

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



Diplomová práce

Příprava fenylsubstituovaných benzothiazolů jako potencionálních modulátorů ABAD

Matěj Chřibek

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

13. května 2016

Poděkování

Chtěl bych velmi poděkovat svému vedoucímu práce prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D., dále konzultantům Mgr. Lukáši Hrochovi, Mgr. Ondřeji Benkovi a doc. PharmDr. Kamilu Musílkovi, Ph.D za cenné rady, bez jejichž pomoci by tato práce nemohla vzniknout.

Za měření NMR spekter děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za měření HRMS spekter děkuji Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi Ph.D.

Za měření aktivity jednotlivých sloučenin děkuji pracovní skupině prof. Frank Gunn-Moore z University of St. Andrews.

Zde bych rád poděkoval rodině, přátelům a kolegům, kteří mě podporovali nejen během tvorby diplomové práce, ale i během celého studia.

Vypracování diplomové práce bylo podpořeno Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (GAUK B-CH/992214).

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 13. května 2016

.....

Univerzita Karlova v Praze,

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové © 2016 Matěj Chřibek. Všechna práva vyhrazena.

Tato práce vznikla jako školní dílo na Univerzitě Karlově v Praze, Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Práce je chráněna právními předpisy a mezinárodními úmluvami o právu autorském a právech souvisejících s právem autorským. K jejímu užití, s výjimkou bezúplatných zákonných licencí, je nezbytný souhlas autora.

Odkaz na tuto práci

Matěj Chřibek. *Příprava fenylsubstituovaných benzothiazolů jako potencionálních modulátorů ABAD: Diplomová práce.* Hradec Králové: UK v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2016.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: Matěj Chříbek

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Název práce: Příprava fenylysubstituovaných benzothiazolů jako potencionálních modulátorů ABAD

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní onemocnění, které způsobuje úbytek kognitivních funkcí. Typická je ztráta paměti, změny chování a osobnosti. Mezi typické patologické znaky této nemoci patří senilní plaky a neurofibrilární shluky hyperfosforylovaného τ -proteinu. V současné době neexistuje kauzální léčba, jelikož etiologie zůstává, i přes obrovský zájem vědců, stále neobjasněna.

Současná hypotéza předpokládá toxické působení rozpustné formy beta amyloidu ($A\beta$) uvnitř buňky, mimo jiné také v mitochondriích. Je známo mnoho intracelulárních proteinů, se kterými $A\beta$ interaguje, mezi nimi také amyloid vázající alkoholdehydrogenasa (ABAD). Bylo ukázáno, že interakce $A\beta$ -ABAD následně vede ke změně funkce ABAD a způsobuje mitochondriální dysfunkci, což vede k buněčné smrti. Proto inhibice $A\beta$ -ABAD, spolu s inhibicí ABAD se jeví jako potencionální farmakologický cíl.

Cílem této práce bylo připravit deriváty benzothiazolyl močoviny jako potenciální modulátory ABAD a následně otestovat jejich inhibiční aktivitu. Strukturně vychází z imunopresiva frentizolu, u kterého se ukázaly mírné inhibiční účinky na ABAD ($IC_{50} = 200 \mu M$), a proto bylo připraveno několik sérií analogů s různými substitucemi.

V rámci diplomové práce bylo připraveno 21 potenciálních modulátorů ABAD. Byla stanovena *in vitro* jejich inhibiční aktivita vůči ABAD, výsledky byly vyjádřeny jako procentuální zbývající aktivita ABAD. Na základě získaných výsledků měření byly stanoveny vztahy mezi strukturou a účinkem připravených sloučenin.

13 sloučenin vykazuje inhibiční účinky vůči ABAD, 8 produktů účinky enzymu ABAD naopak zesilují. Sloučeniny s methoxy skupinou v poloze C6 benzo[*d*]thiazolu obecně vykazovaly mírně zvýšené inhibiční schopnosti oproti substituci chlorem nebo fluorem ve stejné pozici. Z hlediska inhibice byla substituce na benzenovém jádře v polohách C3 fluorem a C4 hydroxy skupinou nejúčinnější. Nejúčinnější inhibitor dokázal snížit aktivitu ABAD o více než 85 %.

Na druhou stranu nejvíce ABAD aktivovaly sloučeniny, obsahující v poloze C2 benzenového jádra methoxy skupinu a v poloze C4 fluor. Nejúčinnější aktivátor zvýšil aktivitu ABAD o více než 15 %.

Klíčová slova

Alzheimerova nemoc, Amyloid- β , Mitochondrie, Amyloid vázající alkoholdehydrogenasa, Frentizol

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Matěj Chřibek

Supervisor: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Title of Thesis: Preparation of phenyl derived benzothiazoles as potential ABAD modulators

Alzheimer's disease (AD) is neurodegenerative disease, which is characterized by progressive cognitive decline. Characteristic symptoms are memory loss, change of behaviour and personality. The pathological hallmarks of AD are senile plaques and neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated τ protein. Currently there is no causal treatment, because the aetiology stays unexplained, despite of intensive research.

Nowadays, the hypothesis assumes that soluble form of amyloid- β ($A\beta$) is associated with toxic effects inside the cells, among others in mitochondria. There are many intracellular proteins, which interact with $A\beta$, such as amyloid binding alcohol dehydrogenase (ABAD). Interaction $A\beta$ -ABAD with consequent alteration of ABAD function has been shown to cause mitochondrial dysfunction, consequently leading to the cell death. Therefore, inhibition of $A\beta$ -ABAD along with ABAD inhibition seems as a potential pharmacological target.

The aim of this thesis was to synthesize substituted benzothiazole ureas as potential modulators of ABAD and subsequently to test their inhibition

ability. New compounds are comprised of structure of frentizole, an immunosuppressive drug which displayed some minor inhibition ($IC_{50} = 200 \mu M$). This benzothiazole urea is relatively facile to modify, therefore there were synthesized several series of its analogues.

In the diploma thesis, 21 potential modulators of ABAD were synthesized. The structure activity relationship was determined from obtained results. The inhibition ability was determined *in vitro* against ABAD enzyme. The results were presented as percentage of remaining activity of ABAD enzyme.

13 compounds exert inhibition ability, 8 substances increase effects of ABAD enzyme. Slightly better inhibiting ability was observed in compounds with methoxy group at position C6 of benzo[*d*]thiazole scaffold in contrast with chlorine and fluorine at the same position. The inhibition activity of compounds with modifications of benzene scaffold at position C3 by fluorine and C4 by hydroxy group has been observed as the most satisfying, therefore, these compounds are suitable candidates for further evaluation. One compound was able to inhibit ABAD more than 85 % in comparison to the control.

On the other hand, compounds with modification of benzene scaffold at position C2 methoxy group and at position C4 fluorine exert activating ability of ABAD. The most potent activator of ABAD was able to activate the enzyme by more than 15 %.

Keywords

Alzheimer's disease, Amyloid- β , Mitochondria, Amyloid binding alcohol dehydrogenase, Frentizole

Obsah

Úvod	1
1 Cíl práce	3
2 Teoretická část	5
2.1 Alzheimerova nemoc	5
2.1.1 Historie	5
2.1.2 Epidemiologie	7
2.1.3 Rizikové faktory	9
2.1.4 Symptomy	10
2.1.5 Diagnóza	12
2.1.6 Současná terapie	13
2.2 Amyloid- β	15
2.2.1 Zpracování APP	15
2.2.2 Fyziologická role amyloidu- β	17
2.3 Intracelulární amyloid- β	17
2.4 Mitochondriální amyloid- β	21
2.4.1 Toxicita amyloidu- β	22
2.5 Enzymy interagující s amyloidem- β	24
2.6 Amyloid vázající alkoholdehydrogenasa	24
2.6.1 Struktura a fyziologická funkce	25
2.7 Souvislost ABAD s amyloidem- β	27

3	Experimentální část	31
3.1	Chemikálie a materiální vybavení	31
3.2	Design nových sloučenin	32
3.3	Příprava	33
3.3.1	Příprava meziproduktů	33
3.3.2	Příprava 1-(benzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl)-3-fenylmočoviny	35
3.4	Připravené meziprodukty	36
3.5	Seznam připravených sloučenin	37
3.6	Stanovení inhibičních parametrů	58
3.6.1	Princip metody	58
4	Výsledky a diskuse	61
	Závěr	67
	Literatura	69
5	Přílohy	81

Seznam obrázků

2.1	Porovnání zdravého mozku a mozku s AD	6
2.2	Graf vyjadřující stárnutí obyvatelstva	7
2.3	Graf odhadující počet lidí s demencí	8
2.4	Chemické struktury léčiv, používaných v léčbě AD	14
2.5	Zpracovávání APP	17
2.6	Fyziologická a patologická role amyloidu- β	18
2.7	Intracelulární amyloid- β	19
2.8	Vliv amyloid- β na mitochondrie	23
2.9	Mechanismus redukce karbonylové skupiny	26
2.10	Důsledky mitochondriálního amyloid- β	28
2.11	Interakce amyloid- β -ABAD, resp. amyloid- β -ABAD-DP	29
2.12	Chemická struktura frentizolu	30
3.1	Příprava meziprojektu	33
3.2	1. metoda přípravy aminů	33
3.3	2. metoda přípravy aminů	34
3.4	Příprava 1-(benzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl)-3-fenylmočoviny	35
3.5	Chemické struktury meziprojektů	36
3.6	Princip metody	58
3.7	Absorpční spektrum NAD ⁺ /NADH	59
4.1	Výsledný produkt - 1-(benzo[<i>d</i>]thiazol-2-yl)-3-fenylmočovina	63
4.2	Inhibice ABAD při fixní koncentraci inhibitoru 25 μ M	65

5.1	MiniMental State Examination	82
5.2	MoCA test	83
5.3	Test kreslení hodin	84
5.4	NMDA Receptor	85

Seznam použitých zkratek

ABAD amyloid binding alcohol dehydrogenase

ABAD-DP amyloid binding alcohol dehydrogenase-decoy peptide

A β beta amyloid

ACh acetylcholin

AChE acetylcholinesterasa

AChEI acetylcholinesterase inhibitor

AD alzheimer's disease

ADAM a disintegrin and metalloproteinase

AICD APP intracellular C-terminal domain

APP amyloid precursor protein

ApoE apolipoprotein E

ATP adenosine triphosphate

BACE1 β -site APP-cleaving enzyme 1

CNS centrální nervová soustava

CypD cyclophilin D

DNA deoxyribonucleic acid

DCM dichlormethan

DMF dimethylformamid

ER endoplasmatické retikulum

EtOH ethanol

HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethan-1-sulfonová kyselina

HRMS high resolution mass spektrometry

MeOH methanol

MMSE minimental state exam

NAD⁺ oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

NADH redukováaná forma nikotinamidadenindinukleotidu

NMDA *N*-methyl-*D*-aspartát

NMR nuclear magnetic resonance (spectroscopy)

Pd/C palladium on carbon

ROS reactive oxygen species

SAR vztah mezi strukturou a účinkem

SDR short-chain dehydrogenase/reductase

THF tetrahydrofuran

TIM translocase of inner mitochondrial membrane

TLC thin layer chromatography

TOM translocase of outer mitochondrial membrane

Úvod

Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease; AD) je progresivní onemocnění mozku, které významně omezuje každodenní život pacienta. AD byla popsána německým psychiatrem Aloisem Alzheimerem před více než sto lety. Přesnou etiologii však dosud neznáme. Podle Alzheimer's Disease International bylo na léčbu demencí vynaloženo v roce 2015 více než 818 miliard dolarů [1]. Nejedná se tedy jen o závažný zdravotnický problém, ale také socioekonomický problém. I nadále je tato nemoc považována za nevyléčitelnou.

Symptomatická léčba zlepšuje kvalitu života a způsobuje pouze dočasné zlepšení kognitivních funkcí. Mezi současně používané skupiny léčiv patří inhibitory acetylcholinesterasy a inhibitory *N*-methyl-*D*-aspartátových (NMDA) receptorů [2].

Vědci se snaží nalézt i jiné přístupy léčby AD, např. inhibitory cyklofilinu D (CypD) [3] či modulátory amyloid vázající alkoholdehydrogenasy (ABAD), aj. [4, 5].

ABAD je mitochondriální enzym, u něhož byla vypořazována a posléze ověřena interakce s beta amyloidem ($A\beta$), která vedla k mitochondriální dysfunkci. Je vhodné hlouběji prozkoumat molekulární mechanismus interakce $A\beta$ -ABAD, který způsobuje poškození mitochondriálních funkcí a současně buněčných funkcí [5].



Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo připravit deriváty benzothiazolyl močoviny jako potencionální modulátory ABAD s následným testováním jejich inhibiční aktivity a vyhodnocením vztahu mezi strukturou a účinkem připravených sloučenin. Struktura navržených molekul vychází z imunopresiva frentizolu, u kterého se ukázaly inhibiční účinky na ABAD, a proto bylo připraveno několik sérií analogů s různými substitucemi. Součástí práce je literární rešerše dané problematiky.

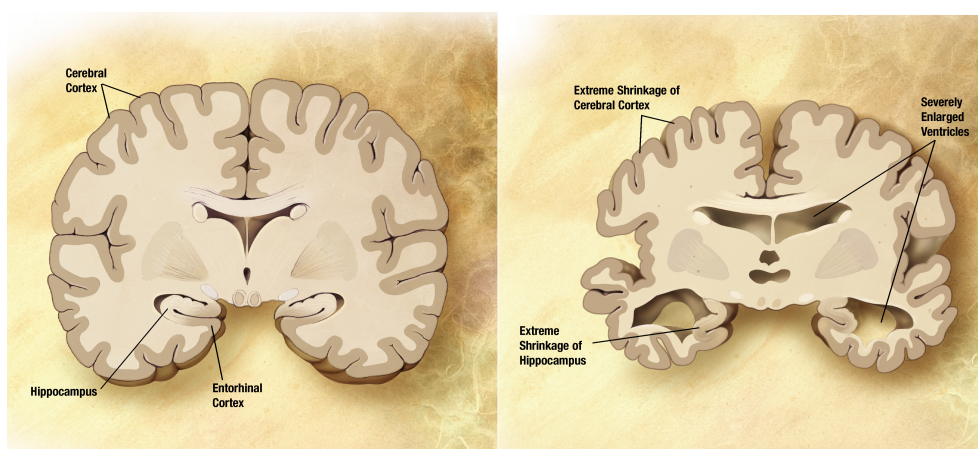
Teoretická část

2.1 Alzheimerova nemoc

AD je neurodegenerativní, dosud nevléčitelné onemocnění, charakteristické svým progresivním vývojem. Prevalence sporadické formy AD se po 65. roku života výrazně zvyšuje. Tato nemoc je spojená s postupným zhoršováním kognitivních funkcí, se ztrátou paměti a prostorové orientace [6]. Incidence AD se v současnosti neustále zvyšuje. Dochází při ní ke vzniku charakteristických patologických změn v mozku. Komplexní mechanismus vzniku této nemoci není známý, je však známo, že dochází k významné neuronální atrofii (viz obrázek 2.1), úbytku synapsí, k abnormálnímu hromadění $A\beta$ a ke vzniku tzv. neurofibrilárních klubek tvořených hyperfosforylovaným τ -proteinem [7].

2.1.1 Historie

Senilní demence je obecný pojem pro nemoc, která se projevuje jako úpadek mentálních schopností, ovlivňující mimo jiné základní funkce každodenního života [8, 9]. Nemoci způsobující stařecké demence existovaly již dávno předtím, než Alois Alzheimer popsal stav své pacientky. Můžeme konstatovat, že tyto nemoci provázely lidstvo od nepaměti. První koncept stařecké demence



Obrázek 2.1: Porovnání zdravého mozku a mozku s AD

[11]

formulovali antičtí Řekové [10]. Přibližně na konci druhého století po Kristu, římský učenec Aretheus z Kappadokie byl nejpravděpodobněji první, který popsal rozdíl mezi akutní a chronickou psychiatrickou poruchou. Popsal akutní reverzibilní stav, který byl nazván delirium a chronický stav, který nazval vyšší kognitivní porucha, jinými slovy demence [12].

Ve středověku se tématu senilní demence příliš nevěnovali. Další významný popis této demence poskytl až v 19. století otec moderní psychiatrie Philippe Pinel [12].

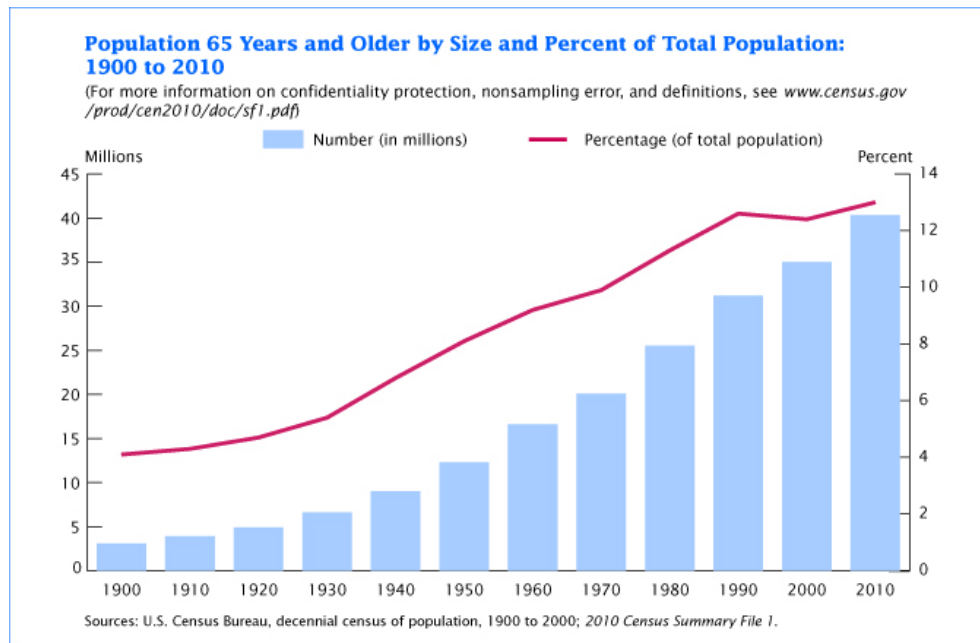
V roce 1907 Alois Alzheimer popsal zvláštní stav své pacientky Auguste Deter. Byla to 51 letá žena, která se vyjímalá relativně rychlým zhoršováním paměti společně s dalšími psychiatrickými poruchami - paranoia, agrese, zmatenost [13]. Po čtyřech letech zemřela. Alois Alzheimer zjistil nové patologické nálezy - neurofibrilární shluky a neidentifikovatelné plaky, o kterých informoval na 37. shromáždění psychiatrů. V roce 1910 použil spojení Alzheimerova choroba významný německý psychiatr Emil Kraepelin v osmé edici jeho textu Psychiatrie [13].

Výše zmíněné plaky byly izolovány v roce 1984 a popsány až o tři roky později jako plaky $A\beta$ [14, 15]. Některé zdroje uvádějí, že 90 % informací, které

známe o AD, vědci zjistili v posledních 15 letech [16].

