

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**MĚŘENÍ ÚČINNOSTI NOVÝCH INHIBITORŮ  
ACETYLCHOLINESTERASY POMOCÍ ELLMANOVY  
METODY**

**Rigorózní práce**

**Vedoucí práce: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.**

**Školitel-specialita: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2021**

**Mgr. Michaela Mackurová**

**Čestné prohlášení:**

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

V Hradci Králové dne:

.....

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala konzultance mé práce, mjr. PharmDr. Vendule Hepnarové, Ph.D. za odbornou pomoc v laboratoři a zejména za trpělivost a věnovaný čas během konzultací a sepisování této rigorózní práce.

Mé díky patří rovněž vedoucí mojí práce, Doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D. za poskytnutou pomoc s formální stránkou práce.

Ráda bych své díky vyjádřila i zaměstnancům katedry farmakologie a toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Brně, že mi umožnili realizovat tuto práci a poskytli příjemné pracovní podmínky.

Nakonec děkuji také mé rodině, která mě při sepisování práce podporovala a motivovala.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Vypracováno na: Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Katedra toxikologie a vojenské farmacie

Kandidát: Mgr. Michaela Mackurová

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Školitel-specialista: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Název diplomové práce: Měření účinnosti nových inhibitorů acetylcholinesterasy pomocí Ellmanovy metody

Cholinesterasy (ChEs) patří k významné skupině enzymů našeho organismu. Nejznámější acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa hrají důležitou roli v terapii řady onemocnění, mimo jiné i v terapii Alzheimerovy choroby (AD). Jedná se o neurodegenerativní chorobu, které se vyskytuje zejména u osob staršího věku. Patří mezi nejčastější formy demence a její výskyt stále stoupá. Doposud nebyla vyvinuta efektivní terapie AD, dostupná je léčba pouze symptomatická. Je proto nezbytné hledat taková terapeutika, která by byla schopna tuto závažnou nemoc zastavit či vyléčit.

Cílem této práce bylo stanovení inhibiční koncentrace nově syntetizovaných potencionálních léčiv AD vůči oběma ChEs. Testováno bylo celkem 27 derivátů odvozených od takrinu, jež byly obohaceny o substituenty zajišťující nižší toxicitu a lepší penetraci do mozku. Inhibiční potenciál testovaných látek byl stanoven spektrofotometricky pomocí Ellmanovy metody.

Zjištěné výsledky inhibiční aktivity byly ovlivněny jak počtem, tak i druhem navázaných funkčních skupin. Většina z testovaných látek však neprojevila vyšší inhibiční potenciál než odpovídající standard. Nejlepších inhibičních výsledků dosáhly deriváty

substituované atomem chloru v poloze 5 aminochinolinového skeletu. Navýšení počtu atomů chloru v molekule inhibiční potenciál snižuje.

Nejvhodnějším kandidátem pro další testování v hledání účinného potencionálního léčiva AD se jeví látka LG 624, která prokázala nejvyšší inhibiční účinnost vůči AChE ( $IC_{50}=34$  nM) i vůči BChE ( $IC_{50}=62$  nM) ze všech testovaných látek.

## **Abstract**

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Performed at: University of defence in Brno, Faculty of Military Health Sciences in Hradec Králové, Department of Toxicology and Military Pharmacology

Candidate: Michaela Mackurová

Leader of diploma thesis: Doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Supervisor: mjr. PharmDr. Vendula Hepnarová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Measurement of the efficacy of new acetylcholinesterase inhibitors using the Ellman method

Cholinesterases (ChEs) belong to an important group of enzymes in our body. The best known acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase play an important role in the treatment of many diseases, including Alzheimer's disease (AD). It is a neurodegenerative disease that occurs mainly in the elderly. It is one of the most common forms of dementia and its incidence is still increasing. To date, no effective therapy for AD has been developed, only symptomatic treatment is available. It is therefore necessary to look for therapeutics that would be able to stop or cure this serious disease.

The aim of this work was to determine the inhibitory contraction of newly synthesized potential drugs AD against both ChEs. A total of 27 tacrine derivatives were tested, which were enriched with substituents ensuring lower toxicity and better penetration into the brain. The inhibitory potential of the test substances was determined spectrophotometrically using the Ellman method.

The results of inhibitory activity were influenced by both, the number and the type of functional groups attached. However, most of the test substances did not show a higher inhibitory potential compared to the corresponding standard. The best inhibitory results were

obtained by chlorine-substituted derivatives in position 5 of the aminoquinoline skeleton. Increasing the number of chlorine atoms in the molecule reduces the inhibitory potential.

The most suitable candidate for further testing in the search for an effective potential drug for AD appears to be LG 624, which showed the highest inhibitory activity against AChE ( $IC_{50} = 34$  nM) and against BChE ( $IC_{50} = 62$  nM) of all tested substances.

## Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Cholinesterasy</b> .....	<b>10</b>
1.1 Acetylcholinesterasa.....	11
1.2 Butyrylcholinesterasa .....	13
<b>2. Alzheimerova choroba</b> .....	<b>14</b>
2.1 Epidemiologie a rizikové faktory .....	14
2.2 Diagnostika.....	16
2.3 Průběh a projevy AD.....	17
2.4 Patofyziologie.....	18
2.4.1 $\beta$ -amyloidní hypotéza .....	20
2.4.2 Tau hypotéza .....	21
2.4.3 Cholinergní hypotéza .....	22
2.4.4 Genetický podklad onemocnění .....	25
2.4.6 Excitotoxicita a proapoptotické faktory .....	26
<b>3. Léčba</b> .....	<b>27</b>
3.1 Inhibitory cholinesteras .....	27
3.2 Antagonista NMDA receptorů .....	29
3.1 Multi-target-directed ligands.....	30
3.1.1 Takrin a jeho deriváty .....	32
<b>4. Cíl práce</b> .....	<b>35</b>
<b>5. Metodika</b> .....	<b>36</b>
5.1 Princip metody .....	36
5.2 Chemikálie .....	38
5.3 Postup měření.....	40
5.4 Přístroje a pomůcky.....	40
5.5 Zpracování výsledků .....	41
<b>6. Výsledky</b> .....	<b>42</b>
<b>7. Diskuze</b> .....	<b>54</b>
<b>8. Závěr</b> .....	<b>60</b>



## Seznam použitých zkratek

AD	-	Alzheimerova choroba
ACh	-	acetylcholin
AChE	-	acetylcholinesterasa
AChEI	-	inhibitory acetylcholinesterasy
AChR	-	acetylcholinový receptor
Apo-E	-	apolipoprotein E
APP	-	amyloidový prekurzorový protein
ATChI	-	acetylthiocholinjodid
A $\beta$	-	$\beta$ -amyloid
BChE	-	butyrylcholinesterasa
BTChI	-	butyrylthiocholinjodid
CAS	-	katalytické aktivní místo
CNS	-	centrální nervový systém
FDA	-	Food and Drug administration
FVZ	-	fakulta vojenského zdravotnictví
HEB	-	hematoencefalická bariéra
ChAT	-	cholinacetyltransferasa
ChEs	-	cholinesterasy
IC <sub>50</sub>	-	inhibiční koncentrace
LD <sub>50</sub>	-	dávka látky, která způsobuje smrt u 50 % testované populace
MAO	-	monoaminoxidasa
mAChR	-	muskarinový receptor

MMSE	-	test kognitivních funkcí
MTDLs	.	multifunkční léčiva
M <sub>1-5</sub>	-	muskarinové receptory typu 1-5
nAChR	-	nikotinový receptor
NMDA	-	N-methyl-D-asparagová kyselina
NPL	-	nervově paralytické látky
OP	-	organofosfát
PAS	-	periferní anionické místo
PSEN-1	-	presenilin 1
PSEN-2	-	presenilin 2
ROS	-	reaktivní formy kyslíku
SD	-	směrodatná odchylka měření
SI	-	index selektivity
THA	-	takrin
7-MEOTA	-	7-methoxytakrin
6-Cl-THA	-	6-chlortakrin

## Úvod

Cholinesterasy (ChEs) jsou skupinou enzymů, které mají nezastupitelnou roli v našem organismu. V současnosti jsou známy 2 ChEs a to acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE). AChE má zásadní roli v ukončení cholinergní neurotransmise, BChE má spíše detoxikační význam a podílí se na metabolismu určitých látek v organismech. Znalost struktury a funkce těchto enzymů je důležitá součástí terapie řady různých onemocnění. Inhibitory AChE (AChEI) se používají k terapii autoimunitního onemocnění Myasthenia gravis, k léčbě různých druhů demencí včetně Alzheimerovy choroby (AD) či jako profylaktika při otravě nervově paralytickými látkami.

AD je řazena mezi nejčastější formy demence. Jedná se o neurodegenerativní onemocnění, které postihuje značnou část populace vyššího věku a jeho incidence neustále stoupá. Typickými projevy je porucha koncentrace, prostorová dezorientace, změny chování a osobnosti, porucha kognitivních funkcí až úplná ztráta paměti. Etiopatogeneze nemoci není doposud zcela objasněna a stále neexistuje léčivo, které by dokázalo AD vyléčit. Existuje však celá řada hypotéz, které se snaží možný vznik nemoci vysvětlit. Nejznámější z nich jsou hypotéza amyloidní, založená na představě nadměrného ukládání peptidu  $\beta$  amyloidu a následné kumulaci neuritických plaků v mozkové tkáni, teorie hyperfosforylovaného proteinu tau, glutamatergní a cholinergní hypotéza či teorie oxidačního poškození. Snahu o nalezení efektivního léčiva, které by dokázalo průběh nemoci zastavit či ji zcela vyléčit komplikuje fakt, že AD je multifaktoriálního charakteru, kdy jsou poškozeny jak anatomické součásti v CNS, tak i biochemické procesy. V ČR jsou prozatím k terapii AD schválena 4 léčiva. Jedná se o AChEI, které zvyšují množství acetylcholinu (ACh) na nervových spojích pro vedení vzruchu v CNS. Do této skupiny patří donepezil, rivastigmin a galantamin. A posledním lékem používaným k terapii AD je antagonist NMDA receptorů memantin. Tato dostupná léčiva slouží pouze k mírnění příznaků a zpomalení progresu nemoci. V současnosti se vývoj zaměřuje na hledání takových látek, které dokážou ovlivnit několik patologických jevů současně. Tato terapeutika se označují jako multi-targeted-directed ligands (MTDLs).

# 1. Cholinesterasy

Cholinesterasy (ChEs) je souhrnný název pro skupinu příbuzných enzymů, které katalyzují primárně hydrolýzu esterů cholinu rychleji než jiné estery za optimálních podmínek. Tato skupina enzymů má vliv na různé typy karboxylových esterů. (Aldridge, 1953)

U obratlovců rozlišujeme dva základní typy ChEs a to acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BChE). Dle mezinárodní biochemické unie (IUB) spadá AChE do třídy EC 3.1.1.7 a BChE do třídy EC 3.1.1.8. Tyto dva typy jsou rozlišeny na základě historického dělení podle substrátové specifity. I když jsou to enzymy příbuzné, jejich různorodá substrátová specifita je dána rozdílným počtem aromatických zbytků v aktivních místech enzymů. U BChE je 6 ze 14 aromatických zbytků aminokyselin nahrazeno alifatickými zbytky. Tento fakt zapříčinil různou velikost aktivních míst daných enzymů a u BChE je objem aktivního místa větší. Náhrada aromatických kyselin alifatickými vedla k selektivní citlivosti vůči různorodým inhibitorům obou enzymů. (Saxena, 1997)

AChE i BChE si jsou strukturně velmi blízké, sdílí až 65 % sekvence aminokyselin, i navzdory tomu, že podklad pro vznik jim dávají různé geny na lidských chromozomech. V případě AChE se jedná o chromozom 7 a v případě BChE o chromozom 3. (Allderdice et al., 1991) Obě tyto esterasy jsou přítomny ve velkém množství v lidském těle a jsou řazeny do nadrodiny tzv. serin-proteinových hydrolas. AChE se vyskytuje převážně ve svalech, mozku, membránách erytrocytů, nejvyšší aktivitu však vykazuje v cholinergním systému. (Brunovský, 2007) Zatímco BChE má vysokovou afinitu v játrech, střevě, srdci, plicích a ledvinách, kde má širší substrátovou specifitu. (Pohanka, 2011; Lincová a Farhali, 2007)

## 1.1 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (AChE) též známá po názvy acetylcholin acetylhydrolasa či jako pravá ChE typu 1 je membránově uložená glykoproteinová struktura, která existuje v několika izoformách, které mají katalytické vlastnosti téměř stejné, ale liší se tím, jak se vážou na povrch buňky a oligomerní strukturou. Její hlavní funkcí je rychlá degradace neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) ze synaptické štěrbině. Hydrolytickým rozkladem ACh vzniká cholin a acetát, přitom cholin se recykluje zpět do nervových zakončení, díky vysokoafinitního přenosového systému, který je závislý na koncentraci  $\text{Na}^+$  iontů, kde se z něj syntetizuje nová molekula ACh. (Obr. 1) AChE vykazuje vysokou katalytickou aktivitu, je uváděno, že každá molekula AChE degraduje až  $10^5 - 10^6$  molekul ACh. Maximální rychlost hydrolyzy je při koncentraci ACh  $2,5-3 \times 10^{-3}$  M. Optimální rychlost závisí na čistotě enzymu, ale i na jeho zdroji a pH. (Radic a Taylor, 2006)

Struktura AChE je rozsáhle prozkoumána od roku 1990. První experimenty byly prováděny na AChE, izolované z druhu elektrického úhoře (*Torpedi californica*). Strukturně je molekula AChE elipsovitého tvaru, tvořena 12ti  $\beta$ -skládanými listy, které obklopuje 14  $\alpha$ -helixů. (Čolovic, 2013) AChEs mají několik různých forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze v malé míře je přítomna monomerní forma G1. U AD roste výrazně podíl formy G1 a klesá podíl G4. (Jirák, 2002)

Součástí enzymu je přítomnost 20Å hluboké kavity, která slouží jako vlastní aktivní místo, zodpovědné za hydrolyzu ACh. Klinické studie se shodují na přítomnosti 2 vazebných bodů, a to periferního anionického místa (PAS) a aktivního katalytického místa (CAS).

PAS AChE, známé též jako  $\beta$  anionické místo, se nachází na povrchu katalytické kavity. Je tvořeno aromatickými aminokyselinami – Tyr70, Tyr121, Trp279, kdy právě posledně zmiňovaný Trp279 má klíčovou adhezní funkci pro AChE. (Johnson, 2006) Díky hydrofobním interakcím dojde k vazbě substrátu s nízkou afinitou a jeho posunutí hlouběji do dutiny, na jejímž dně se nachází katalytické místo. (Dvir, 2010) Prvním krokem při katalýze enzymu je přechodná vazba na PAS kvartérním aminem cholinové části enzymu.

