

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Tereza Kalinová

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**VLIV INHIBITORŮ CHOLINESTERÁZ NA MONOAMINERGNI SYSTÉM A
ENERGETICKÝ METABOLISMUS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Školitel - konzultant: doc. PharmDr. Jana Hroudová, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Poděkování

Děkuji zejména doc. PharmDr. Janě Hroudové, Ph.D. za vstřícné a trpělivé vedení, za cenné rady a zejména za čas, který mi během práce věnovala. Také děkuji prof. RNDr. Zdeňkovi Fišarovi, CSc. za praktické připomínky a pomoc při zpracovávání dat mé práce. Za pomoc a rady také děkuji doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. V poslední řadě děkuji svým rodičům a příteli Tomášovi, kteří mi byli oporou během celého mého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Tereza Kalinová

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Školitel: doc. PharmDr. Jana Hroudová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv inhibitorů cholinesteráz na monoaminergní systém a energetický metabolismus

Inhibitory cholinesteráz (ChE) hrají klíčovou roli v léčbě Alzheimerovy choroby (AD). Zpomalují kognitivní deficit a působí také pozitivně na funkční i behaviorální symptomy choroby. V současné době jsou jedinými látkami z této skupiny schválenými k léčbě AD rivastigmin, donepezil a galantamin. Prvním inhibitorem ChE byl takrin, který byl z trhu stažen pro svou toxicitu a nežádoucí účinky. Ve snaze najít látky s nižší toxicitou a postihující současně více patofyziologických mechanismů AD jsou syntetizovány a intenzivně zkoumány nové deriváty takrinu a 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Působení inhibitorů ChE na mitochondriální funkce a energetický metabolismus není dostatečně objasněno. Cílem práce je zjistit, jak působí *in vitro* inhibitory ChE na energetický metabolismus a buněčnou respiraci, konkrétně na komplexy I-IV elektronového transportního řetězce a enzym citrátového cyklu citrátsyntázu. Předpokládá se také inhibiční účinek na aktivitu monoaminoxidáz (MAO). U nově vyvíjených látek s multimodálním účinkem je inhibice izoformy MAO-B zahrnuta v mechanismech účinku. Výsledky této studie identifikovaly jednu molekulu, která by se mohla stát potenciálním kandidátem pro další výzkum v oblasti nových léčiv k léčbě AD.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Tereza Kalinová

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Mentor: Assoc. Prof. Jana Hroudová, Pharm.D., Ph.D.

Title of diploma thesis: Effect of cholinesterase inhibitors on monoaminergic system and energy metabolism

Cholinesterase (ChE) inhibitors play an essential role in the treatment of Alzheimer's disease (AD). They effect positively cognitive, functional and behavior symptoms of AD. Up to date, donepezil, rivastigmine and galantamine represent the only ChE inhibitors approved for AD treatment. The first ChE inhibitor was tacrine, which was withdrawn from market due to its toxicity and adverse effects. Recently, novel tacrine and 7-methoxytacrine (7-MEOTA) derivatives were synthesized and extensively investigated to find less toxic compounds affecting pathological mechanisms associated with development of AD. There is less known about effects of these drugs on mitochondrial functions and cellular energy metabolism. The aim of this project is to examine *in vitro* effects of ChE inhibitors on energy metabolism and cellular respiration, specifically on mitochondrial electron transport chain complexes and an enzyme of the citric acid cycle – citrate synthase. Inhibitory effects on monoamine oxidase B (MAO-B) activity can be also expected. Inhibition of MAO-B is included in mechanisms of action of newly developed multitarget drugs. The results of this study identified one molecule that could become a potential candidate for further research of new drugs for therapy of AD.

Obsah

1.	Seznam zkratek	8
2.	Úvod	10
2.1.	Alzheimerova nemoc.....	10
2.2.	Mitochondriální dysfunkce u AD.....	11
2.3.	Léčiva k terapii AD a jejich účinky.....	12
2.4.	Vliv inhibitorů AChE a memantinu na mitochondriální funkce	17
3.	Teoretická část	18
3.1.	Mitochondrie	18
3.1.1.	<i>Fyziologie oxidativní fosforylace</i>	19
3.1.2.	<i>Regulace oxidativní fosforylace</i>	20
3.1.3.	<i>Respirometrie s vysokým rozlišením</i>	23
3.1.4.	<i>Specifické inhibitory ETC</i>	24
3.2.	Sledované mitochondriální enzymy	25
3.3.	Monoaminoxidáza.....	26
3.4.	Nové inhibitory ChE v preklinických studiích.....	27
3.4.1.	<i>Deriváty takrinu</i>	27
3.5.	Další nově vyvíjené látky k terapii AD.....	28
3.5.1.	<i>Inhibitory MAO-B a jejich hybridní deriváty</i>	28
3.5.2.	<i>Látky interagující s mitochondriálními enzymy – ABAD modulátory, mPTP modulátory</i> ..	28
3.6.	Testované nové inhibitory ChE.....	30
4.	Cíle	31
5.	Experimentální část	32
5.1.	Materiál, chemikálie a média	32
5.2.	Izolace mitochondrií.....	32
5.3.	Testované látky	33
5.4.	Aktivita citrát syntázy a komplexů ETC	34
5.5.	Mitochondriální respirace	35
5.6.	Aktivita monoaminoxidázy.....	37
5.7.	Analýza dat a statistika.....	37
6.	Výsledky	38
6.1.	Aktivita citrát syntázy a komplexů ETC	38
6.2.	Mitochondriální respirace	40
6.3.	Aktivita MAO	41
7.	Diskuse	44
7.1.	Aktivita citrát syntázy a komplexů ETC	45
7.2.	Mitochondriální respirace	47

7.3.	Aktivita MAO	48
8.	Závěr	50
9.	Reference	51

1. Seznam zkratek

ABAD – A β vázající alkoholdehydrogenáza z anglického A β binding alcohol dehydrogenase

A β – amyloid β

ACh – acetylcholin

AChE – acetylcholinesteráza

AD – Alzheimerova choroba z anglického Alzheimer's disease

ADP – adenosin-5'-difosfát

Akt – proteinkináza B

APP – amyloidový prekurzorový protein

ATP – adenosin-5'-trifosfát

BuChE – butyrylcholinesteráza

ChE – cholinesteráza

CoQ – koenzym Q₁₀

COX – cytochrom *c* oxidáza, komplex IV

cyt *c* – cytochrom *c*

DMSO – dimethylsulfoxid

ETC – elektronový transportní řetězec z anglického electron transport chain

5-HT – 5-hydroxytryptamin, serotonin

IC₅₀ – poloviční inhibiční koncentrace

MAO – monoaminoxidáza

7-MEOTA – 7-methoxytakrin

mPTP – mitochondriální pór přechodné propustnosti z anglického mitochondrial permeability transition pore

mtDNA – mitochondriální DNA

NADH – redukovaný nikotinamidadenin dinukleotid

NAD⁺ – oxidovaný nikotinamidadenin dinukleotid

nDNA – jaderná DNA

NMDA – N-methyl-D-asparagová kyselina

OXPHOS – oxidativní fosforylace

ROS – reaktivní formy kyslíku z anglického reactive oxygen species

ROX – zbytková spotřeba kyslíku z anglického residual oxygen consumption

sAPP α – sekretovaný α -prekurzor amyloidu

TCA cyklus – cyklus trikarboxylových kyselin z anglického tricarboxylic acid, citrátový cyklus, Krebsův cyklus

T2 – diiodthyronin

T3 – triiodthyronin

$\Delta\psi_m$ – mitochondriální membránový potenciál

Δp – protonová hnací síla

2. Úvod

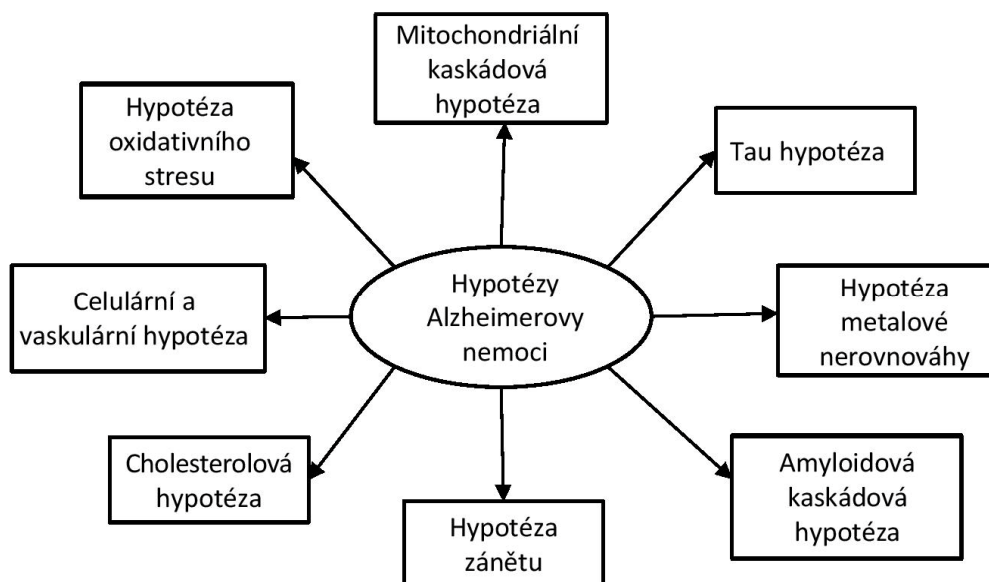
2.1. Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění, u kterého dochází extracelulárně k akumulaci amyloidu- β (A β , senilní plaky) a intracelulárně k ukládání depozit hyperfosforylované formy tau proteinu do neurofibrilárních klubek (tangles). Třetím klíčovým symptomem je úbytek neuronů, který vede k celkové atrofii mozkové tkáně (Rusina et al., 2014). AD je charakterizována zhoršením kognitivních funkcí a ztrátou paměti. Jde o nejčastější příčinu demence.

Hlavním rizikovým faktorem pro rozvoj této nemoci je věk. Prevalence v populaci výrazně narůstá po 65. roce věku. Ve věkové skupině 65letých postihuje dvě až tři procenta populace, ve věkové skupině 80letých 30 procent i více. AD odpovídá přibližně za dvě třetiny syndromů demence. V ČR bylo v roce 2010 demencí postiženo asi 80 000 osob, celosvětově 36 milionů osob. V souvislosti se stárnutím populace se očekává, že se prevalence výskytu demence do roku 2030 zdvojnásobí (Rusina et al., 2014). Podle Světové zdravotnické organizace bude toto číslo ještě vyšší – 82 miliónu lidí (www.who.int).

Abnormality A β a tau proteinu jsou příčinou neuronálních dysfunkcí a buněčné smrti. V souvislosti s příčinami vzniku a rozvoje AD jsou diskutovány různé hypotézy (viz Obr. 1). Nejčastěji zmiňované jsou tau hypotéza (Maccioni et al., 2010) a hypotéza amyloidní kaskády, která předpokládá, že určitá akumulace derivátu amyloidového prekurzorového proteinu (APP), amyloidu β , indukuje charakteristické biochemické, histologické a klinické změny, které se můžou manifestovat u pacientů s AD (Hardy a Selkoe, 2002). Jako kritické se považují oligomery složené ze 42 aminokyselin (A β ₄₂) (Walsh a Selkoe, 2007). Přestože A β a hyperfosforylovaný tau protein jsou nejvíce zmiňovány jako patogenní mechanismy této choroby, v poslední době se dostává do širšího povědomí i mitochondriální hypotéza AD (Hardy a Higgins, 1992; Mohandas et al., 2009; Swerdlow et al., 2010). Z dalších hypotéz jsou debatované tyto: hypotéza oxidativního stresu (Markesbery, 1997), hypotéza zánětu (Zotova et al., 2010), vaskulární hypotéza (de la Torre, 2010), cholesterolová hypotéza (Wood et al., 2014), hypotéza vycházející z předpokladu, že neuropatogenní efekt A β u AD souvisí s interakcemi mezi A β a některými kovy (železo, měď, zinek) (Bush a Tanzi, 2008) a hypotéza, která

předpokládá, že významným neuropatologickým prvkem AD jsou abnormality buněčného cyklu neuronů (Neve a McPhie, 2006).



Obr. 1 Hypotézy diskutované v souvislosti s AD (Modifikováno dle: Hroudová *et al.*, 2016)

2.2. Mitochondriální dysfunkce u AD

Na patofyziologii AD se podílí mitochondriální dysfunkce, která byla pozorována v krevních buňkách, fibroblastech a neuronech pacientů s AD (Bosetti *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 1998). Na molekulární úrovni je narušen energetický metabolismus, kdy poškozená funkce mitochondriálních enzymů byla pozorována zejména u COX (cytochrom *c* oxidáza, komplex IV), ale také u dalších komplexů ETC (Chandrasekaran *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1994). Inhibice komplexu I může být částečně vysvětlena interakcí ND3 (mitochondriálně kódovaná subjednotka komplexu I) a A β (Munguia *et al.*, 2006). Nedostatečnost COX byla původně popsána v trombocytech pacientů s AD (Parker *et al.*, 1990). Později byl u pacientů s AD potvrzen úbytek aktivity COX v mitochondriích izolovaných nejen z trombocytů ale i postmortem z motorické kůry a hippocampu (Bosetti *et al.*, 2002). U AD buněk byl rovněž zaznamenán pokles funkce různých mitochondriálních proteinů, včetně enzymů cyklu trikarboxylových kyselin (TCA; citrátový cyklus, Krebsův cyklus) a komplexů elektronového transportního řetězce (ETC) (Bosetti *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2004; Chaturvedi a Flint

Beal, 2013; Gibson et al., 1998; Karbowski a Neutzner, 2012). Současně svou roli v patofyziologii mitochondriálních dysfunkcí hraje také jak zvýšená produkce ROS (reaktivních forem kyslíku), tak narušená antioxidační ochrana (Maes et al., 2012; Starkov, 2008).

K mitochondriálním dysfunkcím souvisejícím s patofyziologií AD můžeme zařadit defekty v systému oxidativní fosforylace (OXPHOS), zvýšení delecí, mutací nebo polymorfismů mtDNA (mitochondriální DNA), poškození kalciové signalizace, poškození energetického metabolismu stejně tak jako interakce se specifickými proteiny (např. A β , tau protein, α -synuklein) (Hroudová et al., 2014). Mitochondriální dysfunkce indukovaná A β přispívá k poškození energetického metabolismu, defektům v aktivitě/funkcích klíčových enzymů ETC, akumulaci/zvýšené produkci ROS, změnám v mitochondriální biogenezi a dynamice. Mitochondrie mají účinný antioxidační systém proti ROS a veškerým poruchám v mitochondriálním metabolismu přispívajícím ke zvýšené produkci ROS. Není nutno příliš zdůrazňovat, že ROS ve své podstatě přispívají k neurodegeneraci. Navzdory rozsáhlému výzkumnému úsilí o pochopení patofyziologie neurologických onemocnění v souvislosti s mitochondriální dysfunkcí, není dodnes přesný mechanismus známý (Hroudová et al., 2016).

Současně používané biomarkery AD (A β , tau protein a fosforylovaný tau protein) souvisejí s mitochondriální dysfunkcí (Chaturvedi a Flint Beal, 2013; Cummings, 2011; Kristofikova et al., 2013). A β , tau protein a fosforylovaný tau protein hrají mimo jiné roli při patologické tvorbě ROS (Alavi Naini a Soussi-Yanicostas, 2015; Butterfield a Sultana, 2011) a při poruchách ETC (Fukui a Moraes, 2008).

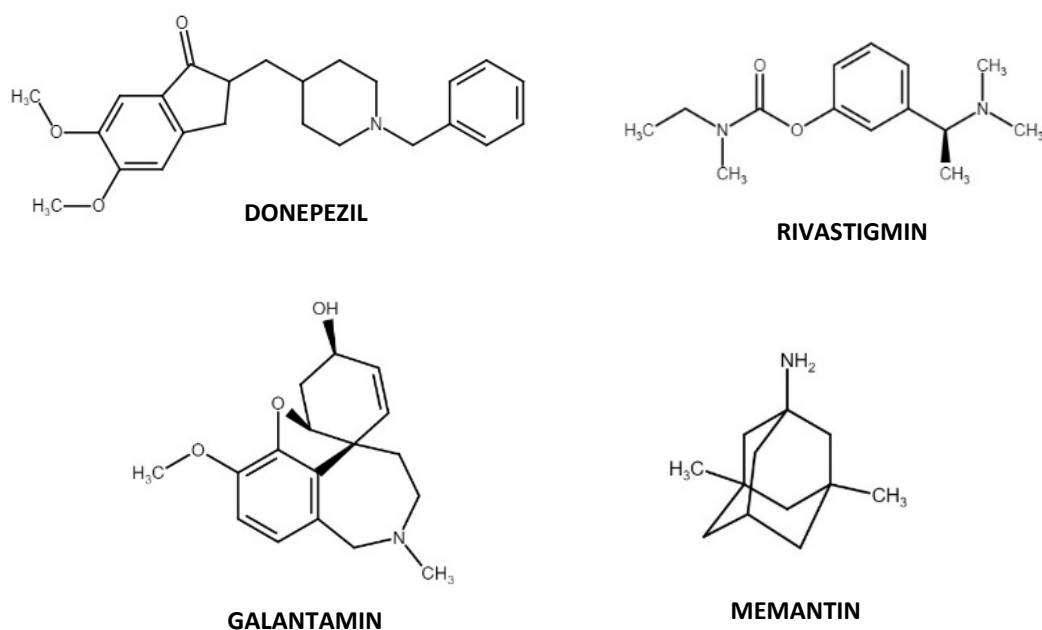
Poškození mitochondriálního metabolismu, zejména ETC a stejně tak zvýšený oxidativní stres, mohou hrát významnou roli v patogenezi AD. Některé účinky látek používaných pro symptomatickou terapii AD mohou souviset s jejich přímým působením na mitochondriální funkce (Singh et al., 2017).

2.3. Léčiva k terapii AD a jejich účinky

Možnosti současné terapie AD jsou omezené a jsou založené na podávání inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE) (donepezil, rivastigmin, galantamin) a/nebo antagonisty NMDA receptorů (memantin) (viz Obr. 2.). V terapii kognitivních poruch a demence u seniorů jsou také využívána nootropika, jako je piracetam, i když jejich účinek nebyl

podle EBM (evidence based medicine) prokázán (Hroudova et al., 2016; Zemek et al., 2014).

