

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Hodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných
modulátorů cholinesteráz**

Bc. Michaela Válková

Diplomová práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Válková**
Osobní číslo: **C17426**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Hodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných modulátorů cholinesteráz**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Zpracování literární rešerše na téma cholinesteráz, inhibitorů a reaktivátorů cholinesteráz v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".
2. Teoretické zvládnutí *in vitro* testů důležitých pro hodnocení cytotoxicity nových látek.

Experimentální část:

1. Zvládnutí *in vitro* metod (kultivace buněk, *in vitro* testy toxicity - MTT test).
2. Zhodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných látek.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce: **pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.**
Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
v Hradci Králové
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Ľubica Múčková**
Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
v Hradci Králové
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice. Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 5. 2019

.....
Michaela Válková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu pplk. doc. MUDr. Jaroslavovi Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a připomínky. Dále Mgr. Lubice Múčkové za vstřícnost a ochotu během práce v laboratoři, za pomoc při zpracování diplomové práce a příjemnou spolupráci. Také děkuji svoji rodině za podporu a optimismus během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá hodnocením cytotoxicity nově syntetizovaných modulátorů cholinesteras. Zvolenými látkami byly deriváty kyseliny čtvercové, takrinu a 7-metoxytakrinu. Takrin a 7-metoxytakrin jsou inhibitory acetylcholinesterasy určené pro léčbu Alzheimerovi choroby, ačkoliv v případě takrinu se již od jeho podávání ustoupilo, kvůli jeho nežádoucím účinkům. První část je zaměřena na Alzheimerovu chorobu, její patogenezi, příznaky, diagnostiku a terapii. Druhá část je věnována provedení experimentu (tzn. pasážování buněk, provedení MTT testu, apod.). V závěru práce jsou uvedeny a zhodnoceny toxikologické indexy a dávkově závislé křivky u jednotlivých testovaných sloučenin.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, takrin, 7-metoxytakrin, kyselina čtvercová, cholinesterasy, MTT test

TITLE

Evaluation of cytotoxicity of newly synthesized modulators of cholinesterase

ANNOTATION

This diploma thesis evaluates the cytotoxicity of newly synthesized modulators of cholinesterase. The chosen compounds were the derivatives of squaric acid, tacrine and 7-methoxytacrine. Tacrine and 7-methoxytacrine are acetylcholinesterase inhibitors used for the treatment of Alzheimer's disease. Due to adverse effects, tacrine has been withdrawn from the market. In the first chapter, the author therefore describes Alzheimer's disease and associated pathogenesis, symptoms, diagnosis, and therapy. The second part is focused on the experiment (i. e. passaging of cells, MTT test, etc.). At the end of the work, toxicological indexes and dose-dependent curves of individual test compounds are presented and evaluated.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, tacrine, 7-methoxytacrine, squaric acid, cholinesterases, MTT test

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Teoretická část..... | 13 |
| 1.1 | Alzheimerova nemoc | 13 |
| 1.1.1 | Patogeneze Alzheimerovy choroby | 14 |
| 1.1.1.1 | Cholinergní hypotéza | 14 |
| 1.1.1.2 | Amyloidní hypotéza | 17 |
| 1.1.1.3 | Tau proteinová hypotéza | 19 |
| 1.1.1.4 | Genetické predispozice | 20 |
| 1.1.1.5 | Hypotéza o imunitní odpovědi | 21 |
| 1.1.1.6 | Hypotéza o oxidačním stresu | 23 |
| 1.1.1.7 | Hypotéza o mitochondriální dysfunkci | 24 |
| 1.2 | Příznaky AD..... | 25 |
| 1.2.1 | Rané stádium..... | 26 |
| 1.2.2 | Střední stádium | 26 |
| 1.2.3 | Pozdní stádium..... | 26 |
| 1.2.4 | Atypické a asymptomatické stádium | 27 |
| 1.3 | Diagnostika | 27 |
| 1.3.1 | Klinická diagnostika | 27 |
| 1.3.2 | Neuropsychologické a psychometrické testy..... | 28 |
| 1.3.3 | Biochemické vyšetření AD..... | 29 |
| 1.3.4 | Vyšetření vybranými zobrazovacími technikami | 30 |
| 1.4 | Terapie AD..... | 33 |
| 1.4.1 | Farmakologická léčba | 33 |
| 1.4.1.1 | Cholinesterasové inhibitory | 33 |
| 1.4.1.2 | Antagonisté N-methyl-D-asparátu | 36 |
| 1.4.1.3 | Sekretasové inhibitory..... | 38 |
| 1.4.1.4 | Inhibitory kinas | 39 |
| 1.4.1.5 | Látky regulující oxidační stres | 40 |
| 1.4.1.6 | Imunizace | 40 |
| 1.4.2 | Nefarmakologická léčba | 41 |
| 2 | Cíle diplomové práce..... | 42 |
| 3 | Experimentální část | 43 |
| 3.1 | Metodika | 43 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.1 | Buněčná linie | 43 |
| 3.1.2 | Testované látky | 43 |
| 3.2 | Kultivace a pasážování buněk | 46 |
| 3.2.1 | Postup pasážování | 47 |
| 3.3 | Počítání buněk | 47 |
| 3.3.1 | Bürkerova komůrka | 47 |
| 3.3.2 | Průtoková cytometrie | 47 |
| 3.4 | Stanovení cytotoxicity látek | 49 |
| 3.4.1 | Nasazení do destičky | 49 |
| 3.4.2 | Ovlivnění buněk | 49 |
| 3.4.3 | Kolorimetrické stanovení buněčné viability | 50 |
| 3.4.3.1 | Provedení MTT testu | 51 |
| 3.5 | Statistická analýza | 52 |
| 4 | Výpočet toxikologických indexů | 52 |
| 4.1 | Výchozí sloučeniny pro syntézu jednotlivých derivátů | 52 |
| 4.1.1 | Toxikologické indexy IC ₅₀ | 52 |
| 4.2 | Monotakrinové deriváty kyseliny čtvercové | 52 |
| 4.2.1 | Toxikologické indexy IC ₅₀ | 52 |
| 4.2.2 | Dávkově - závislé křivky | 53 |
| 4.3 | Bistakrinové deriváty kyseliny čtvercové | 56 |
| 4.3.1 | Toxikologické indexy IC ₅₀ | 56 |
| 4.3.2 | Dávkově - závislé křivky | 57 |
| 4.4 | Mono-7-metoxytakrinové deriváty kyseliny čtvercové | 60 |
| 4.4.1 | Toxikologické indexy IC ₅₀ | 60 |
| 4.4.2 | Dávkově - závislé křivky | 61 |
| 4.5 | Bis-7-metoxytakrinové deriváty kyseliny čtvercové | 64 |
| 4.5.1 | Toxikologické indexy IC ₅₀ | 64 |
| 4.5.2 | Dávkově - závislé křivky | 65 |
| 5 | Diskuze | 69 |
| 6 | Závěr | 72 |
| 7 | Zdroje | 73 |
| 8 | Seznam obrázků | 85 |
| 9 | Seznam tabulek | 91 |

Seznam zkratek

| | |
|-----------|---|
| ABAD | Amyloid-vázající alkohol dehydrogenasa |
| A β | Amyloid – β |
| ACh | Acetylcholin |
| AChE | Acetylcholinesterasa |
| AD | Alzheimerova choroba |
| ADAM | Skupina desintegrinů a metaloproteinů |
| ADRDA | Alzheimer's Disease and Related Disorders Association |
| AMK | Aminokyselina |
| ApoE | Apolipoprotein E |
| APP | Transmembránový amyloidový prekurzorový protein |
| Arg | Arginin |
| BACE1 | β – sekretasa |
| BBB | Hematoencefalická bariéra |
| BuChE | Butyrylcholinesterasa |
| CAS | Katalytické aniontové místo |
| CBS | Kortikobazální syndrom |
| CT | Počítačová tomografie |
| DMEM | Dulbeccoovo modifikované Eaglovo médium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| EDTA | Ethylendiaminotetraoctová kyselina |
| EEG | Elektroencefalografie |
| EOAD | Včasná forma Alzheimerovy choroby |
| EOFAD | Včasná familiární forma Alzheimerovy choroby |
| FAD | Familiární forma Alzheimerovy choroby |
| FBS | Fetální bovinní sérum |
| FDG-PET | Pozitronová emisní tomografie s fluorodeoxyglukosou |

| | |
|------------------|---|
| GABA | γ – aminomáselná kyselina |
| Glu | Glutamová kyselina |
| GSK-3 | Kinasa glykogen syntasy |
| His | Histidin |
| IC ₅₀ | Koncentrace, při které viabilita buněk klesne na 50 % |
| IMC | Information Memory Concentration test |
| Iso-OMPA | Tetraisopropyl pyrofosforamid |
| LOAD | Pozdní forma Alzheimerovy choroby |
| LOFAD | Pozdní familiární forma Alzheimerovy choroby |
| LTP | Dlouhodobé ovlivnění synaptické plasticity |
| mAChR | Muskarinové acetylcholinové receptory |
| MAO | Monoaminoxidasa |
| MAPT | Gen pro tau protein |
| MM | Mozkomíšní mok |
| MMSE | Mini-Mental State Examination |
| MRI | Magnetická rezonance |
| MTT | 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid |
| nAChR | Nikotinové acetylcholinové receptory |
| NFT | Neurofibrilární spleť |
| NINCDS | National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke |
| NMDA | N-methyl-D-asparát |
| PAS | Periferní aniontové místo |
| PBS | Fosfátový pufr |
| PET | Pozitronová emisní tomografie |
| Phe | Fenylalanin |
| PHF | Párové heliakální filamenty |

| | |
|---------|--|
| PIB | N-methyl-[11C]2-(4-methylaminofenyl)-6-hydroxybenzothiazol |
| PS 1 | Presenilin 1 |
| PS 2 | Presenilin 2 |
| rCBF | Regionální průtok krve mozkem |
| ROS | Reaktivní radikálové formy kyslíku |
| SA | Kyselina čtvercová |
| SD | Směrodatná odchylka |
| Ser | Serin |
| SPE-CT | Jednofotonová emisní počítačová tomografie |
| TDC | 2,2,4-trihydroxychalkon |
| THA | Takrin |
| Trp | Tryptofan |
| TSH | Hormon stimulující štítnou žlázu |
| Tyr | Tyrosin |
| T4 | Tyroxin |
| 7-MEOTA | 7 - metoxytakrin |

Úvod

Tato diplomová práce je zaměřena na stanovení a zhodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných modulátorů cholinesteras, jejichž výchozími sloučeninami jsou kyselina čtvercová (SA) a inhibitory acetylcholinesterasy (AChE), jako jsou takrin (THA) a 7-metoxytakrin (7-MEOTA). Spolu s SA vytvářejí mono- a bis- takrinové nebo mono- a bis- 7-metoxytakrinové deriváty. Inhibitory AChE jsou jednou z nejčastějších možností při terapii Alzheimerovy choroby (AD; Soukup *et al.*, 2013). Jejich mechanismem účinku je zvýšení koncentrace acetylcholinu (ACh) v synaptických štěrbinách, čímž kompenzují jeho nedostatek, který je charakteristický pro toto onemocnění (Čolović *et al.*, 2013).

Diplomová práce je rozdělena na teoretickou, experimentální a výsledkovou část. V teoretické části předložené diplomové práce je popsána AD, včetně patogeneze a jednotlivých mechanismů, které jsou pravděpodobně zodpovědné za její rozvoj. Dále jsou v teoretické části popsány příznaky, jež jsou charakteristické pro jednotlivá stádia, a diagnostika, která je komplexní (klinická diagnostika, neuropsychologické a psychometrické testy, biochemické vyšetření a vyšetření zobrazovacími technikami), a z pohledu včasného odhalení AD důležitá. V závěru první části jsou uvedeny možnosti farmakologické (cholinesterasové a sekretasové inhibitory, antagonisté N-methyl-D-asparátu, imunizace, látky regulující oxidační stres a inhibitory kinas) a nefarmakologické léčby.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na stanovení cytotoxicity výchozích látek a nově syntetizovaných sloučenin. Použita byla buněčná linie HepG2, u které byl popsán proces její kultivace, pasážování, počítání buněk (Bürkerova komůrka, průtokový cytometr) a nakonec provedení stanovení cytotoxicity (nasazení buněk do destičky, jejich ovlivnění, kolorimetrické stanovení buněčné viability → neboli provedení MTT testu).

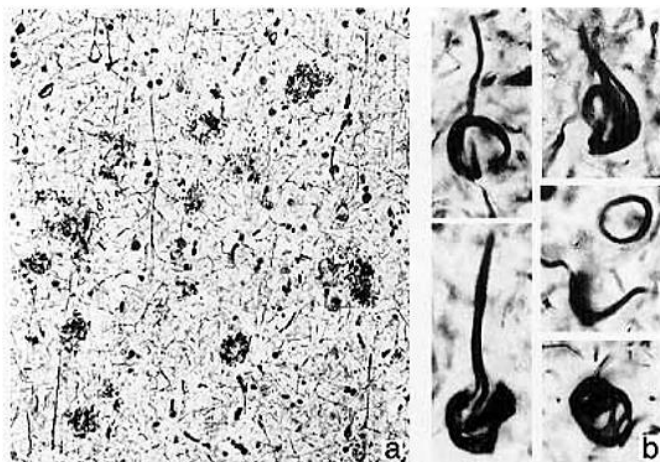
Třetí část je zaměřena na výpočet toxikologických indexů spolu se statistickou analýzou. U jednotlivých analyzovaných derivátů (monotakrinové, bistakrinové, mono-7-metoxytakrinové a bis-7-metoxytakrinové deriváty SA), a výchozích látek jsou uvedeny toxikologické indexy spolu s dávkově-závislými křivkami. Na základě těchto výsledků je v závěru práce vedena diskuze.

1 Teoretická část

1.1 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku. Jedná se o jednu z hlavních příčin vzniku demence (Schachter a Davis, 2000; Swerdlow, 2007; Dos Santos, 2016). Poprvé ji popsal německý neuropatolog a psychiatr Alois Alzheimer v roce 1907. Při vyšetření mozku (obr. č. 1) zesnulé paní Auguste Deterové (Zvěřová, 2017), která trpěla těžkou formou demence, zjistil, že senilní plaky masivně prorůstají do vrstvy kůry a jsou viditelná dokonce v nebarveném preparátu. Na základě toho (v roce 1910), byly po něm pojmenovány charakteristické změny neurofibril (Alzheimerovy změny) – neuronální spletě, která v elektronovém mikroskopu vypadají, jako plamínek či tenisová raketa (Bekris *et al.*, 2010; Zvěřová, 2017).

Tímto onemocněním na celém světě trpí okolo 50 miliónů lidí ve věku nad 65 let (zaznamenáno v roce 2017). Největší incidence je v Asii (49 %), Evropě (25 %) a Americe (18 %). Predikce je, že v roce 2030, by se počet lidí trpící touto chorobou mohl zvýšit, až na 74,7 mil., a na 131,5 mil. v roce 2050 (Prince *et al.*, 2015).



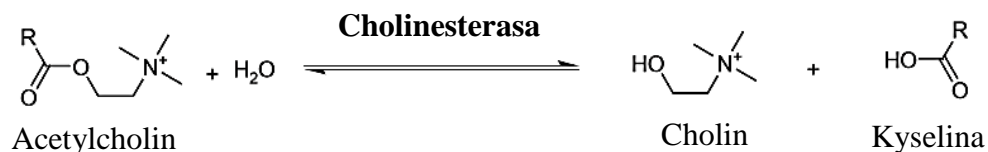
Obr. č. 1: Vzorek mozkové kůry Auguste D. obarvený Bielschowského stříbrem. (a) Četný výskyt neurofibrilárních spleť a neuritických (Alzheimerových) plaků. (b) Příklady neurofibrilárních spleť. Převzato z Goedert *et al.*, 2006.

(5) Snížené uvolňování rozpustného prekurzorového proteinu amyloid- β ; (6) zvýšená produkce amyloidu- β (A β); (7) Snížená produkce glutamátu. Převzato z Francis *et al.*, 1999.

Cholinesterasy

Funkce cholinergního systému je zprostředkována díky neurotransmiteru acetylcholinu (ACh). Poprvé byl rozeznán v roce 1920 (Loewi, 1921) a nalezen, jak v centrálním, tak periferním nervovém systému. Rozlišujeme dva základní typy receptorů pro acetylcholin: muskarinové (mAChR) a nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR). Acetylcholinové receptory jsou také přítomny na buňkách mimo nervovou soustavu, a to například na endoteliálních buňkách nebo buňkách imunitního systému (Wessler a Kirkpatrick, 2008).

Cholinesterasy (ChE) tvoří skupinu enzymů vyskytující se v nervové tkáni, svalech a červených krvinkách. Katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru ACh na cholin a acetát (obr. č. 3) a zakončují cholinergní neurotransmisi. Strukturně jsou ChE monomery nebo oligomery glykoproteinových katalytických podjednotek, jejichž molekulové hmotnosti jsou obvykle v rozmezí 70 – 80 kDa (Massoulié *et al.*, 1993).



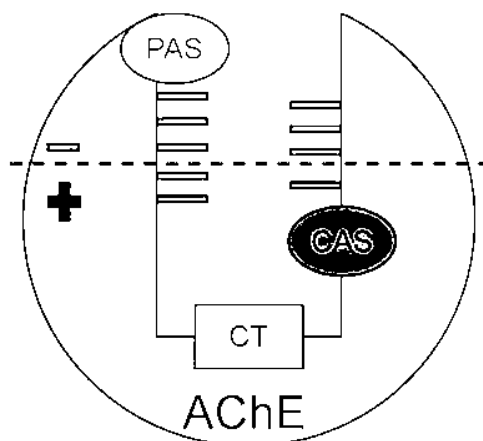
Obr. č. 3: Reakce katalyzovaná cholinesterasami. Převzato z Dzoyem *et al.*, 2014.

Podle jejich afinity nebo reaktivity se substráty, se inhibitory ChE rozdělují na dva typy, a to na acetylcholinesterasu (AChE; EC 3.1.1.7.) a pseudocholinesterasu neboli butyrylcholinesterasu (BuChE; EC 3.1.1.8.; Bajgar, 2004).

- Acetylcholinesterasa

AChE neboli také specifická, pravá ChE má hlavní funkci při katalýze hydrolýzy ACh. Hydrolýza za přítomnosti AChE je rychlejší, v porovnání s BuChE (Fukuto, 1990). AChE je součástí postsynaptické membrány a směřuje do synaptické štěrbině v rámci nervosvalové ploténky. Relativně vysoká koncentrace může být nalezena v krvi, a to na membráně červených krvinek, kde je zodpovědná za degradaci acetylcholinu v plazmě. Molekulová hmotnost podjednotek AChE je 69 kDa (Dzoyem *et al.*, 2014; Fujii *et al.*, 1997).

AChE (obr. č. 4) je tvořena úzkou hlubokou dutinou (rokli) obsahující tzv. aromatickou rokli s 14 aromatickými zbytky, skrz kterou vstupuje ACh k aktivnímu místu. Aktivní místo má díky tomu vyšší selektivitu. Vstup ACh je přes periferní β -aniontové místo (PAS), které je lokalizováno na povrchu AChE. Toto místo bylo uznáno, jako cíl pro více modulátorů AChE (Bajgar, 2004; Pohanka, 2011). Dále je uvnitř přítomno α -aniontové místo (CAS) obsahující aminokyseliny (AMK), jako jsou tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr) a fenylalanin (Phe). V jejich blízkosti je katalytická triáda, která je součástí esteratického místa, obsahující serin (Ser) – histidin (His) – kyselina glutamová (Glu). Penetrace substrátu (ACh) je umožněna kationty v π -interakci mezi acetylcholinovým kvartérním amoniovým iontem (vznikající hydrolyzou esterové vazby) a π -elektrony aromatických jader Phe, Trp a Tyr. Tyto interakce jsou zodpovědné za správnou orientaci substrátu (Pohanka, 2011).



Obr. č. 4: Ilustrační schéma acetylcholinesterasy. AChE – acetylcholinesterasa; PAS – periferní aniontové místo; CAS – katalytické aniontové místo; CT – katalytická triáda; - negativní oblast; + kladná oblast; převzato z <http://proteopedia.org>.

Enzymologie AChE spočívá v tom, že uvolněný ACh, z vezikulů do synaptické štěrby, stimuluje ACh receptory. Koncový signál na cholinergních nervech je vlivem AChE rychlý, a hladina ACh klesne pod prahovou koncentraci (Pohanka, 2011).

U pacientů trpících AD, byla detekována (isoelektrickou fokusací) AChE v mozkomíšním moku (MM). Neurofibrilární spleť mohou obsahovat AChE a i BuChE (Coleman *et al.*, 1992).

- **Butyrylcholinesterasa**

BuChE neboli také pseudocholinesterasa či nespecifická ChE je všude přítomný enzym vyskytující se nejen v lidských a zvířecích tkáních, ale také v mnoha rostlinách a mikroorganismech. V lidském těle je přítomna v plazmě či séru, pankreatu a játrech (kde je syntetizována). Katalyzuje hlavně hydrolýzu butyrylcholinu, a to za vzniku butyrátu a cholinu. BuChE hraje také důležitou roli v cholinergní neurotransmisi a bývá zapojena v dalších funkcích nervového systému, neurologických nemocích, a v nespecifických detoxikačních procesech (je schopna odbourat velké množství exogenních látek, jako jsou prokain, kokain, heroin, aj.; Bajgar, 2004; Pohanka, 2011).

Stejně jako AChE, BuChE obsahuje PAS, CAS a úzkou hlubokou dutinu. Katalytická triáda se skládá ze Ser, His a Glu (Li *et al.*, 2017).

V mozku je u AD BuChE pozorována v nepatrném zvýšení či neměnném množství. Zdá se, že hraje roli v konverzi benigních plaků, jak je vidět při normálním stárnutí vláknitých fibrilárních plaků přítomných u AD. Podpora této role BuChE byla zjištěna na základě pozorování a nalezení asociované BuChE s A β plaky u myši trpící AD. Navíc, u myšího modelu, kde byl gen, kódující BuChE, vyřazen byla pozorována snížená depozice A β v placích (Hamodat *et al.*, 2017).

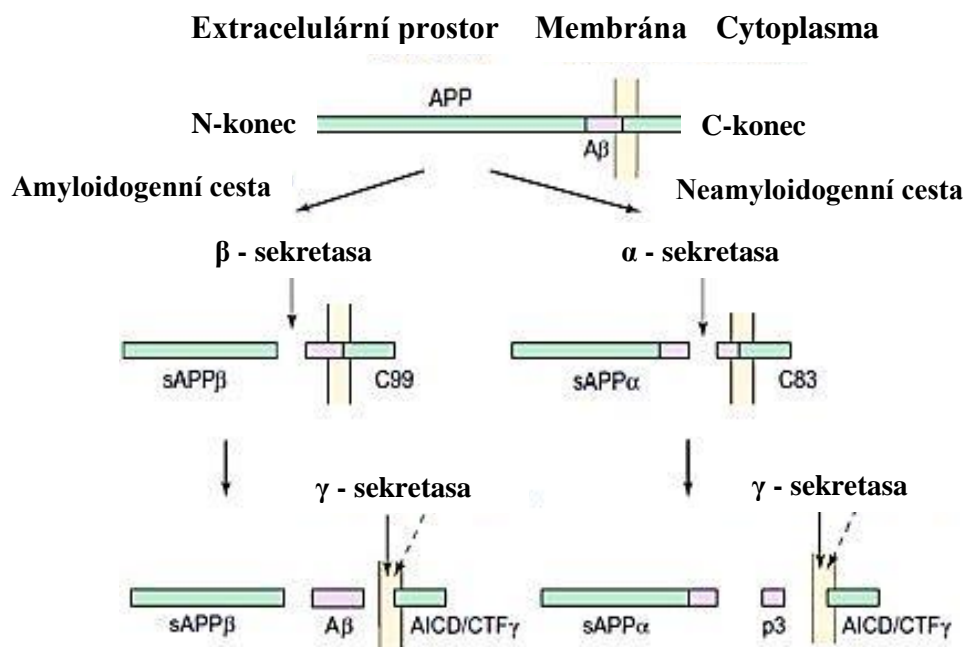
1.1.1.2 Amyloidní hypotéza

Základním patologickým znakem u AD je progresivní akumulace fragmentů A β ; (senilních plaků, obr. č. 5; Schachter a Davis, 2000; Swerdlow, 2007). Peptid A β byl poprvé identifikován v roce 1980, jako součást extracelulárních amyloidních plaků. Zanedlouho poté, se objevily zprávy o existenci intracelulárního A β (Grundke *et al.*, 1989). A β je tvořen z transmembránového amyloidového prekurzorového proteinu (APP). APP je syntetizován v endoplazmatickém retikulu a transportován přes Golgiho aparát do trans-Golgiho sítě. Odtud je transportován v sekrečních vezikulech na povrch buněk, kde je následně štěpený α sekretasou. Jedná se o neamyloidogenní dráhu štěpení APP, která za fyziologických podmínek převažuje. APP je štěpen α sekretasou v pozici 83 za vzniku rozpustné N-koncové ektodomény APP (sAPP α) a centrálního koncového fragmentu (CTF α), který je ponechán v membráně. Poté je následně štěpen γ sekretasou za vzniku krátkého fragmentu označeného jako p83. Fragment p83 je poměrně rychle degradovaný a nemá žádnou speciální funkci (Zhang *et al.*, 2011).