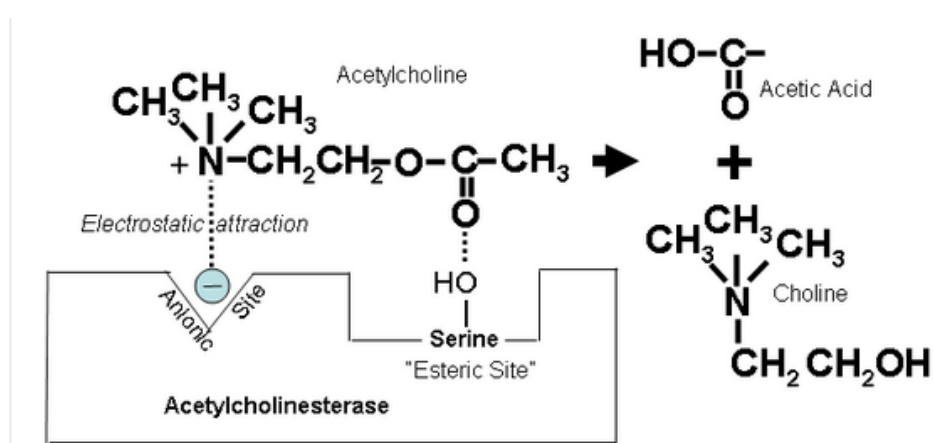
CAS AChE se nachází u dna dutiny a je tvořeno anionickým místem a esteratickým místem, umístěným hned vedle. Aktivní místo je obklopeno 14 aromatickými aminokyselinami, jejichž zbytky interagují se substráty. Přítomnost  $\pi$  elektronů aromatických jader aminokyselin

zajišťuje konformační změny, čímž dojde k rozšíření kavity pro správnou orientaci a penetraci substrátu. (Pohanka, 2011; Sussman 1992)

Esteratické místo je lokalizováno na dně kavity a je tvořeno katalytickou triádou aminokyselin – Ser200, His440, Glu327, podobně jako aktivní místa jiných serinových hydroláz (triáda má jinou chiralitu či glutamát bývá nahrazený aspartátem).

Serin se aktivuje v přítomnosti His a Glu, dojde k acylaci mezi hydroxy skupinou serinu a kyslíkem ACh. Vzniklá kovalentní vazba enzym - substrát vytvoří oxyanion, který reaguje s dvěma Gly za vzniku vodíkové vazby. Hydrolýzou karboxylu vzniká acylderivát daného enzymu a volný cholin. Následně molekuly vody nukleofilně napadají acylderivát v přítomnosti histidinové zbytku v esteratickém místě. Uvolní se acetát a regenerovaný volný enzym. (Dvir, 2010; Nachmansohn, 1951)

Znalost struktury AChE a vlastností katalytického místa má důležitý význam při výzkumu potenciálních léčiv. Znalost mechanismu inhibice enzymu vede k návrhu inhibitorů AChE (AChEI) pro budoucí terapii Alzheimerovy choroby nebo našel uplatnění při hledání nových reaktivátorů AChE, jakožto antidot při zasažení nervově paralytickými látkami. AChEI jsou také lékem volby při autoimunitním onemocnění Myasthenia gravis, kde poskytují symptomatickou úlevu.



Obr. 1: Hydrolýza ACh enzymem AChE (ATSDR, 2021)

## 1.2 Butyrylcholinesterasa

Druhým enzymem patřícím do skupiny ChEs je butyrylcholinesterasa (BChE), nazývaná též pseudocholinesterasa či plazmatická cholinesterasa. Toto označení vzniklo v minulosti díky tomu, že AChE se nachází na povrchu erytrocytů a po centrifugaci krve zůstává v plazmě jen BChE. (Radic a Taylor, 2006) BChE je syntetizována v játrech a odtud je sekretována do plasmy. Přítomna je především v periferních tkáních, střevech, pankreatu, v menší míře pak v mozku. Její fyziologická role nebyla prozatím přesně stanovena, pomáhá však regulovat transmissi ACh, na rozdíl však od AChE nemá přirozený substrát. Podílí se na metabolismu lipoproteinů, udržování myelinu, hraje roli v buněčné adhezi a neurogenезi. Působí primárně jako detoxikační enzym. Je schopna vychytat karbamátové a organofosfátové zbytky ještě předtím, než doputují k AChE. Obecným faktem však je, že je schopna vázat objemnější ligandy a podílí se na metabolismu řady exogenních látek (kokainu, prokainu, heroinu, acetylsalicylové kyseliny či sukcinylcholinu) V případě, že AChE není přítomna, nebo je její aktivita snížena, funguje BChE jako záloha a přebírá regulaci cholinergního přenosu. Tím se vysvětluje, že při rozvoji AD je její aktivita markantně zvýšena a hraje důležitou roli při agregaci amyloidu beta a rozvoji neurofibrilárních filament. (Patočka, 2004; Pohanka, 2011; Cokugras, 2003)

BChE má dlouhý biologický poločas až 120 dnů, čehož se využívá při detekci organofosfátů (OP) až několik dnů po jejich expozici. Dlouhý poločas a snadná izolace stabilního komplexu OP-BChE z plazmy nasvědčují k využívání BChE jako biomarkeru při expozici nervově paralytickými látkami či organofosfátovými pesticidy. Její zásadní role v metabolismu kokainu našlo uplatnění jako bioscavenger při léčbě otrav kokainem. (Sporty, 2010)

BChE by mohla v budoucnu sloužit jako včasný marker v diagnostice AD. Bylo zjištěno, že mozkomíšní mok pacientů s touto chorobou obsahuje specifickou formu BChE, jejíž glykosylace je změněna. Analýza této formy by mohla posloužit pro citlivou detekci. (Lockridge, 2015)

## 2. Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je neurodegenerativní, progresivní onemocnění, postihující značné procento populace zejména ve věku nad 65 let. Jedná se o jednu z nejčastějších příčin demencí. (Blennow, 2006) Typickým projevem nemoci je porucha kognitivních funkcí, což zahrnuje ztrátu paměti, schopnost koncentrace a myšlení, sníženou prostorovou orientaci a neschopnost zpracování informací. Onemocnění a jeho klinické charakteristiky poprvé popsal začátkem 20. století německý psychiatr Alois Alzheimer, po němž tato choroba nese jméno. V současné době stále neexistuje kauzální léčba tohoto onemocnění. Vzhledem k nabývajícimu počtu případů představuje AD čtvrtou až pátou nejčastější příčinu smrti a tedy pro mnohé země významnou ekonomickou a politickou zátěž. (Korábečný, 2012)

### 2.1 Epidemiologie a rizikové faktory

Zásadní roli při vzniku AD hraje věk a pohlaví. V daném případě lze prohlásit, že je obecně více ohroženo pohlaví ženské než mužské. Vysvětlením může být úbytek estrogenních hormonů u žen v menopauzálním stádiu a průměrná délka života, která je u žen vyšší. S rostoucím věkem roste incidence tohoto onemocnění exponenciálně - mezi 65 až 74 lety je 3 %, mezi 75 až 84 lety je již 19 % a po 85. roku věku dosahuje 47 %. (Zvěřová, 2017) Tříprocentní incidence u pacientů nad 65 let se každých 5 let zdvojnásobuje. Rozhodujícím věkem je tedy 65. rok života a více, avšak existují i případy s mnohem dřívějším nástupem, většinou mezi 40. - 50. rokem života. Dalším rizikovým faktorem je rodinná anamnéza, kdy podle zpracovaných výzkumných dat je mnohem větší pravděpodobnost vzniku AD v rodině s genetickou predispozicí u více než jednoho rodinného příslušníka spolu s vlivy životního prostředí. Na základě těchto poznatků bývá AD rozdělována do dvou základních forem – dědičná a sporadická. Dědičná forma se začíná projevovat dříve, už kolem 40 let a vždy před 65. rokem života. Tvoří přibližně kolem 3 % všech případů. Zatímco mnohem častější forma sporadická se projevuje až po 65. roku věku a rostoucím věkem stoupá i její riziko vzniku. (Preiss, 1998)



Podle Koukolík et al. (1998) jsou významnými a prokázanými rizikovými faktory genetické polymorfismy a mutace, jako je nosičství alely  $\epsilon$ -4 (E4) genu pro apolipoprotein E. Apolipoprotein E (Apo-E) je látka tělu vlastní, která nachází své fyziologické uplatnění při transportu cholesterolu. U lidí jsou známy izoformy E2, E3 a E4. Lidé, vybavení izoformou E4/E4, inklinují ke vzniku AD 3-5 krát častěji než srovnatelná populace s jinými izoformami Apo-E. Dalšími neurčitými rizikovými faktory pro vznik AD jsou poranění hlavy, kouření a nižší vzdělání.

Přítomnost obecných prvků spojených se špatným životním stylem také podporuje vznik a rozvoj AD. Patří zde kardiovaskulární choroby, vysoký krevní tlak, vysoká hladina cholesterolu, diabetes 2. typu, nízké hladiny vitamínu B<sub>12</sub> a folátu, snížená až nulová fyzická aktivita a obezita.

Je potřeba také zmínit i faktory, které riziko vzniku AD snižují, tzn. protektivní faktory. Za tyto faktory se naopak považuje vyšší vzdělání jednotlivce, určitá psychická aktivita, mentální trénink, užívání antiflogistik a látek snižujících hladiny cholesterolu, hormonální substituce u žen po menopauze, včasná a účinná léčba depresí, spojená s neklesající psychickou aktivitou ve vyšším věku. (Jirák, 2009)

Tab. 1: Přehled a shrnutí rizikových faktorů u AD

<b>Rizikové faktory</b>	
věk	v 85. roku života trpí AD každý čtvrtý až pátý člověk
pohlaví	pohlaví ženské je postiženo více než pohlaví mužské
vzdělání	nižší vzdělání nese vyšší riziko pro vznik AD
genetické předpoklady	přímá dědičnosti či genetické polymorfismy a mutace
alkohol	dlouhodobá a nadměrná konzumace zvyšuje riziko
poranění hlavy	zranění se ztrátou paměti na 15min zvyšuje riziko dvojnásobně
kouření	přispívá k rozvoji demence
zdraví a životní styl	vysoká hladina cukru, lipidů, nedostatek vitamínů a pohybu
sklony k depresím	souvisí s vyšším rizikem rozvoje

## 2.2 Diagnostika

Diagnostiku AD můžeme nejčastěji posoudit z anamnestických nebo klinických údajů. Další možností je stanovení vyloučením jiných etiologií demence. Nejznámější a nejvíce používaný screeningový test, založený na testování kognitivních funkcí je tzv. Mini-Mental State Examination (MMSE). Test má celkem 30 otázek a úkolů, které se zaměřují na krátkodobou paměť, orientační dovednosti, schopnost číst a psát a jiné. Každá správná odpověď se počítá jako jeden bod v testu. Člověk s normální úrovní kognitivních funkcí by měl dosáhnout na hranici 30 bodů. Test však není zcela spolehlivý, jeho nevýhodou může být poskytování falešně pozitivních výsledků či nemožnost rozeznání časně formy AD, která je pro léčbu zásadní. Nachází uplatnění zejména v průběhu monitorování nemoci. Bodová škála a vyhodnocení MMSE testu jsou uvedeny v (Tab. 2). (Ressner, 2004)

Tab. 2: Vyhodnocení MMSE testu

<b>Vyhodnocení MMSE testu</b>	
<b>27 - 30 bodů</b>	normální kognitivní funkce
<b>25 - 26 bodů</b>	jedná se o lehkou poruchu kognitivních funkcí nebo počáteční demenci – nutnost pacienta sledovat
<b>18 – 24 bodů</b>	lehká forma demence
<b>6 – 17 bodů</b>	středně těžká forma demence
<b>6 a méně</b>	těžká forma demence

Pro specifitější diagnostiku se používá například test kreslení hodin (Clock – drawing test), kdy pacient dostane příkaz nakreslit ciferník hodin se všemi čísly a ručičkami, aby naznačovaly konkrétní čas. Již v počátečních stádiích choroby je výsledek tohoto testu pozitivní. Pro testování kognitivních funkcí se využívá především ADAS – cog test (Alzheimer disease assessing test – kognitivní složka), Adenbroek Cognitive examination (ACE) a paměťový test učení, kdy je pacient zkoušen zapamatováním 15 slov. (Ressner, 2004)

Mezi komplexní testy řadíme ty, které jsou schopny prověřit všechny složky paměti a lze je použít k diagnostikování i časných fází nemoci. Jejich nevýhodou je jejich časová náročnost. Patří sem Wechslerův test a Cambridge Cognitive Examination (CAMCOG), oba zaměřené na testování orientace, paměti, pozornosti a schopnosti srozumitelného vyjadřování. (Roth et al., 1986)

Pro konečné potvrzení diagnózy jsou využívány markery choroby tzv. biomarkery. Ke stanovení markerů slouží zobrazovací metody (výpočetní tomografie - CT, magnetická resonance - MRI), které identifikují atrofii mozku nebo rozšíření komorových struktur, hodnotu některých proteinů v porovnání se zdravými jedinci (tau protein, beta amyloid) a také poruchy epizodické paměti, která bývá zasažena jako první. (Jiráček, 2008)

## 2.3 Průběh a projevy AD

V současné době se odhaduje, že je ve světě kolem 46,8 miliónů lidí, trpících Alzheimerovou chorobou. V České republice se počet postižených odhaduje na cca 164 000 a v roce 2050 to může být více než dvojnásobek. (Fenclová, 2020) Tato čísla vyměřují počet diagnostikovaných pacientů, což znamená, že reálný počet nemocných, zahrnujících i nediodagnostikované pacienty, je daleko vyšší. Současně schválená léčba v ČR dokáže zpomalit progres nemoci, a tím zlepšit kvalitu života, ale nedokáže tuto nemoc zastavit nebo zcela vyléčit. Stěžejním bodem pro prevenci a zpomalení progresu nemoci je diagnostika, schopná zachytit i raná stádia. (Korábečný, 2012; Thies, 2012)

Podle závažnosti symptomů lze AD rozdělit do 3 stádií - preklinické stádium, střední fáze a těžká fáze. Jednotlivé příznaky se v daných fázích překrývají, proto není snadné nemocného zařadit do určitého stádia. Onemocnění trvá v průměru 7–10 let od prvního výskytu klinických příznaků do smrti. (Jiráček, 2008)

Preklinické stádium souvisí s rozvojem patologických projevů v mozku a je bez jakýchkoli známek choroby. Začíná několik let před stanovením diagnózy.