Donepezil, rivastigmin a galantamin pozitivně ovlivňují centrální cholinergní transmissi. Inhibicí AChE snižují degradaci acetylcholinu (ACh) a tím zvyšují jak koncentraci, tak i jeho setrvávání v nervových synapsích (Nieoullon, 2010). Ukázalo se, že tyto tři látky zároveň vykazují určité neuroprotektivní vlastnosti, u kterých mechanismus účinku pravděpodobně nesouvisí s inhibicí AChE (Arias et al., 2005; Ye et al., 2015). Necholinergní alternativou k inhibitorům AChE je v terapii AD memantin, který působí na glutamátové NMDA receptory. Memantin je středně afinitním nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů, brání jejich nadměrné aktivitě, aniž by narušil jejich normální fyziologickou aktivitu (Lipton, 2004, 2005)



Obr. 2 Chemická struktura léčiv schválených pro terapii AD. Vytvořeno v <https://chem-space.com/>

Donepezil je nekompetitivní a reverzibilní inhibitor ACh. Zmírňuje mitochondriální dysfunkce navozené kyselinou okadaovou, konkrétně zvýšenou hladinu vápníku v mitochondriích (zvýšení hladiny Ca následně vede k narušení ETC, nadprodukcí ROS) a změny $\Delta\psi_m$; tyto účinky donepezilu byly pozorovány v mitochondriích izolovaných z mozků potkanů (Kamat et al., 2011). Neuroprotektivní efekt inhibitorů AChE byl

pozorován také v neuroblastech SH-SY5Y vystaveným vlivu kyseliny okadaové nebo A β ₂₅₋₃₅ (Arias et al., 2005). Vedle toho byl pozorován účinek donepezilu proti glutamátom navozené neurotoxicitě na primárních kulturách získaných z mozkové kůry potkanů; preinkubace kortikálních neuronů s donepezilem zabránila glutamátom indukované apoptóze následkem které dochází k apoptóze navozené smrti neuronů (Takada et al., 2003).

Bylo zjištěno, že donepezil způsobuje snížení $\Delta\psi_m$, zvýšené uvolňování cytochromu *c* (cyt *c*) do cytosolu a změny v expresi proapoptotických proteinů ze skupiny Bcl-2 (Ki et al., 2010). Donepezil vykazoval schopnost navození apoptózy v leukemických buňkách HL-60 prostřednictvím mitochondriemi zprostředkované kaspáza-dependentní dráhy (Ki et al., 2010). Po podání donepezilu byla po 24 hodinách pozorována výrazná depolarizace mitochondriální membrány, která se ještě značně zvýšila po 48 hodinách. Studie ukázala, že donepezil navozuje aktivaci kaspázy-9 jako důsledek sníženého $\Delta\psi_m$. Pokles $\Delta\psi_m$ zpravidla souvisí s formováním mitochondriálních pórů přechodné propustnosti (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) a difuzí cyt *c* do cytosolu. V buňkách HL-60 donepezil zvyšoval hodnoty cytosolického cyt *c*, což svědčí o zapojení mitochondrií do apoptózy indukované donepezilem. Toto zjištění ukazuje na to, že donepezil mění hladiny proteinů ze skupin Bid, Bax, Bcl-2 a Bcl-xl. Následkem je snížení $\Delta\psi_m$ a uvolnění cyt *c* z mitochondrií (Ki et al., 2010).

Rivastigmin je nekompetitivní pseudoireverzibilní inhibitor AChE (Ellis, 2005; Jann, 2000), který navíc inhibuje také butyrylcholinesterázu (BuChE). Jako duální inhibitor může rivastigmin poskytnout trvalejší působení než selektivní AChE inhibitor a zpomalit vznik amyloidogenních proteinů (Ballard, 2002). Bylo zjištěno, že dlouhodobé podávání rivastigminu snižuje odbourávání ACh snížením aktivity AChE v cerebrospinální tekutině pacientů s AD (Amici et al., 2001; Hellstrom-Lindahl et al., 2000; Parnetti et al., 2002). Biochemické studie ukazují, že selektivita inhibice AChE rivastigminem je v CNS větší než na periférii (Jann, 2000; Polinsky, 1998). Z tohoto důvodu může být u pacientů s AD, u kterých se stav zhoršuje po podání selektivního inhibitoru AChE anebo netolerují terapii donepezilem, prospěšná změna stávající terapie na rivastigmin (Auriacombe et al., 2002; Bartorelli et al., 2005).

Během procesu degenerace primárních potkaních neuronů rivastigmin snižoval sekreci A β a zvyšoval sekreci sAPP α (sekretovaný α -prekurzor amyloidu) štepeného α -

sekretázou. Zvýšená hladina sAPP α štěpeného α -sekretázou může zasahovat do metabolické aktivity buňky a podporovat přežití neuronů (Bailey et al., 2011)

Rivastigmin vykazuje výrazný účinek na lymfocytární mitochondrie. U pacientů s AD, kterým byl podán rivastigmin, byla pozorována vyšší oxidativní a enzymatická aktivita v porovnání se skupinou pacientů s AD, které rivastigmin podáván nebyl a kontrolní skupinou bez diagnózy AD (které také rivastigmin podáván nebyl). Statistický významný rozdíl byl pozorován pro oxidaci pyruvátu-malátu (substrát komplexu I) a glycerol-3-fosfátu (substrát komplexu III), a pro enzymatické aktivity komplexu II, III a IV. Rivastigmin zvyšuje schopnost mitochondrií oxidovat substráty komplexů I a III (zvyšuje respirační kapacitu) a podporuje enzymatickou aktivitu komplexů ETC (komplexu II, III a IV) (Casademont et al., 2003). Mechanismus, kterým rivastigmin stimuluje ETC, není zatím znám.

Galantamin má duální účinek; působí jako kompetitivní reversibilní inhibitor AChE a jako alosterický modulátor nikotinového receptoru zároveň potencuje účinek ACh (Rogawski, 2004). Tato alosterická modulace nikotinového receptoru pro ACh může být určitým terapeutickým benefitem pro léčbu AD (Maelicke, 2000). *In vitro* studie na buňkách PC12 prokázaly, že galantamin dokáže buňky ochránit před A β -indukovanou apoptózou. Dokázal zabránit agregaci A β , morfologickým změnám endoplazmatického retikula a mitochondrií, včetně poklesu $\Delta\psi_m$ a akumulaci ROS (Liu et al., 2010). Při koncentracích nižších než 100 μ M galantamin v lidských buňkách HePG nepůsobil cytotoxicky, neovlivňoval markery oxidativního stresu (tj. nezvyšoval produkci malondialdehydu a nesnižoval hladiny glutathionu) a nezvyšoval ani vlastní produkci ROS (Ezoulin et al., 2005). Galantamin byl schopen výrazně obnovit aktivitu komplexu I a II u myší, u nichž byla vyvolána neurodegenerace intrahippokampálním podáním kyseliny kainové (Kumar et al., 2011).

Memantin je necholinergní alternativou k inhibitorům AChE, působí jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, ke kterým má nízkou afinitu. Byl schválen pro léčbu mírných až těžkých forem AD. Memantin byl schopen v *in vitro* podmínkách zabránit neurotoxicitě indukované berberinem (ta se projevuje zvýšeným průnikem vody do mitochondrií, zvýšením oxidativního stresu a poklesem $\Delta\psi_m$) (Kysenius et al., 2014). Memantin v *in vitro* podmínkách zabraňoval nezvratným elektrofyziologickým změnám vyvolaným inhibitorem komplexu II, 3-nitropropionovou kyselinou, avšak na toxické

změny vyvolané inhibitorem komplexu I, rotenonem, neměl žádný vliv (Tozzi et al., 2007). Memantin rovněž prokázal neuroprotektivní vlastnosti; měl schopnost zabránit neurodegeneraci indukované A β a zesílit utilizaci glukózy v mozku (Rogawski, 2004). Memantin příznivě ovlivňuje mitochondriální dysfunkce a sníženou hladinu vápníku v mitochondriích. Dále vykazuje schopnost zvrátit nepříznivé změny $\Delta\psi_m$ a snížit produkci ROS navozenou působením kyseliny okadaové v mitochondriích mozku potkanů. Pro porovnání je nutno zmínit, že donepezil neměl za těchto podmínek vliv na tvorbu ROS (Kamat et al., 2011). Účinky memantinu byly zkoumány na úrovni gliových buněk, neuropeptidů a enzymů degradujících peptidy na zvířecím AD modelu, kde byly určité oblasti potkaního mozku vystaveny vlivu kyseliny ibotenové. Tato kyselina je silným neurotoxinem. Díky své prostorové struktuře je alosterickým analogem glutamátu a chová se jako neselektivní agonista glutamátových receptorů. Při současném podání obou látek studie prokázala protektivní účinek memantinu související se změnami neuropeptidů, neuronů a gliových buněk. Aktivace gliových buněk pravděpodobně hraje významnou roli v patofyziologii AD a koreluje se změnami hodnot neuropeptidů v mozku postiženém AD. Tyto nežádoucí změny v hodnotách neuropeptidů byly obnoveny podáváním memantinu (Ahmed et al., 2004). Cílem studie, kterou provedl Arif et al. (2009), byl výzkum protektivního vlivu memantinu na změny neuropeptidů vyvolané A β_{25-35} v peptidergických a gliových buňkách (Arif et al., 2009). Memantin potlačoval aktivaci glutamátu blokadou NMDA receptorů, což vedlo ke snížené aktivaci gliového systému. Tato snížená aktivita gliového systému potlačila gliemi zprostředkované změny neuropeptidů a jejich degradačních enzymů. Studie tedy poukazuje na určitou roli gliových a peptidergických buněk v patofyziologii AD. Miguel-Hidalgo et al. (2002) prokázali protektivní vliv terapeutických koncentrací ($2,35 \pm 0,23 \mu\text{M}$) memantinu na proces neurodegenerace vyvolané vlivem A β .

Současná léčba AD je tedy omezena na symptomatické podávání inhibitorů cholinesteráz a/nebo necholinergní alternativy memantinu. Probíhá intenzivní výzkum ve snaze najít nové molekuly, které by se mohly stát slibnými kandidáty pro terapii AD. Strategie nově vyvíjených léčiv se různí a vychází ze stávajících hypotéz AD (Hroudová, 2017).

2.4. Vliv inhibitorů AChE a memantinu na mitochondriální funkce

Účinky některých léčiv používaných v symptomatické terapii AD souvisí s jejich přímým vlivem na mitochondriální funkce. V *in vitro* studiích, prováděných na mitochondriích získaných z mozků prasat, byly zkoumány účinky farmakologicky odlišných kognitiv (galantamin, donepezil, rivastigmin, 7-methoxytakrinu /7-MEOTA/, memantin) a nootropik (latrepirdin, piracetam) (Singh et al., 2017). Byl studován vliv na aktivitu komplexů ETC (komplex I, II + III, IV), citrátsyntázy, monoaminoxidázy (MAO), na spotřebu kyslíku a produkci peroxidu vodíku. Aktivita komplexu I byla snížena po inkubaci s galantaminem, donepezilem a memantinem; aktivita komplexu II + III byla působením galantaminu zvýšena. Žádné testované léčivo nevyvolalo ani ve vyšších koncentracích (100 $\mu\text{mol/L}$, piracetam až 10 mmol/L) významné změny ve spotřebě kyslíku. Všechny zkoumané látky inhibovaly aktivitu MAO-A. Jako nejsilnější inhibitory MAO-A ze skupiny výše zkoumaných léčiv byly shledány donepezil, 7-MEOTA a latrepirdin. Žádné z testovaných léčiv nijak zásadně nezasahovalo do sukcinátem indukované produkce mitochondriálního peroxidu vodíku. Přímý účinek kognitiv a nootropik užívaných v terapii AD na mitochondriální respiraci je relativně malý. Jako nejbezpečnější léčiva z hlediska narušení mitochondriálních funkcí se jeví piracetam a rivastigmin. Inhibice MAO-A kognitiv a nootropiky může být součástí mitochondriální neuroprotektce. Tyto výsledky jsou odrazovým můstkem pro budoucí výzkum, který bude mít za cíl kvantifikaci účinků současně používaných léčiv a/nebo nově syntetizovaných látek na mitochondriální funkce v závislosti na jejich mechanismu účinku (Singh et al., 2017)

3. Teoretická část

Současná léčba AD je omezena pouze na symptomatické podávání inhibitorů ChE a/nebo necholinergní alternativy memantinu. Probíhá intenzivní výzkum ve snaze najít nové molekuly, které by se mohly stát slibnými kandidáty pro terapii AD. Strategie nově vyvíjených léčiv se různí, vychází ze stávajících znalostí AD. Současný vývoj nových léčiv pro terapii AD je orientován na různé patofyziologické procesy AD: ovlivnění cholinergního deficitu, tvorbu a eliminaci patologických proteinů A β a hyperfosforylovaného tau proteinu, zánětlivé procesy, nedostatek neurotrofních faktorů, mitochondriální dysfunkci, inzulinovou rezistenci a další patofyziologické procesy AD (Hroudová, 2017). Uvádět zde mechanismy všech nově vyvíjených látek (skupin látek) pro terapii AD by bylo velmi obsáhlé, proto jsem se níže zaměřila pouze na ty skupiny nově vyvíjených látek, které bezprostředně ovlivňují mitochondriální funkce.

3.1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou buněčné organely složené z vnější a vnitřní membrány, mezimembránového prostoru a intracelulární matrix. Vnější membrána kryje a formuje samotnou organelu, vnitřní membrána je zvlněná a tvoří tzv. krysty. V mitochondriálním matrix je lokalizován TCA cyklus. Hlavní funkcí TCA cyklu je oxidace acetyl-CoA získaného z metabolismu cukrů, aminokyselin a mastných kyselin. TCA cyklus je uspořádaný jako supramolekulární komplex, který umožňuje interakce s mitochondriální membránou a elektronovým transportním řetězcem (ETC) během oxidativní fosforylace (OXPHOS) (Velot a Srere, 2000).

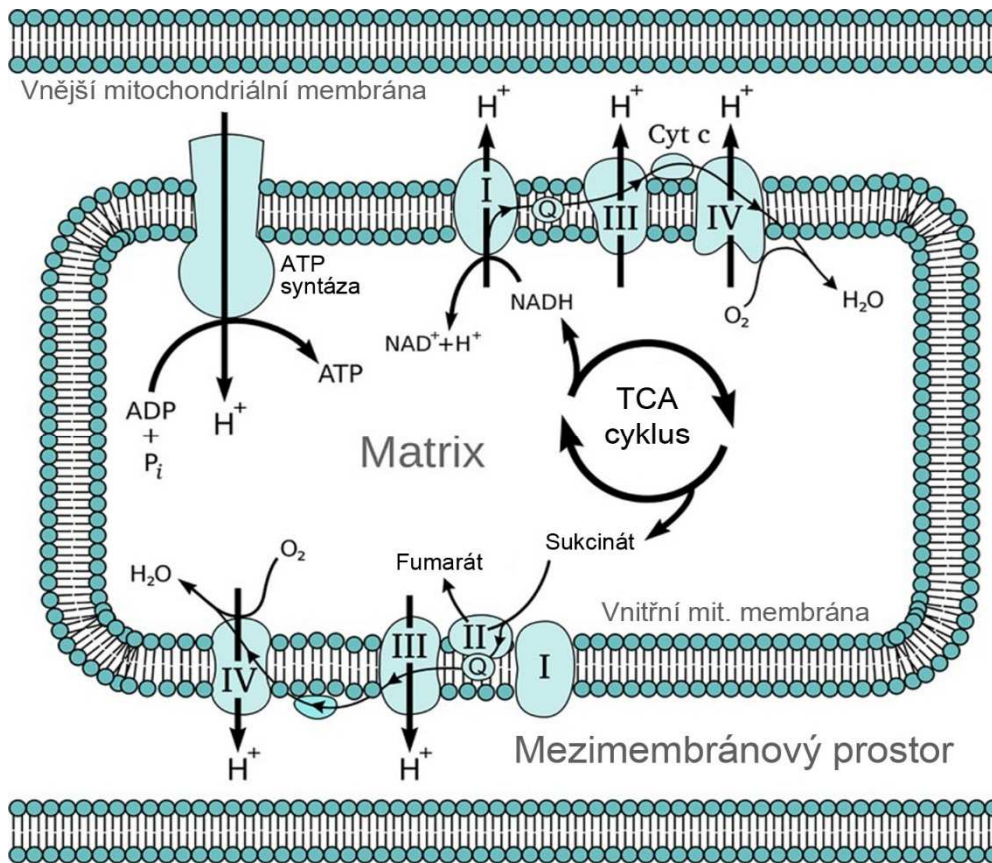
Klíčovou rolí mitochondrií je produkce adenosin-5'-trifosfátu (ATP), kromě této funkce jsou zapojeny do dalších důležitých procesů jako např. regulace tvorby reaktivních forem kyslíku a dusíku, neurotransmiterů, homeostázy buněčného vápníku a spouštění apoptózy. Mitochondrie jsou rovněž důležité pro vývoj neuronů a synaptogenezi.. Poškozená funkce mitochondrií vede k poškození bioenergetiky, poklesu produkce ATP, narušení vápníkové homeostázy, zvýšené produkci zmíněných reaktivních forem kyslíku a dusíku, a tím ke zvýšení oxidačního stresu (Hroudova a Fisar, 2010, 2011).

3.1.1. Fyziologie oxidativní fosforylace

Dýchací řetězec je lokalizovaný v kristách, strukturách tvořených vnitřní mitochondriální membránou (viz Obr. 3). ETC se skládá z komplexů se supramolekulární strukturou, kde mitochondriální protonové pumpy (komplexy I, III a IV) transportují protony a vytváří protonový gradient (Bunoust et al., 2005; Kadenbach et al., 2010). Do komplexu III jsou elektrony transportovány nepřetržitě, komplex IV umožňuje redukci O_2 na H_2O . Většina ATP syntetizována ATP syntázou (komplex V) pochází z elektrochemického gradientu mezi mitochondriálními kompartmenty oddělenými vnitřní mitochondriální membránou. Kofaktor koenzym Q_{10} (ubiquinon; CoQ) je zodpovědný za přenos elektronů z komplexu I a II do komplexu III; druhým důležitým kofaktorem je cyt *c*, který přenáší elektrony z komplexu III do komplexu IV (Solmaz a Hunte, 2008). Oba kofaktory modulují energii a produkci ROS (Mattson et al., 2008; Rodriguez-Hernandez et al., 2009).