Studie naznačují, že fragmenty sAPP α by mohly mít neuroprotektivní účinky, protože regulují proliferaci nervových kmenových buněk a jsou důležité pro včasný vývoj centrální nervové soustavy (CNS; Haass *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2011).

V případě patologického stavu je APP štěpen amyloidogenní dráhou, která vede k tvorbě A β . Počáteční proteolýza je zde zprostředkována β sekretasou (BACE1) v pozici 99 (od C konce). Dochází rovněž ke vzniku N-koncové ektodomény APP (sAPP β) v extracelulárním prostoru a C-koncového fragmentu (CTF β), který je zanechaný v membráně a je štěpen γ sekretasou, což vede k uvolnění inaktivního peptidu A β o délce 40 (A β 40) nebo 42 (A β 42) AMK (Jarrett *et al.*, 1993; Younkin, 1998, Niedowicz *et al.*, 2011; Fišar a Jiráček, 2009). Fragment A β 40 je více zastoupený (cca 80 – 90 %), po něm následuje fragment A β 42 (cca 5 – 10 %). Mírně dlouhé formy, hlavně teda fragmenty A β 42 jsou hydrofóbnější a fibrilogenní (Murphy a LeVine, 2010). Poměr A β 42/40 hraje pravděpodobně důležitou úlohu v patogenezi AD (Dumurgier *et al.*, 2015).

Všechny výše zmíněné enzymy patří do skupiny ADAM (skupina desintegrinů a metaloproteinů). BACE1 se řadí mezi asparát proteasy, vykazující endo- a exonukleázovou aktivitu. γ sekretasa byla identifikována, jako komplex enzymů obsahující presenilin 1 nebo 2 (PS 1 a PS 2) aj. (Sanabria *et al.*, 2017; LaFerla *et al.*, 2017).

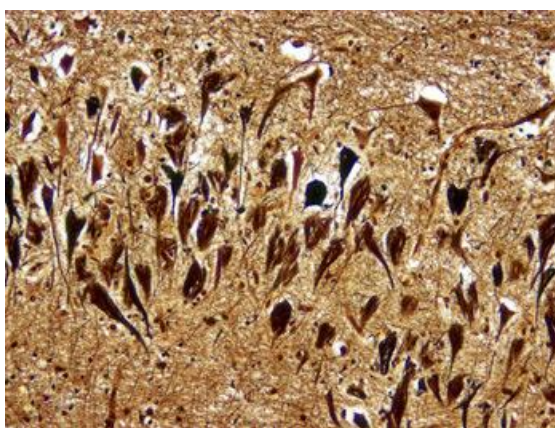


Obr. č. 5: Shrnující schéma štěpení APP amyloidogenní a neamyloidogenní cestou. Převzato z Barage a Snowane, 2015.

1.1.1.3 Tau proteinová hypotéza

V době studia mikrotubulů byl v polovině 70. let 20. století poprvé identifikován tau protein. Je nazýván, jako neurální protein asociovaný s mikrotubuly, protože se podílí na stavbě tubulinu, a spolu s nimi zajišťuje stabilitu mikrotubulů (Du *et al.*, 2018; Zvěřová, 2017). Tyto mikrotubuly zajišťují podporu pro strukturální změny, axonální transport a neurální růst. V CNS se tau protein vyskytuje v 6 různých isoformách (Goedert *et al.*, 2006), které se liší v počtu vazebných míst pro mikrotubuly a množstvím exonů (Sanabria *et al.*, 2017).

Tau protein je vysoce rozpustný a podléhá mnoha modifikacím, jako je například fosforylace Ser, monomethylace argininu (Arg), acetylace a dimethylace lysinu (Lys) nebo ubikvitinace Lys nebo Ser (Du *et al.*, 2018). Při AD dochází k dysfunkcím ve fosforylačních procesech proteinu, což vede k hyperfosforylaci. Hyperfosforylovaný tau protein ztrácí své stabilizační funkce pro mikrotubuly. Vykazuje sníženou afinitu k mikrotubulům, což podporuje zvýšení volného tau proteinu, který a to vede k větší agregaci a fibrilizaci jeho samotného, a tedy k tvorbě neurofibrilární sítě (NFT, obr. č. 6; Kuret *et al.*, 2005; Rafii a Aisen, 2009). NFT jsou tvořeny párovými heliakálními filamenty (PHF, obsahující hyperfosforylovaný tau protein) a jejich počet koreluje se stupněm demence (Avila *et al.*, 2004). Ve výsledku dochází k poruše axonálního transportu a rozvoji neurodegenerace (Sanabria *et al.*, 2017).



Obr. č. 6: Neurofibrilární sítě v mozkové kůře u pacientů trpící AD. Převzato z www.neuropathology-web.org.

In vitro experimenty, ve kterých byly použity různé typy buněk (neuronální buněčné linie, primární hipokampální a kortikální neurony, a hipokampální kultury) ukázaly, že výskyt A β indukuje hyperfosforylaci tau proteinu (Wang *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2002).

1.1.1.4 Genetické predispozice

Drtivá většina vyskytujících se případů AD jsou sporadická (nebyly zjištěny žádné genetické mutace). Mohou ale vzniknout vzácné mutace genu kódující APP, alely ϵ 4 apolipoproteinu E (ApoE), PS1, PS2 a tau proteinu. V těchto případech se jedná o familiární (FAD) formu (Dos Santos *et al.*, 2016).

Z praktického hlediska se tedy AD dělí podle dvou kritérií: podle začátku onemocnění na časnou (early-onset AD – EOAD; early-onset familial – EOFAD) a pozdní formu (late-onset AD – LOAD; late-onset familial – LOFAD), a podle dědičnosti na familiární nebo sporadickou formu. Familiární formu můžeme rozdělit na 4 varianty, a to na AD 1 (mutace genu kódující APP; LOFAD), AD 2 (přítomnost genu pro ApoE na chromozomu 19, LOFAD), AD 3 (defekt v genu kódující membránový protein PS1 na chromozomu 14, EOFAD) a AD 4 (defekt v genu kódující membránový protein PS2 na chromozomu 1, EOFAD; Goetz 2007; Kumar *et al.*, 2007; Bekris *et al.*, 2010; Tanzi a Bertram, 2005).

U familiární a sporadické formy AD s pozdním začátkem hraje významnou roli ApoE. ApoE je látka tělu vlastní (transportuje cholesterol do krve) a vyskytuje se ve třech isoformách (E2, E3 a E4). Lidé s isoformou E4, mají daleko větší pravděpodobnost, že onemocní AD, než lidé s jinou isoformou ApoE. Právě alela ϵ 4 ApoE je považována za jeden z hlavních rizikových faktorů vzniku onemocnění. Pokud někdo z příbuzných trpí AD, tak je 40% riziko, že také onemocní touto chorobou (pokud se dožije 85 let). Toto zjištění dokládá, že sporadická forma AD je dána neúplnou penetrací jednoho či více genů v kombinaci s rizikovými faktory prostředí (Kolejáčková *et al.*, 2011; Grossman *et al.*, 2010; Zvěřová, 2017, Niedowicz *et al.*, 2011).

EOFAD je podmíněna mutací genu APP, PS1 a PS2. V současné době známe zhruba 20 mutací genu APP, které jsou zodpovědné za vznik AD (Zvěřová, 2017). Převážná část těchto mutací se objevuje v místě, kde působí β nebo γ sekretasy. Vzhledem k tomu, že PS1 a PS2 tvoří aktivní místo γ sekretasy, dojde v případě jejich mutace k posunu při tvorbě A β směrem k amyloidogenní formě (Niedowicz *et al.*, 2011). I mutace genu kódující PS2 společně s mutací genu pro tau protein (MAPT) podporují amyloidogenní dráhu.

Mechanismus korelace mezi PS1, PS2 a kontrolou štěpení APP, nebyl doposud objasněn AD (Zvěřová, 2017).

1.1.1.5 Hypotéza o imunitní odpovědi

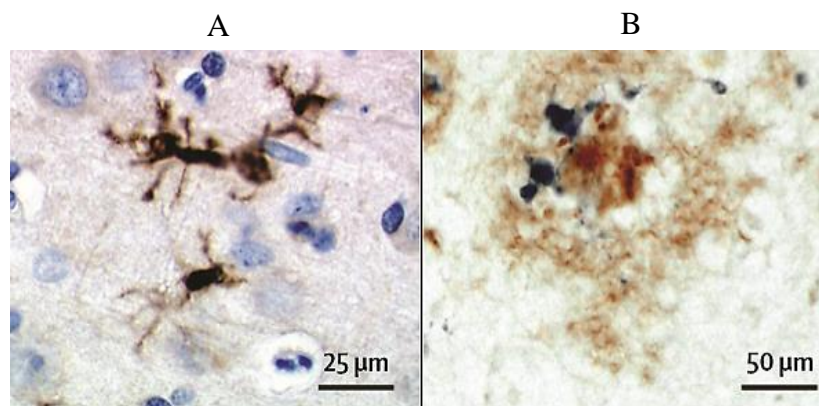
V posledních 15 letech byly v mozku u AD pozorovány mediátory zánětu. Byly buď nedetekovatelné, nebo byly nalezeny pouze v nižších hladinách (na úrovni pozadí) ve vzorcích od starších pacientů, kteří netrpěli demencí. Z počátku byla tato úvaha odmítána vzhledem k tomu, že mozek má tzv. imunologické privilegium. Tento pohled, je s potvrzující přítomností zánětlivých mediátorů u AD postupně opouštěn. Je tedy jasné, že mozek může mít několik specifických imunologických vlastností, ale v žádném případě není imunologicky izolovaným orgánem (Akiyama *et al.*, 2000). Připadá zde tedy otázka, zdali jsou zánětlivé mechanismy skutečně příčinou poškození u AD nebo jsou pouze přítomny za účelem odstranění nežádoucí buněčné drtě od jiných primárních patologických procesů.

Mikroglie

Jedním ze znaků AD jsou reaktivní glióza a zánět nervové tkáně. Dráha imunitní odpovědi zprostředkovaná mikroglie je považována za jednu z hlavních rizikových faktorů AD (obr. č. 7; Du, *et al.*, 2018). Mikroglie (Hortegovy glie) neboli rezidentní fagocyty CNS, jsou malé a pohyblivé buňky, které se nacházejí v mozku a míše. Od ostatních glií a neuronů jsou odlišné, protože do mozku vstupují, až v průběhu nitroděložního života (Orel, 2015). V „přiděleném“ teritoriu se mikroglie neustále pohybují, aniž by narušovaly jemnou strukturu okolní neuroální tkáně. Získávají tak přehled o odumřelých, poškozených či rozpadlých neuronech, ale také, zajišťují faktory, které podporují trofii tkáně (Kettenmann *et al.*, 2011). Zároveň jsou důležitou součástí v udržování plasticity neuronálních obvodů, čímž přispívají k ochraně a remodelaci synapsí. Tento ochranný a remodelační účinek je do jisté míry zprostředkován díky uvolňujícím se faktorům, včetně neurotrofního faktoru, jenž přispívá k tvorbě paměti.

V případě patologického stavu, jako je neurální smrt nebo proteinové agregáty jsou mikroglie aktivovány, a migrují do místa poranění (léze), kde zahájí imunitní odpověď. Mikroglie se vážou na rozpustné oligomery A β a fibrily přes buněčné receptory na povrchu, jako jsou například CD36, CD14, CD47, SCARA1 aj. (Heneka *et al.*, 2015). Po vazbě na receptor dochází k fagocytóze a výsledkem je vstup fibril do endolyzozomálních kompartmentů mikroglie. Na rozdíl od A β fibril, které jsou rezistentní vůči enzymatické

degradaci, může být rozpustný A β degradován různými extracelulárními proteásami (např.: neprilysinem nebo enzymem degradujícím inzulin). Tento proces je považován za součást zánětlivé reakce u AD (Heneka *et al.*, 2015; Lee a Landreth, 2010).

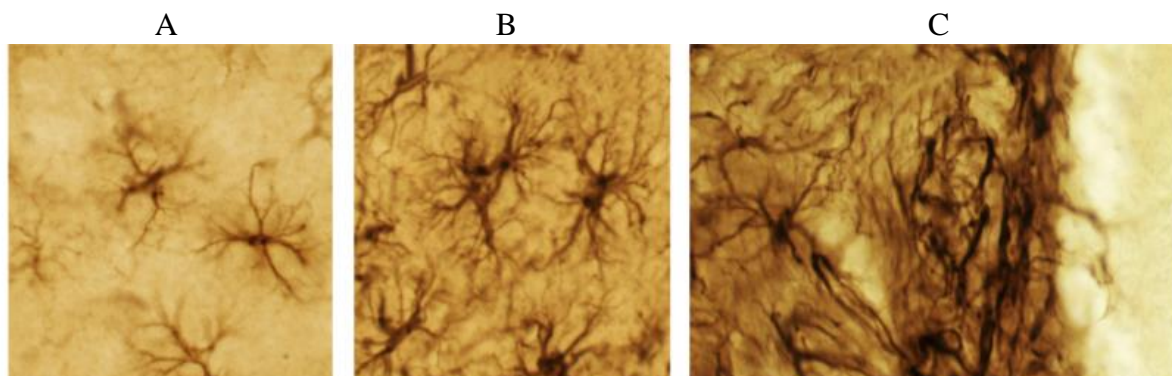


Obr. č. 7: Struktury mikroglíí u pacientů s AD. **A** – Mikroglie (hnědá; pozitivní na IL-1) ve frontální oblasti mozkové kůry. **B** – Mikroglie (modrá; pozitivní na CD11b – adhezní integrin) v ložisku A β (hnědá) v parietální oblasti mozkové kůry. Převzato z Heneka *et al.*, 2015.

Astroglie

Mimo mikroglie hrají určitou roli v patogenezi AD i astroglie neboli astrocyty (obr. č. 8). Jedná se o podpůrné buňky, které neuronům zprostředkovávají výživu. Jsou schopné se svými dlouhými výběžky napojit na krevní kapiláry, a tím tak zajišťovat přenos látek z krve k neuronům a zpět (Orel, 2015). V případě patologické reakce dochází k reaktivní astroglióze (komplexní, vícestupňová patologická reakce), zatímco remodelace astrocytů je obvykle zaměřena na neuroprotektci a obnovu nervové tkáně (Sofroniew, 2009 a 2010). Vedle aktivovaných mikroglíí se hypertrofické reaktivní astrocyty akumulují v okolí senilních plaků a jsou tak často pozorovány (*post mortem*) v lidské tkáni pacientů s AD (Medeiros a LaFerla, 2013). Podobně jako mikroglie, i astrocyty uvolňují cytokiny (TNF- α , GM-CSF), interleukiny (IL-1, IL-6), oxid dusnatý a další potenciálně toxické molekuly po expozici s A β , čímž dochází k zesílení zánětlivé odpovědi. Dále mají astrocyty roli v internalizaci a degradaci A β . Pro eliminaci A β zprostředkovanou astrocyty je potřeba ApoE, který svou lipidickou aktivitou (závislá na astrocytech) zvyšuje schopnost mikroglíí eliminovat A β . Kromě eliminačních povinností, mají astrocyty úlohu při odstraňování rozpustného A β z parenchymu paravenózní (mimožilní) drenáže (Heneka *et al.*, 2015).

Existují důkazy o tom, že zánět nervové tkáně může řídit patogenní proces u AD. Mozek by už tedy neměl být považován za imunitně privilegovaný orgán, a tato úvaha by měla být integrována do známých patogenních cest různých neurodegenerativních onemocnění. Interakce ligand – receptor (v prostředí CNS), které udržují ve zdravém mozku mikroglie pod kontrolou, jsou právě narušeny chronickým neurodegenerativním onemocněním. Ale to, kdy a jak k tomu u AD dochází, není doposud jasné (Heneka *et al.*, 2015).



Obr. č. 8: Struktury astrocytu u pacientů s AD. **A** – Fyziologický výskyt astrocytů ve zdravé tkáni. **B** a **C** – Patologický výskyt astrocytů (mírná a těžká astroglióza, postupně). Převzato z Sofroniew, 2009.

1.1.1.6 Hypotéza o oxidačním stresu

Oxidační stres je charakterizován nerovnováhou v produkci reaktivních radikálových forem kyslíku (ROS) a antioxidační obranou. ROS sehrávají významnou roli v procesu neurodegenerace a poklesu kognitivních funkcí (Gella a Durany, 2009). Mozková tkáň je, v porovnání s jinými tkáněmi v těle, náchylnější k oxidačnímu poškození (například proto, že neurony, jakožto postmitotické buňky jsou schopny v sobě kumulovat oxidační poškození během celého života; Chmátalová a Skoumalová, 2014).

U pacientů s AD je mozková tkáň vystavena oxidačnímu stresu, právě v důsledku zvýšené akumulace A β a NFT (Huang *et al.*, 2016). Důkazy o oxidačním stresu se u AD projevují vysokými hladinami oxidovaných proteinů, produktů glykace, konečných produktů peroxidace lipidů, tvorbou toxických látek, jako jsou peroxidy, alkoholy, ketony, aldehydy, volné karbonyly, cholestenon a výskytem oxidačně modifikované jaderné a mitochondriální DNA (Gella a Durany, 2009).

Se zvýšenou akumulací A β je asociována i zvýšená koncentrace kovových iontů. Bylo zjištěno, že koncentrace kovových iontů je v placích podstatně vyšší, než v okolní tkáni.

Jedná se o kovové ionty železa (koncentrace v placích je 85 ppm oproti 42 ppm v okolní tkáni), mědi (16 ppm oproti 6 ppm) a zinku (87 ppm oproti 34 ppm) (Rajendran *et al.*, 2009). Ionty železa, jako například železnaté ionty jsou schopné reagovat s molekulárním kyslíkem, přičemž vznikají železité ionty a superoxidový radikál. Vazbou na proteiny, jako je například právě A β , se organismus snaží snížit oxidační vlastnosti železa. Měď se na A β váže s velkou afinitou přes His a Tyr zbytky. Pro amyloidní plaky je charakteristický výrazný redukční potenciál vedoucí k redukci kovových iontů za vzniku oxidované formy A β . Vedlejším produktem této reakce je peroxid vodíku, který může dále generovat volné radikály a působit neurotoxicky (Chmátalová a Skoumalová, 2014). Dysregulace metabolismu železa a mědi se podílí na vzniku a rozvoji AD, a to hlavně kvůli prohloubení oxidačního stresu, což má za následek poškození biomolekul, zvýšenou agregaci A β a hyperfosforylaci tau proteinu. Poruha metabolismu těchto dvou kovů má za následek také i regulační selhání neuronálního buněčného cyklu, který vede k apoptóze buněk (Jomova a Valko, 2011). Zinek působí ve velmi nízkých koncentracích spíše protektivně, protože zpomaluje cytotoxické působení A β , a to destabilizací vznikajících agregátů. Je schopný kompetice s ionty mědi o vazná místa na A β , čímž dokáže změnit jeho konformaci. Na takto změněný amyloid se měď už nedokáže navázat, a tím je předcházeno sekundární tvorbě volných radikálů. Pokud je však koncentrace zinku vysoká, tak svojí vazbou na A β naopak urychlí tvorbu fibrilárních amyloidních agregátů a působí tak neurotoxicky (Chmátalová a Skoumalová, 2014; Huang *et al.*, 2016).

Disbalance mezi tvorbou volných radikálů a antioxidačními mechanismy může mít za následek poškození makromolekul v organismu a tím pádem narušení správného fungování buněk. Při AD jsou patologické procesy v mozku doprovázeny oxidačním stresem. Zatím však není jasné, jestli je právě oxidační stres primární příčinou vzniku AD nebo jestli vzniká sekundárně, jako důsledek změn v mozku, které se rozvíjejí při AD (Chmátalová a Skoumalová, 2014).

1.1.1.7 Hypotéza o mitochondriální dysfunkci

Mitochondriální dysfunkce je při AD pozorována ve více tkáních, jako je mozek, krevní destičky a fibroblasty (Swerdlow, 2007). Fyziologická funkce mitochondrií v mozku se postupně s věkem zhoršuje, což může přispívat k neurodegeneraci u této choroby. Cerebrální hypometabolismus je patrný v postižených oblastech mozku, přičemž klesá aktivita některých mitochondriálních enzymů, včetně komplexu cytochrom c oxidasy, komplexu α -ketoglutarát dehydrogenasy a komplexu pyruvát dehydrogenasy. Mitochondrie

mají při AD také snížený membránový potenciál, zvýšenou permeabilitu a produkují nadbytek ROS, které dále poškozují makromolekuly a tím přispívají k patogenezi neurodegenerace (Onyango, *et al.*, 2016). APP, A β nebo komplex γ sekretas se nacházejí buď v mitochondriích, nebo v mitochondriální membráně. Jejich funkce v mitochondriích je v současné době neznámá (Swerdlow, 2007). Je však zřejmé, že zvýšené hladiny APP a A β přispívají k mitochondriálním abnormalitám. Nadprodukce APP a A β může mít vliv na mitochondriální fúzi a štěpení, může narušit mitochondriální transport a také mitochondriální elektronový transportní řetězec, což vede k nadměrné produkci ROS a celkovému narušení mitochondriální funkce (Onyango, *et al.*, 2016). Jedna studie uvádí (Glabe a Kayed, 2006), že oligomer A β permeabilizuje membrány, čímž zvyšuje schopnost buněk deaktivovat mitochondrie. Takže jedním z fyziologických rolí APP nebo A β v mitochondriích či její membráně může být tzv. vypnutí abnormálních mitochondrií (Swerdlow, 2007).

Hypotéza o mitochondriích bere v úvahu rovněž jevy stárnutí, což platí pro jednotlivce, ještě než se u nich rozvine AD. Odolnější mitochondrie jsou schopny si udržet přiměřenou funkci déle, než méně odolné mitochondrie, což může ovlivňovat úspěšnost stárnutí. V případě, že by změna fyziologie APP nebo A β způsobila mitochondriální dysfunkci, spustila by se série události jako při stárnutí. Jakmile není rovnováha mezi aerobním a anaerobním metabolismem udržitelná, jsou spuštěny různé buněčné odezvy. Dochází například k opětovnému vstupu do buněčného cyklu nebo k fosforylaci tau proteinu, až nakonec dojde k selhání neuronální diferenciaci a rozvoji neurodegenerace (Swerdlow 2007; Lin a Beal, 2006).

1.2 Příznaky AD

AD je často hlavní příčinou demence u starších lidí (Dos Santos *et al.*, 2016). Symptomy se u lidí trpící AD liší a rozdělují se mezi kognitivní změny typické související s věkem a rané příznaky (Alzheim. Assoc. Rep., 2018). Obecně AD dělíme na tzv. presenilní formu (FAD, rychlý průběh onemocnění), kdy se příznaky objevují již před 65. rokem, a na tzv. senilní formu (sporadický výskyt, pozdní nástup onemocnění), u které se první příznaky objevují po 65. roce. (Zvěřová, 2017). Podle průběhu je AD klasifikováno na 3 stádia, a to na lehké, střední a těžké stádium (Dos Santos *et al.*, 2016).

1.2.1 Rané stádium

V raném stádiu AD jsou ovlivněny cholinergní neurony v limbickém systému. Dochází tak ke zmenšení objemu hipokampu přibližně o 25 %. Pro toto stádium jsou typické změny chování, jako je například podrážděnost, změny osobnosti, špatná orientace v čase a místě, hněv, smutek a potíže se soustředěním. Dále se u pacientů objevuje agitace, která je spojená se ztrátou objemu v několika specifických oblastech mozku, včetně frontální kůry, zadní části cingulární kůry, amygdaly a hipokampu. Nemocní nejsou rovněž schopni zpracovávat nové informace a dochází k poklesu schopnosti provádět rutinní úkoly (Dos Santos *et al.*, 2016; Lopéz a DeKosky, 2008).