Ve střední fázi nemoci se začínají projevovat první příznaky jako je neschopnost zapamatovat si nové informace, ztráta krátkodobé paměti a prostorová dezorientace. Projevy souvisí i se změnou osobnosti jedince a je potřebná dostatečná starostlivost a pomoc okolí. Pacienti v pokročilejším stádiu ztrácí schopnost rozpoznat své nejbližší. Valná většina jedinců je diagnostikována právě v tomto období. Postupné poškození nervových buněk zapříčiňuje horší vyjadřování myšlenek, problémy se skládáním vět, čtením, psáním, změny osobnosti (impulzivní chování, ztráta zájmu, agrese, podrážděnost, poruchy spánku). Střední fáze je nejdelším obdobím nemoci a může trvat od 3-5 let. (Musiek, 2013)

V těžkém stádiu už pacienti postrádají schopnost postarat se o své základní potřeby a jsou zcela závislí na pomoci okolí. Výše zmíněné projevy nemoci se dále prohlubují, nemocní nepoznávají své nejbližší a opakuji jen malý výčet slov. Je snižována schopnost pohybu, pacienti mají obtíže s příjmem potravy, neudrží stolici ani moč. AD je fatální onemocnění, kdy pacienti umírají v důsledku sekundárních infekcí, nejčastěji aspirační pneumonií. (Ganguli, 2005)

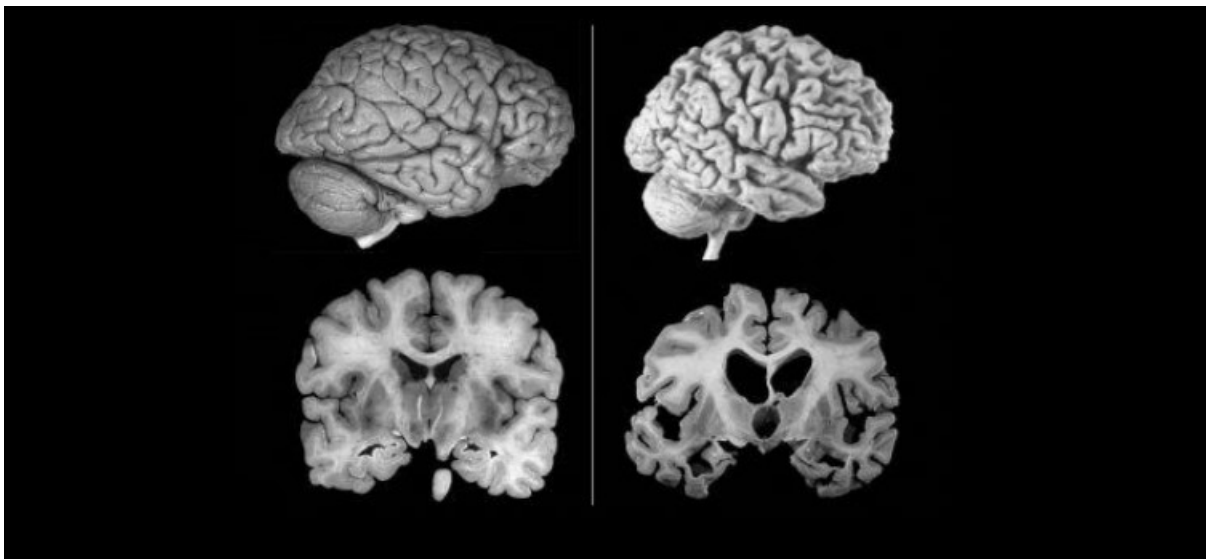
## 2.4 Patofyziologie

Patofyziologické změny související s AD zahrnují jak poškození funkce neurotransmiterních systémů, tak strukturální makroskopické změny mozkové tkáně. Změny funkce neurotransmiterů mají přímou souvislost s úbytkem neuromediátoru ACh a v důsledku toho sníženou aktivitu enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT, E.C.2.3.1.6), který je za syntézu ACh zodpovědný. U cholinergních receptorů dochází ke snížení počtu nikotinových (nAChR) a zároveň i počtu muskarinových receptorů (mAChR). (Lombardo, 2015) Narušení funkce cholinergního systému je úzce spojeno s poruchou kognitivních funkcí i paměti. Poškození neuronů až excitotoxicita je projevem zvýšené stimulace hlavního excitačního neurotransmiteru glutamátu. Při AD dochází také k ovlivnění adrenergního a serotoninergního systému, projevující se neuropsychiatrickými defekty. (Petrovič et al., 2004)

AD je řazena mezi tzv. atroficko-degenerativní demence, projevující se atrofií mozkové tkáně. Ve většině mozků alzheimerovských pacientů lze zobrazovacími metodami prokázat obraz kortiko-subkortikální atrofie. Stupeň atrofie odpovídá stupni postižení kognitivních

funkcí, avšak nemusí tomu být vždy. Dokonce mohou existovat i pacienti s rozvinutou AD bez známek makroskopické atrofie. Makroskopické změny jsou nejvíce zřetelné v temporální oblasti. (Jirák et al., 1999)

Strukturální změny mozkové tkáně jsou tedy spojeny s úbytkem neuronů zejména v hippocampu a kůře a narušením buněčných funkcí. (Obr. 2) Mezi další nápadné změny mozkové tkáně patří tvorba a ukládání patologických proteinů. AD je typickým zástupcem tzv. amyloidopatie, kdy v mozkové kůře jsou pozorovány okrouhlé chumáče rozpadlých nervových vláken. V jejich středu se často objevuje bílkovinná hrudka tvořená beta-amyloidem ( $A\beta$ ). Tyto extracelulární depozita amyloidu jsou nazývána senilní či neuritické plaky (NPs). Dalším diagnostickým znakem je přítomnost intracelulárních neurofibrilárních shluků (NFTs), tvořených fosforylovaným proteinem Tau. Zmíněné patologické projevy se mohou začít rozvíjet téměř 20 let před vznikem klinických příznaků nemoci. (Krombholz, 2011; Jirák, 2009)



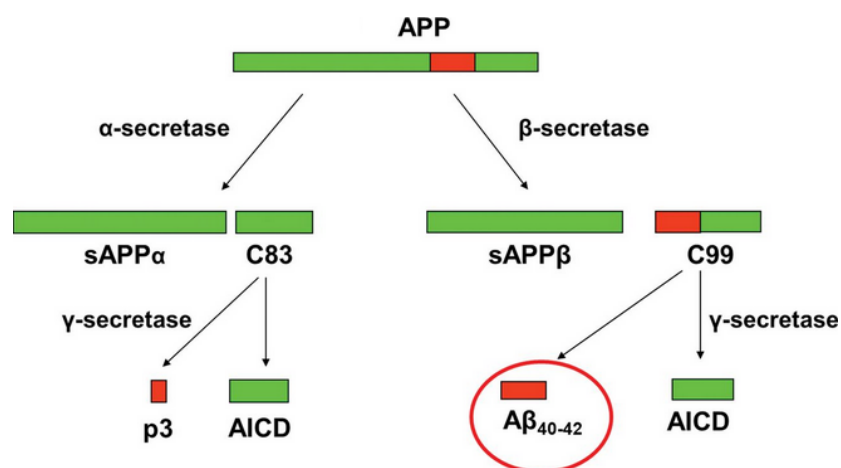
Obr. 2: Srovnání mozkové tkáně zdravého jedince a jedince s AD (Bagad, 2013)

Prozatím není objasněna primární příčina nemoci. Je však známo více patogenetických prvků, mezi nimiž jsou hledány souvislosti a vzájemná sounáležitost. Problematiku patofyziologie lze rozdělit do následujících hypotéz:

### 2.4.1 $\beta$ -amyloidní hypotéza

$\beta$ -amyloidní hypotéza je založená na tvrzení, že důvodem vzniku AD je nadměrná kumulace peptidu amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ), což má později za následek rozvoj neuritických plaků (NPs) v mozkové tkáni.  $\beta$ -amyloid je tvořen z transmembránově uloženého amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za přirozenou součástí neuronů. Za fyziologických podmínek dochází ke štěpení APP na solubilní fragmenty o 40 aminokyselinách působících neuroprotektivně. Však při rozvoji AD dochází ke štěpení APP enzymy beta a gama-sekretasou na delší fragmenty o 42 až 43 aminokyselinách. Tyto atypické dlouhé fragmenty přestávají být solubilní a oligomerizují.

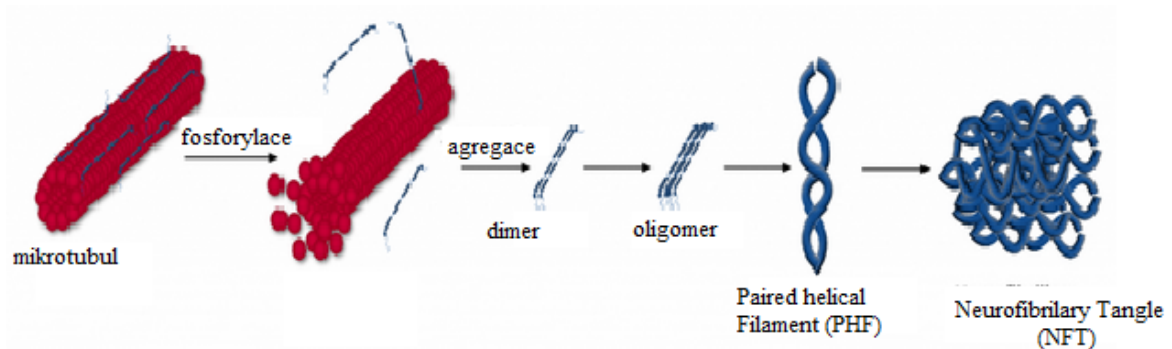
Vzniklé oligomery jsou výrazně neurotoxické, následně koagulují v mezibuněčných prostorách mozkové kůry a tím vzniká polymerovaný beta-amyloid. Drúzy  $A\beta$  tvoří základ tzv. alzheimerovských plaků, postihující nervový systém. (Obr. 3) V oblasti plaků dochází k projevům sterilního zánětu, vzniká gliový lem a nastává odumírání neuronů. Místa, s největším výskytem odumřelých jednotek nervového systému se nachází v oblasti temporálního laloku, zajišťující krátkodobou paměť. Tímto lze vysvětlit typické výpadky paměti u pacientů v rané fázi onemocnění. (Jirák, 2009; Musiek, 2013) Amyloidní hypotéza je v současné době nejvíce uznávanou teorií vzniku AD.



Obr. 3: Schématické znázornění vzniku amyloidových plaků (Teich et al., 2012)

## 2.4.2 Tau hypotéza

Tau protein, neboli s mikrotubuly spojený protein, za fyziologických podmínek stabilizuje mikrotubuly, které jsou základní složkou cytoskeletu. Při AD je jeho funkce patologicky změněna (především nadměrnou fosforylací), dochází k jeho agregaci a neurotoxicitě. Postižená neuronová vlákna polymerují, vytváří párově heliakální filamenta, která jsou podkladem pro vznik tzv. neurofibrilárních tangles (uzlíčků, košíčků). (Obr. 4) Tyto uzlíčky se v neuronech rozšiřují a postižené neurony podléhají apoptóze. Hyperfosforylaci proteinu tau spouští aktivovaný enzym GSK-3 $\beta$  (glykogen syntasa kinasa 3 $\beta$ ) za účasti enzymu CDK 5 (cyklin dependentní kinasa 5). Tento děj je pravděpodobně spouštěn toxickými oligomery beta-peptidu. Mutace tau proteinu hraje významnou úlohu nejen při rozvoji AD, ale také v případě jiných neurodegenerativních onemocnění, souhrnně označovaných jako tautopatie. (Jirák, 2009; Avila, 2004; Mandelkow, 2012)



Obr. 4: Schéma vzniku neurofibrilárních vláken (Thomson, 2018)

### 2.4.3 Cholinergní hypotéza

Tato hypotéza byla po několik desetiletí považována za jedinou uznávanou hypotézu, pokoušející se vysvětlit patofyziologii AD. Avšak až do té doby, než byl roku 1991 z neuritických plaků izolován 4 kDa velký peptid, beta-amyloid.

Cholinergní hypotéza se zakládá na faktu, že při rozvoji AD dochází k narušení cholinergního systému. V důsledku úbytku a snížení plasticity některých neuronů bývají postiženy především acetylcholinergní neurony, pronikající z Nucleus Basalis Meynerti difúzně do oblasti hippocampu a asociativních korových oblastí. Dále je snížena aktivita enzymu cholinacetyltransferasy (ChAT), který syntetizuje ACh. Ubývá také presynaptických mAChR i nAChR. Postsynaptická část zůstává intaktní, včetně postsynaptických receptorů. Současně roste aktivita korové AChE a BChE. Nejvíce nápadná ztráta počtu cholinergních vláken byla nalezena ve spánkové asociační kůře. (Preiss, 1998; Koukolík, 1998)

ACh je neuromediátor, umožňující přenos informací mezi buňkami formou chemického vedení vzruchu z neuronu na neuron v rámci cholinergní synapse. Je využíván všemi pregangliovými a částí postgangliových neuronů sympatiku a také všemi pre i postgangliovými neurony parasympatiku. Důležité cholinergní synapse lze nalézt i v centrálním nervovém systému (CNS), kde slouží k inervaci téměř všem částem mozku. Cholinergní systém je tedy nezbytný pro řadu procesů jako je paměť, smyslové vnímání, učení, pozornost či regulaci cyklu spánku. Syntéza ACh se realizuje v cytoplazmě cholinergních neuronů z cholinu a acetylkoenzymu-A. Přenos acetylových skupin na cholin je katalyzován enzymem cholinacetyltransferázou (ChAT). Vzniklý ACh se přechodně uchovává v synaptických vezikulech. Obsah daného puchýřku se nazývá kvantum a jeho množství kolísá od 1 000 do 50 000 ACh molekul. (Martínková, 2007; Amber, 2010)

K uvolnění ACh dochází na základě impulsu šířícího se po nervovém vlákně. Při této depolarizaci cholinergních neuronů nastane exocytóza vezikul a molekuly ACh jsou uvolněny do synaptické štěrbině, kde jsou odbourávány enzymem AChE.

ACh je velmi rychle hydrolyzován na cholin a acetát a touto finálním rozkladem je ukončena fyziologická funkce neuromediátoru ACh přenášejícího nervové vzruchy v cholinergním systému.