2.1.2 Epidemiologie

Je všeobecně známo, že senilní demence zcela určitě souvisí s věkem. Existuje tedy přímá závislost mezi stárnutím obyvatelstva a nárůstem počtu lidí se senilní demencí (viz obrázek 2.2 a 2.3).



Obrázek 2.2: Graf vyjadřující stárnutí obyvatelstva

[17]

Je odhadováno, že exponenciální nárůst demencí postihne v následujících desetiletích zejména u populace s nižším sociálním kreditem (viz obrázek 2.3) [1]. Je velmi důležité zmínit, že v důsledku složité diagnostiky senilní demence, dochází k obrovským rozdílům mezi jednotlivými autory, co se týče počtu nemocných.

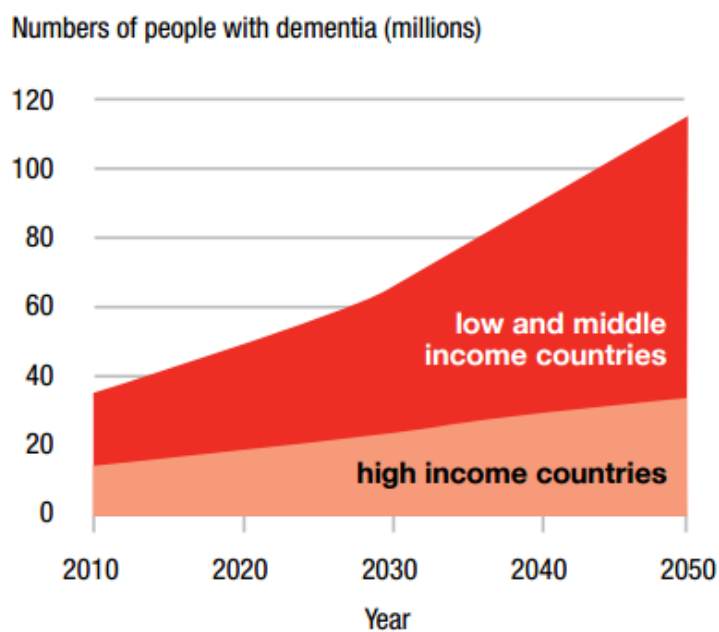
Odhaduje se, že AD je cca 60-80 % všech demencí [8]. Když vezmeme v potaz počty lidí s demencí od Alzheimer's Disease International, zjistíme, že v Evropě žilo v roce 2015 cca 10,46 milionů lidí s demencí, což znamená, že

2. TEORETICKÁ ČÁST

počet lidí trpících AD je mezi 6,2-8,4 miliony [1].

Bylo zjištěno, že ženy trpí AD častěji než muži. Dle Mátla a kol. se v České republice v roce 2013 odhaduje počet lidí s demencí na 143 000, z čehož dvě třetiny tvoří ženy [18]. Důvod je nejasný. Předpokládá se, že ženy obecně žijí déle než muži, ačkoli některé studie nenašly žádný významný rozdíl mezi ženami a muži [8].

Dle Americké Alzheimer's Association je AD 6. nejčastější příčinou úmrtí [8]. Vzhledem k odhadům se dá předpokládat, že bude stále častější příčinou úmrtí.



Obrázek 2.3: Graf vyjadřující odhad počtu lidí s demencí v následujících dekadách v závislosti na velikosti příjmu

[8]

2.1.3 Rizikové faktory

Přesné příčiny vzniku AD doposud nejsou známy, proto se v současné době jedná o onemocnění neznámé etiologie s některými popsány rizikovými faktory [19].

Mezi největší rizikové faktory patří věk. S přibývajícím věkem se riziko výrazně zvyšuje. Ačkoliv není jasné, zda způsobuje AD samotný věk nebo se přidávají i jiné vlivy [19]. Je třeba také zmínit fakt, že se zlepšuje zdravotní péče, a tudíž populace stárne. Některé zdroje uvádějí, že od 65 let se pravděpodobnost vzniku AD každých pět let zvyšuje téměř dvojnásobně [20].

Ukazuje se, že delší vzdělávání napomáhá k tvorbě tzv. kognitivní rezervy. Daná hypotéza je založena na předpokladu, že mozek jedince s větším vzděláním zvyšuje počet spojení mezi neurony a umožňuje kompenzovat změny v mozku, nastolené AD, prostřednictvím alternativních drah ke splnění daných kognitivních úkonů [8].

Existují dva typy AD - familiární a sporadická forma. Familiární forma se objevuje často již u lidí mladších 65 let. Zdroje se ovšem v prevalenci rozcházejí. Dle National Institute of Aging je to 5 % [21], dle Folche a kol. se uvádí 2 % [22].

Vědci zjistili, že mutace způsobující familiární formu AD se nacházejí na chromozomech 1, 14 a 21. Každá z těchto zmíněných mutací zapříčiňuje tvorbu $A\beta$. Na chromozomu 1 se nachází gen pro tvorbu proteinu presenilinu 2. Mutace genu na chromozomu 14 způsobuje tvorbu vadného presenilinu 1. Oba zmíněné preseniliny jsou základní fragmenty γ -sekretasy, nutné ke správnému fungování tohoto enzymu. Tyto mutace vedou ke zvýšení produkce méně rozpustného a více toxického $A\beta_{1-42}$. Poslední zmiňovaná je mutace genu pro APP na 21. chromozomu. Dochází tedy k produkci většího množství APP, a tudíž vzniká zvýšené množství $A\beta$ [21]. To je také důvod, proč lidé s Downovým syndromem jsou mnohem náchylnější k AD. Downův syndrom je důsledek trisomie 21. chromozomu [14].

Sporadická forma AD má významnou genetickou komponentu, a to z 50-70 %. Zhruba z poloviny se přičítá genu pro apolipoprotein E. *ApoE* se nachází na povrchu částic VLDL (Very Low Density Lipoprotein), které transportují triacylglyceroly z jater do periferních tkání [23]. Gen pro *ApoE* kóduje tři varianty proteinů - *ApoE* ϵ 2, *ApoE* ϵ 3, *ApoE* ϵ 4 [8, 14]. Nejčastěji se vyskytuje forma *ApoE* ϵ 3. Je přítomná u cca 60 % Američanů [8]. *ApoE* ϵ 2 je zakódována u 10-20 % populace, zato *ApoE* ϵ 4 u 20-30 %. Ve srovnání s *ApoE* ϵ 3 může *ApoE* ϵ 2 snižovat riziko jednotlivce, naopak *ApoE* ϵ 4 může riziko zvyšovat. Jinými slovy, jedinci, kteří zdědí jednu formu alely *ApoE* ϵ 4 mají přibližně 3× vyšší riziko vzniku AD. Na druhou stranu, pokud jedinec získá obě alely formy *ApoE* ϵ 4, má dokonce 8-12× větší riziko. Neznamená to však, že se AD u daného jedince rozvine [24, 25]. Některé zdroje ovšem uvádějí, že alela pro *ApoE* ϵ 4 je velmi silně spojena se zvýšenou depozicí A β [14].

Rizikových faktorů je však mnohem více (traumatické zranění mozku, faktory související s kardiovaskulární chorobou, sociální faktory, atd.) [8].

2.1.4 Symptomy

AD je charakterizována jako plíživá a nenápadná nemoc, která je mnohdy zaměňována za standardní součást stárnutí [26]. Příznaky nejsou vždy stejné, jež se mohou výrazně odlišovat mezi jednotlivci [9]. Problém ovšem je, že neurodegenerativní změny na mozku mohou nastat řadu let před tím, než se první symptomy vůbec objeví [27].

Nejvíce a nejdříve je zasažena oblast limbického systému, zejména hipokampu (viz obrázek 2.1). Správná funkce těchto částí mozku je nezbytná pro tvorbu nových paměťových stop. Proto již v počátcích onemocnění dochází k poruchám epizodické paměti, která zachovává vzpomínky, zážitky. [7, 26, 28, 29]. Co se týče časového intervalu, nejdříve je narušena paměť krátkodobá. V průběhu onemocnění se však těmto změnám nevyhne ani sémantická paměť, která ukládá naučené pojmy, vědomosti [26].

Jsou rozlišována tři stádia AD - mírná, středně závažná a závažná forma AD. To ovšem neznamená, že jednotlivec musí projít postupně jednotlivými stádii. Rozlišení slouží spíše k obecnému přehledu, jelikož se nemoc u každého vyvíjí jiným směrem. Stádia se tedy mohou prolínat [9, 27]. Např:

- Zhoršování paměti, která postupně rozvrací každodenní život
 - Komunikační obtíže (psaný i ústní projev)
 - Problémy v plánování a v řešení problémů
 - Obtížné a nejisté rozhodování
 - Problematické řešení složitějších úkonů
 - Časová i prostorová desorientace (nejprve v neznámém prostředí a později i ve známém prostředí)
 - Změny nálady a osobnosti (mohou se později objevit i psychické problémy (bludy, halucinace, agitace)
 - Inkontinence
 - Dezorientace (v posledním stádiu pacient nepozná ani vlastní rodinu)
- [8, 9]

2.1.5 Diagnóza

Prvotní diagnostiku provede nejčastěji okolí pacienta, které pozná změny chování a jednání [30]. Důležitá je včasná a hlavně správná diagnóza lékařem [9].

K diagnóze napomůže několik přístupů. Základ je osobní i rodinná anamnéza a samozřejmě klinické vyšetření [26]. Je třeba, aby pacient podstoupil několik neurologických testů (např. kognitivní testy).

Nejvíce se používá screeningový test kognitivních funkcí tzv. mini-mental state exam (MMSE) (viz příloha 5.1). Tento test však není plně spolehlivý. I člověk se skvělým výsledkem může být postižen AD [26]. Mnohem citlivější je výsledek testu, který má zobjektivizovat kognitivní poškození mozku. Nazývá se ACE-R neboli Addenbrook cognitive examination [31]. Existuje také alternativa MMSE, a sice MoCA (The Montreal Cognitive Assessment) test (viz příloha 5.2), vhodný spíše k záchytu počátečních stádií demencí. Oproti MMSE sleduje i jiné kognitivní funkce než paměť [30, 32]. Ke zvýšení specifity testů se používá test kreslení hodin (viz příloha 5.3) [32].

Pro potvrzení diagnózy je třeba využít tzv. markerů nemoci. Příkladem mohou být zobrazovací metody typu CT (Computer Tomography) nebo MRI (Magnetic Resonance Imaging), které mohou potvrdit či vyvrátit změny na mozku [8]. Nový náhled na problematiku představuje oblast biomarkerů. Bylo zjištěno, že v likvoru AD pacientů se nachází oproti lidem bez AD zvýšená hladina τ -proteinu a hyperfosforylovaného τ -proteinu a snížená hladina $A\beta_{1-42}$ (dochází ke zvýšené deponaci $A\beta$, proto je koncentrace v likvoru snížena) [26, 30, 32].

Vědci věří, že testy biomarkerů jsou slibná cesta, jak v budoucnu diagnostikovat nemoc již v prvních fázích onemocnění. To by mohlo znamenat včasný zásah lékařů a potenciální pozitivní ovlivnění průběhu nemoci [33].

2.1.6 Současná terapie

V roce 1982 vznikla první hypotéza vzniku AD. Byla to tzv. cholinerní hypotéza, která brala v potaz souvislost mezi sníženou hladinou neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) a projevy nemoci [2]. Na teoretickém podkladě této hypotézy se v klinické praxi používají inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI), což jsou sloučeniny, které zamezují rozkladu ACh na synapsích [15].

Výše zmíněné AChEI se považují za základ symptomatické léčby. Patří mezi ně donepezil, rivastigmin a galantamin [34].

2.1.6.1 Kompetitivní AChEI

Rivastigmin je derivát kyseliny karbamové. Mechanismus účinku spočívá v karbamoylaci aktivního místa AChE. Jedná se o reverzibilní inhibici. Na rozdíl od jiných karbamátových AChEI neobsahuje ve své molekule kvarterní, kladně nabitý dusík, a tudíž prochází přes hematoencefalickou bariéru. Tento průnik znamená působení v centrální nervové soustavě (CNS), a proto i pozitivní ovlivnění symptomů AD (viz obrázek 2.4) [2]. Rivastigmin se používá k léčbě lehkých až středně závažných stádií AD [35].

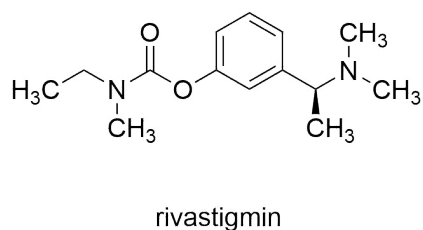
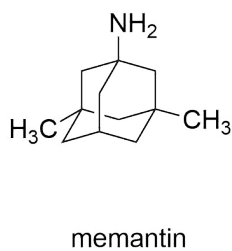
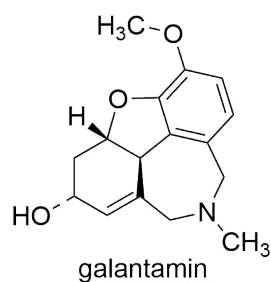
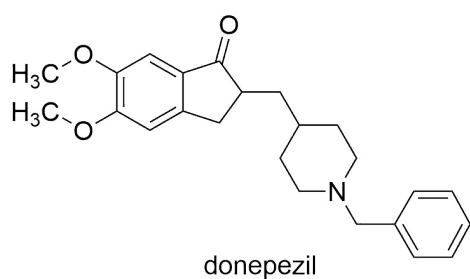
Galantamin je alkaloid, který byl izolován ze *Sněženky Woronovy* (*Galanthus Woronowii*) (viz obrázek 2.4) [2, 36]. V jeho struktuře můžeme nalézt tetracyklický skelet. Kromě inhibice AChE allostericky modifikuje nikotinové receptory, čímž dále podporuje cholinerní transmissi [37].

2.1.6.2 Nekompetitivní AChEI

Další používanou sloučeninou je donepezil (viz obrázek 2.4). Patří mezi nejúčinnější AChEI. Jeho výhodou je relativně vysoká selektivita i delší biologický poločas. Rovněž jako galantamin či rivastigmin se používá na mírné či středně závažné stádia demencí [38].

2.1.6.3 Inhibitory NMDA receptorů

Lékem volby pro středně závažné až těžké případy AD je memantin (viz obrázek 2.4). Jedná se o dimethylový derivát amantadinu. Mechanismus účinku spočívá v antagonizaci NMDA receptorů v CNS vazbou uvnitř kanálu receptoru (viz příloha 5.4). Jinými slovy tím brání aktivaci těchto receptorů při zvýšené koncentraci kyseliny glutamové, která je přítomná v CNS při AD [2].



Obrázek 2.4: Chemické struktury léčiv, používaných v léčbě AD

2.2 Amyloid- β

Robert Virchow, otec moderní patologie byl jeden z prvních, který použil termín amyloid. Popisoval amorfní strukturu, kterou mylně považoval za škrob (lat. *amylum*), ale ve skutečnosti se jednalo o strukturu proteinovou [39]. Název se však vžil natolik, že se používá i nadále.

V dnešní době se pod pojmem amyloid skrývají extracelulární, nerozpustné, fibrotické agregáty, jejichž charakteristikou je sekundárně získaná forma β -skládaného listu. Odtud plyne název, amyloid- β . Struktura β -skládaného listu je specifická tím, že je odolná vůči proteolytickému štěpení. Tyto špatně rozpustné proteiny mají tendenci se agregovat a kumulovat v tkáních ve formě dimerů nebo oligomerů, popř. vytvořit depozita v extracelulárním prostoru. Výše zmíněné může vést k různým onemocněním, např. amyloidosa nebo AD [40].

Původně amyloidní hypotéza předpokládala, že za degenerativní onemocnění je zodpovědné ukládání $A\beta$ ve formě senilních plaků, které jsou zodpovědné za zánět, oxidativní stres a hyperfosforylaci τ -proteinu. [5, 41]. V posledních letech však došlo k reinterpretaci této hypotézy [41]. Novější data ukazují, že rozpustné oligomery $A\beta$ jsou toxičtější než nerozpustné fibrily [5, 41].

2.2.1 Zpracování APP

$A\beta$ se tvoří z APP (Amyloid Precursor Protein) neboli z prekurzorového proteinu pro amyloid. APP je transmembránový glykoprotein, který obsahuje 695 aminokyselin [42]. Gen pro tento protein se nachází na 21. chromozomu, jak už bylo zmíněno výše (viz kapitola 2.1.3). Existují i APP s větším počtem aminokyselin, ale tyto varianty se nevyskytují v CNS [43]. Tento protein se může odbourávat dvěma cestami, a sice amyloidogenní nebo neamyloidogenní. Záleží na typu sekretasy, která provede první štěpení APP (viz obrázek 2.5) [44]. Není úplně jisté, jak jsou tyto cesty regulovány.

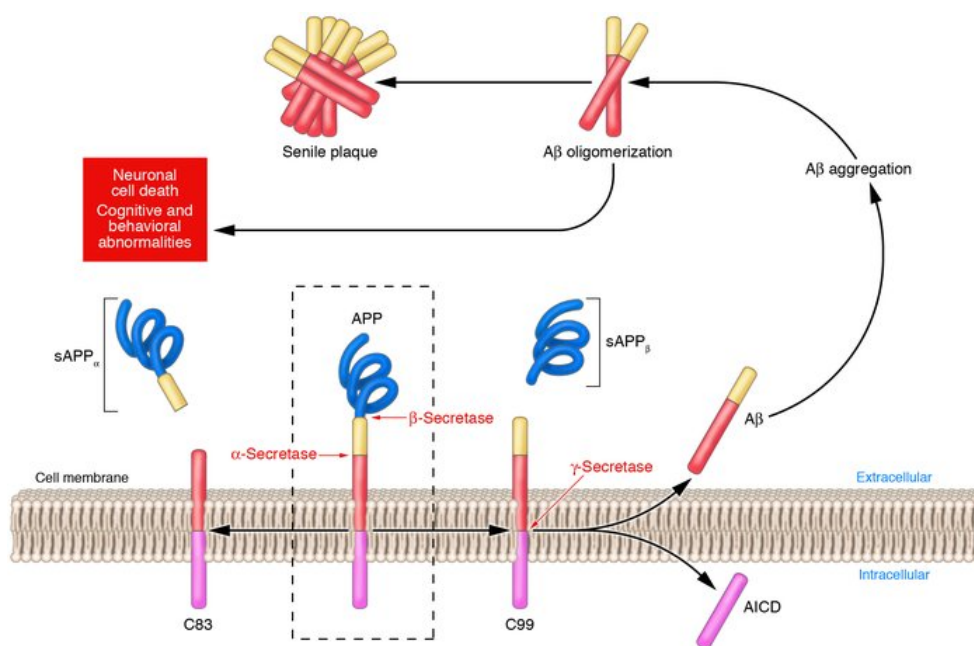
2.2.1.1 Neamyloidogenní cesta

Hlavní roli při neamyloidním štěpení APP má α -sekretasa, která patří do rodiny ADAM (a disintegrin and metalloproteases), zejména ADAM 9, 10, 17 (někdy také tumor necrosis factor- α converting enzyme; TACE) [45, 46]. Vytváří rozpustný fragment zvaný sAPP- α (soluble amyloid precursor protein- α), který má neuroprotektivní funkci. Z původního APP vzniká fragment o délce 83 aminokyselin (C83). Následuje vnitromembránový sestřih γ -sekretasou. γ -sekretasa je multiproteinový komplex složený z jednotlivých individuálních proteinů. Toto štěpení dává vzniku AICD (APP intracellular C-terminal domain) a extracelulárnímu proteinu p3 [40, 47]. Touto cestou se zpracuje asi 90 % APP [47].

