobena také přítomností dvou typů cholinesteráz v mozku savců. Kromě již zmíněné acetylcholinesterázy se na cholinergní neurotransmisi hydrolyzou acetylcholinu podílí ještě butyrylcholinesteráza (Guzior et al., 2014). Oba enzymy mají velmi podobnou strukturu, ale liší se afinitou k substrátům, katalytickou aktivitou a šířením v mozku (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

Acetylcholinesteráza je hlavním hydrolytickým enzymem acetylcholinu, zatímco butyrylcholinesteráza má pouze podpůrnou funkci ve zdravé mozkové tkáni. Avšak s postupující AD se zvyšuje aktivita BuChE, což kompenzuje nedostatek AChE a reguluje cholinergní neurotransmii. Zároveň BuChE dle posledních studií reguluje hladinu acetylcholinu v CNS, a tím ovlivňuje motoriku, chování, rozeznávací schopnosti a vědomí (Guzior et al., 2014).

Navíc se AChE vyskytuje společně s β -amyloidy v neuritických placích, kde urychluje tvorbu β -amyloidních vláken a tvoří s nimi stabilní komplexy (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Mimoto je periferní aniontové vazebné místo (PAS) AChE zapojeno do přeměny β -amyloidu vedoucí k jeho agregaci a tvorbě vláken. Proto můžeme inhibitory duálního vazebného místa AChE (reakce s CAS i PAS) považovat za látky zabraňující hromadění β -amyloidu (Guzior et al., 2014).

Nejnovější výzkumy se věnují především vývoji komplexnějších léků, tzv. MTDL (Multi-Target-Directed-Ligands), se strategií mnohonásobných ligandů (MLS). Zatímco do této doby dominovalo dogma „jeden cíl – jeden lék – jedno onemocnění“, nyní jde o molekuly, které umožňují interakci s více než jedním cílem v patogenezi AD. Této strategii lze dosáhnout spojením více molekul s vysokou účinností pro různé cíle, nebo jedním činidlem regulujícím více cílů současně (Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

MTDL zkoumané pro léčbu AD obsahují obvykle inhibitory dvojího vazebného místa cholinesterázy a současně zabraňují hromadění β -amyloidu, blokují vápníkové kanálky, brání NMDA receptory nebo mají antioxidační účinky. Nejběžnější cíle při vývoji MTDL léků jsou acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, β -sekretáza, β -amyloid a monoaminoxidáza. Kromě toho také látky vykazující antioxidační a nervy chránící účinky, chelatační vlastnosti, či uvolňující oxid dusičitý (Guzior et al., 2014).

Většina těchto ligandů je biologicky aktivní v in vitro podmínkách, a proto musí být ověřeny ve studiích s vyšší mírou prokazatelnosti, jako jsou zvířecí modely a klinické studie. Avšak některé sloučeniny vykazují i vhodnou in vivo aktivitu, dokonce i při klinických

studiích, jako například sloučeniny takrinu, ladostigil, či memoquin (Guzior et al., 2014). Takrin je asi nejběžnější strukturou tvořící kostru MTDL, díky jeho velmi aktivní inhibici cholinesterázy a také řadě hybridních sloučenin obsahujících fragmenty donepezilu, galantaminu nebo memantinu (Agatonovic-Kustrin et al., 2018). Existuje také velké množství látek, obsahujících strukturální fragmenty získávané z přírodních zdrojů. Patří mezi ně řada přírodních alkaloidů, flavonoidů, či jiných látek, jako jsou chalkon, kumarin, huprin, kurkumin, rhein, berberin, či deriváty resveratrolu (Guzior et al., 2014).

4.3.2. Alternativní léčba

Jak již bylo zmíněno, momentálně používaná léčba se vyznačuje nízkou snášenlivostí pacientů, zejména v oblasti trávicího traktu, a problémy s biologickou dostupností. A proto mnohé výzkumy hledají řešení v přírodních produktech obsahujících acetylcholinesterázové inhibitory a přírodní antioxidanty s vyšší účinností a menšími negativními dopady (Adewusi et al., 2011).

Této problematice se věnuje tzv. doplňková a alternativní medicína neboli CAM (complementary and alternative medicine), která využívá směsí fytochemikálií přítomných v rostlinných extraktech. Díky tomu, může být dosaženo lepších výsledků v porovnání s jednosložkovými náhodně syntetizovanými léčivy. Uměle vytvořené molekuly jsou velmi často prostorově méně složité a pochází z omezeného počtu rodičovských molekul než metabolity přirozeného původu. Předmětem fytomedicínského výzkumu byla převážně terapeutická role přírodních antioxidantů, jako jsou flavonoidy, alkaloidy, triterpeny, saponiny a polyfenoly (Parvez, 2017).

Akumulace oxidačních sloučenin, převážně volných radikálů a jiných reaktivních oxidačních druhů (ROS), způsobuje oxidaci biomolekul, což může následně způsobit buněčné poškození. Jeho důsledkem může být vliv na stárnutí buněk a v důsledku toho mají oxidační stres a produkce ROS podíl i na patogenezi Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Adewusi et al., 2011). Mimo jiné se CAM prokázala jako velmi vhodná u pacientů vyššího věku, v případech zvýšeného rizika při podstoupení anestezie, u jedinců s neurologickými lézemi, či s jiným stavem znemožňujícím konvenční léčbu. Přírodní sloučeniny a antioxidanty stimulační a zklidňující nervový systém jsou v těchto rizikovějších případech obdobně důležité jako látky s protizánětlivými účinky (Parvez, 2017).

Mezi aktuálně velmi slibné přírodní látky používané a zkoumané jako CAM ke zmírnění a léčbě neurodegenerativních poruch řadíme: kofeinol, kofein, alkaloid trigonelin, bajkalein, wogonin, ginsenosidy, rensheň shouwu, tanshinony, withanolidy, pikrosidy, parthenolid, extrakty harpagofytu ležatého a vrby bílé, tetrahydrokanabinol a kanabiny, naringenin a kvercetin, piperin, berberin a poněkud kontroverzní shogaol, kurkumin, resveratrol a další. Tyto látky jsou často kombinované v níže zmíněných přírodních přípravcích testovaných pro zmírnění příznaků NDO, ale i dalších nemocí (Parvez, 2017).

Kafeinol je směsí kofeinu a ethanolu. V experimentálních modelech se v malých koncentracích projevil jako silný reduktant poškození mozku a je nyní klinicky testován. V budoucnu by tedy mohl být vhodný pro léčbu pacientů s mozkovou mrtvicí, ale je třeba brát v potaz jeho sníženou účinnost v případě pravidelného příjmu alkoholu (Parvez, 2017).

Mezi účinné složky kávových (*Coffea sp. f. Rubiaceae*) zrn patří kofein a trigonelin. Tyto látky prokázaly své neuroprotektivní účinky a byl potvrzen vliv vyšší konzumace kávy na průběh Parkinsonovy choroby, zpomalení jejího postupu a její prevence. Také trigonelin prokázal v experimentálním prostředí roli stimulantu uvolňování dopaminu v kultivovaných buňkách feochromocytomu (Parvez, 2017).