ACh působí na 2 základní typy membránových receptorů: muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR). nAChR jsou spřaženy s iontovými kanály buněčné membrány, fungují tedy jako ligandem řízené a řadíme je k ionotropním receptorům. Jejich schopnost je ovlivnění



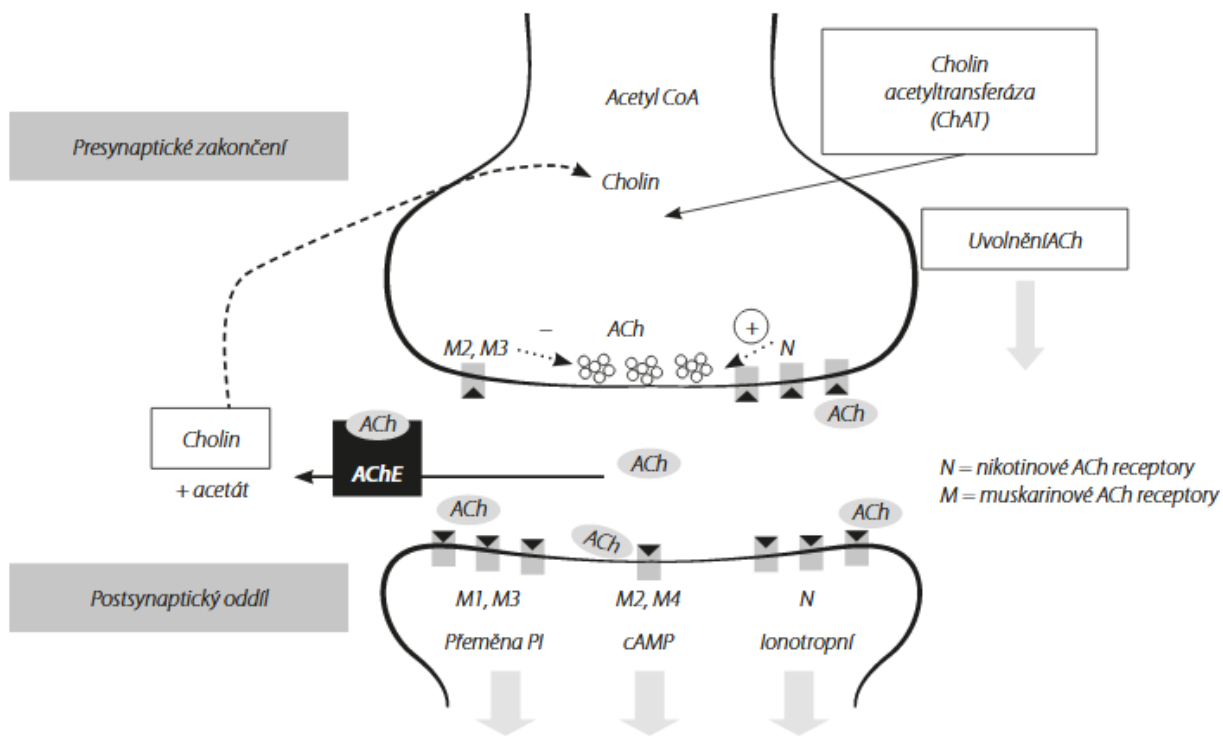
toku iontů (zejména kationty  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ ) skrz kanály, kdy po navázání ACh dochází k aktivaci receptoru, následuje konformační změna, kanál se otevře a poté po depolarizaci postsynaptické membrány nastává proudění iontů po koncentračním gradientu. Všechny nAChR mají pentamerní strukturu. (Bolis, 2005)

Role periferních a centrálních nikotinových receptorů jsou zcela rozdílné. V periferním nervovém systému (PNS) zajišťují rychlou synaptickou odpověď, kdežto v CNS plní spíše funkci modulátoru. nAChR, nacházející se v CNS, jsou vysoce propustné pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a zvýšená hladina těchto iontů napomáhá uvolnění dalších neurotransmiterů, jako je ACh, GABA, glutamát, serotonin, dopamin či norepinefrin. (Ferreira, 2002)

Existují jednotlivé subtypy nAChR. Jedná se o nAChR neuronální ( $\text{N}_\text{N}$ ) s podjednotkami  $(\alpha 3)_2$  a  $(\beta 4)_3$ , který se nachází v sekrečních vláknech nadledvinové dřeně, ve vegetativních gangliích a dále nAChR muskulární ( $\text{N}_\text{M}$ ) se svými podjednotkami  $(\alpha 1)_2$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ , který je umístěný na nervosvalové ploténce na neuromuskulárních spojeních.  $\text{N}_\text{M}$  je tedy zodpovědný za svalovou kontrakci. (Finkel, 2009; Soukup, 2010)

mAChR jsou spřaženy s G-proteinem, inhibice či aktivace G-proteinu moduluje aktivitu enzymatických systémů skrz systém druhých posílů. mAChR se rozlišuje na 5 subtypů. Liší se jednak v umístění a také v dějích, které lze očekávat po stimulaci těchto receptorů.  $\text{M}_1$  receptory se nachází v parietálních buňkách žaludku a nervových buňkách,  $\text{M}_2$  receptory v srdečních buňkách a  $\text{M}_3$  receptory jsou lokalizovány v buňkách hladké svaloviny a exokrinních žlázách. Tyto zmíněné 3 typy M receptorů jsou prozatím nejdětalněji prostudovány. Receptory  $\text{M}_4$  a  $\text{M}_5$  jsou lokalizovány v CNS.

Subtypy  $\text{M}_1$ ,  $\text{M}_3$  a  $\text{M}_5$  jsou spojeny s  $\text{G}_\text{q}$  proteinem, po jejich stimulaci dojde k aktivaci fosfolipázy C a jsou zodpovědné za zvýšení buněčné dráždivosti. Kdežto subtypy  $\text{M}_2$  a  $\text{M}_4$  jsou spojené s  $\text{G}_\text{i}$  proteinem, což má za následek pokles cyklického adenosinmonofosfátu, otevření  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, efluxu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, čímž se snižuje buněčná dráždivost. Fungují jako autoreceptory a tlumí vyplavování ACh na synapsi, zejména v kůře a hipokampu. (Lincová, 2002; Ferreira, 2002)



Obr. 5: Cholinergní transmise (Jiráček, 2015)

#### 2.4.4 Genetický podklad onemocnění

Dané teorie patofyziologie AD jsou podmíněné zejména genetickými a patofyziologickými nálezy. S rostoucím věkem se hmotnost mozku zmenšuje. Rozšiřují se mozkové komory a snižuje se tloušťka mozkové kůry. Tyto proměnlivé makroskopické nálezy dementních pacientů se překrývají s nálezy stejně starých nedementních pacientů. Důležitou roli hrají abnormálně zpracovaná ložiska APP a tau proteinu, patrná z mozku pacientů při CT a MR vyšetření. V případě APP dochází působením beta a gama sekretasy ke zvýšené tvorbě A $\beta$  o 42 aminokyselinách, které oligomerizují a agregují. Tento patofyziologický jev je podmíněn mutací na dlouhém raménku 21. chromozomu. U menší skupiny nemocných, zejména u nemocných s familiárním výskytem a časným začátkem choroby, se toto podmínění váže i na 1. a 14. chromozom. Na genetické úrovni byly identifikovány tyto 3 geny – gen pro APP na chromozomu 21, gen presenilin-1 (PSEN1) na chromozomu 14, gen presenilin-2 (PSEN2) na chromozomu 1. Zvýšená tvorba a agregace A $\beta$ <sub>42</sub>, který je hlavní složkou amyloidních deposit u pacientů s AD, je následkem zmíněných mutací. (Kadmiri, 2014)

Další genetickou predispozici nese gen pro ApoE. Primárně se jedná o apolipoprotein mozku, vylučován astrocyty a jeho funkce v organismu je spojována s udržováním hladin cholesterolu a fosfolipidů v krvi. ApoE se vyskytuje v různých izoformách (alelách), na rozvoj AD má největší dopad izoforma E4. Tato alela je zakódována zhruba u poloviny pacientů s AD, přítomnost dvou jejích kopií zvyšuje riziko vzniku AD dvanáctkrát. Je známo, že se ApoE také podílí na metabolismu A $\beta$  a vzniku amyloidních plaků. (Musiek, 2013)

### 2.4.5 Antioxidační teorie

Oxidační stres spojený s tvorbou volných kyslíkových radikálů (ROS) hraje významnou roli v patogenezi řady onemocnění včetně AD. Mozková tkáň je náchylná k oxidačnímu působení důsledkem vysokého využití esenciálního kyslíku, díky přítomnosti polynenasycených mastných kyselin (jejich lipidy podléhají peroxidaci) a také kovových iontů (Fe, Cu, Zn) schopných oxidačně-redukčních reakcí. ROS jsou vysoce reaktivní také s biomolekulami, včetně lipidů, sacharidů a DNA. Při spuštění řetězcové reakce, nastává buněčná dysfunkce a nervové buňky odumírají. Po napadení tkáně dochází k tvorbě sterilního zánětu, jsou vyplaveny cytokiny, interleukiny, volné radikály a dochází k vyvolání imunitní reakce. (Skoumalová, 2011; Butterfield, 2007)

### 2.4.6 Excitotoxicita a proapoptotické faktory

U AD je postižen i glutamátergní systém, v důsledku nadměrného uvolňování excitačních aminokyselin zejména glutamátu v nejpostiženějších korových oblastech a jeho snížené zpětné vychytávání. Glutamát se tak nadměrně váže na ionotropní receptor typu NMDA (N-methyl-D-aspartátový receptor). Dochází pak k nadměrnému otevření kalciových kanálů a ke zvýšenému vstupu kalcia do neuronů. Následně k aktivaci proteinkinas a fosfatas a další kaskádě dějů, vedoucí k nerovnováze buňky, její destabilizaci a v konečném důsledku k neuronální apoptóze. Z odumřelé buňky se následně uvolní excitační kyseliny a celá reakce se řetězcově opakuje. (Preiss, 1998)

U AD je navíc zjištěn nedostatek určitých antiapoptotických a nadbytek proapoptotických faktorů.

Například je prokázána nižší produkce faktoru CREB (cAMP response element binding protein) a v důsledku toho nižší tvorba nervového růstového faktoru BDNF (brain-derived neurotrophic factor), což vede ke snížení neuronální plasticity. Zvyšuje se hladina toxicky působícího homocysteinu. (Jiráček, 2002)

### 3. Léčba

Důležitý předpoklad pro optimální léčbu AD zahrnuje zejména správnou diagnózu, rozpoznání a sledování všech významných příznaků. Léčbu je potřeba zahájit co nejdříve, nejlépe již v iniciálním stádiu onemocnění, protože čím dříve se s léčbou začne, tím je její přínos žádoucí. Péče by měla být komplexní, zaměřená na konkrétního pacienta a jeho rodinu či pečující. (Franková, 2016)

V současné době jsou pro terapii AD užívány pouze dvě skupiny látek – AChEI (donepezil, rivastigmin, galantamin) a antagonisty N-methyl-D-aspartátových receptorů (memantin). Použití a schválení těchto látek je ověřeno medicínou na důkazech (evidence-based medicine). Jejich funkcí je především zpomalení progresu demence, oddálení těžkých stadií demence, oddálení doby, kdy jsou postižení pacienti umisťováni do léčebných a sociálních zařízení. První skupinu farmak představují inhibitory cholinesteras, tzv. kognitiva. Tyto látky jsou léky volby, zlepšují cholinergní transmisí blokací enzymů, které odbourávají ACh. Používají se u lehčích až středních forem AD.

#### 3.1 Inhibitory cholinesteras

Inhibitory cholinesteras jsou strukturně nejednotné, jednotliví zástupci se liší v typu inhibice a také v tom, zda odbourávají či neodbourávají molekuly BChE. Hlavním zástupcem piperidinových derivátů je donepezil. Na trh byl uveden v roce 1996, jako náhrada fyzostigminu a takrinu. V současnosti je nejvíce užíván k terapii AD na světě. Má vysokou selektivitu k AChE lokalizované v centrálním nervovém systému. Naopak má poměrně malý účinek v oblasti periferie. Účinek na BChE je také poměrně velmi slabý. Toto léčivo je bezpečné a pacienti dobře tolerované, však se mohou objevit nežádoucí účinky spojené s působením na cholinergní systém. Jedná se o nauzeu, zvracení, zácpu, průjem, bolesti hlavy. Je metabolizován cestou cytochromu p450 a vzniklý metabolit je srovnatelně aktivní jako mateřská látka. Délka trvání navozené inhibice je tedy poměrně vysoká. Dávkování je 5 mg jedenkrát denně, při dobré snášenlivosti se po měsíci titruje na 10 mg denně. (Korábečný, 2014)

Dalšími zástupci jsou karbamátové deriváty, kam řadíme spíše experimentálně než klinicky používaný fyzostigmin, který má krátký biologický poločas a časté nežádoucí účinky. Své uplatnění našel jako antidotum při otravě nervově paralytickými látkami. Prodloužením postranního řetězce fyzostigminu dalo za vznik perspektivnějším zástupci v terapii AD rivastigminu. Rivastigmin inhibuje nejen AChE, ale i BChE, která taktéž odbourává ACh a při

AD je její činnost zvýšena. Další výhodou v terapii AD je zmírnění tvorby a akumulace A $\beta$  v mozku. Má výraznou selektivitu vůči mozkové tkáni a dlouho dobu působení. Podávání rivastigminu zahrnuje časté nežadoucí gastrointestinální účinky, které lze eliminovat užíváním v průběhu jídla a titrováním dávky. Alternativou perorálního podání se rivastigmin používá ve formě transdermálních náplastí, které vykazují lepší snášenlivost. (Jirák a Vnoučková, 2003; Zemek et al., 2014)

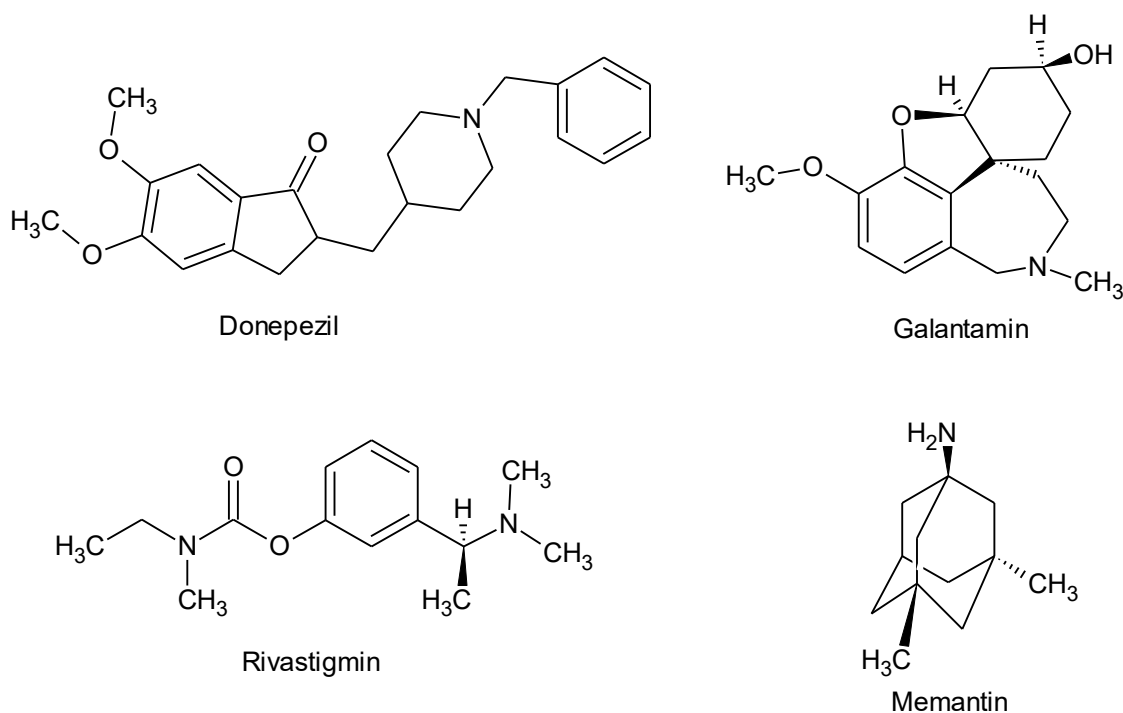
Posledním inhibitorem AChE je galantamin. Je to alkaloid původně získávaný z některých druhů sněženek a narcisů. K terapeutickým účelům je získáván synteticky. Kromě selektivní inhibice AChE je také selektivním inhibitorem nAChR, čímž se zlepšuje uvolňování ACh z presynaptického zakončení. Působí také neuroprotektivně a protizánětlivě. Jeho vysoká selektivita vůči AChE, však mnohonásobně méně vůči BChE je poměrově 54:1. Tento poměr je vyšší než u rivastigminu, však méně než u donepezilu. Při porovnání s oběma sloučeninami je slabým AChEI. Galantamin je v klinickém použití podáván per os a dávka je postupně titrována. (Jirák, 2009)

Tab. 3: Porovnání inhibitorů AChE schválených k terapii AD (Štěpánková, 2008)