1.2.2 Střední stádium

Ve středním stádiu se poruchy kognitivních funkcí prohlubují. Toto stádium může trvat v rozmezí 2 – 10 let. Dochází k poklesu hladiny ACh v některých neuronech, mezi které můžeme zařadit i ty, které se nacházejí ve ventrálním telencefalu. Tato část mozku je za fyziologických podmínek zapojena do ukládání informací a dlouhodobé paměti. Dále se objevují obtíže při rozpoznávání a komunikaci s lidmi (Dos Santos *et al.*, 2016). Dochází také k rychlé progresi poruch aktivit každodenního života, zejména obsluha domácích zařízení, jako jsou televize, telefon a pračka, ale také řízení automobilu. Vyskytuje se také i ztráta chuti k jídlu a občas se může vyskytovat i zanedbávání hygieny. Často se ale také objevují (i když ne u všech pacientů) i psychologické a behaviorální problémy. Mezi ně můžeme zařadit vokalizaci (vykřikování, sténání), bezdůvodné a neúčelné opouštění bytu či domu (toulání se), agresivitu, apatii, halucinace nebo bludy (nejčastěji o tom, že je někdo okrádá/okradl; Zvěřová, 2017; Dos Santos *et al.*, 2016; Lopéz a DeKosky, 2008).

1.2.3 Pozdní stádium

V případě těžkého posledního stádia AD nejsou pacienti schopni se sami najíst či napít, kvůli poškozené oblasti mozku kontrolující polykání. Mohlo by tedy dojít k vdechnutí jídla do plic, což by vedlo k plicní infekci, konkrétně plicní pneumonii (Alzheim. Assoc. Rep., 2018). Nemocní nejsou schopni porozumět nebo se vyjádřit, a často se u nich objevuje aji inkontinence moči a stolice. Vlivem masivního úbytku cholinergních neuronů v mozkové kůře nerozpoznávají nejbližší příbuzné ani své okolí, ztrácejí vzpomínky a jsou časově a prostorově dezorientovaní. U těchto pacientů už není možné obnovit zapomenuté informace (vzpomínky) v důsledku zasažení onemocnění do limbického systému. Stávají se tedy plně

závislími na okolní péči. Tato fáze trvá v průměru 1 – 3 roky a končí smrtí pacienta (Zvěřová 2017; Dos Santos *et al.*, 2016).

1.2.4 Atypické a asymptomatické stádium

Mimo výše uvedená stádia se může objevit i atypický nebo asymptomatický průběh. V rámci atypického průběhu je nutno na úvod zmínit to, že AD bývá představována, jako syndrom frontálního laloku s významnými behaviorálními abnormalitami a deficitem výkonných funkcí. Další (pozdější) varianta zahrnuje bilaterální okcipitální a parietální defekty laloku, což se projevuje jako Bálintův syndrom, který se projevuje sníženou vizuální pozorností, optickou ataxií apod. Dalším syndromem, pod kterým může být tato choroba skryta je kortikobazální syndrom (CBS; Lopéz a DeKosky, 2008; Johanidesová *et al.*, 2012). Pro CBS jsou charakteristické asymetrické samovolné pohyby, včetně třesu, dystonie, rigidity a myoklonus. Poměrně často jsou přítomny také různé kognitivní deficity (Chahine *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2011).

U asymptomatického průběhu AD hraje roli rozvoj pozitronové emisní tomografie (PET, více v následující kapitole) pro zobrazování A β . U značného počtu starších lidí, kteří nevykazují žádné kognitivní změny, lze pozorovat A β 42. Není pravděpodobné, že by se vzhledem k jejich věku u nich následně rozvinuly kognitivní změny apod. (mohou se ale vyskytnout i výjimky). U některých jedinců, kterým byla provedena pitva, byly nalezeny důkazy o přítomnosti senilních plaků a neurofibrilárních spleť, i když byli zdraví a bez kognitivních změn. V současnosti nelze určit, zda skupina lidí, které by byla nějaká patologie AD nalezena zůstala asymptomatická. Je nutno počítat s vysokým rizikem objevení klinických příznaků a vzniku kandidátů na preventivní terapii, v závislosti na riziku, nákladech a vedlejších účincích těchto terapií (Dubois *et al.*, 2010).

1.3 Diagnostika

Počáteční příznaky mohou být atypické s nekognitivními změnami, proto je důležitá důvěryhodnost, pochopení a váha důkazů, jak ze strany pacienta, tak lékaře.

1.3.1 Klinická diagnostika

Pro řešení diagnostické nejistoty byla v roce 1984 vypracována McKhannem a spol. kritéria NINCDS-ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; McKhann *et al.*, 1984).

Kromě těchto kritérií se do diagnostického procesu zapojují, na základě nových poznatků i různé biomarkery.

Podle výše zmíněných kritérií můžeme diagnózu AD určit za jistou, možnou, pravděpodobnou a nepravděpodobnou. S jistotou, že se jedná o AD, můžeme říct tehdy, pokud jsou splněna kritéria pro pravděpodobnou AD a je doložen histopatologický důkaz z biopsie nebo autopsie (Zvěřová, 2017; McKhann *et al.*, 1984).

Pravděpodobná AD je potvrzena klinickými a rovněž i neuropsychologickými testy (viz kap. 1.3.2), poruchou paměti a dalších kognitivních funkcí (2 a více). Začátek klinických příznaků je mezi 40. až 90. rokem (nejčastěji kolem 65 roku) a nesmí být přítomno jiné onemocnění, které by vedlo ke vzniku demence. Dalšími faktory může být pozitivní rodinná anamnéza, normální EEG záznam a likvorologický nález. Také, ale některé z příznaků, jako jsou poruchy nálad (zejména deprese), nespavost, poruchy vnímání, sexuální poruchy, inkontinence, apod. (Alzheim. Assoc. Rep., 2018; Zvěřová, 2017).

Možná AD je charakteristická atypickým začátkem, poruchou paměti a učení, a není přítomno onemocnění, kterým by se dala demence vysvětlit. Diagnostikována je v případě, že nejsou dostupné důkazy o genetické mutaci způsobující AD z genetického vyšetření nebo rodinné anamnézy (McKhann *et al.*, 1984).

U nepravděpodobné AD se objevují neurologické příznaky, jako senzorické deficity, poruchy pohybové koordinace, ale také epileptické záchvaty či poruchy chůze (Zvěřová, 2017).

1.3.2 Neuropsychologické a psychometrické testy

Tato vyšetření analyzují kognitivní funkce pacientů v různých oblastech. Jedním z nejpoužívanějších testů na světě je Mini-Mental State Examination (MMSE). Připravil ho Folstein a kol. (Folstein *et al.*, 1975). Tento test může být použit buď samostatně, nebo v kombinaci s jinými nástroji pro zhodnocení kognitivní úrovně pacienta, jako jen například Clock test. Dalším testem, který je doporučován je Information Memory Concentration Test (IMC) od Blessedova neboli tzv. Blessedova škála (Dos Santos *et al.*, 2016; Zvěřová, 2017).

MMSE je vhodný screening pro vyloučení demence lidí v primární péči. Tento test je zaměřený na kognitivní aspekty mentálních funkcí a nesoustředí se na náladu či abnormality v myšlení pacienta. MMSE je komplex 11 subtestů (viz tab. č. 1) jejichž výstupy pokrývají 5 domén (orientaci, rozsah pozornosti, pracovní paměť, verbální paměť, řeč a praxi) (Štěpánková *et al.*, 2015).

Předností MMSE je spolehlivě odlišit středně těžké demence od normálního stavu. Problém nastává v případě diagnostiky časného stádia demence s lehkou kognitivní poruchou, která je považována za předstupeň demence (Štěpánková *et al.*, 2015).

Tab. č. 1: Ukázka obsahu MMSE testu. Převzato z Štěpánková *et al.*, 2015.

| Testová úloha | Doména |
|--|----------------------------|
| Orientace časem | Orientace |
| Orientace místem | |
| Opakování 3 slov | Rozsah pozornosti |
| Odčítání 7 od 100 (tzv. sedmičkový test) | Koncentrace/pracovní paměť |
| Vybavení 3 slov z paměti | Verbální paměť |
| Pojmenování 2 předmětů | Řeč a praxe |
| Opakování věty - jazykolamu | |
| Porozumění a provedení pokynu | |
| Porozumění psanému pokynu | |
| Napsání věty | Řeč a praxe |
| Překreslení obrazce | |

1.3.3 Biochemické vyšetření AD

Nejvhodnější diagnostický marker pro AD by měl splňovat minimálně 3 základní požadavky: reagovat na základní neurobiologické změny při onemocnění, být potvrzen post-mortem a být měřitelný co nejdříve v rámci začínající nemoci (ideálně v pre-symptomatickém stádiu). Dále by jeho odběr měl být neinvazivní a relativně jednoduchý (De-Paula *et al.*, 2012).

Mozkomíšni mok (MM) může být považován za ideální zdroj biomarkerů v AD, protože je v těsném kontaktu s mozkovou tkání a patologické změny v mozku jsou často odraženy v MM (De-Paula *et al.*, 2012). Nejběžnější biochemický test prováděný z MM, který je průkazný a není pro pacienty zatěžující, je analýza tripletu (A β 42, tau proteinu a fosforylovaného tau proteinu). V porovnání se zdravými jedinci, mají pacienti s AD sníženou hladinu A β a vyšší hladinu normálního a fosforylovaného tau proteinu. Z novějších biomarkerů je testován mitochondriální enzym amyloid-vázající alkohol dehydrogenasa (ABAD; Zvěřová, 2017).

Provádějí se také laboratorní testy krve, které zahrnují kompletní krevní obraz, močovinu v séru, kreatinin, tyroxin (T4), hormony stimulující štítnou žlázu (TSH), albumin, jaterní enzymy, vitamín B12, vápník, sérologické testy na syfilis (u pacientů mladších 60 let)

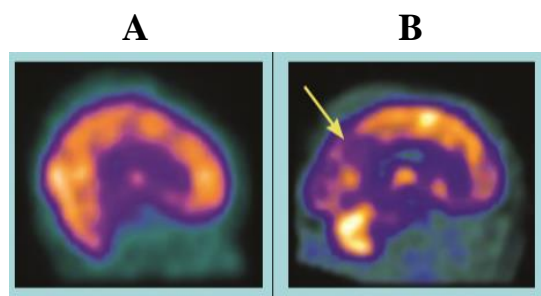
a kompletní sérologii HIV (Dos Santos *et al.*, 2016). Nedostatek právě vitamínu B12, B9, ale také změny v koncentracích metabolitů zmíněných vitamínů (homocystein) mohou ovlivnit vznik a progresi neuropsychiatrických onemocnění. Citlivým markerem funkční nedostatečnosti vitamínů B12 a B9 je celkový plazmatický homocystein. Bylo také potvrzeno spojení mezi nedostatkem B9 a narušeným metabolismem monoaminoxidasy (MAO; Bottiglieri *et al.*, 2000 a 2005). MAO zpětně vychytává monoaminové neurotransmitery. Vedlejším produktem reakcí katalyzovaných MAO jsou látky neurotoxického charakteru, jako je peroxid vodíku, aldehydy a amoniak (Zvěřová, 2017).

1.3.4 Vyšetření vybranými zobrazovacími technikami

K zobrazovacím technikám, které se používají na vyšetření mozku, při podezření na AD patří počítačová tomografie (CT), jednofotonová emisní počítačová tomografie (SPE-CT), pozitronová emisní tomografie (PET) a magnetická rezonance (MRI).

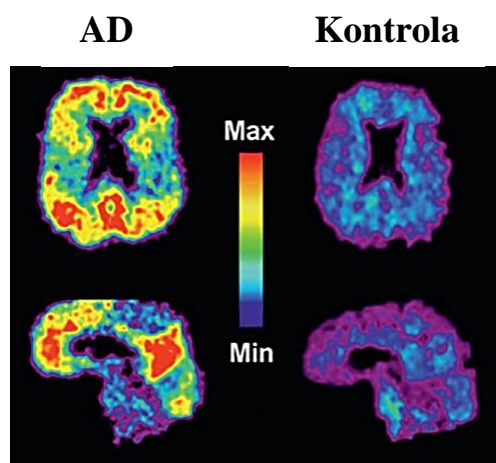
Pomocí CT je možné vizualizovat rozšiřující se atrofii v mozku. Metoda bývá použita k posouzení integrity mozkové tkáně. Tato technika je také schopna kvantifikovat hustotu tkání, velikost komor, objem MM a hmotnost mozku. U pacientů s AD, jejichž stav se rychle zhoršuje, jsou vidět největší změny ve velikosti komor. V časně diagnóze AD má CT malou hodnotu, protože na základě něj se nepozná o jaký stupeň či stádium AD se jedná. Proto je nutná korelace snímků CT s klinickými příznaky, výsledky neuropsychologických testů a popřípadě pitevních nálezů (Khachaturian 1985; McKhann *et al.*, 1984).

Rozšířením této techniky je SPE-CT, která se používá pro diferenciální diagnostiku demence, včetně AD (Dos Santos *et al.*, 2016). Měří průtok krve mozkiem pomocí SPE-CT radiofarmak, jakými jsou ^{99m}Tc -hexamethylpropylen amin a ^{99m}Tc -ethyl-cysteinový dimer (Yeo *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2016). Více prokrvené tkáně budou obsahovat více radiofarmak a budou tedy vyzařovat intenzivnější gama záření. Látka označená radionukleotidem je navíc metabolizována v cílových tkáních a buňkách. Neurony s vyšší aktivitou (vyšším metabolickým obratem) vychytávají více dané látky, radionukleotid se více kumuluje a následně vykazují vyšší intenzitu gama záření. Lze tak zobrazit hypoperfuzi mozku (obr. č. 9), metabolickou aktivitu neuronů apod. (Orel, 2015).



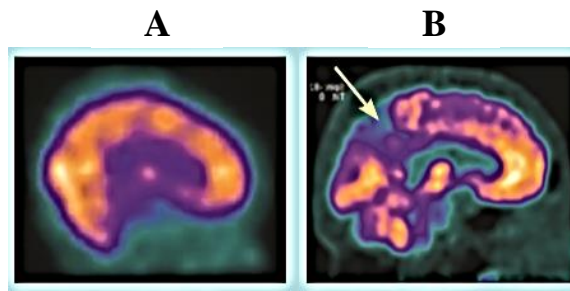
Obr. č. 9: SPE-CT a FDG-PET skeny mozku, kde **A** – zobrazení zdravého mozku v sagitální rovině, díky SPE-CT skenu. **B** – zobrazení mozku v sagitální rovině, pacienta trpícího AD, díky SPE-CT skenu. V temporoparietální oblasti je viditelná hypoperfúze. Převzato z Rayment *et al.*, 2016.

Pomocí PET je možné kvantitativní vyhodnocení rychlosti využití glukózy, spotřeby kyslíku a regionální změny průtoku krve mozkem (rCBF). U většiny pacientů s AD se vyskytuje mozkový hypometabolismus, který je v souměřitelnosti se závažností onemocnění (McKhann *et al.*, 1984). Nejvyužívanější technikou pro detekci markerů A β uložených v neurální tkáni je ^{11}C -PIB-PET (obr. č. 10). V rámci této techniky se používá látka PIB (N-methyl-[^{11}C]2-(4-methylaminofenyl)-6-hydroxybenzothiazol; Zhang *et al.*, 2014), která je označena pozitronovým zářičem ^{11}C . Pomocí ^{11}C -PIB-PET vyšetření je například měřena glykolytická aktivita, která odpovídá míře aktivity neuronů, která je negativně ovlivněna kumulací A β 42 (Orel, 2015; Zhang *et al.*, 2014; Chu, 2012).



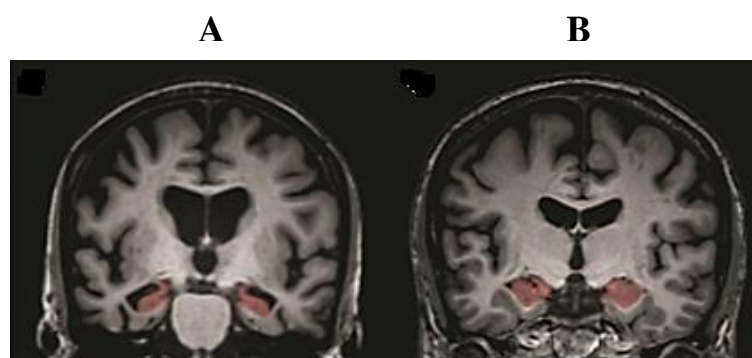
Obr. č. 10: Axiální a sagitální PET sken mozku, zobrazující rozdíl mezi obsahem amyloidu, v mozkové tkáni u pacienta trpící AD a zdravým jedincem (kontrola). Převzato z Rayment *et al.*, 2016.

PET s využitím fluorodeoxyglukosy (FDG-PET; obr. č. 11) se také používá k měření metabolické aktivity mozku. U pacientů s AD je charakteristickou změnou bilaterální hypometabolismus horního/zadního temporálního a parietálního laloku. Při mírném zhoršení kognitivních funkcí, v důsledku patologie AD, mozkové skeny pořízené FDG-PET odhalují hypometabolismus ve střední části parietálního kortexu. U pokročilé formy AD je navíc přítomen hypometabolismus frontálního laloku (Chu, 2012).



Obr. č. 11: SPE-CT a FDG-PET skeny mozku, kde **A** – SPE-CT sken zdravého mozku v sagitální rovině. **B** – FDG-PET sken mozku v sagitální rovině pacienta trpícího AD. V temporoparietální oblasti je zřetelný hypometabolismus. Převzato z Rayment *et al.*, 2016.

Pomocí MRI je možné detekovat vývoj různých strukturních a funkčních abnormalit v časných až pozdních stádiích AD. Anatomická a objemová MRI je nejrozšířenější technikou, která měří atrofie, jak lokálně, tak i globálně. U AD se objevují hipokampální atrofie (obr. č. 12), které jsou považovány za indikátor regionálního poškození neuronů (Cavedo *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2016).



Obr. č. 12: Hipokampální atrofie viditelná pomocí MRI skenu s vysokým rozlišením, kde červeně je označený hipokampus. **A** – pacient trpící AD; **B** – zdravý jedinec (kontrola). Převzato z Teipel *et al.*, 2015.

1.4 Terapie AD

V současné době AD patří mezi nevyléčitelná onemocnění. Včasným zahájením terapie je možné pouze zpomalit její průběh a udržet ji tak v lehčím stádiu. Cílem je zmírnit příznaky a oddálit nástup těžké formy AD. Existují dvě možnosti terapie, a to farmakologická a nefarmakologická léčba. Ve většině případů, terapie AD, zahrnuje obě možnosti léčby.

1.4.1 Farmakologická léčba

1.4.1.1 Cholinesterasové inhibitory

Inhibitory ChE jsou širokou skupinou chemických sloučenin s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. AChE inhibitory hrají důležitou roli v biochemických procesech v lidském těle. Specifické BuChE inhibitory, jako je například iso-OMPA (tetraisopropyl pyrofosforamid), mají převážně diagnostický význam. Nižší zájem o BuChE inhibitory může být vysvětlen tím, že jsou za fyziologických podmínek v nadbytku (Adler a Filbert, 1990).

Sloučeniny inhibující AChE můžeme rozdělit na reverzibilní (vratné) a irreverzibilní (nevratné). Dále mohou být rozděleny do 3 skupin, a to podle toho, na jaké místo enzymu se váží. Vázat se mohou na esteratickou část aktivního místa, na β -aniontové (periferní) nebo na α -aniontové místo. Co se týče irreverzibilních inhibitorů, tak ty se v terapii AD nepoužívají. (Pohanka 2011; Čolović *et al.*, 2013).

Reverzibilní inhibitory

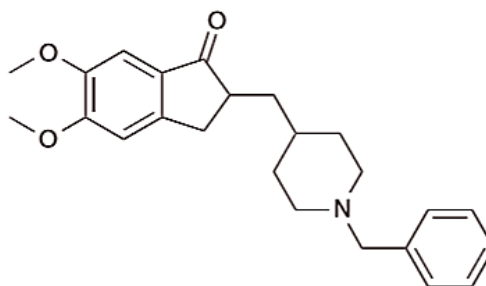
Spadají sem sloučeniny s odlišnými funkčními skupinami (karbamát, kvartérní nebo terciární amoniová skupina), které jsou aplikovány v léčbě různých nemocí, jako je AD, ale i myasthenia gravis, glaukom, aj. (Pohanka, 2011). Mezi obecné nežádoucí účinky těchto inhibitorů patří nauzea, zvracení, bradykardie, bolest hlavy, aj. (Farlow *et al.*, 2010; Birks *et al.*, 2009).

U pacientů s AD tyto inhibitory inhibují AChE aktivitu a udržují tak hladinu AChE zvýšenou. Proto dochází ke zvyšování cholinergní neurotransmise v přední oblasti mozku a tím se kompenzuje ztráta funkce mozkových buněk. Žádný lék obsahující inhibitor nezajišťuje oddálení nebo zastavení progresu choroby (Čolović *et al.*, 2013). Léky, zlepšující kvalitu života pacientům s touto chorobou, obsahující nejčastěji inhibitor, jako je donepezil, rivastigmin a galantamin. V roce 1993 byl použit, jako první inhibitor takrin. Od jeho užívání

je ale pomalu upouštěno (Bond *et al.*, 2012; Watkins *et al.*, 1994). Také fenoly podobné kurkuminu nebo resveratrol byly zaměřeny na léčbu AD mnoho let, protože jsou známé pro jejich různé biologické účinky. Zvláště, resveratrol má výhodu v selektivní inhibici BuChE. Navíc má silnou anti-amyloidogenní aktivitu, při které prostřednictvím proteasomu, redukuje hladiny A β (Li *et al.*, 2017).

- Donepezil

Donepezil je piperidinový selektivní inhibitor AChE (obr. č. 13) vázající se reverzibilně na β -aniontové místo enzymu. Jeho hlavní terapeutické použití je v paliativní léčbě mírného až středního průběhu AD. V některých případech může zlepšit kognitivní funkce i u pacientů s těžkou formou AD (Čolović *et al.*, 2013; Winbland, 2006).



Obr. č. 13 : Chemická struktura donepezilu. Převzato z Ríos, 2012.

Výzkum, který vedl k vývoji donepezilu, začal v roce 1983 v japonské firmě Eisai. V roce 1996 dostala tato společnost schválení od amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro přípravu donepezilu pod značkou Aricept, kterou uvedla na trh společně s firmou Pfizer (Winbland, 2006).

Snadno prochází přes hematoencefalickou bariéru (BBB). Eliminační poločas má okolo 70 hodin. U pacientů užívající vyšší dávky, bylo zaznamenáno mírné zlepšení kognitivních funkcí ale naopak žádné zlepšení celkové funkce. Běžné nežádoucí účinky donepezilu jsou zvracení, nechutenství, nevolnost, bradykardie, aj. (Farlow *et al.*, 2010).

- Takrin

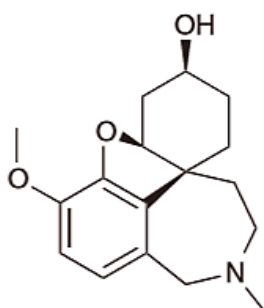
THA (obr. č. 19, viz kap. 3.1.2.) je schopen reverzibilně interagovat s α -aniontovým místem v AChE. Stal se tak prvním schváleným (v roce 1993) inhibitorem ChE používaným pro potlačení příznaků AD. Snadno prostupuje přes BBB a je metabolizován v játrech cytochromem P450. Je celosvětově známý a prodáváný pod názvem Cognex. Dnes je jeho

aplikace omezošana kvůli relativně vysoké hepatotoxicitě (Konrath *et al.*, 2013; Yip *et al.*, 2018; Koráběčný *et al.*, 2012). Z tohoto důvodu zde byla snaha o nalezení derivátů THA, které by byly méně toxické.

Jedním z nich je 7-MEOTA (obr. č. 20; viz kap. 3.1.2.). Ten byl vyvinut v České republice, jako nový méně toxický derivát THA, přičemž bylo zachováno terapeutické použití při AD. Původně byl ale představen, jako antidotum proti anticholinergní látce 3-chinuklidinyl benzylátu. V inhibici lidské AChE a BuChE je poměrně slabší než THA, ale za to má méně vedlejších účinků a je méně toxický (Soukup *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015).

- Galantamin

Galantamin neboli Nivalin je selektivní, kompetivní, rychle reverzibilní inhibitor AChE (obr. č. 14) interagující s α -aniontovým místem. Může se také vázat s aktivním místem zahrnující aromatickou roklí. Jedná se o alkaloid izolovaný z *Galanthus nivalis* (sněžěnka; Pohanka, 2011). V současné době je ve farmaceutickém průmyslu získáván z narcisových cibulek, což vyvolalo exponenciální zájem o izolaci a charakterizaci alkaloidů z cibulek rodu *Amaryllidaceae* (např.: lykorin, homolykorin a hippeastrine), většina z nich má anticholinesterasovou aktivitu (Dzoyem *et al.*, 2014).