V tradiční čínské medicíně využívaná bylina huang qin neboli šišák bajkalský, obsahuje látky bajkalein a wogonin, které také vykazují protizánětlivé a antioxidační účinky. Bajkalein prokázal svou neuroochranou schopnost v in vitro podmínkách při zkoumání lipázou způsobeného poškození dopaminergních neuronů svým oslabujícím účinkem volných radikálů. Zatímco wogonin způsobuje inhibici mikrogliální aktivity v in vitro i in vivo podmínkách. Mikrogliální aktivace má kritický vliv při vzniku patogenních zánětů u neurodegenerací. Neuroprotektivní účinek těchto látek spočívá ve změně klidového potenciálu buněčné membrány i za patogenních podmínek. Navíc v případě kultivace kortikálních buněk potkanů projevil extrakt z šišáku ochranu proti excitotoxické smrti neuronů (Parvez, 2017).

Další důležitou čínskou bylinou je hojně využívaný ženšen (*Panax sp. f. Araliaceae*). Jedny z nejpoužívanějších izolovaných složek této byliny jsou velmi nadějně neuroprotektivní látky nazývané ginsenosidy. Můžeme je rozdělit do dvou hlavních skupin na protopanaxadioly (PPD) a protopanaxatrioly (PPT). Neuroochranná role ženšenu je dána schopností regulace neurozánětlivých procesů, uvolňování neurotransmiterů a synaptické plasticity. U frakcí ginsenosidů řady Rb byla v případě potkaního modelu s neurodegenerací prokázána ochranná funkce působící na glie, neurony a kognitivní funkce jedince. Nedávné studie rovněž prokázaly léčebné účinky ginsenosidů proti neurozánětům, mozkovému oxidativnímu stresu a apoptóze. Pozdější výzkum poukázal také na protineurozánětlivé působení ženšenových oligosacharidů na kognitivní poškození způsobené skopolaminem. Jistý ženšenový extrakt zvyšuje regulaci acetylcholintransferázy a tím zkvalitňuje kognitivní funkce. Ginsenosidy mají také při chronickém snížení prokrvení mozkové tkáně pozitivní vliv na kognitivní zhoršení skrz neurotrofické mozkové faktory regulované epigenetickou modulací. V případě Alzheimerovy choroby na potkaním modelu byl zjištěn na signální dráze hypokampu neuroprotektivní vliv ženšenových proteinů (Parvez, 2017).

Čínské kapsle prodávané pod názvem Renshen Shouwu (RSSW), prokázaly účinky při zlepšení paměti, apoplexií a ztrátách paměti. Tyto kapsle mají patentované složení z kořenů rdesna mnohokvětého (*Polygonum multiflorum f. Polygonaceae*) a ženšenu. Na základě výzkumů je RSSW navržena jako prevence a léčba vaskulární demence, ischemie či reperfuze (Parvez, 2017).

Ženšen se nachází také v dalším tradičním čínském léčivu Shen-Mai-San. Jde o směs ženšenu pravého (*Panax ginseng f. Araliaceae*), klanoprašky čínské (*Schisandar chinensis f. Schisandraceae*) a sedoulku japonského (*Ophiopogon japonicus f. Asparagaceae*). Byl prokázán její vliv při léčbě rakovinou způsobené bolesti a únavy a oxidativního poškození u potkanů (Parvez, 2017).

Červená šalvěj (*Salvia miltiorrhiza f. Lamiaceae*) obsahuje sloučeninu tanshinon IIA, která vykazuje protizánětlivé, neuroprotektivní a imunoregulační účinky. Nedávno byl u potkanů s autoimunitní encefalomyelitidou prokázán terapeutický vliv tanshinonu IIA u roztroušené sklerózy. Zvířata léčená TSIIA vykazovala výrazné zlepšení klinických příznaků

a patologických změn, včetně infiltrace zánětlivých buněk centrální nervové soustavy a demyelinizace (Parvez, 2017).

Ajurvédská rostlina vitánie snodárná (*Withania somnifera* f. *Solanaceae*) rostoucí v Indii je v sanskrtu nazývána ashwagandha neboli „síla koně“. Její hlavní léčebnou složkou jsou látky zvané withanolidy. Byl u nich prokázán účinek v mikrogliálních buňkách oslabující oxidativní a zánětlivé reakce. Dokonce u jedné z nejvíce bioaktivních složek, withaferinu A, se předpokládá možnost využití proti mozkovým nádorům (Parvez, 2017).

Rostliny rodu kutki (*Picrorhiza* f. *Plantaginaceae*) byly tradičně využívány k léčbě několika onemocnění díky jejich antioxidantním a protizánětlivým účinkům. Jedna z neúčinnějších látek obsažená v kořenech se nazývá pikrosid II. Této látce byl prokázán neuroochranný a protizánětlivý vliv v případě mozkové ischemie potkanů, včetně zvýšení růstu buněk axonů. Je pravděpodobné, že výtažky kutki způsobují u potkanů trpících odkrvením mozku inhibici buněčné apoptózy (Parvez, 2017).

Extrakt z řimbaby obecné (*Tanacetum parthenium* f. *Asteraceae*) bohatý na aktivní látku parthenolid, je rostlinný lék proti bolestem hlavy a migréně. Klinické studie prokázaly, že lze snížit frekvenci a závažnost migrénových záchvatů pomocí kapslí se sušenými listy řimbaby (Parvez, 2017). Další studie dokázaly schopnost extraktu řimbaby inhibovat AChE a BuChE v laboratorních podmínkách, což jsou poměrně slibné výsledky pro možnost budoucího využití v CAM neurodegenerativních onemocnění. Dle dané studie však dochází k silnější inhibici BuChE než AChE a také má velmi silný vliv způsob přípravy testovaného extraktu (Zengin et al., 2020).

Dlouhou historii v lidové medicíně má také tzv. ďáblův dráp (*Harpagophytum Procumbens* f. *Pedaliaceae*) a kůra vrby bílé (*Salix alba* f. *Salicaceae*). Využívaly se jako přírodní analgetika proti bolesti zad, antipyretika a proti zánětům. Výzkum potvrdil jejich pozitivní krátkodobý vliv i na chronickou bolest zad (Parvez, 2017).

Konopí seté (*Cannabis sativa* f. *Cannabaceae*) a v něm obsažené látky THC neboli tetrahydrokanabinol a kanabinoidy jsou sice často zneužívány jako drogy, přesto byl u nich prokázán léčebný účinek. Tyto látky snižují různé formy bolesti hlavy, a kromě toho napomáhá inhalace THC účinnému snížení bolesti způsobené diabetickou neuropatií. Při péči o pacienty s nevléčitelnými nemocemi nebo rakovinou se využívá kanabinoidů pro snížení bolesti (Parvez, 2017).

Další výzkumy se zabývají přírodními látkami naringeninem, kvercetinem a piperinem. Potencionálně by mohly vykazovat více farmakologických vlastností, jako například protizánětlivé, antioxidantní a antihypersenzitivní účinky. Laboratorně již bylo zjištěno, že naringenin zvyšuje množství serotoninu, norepinefrinu a z mozku a glukokortikoidních receptorů odvozeného neurotrofického faktoru, čímž vykazuje slibný potenciál jako antidepresivum. Zatímco kvercetin a od něj odvozené látky prokázaly možnost kladného působení na lidskou psychiku skrze proopiomelanokortin a neuroochranné účinky včetně potlačení prozánětlivých cytokininů (Parvez, 2017).