	<b>Donepezil</b>	<b>Rivastigmin</b>	<b>Galantamin</b>
obchodní název	Aricept®	Exelon®	Razadyne®
struktura	piperidin	karbamát	alkaloid
IC <sub>50</sub> AChE (nmol/l)	22 nM	48000 nM	800 nM
IC <sub>50</sub> BChE (nmol/l)	4150 nM	54000 nM	7300 nM
inhibice	reverzibilní	pseudoreverzibilní	reverzibilní
modulátor nAChR	ne	ne	ano
denní dávka	5-10 mg 1x denně	6-12 mg 2x denně	16-24 mg 2x denně
poločas eliminace (h)	50-70h	0,6-2h	5-7h
místo eliminace	játra, ledviny	ledviny	játra, ledviny

## 3.2 Antagonista NMDA receptorů

Druhou látkou zavedenou v klinické praxi k terapii AD je antagonist N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů memantin. Tento derivát adamantanu brání aktivaci NMDA receptorů vazbou uvnitř kanálu, při zvýšené hladině excitačních aminokyselin (zejména glutamové kyseliny), které jsou přítomné v CNS při rozvoji AD. Podává se perorálně v denní dávce 20 mg (jednorázově nebo rozděleně do dvou denních dávek. Titrace dávky probíhá po týdnech, kdy první týden se podává 5 mg a každý další týden se 5 mg přidává. Jeho použití se volí při hodnotě testu MMSE 17–6 bodů. Memantin je tedy určen pro střední až těžké, ale nikoli nejtěžší demence. Lze ho vzájemně kombinovat i s inhibitory ChEs, ikdyž je tato kombinace terapeuticky výhodná, je velmi nákladná. V České republice je hrazena při skóre MMSE od 13-17 bodů. (Jirák, 2009)



Obr. 6: Struktury léčiv schválených v terapii AD

### 3.1 Multi-target-directed ligands

Etiologie a patogeneze AD má multifaktoriální charakter a přímá příčina onemocnění není zcela jasná. Tato choroba je charakterizována na molekulární úrovni koagulací a agregací specifických proteinů, neurozánětlivými procesy, oxidačním stresem, spojeným s tvorbou kyslíkových radikálů a v neposlední řadě deficitem ACh. V současnosti schválená léčiva regulují zejména hladinu neurotransmiterů (ACh, glutamát), zlepšují symptomatologii a zvyšují kvalitu života. Bohužel však nejsou schopna ovlivnit či zastavit proces vedoucí k neurodegeneraci. (Ibach, 2004) V současné terapii, používané k léčbě AD, všechna léčiva působí na jeden cíl. S ohledem na tyto multifaktoriální znaky a různorodé rysy etiologie vedly k novému přístupu jedné sloučeniny, schopné interagovat s několika biologickými cíli současně na neurotoxické úrovni. Tento nový přístup tedy upouští od objevování nových molekul v terapii AD, schopných interagovat s jedním z biologických cílů (one-targeted), které mohou být pro léčbu AD nedostačující, a zaměřuje se na vývoj ligandů s multifunkčním charakterem (MTDLs, multi-targeted directed ligands). (Youdim, 2005)

Zmiňované MTDLs představují nadějný a efektivnější přístup při terapii AD. Běžný postup pro vývoj nových MTDL využívá jako strukturální kostru již existující léčivo. Nejběžnější návrh MTDLs strategií je kombinace dvou správně vybraných farmakoforů, které vykazují aktivitu proti dvěma zcela různým molekulárním cílům. Spojení farmakoforů představuje vyšší efektivitu a zároveň bezpečnější terapii z hlediska farmakodynamických a farmakokinetických interakcí.

Studie založené na MTDL podkladu přinesly inovativní vývoj tzv. "disease-modifying anti-Alzheimer's drugs" (DMAADs), což jsou substance ovlivňující AD. Předností DMAADs je kromě anticholinergního účinku inhibice agregace A $\beta$ , také chelatace kovů a antioxidační aktivita skrz uvolňování oxidu dusnatého. V poslední době je veškerý výzkum fokusován na zkoumání MTDL léčiv jako potenciálních kandidátů pro terapii AD.

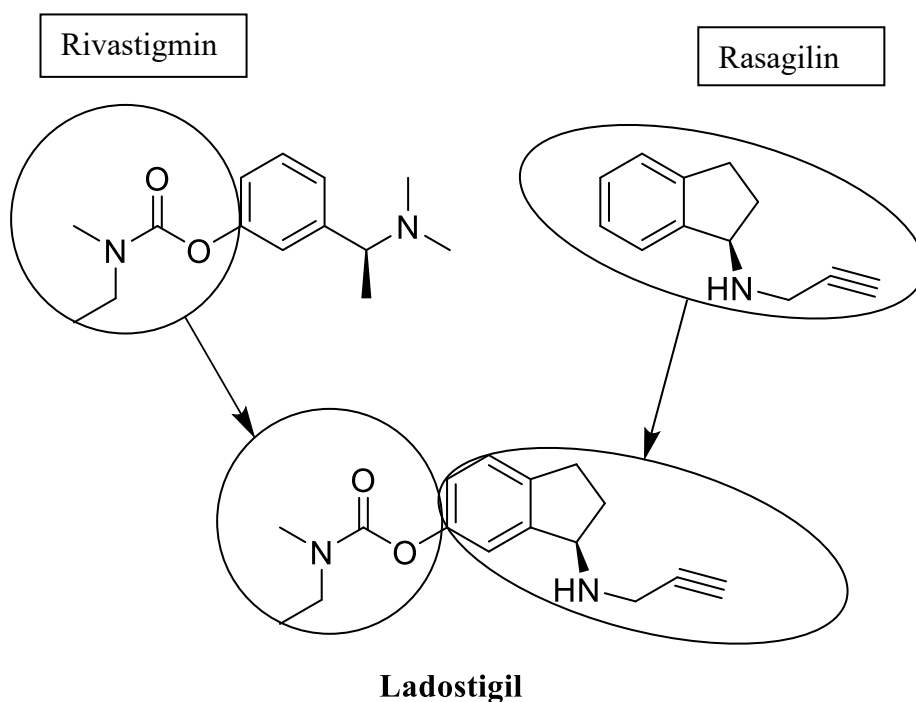


Jeden z využívaných MTDLs přístupů, jež se uplatňuje v léčbě AD, je modelování hybridů, založených na kombinaci farmakoforů pocházejících z inhibitorů ChEs s farmakofory pocházejících z inhibitorů MAO. Touto kombinací by mělo být zaručeno zpomalení progresu onemocnění a zároveň se získá neuroprotektivní účinek před oxidačním poškozením buněk, provázející toto onemocnění. (Unzeta, 2016; Cavalli et Bolognesi, 2008)

Design MTDLs vedl mimo jiné i k syntéze duálního inhibitoru ChE a monoaminoxidasy (MAO) ladostigilu. Jeho molekula vychází z karbamátové složky rivastigminu a propargylaminové složky rasagilinu (selektivní inhibitor MAO-B). Zmíněné farmakoforové skupiny jsou propojeny pomocí indanového kruhu rasagilinu. (Obr. 7)

Inhibitory MAO-B vykazují neuroprotektivní účinky a mají terapeutický potenciál pro léčbu AD, tím, že inhibicí MAO-B se docílí snížení koncentrace MAO-B v mozku. U enzymu MAO-A se její inhibice využívá ke zmírnění příznaků depresí.

Propargylaminová skupina rasagilinu zodpovídá za neuroprotektivní působení a zabraňuje tvorbě ROS při interakci s kofaktorem FAB v enzymu MAO-B. Navíc se ukázalo, že ladostigil je po perorálním podání schopný inhibovat centrální ChEs a tudíž proniká přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Jeho inhibice je 100x větší na AChE než na BChE. Tyto poznatky poukazují na slibnou účinnost v terapii AD. (Korábečný et al., 2018)



Obr. 7: Struktura duálního inhibitoru ladostigilu

### 3.1.1 Takrin a jeho deriváty

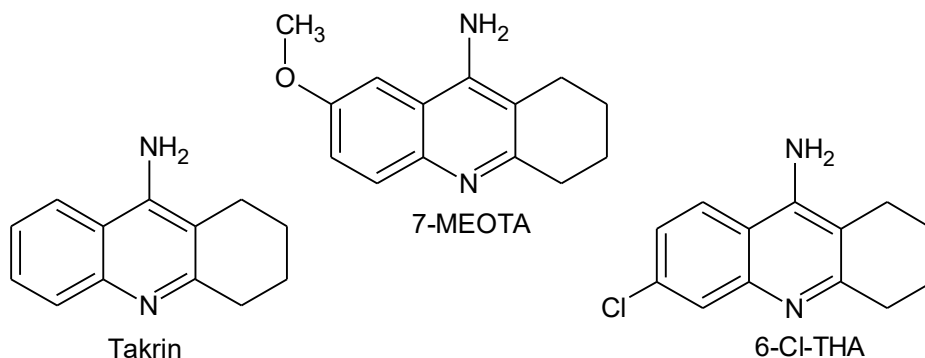
Takrin (THA, 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) byl jako první ze skupiny AChEI FDA ( Food and Drug Administration) v roce 1993 schválen k terapii mírných až středních forem AD. Komerčně je známý pod názvem (Cognex®). Jeho mechanismus účinku spočívá v neselektivní inhibici AChE ( $IC_{50}= 0,32 \mu\text{M}$ ) i BChE ( $IC_{50}= 0,088 \mu\text{M}$ ). (Hepnarová, 2018) Jedná se o nekompetitivní AChEI, jehož akridinový skelet se váže na indolový kruh Trp84 v aktivním místě enzymu. Je také zaznamenáno jeho působení na muskarinové receptory, iontové kanály a také hraje roli při metabolismu monoaminů (ovlivňuje reuptake serotoninu a dopaminu na nervových zakončeních). (Davis, 1995) Díky dobré rozpustnosti v lipidech bylo dosaženo jeho dobré prostupnosti přes HEB. Snadný prostup je pravděpodobně spojen s acetyl-L-karnitinovým transportním systémem. (Lee, 2012) Však později se ukázalo, že THA má určité nevýhody, které vedly v roce 1998 k jeho stažení z trhu. Důvodem bylo nutnost dávkování 4x denně, nízká biodostupnost a značné nepříznivé účinky (nauzea, průjem, močová inkontinence, hepatotoxicita a potenciální karcinogenita), takže jen málo pacientů snášelo terapeutické dávky. Pokusy ke snížení toxicity a zlepšení účinnosti vedou ke změnám ve struktuře THA, což dává za vznik novým derivátům. THA tak zůstává oblíbenou výchozí strukturou pro navrhování MTDLs s nižší toxicitou a lepší biologickou dostupností. Vývoj nových sloučenin se zaměřuje na hledání adeptů se zvýšenou účinností jako AChEI, dobrou penetrací přes HEB, zvýšenou metabolickou stabilitou a sníženými nežádoucími účinky a toxicitou.

V poslední době syntetizované deriváty lze rozdělit do tří skupin. První skupinou jsou monotakrinové deriváty, ve kterých je různě modifikován základní skelet. Hlavním takovým derivátem je 7-methoxy derivát takrinu (7-MEOTA, 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin). Jeho vývoj a výzkum probíhal v České republice v době procesu schvalování takrinu. Farmakologické působení je obdobné jako v případě THA, tedy centrální inhibitor AChE. Ukázalo se však, že 7-MEOTA vykazuje nižší inhibiční účinnost na AChE v porovnání s THA,  $IC_{50} \text{ AChE} = 15 \mu\text{M}$  (Korábečný et al., 2010) Výhoda tohoto derivátu tkví v lepší snášenlivosti, antioxidačnímu působení, interakci s AChR a hlavně v nižší toxicitě. (Soukup et al., 2013) Vychytáváním ROS předchází hepatotoxicitě spojené s THA. Navíc byl tento derivát zaveden do ozbrojených sil Armády České republiky jako protilátka proti 3-chinclidinylbenzilátu zničujícího činidla (Agent 15, QNB, BZ). Obě látky jak 7-MEOTA, tak

i THA se biotransformují podobnou cestou. Hlavní rozdíl spočívá v hydroxylovaných derivátech THA, zejména venlakrinu (1-hydroxytakrin), který právě působí toxicky vyvoláním oxidačního stresu.

U 7-MEOTY se tento metabolit vůbec nevyskytuje, jelikož její metabolická cesta probíhá nejprve přes demethylaci methoxy skupiny a vzniklý metabolit je následně konjugován a eliminován z organismu. (Patočka, 2008; Soukup et al., 2013)

Skupina (Gregor et al. v roce 1992) se zabývali studiem substituovaných derivátů THA. Prokázali, že derivát THA s navázaným chlorem v poloze 6, 6-Cl-THA, prokazuje vyšší účinnost než jiné isomery, které testovali. Došli k názoru, že lepších vlastností může být docíleno díky přítomnosti chloru, což má vliv jednak na lipofilitu, orientaci při vazbě na enzym indukovaný dipólovým momentem nebo efekt na disociační konstantu sloučeniny. Tyto vlastnosti mohou vést k lepší interakci mezi derivátem THA a aromatickými zbytky aminokyselin v místě enzymu, bohatých na přítomnost elektronů. 6-Cl-THA se řadí k silným reverzibilním AChEI s hodnotou  $IC_{50AChE}=1,8$  nM (Gregor et al., 1992)



Obr. 8: Struktura takrinu a jeho monoderivátů 7-MEOTY a 6-Cl-THA.

Druhou skupinou derivátů jsou homodimery takrinu. Jedná se zpravidla o symetrické struktury, které působí inhibičně na ChEs. Úplně první byly připraveny Pangem et al. v roce 1996. Předlohou strukturou se stal bis-7-takrin ( $IC_{50AChE} = 0.81$  nM), jež je považován za první duální inhibitor, což znamená, že dosáhne místa účinku v obou anionických částech AChE, tedy jinými slovy, se váže jak na periferní anionické místo, tak i na katalytické místo

AChE. (Pang, 1996; Korábečný, 2012) Z dalších účinků se projevily jeho slabé neuroprotektivní vlastnosti, inhibiční účinek  $\beta$ -sekretasy a antagonistické působení na GABA-ergních receptorech. Avšak disponoval nízkou perorální dostupností, vysokým rizikem lékových interakcí a transformací na neúčinný metabolit. (Li et al., 2007)

V současnosti nejširší a nejvíce zkoumanou skupinu sloučenin představují heterodimery takrinu. Vývoj opět vychází z molekuly bis-7-takrinu, kdy základní skelet takrinu bývá u některých zástupců nahrazen například 6- chlortakrinem. (Wlodek, 1996)

Po testování za využití molekuly 6- chlortakrinu navazuje celá řada dalších studií, kdy je k takrinu navázán například donepezil a vznikají donepezil-takrinové heterodimery nebo kombinace takrinu s huperzinem a v této sérii studií testovaná analoga předčila ve své inhibiční účinnosti předlohou strukturu huperzinu A na AChE a dosáhla inhibičních koncentrací v řádu nM. (Jiang, 2003)

Další atraktivní skupinou jsou takrin-melatoninové heterodimery. Z jednotlivých studií vyplývá, že hormon melatonin hraje důležitou roli v antioxidačních pochodech v průběhu AD. (Reiter, 2007)

Tato práce je zaměřena na tzv. monotakrinové deriváty, u kterých je sledován vliv velikosti nasyceného kruhu, přikondenzovaného k takrinovému základu a substituce v různých jeho polohách (zejména 6-,7- a 8-).