2.2.1.2 Amyloidogenní cesta

Jak název napovídá, touto cestou vzniká $A\beta$. Za enzymatický proces je zodpovědný enzym zvaný BACE1 (β -site APP-cleaving enzyme 1), což je hlavní β -sekretasa v CNS [48]. Střihem APP nejdříve vzniká fragment C99. Číslo znamená počet aminokyselin [48] (někdy také $CT\beta$ [40] nebo $CTF\beta$ [47]). Tato část je poté zpracována γ -sekretasou, která vytváří extracelulární $A\beta$ a intracelulární AICD.

γ -sekretasa je nespecifický enzym, protože vytváří různé druhy $A\beta$. Tyto druhy se liší počtem aminokyselin, od 37 do 42. Hlavní produkt ve většině buněk je $A\beta_{1-40}$ [41]. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů $A\beta$ se liší mezi autory. Dle Godyňové a kol. je $A\beta_{1-40}$ zastoupen více než z 50 %, zbývající druhy ($A\beta_{1-37}$, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-42}$) jsou zastoupeny z 5-20 % [41]. Na druhou stranu dle Murphyho a kol. je to cca z 80-90 % $A\beta_{1-40}$ a z 5-10 % $A\beta_{1-42}$ [47]. $A\beta_{1-42}$ je hydrofobnější a více fibrilogenní a je také hlavním druhem v depozicích $A\beta$ v CNS [47].



Obrázek 2.5: Zpracovávání APP

[49]

2.2.2 Fyziologická role amyloidu- β

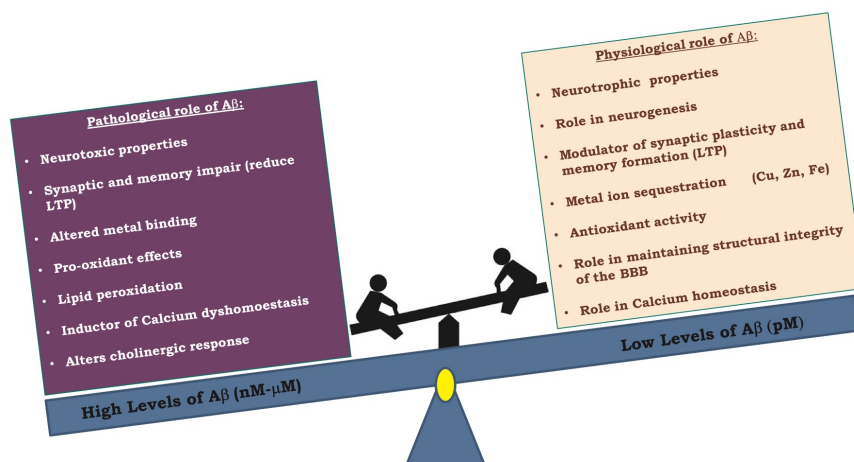
Ačkoliv A β ve vyšších koncentracích je neurotoxický a způsobuje smrt buněk, v nižších koncentracích je přítomen i ve zdravé CNS. Bylo zjištěno, že má důležitou roli v synaptické plasticitě a životaschopnosti neuronů [40].

Fyziologické role A β stručně shrnuje obrázek 2.6.

2.3 Intracelulární amyloid- β

Přítomnost extracelulárních plaků není vhodný indikátor závažnosti senilní demence. Zvýšená hladina intracelulárního A β_{1-42} mnohem přesněji reflektuje stadium neurodegenerace. Následkem tohoto zjištění se vědci mnohem více zaměřili na myšlenku, že by klíčovou roli v progresi AD mohl hrát A β uvnitř buňky, zejména v mitochondriích [4].

Několik studií s transgenními modely ukázalo, že A β se akumuluje nejdříve



Obrázek 2.6: Fyziologická a patologická role amyloidu- β

Dostupné z: [40]

intraneuronálně, než se objeví ve formě amyloidních plaků. Tento poznatek byl ověřen na *post-mortem* mozcích s AD a Downovým syndromem [50]. Intraneuronální kompartment je také místo, kde $A\beta$ může oligomerizovat v toxické agregáty, které mohou ovlivnit synaptickou plasticitu mozku, způsobit kognitivní úpadek a rozpoutat prozánětlivou reakci [50].

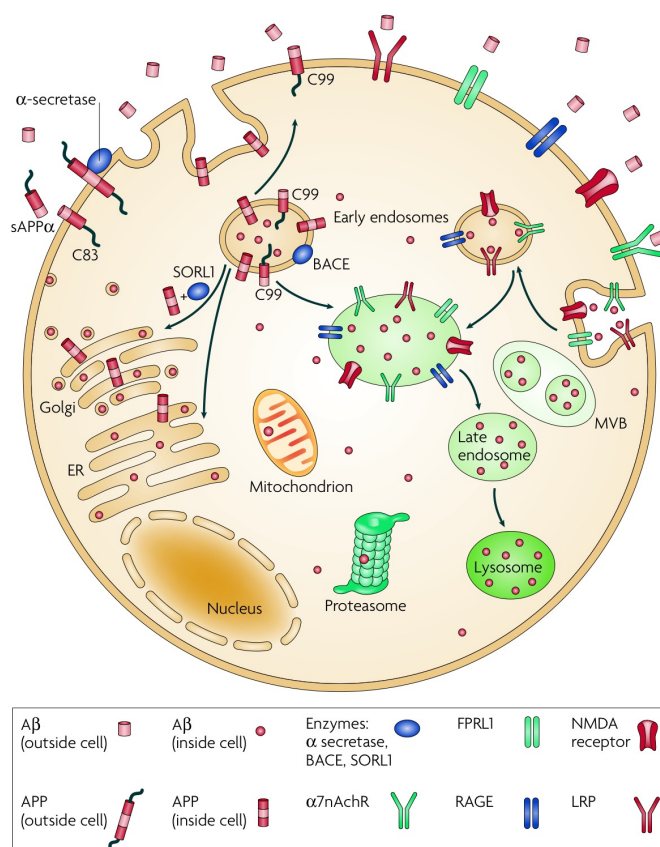
Ačkoliv existuje spousta důkazů, že $A\beta$ se akumuluje intracelulárně, je důležité si uvědomit, jak se do buněk dostane. APP se nenachází jen na plazmatické membráně, ale i v Golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu (ER), endosomech, lysosomech a na mitochondriální membráně [4, 51].

Zdá se, že $A\beta$ je převážně produkován v plazmatické membráně nebo v rámci sekreční cesty, proto je většina $A\beta$ rychle odstraněna z buňky. Je však velmi pravděpodobné, že APP vzniká také intracelulárně [51]. Z důvodu různé lokalizace $A\beta$ a sekretas je obtížné vysvětlit přítomnost $A\beta$ v cytosolu [4].

Dle některých studií se $A\beta$ může vmezeřit ve vysokých koncentracích do lipidových membrán, což vede ke ztrátě integrity endosomů a lysosomů s následným únikem $A\beta$ do okolí. Mechanismy, které popisují pohyb $A\beta$ v rámci

buňky nejsou zcela objasněny [4].

Kromě toho, že $A\beta$ se produkuje intracelulárně, je také možné, že $A\beta$, který byl dříve sekretován, může být zpětně internalizován skrze některé transportéry (viz obrázek 2.7) [4].



Obrázek 2.7: APP je skrz sekreční systém veden na plazmatickou membránu, kde je přednostně rozštěpen α -sekretasou (viz kapitola 2.2.1.1). Nezpracovaný APP může být internalizován časnými endosomy. Pokud je přítomen enzym sortilin related receptor (SORL1), může dojít k navrácení APP do Golgiho aparátu. Časné endosomy obsahují nejen BACE1 enzymy, ale i optimální pH pro jejich aktivitu. Fragment C99 (viz kapitola 2.2.1.2) může být zpracován γ -sekretasou v ER, v plazmatické membráně nebo v systému endosom/lysosom. Extracelulární $A\beta$ se může navázat na povrchové receptory, prostřednictvím kterých mohou být internalizovány do časných endosomu, ale i do ER, Golgiho aparátu, mitochondrie či cytosolu [51].

Dostupné z: [51]

Jiné studie tvrdí, že endocytóza je regulována dynamin-dependentní a cestou zprostředkovanou RhoA (Ras homolog gene family, member A) [52]. Podle jiné studie k akumulaci $A\beta$ dochází skrz nesaturovanou cestu, nezávislou na energii a endocytóze [52].

Studie provedené na lidských mozcích odhalily, že většina intracelulárního $A\beta$ se skládá z $A\beta_{1-42}$. Imunohistochemické studie ukázaly, že hladiny $A\beta_{1-42}$ se snižují v pokročilejších stádiích AD [4].

2.4 Mitochondriální amyloid- β

Mitochondrie je organela v eukaryotní buňce, hrající klíčovou roli v ontogenezi buňky. Je složena ze dvou membrán, oddělených mezimembránovým prostorem a matrix. V mitochondriální matrix se odehrávají životně důležité pochody, např. Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin. Na vnitřní membráně se nachází pět komplexů respiračního řetězce, který je zodpovědný za tvorbu ATP v rámci oxidativní fosforylace. Jako vedlejší produkty při syntéze ATP vznikají volné radikály (Reactive Oxygen Species; ROS) [52].

Nejen, že tyto organely jsou zásadní pro energetický metabolismus buňky, ale regulují také buněčnou smrt, ke které působení $A\beta$ postupně spěje [53]. Mitochondriální hypotézu, představil světu Swerdlow a kol. ve svém článku „A mitochondrial cascade hypothesis for sporadic Alzheimer’s disease“ již v roce 2004 [54]. Mitochondriální dysfunkce se následně projevuje v podobě depozice $A\beta$, synaptické degenerace či formace neurofibrilárních shluků [53, 54]. Od té doby se vědecká komunita zaměřila na možnou souvislost mezi přítomností $A\beta$ a dysfunkcí mitochondrií.

Mitochondriální akumulace $A\beta$ byla prokázána nejen u transgenních myších mozků, ale také u pacientů s AD, ještě před vznikem senilních plaků [53, 55]. Tyto poznatky potvrzují hypotézu kaskády toxického intracelulárního $A\beta$, která předpokládá, že toxicita $A\beta$ by mohla být zapříčiněna rozpustnými agregáty spíše než extracelulárními nerozpustnými plaky [5, 55].

Jakým způsobem se $A\beta$ dostane do mitochondrie, je dosud předmětem mnoha hypotéz. Někteří autoři jsou přesvědčeni, že oligomery $A\beta$ na rozdíl od monomeru $A\beta$ mají schopnost měnit permeabilitu membrány [56]. Nejnovější poznatky ovšem ukazují, že nejpravděpodobnější varianta průchodu $A\beta$ je skrz specifické transportéry TOM 40 (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane) a TIM23 (Translocase of the Inner mitochondrial Membrane) [5, 55, 57, 58, 59].

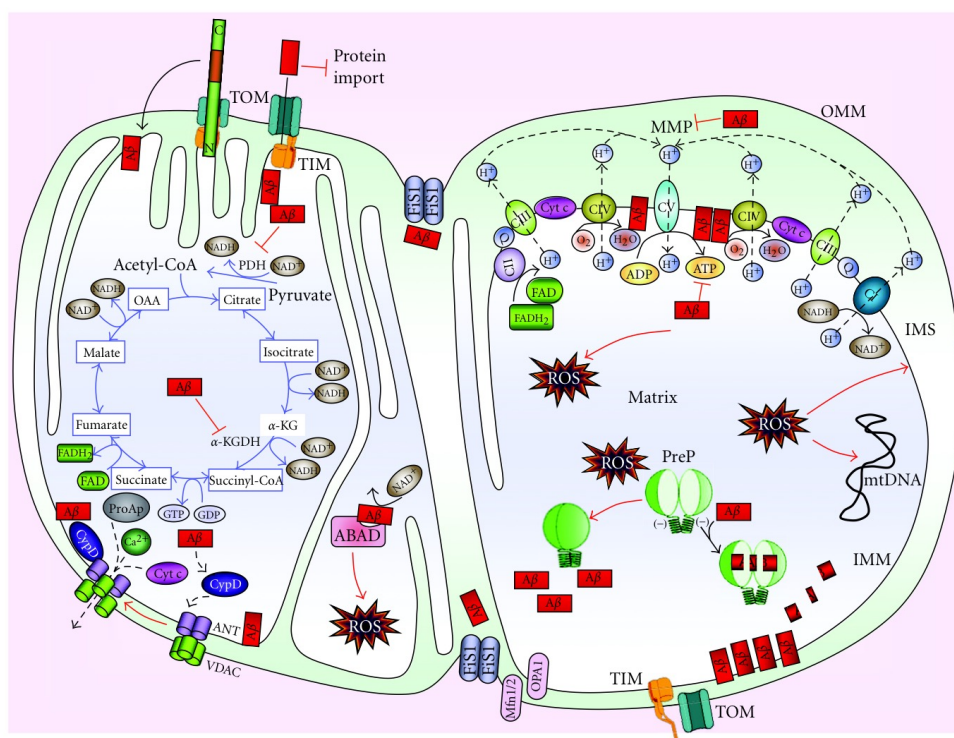
Některé zdroje také uvádí, že i APP může interagovat s transportéry

TOM a TIM. Dle Pavlova a kol. obsahuje *N*-konec APP tzv. mitochondriální cílovou sekvenci, což jsou pozitivně nabitě aminokyseliny v polohách 40,44 a 51. Obsahuje taktéž tzv. kyselou brzdící translokační sekvenci, což je doména o 70 aminokyselinách (polohy 220-290 od *N*-konce), bohatá na kyselce reagující aminokyseliny. Tato doména zabrzdí APP uvnitř transportéru [57]. Následně dochází buď k degradaci APP prostřednictvím HtrA2 (High-Temperature Requirement serin proteasa A2) v mezimembránovém prostoru nebo se vytvoří superkomplex APP s TOM i TIM a dochází k zablokování importu důležitých nově nasyntetizovaných proteinů, esenciálních v elektronovém transportním systému (viz obrázek 2.8) [55, 57, 59, 60].

2.4.1 Toxicita amyloidu- β

Již delší dobu je známo, že $A\beta$ poškozuje mitochondrie, což vede k další kaskádě dějů uvnitř buňky. Příkladem může být [5, 52, 53, 55, 61] (viz obrázek 2.8):

- poškození dýchacího řetězce a tím porucha energetického metabolismu
- zvýšený oxidativní stres (ROS)
- negativní ovlivnění vápníkové homeostázy
- porucha mitochondriální DNA
- změny v počtu mitochondrií
- změny velikosti mitochondrií
- indukce apoptózy
- poškození membrán

Obrázek 2.8: Vliv amyloid- β na mitochondrie

Dostupné z: [55]

APP, respektive $A\beta$ způsobuje blokádu importu *de novo* nasyntetizovaných proteinů z cytosolu, např. podjednotky komplexu IV, důležité pro dýchací řetězec. Dle Paganiho a kol. importní deficit v krátkodobém horizontu není dostatečný na to, aby poškodil integritu mitochondrií, ale z dlouhodobého hlediska způsobuje dysfunkci mitochondrií a tím ještě prohlubuje importní deficit. $A\beta$ může způsobovat deficit přímým i nepřímým působením na importní mechanismus [55, 57].

$A\beta$ může ovlivňovat vnitřní i vnější mitochondriální membránu různými mechanismy včetně ovlivňování jejich permeability [55].

Předpokládá se, že $A\beta$ může ovlivňovat aktivitu některých enzymů, např. pyruvátdehydrogenasy a 2-oxoglutarátdehydrogenasy, čímž snižuje redukcí NAD^+ na $NADH$, a tak redukuje i koncentraci protonů. Ty jsou esenciální k udržení mitochondriálního membránového potenciálu, který je nutný k tvorbě

ATP. Při snížení ATP dochází ke zvýšené tvorbě ROS. ROS blokují degradaci $A\beta$, způsobují peroxidaci mitochondriální DNA nebo mitochondriálních lipidů, které zhoršují funkci mitochondrií [61].

2.5 Enzymy interagující s amyloidem- β

Konkrétní molekulární mechanismus, kterým by $A\beta$ způsoboval toxicitu v mitochondriích, zatím nebyl stanoven. Nicméně, bylo prokázáno u mnoha mitochondriálních proteinů, že přímo interagují s $A\beta$. Tyto interakce mohou zcela změnit jejich fyziologické funkce a následně spustit mitochondriální kaskádu, vedoucí k jejich dysfunkci, ústící v progresi AD [62].

Nejvíce popsány intracelulární proteiny vázající $A\beta$ je ABAD, o kterém pojednávají kapitoly 2.6 a 2.7.

Pro přehled je také vhodné zmínit další proteiny, se kterými $A\beta$ interaguje, a sice CypD, kreatinkinasa, γ -sekretasa a mnoho dalších. Dle Benka a kol. existuje přes 20 možných interakčních „partnerů“ $A\beta$. Navíc je pravděpodobné, že toto číslo není konečné [62].

2.6 Amyloid vázající alkoholdehydrogenasa

Yan a kol. v roce 1997 poprvé popsali enzym, který pojmenovali - ERAB (endoplasmic-reticulum associated $A\beta$ binding protein). Ve skutečnosti to byl enzym, lokalizovaný v mitochondriální matrix a později byl pojmenován jako ABAD [5]. Jak už název napovídá, enzym patří mezi dehydrogenasy, přesněji mezi SDR (Short-chain Dehydrogenase/Reductase) oxidoreduktasy. Jeho aktivita je závislá na kofaktoru $NAD^+/NADH$ [5].

V minulosti měl tento enzym velké množství názvů. Názvy se totiž odvíjely podle substrátů, které je enzym schopen katalyzovat [5]. Pro příklad můžeme uvést SCHAD (Short-Chain HydroxyAcyl-CoA Dehydrogenase), 17β -HSD (17β -hydroxysteroid dehydrogenase), aj. [63]. ABAD má velmi širokou

substrátovou specifitu, alespoň dle *in vitro* testování. Může katalyzovat reverzibilní oxidaci/redukci lineárních alkoholů, steroidních substrátů (estradiol), acetoacetyl-CoA či β -hydroxybutyrát [4, 64]. Je důležité zdůraznit, že schopnost enzymu metabolizovat substráty *in vitro*, nezaručuje stejnou metabolizaci v prostředí *in vivo* [5, 4, 64]. Fakt, že ABAD může katalyzovat inaktivaci pohlavních hormonů, by mohl vysvětlovat, proč ženy trpí AD více než muži [5, 4].

Stále více důkazů poukazuje na fakt, že tento mitochondriální enzym hraje důležitou roli v patogenezi AD.