Obr. č. 14: Chemická struktura galantaminu. Převzato z Ríos, 2012.

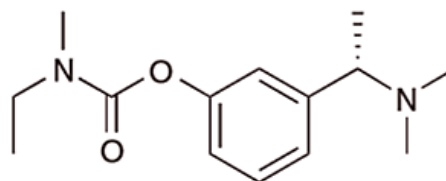
Galantamin byl poprvé uveden na trh v roce 2001 při léčbě mírné až střední formy AD. Kromě léku slouží, jako alosterický ligand na nikotinových cholinergních receptorech vyvolávající jejich modulaci. Galantamin interaguje s nikotinovým receptorem na vazebných místech, kde zesiluje jejich citlivost na ACh (Pohanka, 2011; Wessler a Kirkpatrick, 2008).

Absorpce galantaminu je rychlá a kompletní, s orální biologickou dostupností mezi 80 a 100 %. Když galantamin alostericky potencuje účinky na nikotinových receptorech, neovlivňuje tím pouze cholinergní neurotransmisi, ale také další neurotransmiterní systémy, jako jsou monoaminy, glutamát a γ -aminomáselná kyselina (GABA). Tyto účinky mohou být

prospěšné a zlepšit kognitivní funkci a psychiatrické onemocnění (schizofrenie, těžké deprese, aj., Ago *et al.*, 2011).

- Rivastigmin

Rivastigmin je silný reverzibilní karbamátový inhibitor (obr. č. 15) vázající se na esteratické aktivní místo enzymu. Narozdíl od donepezilu, který selektivně inhibuje AChE, rivastigmin inhibuje, jak AChE, tak i BuChE. To vede k využití pro léčbu mírné až střední formy AD (Pohanka, 2011; Čolović *et al.*, 2013).

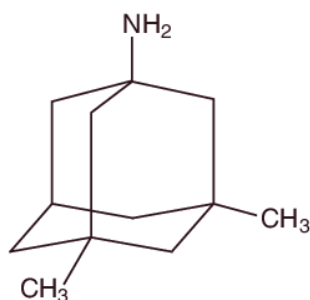


Obr. č. 15: Chemická struktura rivastigminu. Převzato z Ríos, 2012.

Rivastigmin neboli Exolon je užíván orálně ve formě kapslí, kapek nebo náplasti. Dobře se vstřebává a je vylučován močí. Včasná a trvalá léčba AD tímto inhibitorem maximalizuje příznivé účinky, ve srovnání s mírou poklesu kognitivních funkcí a závažnosti demence. Nežádoucími účinky může být zvracení, teplota, únava, bolest hlavy, aj. (Birks *et al.*, 2009).

1.4.1.2 Antagonisté N-methyl-D-asparátu

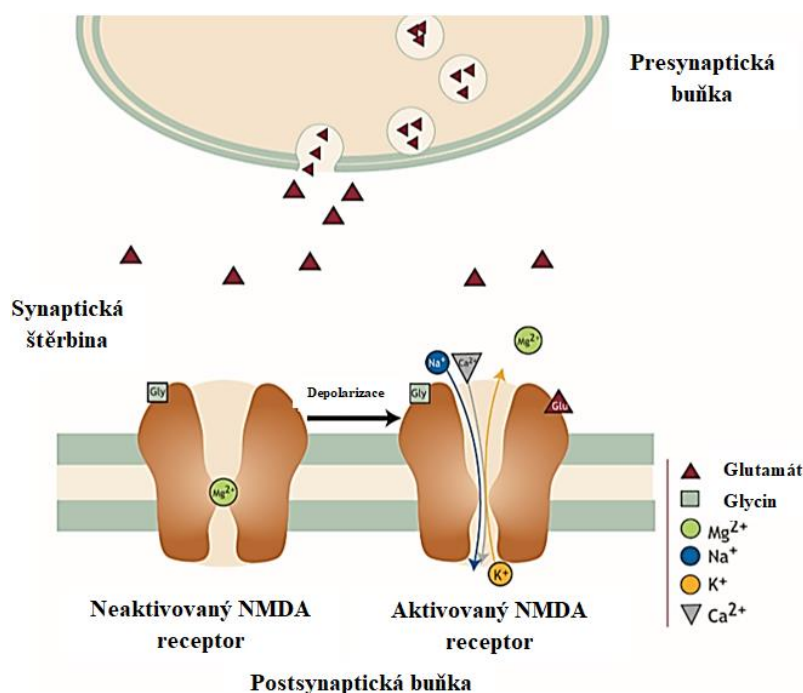
Memantin (obr. č. 16) je lék, který byl schválený Evropskou unií v roce 2002. Je prodáváný pod názvem Ebixa. Jedná se o nekompetitivního antagonistu N-methyl-D-asparátu (NMDA) receptorů, čímž snižuje excitotoxicitu a zabraňuje neurodegeneraci způsobenou nadměrným působením glutamátu (Yiannopoulou *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2016). Předpokládá se tedy, že memantin sice snižuje výše uvedenou excitotoxicitu, ale rovněž umožňuje fyziologické působení glutamátu (i vstup fyziologického množství Ca^{2+} iontů do neuronů) v procesu učení a paměti (Chu, 2012). Je dostupný ve formě tablet (okamžité uvolňování), tobolek (prodloužené uvolňování) a perorální přípravek (v kombinaci s donepezilem). Kombinace memantinu a donepezilu má příznivé výsledky na kognitivní funkce, na každodenní činnosti a chování (porovnání s donepezilem a placebem; Finnn, 2017).



Obr. č. 16: Chemická struktura memantinu. Převzato z Kornhuber a Kennepohl, 2007.

Glutamát a NMDA receptory

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem, v mozku savců, který se podílí na excitačním postsynaptickém přenosu přes ionotropní a metabotropní glutamátové receptory. NMDA receptory (obr. č. 17) mají velký význam v dlouhodobém ovlivnění synaptické plasticity (LTP; Olivares *et al.*, 2012; Wang a Reddy, 2017). Místo, bohaté na NMDA receptory jsou pyramidální buňky v hipokampu a mozkové kůře (oblasti zapojené do kognitivních funkcí, jako je paměť a učení; Chu, 2012).



Obr. č. 17: Schéma aktivovaného a neaktivovaného NMDA receptoru. Převzato z Farlow, 2004.

Mechanismus podílející se na učení a paměti, vyžaduje dlouhodobou potenciaci zprostředkovanou glutamátem právě přes NMDA receptory (Chu, 2012). Za fyziologických

podmínek je iontový kanál NMDA receptoru blokován Mg^{2+} a po uvolnění glutamátu dojde k depolarizaci membrány, a Mg^{2+} opustí kanál. To vede k influxu Na^+ a Ca^{2+} iontů. Po aktivaci NMDA receptor zůstává iontový kanál delší dobu otevřený a jakmile vstoupí Ca^{2+} ionty, tak dojde k LTP. Pro odblokování kanálu na NMDA receptorech musí být splněna současná aktivace AMPA receptorů, které umožní vstup Na^+ iontů do buněk a parciální depolarizaci membrány (Dušek a Večeřová-Procházková, 2015).

Kognitivní porucha u AD úzce souvisí se synaptickou plasticitou, ve které receptory NMDA hrají rozhodující roli (Zhang *et al.*, 2016). Zvýšené uvolňování a snížené odbourávání glutamátu společně se zvýšenou tvorbou $A\beta$ vede k chronické hyperexcitaci NMDA receptorů a zvýšenému toku Ca^{2+} iontů do neuronů. Ca^{2+} ionty aktivují tvorbu kyslíkových radikálů, což nakonec vede k poškození nebo až smrti neuronů (glutamatergních i cholinergních). Glutamát potencuje toxicitu $A\beta$ a zvyšuje jeho tvorbu kvůli posunu aktivity od α sekretasy k β sekretase (Dušek a Večeřová-Procházková, 2015). Je známo, že oligomery $A\beta$, ale i tau protein narušují (inhibují) LTP závislou na NMDA receptorech. Této inhibici se dá předcházet, a to použitím selektivního antagonisty (memantinu), snížením hladiny extracelulárního glutamátu, apod. (Zhang *et al.*, 2016).

1.4.1.3 Sekretasové inhibitory

Tyto inhibitory blokují enzymy, které štěpí APP, čímž zabraňují tvorbě nerozpustného $A\beta$, který je odpovědný za tvorbu senilních plaků. Inhibovanými enzymy jsou BACE1 (Dos Santos *et al.*, 2016). Touto inhibicí je tedy možné zpomalit progresy AD již v časném stádiu (Ghosh a Osswald, 2014). Podle některých studií je BACE1 zajímavým terapeutickým cílem u AD (Sinha a Lieberburg, 1999). Uvádí se, že po identifikaci BACE1 byla snaha syntetizovat a testovat několik inhibitorů tohoto enzymu, a tím zpomalit postup AD na delší dobu (Zhu *et al.*, 2009).

Jednou z možných látek fungující, jako inhibitor BACE1 je LY2811376 ((S)-4-(2,4-difluoro-5-pyrimidin-5-yl-fenyl)-4-methyl-5,6-dihydro-4H-[1,3]thiazin-2-yl-amine). Je to první nepeptidický inhibitor BACE1, díky němuž dochází ke snížení množství $A\beta$. Na zvířecích modelech a zdravých dobrovolnících byly však pozorovány netoxické změny. Zřetelný a dlouhodobý pokles $A\beta$ v MM byl měřen při dávkách 30 nebo 90 mg (perorální podání). Z důvodů toxikologických nálezů, v rámci dalších dlouhodobých preklinických studií, byl další klinický vývoj této látky přerušen (Kumar *et al.*, 2018). Další možností je silný hydroxyethylenový peptidový inhibitor OM99-2. Inhibuje leucin a alanin, efektivně a účinně působí na BACE1 (Dos Santos *et al.*, 2016). V současné době jsou ve

III. fázi klinického zkoušení 3 BACE1 inhibitory, a to verubecestat, AZD3293 a E2609 (Hroudová, 2017; Briggs *et al.*, 2016).

Pro inhibici BACE1, existují i některé přirozeně se vyskytující látky používané v tradiční čínské medicíně. Jde například o 2,2,4-trihydroxychalkon (TDC) a ginsenosid Rg1. Ginsenosid Rg1 se v tradiční medicíně používá intenzivně pro zlepšení paměťové funkce a vykazuje asi 80% inhibiční aktivitu proti BACE1 (Dos Santos *et al.*, 2016).

PS1 a PS2 jsou hlavními enzymatickými cíli pro inhibici γ sekretasy v rámci terapie AD. Bohužel bylo zjištěno na transgenních knockout myších, že inhibice tohoto enzymu vyvolává nežádoucí vedlejší účinky. Kromě zřejmé role v AD mají také za úkol kontrolovat Notch signální dráhu (Notch protein je substrátem γ sekretasy) odpovědnou za buněčnou proliferaci a diferenciaci během embryonálního vývoje. Vyřazení obou genů u myši způsobilo nedostatečné vyvinutí subventrikulární oblasti, kortikální dysplazii a v některých případech se zvířata narodila mrtvá. Objevovala se také hematotoxicita, kožní reakce, aj. Druhá generace inhibitorů γ sekretas (menší zapojení Notch proteinu) byla vyvinuta s lepším bezpečnostním profilem. I přesto, ale výsledky klinických studií nejsou příliš nadějně (Ghosh a Osswald, 2014; Hroudová, 2017).

1.4.1.4 Inhibitory kinas

Enzym kinasa glykogen syntasy (GSK-3) je zodpovědný za fosforylaci glykogenu, což vede k inaktivaci glykogen syntasy, kontrole metabolismu glykogenu, regulaci buněčné proliferace a buněčného cyklu. Existují dvě izoformy GSK-3, a to GSK-3 α a GSK-3 β . Aktivita GSK-3 β je spojená s hyperfosforylací tau proteinu, což ve výsledku vede k tvorbě neurofibrilárních spleť a destabilizaci neuronálních procesů (Dos Santos *et al.*, 2016).

Jedním z inhibitorů GSK-3 β je lithium. To se přímo váže na uvedený enzym a zvyšuje tak inhibici fosforylace tau proteinu. Lithium je také schopné snížit produkci A β , což bylo prezentováno u transgenních myší (Noble *et al.*, 2005), které nadměrně exprimovaly lidský tau protein. Po 30denním podávání (intraperitoneálním) lithia bylo pozorováno významné snížení aktivity GSK-3 β a tudíž i fosforylace tau proteinu. Další možností je valproát, který má podobný účinek (Avila a Hernández, 2007; Dos Santos *et al.*, 2016).

Vysoce selektivními a účinnými inhibitory GSK-3 β jsou deriváty 1,3,4-oxadiazolu. Některé z nich vykazují dobré farmakokinetické vlastnosti a vysokou propustnost přes BBB. Derivát 2-methyl-5-{3[4-(methylsulfonyl)-(3)-fenyl]-1-benzofuran-5-yl}1,3,4-oxadiazol má vysoký inhibiční potenciál ke GSK-3 β v primárních nervových buňkách mozku krysy, což

ukazuje na to, že by tento derivát mohl být dobrým kandidátem na léčbu AD (Dos Santos *et al.*, 2016).

1.4.1.5 Látky regulující oxidační stres

Tyto látky se používají preventivně i léčebně, jak ke snížení tvorby ROS, tak i k jejich vychytávání. Mezi tyto látky patří například alfa-tokoferol (vitamín E). Jsou zkoušeny, ale také jiné látky, jako jsou melatonin, retinol, pyritinol, vitamín C, beta-karoten, aj. (Jirák, 2004).

Inhibitory MAO zpomalují metabolismus neurotransmiteru serotoninu. Jsou účinné nejenom v terapii AD, ale také při poruchách nálad a různých neuropsychiatrických poruch. Antidepresivní a neuroprotektivní účinky inhibitorů MAO přispívají k zeslabení oxidačního stresu (Zvěřová, 2017).

1.4.1.6 Imunizace

Jako další farmakologický přístup k terapii AD by mohla být aktivní imunizace. Počáteční klinická studie (Robinson *et al.*, 2004) využívající látku AN 1792 proti A β , byla zastavena kvůli výskytu meningoencefalitidy u 6 % subjektů. V rámci aktivní imunizace jsou testovány také vakcíny proti patologickým formám tau proteinu. První testované protilátky vykazovaly značnou neurotoxicitu, což vedlo k objevení AAdvac-1. U této vakcíny, která vede k aktivní imunizaci, byla neurotoxicita potlačena. Vakcína se nachází ve II. fázi klinického testování (Robinson *et al.*, 2004; Hroudová, 2017).

Dále bylo prokázáno, že studie zabývající se pasivní imunizací, kdy byla intravenózně aplikována protilátka proti A β malému počtu pacientů s mírnou až střední formou AD, byly bezpečné a potenciálně účinné (Loeffler, 2013). Bohužel, ale nebyl zjištěn žádný důkaz zpomalení progresu AD (Briggs *et al.*, 2016).

Jednou z testovaných protilátek byla například monoklonální protilátka Bapineuzumab proti A β . Podstoupila klinickou studii v letech 2007 - 2012 u pacientů s mírnou, až střední formou AD. Ačkoliv bylo prokázáno, že snižuje rychlost akumulace amyloidů, tak nebyl prokázán žádný léčebný účinek na kognitivní funkci (Salloway *et al.*, 2014).

1.4.2 Nefarmakologická léčba

Tato oblast patří mezi novější vědní disciplíny. Základem je správný psychologický přístup k nemocnému, který ale od lidí co o něj pečují, vyžaduje velkou trpělivost. Výsledky bývají často minimální a přechodné. Se zhoršující se formou AD je nutné používat stále jednodušší psychoterapeutické přístupy. Tato léčba zahrnuje nejrůznější rehabilitační programy, jako jsou počítačové programy zaměřující se na trénování kognitivních a nekognitivních funkcí. Snahou je udržet pacienta co nejdéle zapojeného do každodenního chodu domácnosti a sociálních aktivit, a oddálit tím, tak jeho umístění do některého zdravotnického nebo sociálního zařízení. Se změnou domácího prostředí je velmi často spjat adaptační syndrom, který často vede ke zhoršení stavu, nebo až k úmrtí pacienta (Zvěřová, 2017; Koukolík a Jiráček, 1998).

2 Cíle diplomové práce

- Stanovení cytotoxicity SA, THA a 7-MEOTA
- Stanovení cytotoxicity monotakrinových a bistakrinových derivátů SA
- Stanovení cytotoxicity mono-7-metoxytakrinových a bis-7-metoxytakrinových derivátů SA
- Porovnání cytotoxicity látek s jejich strukturou

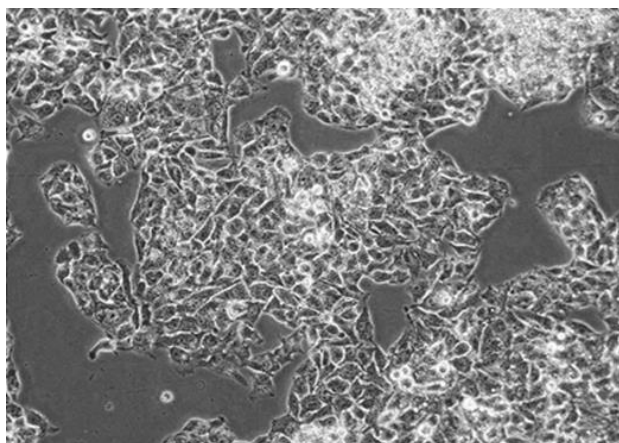
3 Experimentální část

3.1 Metodika

3.1.1 Buněčná linie

K hodnocení cytotoxicity nově syntetizovaných modulátorů ChE byla použita buněčná linie HepG2 (obr. č. 18). Tato buněčná linie je izolována z lidského hepatocelulárního karcinomu jater 15 letého chlapce kavkazského původu (Guo *et al.*, 2015).

HepG2 buňky jsou poměrně často využívány k testování toxicity nově syntetizovaných látek. Tyto buňky vykazují mnoho genotypových a fenotypových vlastností, jako normální jaterní buňky. Hlavní nevýhodou těchto buněk je ale jejich nízká metabolická kapacita, proto jsou vhodnější k testování toxicity výchozích sloučenin a méně vhodné pro hodnocení toxicity metabolitů daných látek (Gerets *et al.*, 2009 a 2012).

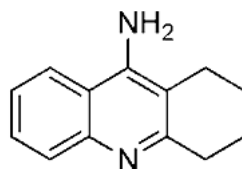


Obr. č. 18: Buněčná linie HepG2.

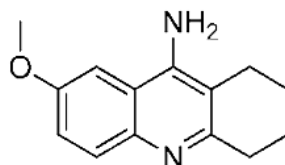
3.1.2 Testované látky

Všechny testované látky byly syntetizované na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany, Hradec Králové, Česká republika).

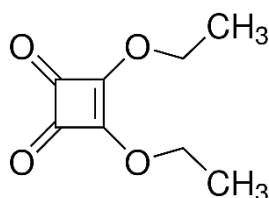
Testovanými látkami byly výchozí látky pro syntézu, a to THA (obr. č. 19), 7-MOETA (obr. č. 20) a SA (3,4-diethoxy-3-cyklobutan-1,2-dion, obr. č. 21).



Obr. č. 19: Chemická struktura THA. Převzato z Koráběčný *et al.*, 2015.

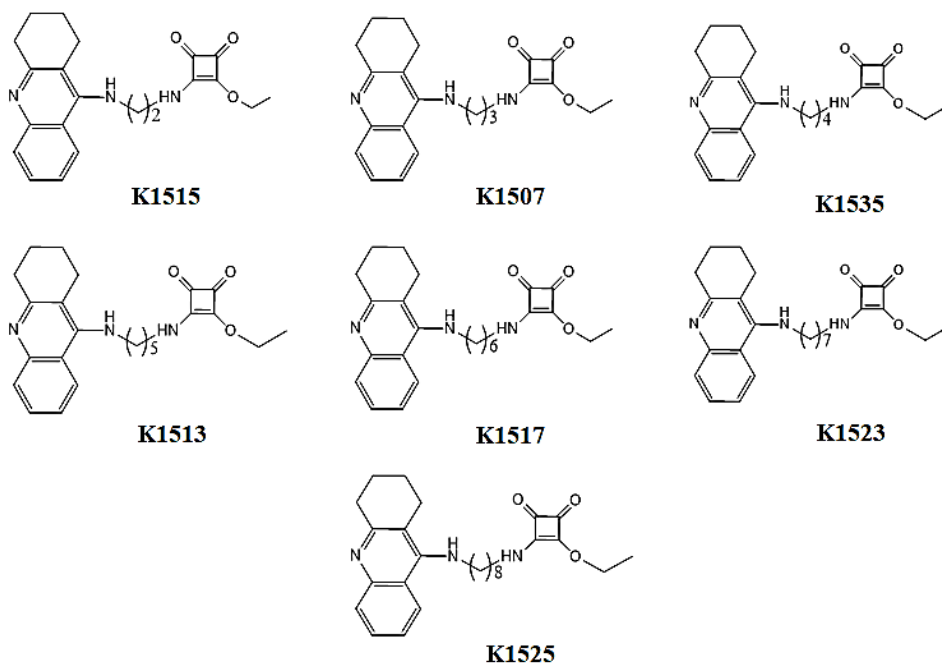


Obr. č. 20: Chemická struktura 7-MEOTA. Převzato z Koráběčný *et al.*, 2015.



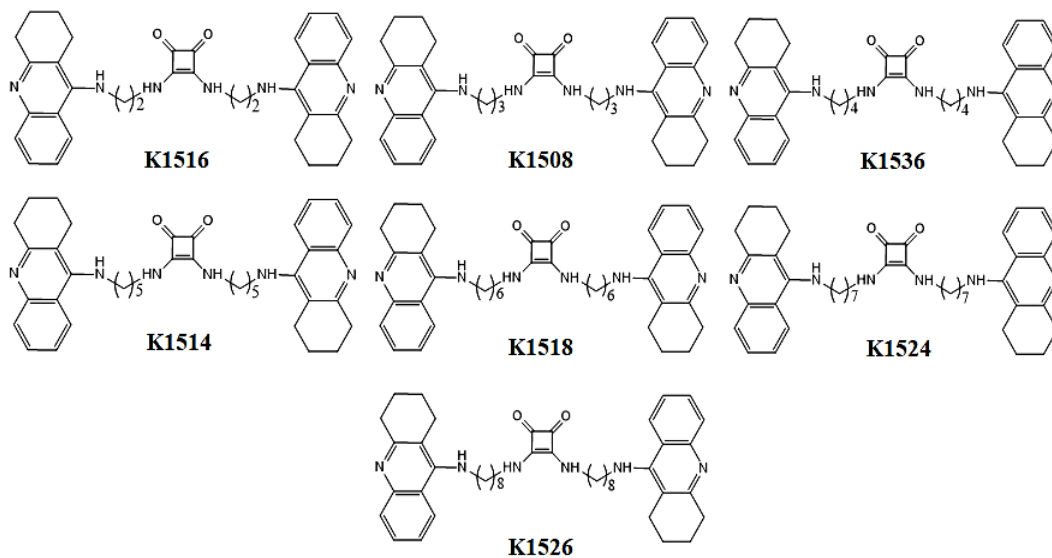
Obr. č. 21: Chemická struktura SA. Převzato z www.sigma-aldrich.cz.

První skupinu nově syntetizovaných látek byly deriváty SA obsahující 1 molekulu THA (obr. č. 22) s označením K1515, K1507, K1535, K1513, K1517, K1523 a K1525.



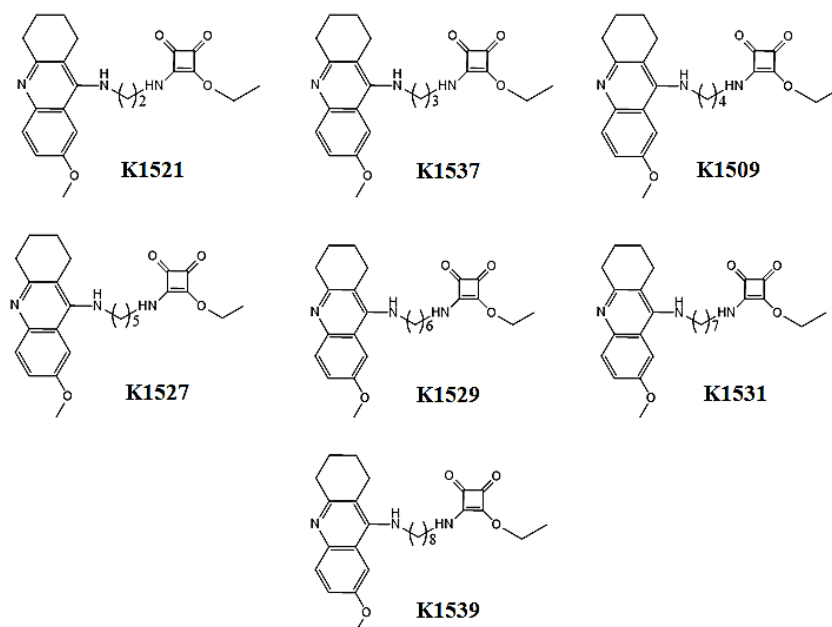
Obr. č. 22: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek monotakrinových derivátů SA.