Energie uložena v ATP je využita pro udržení iontové homeostázy v synapsích a pro fosforylační reakce. ATP je nezbytný pro excitabilitu a přežití neuronů, OXPHOS je zapojená do synaptické signalizace a souvisí se změnami neuronální struktury a funkce. Presynaptická nervová zakončení (synaptozomy) potřebují ATP pro exocytózu a regeneraci neurotransmiterů a pro udržení iontové homeostázy, z tohoto důvodu je v těchto místech mitochondrií více než v jiných částech buňky (Choi et al., 2009).

Enzymy TCA cyklu, oxidativní fosforylace a MAO jsou klíčovými enzymy pro výzkum v molekulární psychiatrii.



Obr. 3 Mitochondrie - oxidativní fosforylace (Modifikováno dle: Jackson *et al.*, 2018)

3.1.2. Regulace oxidativní fosforylace

Regulace systému OXPHOS se odehrává se na pěti úrovních: 1. přímá modulace kinetických parametrů ETC (prostřednictvím exprese pomalých nebo rychlých izoform komplexu IV, biochemickou modulací katalytické aktivity komplexu IV, posttranslační modifikace komplexů ETC a další), 2. regulace vnitřní efektivity OXPHOS (změnami v protonové vodivosti, v poměru fosfátu ke kyslíku (P/O) nebo v dostupnosti substrátů pro jednotlivé komponenty ETC), 3. dynamika mitochondriálního systému (fúze, dělení, pohyblivost, složení membránových lipidů, průnik vody), 4. mitochondriální biogeneze a degradace, 5. vnitřní prostředí buněk a mitochondrií (Benard *et al.*, 2010).

Efektivita OXPHOS je závislá na dodávce redukčních ekvivalentů do ETC a na aktivitě zúčastněných enzymových komplexů. Optimální efektivita a průtokové poměry jsou závislé na regulaci komplexu I (odráží integritu buněčné dráhy) a komplexu II (kterému předchází TCA cyklus) (Cairns *et al.*, 1998). Vyčerpání

meziproduktů TCA cyklu hraje velmi významnou roli v regulaci toku OXPHOS. Během zkoušek respirometrie je nutná dodávka substrátů jak pro komplex I, tak i pro komplex II. Pro dosažení maximální hodnoty respirace je nutný konvergentní vstup elektronů a rekonstituce TCA cyklu (Gnaiger, 2009). Regulačním faktorem je také dostupnost adenosin-5'-difosfátu (ADP) pro adenin nukleotidový transportér ve vnitřní mitochondriální membráně (Ramzan et al., 2010).

Předpokládá se, že komplex I je zodpovědný za adaptivní změny a fyziologické nastavení efektivity OXPHOS (Cocco et al., 2009). Stechiometrická účinnost OXPHOS je definována poměrem P/O nebo množstvím anorganického fosfátu (P_i) zabudovaného do ATP na množství spotřebovaného kyslíku. Poměr P/O byl analyzován u potkanů v mozkových, jaterních a srdečních mitochondriích. U komplexu I byly nalezeny tkáňově specifické rozdíly a závislost na poměru P/O na respiračních hodnotách, avšak u komplexu II nikoliv (Cocco et al., 2009). Telford *et al.* (2009) provedl analýzu metabolické regulace, která porovnávala aktivitu ETC a hodnotu spotřeby kyslíku a na základě výsledků zhodnotila roli komplexu I v mozkových synaptosomech potkanů. Výsledky studie svědčí o tom, že komplex I je rychlost limitující krok pro spotřebu kyslíku a je zodpovědný za vysoký stupeň kontroly nad mitochondriální bioenergetikou (Telford et al., 2009).

Jak je uvedeno výše, transmembránový potenciál vnitřní mitochondriální membrány je pro OXPHOS klíčový. Protony jsou transportovány navenek a vytváří protonovou hnací sílu (Δp), která sestává z podílu elektrického $\Delta\psi_m$ (negativní uvnitř) a z podílu chemického ΔpH (Mitchell, 1961, 1966). V mitochondriích je Δp tvořena hlavně $\Delta\psi_m$. $\Delta\psi_m$ reguluje schopnost mitochondrií tvořit ATP a ROS; a sekvestraci Ca^{2+} vstupujícího do buněk. $\Delta\psi_m$ a syntéza ATP spolu navzájem souvisí; optimální syntéza ATP vyžaduje hodnoty v rozmezí mezi -100 mV a -150 mV. Tyto hodnoty jsou primárně dosahovány pomocí $\Delta\psi_m$, který se drží na vyšších hodnotách (kolem -200 mV) a sekundárně jsou regulovány mechanismy, které snižují $\Delta\psi_m$ na nižší hodnoty (Kadenbach, 2003). Změny $\Delta\psi_m$ ovlivňují permeabilitu mitochondriálních membrán a produkci ROS, $\Delta\psi_m$ pod -150 mV vede k exponenciálně zvýšené permeabilitě stejně tak jako k produkci $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Kadenbach et al., 2010). Podobným způsobem mitochondriální membrány exponenciálně zvyšují svou permeabilitu pro protony (Kadenbach, 2003). Z tohoto důvodu je $\Delta\psi_m$ striktně kontrolován a může být regulován různými parametry.

Regulace OXPHOS je složitý proces, kde jednotlivé úrovně a mechanismy regulace nejsou zcela přesně známy. Důležitou roli zde hraje vápník a zejména jeho hladina v mitochondriích. Dříve se předpokládalo, že transport Ca^{2+} přes mitochondriální membránu měl význam pouze pro udržení optimální hladiny cytosolického Ca^{2+} , kdy v případě přesycení Ca^{2+} dochází k jeho přestupu přes mitochondriální membránu z cytoplazmy směrem do mitochondrií. V případě, kdy v cytoplazmě došlo k přesycení Ca^{2+} , akumuloval se vápník také v mitochondriích a spotřebovával $\Delta\psi_m$ (McCormack et al., 1990; Nicholls et al., 2003; Rizzuto et al., 2000). V současné době se má za to, že Ca^{2+} za pomoci fosforylace reguluje aktivitu dehydrogenáz; syntéza ATP je spuštěna cAMP-dependentní fosforylací a ukončena vápníkem indukovanou defosforylací (Lee et al., 2001; Ludwig et al., 2001).

V TCA cyklu jsou hladinami Ca^{2+} ovlivněny enzymy glycerolfosfátdehydrogenáza, pyruvátdehydrogenáza, isocitrátdehydrogenáza a α -ketoglutarátdehydrogenáza, kde jejich fosforylace vede ke zvýšené produkci ATP, k produkci glykogenu a k oxidaci glukózy (Rizzuto et al., 2000). Reverzibilní fosforylace pyruvátdehydrogenázového komplexu zprostředkovaná vápníkem částečně reguluje dodávku redukčních ekvivalentů (poměr NADH/NAD^+). Aktivace TCA cyklu zvýší produkci NADH (nikotinamidadenin dinukleotid) a to vede k aktivaci přestupu elektronů od komplexu I až do komplexu IV (Viola a Hool, 2010).

Byla také pozorována regulace komplexu I a podjednotek COX prostřednictvím specifických proteinkináz a proteinfosfátáz. cAMP-dependentní proteinkináza katalyzovala fosforylací podjednotky komplexu I (Papa et al., 2002). Při nízkých hladinách Ca^{2+} protein fosfatáza defosforyluje a inaktivuje komplex I. Předpokládá se, že COX je při vysokém podílu ATP/ADP regulována prostřednictvím alosterické inhibice ATP (Kadenbach et al., 2010). Extramitochondriální poměr ATP/ADP reguluje aktivitu COX tak, že při vysokém poměru ATP/ADP se navázané ADP na cytosolickou subjednotku COX vymění s ATP, a to způsobí alosterickou inhibici (Napiwotzki a Kadenbach, 1998). Stejně tak se má za to, že zvýšená intracelulární hladina Ca^{2+} aktivuje mitochondriální fosfatázu, která defosforyluje COX a zruší alosterickou inhibici (Lee et al., 2002). Při fyziologických podmínkách je alosterická inhibice modulována zvýšenou hladinou Ca^{2+} , vysokou koncentrací substrátu a thyroïdních hormonů. Ca^{2+} -dependentní defosforylace indukovaná hormony má za následek ztrátu kontroly respirace pomocí poměru ATP/ADP , dochází ke zvýšení Δp ,

poklesu čerpání protonů, ke zvýšení hodnoty respirace a ATP-syntézy za současného snížení efektivity energetické transdukce (Bender a Kadenbach, 2000).

Thyroidní hormony, zejména trijodthyronin (T3) a diiodthyronin (T2), mají významný vliv na mitochondriální energetický systém a na mitochondriální genom (Cheng et al., 2010). Mechanismus alosterické inhibice COX je úzce spojený s regulací prostřednictvím thyroidálních hormonů. T2 je zodpovědný za krátkodobý účinek thyroidních hormonů a bezprostředně zvyšuje bazální metabolismus. T2 vzniká intracelulární deiodací T3 a váže se na specifická T2 vazebná místa, která byla identifikována na vnitřní mitochondriální membráně (Goglia et al., 1999). Tato vazba na podjednotku COX zruší alosterickou inhibici respirace prostřednictvím ATP (Arnold et al., 1998), to má za následek částečné oslabení OXPHOS zvýšením $\Delta\psi_m$, a následně dochází k narušení vnitřního systému COX (Kadenbach, 2003). Tímto způsobem thyroidní hormony zvyšují permeabilitu pro protony; v potkaních hepatocytech bylo pozorováno, že hypertyreóza podněcuje průnik protonů a obrát ATP, přičemž nemitochondriální spotřeba kyslíku zůstala nezměněna (Harper a Brand, 1994; Starkov, 1997). Na druhou stranu, v potkaních hypothyroidních buňkách byl pozorován významný pokles průniku protonů a nemitochondriální spotřeby kyslíku, zatímco obrát ATP nebyl nijak ovlivněn (Harper a Brand, 1993).

3.1.3. *Respirometrie s vysokým rozlišením*

Princip respirometrie v uzavřené komoře je založen na změnách koncentrace kyslíku, kdy počáteční koncentrace je obvykle 21%. Postupně měřený vzorek spotřebovává kyslík a jeho koncentrace se snižuje. V současné době je používanou metodou respirometrie s vysokým rozlišením (high-resolution respirometry). Tato metoda dokáže detekovat i malé změny v buněčné respiraci navozené účinkem substrátů, inhibitorů a rozpojovacích proteinů. I tyto drobné změny mohou ukazovat na významné mitochondriální defekty způsobené poškozením mitochondriálních proteinů nebo membrán, na defekty mtDNA anebo na poruchy mitochondriálních signalizačních kaskád. Tento nový standard měření mitochondriální a buněčné respirace je prováděn na Oroboros Oxygraphu. Měření je založeno na vysoce citlivých elektrodách, inovativní integrované konstrukci měřicího přístroje, minimalizaci difúze kyslíku do okolí a pokročilém softwaru, který umožňuje zaznamenávání spotřeby kyslíku v čase (Gnaiger et al., 1995; Hutter et al., 2006).

3.1.4. *Specifické inhibitory ETC*

Specifickým inhibitorem komplexu I je rotenon, komplexu II thenoyltrifluoroaceton. Obě látky indukují produkci $O_2^{\bullet-}$ která může vést k masivní tvorbě ROS (Chen et al., 2007; Foster et al., 2006; Turrens, 2003). Pyrrolnitril inhibuje jak komplex I, tak i komplex II. Zasahuje do transportu elektronů mezi NADH, CoQ a sukcinátem, přičemž na COX nemá žádný vliv (Wong et al., 1971).

Inhibitory komplexu III – antimycin, myxothiazol a stigmatellin, se mezi sebou liší svým mechanismem účinku. Antimycin A inhibuje transfer elektronů z cytochromu *b* na CoQ, blokuje Q_i místo komplexu III. Naopak myxothiazol a stigmatellin blokuje transfer elektronů z redukovaného CoQ v místě Q_o (Viola a Hool, 2010). Stigmatellin inhibuje přenos elektronů a obnovu CoQ; myxothiazol inhibuje přenos elektronů z redukovaného CoQ na cyt *c* (Raha et al., 2000).

Inhibitory komplexu IV – KCN a azid sodný (NaN_3) snižují aktivitu COX (Ferguson et al., 2005). Azid specificky blokuje přechod mezi cytochromem *a* a cytochromem a_3 (Wilson a Chance, 1967). Inhibice COX prostřednictvím KCN je reverzibilní, kyanid inhibuje na COX jak transport elektronů, tak i protonů (Nuskova, et al., 2010)

Oligomycin je inhibitorem komplexu V. Blokuje kanál pro průchod protonů (podjednotka F_o). Tento inhibitor zvyšuje $\Delta\psi_m$ a používá se jako inhibitor respirační fáze 3. Uměle vyvolá fázi 4, to znamená fázi respirace nezávislou na ADP fosforylaci nebo klidovou fázi (LEAK) (Sjovall et al., 2010).

Během oxidace substrátů komplexu I (pyruvátu, malátu, glutamátu) inhibice rotenonem nezvyšuje H_2O_2 ; oproti tomu oxidace substrátu komplexů I a II v přítomnosti antimycinu A H_2O_2 zvyšuje. Jak myxothiazol, tak stigmatellin inhibují produkci $O_2^{\bullet-}$ a předpokládá se, že zároveň inhibují efekt antimycinu (Konstantinov et al., 1987; Raha et al., 2000). Při dlouhodobém podávání rotenonu byla v lidských kožních fibroblastech pozorována maximální produkce $O_2^{\bullet-}$, avšak při podávání antimycinu nikoliv (Koopman et al., 2010). Je zajímavé, že rotenon zabránil antimycinu A indukovat produkci ROS u komplexu I, nikoliv však u komplexu II (Q. Chen et al., 2003). Oblast Q_o komplexu III byla po krátkodobé expozici H_2O_2 sledována jako zdroj zvýšeného $O_2^{\bullet-}$ (Viola a Hool, 2010). KCN a azid sodný zvyšují tvorbu ROS

(Ferguson et al., 2005). Oligomycin indukuje hyperpolarizaci vnitřní mitochondriální membrány a může zvýšit hladiny $O_2^{\cdot -}$ (Kirkland a Franklin, 2007).

3.2. Sledované mitochondriální enzymy

Komplex I (EC 1.6.5.3, NADH: ubichinon oxidoreduktáza, NADH dehydrogenáza) je zásadním bodem respirace. Katalyzuje oxidaci redukovaného NADH a tím regeneruje NAD^+ pro TCA cyklus a oxidaci mastných kyselin, a redukuje CoQ na ubichinol (Hirst, 2010). Ve stejném okamžiku, kdy elektrony přechází komplexem I, jsou pumpovány čtyři protony z matrix do mezimembránového prostoru. Komplex I je rovněž rychlost limitující enzym spotřeby kyslíku na synapsích (Telford et al., 2009).

Komplex II (EC 1.3.5.1, sukcinátdehydrogenáza, sukcinát: ubichinon oxidoreduktáza) je alternativním vstupem elektronů do ETC, a je zároveň i jedním z enzymů TCA cyklu. Je to lipoprotein skládající se ze čtyř podjednotek navázaný na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány. Spojuje oxidaci sukcinátu s redukcí CoQ (Tomitsuka et al., 2009). Komplex II se nepodílí na protonovém gradientu. Podjednotky komplexu II jsou kódovány pouze nDNA (jaderná DNA). Z tohoto důvodu se předpokládá, že komplex II normalizuje aktivitu ETC, pokud je zde riziko defektů v mtDNA (Saada et al., 2001).

Komplex III (EC 1.10.2.2, ubichinol:cytochrom *c* oxidoreduktáza, CoQ-cyt *c* reduktáza, cytochrom bc_1 komplex) je tvořen dvěma centry, Q_i centrum orientované do matrix; a Q_o centrum orientované do mezimembránového prostoru (Chen et al., 2003). Komplex III katalyzuje oxidaci jedné molekuly ubichinolu a redukcí dvou molekul cytochromu *c*. Mechanismus reakce komplexu III probíhá ve dvou krocích a nazývá se Q cyklus (Trumpower, 1990). Během Q cyklu jsou uvolněny do mezimembránového prostoru čtyři protony.

Komplex IV (EC 1.9.3.1, cytochrom *c* oxidáza, COX) umožňuje koncovou redukcí O_2 na H_2O , uchovává všechny částečně redukované meziprodukty až do té doby, než je redukce kompletní (Turrens, 2003). Komplex IV zprostředkovává pumpování 4 protonů skrz membránu. Dříve byl považován za endogenní metabolický marker neuronální aktivity (Wong-Riley, 1989).

Citrátsyntáza (EC 2.3.3.1) katalyzuje kondenzaci acetyl-CoA a oxalacetátu na citrát v TCA cyklu. Je to rychlost limitující enzym, řídí tok TCA cyklu a hraje rozhodující roli

v regulaci tvorby energie během mitochondriálního dýchání. Aktivita TCA cyklu je regulována fosforylačním potenciálem matrixu mitochondrií, poměrem NAD^+/NADH a deriváty mastných kyselin (Kispal et al., 1989). Používá se jako kvantitativní marker nepoškozených mitochondrií (Scaini et al., 2010).

3.3. Monoaminoxidáza

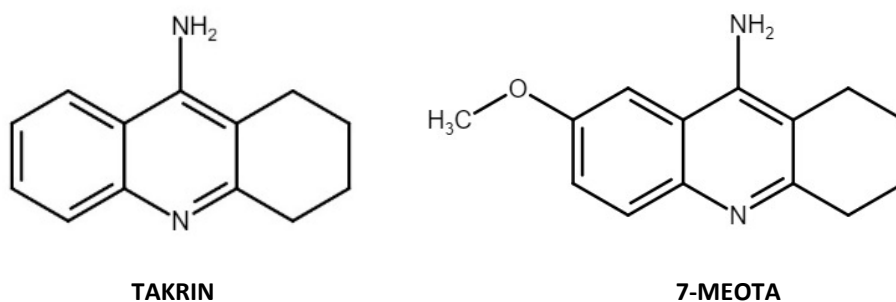
Monoaminoxidáza (EC 1.4.3.4. MAO) je lokalizována na vnější mitochondriální membráně a katalyzuje oxidativní deaminaci aminových neurotransmiterů stejně jako aminových xenobiotik. Řídí metabolickou degradaci katecholaminů a serotoninu (5-hydroxytryptamin, 5-HT) v nervových a jiných cílových strukturách. Hlavní fyziologickou úlohou intraneuronální MAO je udržení velmi nízkých koncentrací monoaminů v cytosolu. Tento enzym vázaný k membráně je flavoprotein, jeho kofaktorem je FAD (flavin adenin dinukleotid). Tento kofaktor byl identifikován jako místo, na které se ireverzibilně vážou kovalentní vazbou inhibitory MAO (Youdim a Bakhle, 2006; Youdim et al., 2006). Vyskytuje se ve dvou izoformách: MAO-A a MAO-B. Jednotlivé izoformy se liší preferencí k substrátům, specifitou k inhibitorům, distribucí v různých tkáních a buňkách a imunologickými vlastnostmi (Bach et al., 1988). MAO-A metabolizuje 5-HT a je citlivá na inhibici nízkými koncentracemi klogylinu, zatímco MAO-B upřednostňuje benzylamin nebo 2-fenylethylamin (PEA) a je citlivá na inhibici nízkými koncentracemi selegilinu. Tyramin, tryptamin, dopamin, norepinefrin a epinefrin jsou stejně dobře oxidovány oběma izoformami MAO. Obě izoformy se vyskytují ve velké míře v CNS; v serotoninergních neuronech a astrocytech je vyšší výskyt MAO-B, v katecholaminergních neuronech je vyšší výskyt MAO-A. (Youdim et al., 2006).