## 4. Cíl práce

Cílem práce bylo stanovit a porovnat inhibiční potenciál 27 derivátů, které byly nově nasyntetizovány na Katedře toxikologie a vojenské farmacie FVZ v Hradci Králové. Podklad pro vznik derivátů tvoří molekula takrinu, jejíž nasycený šestičlenný kruh je pozměněn a deriváty jsou obohaceny o další substituenty, které by měly zajistit nižší toxicitu a zlepšit vstup přes hematoencefalickou bariéru. Inhibitory byly podrobeny měření v koncentrační řadě od  $10^{-3}$  až po koncentraci  $10^{-9}$  mol/l, včetně koncentračních mezistupňů. Z naměřených hodnot byla vypočtena  $IC_{50}$ . Získané výsledky práce stanovily účinnost nejlepších inhibitorů, které mohou dále sloužit v cestě pro hledání dalších potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby.

## 5. Metodika

### 5.1 Princip metody

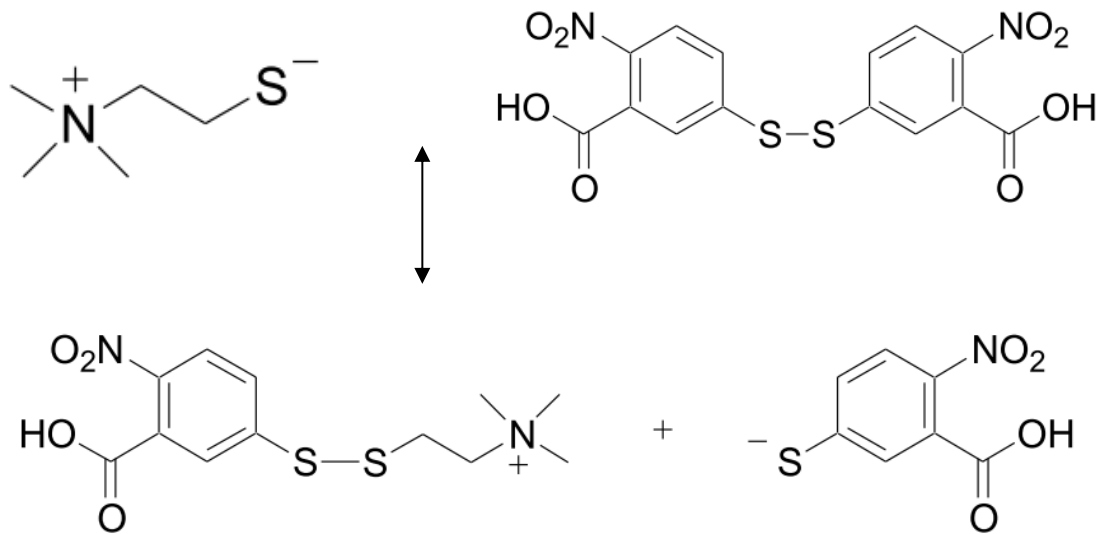
Měření jednotlivých inhibitorů bylo prováděno modifikovanou standardní Ellmanovou metodou na 96 jamkové mikrotitrační destičce. Výsledkem měření je zjištění hodnot inhibiční koncentrace  $IC_{50}$ . Tato hodnota je základní veličinou pro indikaci míry inhibice a určuje takovou koncentraci inhibitoru, potřebnou ke snížení aktivity enzymu na polovinu.

Princip Ellmanovy metody spočívá v reakci 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoové kyseliny) (DTNB) s acetylthiocholinem (ATCh) za vzniku produktu, který je nejlépe hodnotitelný při vlnové délce 412 nm. Celá reakce probíhá v několika krocích. Nejprve dochází k rozštěpení substrátu ATCh jodidu na kyselinu octovou a thiocholin. Ten dále reaguje s DTNB, dochází ke štěpení disulfidického můstku a sám se naváže na vzniklou thiolovou skupinu jedné části DTNB. V druhé části molekuly DTNB kyseliny 5-merkapto-2-nitrobenzoové dochází ke konjugaci dvojných vazeb za vzniku stanovovaného produktu – 5-merkapto-2-nitrobenzenového aniontu. ( $TNB^-$ )

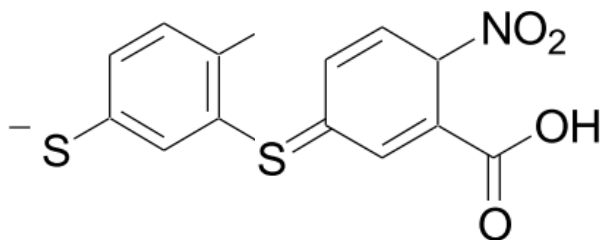
1. Rozštěpení ATCh AChE za vzniku příslušné kyseliny a thiocholinu



## 2. Rozštěpení disulfidických můstků a vazba thiocholinu na DTNB



## 3. Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5- merkapto-2-nitrobenzoové



Ačkoliv je Ellmanova metoda jednoduchá na provedení, poměrně rychlá a levná, její nevýhodou při stanovení aktivit cholinesteras v krvi je interference s hemoglobinem, jehož absorpční maximum je shodné se vznikajícím barevným aniontem. Této interferenci se dá předejít modifikací vlnové délky na 436 nm. (Žďárová – Karasová, 2010)

## 5.2 Chemikálie

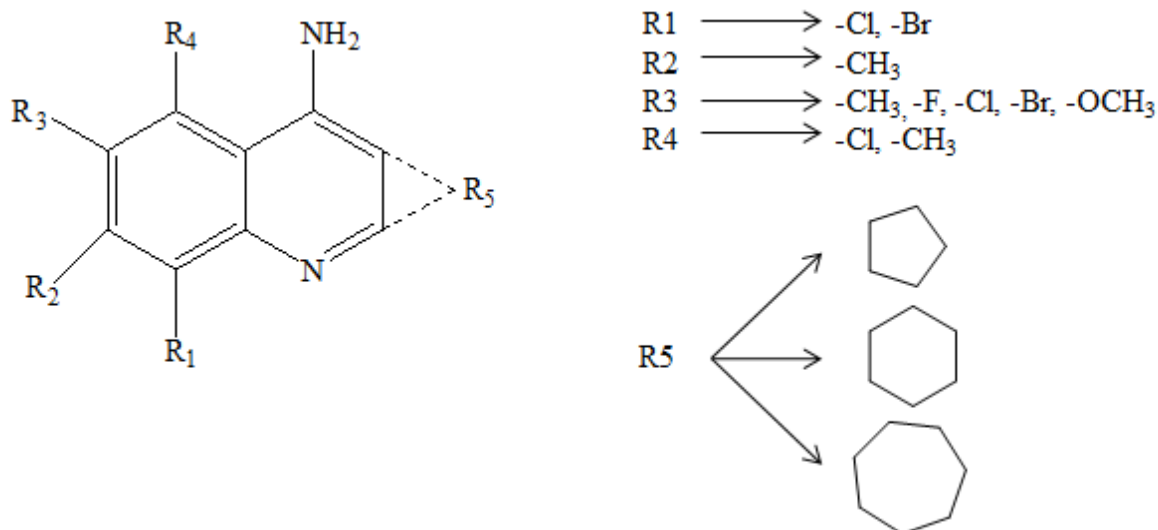
Všechny používané chemikálie a standardy byly zakoupeny u firmy Sigma Aldridge (Česká republika).

- Fosfátový pufr (0,1M; pH 7,4) – 11,49 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  se rozpustí v 810 ml destilované vody a 3,4 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  se rozpustí v 250 ml destilované vody. Posléze se k roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  postupně přidává roztok  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  dokud nezískáme pH rovno 7,4.
- DTNB (0,1M; pH 7,4) - zásobní roztok DTNB byl připraven tak, že 0,05 g 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny se rozpustí za stálého míchání v 50,0 ml 0,1 M fosfátového pufru. Roztok je nestálý na světle, proto je uchováván během pokusu v nádobě obalené alobalem a připravován vždy v čas potřeby. Díky slunečním paprskům by mohlo dojít k rozštěpení DTNB a vzniku  $\text{TNB}^-$ , čímž by se mohla zanešt chyba do dalšího spektrofotometrického stanovení.
- ATChI – specifický substrát pro stanovení aktivity AChE. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,029 g ATChI v 10 ml destilované vody. Tento roztok se napipetuje po 1 ml do eppendorfky a uchovává se v mrazničce při teplotě  $-12^\circ\text{C}$ . V době potřeby byl použit rozmražený 1 ml obsah zkumavky a zásobní roztok naředěn s destilovanou vodou v poměru 1:10 (roztok ATChI: destilovaná voda). Výsledná používaná koncentrace roztoku je tedy 10 mM.
- BTChI – specifický substrát pro stanovení aktivity BChE. Zásobní roztok byl připraven rozpuštěním 0,032 g BTChI v 10 ml destilované vody.  
Výsledná koncentrace je stejná jako v případě ATChI tedy 10 mM.
- AChE – lidská rekombinantní, připravena katedrou farmakologie a toxikologie FVZ Hradec Králové
- BChE – lidská plazmatická, získaná z krve řad dárců FVZ Hradec Králové
- Inhibitory – roztoky testovaných látek byly připravovány v den měření následujícím způsobem. Potřebná navážka a objem byly vypočteny ze vzorce  $m = c * M_r * V$



Př. LG 620 : 2,47 mg rozpuštěno v 926  $\mu\text{l}$  DMSO, vzniká roztok o koncentraci  $10^{-2}$  M, poté je z něj odpipetováno 100  $\mu\text{l}$  a přidá se 900  $\mu\text{l}$  destilované vody a vzniká roztok s koncentrací  $10^{-3}$  M. Tento postup se opakoval až do vzniku koncentrace  $10^{-9}$  M. K získání mezikoncentrace je odpipetováno 200  $\mu\text{l}$  z předchozí celé koncentrace  $10^{-3}$  M a přidá se 430  $\mu\text{l}$  destilované vody a je získána koncentrace  $10^{-3,5}$  M, tento postup se zopakoval u všech mezikoncentrací

Při měření některých inhibitorů bylo třeba doplnit koncentrační řadu o čtvrtinové mezistupně, kdy se odpipetuje 100  $\mu\text{l}$  z 0,1 M roztoku a doplní 930  $\mu\text{l}$  destilované vody v případě koncentrace  $10^{-1,75}$  M. U koncentrace  $10^{-1,25}$  M se odpipetuje 200  $\mu\text{l}$  z 0,1 M roztoku a doplní 465  $\mu\text{l}$  destilované vody, takto se postupovalo u všech mezikoncentrací.



Obr. 9: Obecný strukturní vzorec testovaných látek

### 5.3 Postup měření

Daný vzorek inhibitoru se navázil do eppendorfky a rozpustil v takovém množství DMSO, aby vznikl 0,01 M roztok, u důvodu špatné rozpustnosti látek. Hodnota 0,01M je výchozí pro tvorbu koncentrační řady daného inhibitoru v rozmezí  $10^{-3}$  M až  $10^{-9}$  M. Při vlastním měření se do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky nepipetovalo 10  $\mu$ l roztoku enzymu. K enzymu bylo přidáno 40  $\mu$ l fosfátového pufru, 20  $\mu$ l DTNB a inhibitor a po dobu 20 s se destička protřepala na třepačce IKA MS 3 digital (USA). Následovalo kontinuální pětiminutové třepání v přístroji Synergy 2 a po této inkubační době byl přidáno 20  $\mu$ l substrátu (u AChE ATChI a u BChE BTChI), čímž byla zahájena vlastní inhibiční reakce. Vzniklé zabarvení při reakci neslo přímou úměru mezi intenzitou zbarvení a aktivitou inhibovaného enzymu. U každého pokusu byla zároveň prováděna i kontrola. Inhibitor byl nahrazen 10  $\mu$ l fosfátového pufru a získaná hodnota odpovídala 100% aktivitě enzymu, čímž jsme kontrolovali vlastní aktivitu enzymu. Pro všechny koncentrace inhibitorů byla prováděna 3 nezávislá měření.

### 5.4 Přístroje a pomůcky

Multidetekční reader Syngry HT – BioTek (Vermont, USA)

Vortex Lab Dancer – IKA (Staufen, Německo)

Automatické pipety – Transferpette S (Esex, Anglie)

Titrační destičky s 96 jamkami – ThermoFisher Scientific (Biotech, ČR)

Zkumavky Safe–Lock – Eppendorf (Německo)

Pipeta krokovací Handy Step elektronick – Brand (Wertheim, Německo)

Špičky – Eppendorf

PC s programem na odečtení absorbance Gen 5

Statistický program GraphPad Prism 7 (San Diego, USA)

## 5.5 Zpracování výsledků

Pro stanovení aktivity inhibovaných enzymů byl používán program Gen 5. Aktivita enzymů byla vyjádřena z hodnot získaných absorbancí. Následně byly v počítačovém programu Microsoft Excel vytvořeny výsledné tabulky a grafy. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí počítačového programu GraphPad Prism 7, kdy hodnota  $IC_{50}$  testovaného inhibitoru byla získána proložením dat Hillovou sigmoidální křivkou.