Další skupinu tvořili deriváty SA obsahující 2 molekuly THA (obr. č. 23) s označením K1516, K1508, K1536, K1514, K1518, K1524 a K1526.



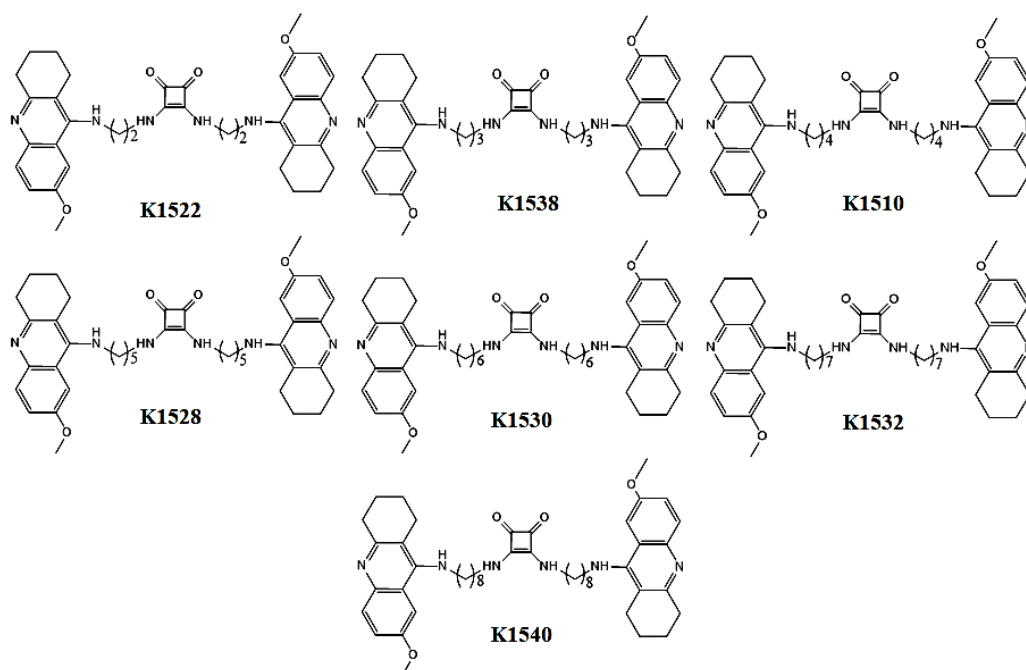
Obr. č. 23: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek bistakrinových derivátů SA.

Třetí skupinou testovaných nově syntetizovaných látek byly deriváty SA obsahující 1 molekulu 7-MEOTA (obr. č. 24) s označením K1521, K1537, K1509, K1527, K1529, K1531 a K1539.



Obr. č. 24: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek mono-7-metoxytakrinových derivátů SA.

Poslední, čtvrtou skupinou testovaných látek nebo-li derivátů SA obsahující 2 molekuly 7-MEOTA (obr. č. 25) s označením K1522, K1538, K1528, K1530, K1532 a K1540.



Obr. č. 25: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek bis-7-metoxytetracyklinových derivátů SA.

3.2 Kultivace a pasážování buněk

HepG2 buňky byly kultivovány v Dulbeccově modifikovaném Eaglovu médiu (DMEM; Biosera, Nuaille, Francie), které obsahuje vysokou koncentraci glukózy (4,5 g/l), fenolovou červeň, různé anorganické soli, aminokyseliny a vitamíny. Toto médium bylo dále suplementováno fetálním bovinním sérem (FBS, 10 % celkového objemu; Biosera) a kombinací antibiotik (penicilin a streptomycin, 1 % celkového objemu; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Buňky byly kultivovány v kultivační lahvy s povrchem 75 cm² (TPP; Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko), opatřené speciálním závitem, jenž umožňuje výměnu plynů s prostředím, ve kterém jsou buňky kultivovány. Kultivace probíhala v CO₂ inkubátoru (incubator CO₂ CB 160, Binder, Tuttlingen, Německo) při 37 °C. V případě, že byla dosáhnuta 75 – 85% konfluency byly buňky pasážované standardním procesem trypsinizace (Muckova *et al.*, 2018).

Pasážování je proces, který slouží k přenesení buněčné linie do nového kultivačního média. Pasážování bylo prováděno v laminárním boxu, který je vybaven HEPA filtry (EuroClone, Pera, Itálie).

3.2.1 Postup pasážování

Na začátku pasážování se kultivační médium aspirovalo a buňky byly následně opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS; Sigma-Aldrich), který byl následně odsán. K uvolnění buněk ode dna kultivační lahve byl použit roztok trypsinu/EDTA (Sigma Aldrich). Kultivační lahev byla následně umístěna na vyhřevnou desku (Scienceware, Wayne, NJ, USA) na 2–5 minut (37 °C). K uvolněným buňkám bylo přidáno 5 ml kultivačního média, ve kterém byly buňky resuspendovány. Celý obsah byl následně přenesen do centrifugační zkumavky (15 ml). Dno kultivační lahve bylo promyto PBS, přičemž celý objem PBS byl přidán do stejné centrifugační zkumavky. Centrifugace (centrifuga Hettich; Schoeller Instruments, s.r.o., Praha, Česká republika) probíhala 4 minuty při 600 otáček/minutu a 37 °C . Po centrifugaci byl odsán supernatant a peleta byla resuspendována v 800 µl média a doplněna médiem na celkový objem 14 ml. Do kultivační lahve bylo přidáno 20 ml média a po spočítání buněk (viz následující kapitola) se určité množství buněčné suspenze přidalo zpátky do kultivační lahve.

3.3 Počítání buněk

3.3.1 Bürkerova komůrka

Pro počítání buněk v Bürkerově komůrce bylo nanášeno 10 µl buněčné suspenze do počítací komůrky. Počet buněk byl spočítán v 6–10 řádcích pomocí světelného mikroskopu (Nikon Instruments, Amsterdam, Nizozemsko). Počet buněk v 1 ml suspenze byl vypočítán podle uvedeného vzorce:

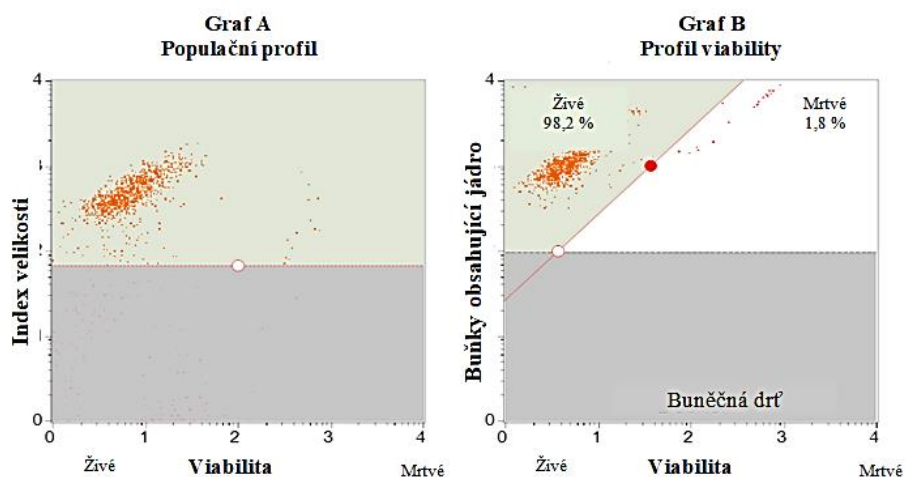
$$\text{průměr počtu buněk} \times 4 = \text{počet buněk} \times 10^4 / 1 \text{ ml suspenze}$$

3.3.2 Průtoková cytometrie

Druhá metoda, která byla použita k zjištění počtu buněk byla mikrokapilární průtoková cytometrie (obr. č. 26) využívající mikrokapilární průtokový cytometr The Muse™ Cell analyzer (Merck, Kenilworth, NJ, USA). Tato metoda umožňuje zjistit počet životaschopných buněk (buňky/ml a v %) a celkový počet buněk (buňky/ml).

Pro počítání buněk pomocí mikrokapilárního průtokového cytometru bylo do mikrozkušavky přidáno 50 μl buněčné suspenze, která byla smíchána se 100 μl reagentu Muse™ Count et Viability reagent (Merck). Tato směs byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a po uplynutí doby inkubace byl stanoven počet a viabilita buněk.

Tato technika využívá reagenční činidlo skládající se ze dvou fluorescenčních barviv, vázajících se na DNA, pomocí kterého jsme schopni rozlišit viabilní a mrtvé buňky. První složkou barvicí směsi je barvivo, které se naváže na jádro mrtvé nebo umírající buňky, díky ztrátě jejich membránové integrity. Tento parametr vyjadřuje životaschopnost buněk. Druhou složkou je barvivo, které je schopné prostoupit buněčnou membránou a následně obarvit všechny buňky obsahující jádro. Tímto způsobem je možné rozlišit buňky s jádrem od tzv. trosek a nejaderných buněk.



Obr. č. 26: Výsledné grafy získané měřením počtu buněk a buněčné viability pomocí mikrokapilárního průtokového cytometru. **Graf A** (populační profil): rozdělení buněk podle jejich velikosti za účelem odlišení buněk od buněčné drtě. **Graf B** (profil viability): umožňuje určení procenta viabilních buněk (vlevo) a mrtvých buněk (vpravo). Horní oblast (světlejší) představuje buňky s jádrem a spodní část (tmavší) buněčnou drť. Přičemž buňky vyskytující se v levém horním rohu mají jádro a jsou živé. Buňky v pravé horní části sice jádro mají, ale jsou mrtvé.

3.4 Stanovení cytotoxicity látek

3.4.1 Nasazení do destičky

Z buněčné suspenze, kterou jsme získali při pasážování buněk, byla podle výpočtu připravena nová suspenze buněk. Do 96jamkové mikrotitrační destičky (TPP) bylo nasazeno 100 μ l této suspenze o hustotě 15×10^3 buněk na jamku (obr. č. 27). Buňky byly ponechány při laboratorní teplotě 10 – 15 minut, aby došlo k rovnoměrné sedimentaci. Následně byla destička vložena do inkubátoru, kde byla ponechána přes noc.



Obr. č. 27: 96jamková destička s nasazenými buňkami.

3.4.2 Ovlivnění buněk

Z testovaných látek byly připraveny zásobní roztoky v dimethylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich). Z připravených zásobních roztoků byly připraveny v den experimentu pracovní roztoky o určité koncentraci (v kultivačním médiu), které byly sériově ředěny v poměru 1:1.

Takto připravená koncentrační řada byla následně přidána (100 μ l) k buňkám v 96jamkové destičce. Následovala 24hodinová inkubace. Do jamek určené pro negativní kontrolu bylo napipetováno pouze kultivační médium (100 μ l). Do posledního sloupce, který představoval pozitivní kontrolu, byl přidán roztok obsahující uhličitan sodný a dodecylsulfát sodný (100 μ l; obr. č. 28).

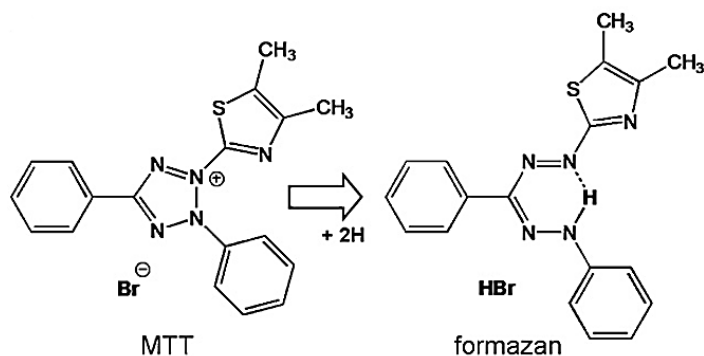


Obr. č. 28: 96jamková destička s nasazenými buňkami a koncentrační řadou testovaných látek. Ve sloupcích 1 – 3 je v triplikátu testovaná látka č. 1; 4 – 6 je v triplikátu testovaná látka č. 2; 7 – 9 je v triplikátu testovaná látka č. 3; 10 – 11 je negativní kontrola a ve sloupci 12 je pozitivní kontrola. Stejné schéma pipetování bylo použito i u dalších destiček s dalšími testovanými látkami.

3.4.3 Kolorimetrické stanovení buněčné viability

Ke stanovení cytotoxicity látek byla použita ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT; Sigma-Aldrich). MTT test byl poprvé proveden Mosmannem v roce 1983 (Mossmann, 1983).

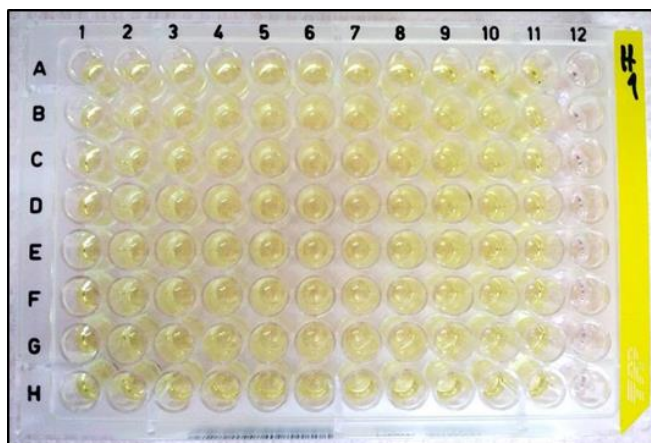
Viabilní buňky jsou v mitochondriích schopny pomocí sukcinátdehydrogenáz redukovat MTT na fialový až fialovomodrý formazan (obr. č. 29). Krystaly formazanu jsou nerozpustné ve vodě, akumulované ve zdravých buňkách a jsou extrahovány pomocí organického rozpouštědla, např. DMSO. Mrtvé buňky ztrácejí schopnost metabolizovat MTT na formazan, proto je intenzita zbarvení roztoku přímo úměrná buněčné viabilitě (Riss *et. al.*, 2013).



Obr. č. 29: Chemická struktura MTT a jeho redukované formy formazanu. Převzato z Stockert. *et. al.*, 2012.

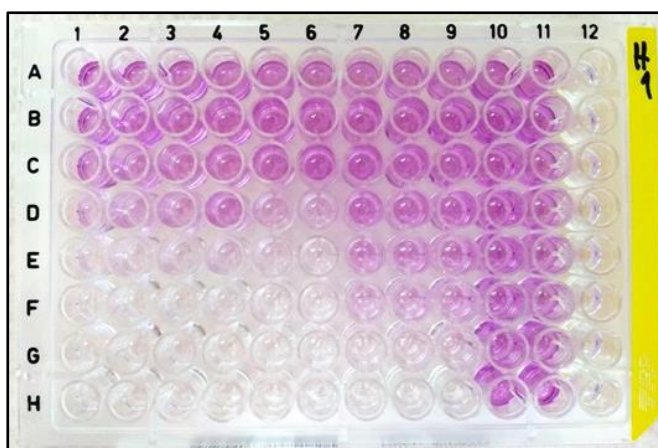
3.4.3.1 Provedení MTT testu

Po 24 hodinové inkubaci s testovanými látkami byl celý obsah jamek odsán a nahrazený do sloupců 1-11 100 μ l roztoku, který obsahuje MTT (0,5 mg/ml). Do 12tého sloupce bylo přidáno bezbarvé médium (obr. č. 30). Destička byla poté umístěna do inkubátoru na 45 minut. V průběhu inkubace je nutná kontrola metabolizování MTT na formazan pod mikroskopem.



Obr. č. 30: 96jamková destička s přidaným roztokem obsahující MTT (sloupec 1 – 11) nebo bezbarvým médiem (sloupec 12).

Po skončení inkubace byl celý obsah opět odsán a formazan v jamkách byl extrahovaný pomocí 100 μ l DMSO (obr. č. 31). Destičky byly promíchány na třepačce. Absorbance byla změřena za využití přístroje Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) při vlnové délce 570 nm.



Obr. č. 31: 96jamková destička po rozpuštění krystalu formazanu pomocí DMSO (sloupec 1 – 12). Intenzita zabarvení roztoku je přímo úměrná viabilitě buněk.

3.5 Statistická analýza

Jednotlivé IC_{50} byly mezi sebou porovnány pomocí parametrického statistického testu (t- test). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Pro statistickou analýzu byl použit software GraphPad Prism verze 6.05.

4 Výpočet toxikologických indexů

Cytotoxicita jednotlivých látek je vyjádřena pomocí toxikologického indexu IC_{50} . Hodnoty IC_{50} byly vypočítané pomocí statistického programu GraphPad Prism verze 6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) metodou 4-parametrické nelineární regrese. Hodnota IC_{50} reprezentuje průměr ze tří nezávislých experimentů doplněný o směrodatnou odchylku (SD).

4.1 Výchozí sloučeniny pro syntézu jednotlivých derivátů

4.1.1 Toxikologické indexy IC_{50}

Toxikologický index IC_{50} udává koncentraci, při které se viabilita buněk snížila na 50 %. Hodnoty IC_{50} SA, THA a 7-MEOTA (tab. č. 2) byly stanoveny na buněčné linii HepG2 po 24-hodinové inkubaci.

Tab. č. 2: Cytotoxicita výchozích látek vyjádřená toxikologickým indexem IC_{50} , jako průměr (se směrodatnou odchylkou) ze třech nezávislých experimentů.

| | IC_{50} [μ M] | SD |
|---------|----------------------|------|
| SA | 1439,0 | 9,85 |
| THA | 168,47 | 6,28 |
| 7-MEOTA | 44,37 | 4,74 |

4.2 Monotakrinové deriváty kyseliny čtvercové

4.2.1 Toxikologické indexy IC_{50}

Hodnoty IC_{50} THA a jeho derivátů (tab. č. 3) byly stanoveny díky buněčné linii HepG2 po 24-hodinové inkubaci.

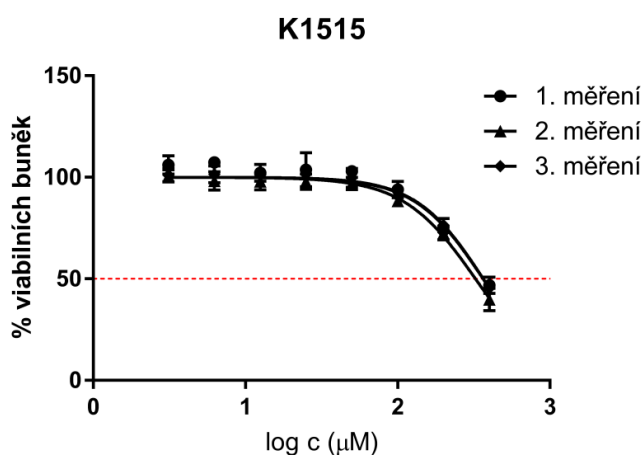
Tab. č. 3: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC_{50} pro monotakrinové deriváty SA obsahující 1 molekulu THA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů.

| | IC_{50} [μ M] | SD |
|--------------|----------------------|-------|
| K1515 | 363,30 | 33,40 |
| K1507 | 314,13 | 16,70 |
| K1535 | 185,93 | 4,66 |
| K1513 | 138,60 | 12,55 |
| K1517 | 105,34 | 12,85 |
| K1523 | 76,33 | 4,91 |
| K1525 | 81,92 | 4,95 |

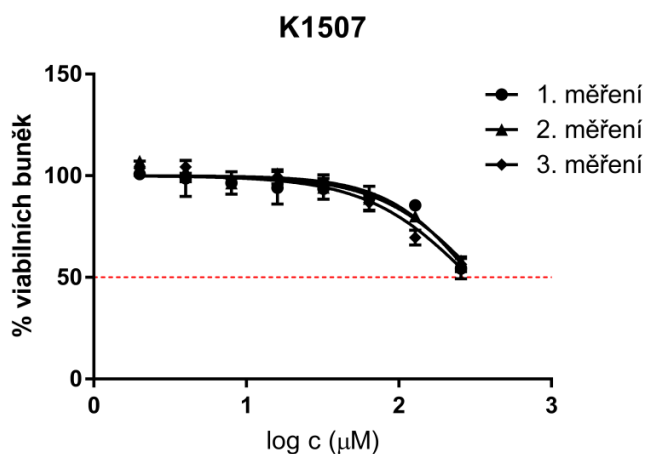
Z výše uvedených a naměřených hodnot je zřejmé, že nejvíce toxickou látkou je K1523 ($IC_{50} = 76,33 \mu$ M). Od této látky se cytotoxicita snižuje v následujícím pořadí K1525, K1517, K1513, K1535, K1507 a K1515. Tyto látky jsou 1,1-, 1,4-, 1,8-, 2,4-, 4,1- a 4,8násobně méně toxické, než nejvíce cytotoxická sloučenina K1525.

4.2.2 Dávkově - závislé křivky

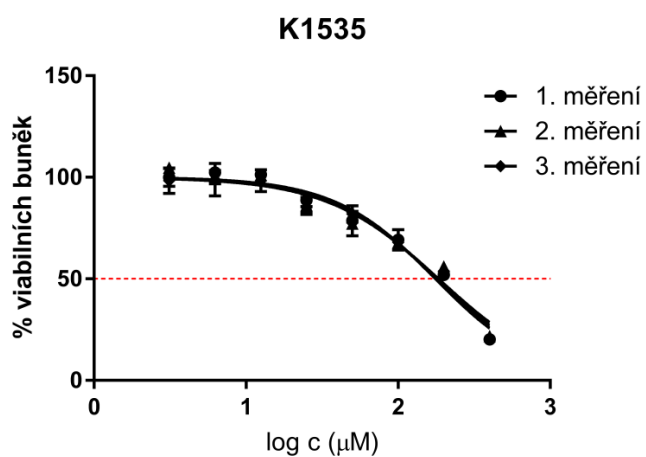
Hodnoty IC_{50} pro monotakrinové deriváty SA obsahující 1 molekulu THA byly určeny pomocí dávkově – závislých křivek, znázorňující změnu viability buněk po jejich ovlivnění koncentrační řadou testované látky (obr. č. 32 – 38). Tyto křivky byly vytvořeny na základě třech nezávislých experimentů uskutečněných v triplikátu.