MAO má souvislost s neurodegenerací vlivem oxidačního stresu (vycházející ze zvýšené produkce peroxidu vodíku) (Naoi et al., 2006). Aktivita MAO v mozku pacientů s AD se zvyšuje (Cai, 2014; Sherif et al., 1992). Aktivovaná MAO hraje významnou roli v patogenezi AD. Zvyšuje expresi β -sekretázy a γ -sekretázy, a tím zvyšuje produkci A β APP, hraje roli při formování a akumulaci neurofibrilárních klubek a ve zhoršení kognitivních funkcí jako důsledek destrukce cholinergních neuronů a poruch cholinergního systému (Cai, 2014).

3.4. Nové inhibitory ChE v preklinických studiích

3.4.1. Deriváty takrinu

Prvním registrovaným reversibilním inhibitorem ChE byl takrin (viz Obr. 4). Je to nespecifický inhibitor ChE, jeho selektivita k AChE je slabá, a proto jeho použití v klinické praxi bylo komplikováno řadou nežádoucích účinků (hepatotoxicita, GIT dyskomfort). Z tohoto důvodu byl takrin stažen z trhu (Davis a Powchik, 1995). Jeho derivát, 7-MEOTA (viz Obr. 4), pravděpodobně díky jiné metabolizaci v organismu tyto vedlejší účinky nevykazoval. V současné době jsou vyvíjeny nové deriváty takrinu a 7-MEOTA, které mají zachovanou terapeutickou účinnost takrinu, ale jsou méně toxické (Soukup et al., 2013). Byly navrženy také hybridní molekuly takrinu: takrin-flavonoidy, takrin-kumariny, takrin-troloxové hybridy a deriváty takrin-propargylaminů. Tyto deriváty se jeví jako slibné multifunkční inhibitory ChE. Multifunkční charakter těchto nově syntetizovaných látek zahrnuje kromě cholinergní inhibice, také pozitivní účinek na nežádoucí agregaci A β , schopnost chelatovat kovy, schopnost reagovat na nežádoucí přesytení Ca²⁺, antioxidační a neuroprotektivní účinek a další (Korabecny et al., 2010a; Korabecny et al., 2010b). Je možné, že nově vyvíjené sloučeniny budou zasahovat více patologických mechanismů AD a mohly by být tedy více účinné.



Obr. 4 Takrin a 7-MEOTA; vytvořeno v <https://chem-space.com/>

3.5. Další nově vyvíjené látky k terapii AD

3.5.1. *Inhibitory MAO-B a jejich hybridní deriváty*

Selegilin a rasagilin jsou selektivní a ireversibilní inhibitory MAO-B, které se používají v terapii Parkinsonovy nemoci. Zvýšená exprese MAO-B může být důsledkem zvýšené hladiny ROS a tímto hrát určitou roli v etiologii AD (Hroudova et al., 2016).

Selegilin má antioxidační a neuroprotektivní vlastnosti, snižuje peroxidaci lipidů v prefrontální kůře, striatu a hipokampu a zvyšuje aktivitu glutathionperoxidázy. V důsledku těchto účinků došlo ke zpomalení neurodegenerativního procesu u starých potkanů (Kiray et al., 2006; Kitani et al., 2002). Jako duální inhibitory AChE a MAO byly popsány nové deriváty karbamátů ze skupiny aminoindanů (řada příbuzná rasagilinu) a fenylethylaminů (řada příbuzná selegilinu) (Sterling et al., 2002). Byly také navrženy nové sloučeniny sestávající z benzylpiperidinové části donepezilu a indolylpropargylaminové části inhibitoru MAO (Bolea et al., 2011).

Lu *et al.* (2013) provedl syntézu takrin-selegilin hybridních molekul, které byly vyhodnoceny jako inhibitory ChE (AChE/BuChE) a MAO-A/B. Výsledky ukázaly, že většina těchto molekul vykazuje vysokou inhibiční aktivitu k ChE a/nebo MAO. Jedna z těchto molekul vykazovala vyváženou aktivitu vůči všem zkoumaným enzymům: AChE, BuChE, MAO-A a MAO-B, navíc bylo prokázáno, že inhibice MAO-B touto látkou je ireversibilní. Výsledky tedy mohou ukazovat na to, že daná molekula má určitý potenciál stát se slibným multifunkčním kandidátem pro další výzkum (Lu et al., 2013).

V současné době probíhá výzkum dalších hybridních sloučenin. Cílem je najít takové sloučeniny, které vykazují optimální multifunkční účinek při nízkém riziku nežádoucích účinků a díky tomu se stát slibnými kandidáty pro léčbu AD.

3.5.2. *Látky interagující s mitochondriálními enzymy – ABAD modulátory, mPTP modulátory*

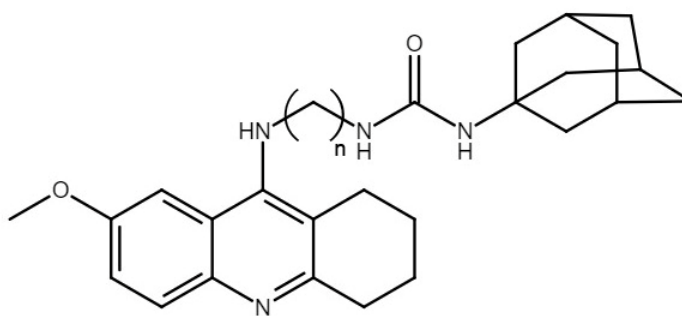
A β je s AD spojován již dlouho, zejména v souvislosti s tvorbou extracelulárních plaků, avšak v poslední době se ukazuje, že svou roli v patofyziologii AD hraje i intracelulární forma A β . V buňkách A β interaguje mimo jiné s mitochondriálními

proteiny ABAD (A β vázající alkoholdehydrogenáza) a cyklofilin D (Muirhead et al., 2010). ABAD je dehydrogenáza interagující s A β a je nositelem A β -zprostředkované mitochondriální a neuronální dysfunkce (Valasani et al., 2014). ABAD zesiluje A β -indukovaný buněčný stres prostřednictvím snížené aktivity COX a zvýšené tvorby ROS v neuronech. Snaha zaměřit se na mitochondriální ABAD a navrhnout nové ABAD modulátory se proto jeví jako slibná strategie vývoje nových molekul pro terapii AD (Lim et al., 2011; Valasani et al., 2014).

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) je multimerní proteinový komplex, lokalizovaný ve vnitřní mitochondriální membráně. Tento komplex je aktivován prostřednictvím proapoptotických podnětů jako jsou ROS a přesycení vápníkem. Otevřením mPTP dochází k okamžité výměně látek mezi mitochondriemi a cytoplazmou a to vede ke ztrátě membránového potenciálu; vnitřní mitochondriální membrána se stává propustná pro molekuly do velikosti 1,5 kDa a to ve výsledku vede k významně zvýšenému průniku vody do mitochondrií (Halestrap et al., 2002; Kroemer et al., 2007). Cyklofilin D se jeví jako klíčový regulátor formace mPTP. Tento protein je lokalizovaný v mitochondriální matrix, při stresových podmínkách se přesouvá do vnitřní mitochondriální membrány a formuje mPTP (Baines et al., 2005; Connern a Halestrap, 1994). Interakce mezi cyklofilinem D a A β potencuje mitochondriální, neuronální a synaptický stres. Mitochondrie s -deficitem cyklofilinu D jsou rezistentní na A β - a Ca²⁺-indukované zvýšení průniku vody do mitochondrií a změnu propustnosti. Navíc vykazují větší kapacitu pro pufrování hladiny vápníku a produkují menší množství ROS. Absence cyklofilinu D v mitochondriích chrání neurony před buněčnou smrtí indukovanou A β a oxidativním stresem (Du et al., 2008). Potlačení tvorby/funkce cyklofilinu D v buňkách se blokuje otevření mPTP indukované vápníkem a dochází k ochraně buňky před buněčnou smrtí následkem oxidativního stresu u různých neurodegenerativních onemocnění včetně AD (Du et al., 2008; Nakagawa et al., 2005). Tyto účinky se jeví jako slibné cíle pro vývoj nových látek pro terapii AD. V současné době probíhá výzkum ve snaze najít nové mPTP modulátory, které by se mohly stát kandidáty pro terapii AD.

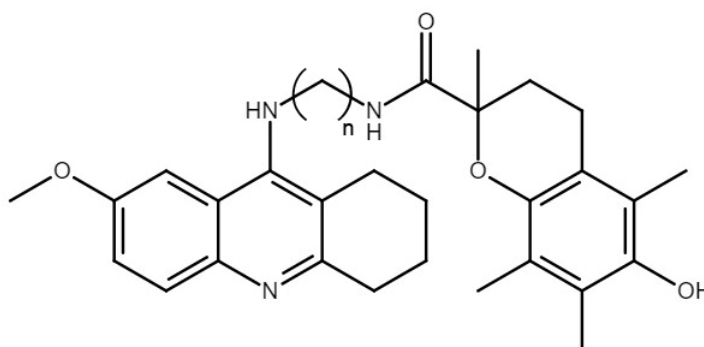
3.6. Testované nové inhibitory ChE

Testované inhibitory ChE byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové podle metod již dříve publikovaných (Korabecny et al., 2010a; Nepovimova et al., 2015). V této práci byly testovány látky dvou řad nově nasyntetizovaných derivátů - řada KS a řada AO. Řada KS (látky K1018, K1020 a K1022) jsou hybridní molekuly 7-MEOTA a adamantylaminu (amantadinu) (viz Obr. 5). Řada AO (látky K1046, K1053, K1056, K1060 a K1065) jsou hybridní molekuly 7-MEOTA a troloxu (hydrofilní analog vitamínu E) (viz Obr. 6). Vzhledem k tomu, že jsou testované látky odvozené od takrinu a 7-MEOTA, byl hodnocen také vliv těchto referenčních látek.



Řada KS ($n = 2 - 8$)

Obr. 5 ŘADA KS, deriváty 7-MEOTA a amantadinu; vytvořeno v <https://chem-space.com/>



Řada AO ($n = 2 - 8$)

Obr. 6 ŘADA AO, deriváty 7-MEOTA a troloxu; vytvořeno v <https://chem-space.com/>

4. Cíle

Cílem práce je zjistit a kvantifikovat účinky nově vyvíjených inhibitorů ChE na složky energetického metabolismu a monoaminergního systému, které mohou souviset s terapeutickými a/nebo vedlejšími účinky léčby.

Pozornost bude věnována zejména těmto účinkům inhibitorů ChE: hodnoty respirace a aktivity mitochondriálních enzymů (enzymy TCA, komplexy ETC, MAO).

Výsledky budou vyhodnoceny ve vztahu ke známým nebo předpokládaným terapeutickým a nežádoucím účinkům testovaných molekul. Na mitochondriální úrovni existuje několik potenciálních cílů, na které léčiva mohou působit, a které mohou vést buď k terapeutickým účinkům, anebo naopak k toxicitě. Proto je důležité testovat danou molekulu na mitochondriální toxicitu a na možné poškození mitochondriálních funkcí již v rané fázi nového vývoje léku. Výsledky této studie by mohly pomoci ve výzkumu nových látek pro léčbu AD.

5. Experimentální část

5.1. Materiál, chemikálie a média

Jako konzervační a izolační médium pro izolované mitochondrie byl použit pufovaný roztok sacharózy (sacharóza 0.32 mol/L, HEPES 4 mmol/L, pH roztoku 7.4). Pro spektrofotometrické měření aktivit komplexů ETC byl použit Krebsův-Henseleitův pufr (118 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mmol/L NaHCO_3 , 11.1 mmol/L glukózy, pH 7.4). Pro spektrofotometrické měření citrátsyntázy byl použit pufr Tris HCl (100 mmol/L $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, HCl, pH 8.1). Pro měření mitochondriální respirace bylo použito mitochondriální respirační médium MiR05 (sacharóza 110 mmol/L, K^+ -laktobionát 60 mmol/L, taurin 20 mmol/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 mmol/L, KH_2PO_4 10 mmol/L, EGTA (kyselina ethylenglykol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraoctová) 0.5 mmol/L, BSA volné od mastných kyselin 1g/L a HEPES 20 mmol/L, pH 7.1). Jako rozpouštědlo testovaných látek byl použit DMSO (dimethylsulfoxid). Pro měření aktivity citrátsyntázy byla použita DNTB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, Ellmanovo činidlo).

Chemikálie používané při stanovení aktivit jednotlivých enzymů a systému OXPHOS byly zakoupeny u Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Radiochemikálie, 5-hydroxytryptamin [^3H] trifluoroacetát (^3H]serotonin) a 2-fenylethylamin [ethyl- ^{14}C] hydrochlorid (^{14}C]PEA) byly zakoupeny u American Radiolabeled Chemicals. Inc. (St. Louis, MO, USA).

Testované látky (K1018, K1020, K1022, K1046, K1053, K1056, K1060, K1065, takrin, 7-MEOTA) byly syntetizovány v Centru biomedicínského výzkumu, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

5.2. Izolace mitochondrií

Mitochondriální frakce a purifikované mitochondrie byly izolovány a připraveny z mozkové kůry prasat. Čerstvé mozky byly získány z jatek a okamžitě umístěny do pufovaného studeného roztoku sacharózy. Všechny následující procedury probíhaly při teplotě 0 – 4 °C. Mozková kůra byla oddělena od mozečku a jemně zhomogenizována homogenizátorem s teflonovým pístem v deseti objemech (w/v) pufovaného studeného roztoku sacharózy s přídavkem aprotininu (kompetitivní inhibitor serinové proteázy). Mitochondrie byly izolovány metodou diferenciální centrifugace. Homogenát byl centrifugován při 1 000 x g 10 minut, aby došlo k odstranění neporušených buněk, jader

a buněčných zbytků. Supernatant byl opatrně dekantován; sediment byl znova resuspendován v pufovaném roztoku sacharózy a opět centrifugován za stejných podmínek. Oba supernatanty byly společně znovu centrifugovány při 10 000 x g po dobu 15 minut. Celkový konečný sediment obsahující mitochondrie byl dvakrát propláchnut roztokem pufované sacharózy, centrifugoval se (10 000 x g, 15 minut) a resuspendoval na koncentraci proteinu 20-40 mg/ml. Uchovával se při -70 °C až do samotného měření. Pro respiometrii byla použita čerstvá mitochondriální frakce, uchovávaná na ledu (Fisar et al., 2010).

Koncentrace bílkovin byla stanovena Lowryho metodou (Lowry et al., 1951), jako standard byl použit hovězí sérový albumin.

5.3. Testované látky

Látky byly dodány ve formě prášku, pro další měření bylo nutné připravit zásobní roztoky těchto látek (koncentrace roztoků - 5 mmol/L). Navážka každé látky byla při pokojové teplotě rozpuštěna ve stanoveném objemu DMSO (viz Tab. 1.). Tyto zásobní roztoky testovaných látek byly skladovány v lednici, při teplotě ± 5 °C.

Tab. 1 Příprava zásobních roztoků testovaných inhibitorů ChE.

Testovaná látka	M_m [g/mol]	M [mg]	V [ml]	c [mmol/L]
7-MEOTA	318,36	5,65	3,550	5
Takrin	234,72	2,44	2,079	5
K1018	612,71	6,41	2,092	5
K1020	640,15	6,75	2,109	5
K1022	668,83	6,54	1,956	5
K1046	517,67	6,43	2,098	5
K1053	487,64	5,13	2,104	5
K1056	529,72	5,16	1,948	5
K1060	522,08	5,09	1,950	5
K1065	592,22	6,17	2,084	5

Navážka každé látky byla rozpuštěna ve stanoveném objemu DMSO, koncentrace roztoků byla 5 mmol/L.

5.4. Aktivita citrátsyntázy a komplexů ETC

Purifikované mitochondrie byly resuspendovány v hypotonickém pufru (25 mmol/L KH_2PO_4 , 5 mmol/L MgCl_2 , pH 7.2) a třikrát ultrasonifikovány pro dosažení maximální enzymatické aktivity. Vzorky byly inkubovány při 30 °C po dobu 30 minut s jednotlivými zkoumanými látkami; finální koncentrace testovaných látek byla 50 $\mu\text{mol/L}$. Každé měření testovaných látek bylo prováděno za současného měření kontrolního vzorku. Objem měřených vzorků byl 1 mL, měření probíhalo při 30 °C; finální koncentrace proteinů byla 150 $\mu\text{g/mL}$. Aktivita komplexů ETC a citrátsyntázy byla měřena spektrofotometricky za pomoci spektrofotometru Uvicon XL (SECOMAM, Alès, Francie).

Komplex I (EC 1.6.5.3, NADH: ubichinon oxidoreduktáza, NADH dehydrogenáza)

Pro měření byla použita již dříve aplikována metoda s drobnými modifikacemi. Aktivita komplexu I byla měřena při 340 nm. Inkubace vzorku probíhala po dobu 30 minut při 30 °C, poté byl k vzorku přidán decylubiquinon (analog CoQ) a následně byla reakce odstartována přidáním NADH; měření každého vzorku probíhalo 3 minuty (Folbergrova et al., 2010; Hroudova a Fisar, 2010).