2.6.1 Struktura a fyziologická funkce

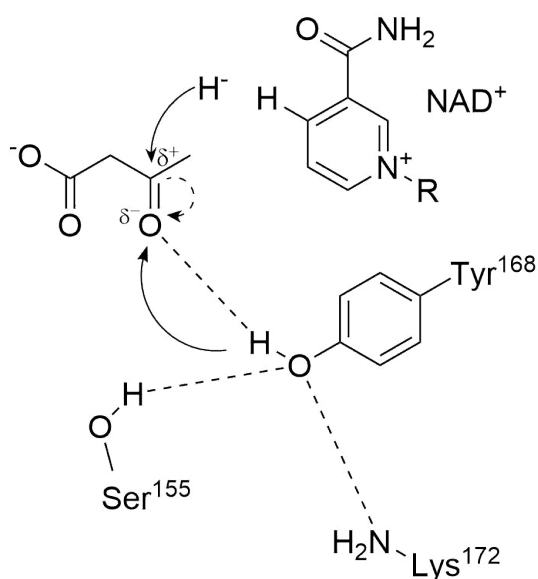
ABAD je formován jako homotetramer a skládá se ze čtyř identických monomerů o velikosti 27 kDa o celkové molekulové velikosti 108 kDa [4, 63]. Prostřednictvím molekulárního modelu bylo zjištěno, že tetramerizace přispívá ke stabilizaci vazebného místa [4]. Katalytická triáda se skládá ze tří aminokyselin - Ser¹⁵⁵, Tyr¹⁶⁸ a Lys¹⁷². Kofaktor NAD⁺/NADH se váže na ABAD v blízkosti katalytické triády nevazebnými interakcemi [4, 65].

Jedna z pravděpodobných funkcí ABAD, vzhledem k jeho lokalizaci v mitochondriální matrix, by mohla být produkce energie a metabolické homeostázy, zejména třetí krok β -oxidace mastných kyselin, kde funguje jako *L*- β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa [5]. Některé zdroje uvádějí, že *D*- β -hydroxybutyrát je metabolizován až 1000 \times více enzymem *D*- β -hydroxybutyrát dehydrogenasou než ABAD. Je tedy možné, že za normálních podmínek ABAD nemá žádnou roli v jeho metabolizaci. Na druhou stranu Yan a kol. zjistili, že exprese ABAD je citlivější na situace ischemického/nutričního stresu, kdy *D*- β -hydroxybutyrát se stává kritickým substrátem [64].

Předpokládá se, že primárními substráty ABAD jsou acyl-CoA. Vědci obhajují tuto hypotézu tím, že dvě fosfátové skupiny CoA interagují s pozitivně nabitými aminokyselinami v rámci vazebného místa (Lys⁹⁹, His¹⁰²,

Lys¹⁰⁴, Lys¹⁰⁵). Současně mezi katalytickou triádou a vazebným místem existují malé hydrofobní postranní řetězce, které jsou vhodně uspořádány pro vazbu alifatického řetězce [66].

Mechanismus redukce karbonylové skupiny probíhá následovně. Primární aminová skupina Lys¹⁷² zvyšuje aciditu hydroxylové skupiny Tyr¹⁶⁸. Kyslík na karbonylu substrátu, má větší elektronegativitu než uhlík, čímž mu dává parciální kladný náboj. Tím zvyšuje pravděpodobnost nukleofilního ataku hydridového aniontu, pocházející z kofaktoru NADH. Po přenosu hydridového aniontu dochází k deprotonaci hydroxylové skupiny Tyr¹⁶⁸. Vzniklý záporný náboj je obratem stabilizován vodíkovou vazbou ze Ser¹⁵⁵ (viz obrázek 2.9) [66].



Obrázek 2.9: Mechanismus redukce karbonylové skupiny

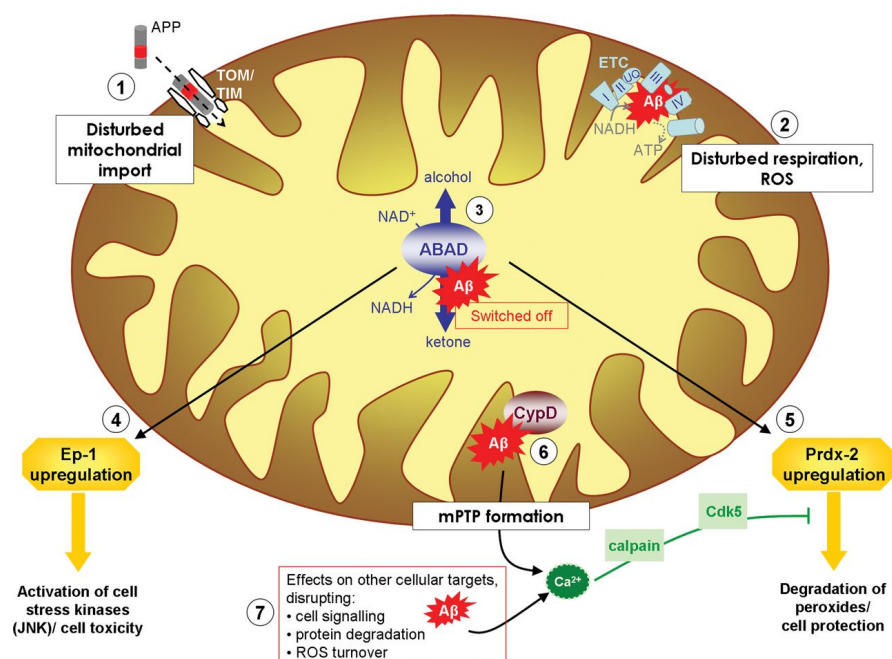
2.7 Souvislost ABAD s amyloidem- β

ABAD je výjimečný enzym mezi SDR skupinou enzymů tím, že obsahuje navíc dvě sekvence aminokyselin (rezidua 102-107 a 141-146). První zmiňovaná sekvence je místem vazby $A\beta$ [5]. Interakci se podařilo identifikovat již v roce 1997 pomocí kvasinkového dvouhybridního systému [67]. Tato hypotéza byla později ověřena pomocí dalších metod.

Vazebnému místu $A\beta$ se někdy říká také loop-D [4] nebo L_D loop [65]. Přesněji se jedná o aminokyselinové rezidua 100-110 [5], některé zdroje uvádějí rezidua 92-120 [70]. Studie s mutanty ABAD ukázaly, že bodové mutace, tedy záměna aminokyselin v rámci loop-D vedou k neschopnosti $A\beta$ se navázat na ABAD. Přesněji tedy ve dvou místech. První místo se skládá z: Ser⁹⁸, Lys⁹⁹, Thr¹⁰⁰, Tyr¹⁰¹ a druhé z: Thr¹⁰⁸, His¹⁰⁹, Thr¹¹⁰. Záměna aminokyseliny za alanin, individuálně či v kombinaci, vedly k ztrátě vazby $A\beta$ -ABAD [4, 65]. Jak už bylo zmíněno výše, ostatní SDR enzymy tuto sekvenci aminokyselin neobsahují. To by mohlo vysvětlit, proč $A\beta$ s těmito enzymy neinteraguje [5].

Dle Yan a kol. dochází při navázání $A\beta$ na ABAD ke změně konformace vazebného místa pro kofaktor NAD^+ , a tím inhibuje jeho funkci. Tato studie, využívající metodu SPR (Surface Plasmon Resonance), potvrdila vazbu $A\beta$ -ABAD už v nanomolárních koncentracích a ukázala konformační změnu ABAD po navázání $A\beta$. Bylo zjištěno, že $A\beta$ a NAD^+ spolu současně kompetují o vazebné místo. Schopnost $A\beta$ se vázat na ABAD se snižuje v prostředí NAD^+ a zároveň přítomnost $A\beta$ inhibuje vazbu NAD^+ na ABAD. Jejich současné navázání se vylučuje. $A\beta$ navozuje změnu funkce enzymu, která může mít roli v mechanismu $A\beta$ -navozené toxicity. [65, 68].

Bylo prokázáno, že přítomnost aktivního ABAD při dostatku $A\beta$ může prohloubit mitochondriální dysfunkci a oxidativní stres *in vitro* a *in vivo*. Navíc bylo zjištěno, že vazba $A\beta$ -ABAD může ovlivňovat expresi různých genů. V mozku s AD byla zjištěna zvýšená regulace těchto několika proteinů, např. antioxidantní protein peroxiredoxin-2, endofilin-1, aj. (viz obrázek 2.10) [70, 69].

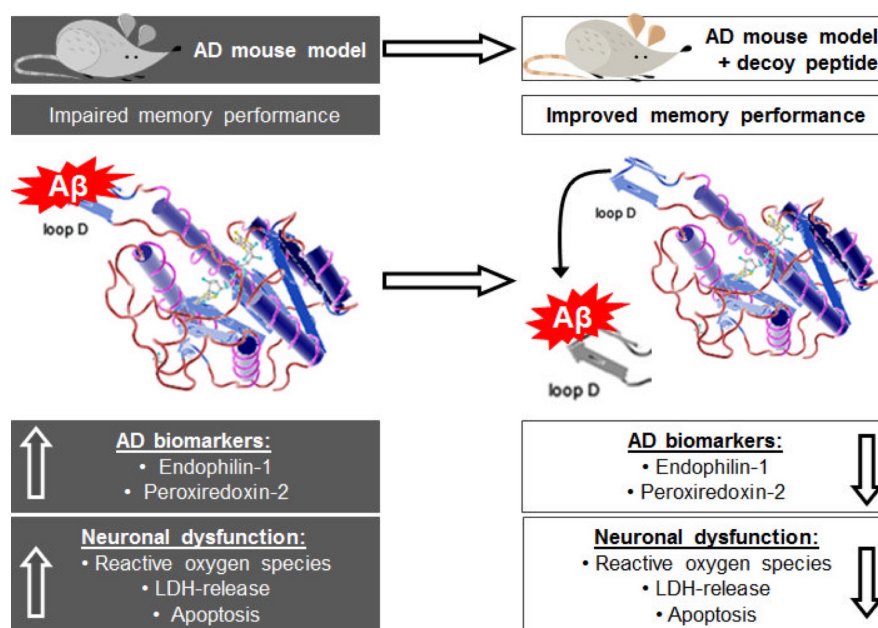
Obrázek 2.10: Důsledky mitochondriálního amyloid- β

Dostupné z: [59]

Peroxiredoxin-2 je antioxidační protein, jehož zvýšená exprese je symptomatická odpověď buňky na zvýšenou hladinu $A\beta$ [69]. Dle Borger a kol. je $A\beta$ odpovědný za rozvrat mitochondriální kalciové homeostázy, respektive vylití vápenatých iontů do cytosolu. Vápenaté ionty aktivují Cdk5 (cyclin dependent kinase 5), která fosforyluje peroxiredoxin-2, a tím inaktivuje jeho antioxidační funkci, čímž dochází k akumulaci ROS (viz obrázek 2.10) [59, 70].

Naopak zvýšená exprese endofilinu-1 způsobuje v korových neuronech významnou aktivaci c-Jun *N*-terminální kinasy, která je součástí proapoptické kaskády, což zapříčiňuje následnou buněčnou smrt (viz obrázek 2.11) [71].

Byly uskutečněny pokusy na živých buňkách, které exprimovaly v kombinacích ABAD, enzymaticky inaktivní ABAD, $A\beta$ a APP. Bylo zjištěno, že zvýšená toxicita byla pozorována v buňkách, které exprimovaly $A\beta$, resp. APP s aktivním enzymem ABAD. Kombinace s inaktivním enzymem vykazovala nižší toxicitu. Z toho vyplývá, že zvýšenou toxicitu vyvolává změna vlastností

Obrázek 2.11: Interakce amyloid- β -ABAD, resp. amyloid- β -ABAD-DP

Dostupné z: [70]

ABAD a ne jeho samotná inhibice [5].

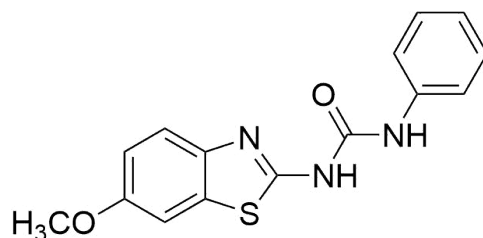
Přesný mechanismus toxicity komplexu A β -ABAD není znám. Předpokládá se, že po navázání A β dochází buď ke změně aktivity enzymu, nebo ke změně distribuce (dochází tedy k metabolizaci substrátů z jiných kompartmentů). Dochází k produkci toxických aldehydů, zejména 4-hydroxynonenalu a malondialdehydu, které jsou za normálních podmínek detoxikovány [5]. Byl proveden experiment, který zjistil, že toxické aldehydy byly tvořeny ve zvýšené míře v buňkách, které exprimovaly současně A β a aktivní ABAD. Na druhou stranu buňky, které exprimovaly pouze ABAD, vykazovaly zvýšenou resistenci vůči toxickým aldehydům [72].

Interakce A β -ABAD je potencionální farmakologický cíl. Byl připraven návnadový peptid (ABAD-decoy peptide; ABAD-DP), jehož struktura zahrnuje loop-D, tedy rezidua aminokyselin 92-120. Měl vyvázat A β , a tím ochránit

2. TEORETICKÁ ČÁST

ABAD před jeho působením. Při pokusech na buňkách, které byly vystaveny $A\beta$, se po podání ABAD-DP snížila tvorba ROS, snížilo se uvolnění cytochromu C z mitochondrií a zvýšila se životaschopnost buněk (viz obrázek 2.11) [65].

Kvůli nevhodným fyzikálně-chemickým vlastnostem se však ABAD-DP nehodí k perorálnímu podání, a proto je snaha najít nízkomolekulární modulátory ABAD. Např. Xie a kol. publikovali výsledky malých modulátorů interakce $A\beta$ -ABAD, kdy publikované molekuly byly deriváty frentizolu (viz obrázek 2.12) [5, 73].



Obrázek 2.12: Chemická struktura frentizolu

Experimentální část

3.1 Chemikálie a materiální vybavení

Všechna rozpouštědla a chemikálie byly dodány firmami Sigma-Aldrich, Merck, Penta a byly použity bez dalšího přečištění. Ke sledování průběhu chemických reakcí byla použita tenkovrstvá chromatografie (Silica gel 60 F_{254} na hliníkových fóliích, Merck). Teploty tání byly změřeny na bodotávku Stuart SMP30 a nejsou korigovány.

NMR spektra (^1H a ^{13}C) byla měřena na 500/125 MHz Varian S500 spektrometr nebo na 300/75 MHz Varian Gemini 300 spektrometr. Chemické posuny δ pro ^1H a ^{13}C spektra jsou uvedeny v ppm v poměru k signálu DMSO (δ 2.50 ppm u ^1H a δ 39.52 ppm pro ^{13}C). Signály jsou uvedeny jako singlety (s), široké singlety (br s), dublety (d), triplety (t) či multiplety (m). Interakční konstanta J je uvedena v jednotkách Hz.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) byla zaznamenána LCMS systémem, složeného z Dionex UltiMate 3000 analytical LC system a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spectrometer. Iontovým zdrojem byl Electro-spray ionization (ESI). (nastavení: shealt gas flow rate 40, aux gas flow rate 10, sweep gas flow rate 2, spray voltage 3.2kV, capillary temperature

350 °C, aux gas temperature 300 °C, S-lens RF level 50. Pozitivní ionty byly monitorovány v oblasti 100 - 1500 m/z s rozlišením až 140000. Získaná spektra byla zpracována v programu Xcalibur 3.0.63

3.2 Design nových sloučenin

Design připravených sloučenin byl odvozen na základě patentu CZ 305633 B6, jehož předmětem jsou nové modulátory aktivity ABAD, strukturně založené na bázi benzothiazolyl močoviny. Dle vynálezu byly připraveny deriváty, které obsahovaly v poloze C6 benzo[*d*]thiazolu fluor a chlor. Na benzenovém jádře byly substituenty zejména chlor, hydroxy skupina, fenoxi skupina či substituent s karbonylovou skupinou. Tento vynález ukázal, že sloučeniny s hydroxy skupinou a chlorem vykazovaly inhibiční účinky vůči ABAD, na druhou stranu fenoxi skupina nebo substituent s karbonylovou skupinou vykazovaly spíše aktivační aktivitu vůči enzymu ABAD [74].

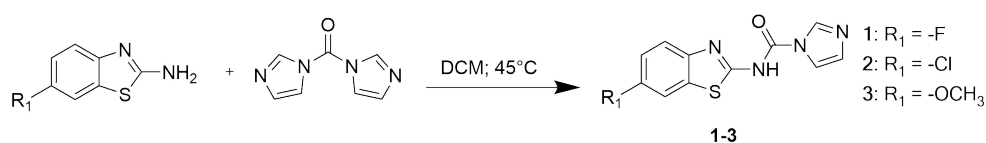
Tyto poznatky vedly k hypotéze, zda je možné substituovat na benzenovém jádře chlor za fluor za současného zachování, či vylepšení inhibiční aktivity. Analogicky byla vyslovena hypotéza ohledně substituentu v poloze C6 na benzo[*d*]thiazolu.

3.3 Příprava

3.3.1 Příprava meziproduktů

3.3.1.1 Příprava substituovaného

N-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-1*H*-imidazol-1-karboxamidu

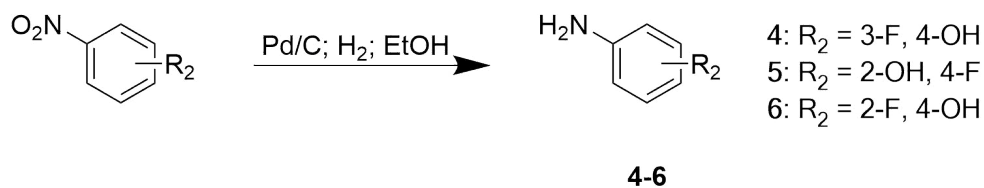


Obrázek 3.1: Příprava meziproduktu

Benzo[*d*]thiazol-2-amin (5 mmol) byl rozpustěn v dichlormethanu (DCM; 50 ml), poté byl přidán 1,1'-karboxyldiimidazol (6 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 45 °C po dobu 20 hodin. Směs byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté byl produkt odfiltrován za sníženého tlaku. Produkt byl použit do dalšího kroku syntézy bez dalšího přečištění (viz obrázek 3.1).