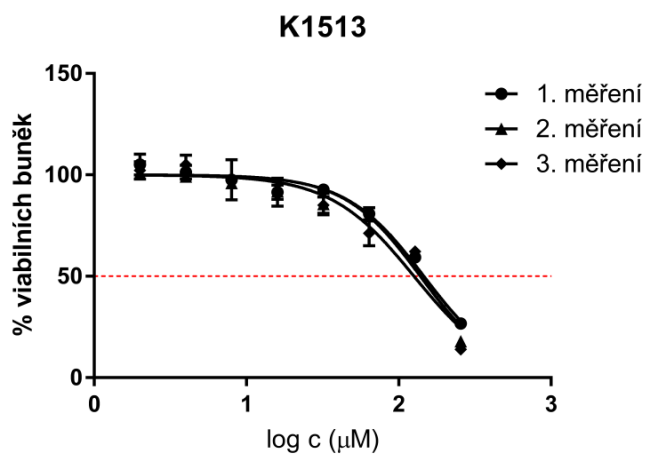
Obr. č. 32: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1515 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



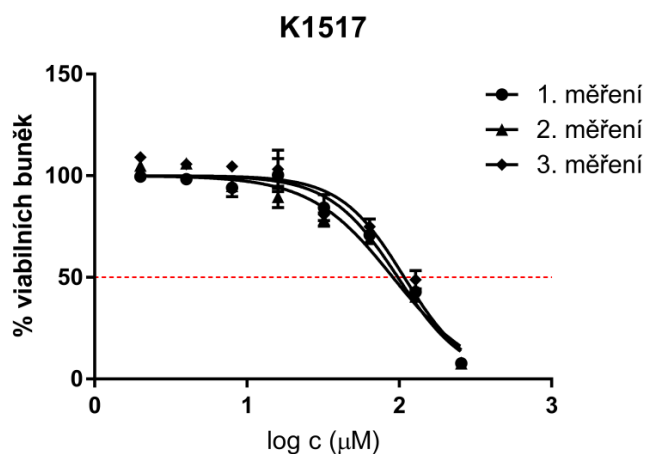
Obr. č. 33: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1507 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



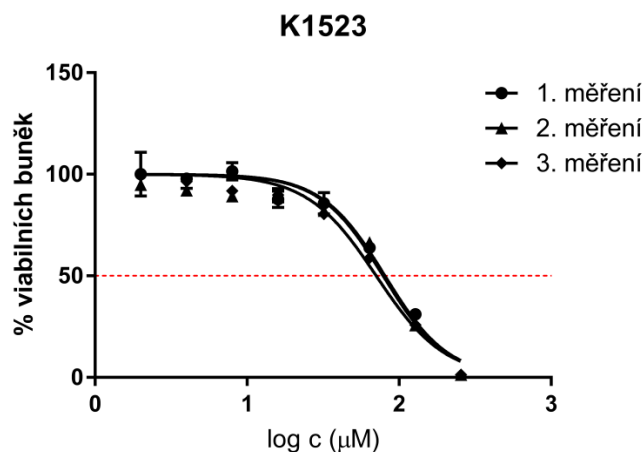
Obr. č. 34: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K153 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



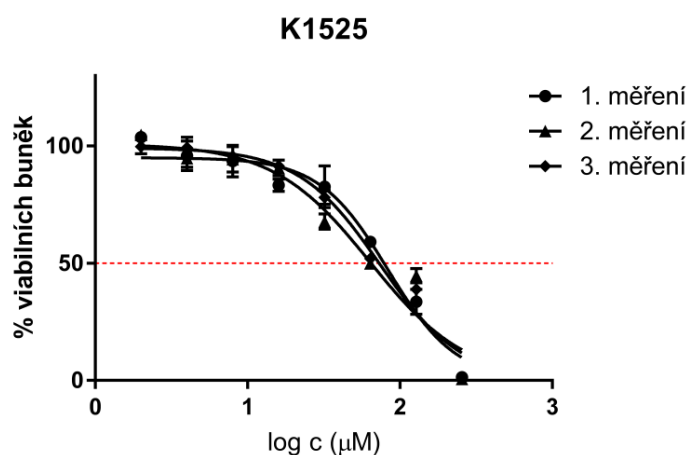
Obr. č. 35: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1513 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 36: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1517 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 37: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1523 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 38: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1525 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.

4.3 Bistakrinové deriváty kyseliny čtvercové

4.3.1 Toxikologické indexy IC₅₀

Hodnoty IC₅₀ bistakrinových derivátů SA (tab. č. 4) byly stanoveny na buněčné linii HepG2 po 24-hodinové inkubaci.

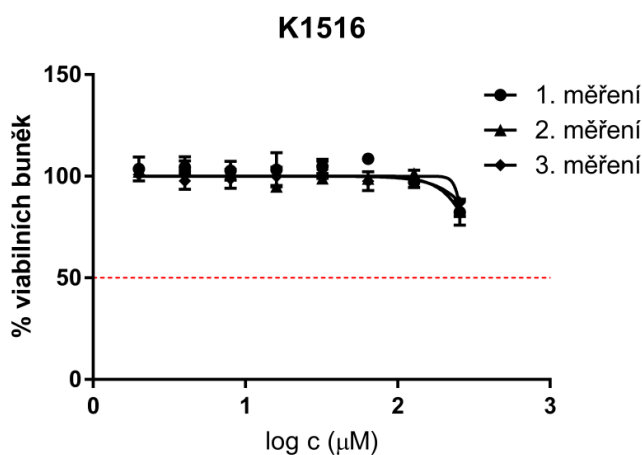
Tab. č. 4: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC_{50} pro bistakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly THA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů.

| | IC_{50} [μ M] | SD |
|--------------|----------------------|-------|
| K1516 | >256 | |
| K1508 | >32 | |
| K1536 | 145,50 | 7,46 |
| K1514 | 68,63 | 15,42 |
| K1518 | 76,40 | 11,51 |
| K1524 | 22,95 | 1,37 |
| K1526 | 6,61 | 1,79 |

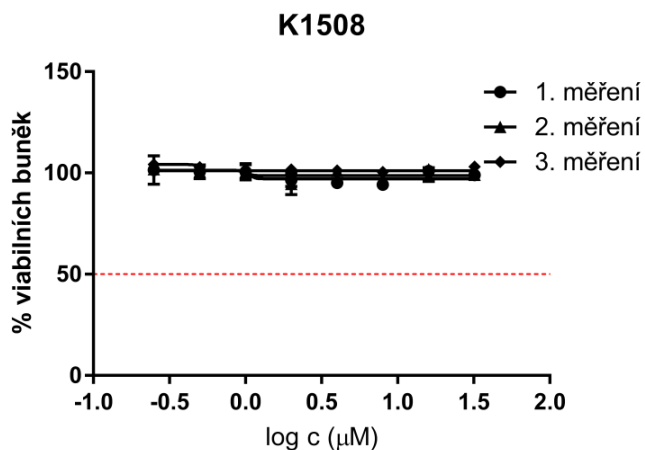
Z výše uvedených a naměřených hodnot je zřejmé, že nejvíce toxickou látkou je K1526 ($IC_{50} = 6,61 \mu$ M). Od této látky se cytotoxicita snižuje v následujícím pořadí K1524, K1508, K1514, K1518, K1536 a K1516. Tyto látky jsou 3,5-, >4,8-, 10,4-, 11,6-, 22- a >38,7násobně méně toxické, než nejvíce cytotoxická sloučenina K1526.

4.3.2 Dávkově - závislé křivky

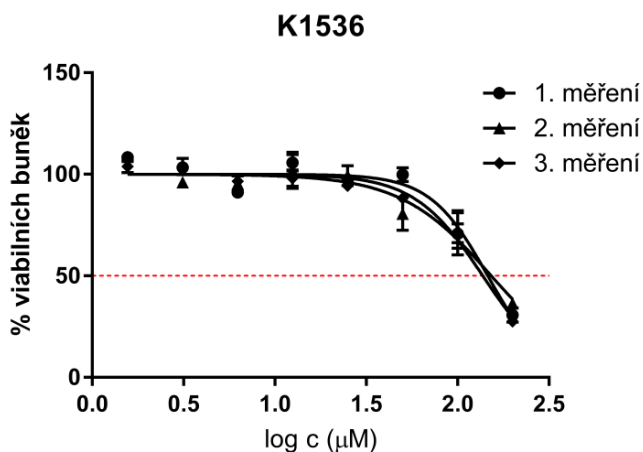
Hodnoty IC_{50} pro bistakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly THA byly určeny pomocí dávkově – závislých křivek, znázorňující změnu viability buněk po jejich ovlivnění koncentrační řadou testované látky (obr. č. 39 – 45). Tyto křivky byly vytvořeny na základě třech nezávislých experimentů uskutečněných v triplicátu.



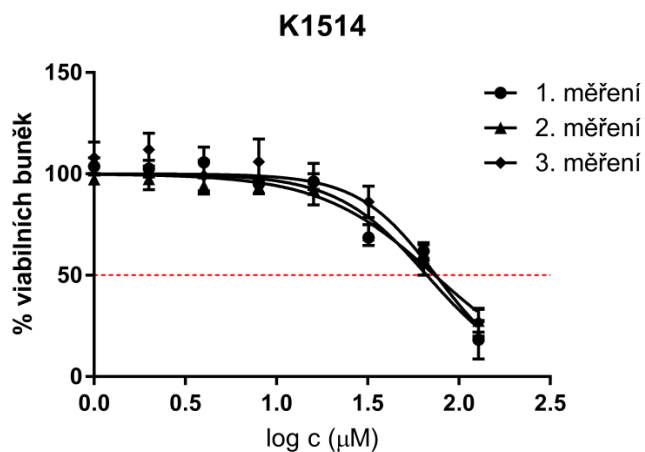
Obr. č. 39: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1516 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplicátu.



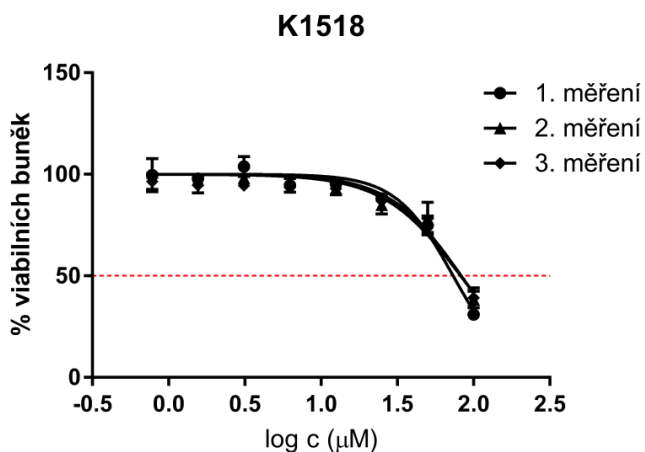
Obr. č. 40: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1508 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



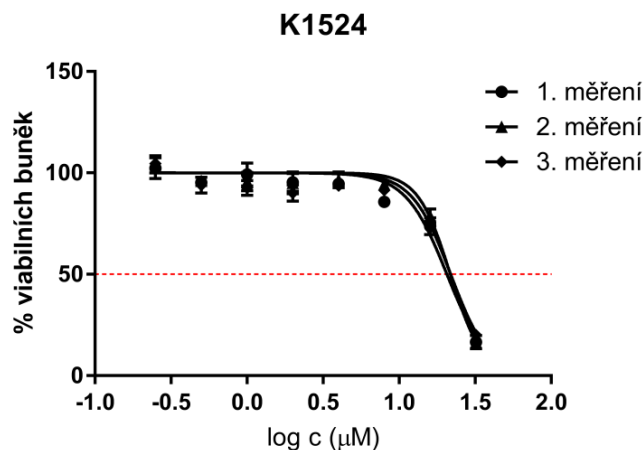
Obr. č. 41: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1536 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



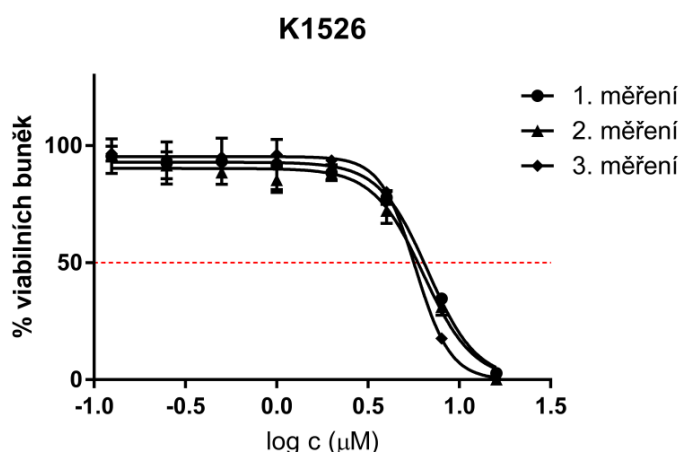
Obr. č. 42: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1514 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 43: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1518 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 44: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1524 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



Obr. č. 45: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1526 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.

4.4 Mono-7-metoxytakrinové deriváty kyseliny čtvercové

4.4.1 Toxikologické indexy IC_{50}

Hodnoty IC_{50} mono-7-metoxytakrinových derivátů (tab. č. 5) byly stanoveny na buněčné linii HepG2 po 24-hodinové inkubaci.

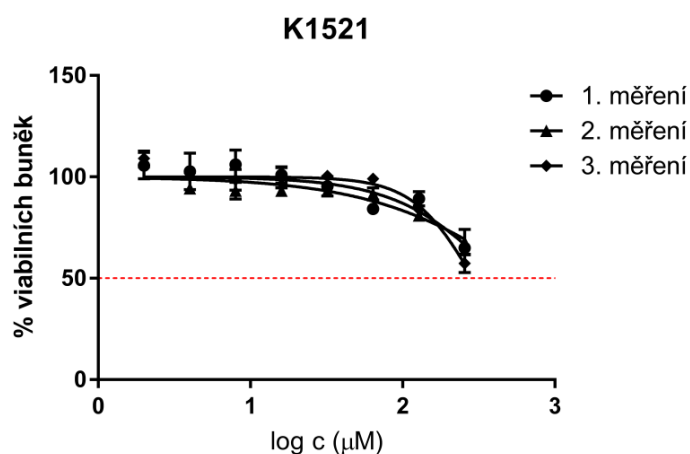
Tab. č. 5: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC_{50} pro mono-7-meotxytakrinové deriváty SA obsahující 1 molekulu 7-MEOTA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů.

| | IC_{50} [μ M] | SD |
|--------------|----------------------|------|
| K1521 | >256 | |
| K1537 | 119,50 | 8,03 |
| K1509 | 106,89 | 8,36 |
| K1527 | 49,32 | 3,98 |
| K1529 | 38,13 | 2,57 |
| K1531 | 81,80 | 5,00 |
| K1539 | 65,39 | 8,77 |

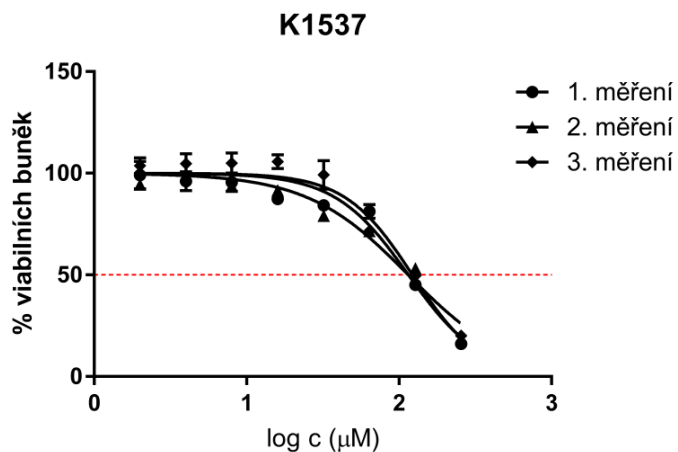
Z výše uvedených a naměřených hodnot je zřejmé, že nejvíce toxickou látkou je K1529 ($IC_{50} = 38,13 \mu$ M). Od této látky se cytotoxicita snižuje v následujícím pořadí K1527, K1539, K1531, K1509, K1537 a K1521. Tyto látky jsou 1,3-, 1,7-, 2,1-, 2,8-, 3,1- a >6,7násobně méně toxické, než nejvíce cytotoxická K1529.

4.4.2 Dávkově - závislé křivky

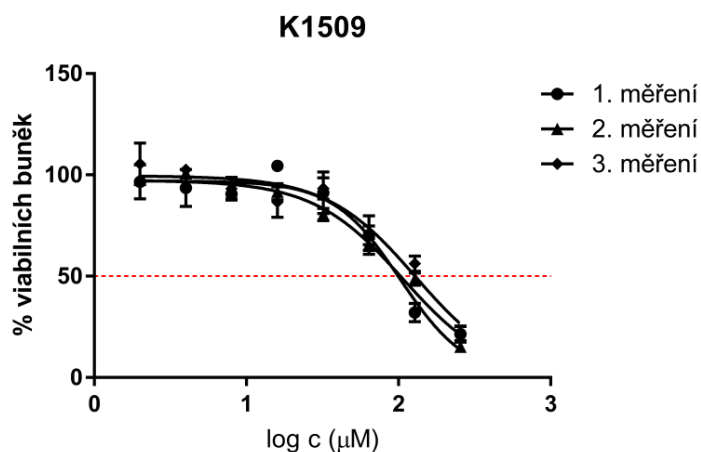
Hodnoty IC_{50} mono-7-metoxatakrinových derivátů SA obsahující 1 molekulu 7-MEOTA byly určeny pomocí dávkově – závislých křivek, znázorňující změnu viability buněk po jejich ovlivnění koncentrační řadou testované látky (obr. č. 46 – 52). Tyto křivky byly vytvořeny na základě třech nezávislých experimentů uskutečněných v triplikátu.



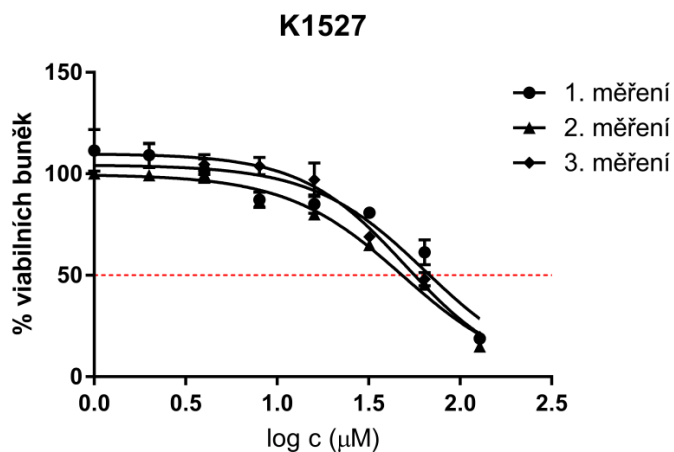
Obr. č. 46: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1521 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



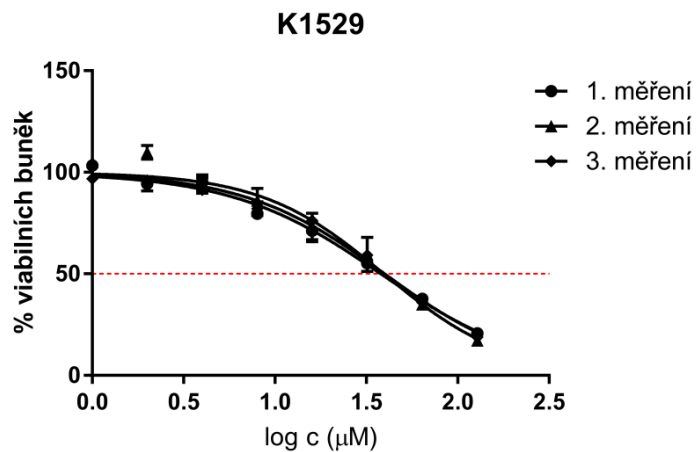
Obr. č. 47: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1537 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



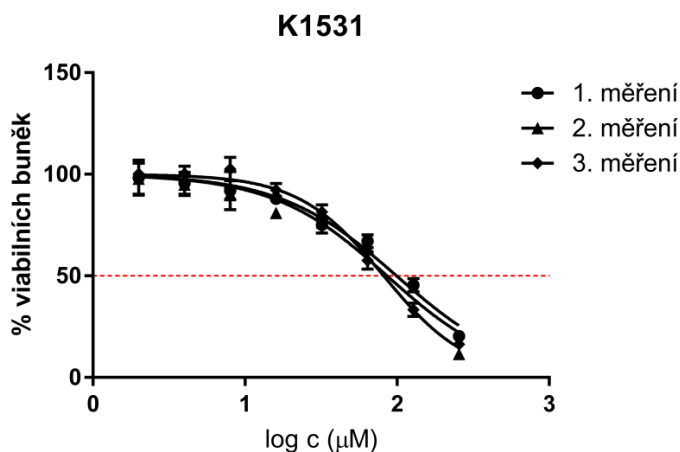
Obr. č. 48: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1509 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



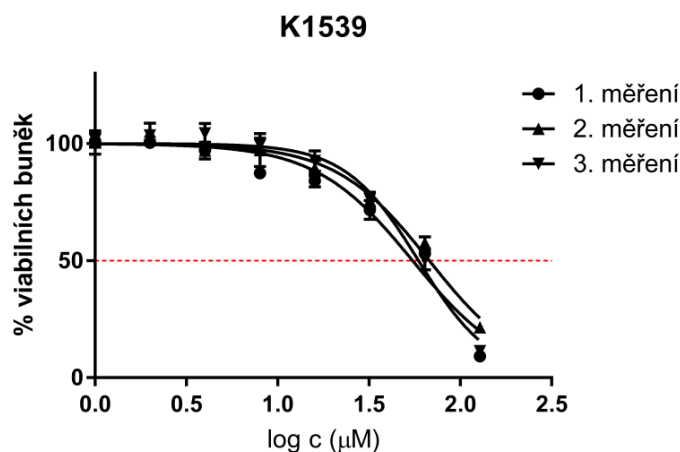
Obr. č. 49: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1527 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 50: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1529 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 51: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1531 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 52: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1539 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.

4.5 Bis-7-metoxytakrinové deriváty kyseliny čtvercové

4.5.1 Toxikologické indexy IC₅₀

Hodnoty IC₅₀ bis-7-metoxytakrinových derivátů SA (tab. č. 6) byly stanoveny na buněčné linii HepG2 po 24-hodinové inkubaci.

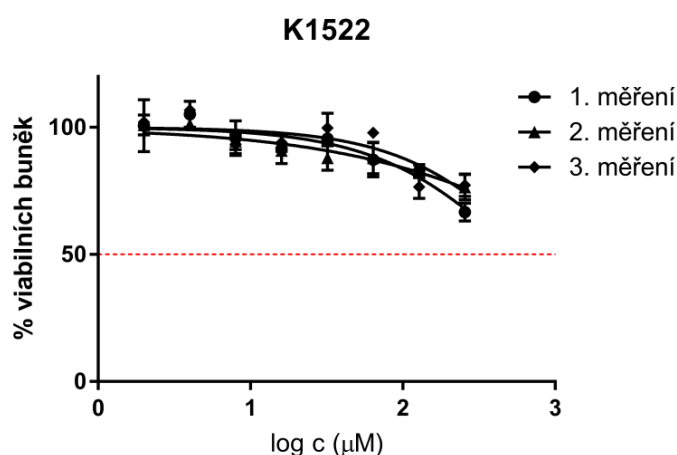
Tab. č. 6: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC_{50} pro bis-7-metoxytakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly 7-MEOTA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů.

| | IC₅₀ [μM] | SD |
|--------------|-----------------------------|-----------|
| K1522 | >256 | |
| K1538 | >64 | |
| K1510 | 187,27 | 14,51 |
| K1528 | 98,32 | 13,87 |
| K1530 | 25,98 | 1,15 |
| K1532 | 8,97 | 0,98 |
| K1540 | 3,53 | 0,59 |

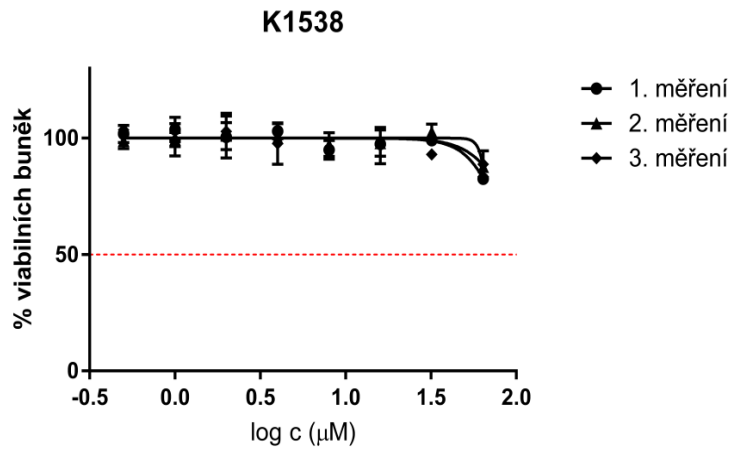
Z výše uvedených a naměřených hodnot je zřejmé, že nejvíce toxickou látkou je K1540 ($IC_{50} = 3,53 \mu\text{M}$). Od této látky se cytotoxicita snižuje v následujícím pořadí K1532, K1530, K1538, K1528, K1510 a K1522. Tyto látky jsou 2,5-, 7,4-, >18,1-, 27,9-, 53- a >72,5násobně méně toxické, než nejvíce cytotoxická sloučenina K1540.

4.5.2 Dávkově - závislé křivky

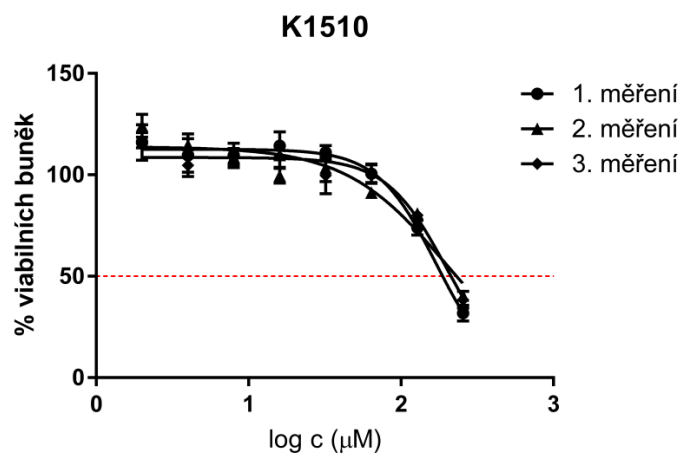
Hodnoty IC_{50} pro bis-7-metoxytakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly 7-MEOTA byly určeny pomocí dávkově – závislých křivek, znázorňující změnu viability buněk po jejich ovlivnění koncentrační řadou testované látky (obr. č. 53 – 59). Tyto křivky byly vytvořeny na základě třech nezávislých experimentů uskutečněných v triplikátu.