Alkaloidy piperin a berberin mají také své místo v alternativní medicíně. První z nich, piperin, inhibuje enzym monoaminoxidáza a zvedá hladinu serotoninu a norepinefrinu v mozku, čímž ovlivňuje osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny. Berberinu, patřícímu do skupiny protoberberinových benzylochinolinových alkaloidů, byl v několika studiích prokázán dopaminergní, serotonergní a noradrenergní účinek (Parvez, 2017).

V případě některých aktivních látek se objevují velmi kontroverzní názory, výzkumy i jejich výsledky. Mezi takové rostliny patří například kurkuma (*Curcuma longa* f. *Zingiberaceae*). Na jednu stranu je vnímána jako další významný druh pro alternativní léčbu NDO. Získává se z ní polyfenolová sloučenina kurkumin, která v laboratorních podmínkách vykazuje protizánětlivé, antioxidantní, protirakovinné a antiapoptické účinky; nicméně dodnes tyto účinky nebyly dostatečně potvrzeny klinickými studiemi (Parvez, 2017). Představuje však svým ochranným a preventivním účinkem velký potenciál proti různorodým onemocněním, jako jsou například neurologické (včetně Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby), autoimunitní, metabolické, plicní, jaterní a kardiovaskulární onemocnění a v neposlední řadě v prevenci rakoviny (Kocaadam et Şanlıer, 2017).

Avšak jiná studie (Baker, 2016) dokazuje, že přestože kurkumin vykazuje v laboratorních podmínkách dobré výsledky, terapeuticky je nevyužitelný. Toto tvrzení je závěrem výzkumu cíleným na proteinové vazebné místo potenciálního léčiva. Dané laboratorní metody využívají jako důkaz vzniklé vazby aktivní látky na konkrétní protein fluorescenci. Avšak některé látky, jako právě například kurkumin, pravděpodobně poskytují zavádějící výsledky, neboť se zdá, že k fluorescenci dochází přirozeně. I přes tento důkaz je kurkumin a jemu podobné látky nadále testován v optimistické naději na možné terapeutické využití. Odborně jsou tyto sloučeniny nazývány jako PAINS (pan-assay interference compounds) a je tedy velmi důležité věnovat principu jejich reakce v dalších výzkumech náležitou pozornost, neboť díky tomu lze předejít zavádějícím výsledkům.

Dalším obdobným druhem může být zázvor (*Zingiber officinale* f. *Zingiberaceae*), který obsahuje mimo jiné aktivní látku 6-shogaol. Ta prokázala v testech s buněčnými modely při aktivaci mikroglií protizánětlivé účinky a významnou inhibici tvorby volných radikálů. Kromě toho se zdá, že inhibuje také syntézu prostaglandinu a prozánětlivých cytokinů (Parvez, 2017).

Jiná sporná polyfenolitická sloučenina, nacházející se v červeném víně a hroznech, se nazývá resveratrol. Byla zkoumána jako léčivo Parkinsonovy choroby, z důvodu předpokladu protizánětlivého, antioxidantního a antiapoptického účinku. Je možné, že resveratrol má kromě výše zmíněných na kultivované dopaminergní neurony také neurotrofický účinek (Parvez, 2017).

V poslední době se zájem o alternativní způsob léčby a využívání přírodních produktů při neurologických poruchách rapidně zvyšuje. I přesto bylo zatím prozkoumáno jen malé množství těchto látek pro jejich funkční mechanismy a mnohé stále podléhají klinickým výzkumům. Avšak je třeba neopomenout fakt, že některé přírodní látky mohou mít velmi silné účinky a tím způsobenou interakci s konvenčními léky, která může způsobit vážné následky, jako například změnu krevního tlaku, hepatotoxicitu, či záchvaty. Je proto vždy potřeba konzultovat vhodnost léčby s odborníkem (Parvez, 2017).

Nicméně CAM by měla být nedílnou součástí léčby u pacientů s diagnostikovanou neurodegenerativní poruchou. Avšak je velmi důležitá správná diagnóza a individuální přístup k pacientům a k jejich predispozicím. Je ale zapotřebí ještě hodně výzkumů a práce pro zajištění vhodné terapie a péče o pacienty ve zdravotnických ústavech (Parvez, 2017).

4.4. Tradiční léčivé rostliny z Amazonie

Z důvodu výše zmíněných poznatků byl při výběr rostlinných extraktů pro účely této studie zaměřen na druhy s etnomedicinální historií, dříve zjištěnou antioxidační aktivitou a prokázaným obsahem alkaloidních látek. Konkrétně se jedná o druhy využívané v tradiční peruánské folklorní medicíně k léčbě rakoviny a jiných chorob, u kterých nedávná studie hodnotí antioxidační a antiproliferační aktivitu. V této studii byly methanolové extrakty vybraných osmi rostlinných druhů zkoumány in vitro na obsah alkaloidů a fenolových sloučenin. Zároveň bylo cílem studie charakterizovat látky způsobující pozorovaný antioxidační a protirakovinný potenciál (Tauchen et al., 2019). Konkrétně se jedná o extrakty z rostlin *Alternanthera brasiliana* (f. *Amaranthaceae*), *Alternanthera flavescens* (f. *Amaranthaceae*), *Ayapana triplinervis* (f. *Asteraceae*), *Dysphania ambrosioides* (f. *Amaranthaceae*), *Eleutherine bulbosa* (f. *Iridaceae*), *Mansoa alliacea* (f. *Bignoniaceae*), *Petiveria alliacea* (f. *Petiveriaceae*), *Phyllanthus niruri* (f. *Phyllanthaceae*) (Tauchen et al., 2019).

Alternanthera brasiliana je bylinná rostlina z čeledi *Amaranthaceae* hojně rozšířená v tropických zemích s původem v Jižní Americe. V tradiční medicíně se využívá převážně k hojení řezných ran, modřin, vředů, proti zánětům, kašli, průjmům a horečce. U rostlinného extraktu byly farmakologickými výzkumy a daty potvrzeny antimikrobiální, analgetické, antivirové účinky (Das et Tribedi, 2015) a antioxidační, fotoprotektivní a antiproliferační aktivita. Tyto účinky jsou připisovány přítomnosti různých chemických složek identifikovaných v rostlině, mezi nimiž jsou flavonoidy, u kterých se většinou jedná o glykosylované flavony, betalainy v podobě betacyaninů, zaručujících charakteristickou barvu některých druhů z dané čeledi (Alencar Filho et al., 2020) a dále alkaloidy, glykosidy, fenoly a saponiny (Das et Tribedi, 2015). V další studii byla prokázána produkce analgetických sloučenin kalusovými kulturami, zejména steroidů a terpenů (Macedo et al., 2004). V rámci histopatologického výzkumu s potkany bylo dokázáno zrychlené ukládání kolagenu, proliferace fibroblastů, angiogeneze a vývoj bazální membrány v řezné ráně vlivem použití extraktu z rostliny. I díky tomu můžeme stanovit léčebný potenciál při hojení ran jako velmi významný (Barua et al., 2012). Nicméně je předpokládáno, že chemické složení druhů se liší v závislosti na stanovišti výskytu (Alencar Filho et al., 2020) a zároveň se významný vliv připisuje i druhu světla, u kterého byl dokázán vliv na produkci sloučenin s analgetickým účinkem (Macedo et al., 2004).