Komplex II + III (EC 1.3.5.1, sukcinátdehydrogenáza, sukcinát: ubichinon oxidoreduktáza + EC 1.10.2.2, ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza, CoQ-cyt c reduktáza, cytochrom bc_1 komplex)

Mitochondriální komplex II + III byl měřen při 550 nm. Jako substrát jsme použili sukcinát, inkubace probíhala po dobu 30 minut při 30 °C a začátek reakce byl odstartován přidáním cyt c; každé měření probíhalo 3 minuty (Trounce et al., 1996).

Komplex IV (EC 1.9.3.1, cytochrom c oxidáza, COX)

Aktivita COX byla měřena při 550 nm jako pokles absorbance během oxidační reakce redukovaného cyt c. Inkubace vzorku probíhala po dobu 30 minut při 30 °C a reakce byla odstartována přidáním cyt c; měření každého vzorku probíhalo 3 minuty (Rustin et al., 1994).

Citrátsyntáza (EC 2.3.3.1)

Aktivita citrátsyntázy byla měřena při 412 nm jako změna zabarvení DNTB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová, Ellmanovo činidlo). Inkubace vzorku probíhala po dobu 30 minut při 30 °C a reakce byla odstartována přidáním oxaloacetátu (0.5 mmol/L); měření každého vzorku probíhalo 3 minuty (Srere, 1969).

5.5. Mitochondriální respirace

Mitochondriální respirace byla měřena v oxygrafu s vysokým rozlišením (Oxygraph-2 k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) s elektrodami Clarkova typu. Respirace byla měřena jako spotřeba kyslíku během injekční titrace, při 37 °C. Měření probíhalo podle protokolů z předešlých studií, které byly přizpůsobeny aktuálním podmínkám (Hroudova a Fisar, 2012; Pesta a Gnaiger, 2012). Do komůrek oxygrafu bylo přidáno respirační médium MiR05 (faktor prostupu kyslíku: 0.92) v konečném objemu 2 mL. Finální koncentrace proteinů mitochondriální frakce se pohybovala mezi 0.05-0.20 mg/mL. Pro dosažení propustnosti mitochondriálních membrán byl použit digitonin (573 µg digitoninu/mg proteinu).

Do ETC elektrony můžou vstupovat dvěma vstupy: hlavním, kterým je komplex I a alternativním, kterým je komplex II. Hodnoty respirace byly měřeny pro obě dráhy vstupů elektronů a jednotlivé dráhy byly stanoveny pomocí specifických substrátů jednotlivých komplexů ETC: malát a pyruvát pro komplex I a rotenon a sukcinát pro komplex II.

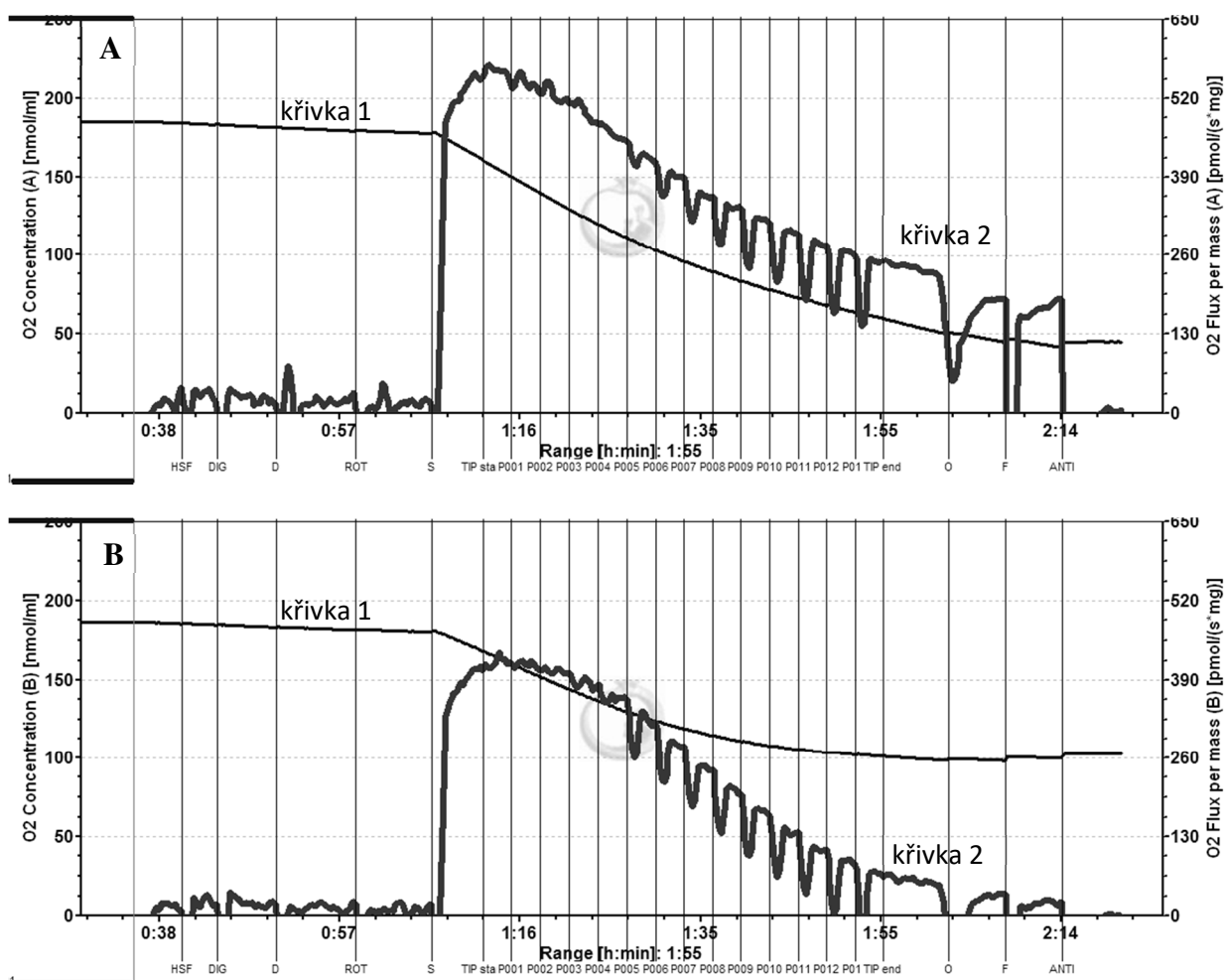
Respirace podporována substráty komplexu I byla aktivována přidáním malátu (2 mmol/L) a pyruvátu (5 mmol/L). Po ustálení signálu byla respirace odstartována přidáním ADP (1.25 mmol/L). Následně probíhala titrace testované látky, titrační objem se pohyboval v rozmezí 0.5 – 100 µL, interval mezi jednotlivými titracemi byl 3 minuty. Respirace byla ukončena přidáním rotenonu (0.5 µmol/L), který je inhibitorem komplexu I. Zbytková spotřeba kyslíku (residual oxygen consumption, ROX), která byla naměřena po přidání rotenonu, byla odečtena od ostatních jednotlivých hodnot respirace.

Samotnému měření respirace podporované substráty komplexu II předcházelo přidání ADP (1.25 mmol/L). Pro dosažení inhibice komplexu I byl následně přidán rotenon (0.5 µmol/L). Respirace byla odstartována přidáním sukcinátu (10 mmol/L). Následovala titrace testované látky, titrační objem se pohyboval v rozmezí 0.5 - 100 µL, interval mezi jednotlivými titracemi byl 3 minuty. Respirace byla ukončena přidáním antimycinu A (1.25 µg/mL), který inhibuje transfer elektronů z cytochromu *b* na CoQ (blokuje Q_i místo komplexu III). ROX, která byla naměřena po přidání antimycinu A, byla odečtena od ostatních jednotlivých hodnot respirace.

Měření respirace každé testované látky probíhalo za současného měření respirace kontrolního vzorku, který místo testované látky obsahoval stejné množství rozpouštědla

(DMSO). Po odečtení ROX byly vyhodnoceny rozdíly v respiraci mezi vzorky s testovanou látkou a kontrolním vzorkem. Tyto rozdíly byly vyjádřeny v %, za předpokladu, že 100 % odpovídá hodnotě kontrolního vzorku.

Výstupem respiračního měření na oxygrafu je graf závislosti koncentrace kyslíku (nmol/nL) na čase (viz Obr. 7) Během měření se v reálném čase vykreslují dvě křivky: křivka 1, která znázorňuje aktuální koncentraci kyslíku ve vzorku (levá osa y) a křivka 2, která je zápornou derivací křivky 1 a znázorňuje reálnou kinetiku spotřeby kyslíku (pravá osa y).



Obr. 7 Respirace podporována substráty komplexu II. Typický výstup respiračního měření na oxygrafu – grafy znázorňující inhibici respirace vlivem testované látky. Titrace kontrolního vzorku (A) a titrace testované látky (B). Vertikální křivky znázorňují jednotlivé přidávané komponenty: HSF – čerstvá mitochondriální frakce; DIG – digitonin; D – ADP; ROT – rotenon; S – sukcinát; P001 až P013 – jednotlivé titrace; O – oligomycin; F – FCCP (karbonyl-kyanid-*p*-trifluormethoxyfenylhydrazon); ANTI – antimycin A. Křivka 1 znázorňuje koncentraci kyslíku ve vzorku (levá osa y), křivka 2 znázorňuje reálnou kinetiku spotřeby kyslíku (záporná derivace křivky 1, pravá osa y).

5.6. Aktivita monoaminoxidázy

Aktivita MAO-A a MAO-B byla stanovena radiochemicky pomocí metod, které byly již dříve publikovány (Egashira et al., 1999; Ekstedt, 1976). Reakční směs s obsahem Krebsova-Henseleitova pufru, mitochondrií a testovaných látek v různých koncentracích byla inkubována při 37 °C po dobu 60 minut. Reakce byla odstartována přidáním radioaktivně značeného substrátu ($[^3\text{H}]$ serotonin pro MAO-A, $[^{14}\text{C}]$ PEA pro MAO-B). Konečný objem vzorku byl 250 μl a obsahoval 200 μg proteinu, 3.2 $\mu\text{mol/L}$ $[^3\text{H}]$ serotoninu pro měření aktivity MAO-A, 10 $\mu\text{mol/L}$ $[^{14}\text{C}]$ PEA pro měření aktivity MAO-B a 0.1 $\mu\text{mol/L}$ až 100 mmol/L zkoumané látky. Reakce byla zastavena přidáním 250 μl 2N HCl. Reakční produkty byly extrahovány ve směsi benzenu:ethylacetátu 1:1 (v/v) a následně byla kapalinovou scintilační spektrometrií (LS 6000IC, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA) změřena radioaktivita v organické fázi.

5.7. Analýza dat a statistika

Aktivita enzymů byla měřena jako křivka závislosti absorbance na čase za pomoci LabPower Junior software (SECOMAM). Relativní změny enzymatické aktivity vyvolané zkoumanou látkou byly stanoveny za předpokladu, že enzymatická aktivita v kontrolním vzorku je 100 %. Data z respirometrických měření byly zaznamenávány a vyhodnocovány pomocí programu DatLab 4.3 software (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Hodnoty respirace byly vyjádřeny jako hmotnostně specifický kyslíkový tok (pmol O_2 spotřebovaných za sekundu/mg proteinu ve vzorku).

Pro kvantifikaci IC_{50} (koncentrace zkoumané látky, která vyvolá 50 % inhibici) a zbytkové aktivity při vysoké koncentraci zkoumané látky byla inhibice aktivity MAO vyhodnocena za použití logistické regrese čtyř parametrů (SigmaPlot, Systat Software Inc., Richmond, CA, USA). Data byla vyjádřena jako průměrné hodnoty se standardní odchylkou.

Výsledky byly analyzovány za pomoci software STATISTICA (verze 12.0, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Pro určení statistické významnosti mezi enzymovou aktivitou testované látky a kontroly byl použit Studentův t-test.

6. Výsledky

6.1. Aktivita citrátsyntázy a komplexů ETC

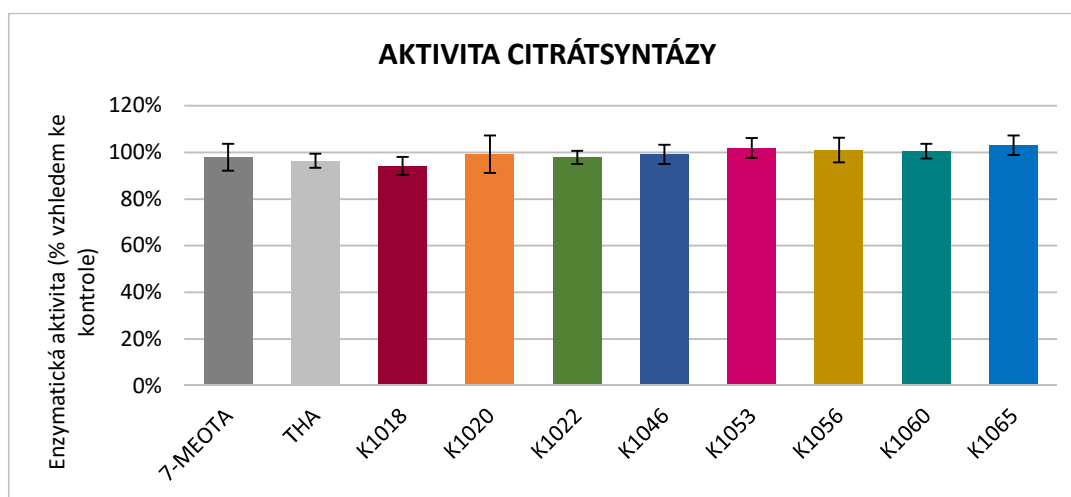
Změny aktivit komplexů ETC a citrátsyntázy byly měřeny na purifikovaných mitochondriích izolovaných z mozků prasat.

Aktivitu cistrátsyntázy žádná z testovaných látek neovlivnila (viz Obr. 8).

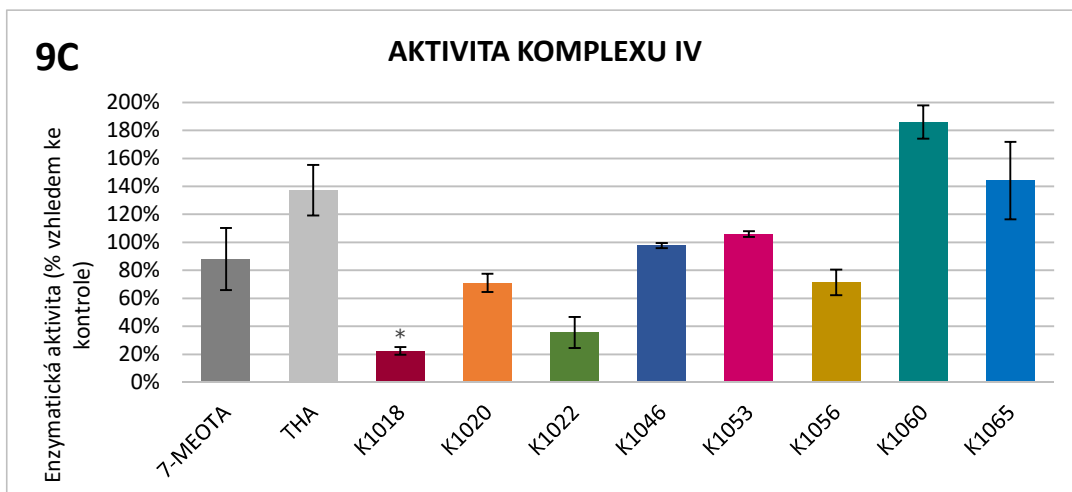
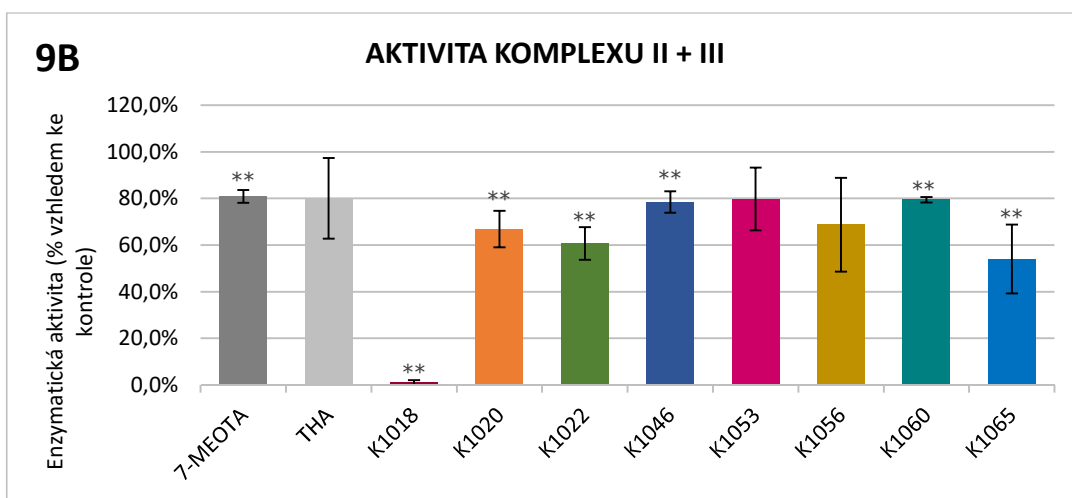
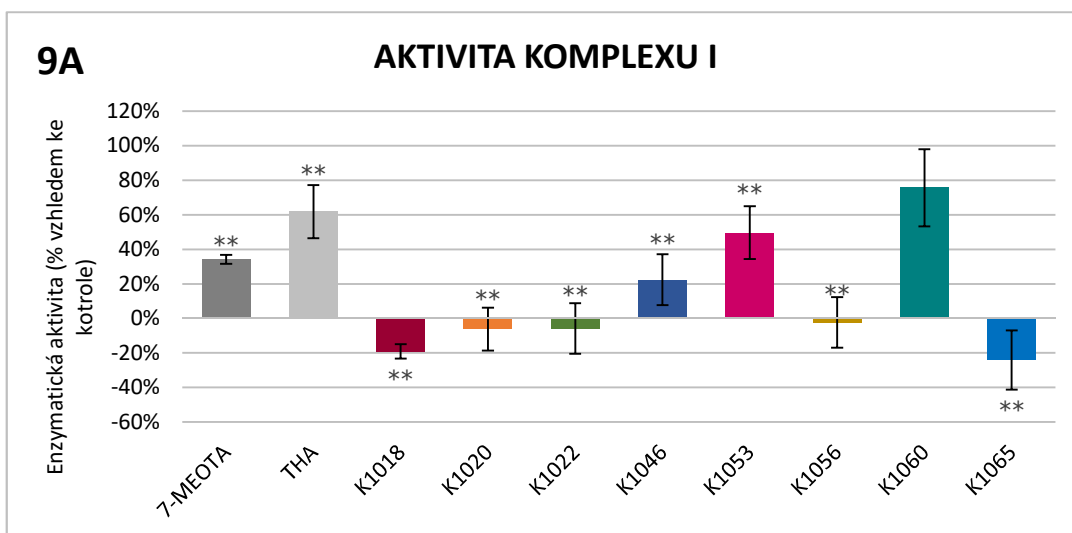
Komplex I byl významně inhibován všemi testovanými látkami s výjimkou K1060 (viz Obr. 9A). Statisticky významná inhibice byla pozorována u látek K1018, K1020, K1022, K1056, K1065 a 7-MEOTA. Inhibice komplexu I takrinem a látkou K1053 byla méně výrazná.