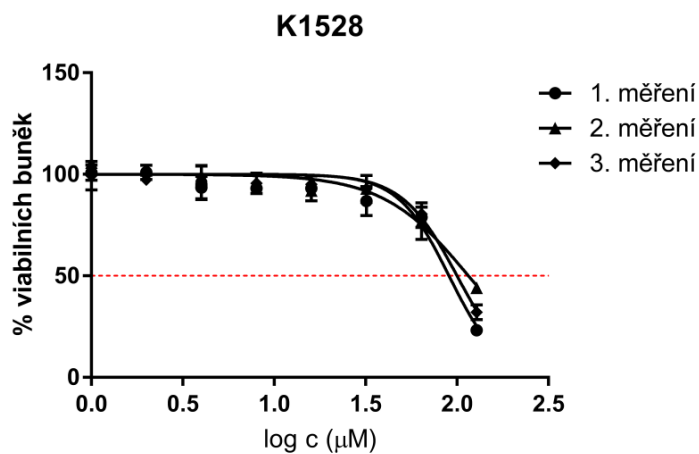
Obr. č. 53: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1522 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



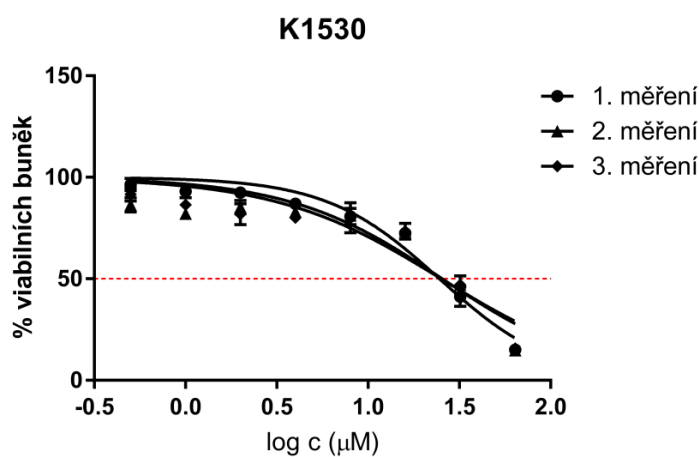
Obr. č. 54: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1538 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



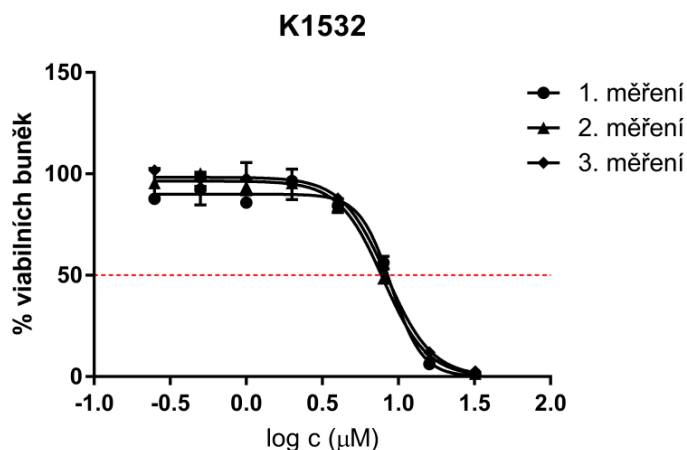
Obr. č. 55: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1510 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



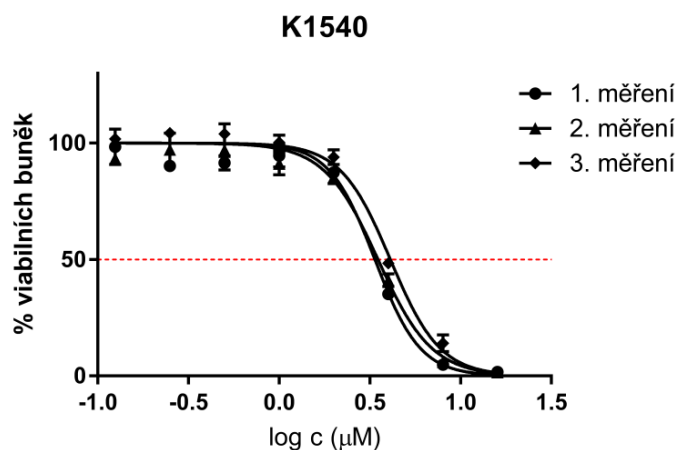
Obr. č. 56: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1528 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



Obr. č. 57: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1530 z tří nezávislých experimentů ($n = 3$) provedených v triplikátu.



Obr. č. 58: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1532 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.



Obr. č. 59: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1540 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu.

5 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovení cytotoxicity nově syntetizovaných modulátorů ChE a následně zhodnotit výsledky toxikologických indexů IC_{50} ve vztahu k struktuře testovaných substancí. Jako výchozí látky pro syntézu nových sloučenin byly zvoleny THA, 7-MEOTA a SA. THA a 7-MEOTA jsou inhibitory ChE používané při terapii AD. Jejich účinkem dochází k zvýšení koncentraci ACh v synaptických štěrbinách. Tím je kompenzován jeho nedostatek, jenž je pro toto onemocnění charakteristický (Soukup *et al.*, 2013). Deriváty SA naopak našly využití v rámci léčby virových a autoimunitních onemocnění kůže, jakými jsou například kožní infekce papilomaviry nebo autoimunitně podmíněná ztráta vlasů a vyrážky (Hill *et al.*, 2015; Mastrolonardo *et al.*, 2002; Ramírez-Fort *et al.*, 2014; Silverberg *et al.*, 2000). Ve vysokých koncentracích jsou tyto látky nescifickými senzitivizujícími kontaktní *dermatitis* (Noster *et al.*, 1976). V nižších koncentracích se ale ukazuje, že deriváty SA mohou inhibovat aktivitu histonových deacetylasy a proteinových tyrosinových fosfatasy (Hanessian *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2004). Přitom inhibitory obou těchto enzymů vykazují potenciál v terapii AD (Gräff a Tsai, 2013; Rabal *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2017). Nové entity duálně působících agens by proto mohly představovat novou perspektivní možnost léčby.

Z tohoto důvodu bylo nasyntetizováno 28 nových sloučenin, které je možné rozdělit do 4 skupin. V každé skupině je 7 sloučenin lišící se charakterem spojovacího řetězce, jehož délka činí 2 až 8 uhlíků:

1. monotakrinové deriváty SA
2. bistakrinové deriváty SA
3. mono-7-metoxytakrinové deriváty SA
4. bis-7-metoxytakrinové deriváty SA

Ve srovnání s mateřskými látkami dochází u hybridních molekul společně se změnou jejich funkce i k ovlivnění toxicity (Cen *et al.*, 2018). V případě THA, který byl jednou z výchozích molekul první a druhé série sloučenin, je nejvýznamnější klinickou komplikací hepatotoxicita. Narušení jaterních funkcí vede v 25 % případů přerušení léčby (Gracon *et al.*, 1998). Ve vzácných případech může dokonce dojít k rozvoji fatálního poškození jater a smrti (Blackard *et al.*, 1998). Z tohoto důvodu bylo hodnocení cytotoxicity výše uvedených látek provedeno na buněčné linii HepG2, jež je odvozená z vysoce diferencovaného hepatocelulárního karcinomu (Guo *et al.*, 2015). HepG2 buňky vykazují vlastnosti

srovnatelné s normálními jaterními buňkami, jako je například epiteliální morfologie, stimulace růstovými hormony nebo sekrece plasmatických proteinů (Fanelli, 2016). Nevýhodou této buněčné linie je nižší metabolická kapacita v porovnání s primárními hepatocyty (Gerets *et al.*, 2012). Na druhou stranu primárních hepatocyty kultivované *in vitro* snadno ztrácí svoji funkci, protože rychle podléhají dediferenciaci, pro kterou je charakteristická například ztráta buněčné morfologie, polarity a pokles metabolické aktivity (Hu a Li, 2015; Bachmann *et al.*, 2015). Z tohoto důvodu buněčná linie HepG2 stále představuje model používaný pro rutinní screening toxicity nově syntetizovaných látek (Gerets *et al.*, 2012).

V první skupině byla nejméně cytotoxická sloučenina s dvouuhlíkatým spojovacím řetězcem (C2; K1515). Se vzrůstající délkou spojovacího řetězce toxicita hybridních molekul rostla až k C7 a C8 (K1523 a K1525), mezi kterými nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl. Tento výsledek naznačuje, že by u těchto látek mohla nastávat saturace cytotoxického účinku. Pro potvrzení této hypotézy by ale bylo nezbytné nasynthetizovat hybridní molekuly s delším spojovacím řetězcem a otestovat jejich toxikologického indexu IC₅₀.

V druhé sérii látek nebylo možné provést přesné hodnocení cytotoxicity látek s C2 a C3 spojovacím řetězcem (K1516 a 1508). Testování naráželo na hranici rozpustnosti obou sloučenin (obr. č. 23). Za povšimnutí rovněž stojí, že rozpustnost látky s C3 řetězcem byla nižší než u molekul s C4, C5 a C6 řetězcem (K1536, K1514 a K1518), které by vzhledem k vyššímu obsahu atomů uhlíku měly vykazovat silnější hydrofobní vlastnosti. Vysvětlení tohoto jevu by mohlo spočívat v čistotě sloučenin. Ačkoliv celkově dosahovala vysokých a pro testování přijatelných hodnot (> 95 %), zůstávalo u každé nově syntetizované látky nízké procento příměsí, jež mohou fyzikálně-chemická vlastnosti směsi ovlivňovat. Pokud bychom se zaměřili na zhodnocení cytotoxicity C4 – C8 sloučenin, je podobně jako u první skupiny látek patrný její nárůst korelující s délkou spojovacího řetězce. Výjimkou je pouze látka C5 a C6, mezi nimiž nebyl nalezen statisticky významný rozdíl. Srovnání IC₅₀ C4 – C8 molekul první a druhé skupiny navíc ukazuje, že bistakrinové deriváty SA jsou více cytotoxické pro buněčnou linii HepG2.

Výchozí molekulou dalších dvou sérií testovaných látek byla, společně s SA, 7-MEOTA. Tato látka byla vyvinutá v České republice ve snaze nasynthetizovat méně hepatotoxický inhibitor AChE se zachováním terapeutického využití při Alzheimerově chorobě (Kaniakova *et al.*, 2018). V porovnání s takrinem je 7-MEOTA slabším inhibitorem lidské AChE a BuChE, z hlediska toxicity a výskytu dalších vedlejších účinků se ale jeví jako perspektivnější než takrin (Soukup *et al.*, 2013; Sang *et al.*, 2015). Rozdíl toxicity pozorovaný

in vivo je spojován s metabolismem obou látek prostřednictvím cytochromu P450. Zatímco z THA vzniká nebezpečný chinon, 7-MEOTA je metabolizován na méně toxický 7-hydroxytakrin, který je po konjugaci eliminován močí (Patočka *et al.*, 2008). Naše výsledky na druhou stranu ukazují, že 7-MEOTA je pro buněčnou linii HepG2 signifikantně cytotoxičtější než THA. Důvod rozdílu mezi *in vivo* a *in vitro* experimenty není znám. Vysvětlení by však mohlo souviset s nižší metabolickou aktivitou HepG2 buněk (Gerets *et al.*, 2009 a 2012).

Třetí skupinu nově syntetizovaných sloučenin představovali mono-7-metoxytakrinové deriváty SA. U látky s C2 spojovacím řetězcem (K1521) nebylo možné toxikologický index IC₅₀ z důvodu rozpustnosti stanovit. I přesto však tato molekula vykazovala nejnižší cytotoxicitu vůči buněčné linii HepG2 v rámci celé skupiny. Od této sloučeniny toxicita vůči HepG2 buňkám rostla s prodlužující se délkou spojovacího řetězce, až k C6 sloučenině (K1529) s nejvyššími cytotoxickými účinky. Toxicita hybridních molekul s C7 a C8 (K1531 a K1539) byla opět signifikantně nižší. Mechanismus, kterým by tento nálezný vysvětlovat, zůstává neznámý.

Ve čtvrté skupině nebylo možné přesně stanovit cytotoxicitu látek s C2 a C3 spojovacím řetězcem (K1522 a 1538). Podobně jako u druhé série bylo testování omezeno rozpustností sloučenin (viz obr. č. 25). U dalších látek (C4 – C8) byla rovněž patrná korelace délky spojovacího řetězce s rostoucí cytotoxicitou.

Nově syntetizované sloučeniny výše zmíněných sérií lze zařadit do skupiny multipotentních hybridních molekul syntetizovaných ve snaze simultánně ovlivnit několik cílů, jež sehraávají významnou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby (Bolognesi *et al.*, 2007). Takrin i 7-MEOTA jsou často používány jako výchozí látky (Girek *et al.*, 2019; Soukup *et al.*, 2013). Ačkoliv se nám v rámci studie podařilo identifikovat nové látky vykazující nižší cytotoxicitu vůči buněčné linii HepG2 než takrin (C2 – C4 monotakrinové a C2 bistakrinové deriváty) nebo 7-MEOTA (C2 – C4, C7 a C8 mono-7-metoxytakrinové a C2 – C5 bis-7-metoxytakrinové deriváty), pro celkové zhodnocení molekul *in vitro* bude třeba výsledky doplnit o testování inhibiční účinnosti vůči lidské AChE a BuChE. Zatímco v případě cytotoxicity byl spíše pozorován její nárůst s prodlužující se délkou spojovacího řetězce, vztah mezi inhibiční aktivitou a délkou spojovacího molekuly může vykazovat odlišný charakter (Nepovimová *et al.*, 2015; Spilovská *et al.*, 2013). Vzhledem k účinkům derivátů SA by bylo také vhodné zhodnotit protizánětlivé vlastnosti nových multipotentních hybridních molekul. Tyto *in vitro* modely jsou na pracovišti Katedry toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO v současné době zaváděny.

6 Závěr

V rámci této diplomové práce bylo na základě výsledků toxikologických indexů (změřených prostřednictvím MTT testu) zjištěno, že v první (monotakrinové deriváty SA) a druhé (bistakrinové deriváty SA) sérii látek cytotoxicita vzrůstala s délkou spojovacího řetězce. Ačkoli se v druhé sérii látek, vyskytovaly málo rozpustné sloučeniny (K1516 a K1508). Při porovnání první a druhé série, se bistakrinové deriváty SA jeví, jako více toxické. V případě třetí (mono-7-metoxytakrinové deriváty SA) série látek se cytotoxicita nezvyšovala s rostoucí délkou spojovacího řetězce, zatímco u čtvrté (bis-7-metoxytakrinové deriváty SA) série látek se cytotoxicita s rostoucí délkou spojovacího řetězce opět zvyšovala.

Zatímco, s délkou spojovacího řetězce se cytotoxicita podle výše uvedených údajů zvyšuje, tak vztah mezi délkou spojovacího řetězce a inhibiční aktivitou není zcela znám, a může vykazovat odlišný charakter.

7 Zdroje

- ADLER, M., FILBERT, M.G. FEBS Letters - Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. 1990, 267, 107-110.
- AGO, Y., KODA, K., TAKUMA, K., MATSUDA, T. Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. *Journal of Pharmacological Science*. 2011, 116, 6-17.
- AKIYAMA, H., BARGER, S., BARNUM, S. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. Neuroinflammation Working Group. *Neurobiology of aging*. 2000, 21(3), 383-421.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's and Dementia. 2018. 367-429.
- ALZHEIMER'S NEWS TODAY. How to AADvac1 works ? [online]. 2013-2019. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://alzheimersnewstoday.com/aadvac1/>
- AVILA, J., LUCAS, J. J., PEREZ, M., HERNANDEZ, F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiological Reviews*. 2004, 84(2), 361-384.
- AVILA, J., HERNÁNDEZ, F. GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2007, 7(11), 1527-1533.
- BACHMANN, A., MOLL, M., GOTTWALD, E., NIES, C., ZANTL, R., WAGNER, H. 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays*. 2015, 4(1), 64-83.
- BAJGAR, J. Advances in clinical chemistry - Organophosphates Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment. 2004, 38, 151-198.
- BARAGE, S. H., SONAWANE, K. D. Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*. 2015, 52, 1-18.
- BEKRIS, L.M., YU, C.E., BIRD, T.D., TSUANG, D.W. Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*. 2010, 23(4), 213-227.
- BIRKS, J., GRIMLEY, E. J., IAKOVIDOU, V., TSOLAKI, M., Holt, F.E. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2009, 2.
- BLACKARD, W.G.Jr., SOOD, G.K., CROWE, D.R., FALLON, M.B. Tacrine. A cause of fatal hepatotoxicity? *Journal of Clinical Gastroenterology*. 1998, 26(1), 57-59.
- BOLOGNESI, M. L., BANZI, R., BARTOLINI, M., CAVALLI, A., TAROZZI, A., ANDRIASANO, V., MELCHIORRE, C. Novel Class of Quinone-Bearing Polyamines as Multi-Target-Directed Ligands To Combat Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, 50(20), 4882-897.

- BOND, M., ROGERS, G., PETERS, J., ANDERSON, R. et al. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and economic model. *Health Technology Assessment*. 2012, 16, 461-469.
- BOTTIGLIERI, T., LAUNDY, M., CRELLIN, R., et al. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2000, 69(2), 228-232.
- BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate in depression. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2005, 29, 1103-1112.
- BRIGGS, R., KENNELLY, S. P., O'NEILL, D. Drug treatments in Alzheimers disease. *Clinical Medicine*. 2016, 16(3), 247-253.
- CAVEDO, E., LISTA, S., KHACHATURIAN, Z. et al. The Road Ahead to Cure Alzheimer's Disease: Development of Biological Markers and Neuroimaging Methods for Prevention Trials Across all Stages and Target Populations. *Journal of Prevention of Alzheimers Disease*. 2014, 1(3), 181-202.
- CEN, J., GUO, H., HONG, C., LV, J., YANG, Y., WANG, T., FANG, D., LUO, W., WANG, C. Development of tacrine-bifendate conjugates with improved cholinesterase inhibitory and pro-cognitive efficacy and reduced hepatotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, 128-136.
- COLEMAN, A. E., GEULA, C., PRICE, B. H., MULAM, M. M. Brain Research - Differential laminar distribution of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase containing tangles in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. 1992, 340-344.
- ČOLOVIĆ, M.B., KRSTIĆ, D.Z., LAZAREVIĆ-PAŠTI, T.D., BONDZIĆ, A.M., VASIĆ, V.M. Current Neuropharmacology. Acetylcholinesterase Inhibitors: *Pharmacology and Toxicology*. 2013, 11 (3), 315-335.
- DE-PAULA, V.J., RADANOVIC, M., DINIZ, B., FORLENZA, O. Alzheimer's Disease. *Subcellular Biochemistry*, 2012, 65.
- DOODY, R.S., THOMAS, R.G., FARLOW, M. et al. Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 2014, 370, 311-321.
- DOS SANTOS, P. L., OZELA, P., DE FÁTIMA, B., BRITO, M., PINHEIRO, A., PADILHA, E., BRAGA, F. et al. L. Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 2016, 23(999), 1-1.
- DU, X., WANG, X., GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translation Neurodegeneration*. 2018, 7, 2.

- DUBOIS, B., FELDMAN, H. H., JACOVA, C. et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *LANCET NEUROLOGY*. 2010, 9(11), 1118-1127.
- DUMURGIER, J., SCHRAEN, S., GABELLE, A., VERCRUYSSSE, O., BOMBOIS, S., et al. Cerebrospinal fluid amyloid- β 42/40 ratio in clinical setting of memory centers: a multicentric study. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2015, 7(1).
- DUŠEK, K., VEČEŘOVÁ-PROCHÁZKOVÁ, A. Daignostika a terapie duševních poruch. Praha: Grada publishing, 2015. 2. vydání. ISBN 978-80-247-4826-9.
- DZYOEM, J. P., KUETE, V., ELOFF, J. N. Biochemical Parametres in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data interpretation, and Use in Plant Screenings. 2014, 23, 675.
- FARLOW, M.R. NMDA receptor antagonists: A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Geriatrics*. 2004, 59, 22-27.
- FARLOW, M.R., SALLOWAYS, S., TARIOT, P.N., YARDLEY, J., MOLINE, M.L. et. al. Effectiveness and tolerability of high-dose (23 mg/d) versus standard-dose (10 mg/d) donepezil in moderate to severe Alzheimer's disease: A 24-week, randomized, double-blind study. *Journal of Clinical Therapeutics*. 2010, 32, 1234-1251.
- FINN, L. A. Current Medications for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Drug Discovery Approaches for the Treatment of Neurodegenerative Disorders*, 2017, 49-58.
- FÍŠAR, Z., JIRÁK, R. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. Praha. Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2737-0.
- FOLSTEIN, M.F., FOLSTEIN, S.E., MCHUGH, P.R. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 1975, 12(3), 189-198.
- FRANCIS, P.T., PALMER, A.M., SNAPE, M. et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 1999, 66(2), 137-147.
- FUJII, T., MORI, Y., TOMINAGA, T., HAYASAKA, I., KAWASHIMA, K. Maintenance of constant blood acetylcholine content before and after feeding in young chimpanzees. *Neuroscience Letters*. 1997, 227, 21-24.
- FUKUTO, T.R. Environment Health Perspectives - Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. 1990, 87, 245-254.
- GELLA, A., DURANY, N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion and Migration*. 2009, 3(1), 88-93.
- GERETS, H.H.J., HANON, E. et. al. Selection of cytotoxicity markers for the screening of new chemical entities in a pharmaceutical context: A preliminary study using a multiplexing approach. *Toxicology in Vitro*. 2009, 319-332.

- GERETS, H.H.J., TILMANT, K., GERIN, B. et. al. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology*. 2012, 69-87.
- GHOSH, A. K., OSSWALD, H. L. BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(19), 6765-6813.
- GIREK, M., SZYMAŃSKI, P. Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chemical Papers*. 2019, 73(2), 269-289.
- GLABE, C.G, KAYED, R. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology*. 2006, 66 (2), S74-78.
- GOEDERT, M., KLUG A, CROWTHER, R.A. Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimers Disease*. 2006, 9(3), 195-207.
- GOETZ, C. G. Textbook of clinical neurology. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2007, 3.
- GRACON, S.I., KNAPP, M.J., BERGHOFF, W.G., PIERCE, M., DEJONG, R., LOBBESTAEL, S.J.et al.. Safety of tacrine: clinical trials, treatment IND, and postmarketing experience. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 1998, 12(2), 93-101.
- GRÄFF, J., TSAI, L.H. The potential of HDAC inhibitors as cognitive enhancers. *Annual Review Pharmacology and Toxicology*. 2013, 53, 11-30.
- GROSSMAN, I, LUTZ, M.W., CRENSHAW, D.G., SAUNDERS, A.M., BURNS, D.K., ROSES, A.D. Alzheimer's disease: diagnostics, prognostics and the road to prevention. *EPMA Journal*. 2010, 1(2), 293-303.
- GRUNDKE, I, I. et al. Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academi of Science of the USA*. 1989, 86, 2853-2857.
- GUO-HUA Q., XIAOJIN, X. et. al. Distinctive pharmacological differences between liver caNCer cell lines HepG2 and HepG3B. *Cytotechnology*. 1-12. 2015
- HAASS, C., HUNG, A. Y., SCHLOSSMACHER, M. G., TELOW, D. B. & SELKOE, D. J. β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, 3021-3024.
- HAMODAT, H., CASH, M. K., FISK, J. D. et al. Neuropathology and applied Neurobiology. 2017, 43, 571-583.