Další vybranou rostlinou z rodu plevuněk (*Alternanthera sp.*) je druh *A. flavescens* známá též pod názvem *Alternanthera ramosissima* (Smith, 2018). Rostlina je tradičně v peruánské folklorní medicíně využívána proti horečce a při léčbě ran (Tauchen et al., 2019b). Po screeningu bioaktivit vzorku na cytotoxicitu proti rakovinným buňkám, protizánětlivou, antimikrobiální a anti-acetylcholinesterázovou aktivitu byl vytipován potenciál pro cytotoxicitu proti rakovinným buňkám a protizánětlivou reakci. Avšak při následných testech se potvrdila pouze potencionální protizánětlivá aktivita (Chester et al., 2017). Nicméně tento druh nebyl zatím příliš podrobně analyzován, a i z tohoto důvodu byl zahrnut do výběru.

Keř s původem v amazonském deštném pralese, dorůstající až jednoho metru, je známý jako *Ayapana triplinervis*, či *Eupatorium triplinerve*. Řadí se do čeledi hvězdnicovitých (f. *Asteraceae*) a pro své účinky je tradičně využívaný domorodými kmeny Jižní Ameriky.

Prostřednictvím koupelí, infuzí odvarů a čajů z listů je používán jako sedativum, stimulant, proti horečce či zánětům v brazilské tradiční medicíně (Begum et al., 2010). Rostlinný extrakt se navíc využívá jako antiseptikum při léčbě vředů a krvácení, anxiolytikum a antidepresivum. Antimikrobiální účinek metanolového extraktu je s největší pravděpodobností způsoben vlivem přítomností depsidonů, kumarinů, saponinů a triterpenů, v hydroalkoholickém extraktu jsou navíc přítomny i redukující cukry, alkaloidy, fenoly, taniny a deriváty seskviterpenových laktonů (Matos Lopes et al., 2015).

Paico, pazote, epazote, mexický čaj, mastruz či v Brazílii používané erva de Santa Maria. Pod těmito lidovými názvy se skrývá Merlík vonný neboli *Dysphania ambrosioides* (též *Chenopodium ambrosioides*), další vybraný druh z čeledi *Amaranthaceae* (dříve řazený k *Chenopodiaceae*). (Sá et al., 2016; Soares et al., 2017). Bylina je velmi rozvětvená, dosahuje výšky až 1 m a má silné typické aroma (Sá et al., 2016). Pro svou pronikavou chuť se tradičně využívá k ochucení fazolí a dalších jihoamerických pokrmů, avšak někdy bývá pěstována i jako listová zelenina (Soares et al., 2017). Druh pochází pravděpodobně z území Mexika, nicméně ho můžeme spatřit jako plevel rostoucí v celé Brazílii, v tropických a subtropických oblastech Ameriky a Afriky i v podnebných podmínkách evropského mírného pásma.

Jako hlavní složky byly v bylině identifikovány polyfenoly a terpeny (Sá et al., 2016), další fenolové sloučeniny a alkaloidy (Tauchen et al., 2019). Z listů rostliny se mimo jiné pro etnomedicinální využití získává esenciální olej, který obsahuje převážně monoterpeny, avšak jeho složení se může značně lišit, jak v zastoupení jednotlivých látek, tak v jejich samotném výskytu. V tradičním lidovém lékařství je daný olej využíván hlavně jako anthelmintikum k léčbě parazitických infekcí lidí, koček, psů a nepřežvýkavých hospodářských zvířat, ale i jako insekticid či antimykotikum (Soares et al., 2017). Listy jsou dále využívány při potížích s trávicím traktem, kosterních zlomeninách, bolestech svalů nebo se typicky v severovýchodní Brazílii rozmělní v mléce za účelem léčby chřipky. Z dřívějších výzkumů jsou dále u byliny známy analgetické, antipyretické, protizánětlivé (Sá et al., 2016), antivirotické a antiaflatoxigenní účinky (Soares et al., 2017). Mimoto byl u rostliny prokázán vliv na širokou škálu rakovinných buněk na základě kombinace vysoké antiproliferační a antioxidační aktivity. Předpokládá se, že tato skutečnost může být značně ovlivněna vysokým obsahem fenolových sloučenin a alkaloidů (Tauchen et al., 2019). Dle WHO (World Health Organization) je bylina a produkty z ní řazeny mezi nejpoužívanější fytotherapeutika v tradiční medicíně na světě (Sá et al., 2016).

Eleutherine bulbosa, rostlinný druh řadící se do čeledi *Iridaceae*, se peruánskými domorodci nazývá Yahuar Piri Piri (Tauchen et al., 2019). Tato cibulovitá rostlina má v Amazonii velmi široké etnomedicinální využití; používá se při výrobě obvazů na rány a vykloubené končetiny, jako tišící lék při ženských obtížích a menstruačních bolestech, či vývar z cibule proti krvavému průjmu a úplavici. Dále se využívá šťáva z cibulí pro zastavení krvácení a urychlení hojení ran, jako oční kapky proti zánětu spojivek nebo je přímo konzumována při problémech s žaludečními vředy a vnitřním krvácením (Duke et al., 2009). U rostliny byly potvrzeny antimikrobiální, protizánětlivé a antihypertenzní účinky a její extrakt vykazuje antioxidační aktivitu a inhibuje činnost řady bakterií. Tyto vlastnosti jsou připisovány převážně sekundárním metabolitům rostliny, které zahrnují flavonoidy, taniny, saponiny, chinony, steroidy, triterpeny, isocholiny, naftaleny a estery mastných kyselin.

V důsledku toho se spekuluje o její slibné antivirové a protirakovinové aktivitě (Munaeni et al., 2019) včetně rozlišení mezi účinků extraktů z nadzemích částí rostliny a cibulkou (Tauchen et al., 2019).

Původní rostlinou v amazonském deštném lese je révovitá rostlina keřovitého charakteru známá pod lidovým názvem Ajo sachá, což v překladu znamená falešný česnek. Tento název získala pro svou silnou česnekovou chuť a vůni, kvůli kterým se tradičně využívá i jako koření. Její systematický název je *Mansoa alliacea* a řadíme ji k čeledi *Bignoniaceae* (Taylor, 2017). V peruánské folklorní medicíně je hojně využívána proti bolestem zad, břicha, křečím, nachlazení, kašli, astmatu, chřipce, bolesti hlavy, epilepsii, malárii, nervozitě a nervovým šokům, kožním problémům, zánětům (Duke et al., 2009) a horečce (Hamann et al., 2019). Dále ji jsou připisovány analgetické, anti-artritické, antirevmatické, protizánětlivé a repelentní účinky (Duke et al., 2009). V rostlině byly již dříve izolovány bioaktivní chinony, lapachon s pravděpodobnou schopností inhibice reverzní transkriptázy a lapachol, který vykazuje potencionální protinádorovou aktivitu (Itokawa et al., 1992). Kromě toho rostlina obsahuje množství fenolů a triterpenů na jejichž podstatě již dřívější studie poukazují na možnou terapeutickou alternativu k léčbě artritidě a dalších zánětů bez nepříznivých vedlejších účinků (Hamann et al., 2019).