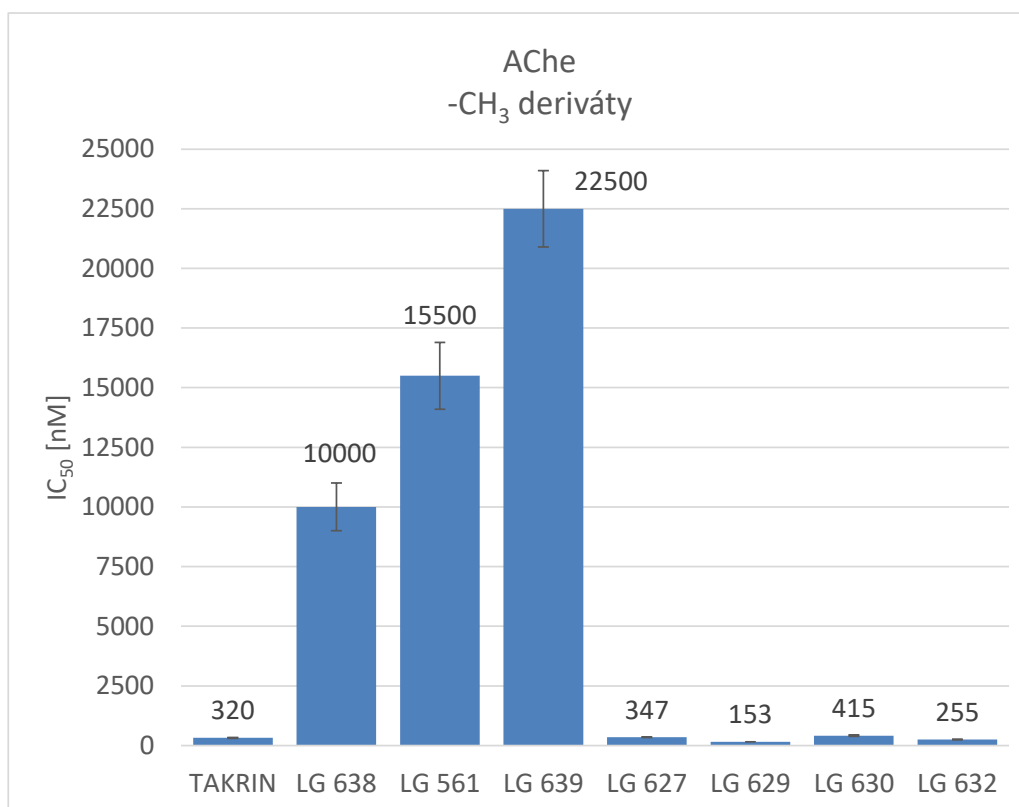
## 6. Výsledky

Měření jednotlivých inhibitorů probíhalo v koncentračních řadách od  $10^{-3}$  M do  $10^{-9}$  M. Testování bylo podrobena 27 látek, které se strukturně lišily. Jedná se monotakrinové deriváty, kdy základ tvoří 4-aminochinolin, ke kterému je vždy přikondenzován čtyř, pěti nebo šestičlenný nasycený kruh. (Obr. 9) Inhibiční aktivita by měla být ovlivněna nejen parametrem, jako je velikost skeletu, ale také počtem, polohou a druhem navázaných funkčních skupin. Testované deriváty byly rozděleny do 5 skupin na základě strukturální podobnosti. První skupina tvořená 7 inhibitory obsahuje ve své struktuře methylovou skupinu v různých polohách skeletu. Ve druhé skupině je celkem 6 zástupců a obsahují ve svém skeletu atom chloru či bromu. Tyto atomy halogenů jsou použity i pro třetí testovanou skupinu, avšak zástupci jsou disubstituovány uvedenými halogeny v polohách 1 a 3 aminochinolinového kruhu. Ve čtvrté skupině byly pro substituci voleny halogeny fluor a chlor, jež jsou umístěny do jiné polohy skeletu než v případě druhé skupiny testovaných derivátů. Poslední skupina testovaných derivátů má pouze 3 zástupce a obsahuje ve své struktuře methoxy skupinu. Výsledkem měření byly zjištěny hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé ChEs. Hodnota zjištěné  $IC_{50}$  indikuje, jaká koncentrace inhibitoru je třeba pro inhibici daného procesu na 50 %. Hodnoty jsou vyjadřovány v jednotkách molární koncentrace. Pomocí  $IC_{50}$  lze tedy určit účinnost testovaných inhibitorů. Čím je hodnota  $IC_{50}$  nižší, tím lze inhibitor považovat za efektivnější při inhibování daných enzymů. V níže uvedených obrázcích jsou vyhodnoceny získané hodnoty  $IC_{50}$  v  $\mu$ M testovaných inhibitorů a jejich jednotlivé směrodatné odchylky měření (SEM).

Dalším zjištěným parametrem byl index selektivity (SI) vůči ChEs. Pro hodnocení výsledků je zásadní, že látky selektivní k AChE mají hodnoty  $SI \geq 1$  a látky selektivní k BChE mají hodnoty  $SI \leq 1$ . Ve výsledných tabulkách jsou výrazně označeny látky, které jsou selektivnější k BChE. Více než dvě třetiny testovaných derivátů prokázalo selektivitu k AChE, přičemž nejselektivnější k BChE byla látka LG 635.

Tab. 4: Tabulka testovaných derivátů substituovaných methylovou skupinou

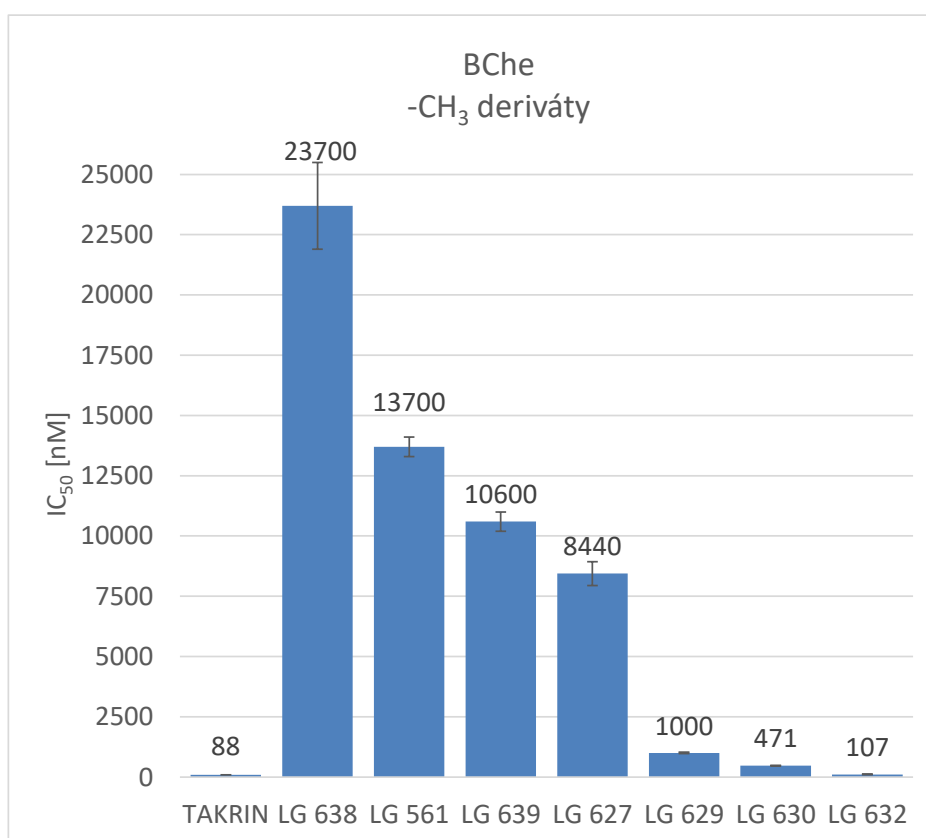
Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5	SI
THA	H	H	H	H	6C	<b>0,275</b>
LG 638	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	5C	2,37
LG 561	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	6C	<b>0,8839</b>
LG 639	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	7C	<b>0,4711</b>
LG 627	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	5C	24,322
LG 629	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	7C	6,5359
LG 630	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	5C	1,1349
LG 632	H	H	H	-CH <sub>3</sub>	7C	<b>0,4196</b>



Obr. 10: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminochinolinu s methylovou skupinou pro AChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD z minimálně tří měření.

První testovanou skupinu tvořily deriváty substituované methylovou skupinou v různých polohách aminochinolinového skeletu jak je uvedeno v Tab. 4. Z jednotlivých hodnot  $IC_{50}$ , uvedených v Obr. 10 je zřejmé, že poloha  $CH_3$  skupiny významně ovlivňuje inhibiční potenciál.

Nejlepší schopnost inhibice vykazala látka LG 629 s  $IC_{50} = 153 \pm 1,0$  nM, která má  $CH_3$  skupinu navázanou v poloze 7 a ke skeletu 4- aminochinolinu je připojen cykloheptan. Další látka, která prokázala lepší potenciál inhibice než námi zvolený standard, byla látka LG 632 s cykloheptanovým kruhem a hodnotou  $IC_{50} = 255 \pm 11$  nM. U látek LG 630 a LG 632, které obsahují v poloze 5 methylovou skupinu, vedla záměna cykloheptanového kruhu za cyklopentanový ke snížení schopnosti inhibovat AChE ( $IC_{50} = 415 \pm 28$  nM), avšak stále se pohybuje v řádech stovek nM. Trojice látek LG 638, LG 561 a LG 639 mají methylovou skupinu umístěnou do polohy 6 a liší se substitucí nasyceného kruhu. Nejnižší  $IC_{50}$  a tedy nejvýraznější schopnost inhibice z uvedené tříčlenné skupiny látek dosáhla LG 638 s  $IC_{50} = 10\,000 \pm 1000$  nM. Míra inhibice je však 31x menší než míra inhibice standardu a při srovnání s nejsilnějším inhibitorem skupiny LG 629 má o dva řády nižší inhibiční potenciál.



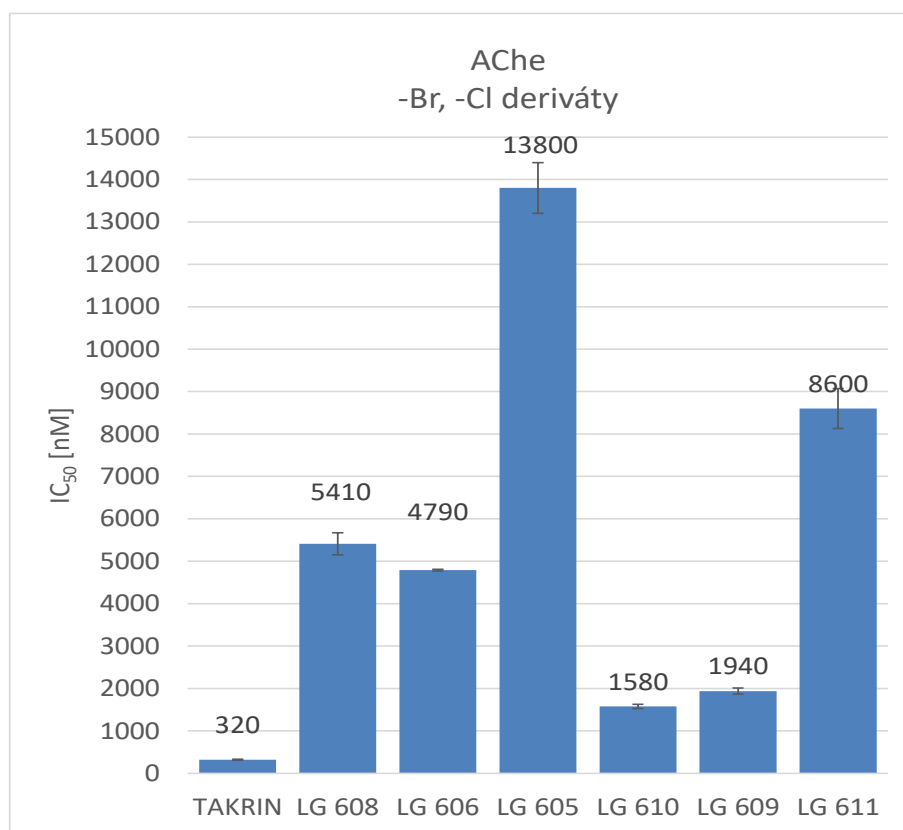
Obr. 11: Hodnoty  $IC_{50}$  derivátů aminochinolinu s methylovou skupinou pro BChE. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SD ze tří měření.

Při testované těchto derivátů aminochinolinu substituovaných methylovou skupinou v daných polohách na Obr. 11 se ukazuje, že ani jeden z nich nemá hodnotu  $IC_{50BChE}$  nižší než daný standard. Největší inhibiční účinek v této skupině má látka LG 632 s  $IC_{50} = 107 \pm 6$  nM s methylem v poloze 5. Další v pořadí je látka LG 630, která má však 4x nižší inhibiční potenciál než LG 632. LG 629, která projevila největší míru inhibice vůči AChE, má prokazatelně nižší afinitu k BChE a s hodnotou  $IC_{50} = 1000 \pm 30$  nM je vůči ní 7x méně účinná než k AChE. U látek LG 638, LG 561, LG 639 a LG 627 inhibiční potenciál v uvedeném pořadí vzestupně roste. Látka LG 627 má  $IC_{50}$  rovno  $8440 \pm 490$  nM a jako jediná z posledně uvedených látek má methylovou skupinu nasubstituovanou do polohy 7 aminochinolinového skeletu.

Dalším zjištěným parametrem byl index selektivity (SI) vůči jednotlivým enzymům. V této testované skupině projevily látky LG 561, LG 639 a LG 632 vyšší míru selektivity k BChE, což je největší počet zástupců skupiny ze všech testovaných látek. Nejselektivnější se projevila látka LG 632 s hodnotou SI 0,4196. Zbylé látky LG 638, LG 627, LG 629, LG 630 jsou selektivnější k AChE.

Tab. 5: Tabulka testovaných derivátů substituovaných bromem a chlorem.

Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5	SI
THA	H	H	H	H	6C	<b>0,275</b>
LG 608	H	H	Br	H	5C	3,1238
LG 606	H	H	Br	H	6C	4,3424
LG 605	H	H	Br	H	7C	1,0942
LG 610	H	H	Cl	H	5C	4,3544
LG 609	H	H	Cl	H	6C	3,4639
LG 611	H	H	Cl	H	7C	1,1977

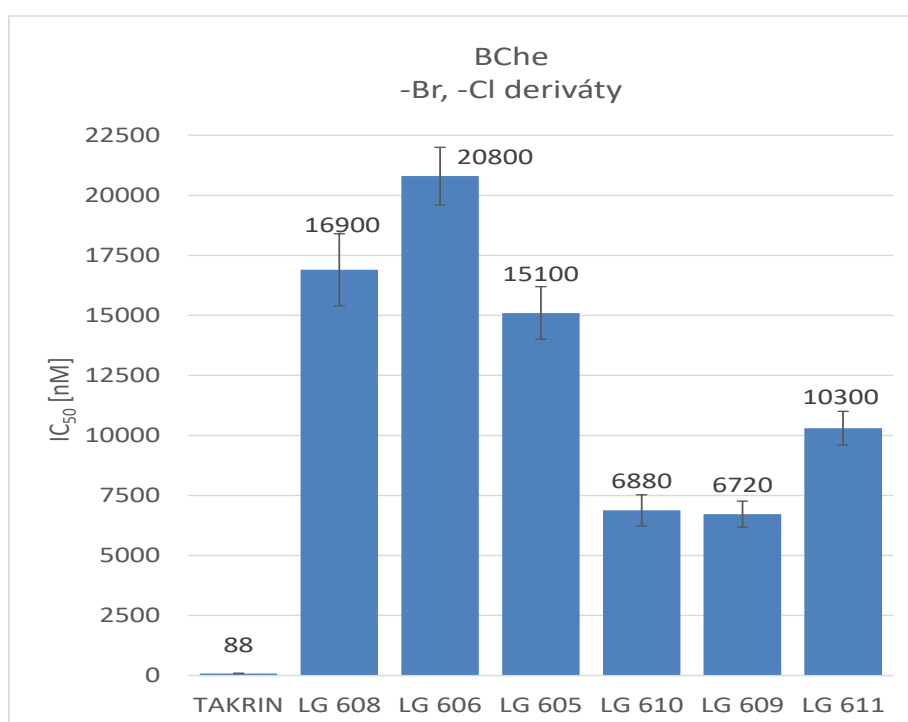


Obr. 12: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminochinolinu s halogeny pro AChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD ze tří měření.



Druhá skupina testovaných látek představuje deriváty aminochinolinu substituované chlorem či bromem v poloze 6. (Tab. 5) Nejúčinnějšími látkami této skupiny se ukázaly být látky LG 610 s  $IC_{50} = 1580 \pm 50$  nM a LG 609 s  $IC_{50} = 1940 \pm 70$  nM.

Obě ve své struktuře mají přítomen chlor v poloze 6, liší se jen velikostí cyklického skeletu, LG 610 obsahuje cyklopentan a LG 609 cyklohexan. Změna chloru za brom snížila míru inhibice vůči AChE. Například LG 608 s hodnotou  $IC_{50} = 5410 \pm 260$  nM je 3x méně účinnější inhibitor v porovnání s LG 610. Zavedením sedmičlenného cykloheptanu do molekuly u látek LG 605 a LG 611 výrazně snižuje inhibiční potenciál v uvedené skupině testovaných látek. LG 611 se jeví o řád účinnějším inhibitorem než LG 605 s  $IC_{50} = 13800 \pm 600$  nM.