- HANESSIAN, S., VINCI, V., AUZZAS, L., MARZI, M., GIANNINI, G. Exploring alternative Zn-binding groups in the design of HDAC inhibitors: squaric acid, N-hydroxyurea, and oxazoline analogues of SAHA. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*. 2006, 16(18), 4784-4787.
- HASSAN, A., WHITWELL, J. L., JOSEPHS, K. A. The corticobasal syndrome–Alzheimer’s disease conundrum. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2011, 11(11), 1569–1578.
- HENEKA, M. T., CARSON, M. J., EL, K. J. et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*. 2015, 14(4), 388-405.
- HILL, N.D., BUNATA, K., HEBERT, A.A.. Treatment of alopecia areata with squaric acid dibutylester. *Clinics ind Dermatology*. 2015, 33(3), 300-304.
- HROUDOVÁ, J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. 2017; 13(2e).
- HU, C., LI, L. In vitro culture of isolated primary hepatocytes and stem cell-derived hepatocyte-like cells for liver regeneration. *Protein & Cell*. 2015, 6(8), 562-574.
- HUANG, W.J, ZHANG, X., CHEN, W.W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports*. 2016, 4(5), 519-522.
- CHAHINE, L. M., REBEIZ, T., REBEIZ, J. J., GROSSMAN, M., GROSS, R. G. Corticobasal syndrome: Five new things. *Neurology: Clinical Practice*. 2014, 4(4), 304–312.
- CHMÁTALOVÁ, Z., SKOUMALOVÁ, A. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická biochemie a metabolismu*. 2014. 22(43), 189-195.
- CHU, L. W., Alzheimer’s disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong medical journal*. 2012. 18(3). 228-237.
- JARRETT, J. T., BERGER, E. P. & LANSBURY, P. T. Jr. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Biochemistry* 32. 1993, 4693-4697.
- JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Farmakologie, onemocnění CNS. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2004, 18, 212-214.
- JOHANIDESOVÁ, S., RUSINA, R., HOUŠKA, P., KELLER, J., MATĚJ, R. Alzheimerova nemoc probíhající pod obrazem kortikobazální degenrece – kazuistika. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*. 2012, 75/108(3), 373-377.
- JOMOVA, K., VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011, 283(2-3), 65-87.

- KANIAKOVA, M., KLETECKOVA, L., LICHNEROVA, K., HOLUBOVA, K., SKRENKOVA, K., KORINEK, M., HORAK, M. 7-Methoxyderivative of tacrine is a “foot-in-the-door” open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology*. 2018, 140, 217-232.
- KETTENMANN, H., HANISCH, U.K., NODA, M., VERKHRATSKY, A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews*. 2011, 91, 461-553.
- KHACHATURIAN, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's Disease. *Archives of Neurology*. 1985, 42(11), 1097-1105.
- KOLEJÁKOVÁ, K., PETROVIČ, R., ŠÚTOVSKÝ, S. et al. Genetika Alzheimerovej choroby. Poster [online]. 2011 [cit. 2019-03-13]. Dostupné z WWW: <http://www.datasolution.sk/pdf/genad.pdf?PHPSESSID>
- KONRATH, E.L., PASSOS, C. S., KLEIN, L.C. Jr., HENRIQUES, A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013, 65(12), 1701-25.
- KORÁBĚČNÝ, J., ANDRS, M., NEPOVIMOVÁ, E., et al. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*. 2015, 20(12), 22084-101.
- KORÁBĚČNÝ, J., ŠPILOVSKÁ, K., BENEK, O., MUSÍLEK, K., SOUKUP, O., KUČA, K., Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Česká a Slovenská farmacie*. 2012; 61, 210-221.
- KORNHUBER, J., KENNEPOHL, M. et al.. Memantine pharmacotherapy: a naturalistic study using a population pharmacokinetic approach.. *Clinical pharmacokinetics*. 2007, 46, 599-612.
- KOUKOLÍK, F., JIRÁK, R. Alzheimerova nemoc a další demence. Praha: Grada publishing, 1998. ISBN 80-7169-615-3.
- KUMAR, V., ABBAS, A. K., FAUSTO, N. et al. Robbins basic pathology. Philadelphia: Saunders Elsevier. 2007, 8.
- KUMAR, D., GANESHPURKAR, A., KUMAR, D., MODI, G., GUPTA, S. K., SINGH, S. K. Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 48, 436-452.
- KURET, J., CONGDON, E.E., LI, G., YIN, H., YU, X., ZHONG, Q. Evaluating triggers and enhancers of tau fibrillization. *Microscopy Research and Technique*. 2005, 67, 141-155.
- LAFERLA, F. M., GREEN, K. N., SALVATORE, O. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007, 8(7), 499-509.

- LEE, C.Y.D., LANDRETH, G.E. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of Neural Transmission*. 2010, 117, 949-60.
- LEE, S. K., PARK, M. K., JHANG, H. E., YI, J., NAHM, K., CHO, D. W., KUCA, K. Preparation of 7-Methoxy Tacrine Dimer Analogs and Their In vitro/In silico Evaluation as Potential Cholinesterase Inhibitors. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2015, 36(6), 1654-1660.
- LI, Q., YANG, H., CHEN, Y. et. al. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease . *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 132, 294-309
- LI, X.L., HU, N., TAN, M.S., YU, J.T., TAN, L. Behavioral and psychological symptoms in Alzheimer's disease. *Biomed Research International*. 2014.
- LIN, M.T., BEAL, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *NATURE*. 2006, 443 (7113), 787-795.
- LOEFFLER, D.A. Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now? *Journal of Neuroinflammation*. 2013, 10, 70.
- LOEWI, O. Über die Übertragbarkeit der herznervenwirkung. *I Mitteilung Pflügers Arch*, 1921, 189, 239-242.
- LOPÉZ, O. L., DEKOSKY, S. T. Clinical symptoms in Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 2008, 89, 207-216.
- MASSOULIE, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E., VALLETTE, F.M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*. 1993, 41, 31-91.
- MASTROLONARDO, M., DIAFERIO, A. Topical immunotherapy with squaric acid dibutylester: unusual hair pigmentary changes in two cases of alopecia areata. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*. 2002, 16(2), 186.
- MCKHANN, G., DRACHMANN, D., FOLSTEIN, M., KATZMANN, R., PRICE, D., STADLAN, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of department of health and human services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 1984, 34(7), 939-944.
- MEDEIROS, R., LAFERLA, F.M. Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*. 2013, 239, 133-38.
- MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983, 55-63.
- MUCKOVA, L., PEJCHAL, J., JOST, P. et. al. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. *Journal drug and chemical toxicology*. 2018, 1-5.

MURPHY, M. P., LEVINE, H. Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, 19(1), 311-323.

NEPOVIMOVÁ, E., KORÁBĚČNÝ, J., DOLEŽAL, R., BABKOVÁ, K., ONDŘEJÍČEK, A., JUN, D., KUČA, K. Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 58(22), 8985-9003.

NEUROPATHOLOGY. An illustrated interactive course for medical students and residents. Chapter 9, Degenerative diseases [online]. 2016 [cit. 2019-03-24]. Dostupné z: <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9bAD.html>

NI, R., MARUTLE, A., NORDBERG, A.: Modulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- β interactions in Alzheimer's disease brain. *Journal of Alzheimers Disease*. 2013, 33, 841-851.

NIEDOWICZ, D.M., NELSON, P.T., MURPHY, M.P. Alzheimer's disease: pathological mechanisms and recent insights. *Current Neuropharmacology*. 2011, 9(4), 674-84.

NOBLE, W., PLANEL, E., ZEHR, C., OLM, V. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academi Science of the USA*, 2005, 102(19), 6990-6995.

NOSTER, U., HAUSEN, B.M., KRISCHE, B., SCHULZ, K.H. Squaric-acid-diethylester - a strong sensitizer. *Contact Dermatitis*. 1976, 2(2), 99-104.

OLIVARES, D. K., DESHPANDE, V., SHI, Y. K., LAHIRI, D. H., GREIG, N. T., ROGERS, J., HUANG, X. N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists and Memantine Treatment for Alzheimer's Disease, Vascular Dementia and Parkinson's Disease. *Current Alzheimer Research*, 2012, 9(6), 746-758.

ONYANGO, I. G., DENNIS, J., KHAN, S. M. Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies. *Aging and Disease*. 2016, 7(2), 201.

OREL, M. Nervové buňky a jejich svět. Praha: Grada publishing 2015. 1. vydání. ISBN 978-80-247-5070-5.

PATOCKA, J., JUN, D., KUČA, K. Possible Role of Hydroxylated Metabolites of Tacrine in Drug Toxicity and Therapy of Alzheimers Disease. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9(4), 332-335.

- POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical papers of the Medical Faculty of University Palacky Olomouc* 2011, 155(3), 219-230.
- PRINCE, M., WIMO, A., GUERCHET, M., ALI, G. C., WU, Y., PRINA, M. The Global Voice on Dementia. *World Alzheimer Report*. 2015.
- RABAL, O., SÁNCHEZ-ARIAS, J.A. et al. Discovery of in-vivo chemical probes for treating Alzheimer's disease: Dual phosphodiesterase 5 (PDE5) and class I histone deacetylases-selective inhibitors. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018.
- RAFII, M.S, AISEN, P.S. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics. *BMC Medicine*. 2009, 7, 7.
- RAJENDRAN, R., MINQIN, R., YNSA, M. D., CASADESUS, G., SMITH, M. A., PERRY, G., WATT, F. A novel approach to the identification and quantitative elemental analysis of amyloid deposits—Insights into the pathology of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009, 382(1), 91-95.
- RAMIRÉZ-FORT, M.K., AU, S.C., JAVED, S.A., LOO, D.S. Management of cutaneous human papillomavirus infection: pharmacotherapies. *Current Problems in Dermatology*. 2014, 45, 175-85.
- RAYMENT, D., BIJU, M., ZHENG, R., KURUVILLA, T. Neuroimaging in dementia: an update for the general clinician. *Progress in Neurology and Psychiatry*. 2016, 20(2), 16-20.
- RÍOS, C. Expert Opinion - Cholinesterase inhibitors: a patent review (2007 – 2011). 2012, 853-869.
- RISS, T. L., MORAVEC, R. A., NILES, A. L. et. al. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. 2013.
- ROBINSON, S.R., BISHOP, G.M., LEE, H.G.G., MÜNCH, G. Lessons from the AN 1792 Alzheimer vaccine: lest we forget. *Neurobiological Aging*. 2004, 25, 609-615.
- SALLOWAY, S., SPERLING, R., FOX, N.C. et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 2014, 370, 322-333 .
- SANABRIA, C. A., ALVADORO, E. I., MONGE, B. C. Molecular Pathogenesis of Alzheimer's Disease: An Update. *Annals of Neurosciences*. 2017, 24(1), 46-54.
- SCHACHTER, A.S., DAVIS, K.L. Alzheimer's disease. *Dialogues Clinical Neuroscience*. 2000, 2(2), 91-100.
- SIGMA-ALDRICH. Catalog – products of 3,4-Diethoxy-3-cyclobutene-1,2-dione [online]. 2019 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich>

- SILVERBERG, N.B., LIM, J.K., PALLER, A.S., MANCINI, A.J. Squaric acid immunotherapy for warts in children. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000, 42 (5), 803-808.
- SINHA, S., LIEBERBURG, I. Cellular mechanisms of β -amyloid production and secretion. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 1999, 96(20), 11049-11053.
- SOFRONIEW, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neuroscience*. 2009, 32, 638-47.
- SOFRONIEW, M.V., VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010, 119, 7-35.
- SOUKUP, O., JUN, D., MUSÍLEK, K., KORÁBĚČNÝ, J. a kol. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Current Alzheimer Research*, 2013; 893-906.
- SPILOVSKÁ, K., KORÁBĚČNÝ, J., KRÁL, J., HOROVÁ, A., MUSÍLEK, K., SOUKUP, O., KUČA, K. 7-Methoxytacrine-Adamantylamine Heterodimers as Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease Treatment — Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies. *Molecules*. 2013, 18(2), 2397-2418.
- STOCKERT, J. C., BLAZQUEZ-CASTRO, A., CANETE, M. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. 2012, 114(8), 785-796.
- SÚKL - Státní ústav pro kontrolu léčiv. Farmakoterapeutické informace; Měsíčník pro lékaře a farmaceuty. 12/2014.
- ŠTĚPÁNKOVÁ, H., NIKOLAI, T., LUKAVSKÝ, J., BEZDÍČEK, O., VRAJOVÁ, M., KOPEČEK, M. Mini-Mental State Examination – česká normativní studie. *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie*. 2015, 78/111(1), 57-63.
- SWERDLOW, R.H. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clinical Interventions in Aging*. 2007, 2(3), 347-59.
- TANZI, R.E., BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell*. 2005, 120(4), 545-555.
- TEIPEL, S., DRZEZGA, A., GROTHE, M. J., BARTHEL, H., ChÉTELAT, G., SCHUFF, N., FELLGIEBEL, A. Multimodal imaging in Alzheimer's disease: validity and usefulness for early detection. *The Lancet Neurology*. 2015, 14(10), 1037-1053.
- TERRY, A.V. Jr., BUCCAFUSCO, J.J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003, 306, 821-827.

- VIEIRA, M.N., LYRA, E., SILVA, N.M., FERREIRA, S.T., DE FELICE, F.G. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B): A Potential Target for Alzheimer's Therapy? *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2017, 31, 9:7.
- WANG, R., REDDY, P. H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 57(4), 1041-1048.
- WANG, H,Y, LI, W., BENEDETTI, N.J., LEE, D.H. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278, 31547-31553.
- WATKINS, P.B., ZIMMERMAN, H.J., KNAPP, M.J., GRACON, S.I., LEWIS, K.W. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *Journal of the American Medical Association*. 1994, 271, 992-998.
- WESSLER, I., KIRKPATRICK, C.J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology*. 2008, 154, 1558-15571.
- WINBLAD, B., LANCET. Donepezil for severe Alzheimer's disease. 2006, 368 (9533), 362.
- XIE, J., COMEAU, A.B., SETO, C.T. Squaric acids: a new motif for designing inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Organic Letters*. 2004, 6(1), 83-86.
- YEO, J. M., LIM, X., KHAN, Z., PAL, S. Systematic review of the diagnostic utility of SPECT imaging in dementia. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2013, 263(7), 539-552.
- YIANNOPOULOU, K.G., PAPAGEORGIOU, S.G. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances Neurological Disorders*. 2013, 6(1), 19-33.
- YIP, L. Y., AW, C. C., LEE, S. H. et al. The liver-gut microbiota axis modulates hepatotoxicity of tacrine in the rat . *Hepatology* . 2018, 67(1), 282-295.
- YOUNKIN, S. G. The role of A β 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology Paris*. 1998, 92, 289-292.
- ZHANG, Y., THOMPSON, R., ZHAN, H., XU, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*. 2011, 4(1), 3.
- ZHANG, S., SMAILAGIC, N., HYDE, C., NOEL-STORR, A. H., TAKWOINGI, Y., MCSHANE, R., FENG, J. C-PIB-PET for the early diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014, 23(7).
- ZHANG, Y., LI, P., FENG, J., WU, M. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*. 2016, 37(7), 1039-1047.

ZHENG, W.H., BASTIANETTO, S., MENNICKEN, F., MA, W., KAR, S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*. 2002, 115, 201-211.

ZHU, Y., XIAO, K., MA, L., XIONG, B., FU, Y., YU, H., WANG, W., WANG, X., HU, D., PENG, H., LI, J., GONG, Q., CHAI, Q., TANG, X., ZHANG, H., LI, J., SHEN, J. Design, synthesis and biological evaluation of novel dual inhibitors of acetylcholinesterase and β - secretase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2009, 17(4), 1600-1613.

ZVĚŘOVÁ, M. Alzheimerova demence. Praha: Grada publishing, 2017. 1. vydání. ISBN 978-80-271-0561-8.

8 Seznam obrázků

- Obr. č. 1: Vzorek mozkové kůry Auguste D. obarvený Bielschowského stříbrem. (a) Četný výskyt neurofibrilárních spleť a neuritických (Alzheimerových) plaků. (b) Příklady neurofibrilárních spleť. Převzato z Goedert et al., 2006.13
- Obr. č. 2: Schéma neuronu znázorňující změny v neurotransmisi při AD. (1) Snížená kortikální cholinergní inervace; (2) Snížená kortiko-kortikální glutamátergní neurotransmise v důsledku ztráty neuronů nebo synapse; (3) Snížená vaznost muskarinových receptorů s druhou stranou (druhým poslem); (4) Posun tau proteinu do hyperfosforylovaného stavu; (5) Snížené uvolňování rozpustného prekurzorového proteinu amyloid- β ; (6) zvýšená produkce amyloidu- β (A β); (7) Snížená produkce glutamátu. Převzato z Francis *et al.*, 1999.14
- Obr. č. 3: Reakce katalyzovaná cholinesterasami. Převzato z Dzoyem *et al.*, 2014.15
- Obr. č. 4: Ilustrační schéma acetylcholinesterasy. AChE – acetylcholinesterasa; PAS – periferní aniontové místo; CAS – katalytické aniontové místo; CT – katalytická triáda; - negativní oblast; + kladná oblast; převzato z <http://proteopedia.org>.16
- Obr. č. 5: Shrnující schéma štěpení APP amyloidogenní a neamyloidogenní cestou. Převzato z Barage a Snowane, 2015.18
- Obr. č. 6: Neurofibrilární spleť v mozkové kůře u pacientů trpící AD. Převzato z www.neuropathology-web.org.19
- Obr. č. 7: Struktury mikroglíí u pacientů s AD. **A** – Mikroglie (hnědá; pozitivní na IL-1) ve frontální oblasti mozkové kůry. **B** – Mikroglie (modrá; pozitivní na CD11b – adhezní integrin) v ložisku A β (hnědá) v parietální oblasti mozkové kůry. Převzato z Heneka *et al.*, 2015.22
- Obr. č. 8: Struktury astrocytu u pacientů s AD. **A** – Fyziologický výskyt astrocytů ve zdravé tkáni. **B** a **C** – Patologický výskyt astrocytů (mírná a těžká astroglióza, postupně). Převzato z Sofroniew, 2009.23

| | |
|---|----|
| Obr. č. 9: SPE-CT a FDG-PET skeny mozku, kde A – zobrazení zdravého mozku v sagitální rovině, díky SPE-CT skenu. B – zobrazení mozku v sagitální rovině, pacienta trpícího AD, díky SPE-CT skenu. V temporoparietální oblasti je viditelná hypoperfúze. Převzato z Rayment <i>et al.</i> , 2016. | 31 |
| Obr. č. 10: Axiální a sagitální PET sken mozku, zobrazující rozdíl mezi obsahem amyloidu, v mozkové tkáni u pacienta trpící AD a zdravým jedincem (kontrola). Převzato z Rayment <i>et al.</i> , 2016. | 31 |
| Obr. č. 11: SPE-CT a FDG-PET skeny mozku, kde A – SPE-CT sken zdravého mozku v sagitální rovině. B – FDG-PET sken mozku v sagitální rovině pacienta trpícího AD. V temporoparietální oblasti je zřetelný hypometabolismus. Převzato z Rayment <i>et al.</i> , 2016. | 32 |
| Obr. č. 12: Hipokampální atrofie viditelná pomocí MRI skenu s vysokým rozlišením, kde červeně je označený hipokampus. A – pacient trpící AD; B – zdravý jedinec (kontrola). Převzato z Teipel <i>et al.</i> , 2015. | 32 |
| Obr. č. 13 : Chemická struktura donepezilu. Převzato z Ríos, 2012. | 34 |
| Obr. č. 14: Chemická struktura galantaminu. Převzato z Ríos, 2012. | 35 |
| Obr. č. 15: Chemická struktura rivastigminu. Převzato z Ríos, 2012..... | 36 |
| Obr. č. 16: Chemická struktura memantinu. Převzato z Kornhuber a Kennepohl, 2007. | 37 |
| Obr. č. 17: Schéma aktivovaného a neaktivovaného NMDA receptoru. Převzato z Farlow, 2004. | 37 |
| Obr. č. 18: Buněčná linie HepG2..... | 43 |
| Obr. č. 19: Chemická struktura THA. Převzato z Koráběčný <i>et al.</i> , 2015. | 44 |
| Obr. č. 20: Chemická struktura 7-MEOTA. Převzato z Koráběčný <i>et al.</i> , 2015..... | 44 |
| Obr. č. 21: Chemická struktura SA. Převzato z www.sigma-aldrich.cz | 44 |
| Obr. č. 22: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek monotakrinových derivátů SA. | 44 |

| | |
|--|----|
| Obr. č. 23: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek bistakrinových derivátů SA. | 45 |
| Obr. č. 24: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek mono-7-metoxytakrinových derivátů SA. | 45 |
| Obr. č. 25: Chemické struktury nově syntetizovaných testovaných látek bis-7-metoxytakrinových derivátů SA. | 46 |
| Obr. č. 26: Výsledné grafy získané měřením počtu buněk a buněčné viability pomocí mikrokapilárního průtokového cytometru. Graf A (populační profil): rozdělení buněk podle jejich velikosti za účelem odlišení buněk od buněčné drtě. Graf B (profil viability): umožňuje určení procenta viabilních buněk (vlevo) a mrtvých buněk (vpravo). Horní oblast (světlejší) představuje buňky s jádrem a spodní část (tmavší) buněčnou drť. Přičemž buňky vyskytující se v levém horním rohu mají jádro a jsou živé. Buňky v pravé horní části sice jádro mají, ale jsou mrtvé. | 48 |
| Obr. č. 27: 96jamková destička s nasazenými buňkami. | 49 |
| Obr. č. 28: 96jamková destička s nasazenými buňkami a koncentrační řadou testovaných látek. Ve sloupcích 1 – 3 je v triplikátu testovaná látka č. 1; 4 – 6 je v triplikátu testovaná látka č. 2; 7 – 9 je v triplikátu testovaná látka č. 3; 10 – 11 je negativní kontrola a ve sloupci 12 je pozitivní kontrola. Stejně schéma pipetování bylo použito i u dalších destiček s dalšími testovanými látkami. | 50 |
| Obr. č. 29: Chemická struktura MTT a jeho redukované formy formazanu. Převzato z Stockert. <i>et. al.</i> , 2012. | 50 |
| Obr. č. 30: 96jamková destička s přidaným roztokem obsahující MTT (sloupec 1 – 11) nebo bezbarvým médiem (sloupec 12). | 51 |
| Obr. č. 31: 96jamková destička po rozpuštění krystalu formazanu pomocí DMSO (sloupec 1 – 12). Intenzita zabarvení roztoku je přímo úměrná viabilitě buněk. | 51 |
| Obr. č. 32: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1515 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu. | 53 |

| | |
|---|----|
| Obr. č. 33: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1507 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 54 |
| Obr. č. 34: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K153 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 54 |
| Obr. č. 35: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1513 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 55 |
| Obr. č. 36: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1517 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 55 |
| Obr. č. 37: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1523 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 56 |
| Obr. č. 38: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1525 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 56 |
| Obr. č. 39: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1516 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 57 |
| Obr. č. 40: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1508 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 58 |
| Obr. č. 41: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1536 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 58 |

| | |
|---|----|
| Obr. č. 42: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1514 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 59 |
| Obr. č. 43: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1518 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 59 |
| Obr. č. 44: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1524 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 60 |
| Obr. č. 45: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1526 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 60 |
| Obr. č. 46: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1521 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 61 |
| Obr. č. 47: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1537 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 62 |
| Obr. č. 48: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1509 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 62 |
| Obr. č. 49: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1527 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 63 |
| Obr. č. 50: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1529 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Obr. č. 51: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1531 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 64 |
| Obr. č. 52: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1539 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 64 |
| Obr. č. 53: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1522 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 65 |
| Obr. č. 54: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1538 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 66 |
| Obr. č. 55: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1510 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 66 |
| Obr. č. 56: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1528 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 67 |
| Obr. č. 57: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1530 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 67 |
| Obr. č. 58: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1532 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 68 |
| Obr. č. 59: Dávkově závislé křivky získané po 24 hodinové inkubaci buněk HepG2 s koncentrační řadou látky K1540 z tří nezávislých experimentů (n = 3) provedených v triplikátu..... | 68 |

9 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tab. č. 1: Ukázka obsahu MMSE testu. Převzato z Štěpánková <i>et al.</i> , 2015. | 29 |
| Tab. č. 2: Cytotoxicita výchozích látek vyjádřená toxikologickým indexem IC ₅₀ , jako průměr (se směrodatnou odchylkou) ze třech nezávislých experimentů. | 52 |
| Tab. č. 3: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC ₅₀ pro monotakrinové deriváty SA obsahující 1 molekulu THA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů..... | 53 |
| Tab. č. 4: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC ₅₀ pro bistakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly THA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů..... | 57 |
| Tab. č. 5: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC ₅₀ pro mono-7-meotxytakrinové deriváty SA obsahující 1 molekulu 7-MEOTA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů. | 61 |
| Tab. č. 6: Cytotoxicita látek vyjádřená toxikologickým indexem IC ₅₀ pro bis-7-metoxytakrinové deriváty SA obsahující 2 molekuly 7-MEOTA získaná jako průměr (se směrodatnou odchylkou – SD) ze třech nezávislých experimentů. | 65 |