Aktivitu komplexu II + III výrazně inhibovala látka K1018, statisticky významný pokles aktivity byl pozorován také po inkubaci s látkami K1022 a K1065 (viz Obr. 9B). Nejméně byly tyto komplexy inhibovány látkami K1046, K1053, K1060, takrinem a 7-MEOTA.

Aktivita komplexu IV byla výrazně snížena vlivem látek K1018 a K1022 (viz Obr. 9C). Na výrazné zvýšení aktivity tohoto komplexu měly vliv látky K1060, K1065 a takrin. Látky K1046, K1053 a 7-MEOTA aktivitu tohoto komplexu nijak výrazně neovlivnily.



Obr. 8 Vliv inhibitorů ChE na aktivitu citrátsyntázy v purifikovaných mitochondriích izolovaných z mozků prasat. Inkubace vzorku probíhala 30 minut při teplotě 30 °C a následně byla spektrofotometricky měřena enzymatická aktivita komplexu (viz odstavec 5.3). Koncentrace testovaných látek byla vždy 50 $\mu\text{mol/L}$. Graf vykresluje relativní hodnoty aktivit v %, hodnota 100 % odpovídá aktivitě kontrolního vzorku, tzn. vzorku bez zkoumané látky.



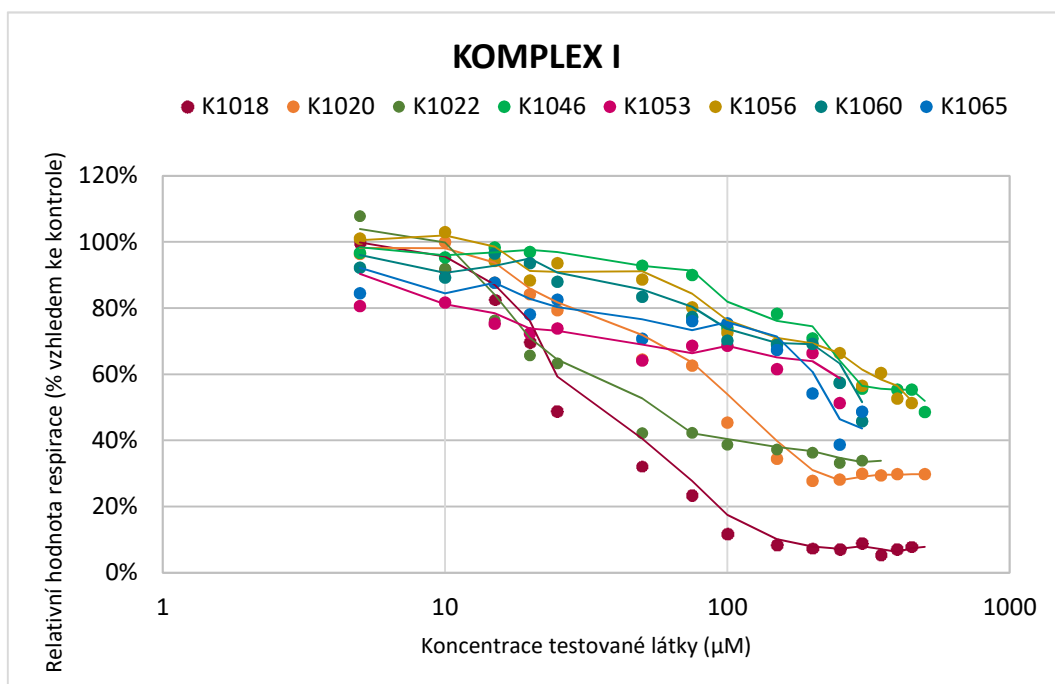
Obr. 9 Vliv inhibitorů ChE na aktivitu enzymů: **9A** - komplexu I, **9B** - komplexu II + III, **9C** - komplexu IV v purifikovaných mitochondriích izolovaných z mozku prasat. Inkubace vzorku probíhala 30 minut při teplotě 30 °C a následně byla spektrofotometricky měřena enzymatická aktivita komplexu (viz odstavec 5.3). Koncentrace testovaných látek byla vždy 50 μmol/L. Grafy vykresluje relativní hodnoty aktivit v %, hodnota 100 % odpovídá aktivitě kontrolního vzorku, tzn. vzorku bez zkoumané látky. Pro porovnání kontrolního vzorku a vzorku s testovanou látkou byl aplikován Studentův t-test (* p < 0.05, ** p < 0.01).

6.2. Mitochondriální respirace

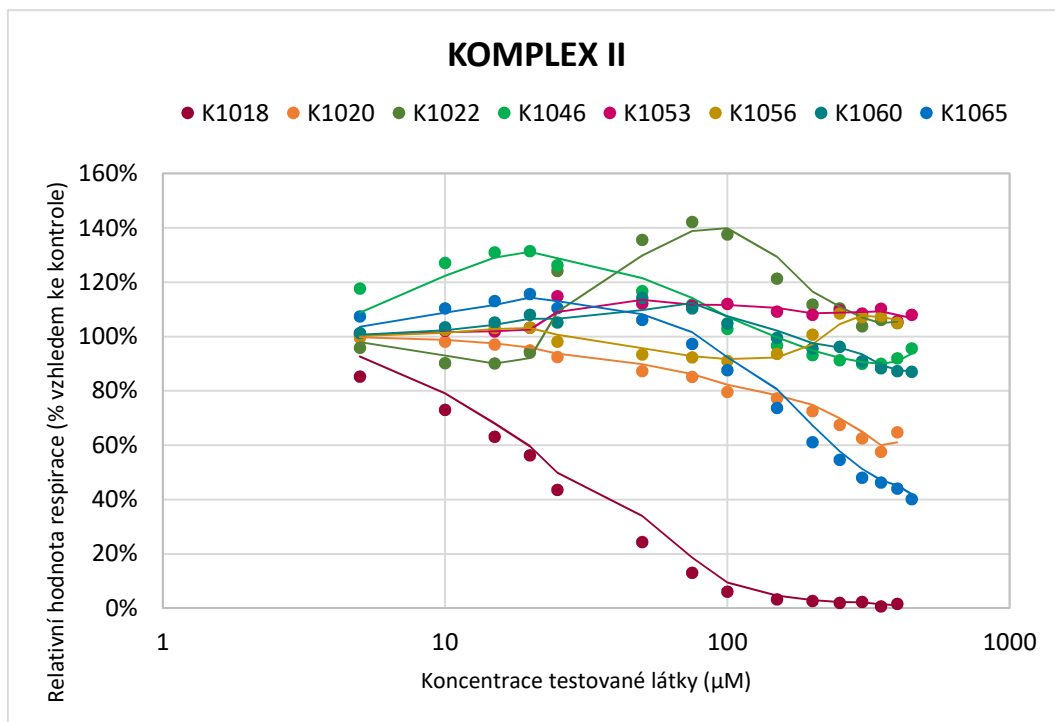
Vliv testovaných látek na rychlost spotřeby kyslíku byl měřen v izolovaných mitochondriích z prasečích mozků.

Respirace podporovaná substráty komplexu I byla inhibována vlivem všech testovaných látek. Nejvýraznější míra inhibice byla pozorovaná u látky K1018, dále u látek K1020 a K1022. Látky K1046, K1056 a K1060 inhibovaly mitochondriální respiraci přes komplex I minimálně (viz Obr. 10).

Respirace podporovaná substráty komplexu II byla výrazně inhibována vlivem látky K1018, menší inhibice byla pozorována vlivem látky K1020. Nízké koncentrace látek K1046, K1060 a K1065 (5 – 20 μM pro K1046 a K1065, 5 – 50 μM pro K1060) působily spíše stimulačně a respirace byla v porovnání s kontrolou vyšší, k inhibici respirace docházelo až při vyšších koncentracích (> 20 μM pro K1046 a K1065, > 50 μM pro K1060). Látka K1053 hodnoty respirace se stoupající koncentrací jen mírně zvyšovala. Látka K1056 měla při nižších koncentracích na respiraci mírný inhibiční vliv, při vyšších koncentracích se hodnoty respirace zvyšovaly (viz Obr. 11).



Obr. 10 Vliv inhibitorů ChE na respiraci podporované substráty komplexu I v čerstvé mitochondriální frakci z prasečích mozků. Respirace byla měřena jako spotřeba kyslíku během injekční titrace, při 37 °C. Jednotlivé body znázorňují hodnotu respirace pro danou koncentraci testované látky. Spojnice těchto bodů reprezentuje respirační křivku jednotlivé testované látky. Graf vykresluje relativní hodnoty respirace v %, kdy hodnota 100 % odpovídá hodnotě respirace kontrolního vzorku, tzn. vzorku bez zkoumané látky. Směrodatné odchylky nejsou v grafu z důvodu přehlednosti zobrazeny.



Obr. 11 Vliv inhibitorů ChE na respiraci podporované substráty komplexu II v čerstvé mitochondriální frakci z prasečích mozků. Respirace byla měřena jako spotřeba kyslíku během injekční titrace, při 37 °C. Jednotlivé body znázorňují hodnotu respirace pro danou koncentraci testované látky. Spojnice těchto bodů reprezentuje respirační křivku jednotlivé testované látky. Graf vykresluje relativní hodnoty respirace v %, kdy hodnota 100 % odpovídá hodnotě respirace kontrolního vzorku, tzn. vzorku bez zkoumané látky. Směrodatné odchylky nejsou v grafu z důvodu přehlednosti zobrazeny.

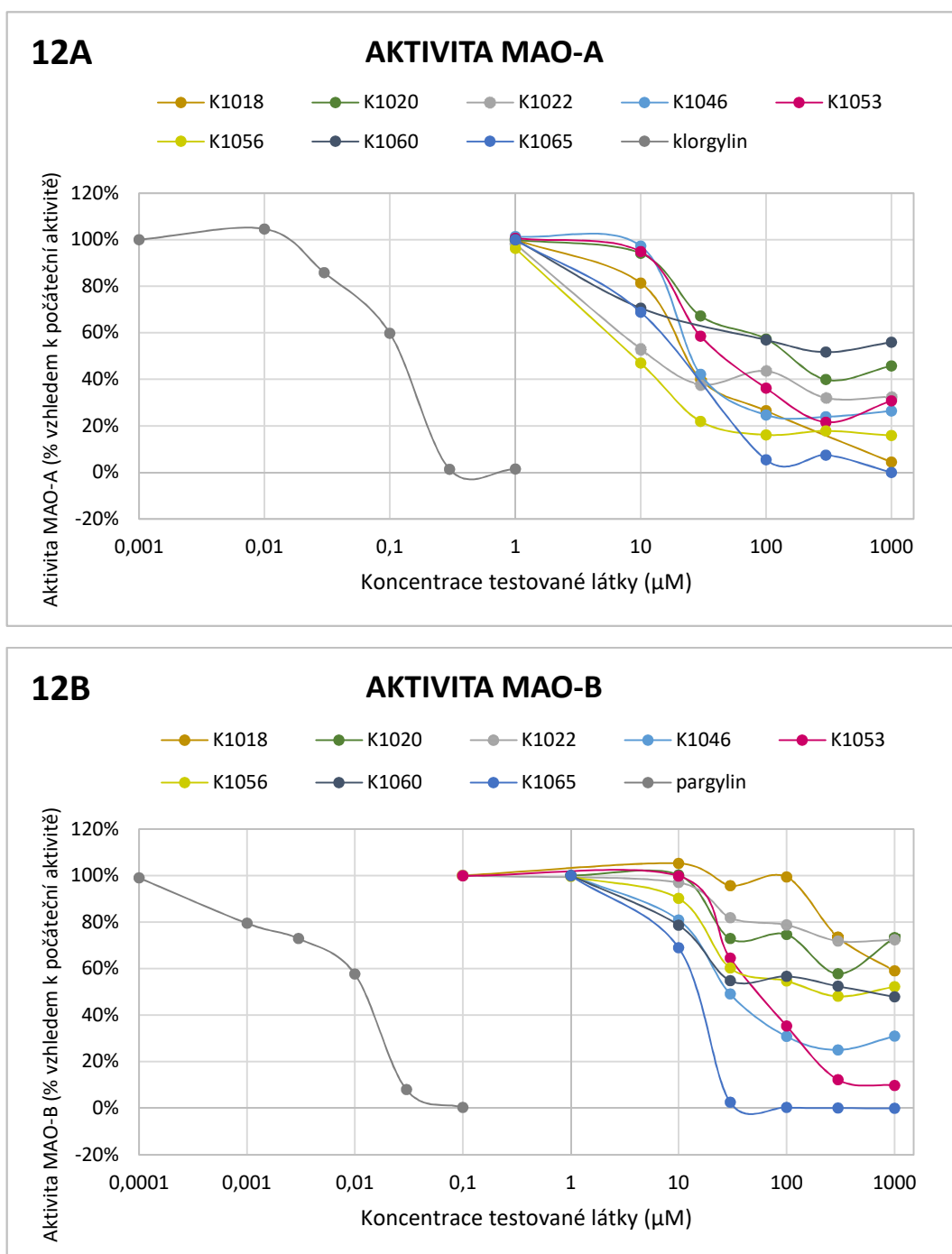
6.3. Aktivita MAO

Vliv testovaných látek na aktivitu MAO-A a MAO-B byl měřen v izolovaných mitochondriích z prasečích mozků.

Aktivita MAO-A byla v různé míře inhibována všemi testovanými látkami (viz Obr. 12A) Hodnoty polovičních inhibičních koncentrací (IC_{50}) testovaných látek byly porovnány s hodnotou IC_{50} klorgylinu (viz Tab. 1), jako silného inhibitoru MAO-A. Tyto hodnoty u všech testovaných látek byly v porovnání s klorgylinem velmi výrazně vyšší. Aktivita MAO-A byla plně inhibována látkami K1018 a K1065. Nejmenší míru inhibice vykazovaly látky K1060 a K1020.

Aktivita MAO-B byla také v různé míře inhibována všemi testovanými látkami (viz Obr. 12B). Zde byly hodnoty IC_{50} porovnávány s pargylinem, který je silným inhibitorem MAO-B (viz Tab. 2). I tady byly hodnoty IC_{50} všech testovaných látek v porovnání

s pargylinem vyšší. Celkově aktivitu MAO-B inhibovaly látky K1053 a K1065. Výrazně byla aktivita MAO-B inhibována také látkou K1046. Nejmenší míru inhibice vykazovaly látky K1022, K1020 a K1018.



Obr. 12 Vliv inhibitorů ChE na aktivitu 12A – MAO-A a 12B – MAO-B v čerstvě mitochondriální frakci z prasečích mozků. Jednotlivé body znázorňují hodnotu aktivity enzymu pro danou koncentraci testované látky. Spojnice těchto bodů reprezentuje inhibiční křivku testovaných látek. Graf vykresluje relativní hodnoty inhibice v %, kdy hodnota 100 % odpovídá hodnotě počáteční aktivity MAO. Směrodatné odchylky nejsou v grafu z důvodu přehlednosti zobrazeny.

Tab. 2 Inhibice MAO-A testovanými inhibitory ChE.

Testovaná látka	MAO-A	
	IC ₅₀ (μmol/L)	Inhibice
K1018	27,36 ± 9,12	Úplná
K1020	28,29 ± 14,82	Částečná
K1022	2,99 ± 3,27	Částečná
K1046	21,57 ± 2,39	Částečná
K1053	26,63 ± 5,28	Částečná
K1056	7,82 ± 1,15	Částečná
K1060	6,02 ± 4,81	Částečná
K1065	15,06 ± 3,81	Úplná
Klorgylin	0,12 ± 0,01	Úplná

Míra inhibice a hodnoty polovičních inhibičních koncentrací jednotlivých látek. Analýza dat je popsána

Tab. 3 Inhibice MAO-B testovanými inhibitory ChE.

Testovaná látka	MAO-B	
	IC ₅₀ (μmol/L)	Inhibice
K1018	256,65 ± 33,61	Částečná
K1020	31,77 ± 15,36	Částečná
K1022	22,60 ± 9,04	Částečná
K1046	18,10 ± 1,71	Částečná
K1053	45,32 ± 6,73	Úplná
K1056	17,11 ± 2,10	Částečná
K1060	10,83 ± 1,10	Částečná
K1065	12,15 ± 0,05	Úplná
Pargylin	0,01 ± 0,00	Úplná

Míra inhibice a hodnoty polovičních inhibičních koncentrací jednotlivých látek. Analýza dat je popsána

7. Diskuse

I přes to, že přesný mechanismus mitochondriálních dysfunkcí v patofyziologii neurodegenerativních onemocnění není dodnes jasný, je zřejmé, že mitochondriální dysfunkce hrají v patofyziologii těchto onemocnění významnou roli (Bosetti et al., 2002; Gibson et al., 1998; Hroudova et al., 2016). K těmto dysfunkcím můžeme mimo jiné zařadit zejména defekty v OXPHOS a zvýšenou produkci ROS (Hroudova et al., 2014). Významnou roli v patofyziologii AD hraje také MAO. Je prokázáno, že u AD je její aktivita zvýšená a to je mimo jiné zdrojem zvýšeného oxidačního stresu a zároveň má MAO také svůj podíl na formování a akumulaci neurofibrilárních klubek a na zhoršení kognitivních funkcí (Cai, 2014; Sherif et al., 1992).