Systematickým názvem *Petiveria alliacea* se nazývá bylina z čeledi *Petiveriaceae* s tmavými kožovitými listy a drobnými bílými kvítky uspořádanými do klasu. Přirozeně se vyskytuje v oblastech amazonského deštného pralesa a tropů střední i jižní Ameriky, Afriky a Karibiku a dorůstá až do výšky 1 m. Má velmi silný česnekový zápach, a proto bývá nazývána česnekovou trávou. V peruánské Amazonii ji však identifikujeme dle tradičního názvu mucura (Taylor, 2017) a je široce využívána v lidové medicíně jako spasmolytikum, diuretikum, proti zánětům, při léčbě rakoviny a k regulaci imunitního systému. Tento názor je již několika studii podporován, neboť bylo potvrzeno, že rostlina přispívá ke zvýšení počtu granulocytů a makrofágů v kostní dřeni a zlepšuje funkci Th lymfocytů, čímž reguluje imunitní odpověď organismu. Avšak tato rostlina je toxická i pro lidský organismus, nicméně míra její toxicity se liší dle rostlinných částí a metod extrakce (García-Pérez et al., 2018). Mezi hlavní sloučeniny v bylině patří dibenzyltrisulfid a další sloučeniny síry, kterým jsou připisovány mnohé účinky, dále stigmasterol, benzyl-P-glukopyranosid, citronelol či phytol (Oluwa et al., 2017). V experimentální části jsme využili dvě variety této byliny, které však mají stejné systematické pojmenování, *Mucura hembra* a *Mucura macho* (Tauchen et al., 2019).

Chanca piedra znamená ve španělštině “rozbít kámen“ a jedná se o lidový název rostliny *Phyllanthus niruri* z čeledi *Phyllanthaceae*. Svůj název získala tato bylina pro svůj generacemi využívaný potenciál při léčbě žlučových a ledvinových kamenů v peruánské folklorní medicíně (Taylor, 2017). Kromě toho se však rostlina tradičně využívá při řadě zdravotních obtíží jako jsou kolika, cukrovka, malárie, úplavice, horečka, chřipka, žloutenka, nefróza, ale i rakovina, proti křečím a žaludečním bolestem a nadýmání, k podpoře trávení a problémy se střevními parazity (Duke et al., 2009). Fytochemické složení rostliny bylo již dříve podrobně popsáno vědeckými studii a víme tedy, že rostlina obsahuje množství bioaktivních látek. Patří mezi ně zejména alkaloidy, polyfenoly, taniny, flavonoidy, lignany, terpenoidy, antokyany, saponiny a kumariny (Chester et al., 2017; Jantan et al., 2019).

V hojném množství byla v rostlině dokázána přítomnost katechininu, kvercetinu a astraglandinu, kterým se přisuzuje schopnost regulace imunitního systému (Jantan et al., 2019). Dle dřívějších studií se dále předpokládá, že některé sloučeniny obsažené ve vodném roztoku mají potencionální účinky jako inhibitory acetylcholinesterázy a dokonce je očekávána specifická reakční vazba mezi těmito látkami a ligandem s komplexem acetylcholinesterázy (Chester et al., 2017). Dále se uvádí, že vodný extrakt rostliny má inhibiční účinek na DNA polymerázu virů žloutenky typu B a stimuluje produkci superoxidového anionu na studiích s myšimi vzorky (Duke et al., 2009). Mimo to se nadzemním částím rostliny dle dalších studií připisují protizánětlivé, hepatoprotektivní, diuretační, antiplasmodické, antihyperalgetické a antioxidační účinky.

5. Metodika

5.1. Výběr rostlinného materiálu

Rostlinný materiál byl pro následné testování inhibice vůči AChE vybrán na základě předešlých etnomedicinálních záznamů (Duke et al., 2009) a předešlé studie, kde tyto rostliny vykázaly slibný antioxidační potenciál a rovněž byl zjištěn jejich relativně bohatý obsah alkaloidních látek (Tauchen et al., 2019). Rostlinné vzorky (tabulka 1) byly zakoupeny na lokálních trzích v městě Pucallpa (Ucayali Region, Peru) v období mezi lednem a květnem 2015 a za účelem umožnění jejich pozdější identifikace byly také uloženy do herbáře místní univerzity (Universidad Nacional de Ucayali). Jako standardizovaný vzorek byl použit galanthamin, který je jedním z léků NDO využívaných klasickou medicínou a neostigmin, využívaný k léčbě onemocnění Myasthenia gravis na základě stimulace nervosvalové ploténky. Nomenklatura byla sjednocena dle Klíče ke květeně ČR.

Tabulka 1. Přehled vybraných rostlinných extraktů.

Č. vzorku	Latinský název	Čeleď	Triviální název	Rostlinná část
1	<i>Mansoa alliacea</i>	<i>Bignoniaceae</i>	Ajo sacha	nadzemní
2	<i>Petiveria alliacea</i>	<i>Petiveriaceae</i>	Mucura hembra	nadzemní
3	<i>Petiveria alliacea</i>	<i>Petiveriaceae</i>	Mucura macho	nadzemní
4	<i>Alternanthera brasiliana</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Lancetilla hembra	nadzemní
5	<i>Dysphania ambrosioides</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Paico	nadzemní
6	<i>Aypana triplinervis</i>	<i>Asteraceae</i>	Caigena	nadzemní
7	<i>Alternanthera flavescens</i>	<i>Amaranthaceae</i>	Lancetilla hembra (Chupa sangre)	nadzemní
8	<i>Phyllanthus niruri</i>	<i>Phyllanthaceae</i>	Chanca piedra	nadzemní
9	<i>Eleutherine bulbosa</i>	<i>Iridaceae</i>	Yahuar piri piri	nadzemní
10	<i>Eleutherine bulbosa</i>	<i>Iridaceae</i>	Yahuar piri piri	cibule

5.2. Chemikálie a reagenty

Acetylcholinjodid (ATCI), Acetylcholinesteráza (AChE) typu VI-S, z elektrického úhoře, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), galanthamin a neostigmin byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Organická rozpouštědla v analytické kvalitě jako například methanol (MeOH) byla pořízena u Penta Chemicals (Praha, Česká republika).

5.3. Příprava extraktů

Jednotlivé rostlinné vzorky byly vysušeny horkým vzduchem (50 °C). Rozemleté vzorky (2 g) byly následně extrahovány po dobu 72 hod ve 250 ml 80 % MeOH pomocí třepačky při pokojové teplotě. Extrakty byly zfiltrvány a odpařeny pomocí rotační vakuové odparky při teplotě vodní lázně 40 °C. Plně vysušené vzorky se opětovně rozpustily ve 100 % MeOH do výsledné koncentrace 51,2 mg/ml. Extrakty se posléze skladovaly při teplotě -80° C.

5.4. Inhibice acetylcholinesterázy

Inhibice aktivity acetylcholinesterázy byla stanovena s použitím Ellmanovy kolorimetrické metody modifikované Eldeenem a kol. (2005). Každý rostlinný vzorek byl napipetován po 25 µl do 96 jamkové mikrotitrační destičky vždy v koncentračních řadách o finální koncentraci od 4 do 512 µg/ml. Následně bylo přidáno do každé jamky 25 µl 15 mM vodného roztoku ATCI, 125 µl 3 mM DTNB ředěném v pufru C (50 mM Tris-HCl, pH 8, obsahující 0,1 M NaCl a 0,02 M MgCl₂*6H₂O) a 50 µl pufru B (50 mM Tris-HCl, pH 8, obsahující 0,1% hovězí sérový albumin-BSA). Poté byla destička ponechána na tmavém místě po dobu 5 minut. Závěrem bylo napipetováno 25 µl čerstvě připravené AChE (0,2 IU/ml) do všech jamek a naměřena absorbance při 405 nm. Galanthamin a neostigmin sloužili jako pozitivní kontroly dané metody. Koncentrace vzorku vykazující 50 % inhibici (IC₅₀) byla získána vnesením procentuální inhibice proti koncentraci extraktu. Každý test byl uskutečněn ve trojím provedení a konečné výsledky byly vyjádřeny pomocí průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou (průměr ± SD).