3.3.1.2 Příprava aminů

3.3.1.2.1 Metoda 1

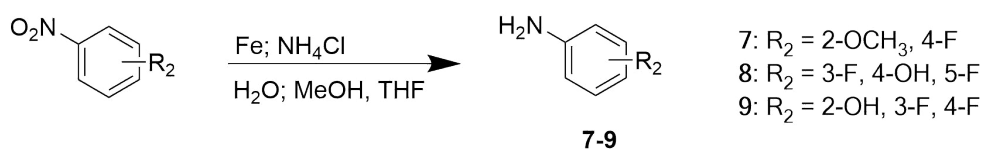


Obrázek 3.2: 1. metoda přípravy aminů

Nitro-derivát (5 mmol) byl rozpustěn v absolutním ethanolu (EtOH; 15 ml). Do reakční směsi byl přidán Pd/C (10 % wt) a byla zavedena vodíková atmosféra. Směs byla míchána po dobu 20 hodin. Průběh reakce byl sledován

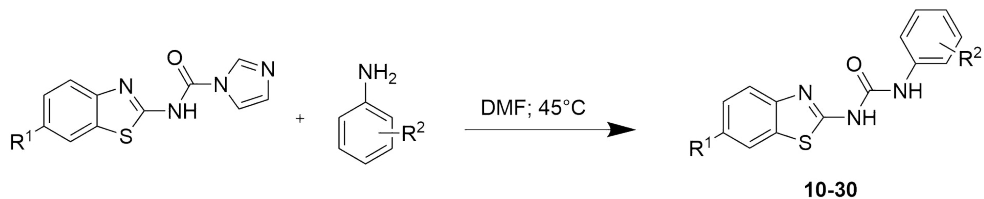
pomocí TLC (detekce ninhydrinem). Reakční směs byla zfiltrována přes Cel-
lite (Sigma Aldrich) a odpařena do sucha. Meziprodukt byl přečištěn pomocí
sloupcové chromatografie, odpařen do sucha a použit do dalšího kroku syntézy
(viz obrázek 3.2). Byla použita modifikovaná procedura založená na redukci
nitro-skupiny pomocí paladia a vodíkové atmosféry [75].

3.3.1.2.2 Metoda 2



Obrázek 3.3: 2. metoda přípravy aminů

Chlorid amonný (4 mmol) byl rozpuštěn ve směsi H₂O:MeOH (1:1, 4 ml),
s následným přidáním práškového železa (10 mmol). Nitro-derivát (1 mmol)
byl rozpuštěn v THF (4 ml) a postupně byl přidáván po kapkách do reakční
směsi. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (detekce ninhydrinem). Po
ukončení reakce byla směs naředěna směsí MeOH/THF (1:1). Produkt byl
zfiltrován přes vrstvu Cellite (Sigma Aldrich). Surový produkt byl přečištěn
pomocí sloupcové chromatografie, odpařen do sucha a použit do dalšího kroku
syntézy (viz obrázek 3.3). Tento postup byl použit a modifikován z důvodu
nižší tvorby vedlejších produktů (dle TLC) v porovnání s metodou 1 [76].

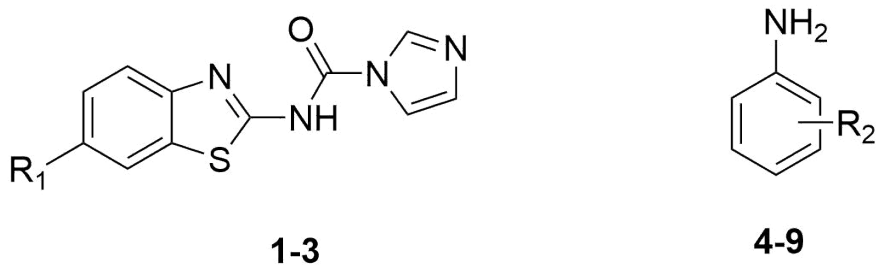
3.3.2 Příprava 1-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-fenylmočovinyObrázek 3.4: Příprava 1-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-fenylmočoviny

Substituovaný *N*-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-1*H*-imidazol-1-karboxamid (1 mmol) byl rozpuštěn DMF (10 ml), poté byl přidán amin (1,2 mmol). Reakční směs byla zahřívána na 45 °C po dobu 20 hodin. Směs byla ochlazená na laboratorní teplotu, byl přidán roztok 1M HCl a reakční směs byla ponechána v lednici po dobu 1 hodiny. Produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a byl promyt vodou (30 ml) k odstranění zbytků DMF. Surový produkt byl rekrystalizován ze směsi MeOH:diethylether (1:1). Reakce byla provedena dle Xie a kol. [73] a následně optimalizována za účelem vzniku menšího množství vedlejších produktů (dle TLC) a dosažení vyššího stupně čistoty po rekrystalizaci (3.4).

3.4 Připravené meziprodukty

Meziprodukt	R ₁	R ₂	Výtěžek
1	6-F	-	96
2	6-Cl	-	97
3	6-OCH ₃	-	96
4	-	3-F, 4-OH	84
5	-	2-OH, 4-F	92
6	-	2-F, 4-OH	76
7	-	2-OCH ₃ , 4-F	75
8	-	3-F, 4-OH, 5-F	59
9	-	2-OH, 3-F, 4-F	68

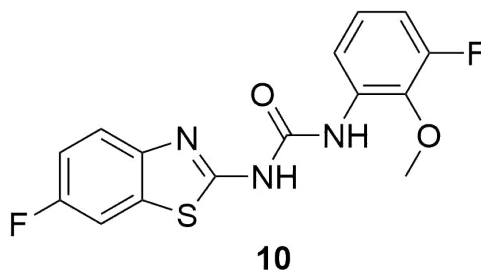
Tabulka 3.1: Meziprodukty a jejich výtěžky. Výtěžky jsou uvedeny v %. Označení R₁ a R₂ se vztahují ke strukturám na obrázku 3.5. Meziprodukty **1-3** byly detekovány pomocí TLC a použity bez dalšího přečištění. Meziprodukty **4-9** byly detekovány dle TLC s barvením ninhydrinem a přečištěny sloupcovou chromatografií.



Obrázek 3.5: Chemické struktury meziproduktů

3.5 Seznam připravených sloučenin

1. 1-(3-fluor-2-methoxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**10**)



Výtěžek 85 %

Bod tání 366-368 °C; rozklad

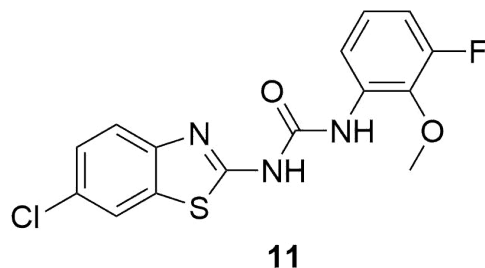
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.34 (s, 1H), 9.16 (br s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.7, 2.5$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 8.8, 4.7$ Hz, 1H), 7.24 (td, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 7.09 (td, $J = 8.3, 6.3$ Hz, 1H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 3.92 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 158.96, 158.36 (d, $J = 239.3$ Hz), 154.79 (d, $J = 243.4$ Hz), 151.24, 145.75, 136.19 (d, $J = 13.5$ Hz), 133.02 (d, $J = 4.6$ Hz), 132.63 (d, $J = 10.9$ Hz), 124.09 (d, $J = 8.9$ Hz), 121.00 (d, $J = 8.1$ Hz), 114.59 (d, $J = 2.5$ Hz), 113.88 (d, $J = 24.3$ Hz), 110.50 (d, $J = 18.5$ Hz), 108.07 (d, $J = 27.0$ Hz), 61.53 (d, $J = 4.8$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 336.06128, nalezeno 336.06073.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(3-fluor-2-methoxyfenyl)močovina (**11**)



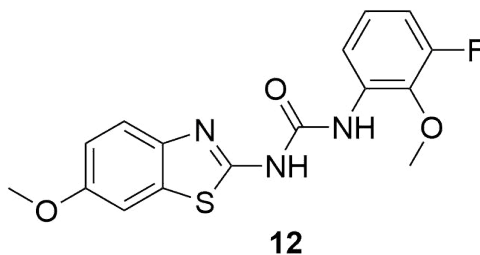
Výtěžek 71 %

Bod tání 341-343 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.41 (s, 1H), 9.16 (br s, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.7, 1.7$ Hz, 1H), 7.13 – 7.05 (m, 1H), 6.99 – 6.92 (m, 1H), 3.92 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.79, 154.78 (d, $J = 243.3$ Hz), 151.17, 147.94, 136.19 (d, $J = 13.5$ Hz), 133.15, 132.96 (d, $J = 4.5$ Hz), 127.04, 126.23, 124.08 (d, $J = 8.9$ Hz), 121.21, 121.16, 114.58 (d, $J = 3.2$ Hz), 110.54 (d, $J = 18.6$ Hz), 61.53 (d, $J = 4.9$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 352.03173, nalezeno 352.03156.

3. 1-(3-fluor-2-methoxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**12**)

Výtěžek 54 %

Bod tání 329-331 °C; rozklad

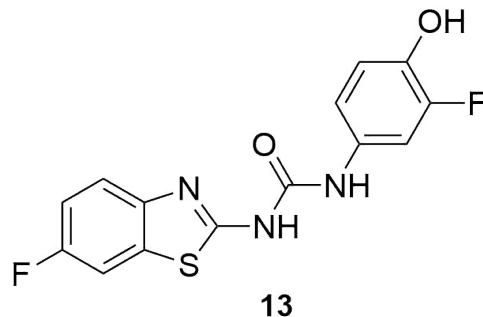
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.20 (s, 1H), 9.22 (br s, 1H), 8.02 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.14 – 7.04 (m, 1H), 7.00 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.97 – 6.91 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.04, 155.79, 154.82 (d, $J = 244.9$ Hz), 151.20, 143.14, 136.13 (d, $J = 13.5$ Hz), 133.18 (d, $J = 4.5$ Hz), 132.60, 124.08 (d, $J = 9.0$ Hz), 120.59, 114.56, 114.47, 110.35 (d, $J = 18.6$ Hz), 104.90, 61.54, 55.60.

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₆H₁₅FN₃O₃S [M+H]⁺ 348.08127, nalezeno 348.08060.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. 1-(3-fluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**13**)



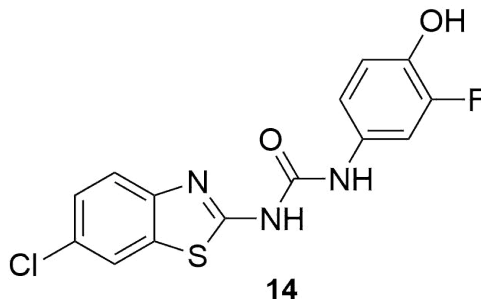
Výtěžek 72 %

Bod tání 243 - 244 °C

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.84 (br s, 1H), 9.62 (br s, 1H), 9.04 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H), 7.64 (dd, $J = 8.8, 4.8$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 1H), 7.22 (td, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 7.07 – 6.97 (m, 1H), 6.96 – 6.85 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.55, 158.30 (d, $J = 239.4$ Hz), 150.48 (d, $J = 239.5$ Hz), 145.11, 140.59 (d, $J = 12.2$ Hz), 132.49 (d, $J = 10.6$ Hz), 130.26 (d, $J = 9.2$ Hz), 120.49 (d, $J = 11.6$ Hz), 117.76 (d, $J = 4.0$ Hz), 113.80 (d, $J = 24.4$ Hz), 108.22 (d, $J = 11.8$ Hz), 107.89 (d, $J = 7.7$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 322.04563, nalezeno 322.04550.

5. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(3-fluor-4-hydroxyfenyl)močovina (**14**)

Výtěžek 29 %

Bod tání 281-282 °C; rozklad

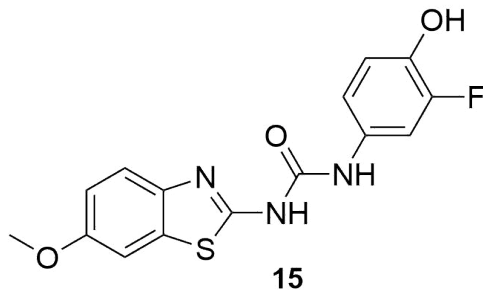
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.89 (br s, 1H), 9.61 (br s, 1H), 9.04 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.43 (dd, $J = 13.2, 2.6$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 7.06 – 6.99 (m, 1H), 6.91 (dd, $J = 9.8, 8.7$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 160.23, 150.46 (d, $J = 239.2$ Hz), 140.62 (d, $J = 12.0$ Hz), 133.01, 130.16, 126.87, 126.20, 121.23, 120.68, 117.74 (d, $J = 3.9$ Hz), 115.62, 107.99 (d, $J = 22.5$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.01608, nalezeno 338.01575.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6. 1-(3-fluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**15**)



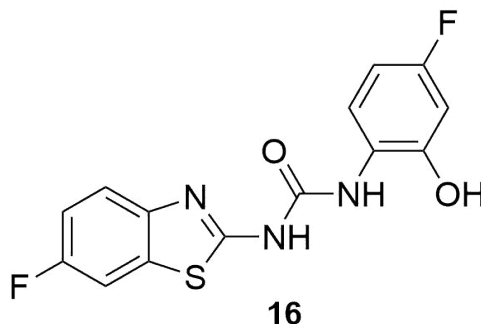
Výtěžek 30 %

Bod tání 250 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.68 (br s, 1H), 9.57 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 13.0$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.91 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157.49, 155.67, 151.91, 150.47 (d, $J = 239.0$ Hz), 140.43 (d, $J = 12.0$ Hz), 132.39, 130.39, 120.06, 117.73, 115.43, 114.35, 107.82 (d, $J = 22.8$ Hz), 104.96, 55.60.

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.06562, nalezeno 334.06525.

7. 1-(4-fluor-2-hydroxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**16**)

Výtěžek 78 %

Bod tání 226-228 °C; rozklad

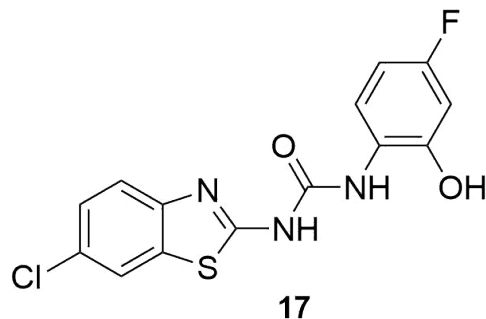
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.16 (s, 1H), 10.63 (s, 1H), 8.76 (s, 1H), 7.99 (dd, $J = 9.0, 6.3$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 8.8, 4.8$ Hz, 1H), 7.22 (td, $J = 9.1, 2.8$ Hz, 1H), 6.69 (dd, $J = 10.0, 2.9$ Hz, 1H), 6.63 (td, $J = 8.8, 2.9$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.10, 158.28 (d, $J = 238.9$ Hz), 157.91 (d, $J = 239.3$ Hz), 151.48, 147.73 (d, $J = 10.9$ Hz), 145.77, 132.71 (d, $J = 10.9$ Hz), 122.98 (d, $J = 2.8$ Hz), 120.83 (d, $J = 8.9$ Hz), 120.18 (d, $J = 9.6$ Hz), 113.76 (d, $J = 24.2$ Hz), 107.99 (d, $J = 26.9$ Hz), 105.04 (d, $J = 21.8$ Hz), 102.11 (d, $J = 25.1$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 322.04563, nalezeno 322.04529.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(4-fluor-2-hydroxyfenyl)močovina (**17**)



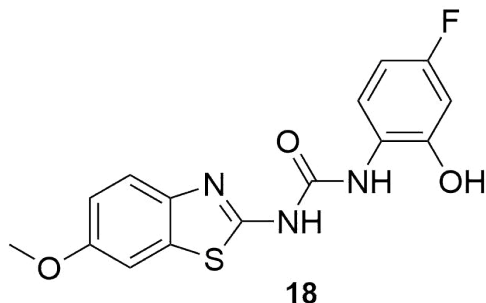
Výtěžek 94 %

Bod tání 216-218 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.74 (br s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.96 (dd, $J = 9.0, 6.3$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 6.74 (dd, $J = 10.1, 2.9$ Hz, 1H), 6.62 (td, $J = 8.7, 2.9$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 160.03, 157.99 (d, $J = 239.2$ Hz), 151.55, 148.00 (d, $J = 11.1$ Hz), 147.84, 133.22, 126.87, 126.18, 122.90 (d, $J = 2.7$ Hz), 121.17, 120.97, 120.31 (d, $J = 9.7$ Hz), 104.95 (d, $J = 21.6$ Hz), 102.20 (d, $J = 25.2$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.01608, nalezeno 338.01566.

9. 1-(4-fluor-2-hydroxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**18**)

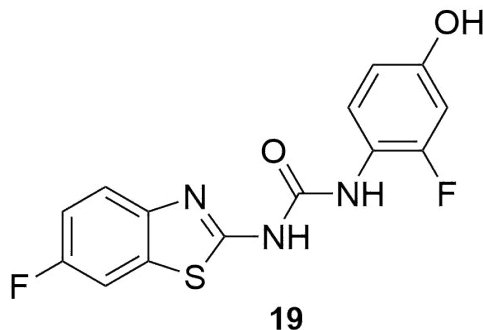
Výtěžek 99 %

Bod tání 207-208 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.72 (br s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 9.0, 6.3$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.99 (dd, $J = 8.8, 2.7$ Hz, 1H), 6.75 (dd, $J = 10.1, 2.9$ Hz, 1H), 6.61 (td, $J = 8.8, 3.0$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157.91 (d, $J = 239.0$ Hz), 157.51, 155.76, 151.54, 147.97 (d, $J = 11.0$ Hz), 142.36, 132.42, 123.03 (d, $J = 2.8$ Hz), 120.28 (d, $J = 10.1$ Hz), 120.17, 114.48, 104.9, 104.90 (d, $J = 21.6$ Hz), 102.18 (d, $J = 25.0$ Hz), 55.64.

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.06562, nalezeno 334.06516.

10. 1-(2-fluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**19**)

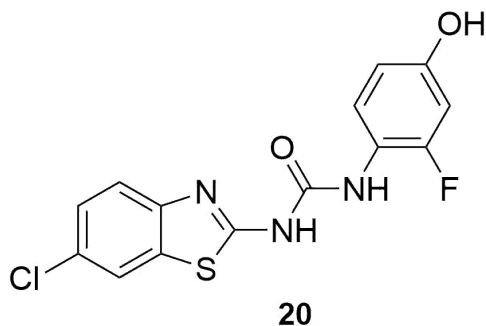
Výtěžek 66 %

Bod tání 270 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.91 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.71 – 7.62 (m, 2H), 7.23 (td, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 12.5, 2.3$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.13, 158.30 (d, $J = 239.2$ Hz), 154.87 (d, $J = 11.0$ Hz), 154.21 (d, $J = 242.5$ Hz), 151.65, 145.76, 132.71 (d, $J = 7.8$ Hz), 124.16, 120.90, 116.87 (d, $J = 11.4$ Hz), 113.80 (d, $J = 24.3$ Hz), 111.11 (d, $J = 2.8$ Hz), 108.04 (d, $J = 27.0$ Hz), 102.74 (d, $J = 21.6$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₄H₁₀F₂N₃O₂S [M+H]⁺ 322.04563, nalezeno 322.0454.

11. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(2-fluor-4-hydroxyfenyl)močovina (**20**)

Výtěžek 94 %

Bod tání 261-262 °C; rozklad

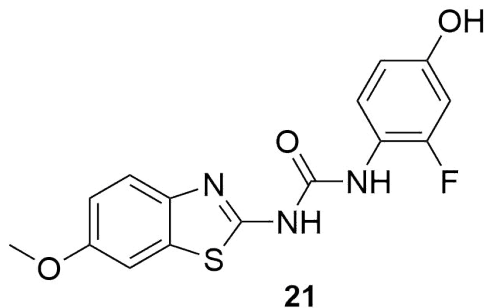
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.98 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 160.02, 154.91 (d, $J = 10.9$ Hz), 154.23 (d, $J = 243.1$ Hz), 151.62, 147.92, 133.21, 126.91, 126.17, 124.17, 121.19, 121.06, 116.82 (d, $J = 11.6$ Hz), 111.11 (d, $J = 2.8$ Hz), 102.74 (d, $J = 21.6$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 338.01608, nalezeno 338.0157.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

12. 1-(2-fluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**21**)



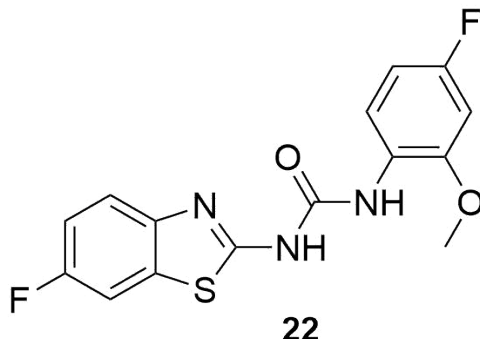
Výtěžek 97 %

Bod tání 241 °C; rozklad

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.75 (s, 1H), 9.73 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.69 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 6.67 (dd, $J = 12.5, 2.6$ Hz, 1H), 6.64 – 6.58 (m, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 157.20, 155.70, 154.72 (d, $J = 10.9$ Hz), 154.12 (d, $J = 242.3$ Hz), 151.62, 143.11, 132.66, 124.04, 120.46, 117.05 (d, $J = 11.7$ Hz), 114.38, 111.09 (d, $J = 2.8$ Hz), 104.88, 102.72 (d, $J = 21.6$ Hz), 55.60.

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 334.06562, nalezeno 334.0663.

13. 1-(4-fluor-2-methoxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**22**)

Výtěžek 97 %

Bod tání 364-366 °C; rozklad

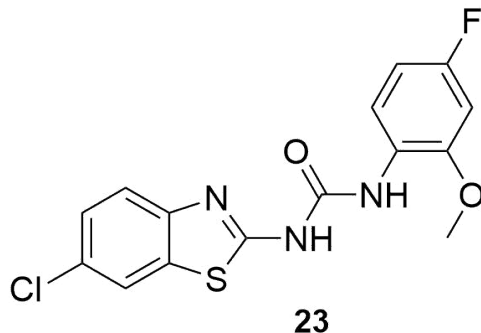
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.30 (br s, 1H), 8.96 (br s, 1H), 8.05 (dd, $J = 8.9, 6.3$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz, 1H), 7.71 – 7.62 (m, 1H), 7.23 (td, $J = 9.1, 2.6$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 10.6, 2.6$ Hz, 1H), 6.77 (td, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 159.13, 158.32 (d, $J = 239.6$ Hz), 158.30 (d, $J = 238.9$ Hz), 151.52, 149.63 (d, $J = 10.3$ Hz), 145.67, 132.64 (d, $J = 11.1$ Hz), 123.66 (d, $J = 3.0$ Hz), 120.85 (d, $J = 9.0$ Hz), 119.91 (d, $J = 9.4$ Hz), 113.81 (d, $J = 24.3$ Hz), 108.02 (d, $J = 27.0$ Hz), 106.16 (d, $J = 21.8$ Hz), 99.72 (d, $J = 27.2$ Hz), 56.38 .

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₅H₁₂F₂N₃O₂S [M+H]⁺ 336.06128, nalezeno 336.0610.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

14. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(4-fluor-2-methoxyfenyl)močovina (**23**)



Výtěžek 94 %

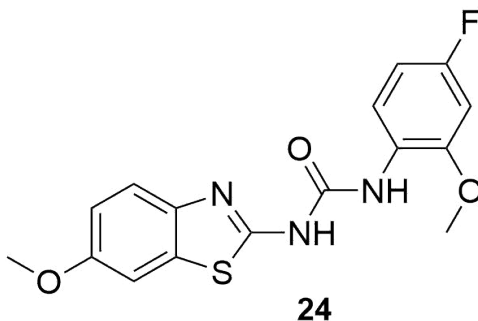
Bod tání 356-358 °C; rozklad

^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.28 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.11 – 8.01 (m, 2H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 7.02 (dd, $J = 10.7, 2.7$ Hz, 1H), 6.78 (td, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.92, 158.33 (d, $J = 239.8$ Hz), 151.35, 149.52 (d, $J = 10.2$ Hz), 147.99, 133.21, 126.95, 126.22, 123.61 (d, $J = 3.1$ Hz), 121.21, 121.12, 119.76 (d, $J = 9.5$ Hz), 106.21 (d, $J = 21.9$ Hz), 99.73 (d, $J = 27.2$ Hz), 56.42.

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{ClFN}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 352.03173, nalezeno 352.0316.

15. 1-(4-fluor-2-methoxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[
- d*
-]thiazol-2-yl)močovina (
- 24**
-)



Výtěžek 88 %

Bod tání 324 °C; rozklad

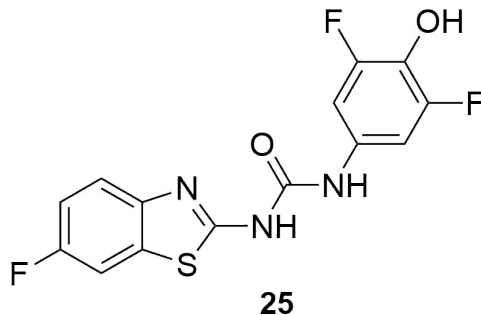
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.07 (s, 1H), 8.94 (br s, 1H), 8.08 (dd, $J = 8.9, 6.3$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 10.7, 2.8$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 6.77 (td, $J = 8.7, 2.8$ Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 158.19 (d, $J = 239.3$ Hz), 157.16, 155.71, 149.45 (d, $J = 10.3$ Hz), 143.16, 132.61, 123.82 (d, $J = 3.0$ Hz), 120.49, 119.68 (d, $J = 9.5$ Hz), 114.40, 106.15 (d, $J = 21.8$ Hz), 104.86, 99.67 (d, $J = 27.2$ Hz), 56.38, 55.59.

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 348.08127, nalezeno 348.0812.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

16. 1-(3,5-difluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**25**)



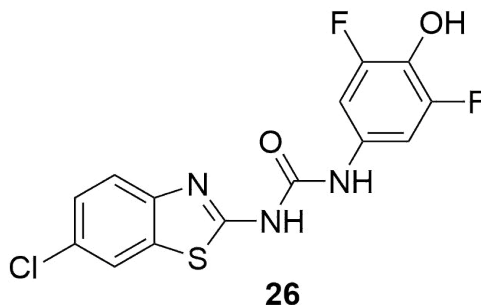
Výtěžek 62 %

Bod tání 317-319 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 10.94 (br s, 1H), 9.83 (br s, 1H), 9.25 (s, 1H), 7.88 – 7.79 (m, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.28 – 7.19 (m, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.68, 158.31 (d, $J = 239.2$ Hz), 152.45, 152.16 (dd, $J = 239.6, 8.7$ Hz), 144.41, 132.22, 129.88 (t, $J = 11.2$ Hz), 129.03 (t, $J = 16.3$ Hz), 120.14, 113.85 (d, $J = 24.2$ Hz), 108.17 (d, $J = 26.9$ Hz), 103.34 – 102.69 (m).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 340.03621, nalezeno 340.0371.

17. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(3,5-difluor-4-hydroxyfenyl)močovina (**26**)

Výtěžek 90 %

Bod tání 304 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.82 (br s, 1H), 9.34 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 7.26 – 7.18 (m, 2H).

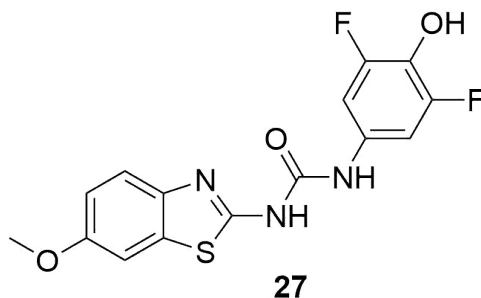
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 160.52, 152.52, 152.15 (dd, $J = 239.7, 8.7$ Hz), 146.42, 132.68, 129.84 (t, $J = 12.6$ Hz), 129.07 (t, $J = 16.3$ Hz), 126.95, 126.26, 121.30, 120.19, 103.24 – 102.85 (m).

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₄H₉ClF₂N₃O₂S [M+H]⁺ 356.00666, nalezeno 356.0077.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

18. 1-(3,5-difluor-4-hydroxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina

(27)



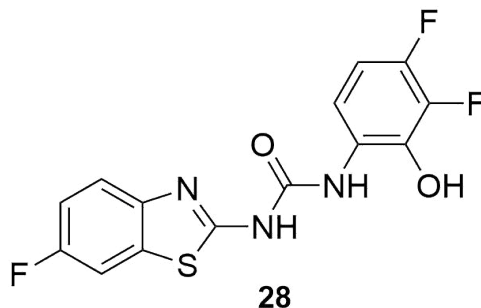
Výtěžek 93 %

Bod tání 161-162 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.80 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 7.54 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.27 – 7.17 (m, 2H), 6.98 (dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155.94, 155.73, 152.17 (dd, $J = 239.5, 8.8$ Hz), 132.01, 130.27 – 129.85 (m), 128.89 (t, $J = 17.3$ Hz), 119.74, 114.68, 114.43, 105.22, 105.08, 103.22 – 102.56 (m), 55.63.

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₅H₁₂F₂N₃O₃S [M+H]⁺ 352.05619, nalezeno 352.0558.

19. 1-(3,4-difluor-2-hydroxyfenyl)-3-(6-fluorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina (**28**)

Výtěžek 96 %

Bod tání 209-210 °C

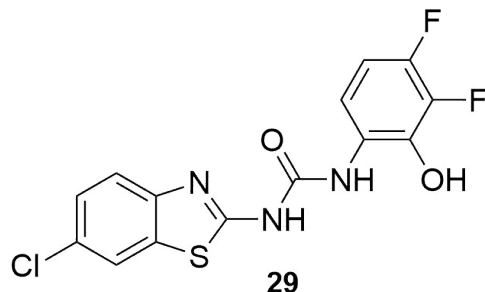
^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.23 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 8.91 (s, 1H), 7.84 (dd, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 7.83 – 7.78 (m, 1H), 7.67 (dd, $J = 8.8, 4.7$ Hz, 1H), 7.24 (td, $J = 9.1, 2.7$ Hz, 1H), 6.91 – 6.82 (m, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.03 (d, $J = 2.3$ Hz), 158.32 (d, $J = 239.0$ Hz), 151.73, 146.29 (dd, $J = 240.5, 10.7$ Hz), 145.65, 140.11 (dd, $J = 238.6, 15.0$ Hz), 136.27 (dd, $J = 13.5, 2.0$ Hz), 132.70 (d, $J = 11.1$ Hz), 125.39 – 125.25 (m), 120.87 (d, $J = 9.0$ Hz), 114.15 (dd, $J = 8.1, 3.6$ Hz), 113.84 (d, $J = 24.3$ Hz), 108.05 (d, $J = 27.0$ Hz), 106.17 (d, $J = 17.7$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 340.03621, nalezeno 340.0361.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

20. 1-(6-chlorbenzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-(3,4-difluor-2-hydroxyfenyl)močovina (**29**)



Výtěžek 75 %

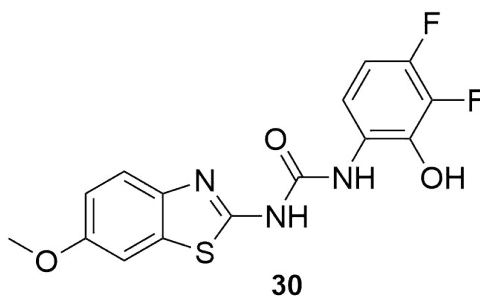
Bod tání 212-213 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 11.29 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.84 – 7.77 (m, 1H), 7.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.41 (dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz, 1H), 6.93 – 6.82 (m, 1H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 159.87, 151.53, 147.85, 146.26 (dd, $J = 240.8, 10.7$ Hz), 140.07 (dd, $J = 238.4, 15.1$ Hz), 136.10 (d, $J = 13.3$ Hz), 133.20, 126.94, 126.20, 125.26 (t, $J = 3.0$ Hz), 121.18, 121.04, 113.96 (d, $J = 6.4$ Hz), 106.19 (d, $J = 17.6$ Hz).

HRMS (ESI) vypočteno pro $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClF}_2\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 356.00666, nalezeno 356.0065.

21. 1-(3,4-difluor-2-hydroxyfenyl)-3-(6-methoxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)močovina
(30)



Výtěžek 99 %

Bod tání 198-200 °C

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.73 (br s, 2H), 9.05 (s, 1H), 7.83 – 7.75 (m, 1H), 7.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 6.90 – 6.80 (m, 1H), 3.79 (s, 3H).

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.27, 155.77, 151.68, 146.22 (dd, *J* = 240.9, 11.1 Hz), 142.61, 140.11 (dd, *J* = 238.3, 14.9 Hz), 136.18 (d, *J* = 13.6 Hz), 132.52, 125.46 (d, *J* = 3.1 Hz), 120.32, 114.47, 114.07 (dd, *J* = 7.5, 3.0 Hz), 106.15 (d, *J* = 17.4 Hz), 104.92, 55.62.

HRMS (ESI) vypočteno pro C₁₅H₁₂F₂N₃O₃S [M+H]⁺ 352.05619, nalezeno 352.0560.

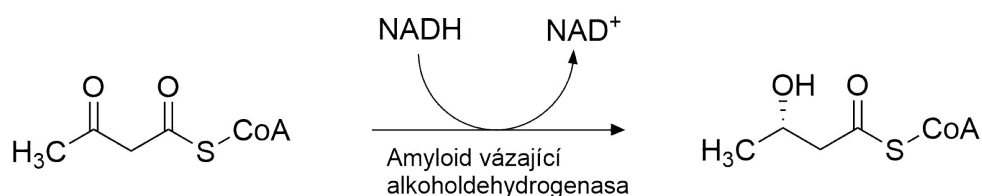
3.6 Stanovení inhibičních parametrů

3.6.1 Princip metody

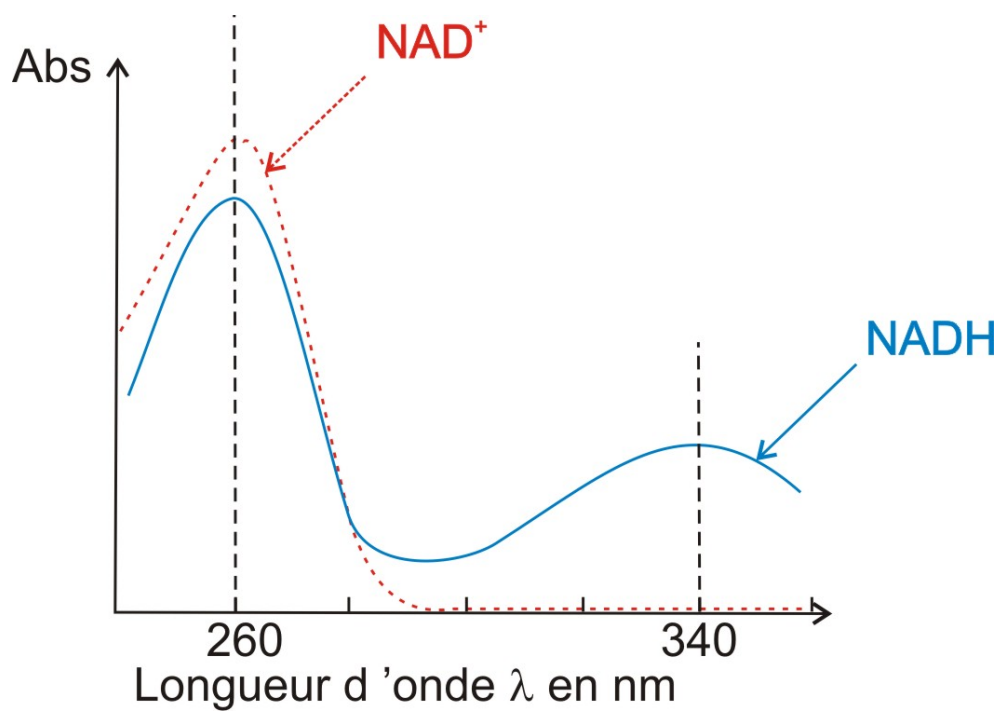
Metoda je založena na redukcí acetoacetyl-CoA pomocí ABAD a NADH jako redukčního činidla (viz obrázek 3.6). Aktivita jednotlivých sloučenin byla měřena na University of St. Andrews ve Skotsku.

3.6.1.1 Metodika

Reakční podmínky zahrnují enzym ABAD (0,5 $\mu\text{g/ml}$), NADH (250 μM), acetoacetyl-CoA (120 μM) a testovanou látku (25 μM v 1% DMSO (v/v)). Byl připraven pufr pro testování (10 mM HEPES pufru, 0,5% (w/v)), zahřátý na teplotu 37 $^{\circ}\text{C}$, pH bylo upraveno na 7,4. Kontrolní roztoky, které byly připraveny, obsahují ekvivalentní koncentraci DMSO (1% (v/v)) a byly testovány současně. Progrese reakce byla měřena pomocí klesající absorpance NADH při $\lambda = 340\text{nm}$ (viz obrázek 3.7). Testování probíhalo za použití spektrofotometru SpectraMAX M2e. Reakce byla zastavena ve chvíli, kdy hodnota absorpance dosáhla ustáleného stavu ($R^2 > 0,9$).



Obrázek 3.6: Princip metody



Obrázek 3.7: Absorpční spektrum NAD⁺/NADH

Výsledky a diskuse

Bylo připraveno celkem 7 sérií analogů frentizolu, tedy 21 sloučenin (viz obrázek 4.1).

Sloučeniny **13-21** byly připraveny z aminů, které byly získány dle metody 1 (viz kapitola 3.3.1.2.1), sloučeniny **22-30** byly připraveny z aminů dle metody 2 (viz kapitola 3.3.1.2.2).

Metoda 2 přípravy aminů byla použita, ačkoliv poskytovala nižší výtěžky než metoda 1, z důvodu nižší tvorby vedlejších produktů (dle TLC), bez nutnosti sloupcové chromatografie konečného produktu. Obecně u sloučenin **22-30** byly vyšší výtěžky oproti sloučeninám **13-21**.

Výtěžky se pohybovaly v rozmezí 29 - 99 %.

Nejnižšími výtěžky se vyznačovaly sloučeniny **14, 15**. Příčinou mohlo být použití aminu, který byl připraven pomocí metody 1, a nutnost jeho přečištění sloupcovou chromatografií.

Pro test inhibiční aktivity sloučenin byl použit screeningový test při fixní koncentraci inhibitoru 25 μM k odhalení účinných inhibitorů. Výsledky byly uvedeny jako zbývající aktivita ABAD. Z výsledků modulační aktivity, uvedených v tabulce 4.1 lze vyčíst SAR.

Bylo zjištěno, že některé sloučeniny ABAD neinhibují, ale mohou jeho aktivitu mírně zvyšovat (**19-23**, **28-30**).