Práce hodnotí vliv nových inhibitorů ChE na mitochondriální metabolismus a monoaminergní systém. Tyto testované látky jsou nově nasyntetizovanými hybridními molekulami 7-MEOTA a amantadinu (řada KS – látky K1018, K1020, K1022) a 7-MEOTA a troloxu (řada AO – látky K1046, K1053, K1056, K1060, K1065). Vzhledem k duálnímu charakteru molekul je možné očekávat i dva hlavní účinky každé řady molekul. Řada KS sebou nese inhibiční účinek na ChE a zároveň se předpokládá, že by mohla nést také účinek amantadinu. Trolox je analogem vitamínu E, takže u molekul řady AO by se dal očekávat kromě inhibice ChE také antioxidační účinek. V souvislosti s měřenými parametry odrážející vliv látek na mitochondriální funkce lze konstatovat, že obecně látky řady AO vykazovaly lepší výsledky než látky řady KS.

Testované látky byly porovnávány s kontrolními vzorky (v reakční směsi bylo použito pouze rozpouštědlo testovaných látek DMSO) a referenčními látkami (takrinem a 7-MEOTA). Vliv testovaných látek na energetický metabolismus mitochondrií byl hodnocen na základě měření aktivit jednotlivých mitochondriálních enzymů (enzymy ETC a citrát syntáza) a měření mitochondriální respirace (respirace podporovaná substráty komplexu I, komplexu II). Vliv na monoaminergní systém byl hodnocen mírou inhibice obou izoform MAO-A a MAO-B. Experimenty probíhaly *in vitro*, na izolovaných mitochondriích získaných z prasečích mozků. Byly měřeny parametry, které s největší pravděpodobností souvisí s patofyziologickými procesy AD a díky tomu můžeme s určitou mírou předpokladu zhodnotit jejich vliv v případné klinické praxi a porovnat benefity a rizika, které tyto potenciální nové látky v terapii AD mohou mít.

7.1. Aktivita citrátsyntázy a komplexů ETC

Citrátsyntáza je enzymem regulujícím tvorbu energie prostřednictvím systému OXPHOS, obecně je také považována za kvantitativní enzymatický marker pro přítomnost nepoškozených mitochondrií. Žádná z testovaných látek výrazně tento enzym TCA neovlivnila. Vzhledem k tomu, že testované inhibitory ChE výrazně aktivitu TCA a citrátsyntázy neovlivnily, je možné brát citrátsyntázu jako marker pro přítomnost intaktních mitochondrií i během případné farmakoterapie těmito látkami. Aktivita citrátsyntázy nebyla ovlivněna ani takrinem ani látkou 7-MEOTA jako referenčními látkami pro nově testované molekuly.

Většina látek výrazně inhibovala komplex I. Komplex I je největším enzymovým komplexem, který je ovlivněn řadou léčiv a toxinů. Je hlavním vstupem elektronů pro OXPHOS a výrazná inhibice tohoto enzymu je většinou spojována s negativním vlivem na energetický metabolismus a s mitochondriální toxicitou. Je zároveň jedním z míst největší tvorby ROS (společně s komplexem III), proto alterace v jeho aktivitě mohou přispívat ke zvýšení oxidačního stresu, a tím potencovat mitochondriální dysfunkce. Snížená aktivita komplexu I byla pozorována u pacientů s AD a jinými neurodegenerativními chorobami (Holper et al., 2019). Z těchto důvodů je snížení aktivity komplexu I vlivem testovaných látek spíše nežádoucí a dá se předpokládat, že by vedl ke zhoršení patofyziologie AD. Z tohoto pohledu se jeví látky K1060 a K1053 (minimální vliv na aktivitu komplexu I) jako vhodnější pro další testování. U látek K1018 a K1065 se míra inhibice komplexu I pohybovala v záporných hodnotách. To mohlo být způsobeno jednak schopností těchto látek dosáhnout v podstatě kompletní inhibice daného enzymu, ale také určitou chybou měření. Minimální inhibici komplexu I vykazoval také takrin, který inhiboval v porovnání s testovanými látkami minimálně.

Komplexy II a III byly také inhibovány všemi látkami, avšak v menší míře než komplex I. Komplex II je alternativním vstupem elektronů pro OXPHOS, alterace v jeho aktivitě mají obecně menší dopad na OXPHOS než poruchy funkce komplexu II. Přesto je nutné při vývoji nových potencionálních léčiv brát v úvahu i zdánlivě málo významné změny aktivity tohoto komplexu. Lze tedy předpokládat, že látka K1018, která komplex II a III inhibovala nejvýrazněji, je nejméně vhodným kandidátem pro další výzkum. Jako vhodné kandidáty na další výzkum z pohledu nemenšího ovlivnění aktivity komplexu II a III můžeme označit látky K1053 a K1060. Referenční látky takrin a 7-MEOTA na tyto

komplexy neměly výrazný vliv, míra jejich inhibice se pohybovala ve srovnatelných hodnotách jako u látek K1053 a K1060.

Komplex IV katalyzuje poslední krok ETC, koncovou redukcí O_2 na H_2O , je důležitým rychlost-limitujícím regulačním enzymem OXPHOS. Na základě této skutečnosti je označován jako klíčový marker mitochondriální funkce (Holper et al., 2019) U pacientů s AD je jeho aktivita snížena, proto další snížení jeho aktivity vlivem farmakoterapie je velmi nežádoucí a může paradoxně přispívat k rozvoji patofyziologických procesů, naopak zvýšení jeho aktivity může vykazovat určitý protektivní vliv v patofyziologii AD. Aktivitu tohoto komplexu výrazně snižovaly látky K1018 a K1022, z tohoto důvodu můžeme tyto látky vyloučit z dalšího testování. Látky K1046 a K1053 aktivitu tohoto komplexu nijak výrazně neovlivnily. Z toho můžeme usuzovat, že jejich účinek na tento komplex nebude mít prakticky žádný negativní dopad na OXPHOS a mitochondriální toxicitu, ale zároveň nebudou vykazovat ani případný protektivní vliv důsledkem zvýšení aktivity tohoto enzymu. Zvýšenou aktivitu komplexu IV vykazovaly látky K1060 a K1065. Je možné předpokládat, že tyto dvě látky se jeví z pohledu účinku na tento komplex jako nejvhodnější molekuly pro další výzkum. Jejich případný protektivní vliv na mitochondrie by mohl být vhodným a významným parametrem pro další výzkum. Takrin aktivitu komplexu IV zvyšoval, proto ho můžeme také označit jako látku s potenciálně protektivním účinkem na mitochondrie.

Do měření aktivit komplexů ETC a citrát syntázy byly zahrnuty i dvě referenční látky: takrin a 7-MEOTA. Biologická dostupnost takrinu po p.o. aplikace je 17 – 24 %, při dávce 80 – 200 mg je maximální plasmatická koncentrace dosažena po 1 – 2 h a pohybuje se mezi 20 – 60 $\mu\text{g/L}$ (0.1 – 0.3 $\mu\text{mol/L}$) (Wagstaff a McTavish, 1994). Nelze tedy očekávat, že u takrinu by tato aktivita měla významný biologický vliv vzhledem k výsledkům dosaženým v této *in vitro* studii. Inhibiční profil látky 7-MEOTA byl méně příznivý než takrinu, 7-MEOTA komplex I inhiboval v daleko větší míře. Na druhé straně neznáme jeho farmakokinetická data v *in vivo* podmínkách.

Pokud bychom tedy terapeutický profil takrinu posuzovali pouze na základě těchto výsledků vyjadřujících vliv na mitochondriální enzymy ETC a na respiraci, tak by se takrin jevil jako relativně slibná látka pro terapii AD. Avšak s ohledem na skutečnost, že se takrin v klinické praxi v minulosti používal, ale pro své nežádoucí účinky musel být z trhu stažen (Davis a Powchik, 1995), můžeme konstatovat, že výsledky mitochondriálních měření jsou pouze jedním parametrem z mnoha, které utvářejí

terapeutický profil dané látky v klinické praxi. Důvodem pro stažení z trhu byla zejména výrazná hepatotoxicita a další nežádoucí účinky, které s mitochondriální toxicitou neměly s největší pravděpodobností žádnou souvislost. Na základě této skutečnosti je nutné brát v potaz, že látka K1060, která vykazovala nejlepší výsledky s ohledem na mitochondriální funkce a na základě těchto výsledků se jeví jako vhodná k dalšímu testování, může projevit svou toxicitu v jiných oblastech.

Je nutné brát v úvahu, že koncentrace testovaných látek při *in vitro* měřeních aktivit jednotlivých komplexů byla v porovnání s plasmatickou koncentrací takrinu (Wagstaff a McTavish, 1994) relativně vysoká (50 μM). V následných *in vivo* studiích by byla koncentrace (potažmo dávkování) s největší pravděpodobností nižší, proto inhibiční profil látky K1060 by mohl být ještě příznivější (menší inhibice komplexů I, II + III ale zároveň i menší vzestup aktivity komplexu IV a s tím i případný menší protektivní vliv).

7.2. Mitochondriální respirace

Do ETC elektrony mohou vstupovat dvěma vstupy: hlavním, kterým je komplex I a alternativním, kterým je komplex II. Hodnoty respirace byly měřeny pro obě dráhy vstupů elektronů a pro rozlišení obou respiračních drah byly použity specifické substráty daných komplexů. Pro komplex I malát a pyruvát, pro komplex II sukcinát a rotenon. Obě respirační dráhy byly výrazně inhibovány látkou K1018, a to už i při nízkých koncentracích. Tyto výsledky korespondují s výsledky měření aktivit jednotlivých komplexů. I při těchto měřeních látka K1018 vykazovala vysokou míru inhibice obou komplexů, které jsou vstupy pro jednotlivé respirační dráhy. Nejméně byla respirace obou drah inhibována látkami K1060 a K1053 a i zde tyto výsledky respirometrie korespondují s výsledky měření aktivit jednotlivých komplexů, kde obě tyto látky vykazaly ze všech testovaných látek nejmenší míru inhibice aktivity jednotlivých komplexů ETC, zde tedy zejména komplexu I a II+III. Svým vlivem na respiraci se od ostatních lišila látka K1022. Ta při nižších koncentracích (5 – 15 μM) hodnoty respirace mírně snižovala, při vyšších koncentracích (20 – 75 μM) hodnoty respirace výrazně zvyšovala a při dalším zvyšování koncentrace (> 75 μM) opět docházelo k inhibici respirace. Toto může ukazovat na možný duální charakter dané látky, a/nebo tato nestandardní respirační křivka může být způsobena chybou měření. Avšak vzhledem k výsledkům ostatních měření (aktivity

komplexů ETC, respirace podporována komplexem I) se spíš nepředpokládá, že by daná látka měla potenciál se stát molekulou pro další výzkum.

Výsledky ukazují, že je v podstatě možné s určitou mírou pravděpodobnosti zhodnotit vhodnost dalšího testování daných látek už po změření aktivity komplexu I. Z výsledků je zřejmé, že míra inhibice komplexu I koresponduje s mírou inhibice respirace podporovanou substráty komplexu I. Vzhledem k tomu, že tato dráha je hlavní dráhou mitochondriální respirace a alterace v aktivitě komplexu I vlivem zkoumané látky jsou pravděpodobně nejvýznamnější příčinou mitochondriálních dysfunkcí, tak proto dysfunkce komplexu I tuto látku v podstatě vylučují z dalšího testování. I toto zjištění může být vodítkem pro další výzkum.

7.3. Aktivita MAO

MAO katalyzuje oxidativní deaminaci různých biogenních aminů i aminových xenobiotik za současné produkce H_2O_2 . Inhibitory MAO jsou součástí terapie jiných neurodegenerativních a psychických onemocnění, ale vzhledem k jejich schopnosti snižovat míru poškození vlivem oxidativního stresu se jeví jako potenciální kandidáti i v terapii AD. Vzhledem k této skutečnosti byly nasyntetizovány a jsou zkoumány nové multifunkční inhibitory MAO/ChE, které se jeví jako možné nadějně látky pro terapii AD (Lu et al., 2013; Wang et al., 2014).

I přes to, že schopnost snížení aktivity MAO nepatří k primárním terapeutickým účinkům inhibitorů ChE, tak jejich vliv na aktivitu MAO může pravděpodobně souviset s vlivem těchto látek na serotonergní, noradrenergní a dopaminergní neurotransmisi. Hlavním předpokládaným účinkem těchto látek je zlepšení kognitivních funkcí (inhibicí ChE), avšak neuroprotektivní a antidepresivní účinek (resp. účinek na změny nálady) může být přidanou hodnotou k tomuto hlavnímu předpokládanému účinku (Singh et al., 2017). Navíc inhibice MAO může hrát důležitou roli v antioxidačním a neuroprotektivním účinku těchto látek.

Všechny látky inhibovaly v různé míře aktivitu obou izoform MAO, hodnoty jejich IC_{50} se pohybovaly v rozmezí 3 – 45 $\mu\text{mol/L}$. Tyto hodnoty jsou opět relativně vysoké, v porovnání s výše zmíněnou maximální plasmatickou koncentrací takrinu (0.1 – 0.3 $\mu\text{mol/L}$) jako referenční látky (Wagstaff a McTavish, 1994), se dá předpokládat, že

většina látek by při p.o. podání těchto hodnot v mozku nedosáhla. Hodnota IC_{50} se výrazně lišila u látky K1018, kde pro MAO-B byla 257 $\mu\text{mol/L}$. Z tohoto pohledu se tato látka jeví jako nejméně vhodná pro další testování, jelikož v případné aplikaci *in vivo* by pro poloviční inhibici aktivity MAO-B vyžadovala vyšší potencionální dávku než ostatní látky. Plným inhibitorem obou izoform MAO byla látka K1065.

Inhibice MAO, především MAO-B, může být žádanou v souvislosti s ovlivněním a snížením tvorby ROS. Ovlivnění monoaminergního systému může být jedním z žádoucích mechanismů účinku při vývoji nových léčiv k léčbě AD a dalších neurodegenerativních onemocnění.

8. Závěr

Snahou tohoto výzkumu bylo vytipování molekul, které pozitivně ovlivňují a/nebo neovlivňují energetický metabolismus mitochondrií a mohly by se stát vhodnými kandidáty pro další výzkum. Na základě měřených a analyzovaných parametrů jsem se snažila identifikovat takové látky, které by při minimálně stejně benefiálním terapeutickém účinku jako současně používané inhibitory ChE v terapii AD vykazovaly menší riziko vedlejších účinku souvisejících s mitochondriálními dysfunkcemi a mitochondriální toxicitou.

S ohledem na všechny měřené a analyzované parametry tedy můžeme předpokládat, že nejvhodnější molekulou pro další výzkum se jeví látka K1060. Tato látka vykázala nejnižší riziko možných nežádoucích účinku způsobených defekty v aktivitách jednotlivých enzymů ETC a poruchou respirace, zvýšení aktivity komplexu IV zároveň naznačuje určitý protektivní vliv této látky na mitochondrie. Zároveň prokázala i dostatečnou míru inhibice MAO, což může být přidanou hodnotou hlavního terapeutického účinku. Ostatní testované látky můžeme s ohledem na výsledky vyloučit z dalšího výzkumu.

Pro upřesnění možného terapeutického profilu a vhodnosti dalšího testování látky K1060 jako potencionálního nového kandidáta z řad multifunkčních inhibitorů ChE pro terapii AD je tedy nutné provést další upřesňující analýzy.

9. Reference

- Ahmed MM, Hoshino H, Chikuma T, Yamada M, Kato T. Effect of memantine on the levels of glial cells, neuropeptides, and peptide-degrading enzymes in rat brain regions of ibotenic acid-treated alzheimer's disease model. *Neuroscience* 2004; 126: 639-649.
- Alavi Naini SM, Soussi-Yanicostas N. Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015; 2015: 151979.
- Amici S, Lanari A, Romani R, Antognelli C, Gallai V, Parnetti L. Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase activity after long-term treatment with donepezil and rivastigmina. *Mechanisms of Ageing and Development* 2001; 122: 2057-2062.
- Arias E, Gallego-Sandin S, Villarroya M, Garcia AG, Lopez MG. Unequal neuroprotection afforded by the acetylcholinesterase inhibitors galantamine, donepezil, and rivastigmine in SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of nicotinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 315: 1346-1353.
- Arif M, Chikuma T, Ahmed MM, Nakazato M, Smith MA, Kato T. Effects of memantine on soluble A β (25-35)-induced changes in peptidergic and glial cells in Alzheimer's disease model rat brain regions. *Neuroscience* 2009; 164: 1199-1209.
- Arnold S, Goglia F, Kadenbach B. 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *European Journal of Biochemistry* 1998; 252: 325-330.
- Auriacombe S, Pere JJ, Loria-Kanza Y, Vellas B. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease who failed to benefit from treatment with donepezil. *Current Medical Research and Opinion* 2002; 18: 129-138.
- Bach AW, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, et al. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85: 4934-4938.

- Bailey JA, Ray B, Greig NH, Lahiri DK. Rivastigmine lowers Abeta and increases sAPPalpha levels, which parallel elevated synaptic markers and metabolic activity in degenerating primary rat neurons. *PLoS One* 2011; 6: e21954.
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434: 658-662.
- Ballard CG. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: benefits of dual cholinesterase inhibition. *European Neurology* 2002; 47: 64-70.
- Bartorelli L, Giraldi C, Saccardo M, Cammarata S, Bottini G, Fasanaro AM, et al. Effects of switching from an AChE inhibitor to a dual AChE-BuChE inhibitor in patients with Alzheimer's disease. *Current Medical Research and Opinion* 2005; 21: 1809-1818.
- Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1797: 698-709.
- Bender E, Kadenbach B. The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Letters* 2000; 466: 130-134.
- Bolea I, Juarez-Jimenez J, de Los Rios C, Chioua M, Pouplana R, Luque FJ, et al. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of donepezil and N-[(5-(benzyloxy)-1-methyl-1H-indol-2-yl)methyl]-N-methylprop-2-yn-1-amine hybrids as new multipotent cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 54: 8251-8270.
- Bosetti F, Brizzi F, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2002; 23: 371-376.

- Bunoust O, Devin A, Averet N, Camougrand N, Rigoulet M. Competition of electrons to enter the respiratory chain: a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 3407-3413.
- Bush AI, Tanzi RE. Therapeutics for Alzheimer's disease based on the metal hypothesis. *Neurotherapeutics* 2008; 5: 421-432.
- Butterfield DA, Sultana R. Methionine-35 of abeta(1-42): importance for oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of Amino Acids* 2011; 2011: 198430.
- Cai Z. Monoamine oxidase inhibitors: promising therapeutic agents for Alzheimer's disease (Review). *Molecular Medicine Reports* 2014; 9: 1533-1541.
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *American Journal of Physiology* 1998; 274: R1376-1383.
- Cardoso SM, Proença MT, Santos S, Santana I, Oliveira CR. Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets. *Neurobiology of Aging* 2004; 25: 105-110.
- Casademont J, Miro O, Rodriguez-Santiago B, Viedma P, Blesa R, Cardellach F. Cholinesterase inhibitor rivastigmine enhance the mitochondrial electron transport chain in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2003; 206: 23-26.
- Chandrasekaran K, Hatanpaa K, Brady DR, Rapoport SI. Evidence for physiological down-regulation of brain oxidative phosphorylation in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology* 1996; 142: 80-88.
- Chaturvedi RK, Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 63: 1-29.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 36027-36031.

- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *Journal of Cell Science* 2007; 120: 4155-4166.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews* 2010; 31: 139-170.
- Choi SW, Gerencser AA, Nicholls DG. Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *Journal of Neurochemistry* 2009; 109: 1179-1191.
- Cocco T, Pacelli C, Sgobbo P, Villani G. Control of OXPHOS efficiency by complex I in brain mitochondria. *Neurobiology of Aging* 2009; 30: 622-629.
- Connern CP, Halestrap AP. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochemical Journal* 1994; 302: 321-324.
- Cummings JL. (2011). Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. *Alzheimer's & Dementia* 2011; 7: e13-44.
- Davis KL, Powchik P. Tacrine. *Lancet* 1995; 345: 625-630.
- de la Torre, J. C. The vascular hypothesis of Alzheimer's disease: bench to bedside and beyond. *Neurodegenerative Diseases* 2010; 7: 116-121.
- Du H, Guo L, Fang F, Chen D, Sosunov AA, McKhann GM, et al. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 2008; 14: 1097-1105.
- Egashira T, Takayama F, Yamanaka Y. The inhibition of monoamine oxidase activity by various antidepressants: differences found in various mammalian species. *Japanese journal of pharmacology* 1999; 81: 115-121.
- Ekstedt B. Substrate specificity of the different forms of monoamine oxidase in rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 1976; 25: 1133-1138.

- Ellis JM. Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *The Journal of the American Osteopathic Association* 2005; 105: 145-158.
- Ezoulin MJ, Li J, Wu G, Dong CZ, Ombetta JE, Chen HZ, et al. Differential effect of PMS777, a new type of acetylcholinesterase inhibitor, and galanthamine on oxidative injury induced in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neuroscience Letters* 2005; 389: 61-65.
- Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y, Orr WC, Sohal RS. Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal* 2005; 390: 501-511.
- Fisar Z, Hroudova J, Raboch J. Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuroendocrinology letters* 2010; 31: 645-656.
- Folbergrova J, Jesina P, Haugvicova R, Lisy V, Houstek J. Sustained deficiency of mitochondrial complex I activity during long periods of survival after seizures induced in immature rats by homocysteic acid. *Neurochemistry International* 2010; 56: 394-403.
- Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Muller M. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* 2006; 79: 136-171.
- Fukui H, Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends in Neurosciences* 2008; 31: 251-256.
- Gibson GE, Sheu KF, Blass JP. Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *Journal of Neural Transmission* 1998; 105: 855-870.
- Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 1837-1845.

- Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Mendez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1995; 27: 583-596.
- Goglia F, Moreno M, Lanni A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Letters* 1999; 452: 115-120.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 2002; 84: 153-166.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-356.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-185.
- Harper ME, Brand MD. The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to the changed respiration rates of hepatocytes from rats of different thyroid status. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 14850-14860.
- Harper ME, Brand MD. Hyperthyroidism stimulates mitochondrial proton leak and ATP turnover in rat hepatocytes but does not change the overall kinetics of substrate oxidation reactions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1994; 72: 899-908.
- Hellstrom-Lindahl E, Moore H, Nordberg A. Increased levels of tau protein in SH-SY5Y cells after treatment with cholinesterase inhibitors and nicotinic agonists. *Journal of Neurochemistry* 2000; 74: 777-784.
- Hirst J. Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochemical Journal* 2010; 425: 327-339.
- Holper L, Ben-Shachar D, Mann JJ. Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease. *Neuropsychopharmacology* 2019; 44:, 837-849.

- Hroudova J, Fisar Z. Activities of respiratory chain complexes and citrate synthase influenced by pharmacologically different antidepressants and mood stabilizers. *Neuroendocrinology Letters* 2010; 31: 336-342.
- Hroudova J, Fisar Z. Connectivity between mitochondrial functions and psychiatric disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 2011; 65: 130-141.
- Hroudova J, Fisar Z. In vitro inhibition of mitochondrial respiratory rate by antidepressants. *Toxicology Letters* 2012; 213: 345-352.
- Hroudova J, Singh N, Fisar Z. Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *BioMed Research International* 2014; 2014: 175062.
- Hroudova J, Singh N, Fisar Z, Ghosh KK. Progress in drug development for Alzheimer's disease: An overview in relation to mitochondrial energy metabolism. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2016; 121: 774-784.
- Hroudová J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* 2017; 18: 7-10.
- Hutter E, Unterluggauer H, Garede A, Jansen-Durr P, Gnaiger E. High-resolution respirometry--a modern tool in aging research. *Experimental Gerontology* 2006; 41: 103-109.
- Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays in Biochemistry* 2008; 62: 643-723.
- Jann MW. Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Pharmacotherapy* 2010; 20: 1-12.
- Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1604: 77-94.
- Kadenbach B, Ramzan R, Wen L, Vogt S. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1800: 205-212.

- Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2011; 100: 311-319.
- Karbowski M, Neutzner A. Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathologica* 2012; 123: 157-171.
- Ki YS, Park EY, Lee HW, Oh MS, Cho YW, Kwon YK, et al. Donepezil, a potent acetylcholinesterase inhibitor, induces caspase-dependent apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2010; 33: 1054-1059.
- Kiray M, Bagriyanik HA, Pekcetin C, Ergur BU, Uysal N, Ozyurt D, et al. Deprenyl and the relationship between its effects on spatial memory, oxidant stress and hippocampal neurons in aged male rats. *Physiological research* 2006; 55: 205-212.
- Kirkland RA, Franklin JL. Bax affects production of reactive oxygen by the mitochondria of non-apoptotic neurons. *Experimental Neurology* 2007; 204: 458-461.
- Kispal G, Evans CT, Malloy C, Srere PA. Metabolic studies on citrate synthase mutants of yeast. A change in phenotype following transformation with an inactive enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 11204-11210.
- Kitani K, Minami C, Isobe K, Maehara K, Kanai S, Ivy GO, et al. Why (--)deprenyl prolongs survivals of experimental animals: increase of anti-oxidant enzymes in brain and other body tissues as well as mobilization of various humoral factors may lead to systemic anti-aging effects. *Mechanisms of ageing and development* 2002; 123: 1087-1100.
- Konstantinov AA, Peskin AV, Popova E, Khomutov GB, Ruuge EK. Superoxide generation by the respiratory chain of tumor mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1987; 894: 1-10.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, et al. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive

oxygen species generation. *Antioxidants & Redox Signaling* 2010; 12: 1431-1470.

Korabecny J, Musilek K, Holas O, Binder J, Zemek F, Marek J, et al. Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010a; 20: 6093-6095.

Korabecny J, Musilek K, Holas O, Nepovimova E, Jun D, Zemek F, et al. Synthesis and in vitro evaluation of N-(Bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules* 2010b; 15: 8804-8812.

Kristofikova Z, Ripova D, Hegnerova K, Sirova J, Homola J. Protein tau-mediated effects on rat hippocampal choline transporters CHT1 and tau-amyloid beta interactions. *Neurochemical Research* 2013; 38: 1949-1959.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* 2007; 87: 99-163.

Kumar A, Prakash A, Pahwa D. Galantamine potentiates the protective effect of rofecoxib and caffeic acid against intrahippocampal Kainic acid-induced cognitive dysfunction in rat. *Brain Research Bulletin* 2011; 85: 158-168.

Kysenius K, Brunello CA, Huttunen HJ. Mitochondria and NMDA receptor-dependent toxicity of berberine sensitizes neurons to glutamate and rotenone injury. *PLoS One* 2014; 9: e107129.

Lee I, Bender E, Arnold S, Kadenbach B. New control of mitochondrial membrane potential and ROS formation--a hypothesis. *Biological Chemistry* 2001; 382: 1629-1636.

Lee I, Bender E, Kadenbach B. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002; 234-235: 63-70.

- Lim YA, Grimm A, Giese M, Mensah-Nyagan AG, Villafranca JE, Ittner LM, et al. Inhibition of the mitochondrial enzyme ABAD restores the amyloid-beta-mediated deregulation of estradiol. *PLoS One* 2011; 6: e28887.
- Lipton SA. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *Journal of Alzheimer's Disease* 2004; 6: S61-74.
- Lipton, SA. The molecular basis of memantine action in Alzheimer's disease and other neurologic disorders: low-affinity, uncompetitive antagonism. *Current Alzheimer Research* 2005; 2: 155-165.
- Liu X, Xu K, Yan M, Wang Y, Zheng X. Protective effects of galantamine against Abeta-induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Neurochemistry International* 2010; 57: 588-599.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-275.
- Lu C, Zhou Q, Yan J, Du Z, Huang L, Li X. A novel series of tacrine-selegiline hybrids with cholinesterase and monoamine oxidase inhibition activities for the treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 62: 745-753.
- Ludwig B, Bender E, Arnold S, Huttemann M, Lee I, Kadenbach B. Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation. *Chembiochemistry* 2001; 2: 392-403.
- Maccioni RB, Farias G, Morales I, Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research* 2010; 41: 226-231.
- Maelicke A. Allosteric modulation of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 2000; 11 Suppl 1: 11-18.
- Maes M, Fišar Z, Medina M, Scapagnini G, Nowak G, Berk M. New drug targets in depression: inflammatory, cell-mediated immune, oxidative and nitrosative stress,

- mitochondrial, antioxidant, and neuroprogressive pathways. And new drug candidates--Nrf2 activators and GSK-3 inhibitors. *Inflammopharmacology* 2012; 20: 127-150.
- Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 23: 134-147.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 2008; 60: 748-766.
- McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiological Reviews* 1990; 70: 391-425.
- Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, Quack G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Research* 2002; 958:210-21.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148.
- Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 1966; 41: 445-502.
- Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian Journal of Psychiatry* 2009; 51: 55-61.
- Muirhead KE, Borger E, Aitken L, Conway SJ, Gunn-Moore FJ. The consequences of mitochondrial amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Biochemical Journal* 2010; 426: 255-270.
- Munguia ME, Govezensky T, Martinez R, Manoutcharian K, Gevorkian G. Identification of amyloid-beta 1-42 binding protein fragments by screening of a human brain cDNA library. *Neuroscience Letters* 2006; 397: 79-82.
- Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434: 652-658.

- Naoi M, Maruyama W, Akao Y, Yi H, Yamaoka Y. Involvement of type A monoamine oxidase in neurodegeneration: regulation of mitochondrial signaling leading to cell death or neuroprotection. *Journal of neural transmission. Supplementum*. 2006; (71): 67-77.
- Napiwotzki J, Kadenbach B. Extramitochondrial ATP/ADP-ratios regulate cytochrome c oxidase activity via binding to the cytosolic domain of subunit IV. *Biological Chemistry* 1998; 379: 335-339.
- Nepovimova E, Korabecny J, Dolezal R, Babkova K, Ondrejicek A, Jun D, et al. Tacrine-Troxolone 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: 8985-9003.
- Neve RL, McPhie DL. The cell cycle as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics* 2006; 111: 99-113.
- Nicholls DG, Vesce S, Kirk L, Chalmers S. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium* 2003; 34: 407-424.
- Nieoullon A. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease: further comments on their mechanisms of action and therapeutic consequences. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* 2010; 8: 123-131.
- Nuskova H, Vrbacky M, Drahota Z, Houstek J. Cyanide inhibition and pyruvate-induced recovery of cytochrome c oxidase. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2010; 42: 395-403.
- Papa S, Scacco S, Sardanelli AM, Petruzzella V, Vergari R, Signorile A, et al. Complex I and the cAMP cascade in human physiopathology. *Bioscience Reports* 2002; 22: 3-16.
- Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 1990; 40: 1302-1303.
- Parker WD Jr, Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK. Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 1994; 44: 1090-1096.

- Parnetti L, Amici S, Lanari A, Romani C, Antognelli C, Andreasen N, et al. Cerebrospinal fluid levels of biomarkers and activity of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase in AD patients before and after treatment with different AChE inhibitors. *Neurological Sciences* 2002; 23 Suppl 2: S95-96.
- Pesta D, Gnaiger E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. *Methods in Molecular Biology* 2012; 810: 25-58.
- Polinsky RJ. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics* 1998; 20: 634-647.
- Raha S, McEachern GE, Myint AT, Robinson BH. Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; 29: 170-180.
- Ramzan R, Staniek K, Kadenbach B, Vogt S. Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1797: 1672-1680.
- Rizzuto R, Bernardi P, Pozzan T. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *The Journal of Physiology* 2000; 529: 37-47.
- Rodriguez-Hernandez A, Cordero MD, Salviati L, Artuch R, Pineda M, Briones P, et al. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy* 2009; 5: 19-32.
- Rogawski MA. What is the rationale for new treatment strategies in Alzheimer's disease? *CNS Spectrums* 2004; 9: 6-12.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica Chimica Acta* 1994; 228: 35-51.
- Rusina R, Matěj R, a kol. Neurodegenerativní onemocnění. Praha: Mladá fronta a.s., 2014: 102.

- Saada A, Shaag A, Mandel H, Nevo Y, Eriksson S, Elpeleg O. Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nature Genetics* 2001; 29: 342-344.
- Scaini G, Santos PM, Benedet J, Rochi N, Gomes LM, Borges LS, et al. Evaluation of Krebs cycle enzymes in the brain of rats after chronic administration of antidepressants. *Brain Research Bulletin* 2010; 82: 224-227.
- Sherif F, Gottfries CG, Alafuzoff I, Oreland L. Brain gamma-aminobutyrate aminotransferase (GABA-T) and monoamine oxidase (MAO) in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section* 1992; 4: 227-240.
- Singh N, Hroudová J, Fišar Z. In Vitro Effects of Cognitives and Nootropics on Mitochondrial Respiration and Monoamine Oxidase Activity. *Molecular Neurobiology* 2017, 54: 5894-5904.
- Sjovall F, Morota S, Hansson MJ, Friberg H, Gnaiger E, Elmer E. Temporal increase of platelet mitochondrial respiration is negatively associated with clinical outcome in patients with sepsis. *Critical Care* 2010; 14: R214.
- Solmaz SR, Hunte C. Structure of complex III with bound cytochrome c in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 17542-17549.
- Soukup O, Jun D, Zdarova-Karasova J, Patocka J, Musilek K, Korabecny J, et al. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Current Alzheimer Research* 2013; 10: 893-906.
- Srere PA. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7 Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods in Enzymology* 1969; 13: 3-11.
- Starkov AA. "Mild" uncoupling of mitochondria. *Bioscience Reports* 1997; 17: 273-279.
- Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, 1147: 37-52.
- Sterling J, Herzig Y, Goren T, Finkelstein N, Lerner D, Goldenberg W, et al. Novel dual inhibitors of AChE and MAO derived from hydroxy aminoindan and

- phenethylamine as potential treatment for Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45: 5260-5279.
- Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. (2010). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010; 20 Suppl 2: S265-279.
- Takada Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, et al. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 306: 772-777.
- Telford JE, Kilbride SM, Davey GP. Complex I is rate-limiting for oxygen consumption in the nerve terminal. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 9109-9114.
- Tomitsuka E, Kita K, Esumi H. Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 2009; 85: 258-265.
- Tozzi A, Costa C, Di Filippo M, Tantucci M, Siliquini S, Belcastro V, et al. Memantine reduces neuronal dysfunctions triggered by in vitro ischemia and 3-nitropropionic acid. *Experimental Neurology* 2007; 207: 218-226.
- Trounce IA, Kim YL, Jun AS, Wallace DC. Assessment of mitochondrial oxidative phosphorylation in patient muscle biopsies, lymphoblasts, and transmitochondrial cell lines. *Methods in Enzymology* 1996; 264: 484-509.
- Trumpower BL. The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc₁ complex. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 11409-11412.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2003; 552: 335-344.
- Valasani KR, Sun Q, Hu G, Li J, Du F, Guo Y, et al. Identification of human ABAD inhibitors for rescuing Aβ-mediated mitochondrial dysfunction. *Current Alzheimer Research* 2014; 11: 128-136.

- Velot C, Srere PA. Reversible transdominant inhibition of a metabolic pathway. In vivo evidence of interaction between two sequential tricarboxylic acid cycle enzymes in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 12926-12933.
- Viola HM, Hool LC. Qo site of mitochondrial complex III is the source of increased superoxide after transient exposure to hydrogen peroxide. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 49: 875-885.
- Wagstaff AJ, McTavish D. Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs & Aging* 1994; 4: 510-540.
- Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry* 2007; 101: 1172-1184.
- Wang L, Esteban G, Ojima M, Bautista-Aguilera OM, Inokuchi T, Moraleda I, et al. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 80: 543-561.
- Wilson DF, Chance B. Azide inhibition of mitochondrial electron transport. I. The aerobic steady state of succinate oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1967; 131: 421-430.
- Wong DT, Horng JS, Gordee RS. Respiratory chain of a pathogenic fungus, *Microsporium gypseum*: effect of the antifungal agent pyrrolnitrin. *Journal of Bacteriology* 1971; 106: 168-173.
- Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences* 1989; 12: 94-101.
- Wood WG, Li L, Müller WE, Eckert GP. Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *Journal of Neurochemistry* 2014; 129: 559-572.
- Ye CY, Lei Y, Tang XC, Zhang HY. Donepezil attenuates Abeta-associated mitochondrial dysfunction and reduces mitochondrial Abeta accumulation in vivo and in vitro. *Neuropharmacology* 2015; 95: 29-36.

Youdim MB, Bakhle YS. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology* 2006; 147 Suppl 1: S287-296.

Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7: 295-309.

Zemek F, Drtinova L, Nepovimova E, Sepsova V, Korabecny J, Klimes J, et al. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opinion on Drug Safety* 2014; 13: 759-774.

Zotova E, Nicoll JA, Kalaria R, Holmes C, Boche D. Inflammation in Alzheimer's disease: relevance to pathogenesis and therapy. *Alzheimer's Research & Therapy* 2010; 2: 1.

Elektronické zdroje:

Anonym. Dementia. In: *World Health Organization official website*. 2017. Dostupné na URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
Přístup 13. 5. 2019