6. Výsledky

Výsledky prezentovány v tabulce 2 ukazují, že i přes vysoký potenciál vybraných extraktů odpovídaly konečné hodnoty IC_{50} u všech vzorků koncentracím vyšším než 512 $\mu\text{g/ml}$. V porovnání se známými konvenčními inhibitory galanthaminem a neostigminem, u kterých byly určeny výsledné koncentrace 2,347 $\mu\text{g/ml}$ pro galanthamin a 1,268 $\mu\text{g/ml}$ pro neostigmin odpovídající hodnotě IC_{50} , nebyly bohužel výsledky rostlinných preparátů plně dostačující.

Tabulka 2. Průměrné hodnoty IC_{50} pozitivních kontrol a rostlinných vzorků.

Vzorek	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	
Galanthamin	2,347	$\pm 0,282842712$
Neostigmin	1,268	$\pm 0,385373196$
Rostl. extrakty	>512	-

Výsledné hodnoty koncentrace vzorku vykazující 50 % inhibici enzymu byly získány z naměřených hodnot absorbance při 405 nm. Absorbance byly zapsány do tabulek 3 a 4 vždy k dané odpovídající koncentraci.

Tabulka 3. Naměřené absorbance při 405 nm rostlinných extraktů č. 1-5.

Koncentrační řada (µg/ml)	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
512	1,204	1,27	1,165	1,222	1,188	1,202	1,198	1,502	1,222	1,309
256	1,239	1,23	1,214	1,205	1,203	1,211	1,213	1,195	1,206	1,197
128	1,259	1,254	1,235	1,212	1,193	1,199	1,245	1,177	1,195	1,208
64	1,234	1,195	1,23	1,221	1,217	1,164	1,246	1,275	1,236	1,211
32	1,285	1,259	1,206	1,238	1,2	1,219	1,236	1,24	1,264	1,177
16	1,21	1,286	1,232	1,261	1,21	1,195	1,223	1,255	1,126	1,254
8	1,232	1,2	1,239	1,22	1,236	1,212	1,206	1,264	1,302	1,205
4	1,19	1,23	1,204	1,207	1,231	1,218	1,303	1,228	1,262	1,219

Tabulka 4. Naměřené absorbance při 405 nm rostlinných extraktů č. 6-10.

Koncentrační řada (µg/ml)	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
512	1,204	1,27	1,165	1,222	1,188	1,202	1,198	1,502	1,222	1,309
256	1,239	1,23	1,214	1,205	1,203	1,211	1,213	1,195	1,206	1,197
128	1,259	1,254	1,235	1,212	1,193	1,199	1,245	1,177	1,195	1,208
64	1,234	1,195	1,23	1,221	1,217	1,164	1,246	1,275	1,236	1,211
32	1,285	1,259	1,206	1,238	1,2	1,219	1,236	1,24	1,264	1,177
16	1,21	1,286	1,232	1,261	1,21	1,195	1,223	1,255	1,126	1,254
8	1,232	1,2	1,239	1,22	1,236	1,212	1,206	1,264	1,302	1,205
4	1,19	1,23	1,204	1,207	1,231	1,218	1,303	1,228	1,262	1,219

7. Diskuze

V této práci byla zkoumána schopnost inhibice aktivity enzymu acetylcholinesteráza v in vitro podmínkách pomocí extraktů ze specifických rostlin amazonského původu. U vybraných vzorků byl již dříve (Tauchen et al., 2019) zjištěn slibný antioxidační a antiproliferační účinek v laboratorních podmínkách. Zároveň byly v dané studii prokázány v rostlinných materiálech vysoké obsahy aktivních látek, jako jsou alkaloidy a fenolické látky, kterým se mohla připisovat, v této práci cílená, inhibice zmíněného enzymu. Kromě toho bylo při jejich výběru přihlíženo i na dlouhou a nezanedbatelnou tradici v peruánské folklorní medicíně.

I přes vysoký potenciál vybraných extraktů reprezentovaný velmi slibnou účinnou aktivitou a obsahem daných látek, nebyly výsledky, jak bylo již dříve zmíněno, rostlinných preparátů dostačující. Koncentrace vykazující aktivitu v případě vzorků léků galanthaminu a neostigminu byla mnohonásobně vyšší, a proto pravděpodobně v případě těchto vzorků nelze předpokládat ani možné praktické využití.

Důvodů, proč nedošlo k dostatečné inhibici by mohlo být více. Vysoký vliv mohl mít mimo jiné i způsob přípravy extraktů. Dle studie zabývající se různými metodami extrakce rostlinného materiálu (Zengin et al., 2020) bylo dokázáno, že vhodnost využití metody může mít vliv i na obsah a poměr účinných látek v extraktu, čímž značně ovlivní výslednou aktivitu.

V jiné dřívější práci obdobného charakteru (Adewusi et al., 2011) bylo při výzkumu reakce rostlinných extraktů v inhibici acetylcholinesterázy využito více variant rozpouštědel z nichž každé vykazovalo odlišné výsledné hodnoty. Dalším z důvodů negativních výsledných hodnot by mohla být možná interference mezi jinými obsahovými látkami v extraktech a základním principem dané metody. Potencionálně by bylo možné těmto reakcím zabránit v případě testování čistých izolovaných látek namísto extraktů.

Protože je acetylcholinesteráza velmi specifický enzym, ani její inhibice není příliš běžným účinkem přírodních aktivních látek (Roufogalis et Wickson, 1975). Jak bylo již dříve zmíněno, předpokládá se, že pro danou reakci je potřeba vysoký obsah alkaloidových a fenolických sloučenin v rostlině. Avšak i na základě výsledků této studie lze konstatovat, že ani vhodná kombinace antioxidačních a antiproliferačních účinků s vysokým obsahem aktivních alkaloidů a fenolických látek v extraktech není ani zdaleka dostačujícími znaky pro hodnocení pravděpodobnosti inhibice acetylcholinesterázy. I přesto, že tyto vlastnosti bývají často rozhodující při výběru vhodných vzorků, právě důsledkem velmi vysoké specifity tohoto enzymu mohou být tyto predikce značně zavádějící. V případě snahy o léčbu neurodegenerativních onemocnění a hledání nových a pro pacienty přijatelnějších látek se jedná o značnou komplikaci. Nicméně, kdyby byl v přírodních rostlinných látkách, respektive v potencionální potravě, vysoký výskyt acetylcholinesterázových inhibitorů, jednalo by se pravděpodobně o velmi silné jedy způsobující nervovou paralýzu v jejímž důsledku by došlo k akutnímu respiračnímu selhání a jisté smrti (Peña-Philippides et al., 2007). Jako konkrétní příklad lze uvést známou toxickou látku sarin. Organofosfátové nervové činidlo, které bylo již několikrát v minulosti využito k chemickým útokům jako nervové paralytikum v důsledku reakce s AChE.