Substituce v poloze C6 benzo[*d*]thiazolu fluorem se jeví jako nejméně výhodná oproti chloru či methoxy skupině z důvodu nižší schopnosti inhibovat ABAD.

Methoxy skupina v poloze C6 benzo[*d*]thiazolu má oproti substituci chlorem mírně vystupňované inhibiční účinky na ABAD. Tento rozdíl však není příliš významný.

Významné rozdíly můžeme vidět v substituci na benzenovém jádře, kde se jeví výhodněji kombinace substituentů fluoru a hydroxy skupiny. Můžeme si všimnout, že fluor v poloze C3 a hydroxy skupina v poloze C4 (**13**, **14**, **15**) vykazuje silnější inhibiční schopnost vůči ABAD oproti hydroxy skupině v poloze C2 a fluor v poloze C4 (**16**, **17**, **18**). Na druhou stranu, sloučeniny, obsahující hydroxy skupinu v poloze C4 a fluor v poloze C2 (**19**, **20**, **21**) naopak ABAD mírně aktivují.

Sloučeniny, které obsahují v poloze C3 fluor a v poloze C4 hydroxy skupinu (**13-15**) mají výrazně větší inhibiční účinky na ABAD než ostatní sloučeniny (**10**, **11**, **12**, **16-30**).

Zdá se, že methoxy skupina není vhodný substituent na benzenové jádro. Pokud je methoxy skupina v poloze C2 a fluor v poloze C3, sloučeniny vykazují pouze slabý inhibiční efekt (**10**, **11**, **12**). Na rozdíl od jejich polohových izomerů (**22**, **23**, **24**), které obsahují fluor v poloze C4, vyznačující se aktivační schopností.

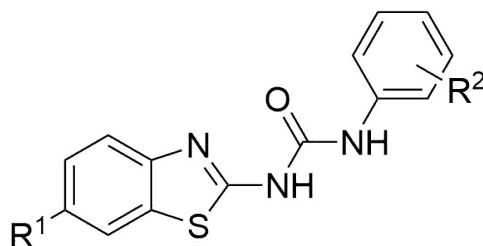
Methoxy skupina na benzenovém jádře v poloze C2 (**22**, **23**, **24**) na rozdíl od volné hydroxy skupiny ve stejné poloze (**16**, **17**, **18**) nevykazuje inhibiční účinky (kromě velmi slabé inhibice u sloučeniny **24**).

Při substituci benzenového jádra více než dvěma substituenty dochází buď ke snížení inhibičního účinku (**25**, **26**, **27**), popř. k vymizení inhibice ABAD (**28**, **29**, **30**).

Nejsilnější aktivační schopnosti ukázal testovaný modulátor (**22**), mající na benzenovém jádře methoxy skupinu v poloze C2, fluor v poloze C4 a fluor v poloze C6 benzo[*d*]thiazolu.

Nejsilnější inhibiční aktivitu projevila připravená sloučenina (**15**), obsahující methoxy skupinu v poloze 6 benzo[*d*]thiazolu a na benzenovém jádře v polohách C3 fluor a C4 hydroxy skupinu. Možným vysvětlením zjištěné mírné aktivace enzymu může být chyba měření nebo interference testovaných sloučenin s komponenty screeningového testu. Tento efekt bude podroben dalšímu výzkumu.

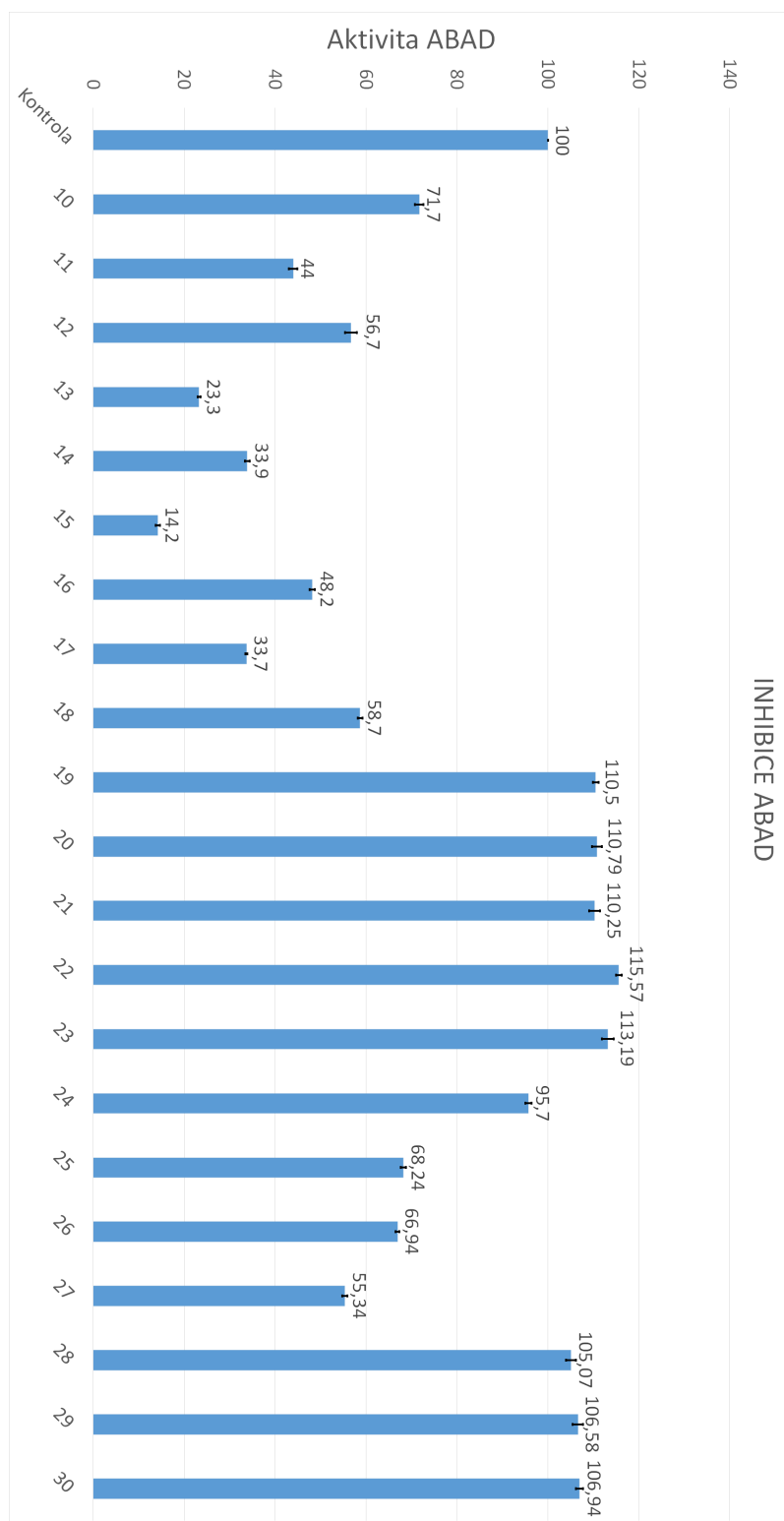
Výsledky inhibiční aktivity testovaných sloučenin jsou znázorněny na obrázku 4.2.



Obrázek 4.1: Výsledný produkt - 1-(benzo[*d*]thiazol-2-yl)-3-fenylmočovina

Modulátor	R ₁	R ₂	Výtěžek	Aktivita	SEM
Kontrola	-	-	-	100	0,00
10	6-F	2-OCH ₃ , 3-F	85	71,7	0,95
11	6-Cl	2-OCH ₃ , 3-F	71	44,0	0,94
12	6-OCH ₃	2-OCH ₃ , 3-F	54	56,7	1,31
13	6-F	3-F, 4-OH	72	23,3	0,33
14	6-Cl	3-F, 4-OH	29	33,9	0,52
15	6-OCH ₃	3-F, 4-OH	30	14,2	0,46
16	6-F	2-OH, 4-F	78	48,2	0,56
17	6-Cl	2-OH, 4-F	94	33,7	0,23
18	6-OCH ₃	2-OH, 4-F	99	58,7	0,55
19	6-F	2-F, 4-OH	66	110,50	0,60
20	6-Cl	2-F, 4-OH	94	110,79	1,08
21	6-OCH ₃	2-F, 4-OH	97	110,25	1,17
22	6-F	2-OCH ₃ , 4-F	97	115,57	0,61
23	6-Cl	2-OCH ₃ , 4-F	94	113,19	1,29
24	6-OCH ₃	2-OCH ₃ , 4-F	88	95,70	0,66
25	6-F	3-F, 4-OH, 5-F	62	68,24	0,57
26	6-Cl	3-F, 4-OH, 5-F	90	66,94	0,42
27	6-OCH ₃	3-F, 4-OH, 5-F	93	55,34	0,60
28	6-F	2-OH, 3-F, 4-F	96	105,07	1,10
29	6-Cl	2-OH, 3-F, 4-F	75	106,58	1,17
30	6-OCH ₃	2-OH, 3-F, 4-F	99	106,94	0,75

Tabulka 4.1: Výtěžky a výsledky měření inhibiční aktivity testovaných sloučenin. Výtěžky jsou uvedeny v %. Aktivita je vyjádřena jako zbývající aktivita ABAD v % při fixní koncentraci modulátoru 25 μ M se standardní odchylkou průměru (SEM). Označení R₁ a R₂ se vztahují ke struktuře na obrázku 4.1.



Obrázek 4.2: Inhibice ABAD při fixní koncentraci inhibitoru 25 μM

Závěr

V rámci diplomové práce bylo připraveno 21 potenciálních modulátorů ABAD. Byla stanovena *in vitro* inhibiční aktivita vůči ABAD, výsledky byly vyjádřeny jako zbývající aktivita ABAD. 13 sloučenin vykazuje inhibiční účinky, zbylé produkty enzym ABAD mírně aktivují. Na základě získaných výsledků byly stanoveny vztahy mezi strukturou a účinkem připravených sloučenin.

Sloučeniny s methoxy skupinou v poloze 6 benzo[*d*]thiazolu obecně vykazovaly mírně zvýšené inhibiční schopnosti oproti substituci chlorem nebo fluorem. Z hlediska inhibice byla substituce na benzenovém jádře v polohách C3 fluorem a C4 hydroxy skupinou neúčinnější. Sloučeniny s vyšší mírou inhibice ABAD bude vhodné podrobit dalšímu výzkumu.

Literatura

- [1] Prince, M.; Wimo, A.; Guerchet, M.; Gemma-Claire, A.; Wu, Y.-T.; Prina, M. *World Alzheimer report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. Alzheimer's Disease International. 2015, p. 1-84. doi:10.1111/j.0963-7214.2004.00293.x.
- [2] Dolezal, M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. 1. vydání. Karolinum:Praha 2009. s. 188. ISBN: 978-80-246-2382-5.
- [3] Du, H.; Yan, S. S. *Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: Cyclophilin D and amyloid beta*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010, vol. 1802, no. 9, p. 198-204. doi:10.1016/j.bbadis.2009.07.005.
- [4] Muirhead, K. E. A.; Borger, E.; Aitken, L.; Conway, S. J.; Gunn-Moore, F. J. *The consequences of mitochondrial amyloid A β -peptide in Alzheimer's disease*. *Biochemical journal* 2010, vol. 426, no. 3, p. 255-270. doi:10.1042/BJ20091941.
- [5] Benek, O.; Musílek, K.; Kuča, K. *Mitochondriální enzym ABAD a jeho role v rozvoji a léčbě Alzheimerovy nemoci*. *Česká a slovenská Farmacie* 2012, vol. 61, no. 4, p. 144-149
- [6] Medeiros, R.; Baglietto-Vargas, D.; LaFerla, F. *The role of Tau in Alzheimer's disease and related Disorders*. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2011, vol. 17, p. 514-524. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00177.x.

- [7] Karantzoulis, S.; Galvin, J. E. *Dinstinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia*. Expert review of neurotherapeutics 2011, vol. 11, p. 1579-1591. doi:10.1586/ern.11.155.
- [8] Alzheimer's association. *Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Alzheimer's & Dementia 2015, vol. 11, no. 3, p. 1-88.
- [9] Holmerová, I.; Nováková, H.; Jarolímová, E. *Alzheimerova nemoc v rodině*. Opravné vydání. Praha:Pfizer, 2008. ISBN neuvedeno.
- [10] Cipriani, G.; Dolciotti, C.; Picchi, L.; Bonuccelli, U. *Alzheimer and his disease: a brief history*. Neurological Sciences 2011, vol. 32, p. 275-279. doi: 10.1007/s10072-010-0454-7.
- [11] Wikipedia: Alzheimer's disease [online]. Poslední revize 30. 6. 2008 [cit. 2016-02-21]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alzheimer%27s_disease_brain_comparison.jpg.
- [12] Boller, F.; Forbes, M. M. *History of dementia and dementia in history: An overview*. Journal of the Neurological Sciences 1998, vol. 158, no. 2, p. 125-133. doi:10.1016/S0022-510X(98)00128-2.
- [13] Hippus, H.; Neundörfer, G. *The discovery of Alzheimer's disease*. Dialogues in Clinical Neuroscience 2003, vol. 5, no. 1, p. 101-108.
- [14] O'Brien, R.; Wong, P. *Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease*. Annual Review of Neuroscience 2011, vol. 1987, p. 185-204. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113613.Amyloid.
- [15] McGleenon, B. M.; Dynan, K. B.; Passmore, A. P. *Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease*. British Journal of Clinical Pharmacology 1999, vol. 48, p. 471-480. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x.

-
- [16] Alzheimer's Association. *What Is Alzheimer's?*. [online]. Chicago 2016. [cit. 2016-02-21]. Dostupné z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp.
- [17] U.S. Census Bureau [online]. [cit. 2016-02-22]. Dostupné z: https://www.census.gov/2010census/news/img/20111130_fig2.jpg.
- [18] Mátl, O.; Holmerová, I.; Mátlová, M. *Zpráva o Stavu Demence 2014: Existují v krajích České republiky významnější rozdíly?* Česká Alzheimerovská Společnost. 2014, 1-17. ISBN 978-80-86541-34-1.
- [19] Gulášová, I. *Alzheimerova choroba – Rizikové a Protektivní Faktory*. Časopis pro ošetrovatelství a sociální vědy ve zdraví a nemoci 2011, vol. 12, no. 4, p. 484-489.
- [20] National Institute of Aging. *Preventing Alzheimer's Disease: What Do We Know?* NIH Publication 2012, no. 12-5503, p. 1-28
- [21] National Institute of Aging. *Alzheimer's Disease Genetics: Fact Sheet*. NIH Publication 2015, no.15-6424, p. 1-8.
- [22] Folch, J.; Petrov, D.; Ettcheto, M.; Abad, S.; Sanchez-Lopez, E.; Garcia, M.; Olloquequi, J.; Beas-Zarate, C.; Auladell, C.; Camins, A. *Current research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment*. Neural Plasticity 2016, p. 1-15. doi:10.1155/2016/8501693.
- [23] Holeček, M. *Regulace cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. 1. vydání. Praha:Grada Publishing, 2006. ISBN 978-80-247-1562-9.
- [24] Alzheimer's association. *Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Alzheimer's & Dementia 2014, vol. 10, no. 2, p. 1-80.
- [25] National Institute Of Aging. *National Institute Of Aging*. NIH Publication No. 15-6423;2015, 1-8.

- [26] Jiráček, R. *Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby*. Neurologie pro praxi 2008, vol. 9, no. 4, p. 224-227.
- [27] Alzheimer's association. *Stages of Alzheimer's*. [online]. Chicago 2016. [cit. 2016-02-15]. Dostupné z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp.
- [28] Bird, C.M.; Burgess, N. *The hippocampus and memory: insights from spatial processing*. Nature Reviews Neuroscience 2008, vol. 9, no. 3, p. 182-194. doi:10.1038/nrn2335.
- [29] Alzheimer's society. *Alzheimer's society: Leading the First Fight against Dementia*. [online]. London 2016. [cit. 30.1.2016]. Dostupné z: www.alzheimers.org.uk.
- [30] Alzheimer centrum. *Diagnostika Alzheimerovy choroby*. Alzheimercentrum. 2014. [online]. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://www.alzheimercentrum.cz/alzheimerovo-onemocneni/diagnostika-alzheimerovy-choroby/>.
- [31] Sekce kognitivní neurologie České neurologické společnosti JEP. [online]. 2012 [cit. 2016-02-20]. Dostupné z: http://www.kognice.cz/kognitivni_test_ace-r2010.pdf
- [32] Alzheimer Nadační Fond. *Současné možnosti diagnostiky a léčby*. [online]. Praha. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: <http://alzheimernf.cz/pro-pecujici-a-pacienty/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby/>.
- [33] Alzheimer's association. *Alzheimer's and dementia testing for earlier diagnosis*. [online]. Chicago 2016. [cit. 2016-02-17]. Dostupné z: http://www.alz.org/research/science/earlier_alzheimers_diagnosis.asp#Cerebrospinal.

- [34] Sheardová, K.; Hort, J.; Rusina, R.; Bartoš, A.; Línek, V.; Ressler, P.; Rektorová, I. *Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy choroby a dalších onemocnění spojených s demencí*. Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie 2007, vol. 70/103, no. 5, p. 589-594.
- [35] Jiráček, R.; Vnoučková, K. *Rivastigminum*. Remedica 2003, vol. 13, p. 372-378.
- [36] Hampl, F.; Paleček, J. *Farmakochemie*. 1. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012. ISBN: 80-7080-495-5.
- [37] Vališ, M.; Caisberger, F.; Šimůnek, L.; Linková, H. *Farmakoterapie demencí - pokroky v léčbě a aktuální doporučení*. Remedica 2013, vol. 23, p. 396-399.
- [38] Jiráček, R.; Slíva, J. *Donepezilum*. Remedica 2004, vol. 14, p. 464-469.
- [39] Kyle, R. A. *Amyloidosis: a convoluted story*. British Journal of Haematology 2001, vol. 114, no. 3, p. 529-538. doi:10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x.
- [40] Cárdenas-Aguayo, M. C.; Silva-Lucero, M. C.; Cortes-Ortiz, M.; Jiménez-Ramos, B.; Gómez-Virgilio, L.; Ramírez-Rodríguez, G.; Vera-Arroyo, E.; Fiorentino-Pérez, R.; García, U.; Luna-Muñoz, J.; Meraz-Ríos, M. A. *Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity*. Neurochemistry. 2014, p. 1-26. doi: 10.5772/57398.
- [41] Godyń, J.; Jończyk, J.; Panek, D.; Malawska, B. *Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials*. Pharmacological Reports 2016, vol. 68, no.1, p. 127-138. doi:10.1016/j.pharep.2015.07.006.
- [42] Castellani, R. J.; Rolston, R. K.; Smith, M. A. *Alzheimer's disease*. Disease-a-Month 2010, vol. 56, no. 9, p. 484-546. doi:10.1016/j.disamonth.2010.06.001.