Dle výzkumu Yiannopoulou a Papageorgiou (2013) zabývajících se novými trendy v hledání léků AD byl zájem pro změnu zaměřen na sloučeniny zabraňující agregaci A β plaků nebo τ -proteinu. Tato studie vycházela z hypotézy vzniku toxických oligomerů v důsledku agregace právě těchto sloučenin. Mezi slibné a dále klinicky testované látky byl zařazen kolostrin, vykazující v buněčných testech inhibici vzniku neurotoxicity a β -amyloidních agregátů. Jedná se o polypeptidovou sloučeninu odvozenou z ovčího kolostra velmi bohatou na obsah prolinu. Další sloučeninou s vysokým potencionálem byl dle studie scyllo-inositol, který prokázal schopnost stabilizace A β plaků v pokusem s myšmi. Studie Yiannopoulou a Papageorgiou (2013) se mimo jiné zabývala i látkami interferujícími se zinkem a mědí, jejichž ionty také vykazovaly vliv na oligomerní β -amyloidní plaky. Lze k nim přiřadit sloučeninu PBT2, která byla dalším aspirantem ke klinickým studiím. Avšak většina farmaceutických společností věnovala pozornost imunoterapii. Konkrétně klinicky testovaným metodám aktivní a pasivní imunizaci, jejichž princip uvolňování agregátů však nebyl zatím zcela objasněn. Potencionální neuroprotektivní léky vycházející z tohoto výzkumu byly zaměřeny na AD v presymptomatických stádiích. Zastávají podstatu léčby včasnou intervencí choroby, neboť symptomy způsobené její progresí jež nejsou vratné (Yiannopoulou et Papageorgiou, 2013).

Nicméně i přesto, že žádný z materiálů nevykazoval námi hledanou aktivitu, lze tuto studii považovat za poměrně inovativní, neboť šlo o první testování těchto rostlinných vzorků na inhibici AChE. Mimoto díky použití konvenčně známých léků jako pozitivních kontrol byla potvrzena korektnost Ellmanovy kolorimetrické metody modifikované Eldeenem a kol. (2005), díky čemuž se nabízí její případné budoucí využití při dalším hledání takto specificky aktivních látek. Další hledání nových léčiv NDO by stále mělo být součástí výzkumu, neboť jak již bylo zmíněno, aktuálně schválené a konvenčně využívané léky jsou značně nedostačující a pro spoustu pacientů nevhodné.

8. Závěr

V souhrnu lze říci, že i přes vysoký potenciál vybraných rostlinných druhů, jejichž etnobotanická indikace a předešlé studie naznačují pravděpodobnou využitelnost při léčbě AD, nedosáhla jejich reakční koncentrace dostatečných výsledků. Důvodů výsledných hodnot mohlo být více, jak je již výše zmíněno. Nicméně i s těmito výsledky lze práci zhodnotit jako inovativní, neboť tyto rostlinné druhy nebyly dříve zkoumány na takto specifické vlastnosti. Případně se zde nabízí možnost dalšího testování vzorků inhibiční aktivity vůči BuChE a tím způsobený dopad na možnou léčbu NDO. Mimo to, byla potvrzena správnost použité in vitro metody a lze ji tak případně využít při dalších experimentech s obdobným účelem.

Jak bylo již výše zmíněno, aktuálně schválené a konvenčně využívané léky jsou značně nedostačující a pro spoustu pacientů nevhodné, a proto by stále mělo být součástí výzkumu další hledání nových léčiv NDO. Zároveň množství pacientů postižených některou ze zmíněných chorob stále roste. Doufejme tedy, že se v blízké budoucnosti podaří nějakou vhodnou alternativu konvenčním léčivům objevit a pomoci tak velkému množství pacientů.

9. Literatura

- Abramov, A. Y., Canevari, L., Duchen, M. R. 2004. β -Amyloid Peptides Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Astrocytes and Death of Neurons through Activation of NADPH Oxidase. *Journal of Neuroscience*. 24 (2). 565–575. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4042-03.2004.
- Adewusi, E. A., Moodley, N., Steenkamp, V. 2011. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of selected southern African medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 77 (3). 638–644. doi: 10.1016/j.sajb.2010.12.009.
- 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.
- Alencar Filho, J. M. T. d., Teixeira, H. A. P., Sampaio, P. A., Pereira, E. C. V., Amariz, I. A. e., Rolim Neto, P. J., Rolim, L. A., Araújo, E. C. d. C. 2020. Phytochemical analysis in *Alternanthera brasiliana* by LC-MS/MS and GC-MS. *Natural Product Research*. 34 (3). 429–433. doi: 10.1080/14786419.2018.1533827.
- Baker, M. 2016. Chemists warn against deceptive molecules: Spice extract curcumin dupes assays and leads some drug hunters astray. *Nature*. 541 (12 January 2017). 144–145.
- Barua, C. C., Ara Begum, S., Talukdar, A., Datta Roy, J., Buragohain, B., Chandra Pathak, D., Kumar Sarma, D., Saikia Bora, R., Gupta, A. 2012. Influence of *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze on Altered Antioxidant Enzyme Profile during Cutaneous Wound Healing in Immunocompromised Rats . *ISRN Pharmacology*. 2012 . 1–8. doi: 10.5402/2012/948792.
- Begum, J., Bhuiyan, M. N. I., Taznin, T. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Eupatorium triplinerve* Vahl. aerial parts. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 12 (3). 543–547. doi: 10.18052/www.scipress.com/ilns.31.14.
- Casoni, F., Basso, M., Massignan, T., Gianazzail, E., Cheroni, C., Salmona, M., Bendotti, C., Bonetto, V. 2005. Protein nitration in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis: Possible multifunctional role in the pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (16). 16295–16304. doi: 10.1074/jbc.M413111200.
- Chester, K., Zahiruddin, S., Ahmad, A., Khan, W., Paliwal, S., Ahmad, S. 2017. Bioautography-based Identification of Antioxidant Metabolites of *Solanum nigrum* L. and Exploration Its Hepatoprotective Potential agChester, K. et al. (2017) 'Bioautography-based Identification of Antioxidant Metabolites of *Solanum nigrum* L. and Explorati. *Pharmacognosy Magazine*. 13 (Suppl (62)). 179–188. doi: 10.4103/pm.pm.
- Das, K., Tribedi, S. 2015. Effect of Zn, Fe And Cu Content On Phytochemical Investigations and Antimicrobial Potential of *Alternanthera Brasiliana*(L.) O. Kuntze Leaf Extracts Procured From Two Different States of India. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 12 (3). 126–143. doi: 10.5505/tjps.2015.25733.
- Duke, J. A., Bogenschutz-Godwin, M. J., Ottesen, A. R. 2009. *Duke's handbook of medicinal plants of Latin America*The Lancet. Vol. 189. Taylor & Francis Group, LLC. p. 843–844. ISBN: 9781420043167.
- García-Pérez, M. E., Alfonso-Castillo, A., Lores, O. F., Batista-Duharte, A., Lemus-Rodríguez, Z. 2018. Toxicological evaluation of an aqueous suspension from leaves and stems of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 211 (September 2017). 29–37. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.022.
- Guzior, N., Wi.eckowska, A., Panek, D., Malawska, B. 2014. Recent Development of Multifunctional Agents as Potential Drug Candidates for the Treatment of Alzheimer's