- [43] Zhang, H.; Ma Q.; Zhang, Y. W.; Xu, H. *Proteolytic processing of Alzheimer's β -Amyloid precursor protein*. Journal of Neurochemistry 2012, vol. 120, p. 9-21. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x.
- [44] Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S. *β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE*. Science 1999, vol. 286, p. 735-741.
- [45] Fahrenholz, F.; Gilbert, S.; Kojro, E.; Lammich, S.; Postina, R. *Alpha-secretase activity of the disintegrin metalloprotease ADAM 10: Influences of domain structure*. Annals of the New York Academy of Sciences 2000, vol. 920, p. 215-222. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06925.x.
- [46] Hooper, M. N.; Lendeckel, U. *The ADAM family of proteases*. Springer US. 2005. ISBN: 978-0-387-25151-6. doi: 10.1007/b106833.
- [47] Murphy, P. M.; LeVine, H. *Alzheimer's disease and β -Amyloid peptide*. Journal of Alzheimer's Disease 2010, vol. 19, no. 1, p. 1-17. doi:10.3233/JAD-2010-1221.Alzheimer.
- [48] Sadigh-Eteghad, S.; Sabermarouf, B.; Majdi, A.; Talebi, M., Farhoudi, M.; Mahmoudi, J. *Amyloid-beta: a crucial factor in Alzheimer's disease*. Medical Principles and Practice 2015, vol. 24, no.1, p. 1-10. doi:10.1159/000369101.
- [49] Gandy, S. *The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease*. The Journal of Clinical Investigation 2005, vol. 115, p. 1121-1129. doi:10.1172/JCI200525100.
- [50] Lulita, M. F.; Allard, S.; Richter, L.; Munter, L. M.; Ducatenzeiler, A.; Weise, Ch.; Carmo, A. D.; Klein, W. L.; Multhaup, G.; Cuello, C. *Intracellular β pathology and early cognitive impairments in a transgenic rat overexpressing human amyloid precursor protein: a multidimensional*

-
- study*. Acta Neuropathologica Communications 2014, vol. 2, no. 1, p. 1-61. doi:10.1186/2051-5960-2-61.
- [51] LaFerla, F. M.; Green, K. N.; Oddo, S. *Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease*. Nature Reviews Neuroscience 2007, vol. 8, no. 7, p. 499-509. doi:10.1038/nrn2168.
- [52] Tillemant, L.; Lecanu, L.; Papadopoulos, V. *Alzheimer's disease: Effects of β -amyloid on mitochondria*. Mitochondrion 2011, vol. 11, no. 1, p. 13-21. doi:10.1016/j.mito.2010.08.009.
- [53] Moreira, P. I.; Carvalho, C.; Zhu, X.; Smith, M. A.; Perry, G. *Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 2010, vol. 1802, no. 1, p. 2-10. doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.006.
- [54] Swerdlow, R. H.; Khan, S. M. *A mitochondrial cascade hypothesis for sporadic Alzheimer's disease*. Medical Hypotheses 2004, vol. 63, no. 1, p. 8-20. doi:10.1016/j.mehy.2003.12.045.
- [55] Pagani, L.; Eckert, A. *Amyloid- β Interaction with Mitochondria*. International Journal of Alzheimer's Disease 2011, vol. 2011, p. 1-12. doi:10.4061/2011/925050.
- [56] Glabe, C. G.; Kaye, R. *Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis*. Neurology. 2006, vol. 66, no. 2, p. 74-78.
- [57] Pavlov, P. F.; Petersen, C. H.; Glaser, E.; Ankarcrona, M. *Mitochondrial accumulation of APP and A β : significance for Alzheimer's disease pathogenesis*. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2009, vol. 13, no. 10, p. 4137-4145. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00892.x.

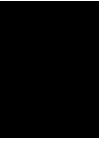
- [58] Petersen, C. H.; Alikhani, N.; Behbahani, H.; Wiehager, B.; Pavlov, P. F.; Alafuzoff, I.; Leinone, V.; Ito, A.; Winblad, B.; Glaser, E.; Ankarcrona, M. *The amyloid- β peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2008, vol. 105, no. 35, p. 13145-13150. doi:10.1073/pnas.0806192105.
- [59] Borger, E.; Aitken, L.; Muirhead, K. E. A.; Allen, Z. E.; Ainge, J. A.; Conway, S. J.; Gunn-Moore, F. J. *Mitochondrial β -amyloid in Alzheimer's disease*. Biochemical Society Transactions 2011, vol. 39, no. 4, p. 868-873. doi:10.1042/BST0390868.
- [60] Spuch, C.; Ortolano, S.; Navarro, C. *New insights in the Amyloid- β Interaction with mitochondria*. Journal of Aging Research 2012, vol. 2012, p. 1-9. doi:10.1155/2012/324968.
- [61] Chen, J. X.; Yan, S. S. *Role of Mitochondrial Amyloid- β in Alzheimer's disease*. Journal of Alzheimer's Disease 2010, vol. 20, p. 569-578. doi:10.3233/JAD-2010-100357.
- [62] Benek, O.; Aitken, L.; Hroch, L.; Kuča, K.; Gunn-Moore, F. J.; Musílek, K. *A direct interaction between mitochondrial proteins and Amyloid- β peptide and its significance for the progression and treatment of Alzheimer's disease*. Current Medicinal Chemistry 2015, vol. 22, No. 9, p. 1056-1085. DOI: 10.2174/0929867322666150114163051
- [63] He, X. Y., Merz, G., Mehta, P.; Schulz, H.; Yang, S. V. *Human Brain Short Chain L-3-Hydroxyacyl Coenzyme A Dehydrogenase Is a Single-domain Multifunctional Enzyme*. The Journal of Biological Chemistry 1999, vol. 274, no. 21, p. 15014-15019.
- [64] Yan, S. D.; Stern, D. M. *Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid- β peptide alcohol dehydrogenase (ABAD)*. International

- Journal of Clinical and Experimental Pathology 2005, vol. 86, p. 161-171.
doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00427.x.
- [65] Lustbader, J. W.; Cirilli, M.; Lin, Ch.; Xu, H. W.; Takuma, K.; Wang, N.; Caspersen, C.; Chen, X.; Pollak, S.; Chaney, M.; Trinchese, F.; Liu, S.; Gunn-Moore, F. J.; L-F Lue, L.-F.; Walker, D. G.; Kuppusamy, P.; Zewier, Z. L.; Arancio, O.; Stern, D.; Yan, S. S.; Wu, H. *ABAD directly links A β to Mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease*. Science 2004, vol. 304, no. 5669, p. 448-452. doi:10.1126/science.1091230.
- [66] Powell, A. J.; Read, J. A.; Banfield, M. J.; Gunn-Moore, F. J., Yan, S. D.; Lustbader, J.; Stern, R.; Stern, D. M.; Brady, R. L. *Recognition of structurally diverse substrates by type II 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (HADH II)/Amyloid- β binding alcohol dehydrogenase (ABAD)*. Journal of Molecular Biology 2000, vol. 303, no. 2, p. 311-327. doi:10.1006/jmbi.2000.4139.
- [67] Yan, S.D.; Fu, J.; Soto, C.; Chen, X.; Zhu, H.; Al-Mohanna, F.; Collison, K.; Zhu, A.; Stern, E.; Saido, T.; Tohyama, M.; Ogawa, S.; Roher, A.; Stern, D. *An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease*. Nature 1997, vol. 389, no. 6652, p. 689-695. doi: 10.1038/39522.
- [68] Yan, Y.; Liu, Y.; Sorci, M.; Belfort, G.; Lustbader, J. W.; Yan, S. S.; Wang, Ch. *Surface plasmon resonance and nuclear magnetic resonance studies of ABAD-Abeta interaction*. Biochemistry 2007, vol. 46, no. 7, p. 1724-31. doi: 10.1021/bi061314n.
- [69] Yao, J.; Taylor, M.; Davey, F.; Ren, Y.; Aiton, J.; Coote, P.; Fang, F.; Chen, J. X.; Yan, S. D.; Gunn-Moore, F. J. *Interaction of amyloid binding alcohol dehydrogenase/Abeta mediates up-regulation of peroxiredoxin II in brains of Alzheimer's disease patients and a transgenic Alzheimer's disease*

- mouse model*. Molecular and Cellular Neuroscience 2007, vol. 35, no. 2, p. 377-382. doi:10.1016/j.mcn.2007.03.013.
- [70] Borger, E.; Aitken, L.; Du, H.; Zhang, W.; Gunn-Moore, F. J.; Yan, S. S. *Is Amyloid Binding Alcohol Dehydrogenase a drug target for Treating Alzheimer's Disease?* Current Alzheimer Research 2013, vol. 10, no. 1, p. 21-29.
- [71] Ren, Y.; Xu, H. W.; Davey, F.; Taylor, M.; Aiton, J.; Coote, P.; Fang, F.; Yao, J.; Chen, D.; Chen, J. X.; Yan, S. D.; Gunn-Moore, F. J. *Endophilin I expression is increased in the brains of Alzheimer disease patients*. The Journal of Biological Chemistry 2008, vol. 283, no. 9, p. 5685-5691. doi:10.1074/jbc.M707932200.
- [72] Murakami, Y.; Ohsawa, I.; Kasahara, T.; Ohta, S. *Cytoprotective role of mitochondrial amyloid beta peptide-binding alcohol dehydrogenase against a cytotoxic aldehyde*. Neurobiology of Aging 2009, vol. 30, no. 2, p. 325-329.
- [73] Xie, Y.; Deng, S.; Chen, Z.; Yan, S. D.; Landry, D. W. *Identification of small-molecule inhibitors of the Abeta-ABAD interaction*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, vol. 16, no. 17, p. 4657-4660
- [74] Univerzita Hradec Králové; Fakultní nemocnice Hradec Králové; Univerzity Court of the University of St. Andrews. *Deriváty benzothiazolylmočoviny, způsob jejich přípravy a jejich použití*. původci: Musílek, K.; Kuča, K.; Benek, O.; Soukup, O., Jun, D.; Aitken, L.; Gunn-Moore, F. J.; Smith, T. K.; Guest, P. Česká republika. Patentový spis CZ 305633 B6. 02. 12. 2015.
- [75] Vanier, G. S. *Simple and Efficient Microwave-Assisted Hydrogenation Reactions at Moderate Temperature and Pressure*. Synlett. 2007, vol. 1, p. 131-135. doi:10.1055/s-2006-958428.

-
- [76] Krishnamurthy, R.; Srinivasan, N. *Iron-Ammonium Chloride - A Convenient and Inexpensive Reductant*. *Synthetic Communications* 2009, vol. 22, no. 22, p. 3189-3195.
- [77] Domov důchodců Albrechtice nad Orlicí [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://ddalbrechtice.cz/data/ext-21.pdf>.
- [78] Mocatest.org. [online]. [cit. 2016-02-23]. Dostupné z: <http://www.mocatest.org/wp-content/uploads/2015/tests-instructions/MoCA-Test-Czech.pdf>.
- [79] 1. Neurologická klinika LF MU u sv. Anny, Brno [online]. [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: http://neuro1.wz.cz/6-Demence/skaly/testhodin_soubory/image002.jpg.
- [80] Neuroservice [online]. [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://www.neuroservice.com/wp-content/uploads/2015/09/NMDA-receptor.jpg>.


KAPITOLA 5



Přílohy

5. PŘÍLOHY

Test kognitivních funkcí-Mini Mental State Exam (MMSE)

Oblast hodnocení:	Max.skóre:
<p>1. Orientace: Položte nemocnému 10 otázek. Za každou správnou odpověď započítejte 1 bod.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Který je teď rok? - Které je roční období? - Můžete mi říci dnešní datum? - Který je den v týdnu? - Který je teď měsíc? - Ve kterém jsme státě? - Ve které jsme zemi? - Ve kterém jsme městě? - Jak se jmenuje tato nemocnice?(toto oddělení?,tato ordinace?) - Ve kterém jsme poschodí?(pokoji?) 	<p>1 1 1 1 1 1 1 1 1 1</p>
<p>2. Paměť: Vyšetřující jmenuje 3 libovolné předměty (nejlépe z pokoje pacienta- například židle, okno, tužka) a vyzve pacienta, aby je opakoval. Za každou správnou odpověď je dán 1 bod</p>	3
<p>3. Pozornost a počítání: Nemocný je vyzván, aby odečítal 7 od čísla 100, a to 5 krát po sobě. Za každou správnou odpověď je 1 bod.</p>	5
<p>4. Krátkodobá paměť (=výbavnost): Úkol zopakovat 3 dřívě jmenovaných předmětů (viz bod 2.)</p>	3
<p>5. Řeč,komunikace a konstrukční schopnosti: (správná odpověď nebo splnění úkolů = 1 bod) Ukažte nemocnému dva předměty (př.tužka,hodinky) a vyzvěte ho aby je pojmenoval. Vyzvěte nemocného, aby po vás opakoval:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Žádná ale - Jestliže - Kdyby <p>Dejte nemocnému třístupňový příkaz: „<i>Vezměte</i> papír do pravé ruky, <i>přeložte</i> ho na půl a <i>položte</i> jej na podlahu.“ Dejte nemocnému přečíst papír s nápisem „Zavřete oči“. Vyzvěte nemocného, aby napsal smysluplnou větu (obsahující podmět a přísudek), která dává smysl) Vyzvěte nemocného, aby na zvláštní papír nakreslil obrazec podle předlohy. 1 bod jsou-li zachovány všechny úhly a protmutí vytváří čtyřúhelník.</p> 	<p>2 1 3 1 1 1</p>
<p>Hodnocení: 00 – 10 bodů těžká kognitivní porucha 11 – 20 bodů středně těžká kognitivní porucha 21 – 23 bodů lehká kognitivní porucha 24 – 30 bodů pásmo normálu</p>	

Obrázek 5.1: MiniMental State Examination

[77]

MONTREALSKÝ KOGNITIVNÍ TEST (Nasreddinův test)

JMÉNO : _____
 Vzdělání : _____ Datum narození : _____
 Pohlaví : _____ DATUM : _____

Prostorová orientace / zručnost 		Okopírujte krychli 	Namalujte ciferník a označte 11 hodin 10 minut (3 body) 	BODY _____/5			
Pojmenování zvířete 					_____/3		
Paměť	Přečtete řadu slov. Testovaný je musí opakovat. Zopakujte je ještě jednou. Po 5 minutách požádejte o opakování slov.	TVAŘ 1.pokus 2.pokus	SAMET	KOSTEL	KOPRETINA	ČERVENÁ	žádný bod
Pozornost	Přečtete řadu čísel (1 za vteřinu). Testovaný je má zopakovat, jak šla za sebou. Testovaný je má zopakovat pozpátku.	[] 2 1 8 5 4 [] 7 4 2				_____/2	
Čtete řadu písmen. Testovaný musí klepnout prstem pokaždé, když uslyší A. Pí 2 a více chybám nedostane žádný bod. [] FBACMNAAJKLBFAKDEAAAJAMOFAB							
Množina odcítů 7 od 100 [] 93 [] 86 [] 79 [] 72 [] 65 4-5 správných odcítů = 3 body / 2-3 správné = 2 body / 1 správný = 1 bod / 0 správný = 0 bod							
Řeč	Opakujte po mně: Pouze vím, že je to Jan, kdo má dnes pomáhat. Když jsou v místnosti psi, kočka se vždy schová pod gauč.	[] []				_____/2	
Vybavování slov:	Řekněte co nejvíce slov, která začínají písmenem K, během 1 minuty.	[] _____ (N > 11 slov)				_____/1	
Abstrakce	Podobnost mezi např. banán-pomeranč = ovoce.	[] vlak - bicykl [] hodinky - pravítka				_____/2	
Pozdější vybavení slov	Vybavení slov BEZ NÁPOVĚDY	TVAŘ []	SAMET []	KOSTEL []	KOPRETINA []	ČERVENÁ []	Body se udělí pouze BEZ NÁPOVĚDY
Nepovinně	Jedna nápověda Více nápověd:					_____/5	
Orientace	[] datum [] měsíc [] rok [] den [] místo [] město						_____/6
© Z.Nasreddine MD www.mocatest.org		NORMA ≥ 26 / 30		CELKEM Přidej 1 bod všem. Je-li nemají 12 leté školní vzdělání		_____/30	

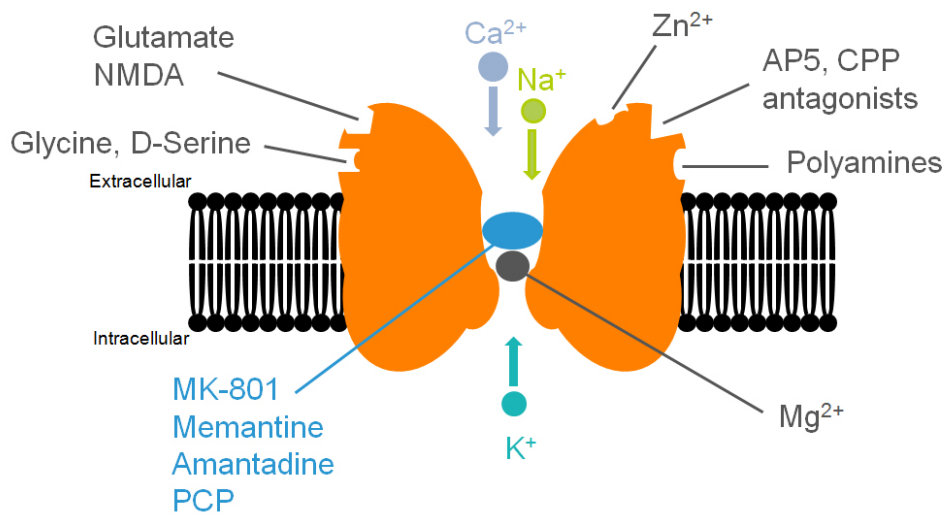
Obrázek 5.2: MoCA test

Skóre	Popis	Příklady
1	Bezchybné provedení <ul style="list-style-type: none"> • číslice 1–12 ve správném pořadí i místě • dvě ručičky ve správné poloze 	
2	Lehká prostorová chyba ciferníku hodin <ul style="list-style-type: none"> • vzdálenosti mezi číslicemi nerovnoměrné • číslice mimo kruh • otočení papíru s otočením číslic • použití pomocných čar pro lepší orientaci 	
3	Chybné zaznamenání času, zachované prostorové uspořádání hodin <ul style="list-style-type: none"> • pouze jedna ručička • čas zaznamenán slovně „10 hodin 10 minut“ • čas vůbec nezaznamenán 	
4	Střední stupeň prostorové dezorganizace, takže zaznamenání času není možné <ul style="list-style-type: none"> • nepravidelné mezery • zapomenutí čísel • perseverace: opakování kruhu, číslice na jednu stranu od 12 • záměna pravý-levý (číslíce proti směru) • dysgrafie – chybějí čitelné číslice 	
5	Těžká prostorová dezorganizace <ul style="list-style-type: none"> • jako u skóre 4, ale silněji vyjádřeno 	
6	Chybí zakreslení hodin (CAVE: vylučte depresi/delirium) <ul style="list-style-type: none"> • žádný pokus zakreslit hodiny • ani vzdálená podobnost s hodinami • napsáno slovo nebo jméno 	

Obrázek 5.3: Test kreslení hodin

[79]

NMDA receptor binding sites



Obrázek 5.4: NMDA Receptor

[80]