- Disease. *Current Medicinal Chemistry*. 22 (3). 373–404. doi: 10.2174/0929867321666141106122628.
- Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *Journal of Neurochemistry*. 97 (6). 1634–1658. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.
- Hamann, F. R., Brusco, I., de Campos Severo, G., de Carvalho, L. M., Faccin, H., Gobo, L., Oliveira, S. M., Rubin, M. A. 2019. Mansoa alliacea extract presents antinociceptive effect in a chronic inflammatory pain model in mice through opioid mechanisms. *Neurochemistry International*. 122 (July 2018). 157–169. doi: 10.1016/j.neuint.2018.11.017.
- Horáček, J., Motlová, L. 1999. Neurodegenerativní onemocnění - Od molekulární genetiky k léčbě. *Vesmír* 78. 307–309.
- Huntington, G. 2003. On chorea. George Huntington, M.D. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 15 (1). 109–112. doi: 10.1176/jnp.15.1.109.
- Itokawa, H., Matsumoto, K., Morita, H., Takeya, K. 1992. Cytotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliacea*. *Phytochemistry*. 31 (3). 1061–1062. doi: 10.1016/0031-9422(92)80077-R.
- Jantan, I., Haque, M. A., Ilangkovan, M., Arshad, L. 2019. An insight into the modulatory effects and mechanisms of action of phyllanthus species and their bioactive metabolites on the immune system. *Frontiers in Pharmacology*. 10 (JULY). 1–19. doi: 10.3389/fphar.2019.00878.
- Kaňovský, P. 2005. Diferenciální diagnostika neurodegenerativních chorob doprovázených demenci. *Interní Medicína pro Praxi*. 5 (8). 5–12.
- Kocaadam, B., Şanlıer, N. 2017. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (13). 2889–2895. doi: 10.1080/10408398.2015.1077195.
- Konvalinka, J., Peichová, J. 2002. Neurodegenerace aneb Špatně sbalené a špatně rozštěpené proteiny. *Vesmír*. 11–16.
- Kovacs, G. G. 2016. Molecular pathological classification of neurodegenerative diseases: Turning towards precision medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 (2). doi: 10.3390/ijms17020189.
- Macedo, A. F., Lage, C. L., Esquibel, M. A., De Souza, M. M., Da Silva, K. L., Niero, R., Cechinel-Filho, V. 2004. Preliminary phytochemical and pharmacological studies on plantlets of *Alternanthera brasiliana* cultured under different spectral quality of lights. *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 23 (4). 515–519.
- Matos Lopes, T. R., De Oliveira, F. R., Malheiros, F. F., De Andrade, M. A., Monteiro, M. C., Baetas Gonçalves, A. C. 2015. Antimicrobial bioassay-guided fractionation of a methanol extract of *Eupatorium triplinerve*. *Pharmaceutical Biology*. 53 (6). 897–903. doi: 10.3109/13880209.2014.948634.
- Munaeni, W., Widanarni, W., Yuhana, M., Setiawati, M., Wahyudi, A. 2019. Phytochemical analysis and antibacterial activities of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. extract against *Vibrio parahaemolyticus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 9 (9). 397–404. doi: 10.4103/2221-1691.267669.
- Oluwa, A., Avoseh, O., Omikorede, O., Ogunwande, I., Lawal, O. 2017. Study on the Chemical Constituents and Anti-inflammatory Activity of Essential Oil of *Petiveria alliacea* L. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 15 (1). 1–8. doi: 10.9734/bjpr/2017/31331.
- 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-Philippides, J. C., Razani-Boroujerdi, S., Singh, S. P., Langley, R. J., Mishra, N. C.,

- Henderson, R. F., Sopori, M. L. 2007. Long- and short-term changes in the neuroimmune-endocrine parameters following inhalation exposures of F344 rats to low-dose sarin. *Toxicological Sciences*. 97 (1). 181–188. doi: 10.1093/toxsci/kfm017.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, C., Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrassa, S., Saido, T. C., Markesbery, W., Gambetti, P., Tabaton, M. 2005. β -amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. 280 (40). 34186–34192. doi: 10.1074/jbc.M501694200.
- Roufogalis, B. D., Wickson, V. M. 1975. Acetylcholinesterase: specificity of the peripheral anionic site for cholinergic ligands. *Molecular Pharmacology*. 11 (3). 352–360.
- Sá, R. D., Santana, A. S. C. O., Silva, F. C. L., Soares, L. A. L., Randaua, K. P. 2016. Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 26 (5). 533–543. doi: 10.1016/j.bjp.2016.05.010.
- Smith, R. W. 2018. *Alternanthera flavescens* (Yellow joyweed) | Native Plants of North America. . Retrieved March 15, 2020, from https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=ALFL
- Soares, M. H., Dias, H. J., Vieira, T. M., de Souza, M. G. M., Cruz, A. F. F., Badoco, F. R., Nicoletta, H. D., Cunha, W. R., Groppo, M., Martins, C. H. G., Tavares, D. C., Magalhães, L. G., Crotti, A. E. M. 2017. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Chenopodiaceae). *Chemistry and Biodiversity*. 14 (8). doi: 10.1002/cbdv.201700149.
- Tauchen, J. 2016. Assessment of in vitro antioxidant and anti-proliferative properties of medicinal and edible plants. *Czech University of Life Sciences Prague*.
- Tauchen, J., Huml, L., Bortl, L., Duskocil, I., Jarosova, V., Marsik, P., Frankova, A., Clavo Peralta, Z. M., Chuspe Zans, M. E., Havlik, J., Lapcik, O., Kokoska, L. 2019. a Screening of medicinal plants traditionally used in Peruvian Amazon for in vitro antioxidant and anticancer potential. *Natural Product Research*. 33 (18). 2718–2721. doi: 10.1080/14786419.2018.1462180.
- Tauchen, J., Huml, L., Bortl, L., Duskocil, I., Jarosova, V., Marsik, P., Frankova, A., Clavo Peralta, Z. M., Chuspe Zans, M. E., Havlik, J., Lapcik, O., Kokoska, L. 2019. b Screening of medicinal plants traditionally used in Peruvian Amazon for in vitro antioxidant and anticancer potential. *Natural Product Research*. 33 (18). 2718–2721. doi: 10.1080/14786419.2018.1462180.
- Taylor, L. 2017. *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals*. SQUARE ONE PUBLISHERS, INC. p. 535. ISBN: 0-7570-0144-0.
- Yiannopoulou, K. G., Papageorgiou, S. G. 2013. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. 6 (1). 19–33. doi: 10.1177/1756285612461679.
- Zecca, L., Zucca, F. A., Wilms, H., Sulzer, D. 2003. Neuromelanin of the substantia nigra: A neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends in Neurosciences*. 26 (11). 578–580. doi: 10.1016/j.tins.2003.08.009.
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Stupar, A., Bulut, G. 2020. Industrial Crops & Products Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. *Industrial Crops & Products*. 146 (October 2019). 112202. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.

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

10. Seznam použitých zkratek a symbolů

AD	Alzheimerova choroba
AChE	Acetylcholinesteráza
AChI	Acetylcholinjodid
ALS	Amyotropická laterální skleróza
BuChE	Butyrylcholinesteráza
CAM	Doplňková a aletrnativní medicína
CAS	Centrální aniontové vazebné místo
CBDG	Kortikobazální degenerace
CNS	Centrální nervová soustava
DLBD	Demence s Lewyho tělísky
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
HD	Huntingtonova choroba
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace působící na 50 % dané populace
MTDL	Multi-Target-Directed-Ligands
NDO	Neurodegenrativní onemocnění
PAS	Periferní aniontové vazebné místo
PD	Parkinsonova choroba
ROS	Reaktivně oxidační druhy