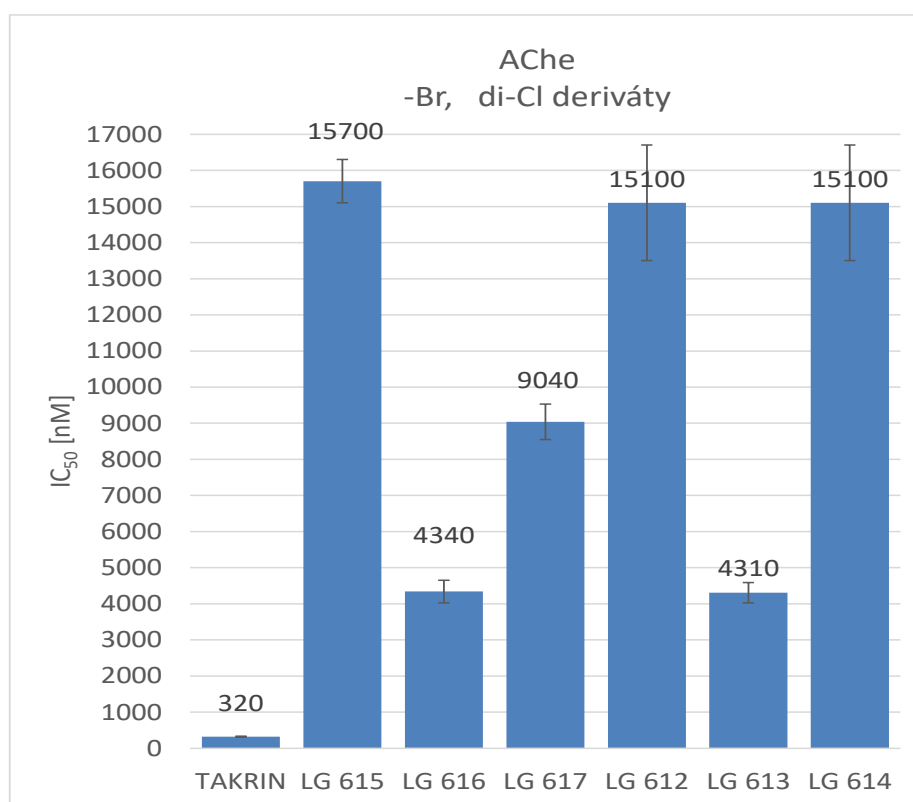
Obr. 13: Hodnoty  $IC_{50}$  derivátů aminochinolinu s halogeny pro BChE. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SD ze tří měření.

Jednotlivé deriváty substituované chlorem a bromem v poloze 6 vykazují nižší inhibiční afinitu k BChE v porovnání s AChE. Nejlepšími inhibitory v této skupině jsou obdobně jako u AChE látky LG 610 s  $IC_{50} = 6880 \pm 650$  nM a LG 609 s  $IC_{50} = 6720 \pm 540$  nM. Inhibiční potenciál mají velmi podobný, i přesto, že se liší substitucí na aminochinolinovém skeletu nasyceným kruhem. Přítomnost chloru v poloze 6 u látek LG 610, LG 609 a LG 611 představuje lepší inhibiční vlastnosti než v přítomnosti bromu v poloze 6. Látky LG 608, LG 606 a LG 605 jsou méně účinnými inhibitory.

Zástupci této testované skupiny projeví vyšší selektivitu k AChE.

Tab. 6: Tabulka testovaných derivátů substituovaných dvěma atomy chloru či bromu.

Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5	SI
THA	H	H	H	H	6C	<b>0,275</b>
LG 615	Cl	H	Cl	H	5C	1,1401
LG 616	Cl	H	Cl	H	6C	3,4101
LG 617	Cl	H	Cl	H	7C	2,6327
LG 612	Br	H	Br	H	5C	-
LG 613	Br	H	Br	H	6C	7,4246
LG 614	Br	H	Br	H	7C	5,9536

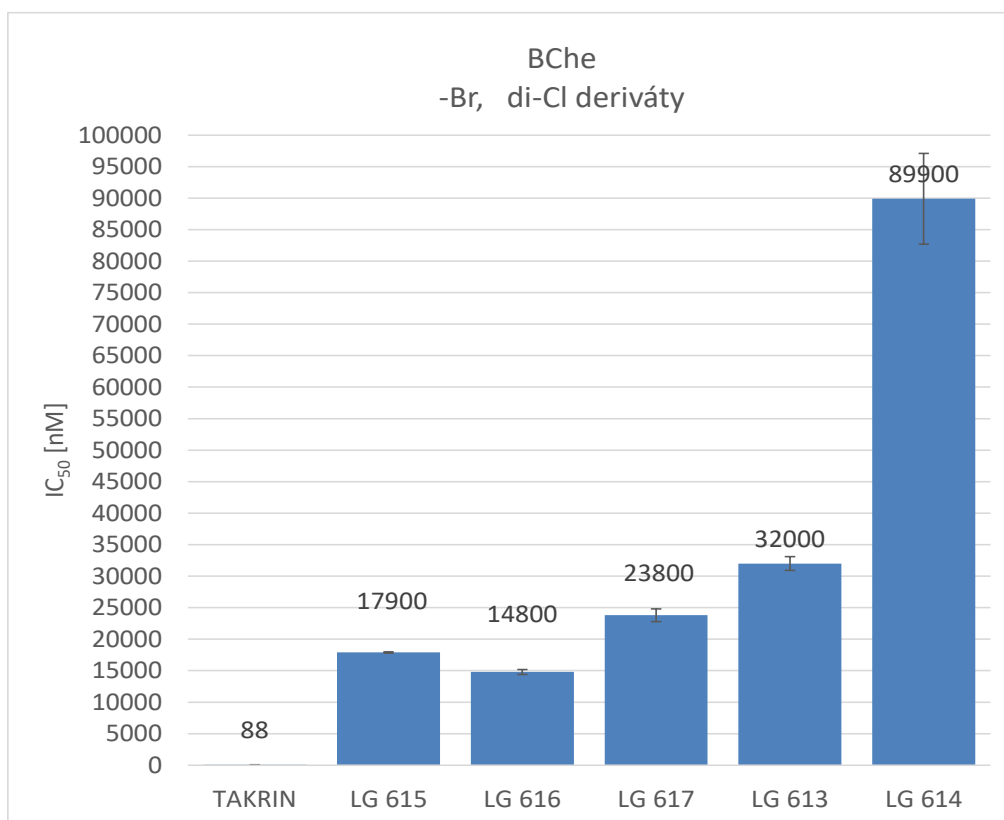


Obr. 14: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminocholinu s dihalogeny pro AChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD z minimálně tří měření.

Třetí skupina derivátů se dvěma atomy chloru či bromu v polohách 6 a 8 udává, že nejúčinnějšími inhibitory dané skupiny jsou látky LG 616 a LG 613, které mají téměř totožné

hodnoty  $IC_{50}$ . Obě látky mají k aminochinolinovému skeletu připojený šest uhlíků dlouhý skelet a LG 616 obsahuje 2 atomy chloru a LG 613 2 atomy bromu ve své molekule.

Zavedením dalšího atomu halogenu do struktury se snižuje inhibiční aktivita a nejlepší inhibitory této skupiny jsou tak 3x méně účinné než nejlepší inhibitor skupiny s jedním atomem halogenu. Srovnatelných výsledků dosáhly i látky s dichlorovanou molekulou LG 612 a LG 614. Látka LG 614 obdobně jako LG 615 má přikondenzovaný cykloheptan k aminochinolinu a hodnotu  $IC_{50}$  velmi podobnou v řádech 15 000 nM.

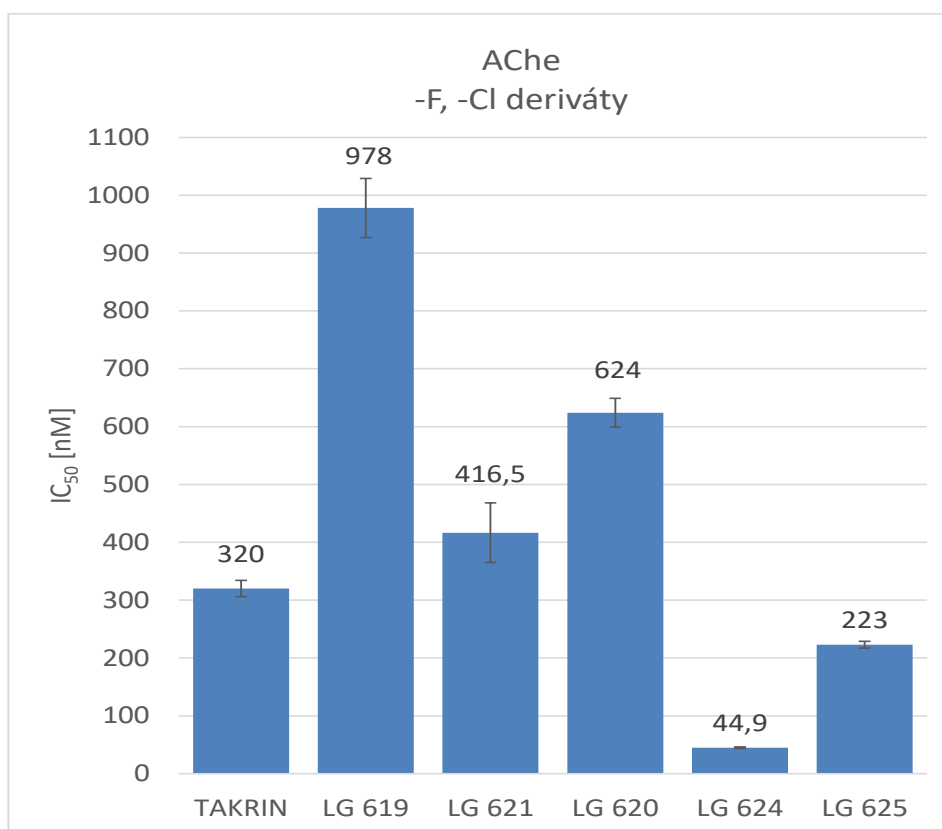


Obr. 15: Hodnoty  $IC_{50}$  derivátů aminochinolinu s dihalogeny pro BChE. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SD ze tří měření.

Tato skupina testovaných derivátů má velmi nízkou míru inhibice vůči BChE. Dokonce látka LG 612 nezainhibovala BChE při testování její nejvyšší koncentrace ani z 50% a proto není uvedena ani její hodnota  $IC_{50}$  na Obr. 15. Nejúčinnějším inhibitorem s nejvyšší mírou afinity k BChE z této skupiny je látka LG 616, substituovaná dvěma atomy chloru v polohách 6 a 8 a s hodnotou  $IC_{50} = 14800 \pm 400$  nM. Další v pořadí je pak látka LG 615, která má  $IC_{50} = 17900 \pm 100$  nM s cyklopentanovým skeletem ve své molekule. Oba inhibitory jak LG 616 i LG 615 jsou více než 200x horšími inhibitory než standard.

Tab. 7: Tabulka testovaných derivátů substituovaná fluorem a chlorem.

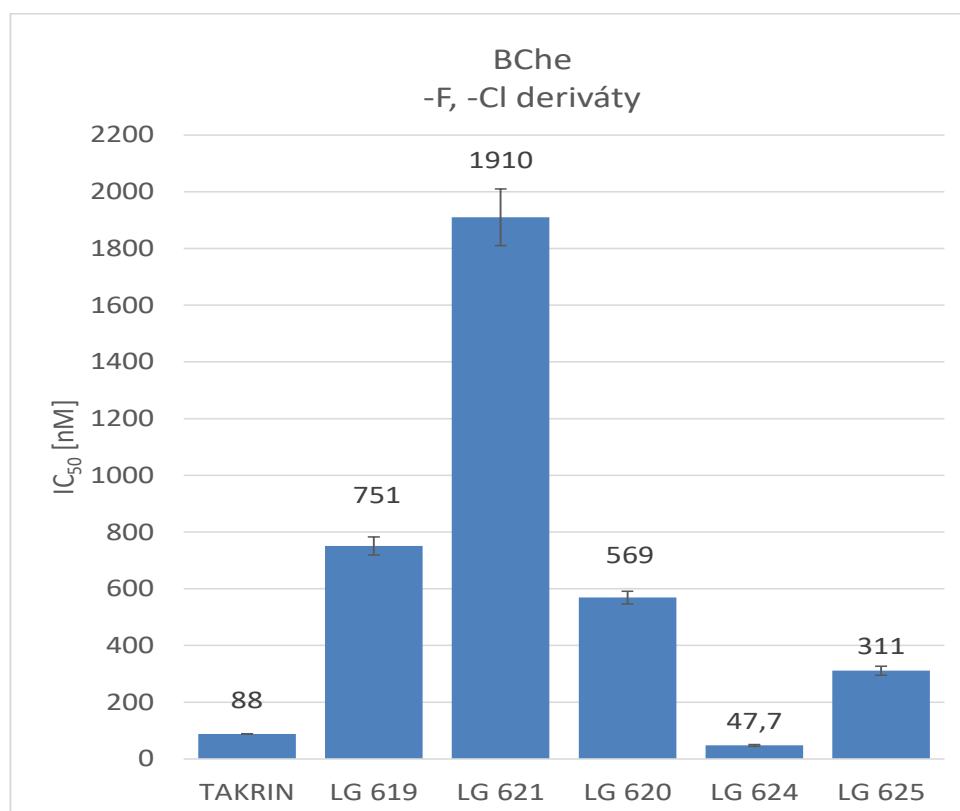
Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5	SI
THA	H	H	H	H	6C	<b>0,275</b>
LG 621	H	H	F	H	5C	4,5858
LG 619	H	H	F	H	6C	<b>0,7679</b>
LG 620	H	H	F	H	7C	<b>0,9119</b>
LG 623	H	H	H	Cl	5C	-
LG 624	H	H	H	Cl	6C	1,4281
LG 625	H	H	H	Cl	7C	1,3946



Obr. 16: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminochinolinu s halogeny fluorem a chlorem pro AChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD z minimálně tří měření.

Čtvrtá skupina derivátů je substituována atomy fluoru v poloze 6 u látek LG 619, LG 621, LG 620 a atomy chloru v poloze 5 u látek LG 623, LG 624 a LG 625. (Tab. 7)

Hodnoty  $IC_{50}$  této skupiny látek ukazují, že se jejich inhibiční aktivita řádově rovná standardu, dokonce LG 624 s hodnotou  $IC_{50} = 44,9 \pm 1,4$  nM je 11x lepším inhibitorem AChE než takrin. LG 624 navíc ve své struktuře kromě atomu chloru obsahuje i nasycený šestičlenný kruh. Na druhém místě je látka LG 625 s  $IC_{50} = 223 \pm 6$  nM, která má na rozdíl od látky LG 625 ve své molekule cykloheptanový kruh místo cyklohexanového kruhu. LG 624 prokázala nejvyšší inhibiční potenciál ze všech testovaných derivátů.



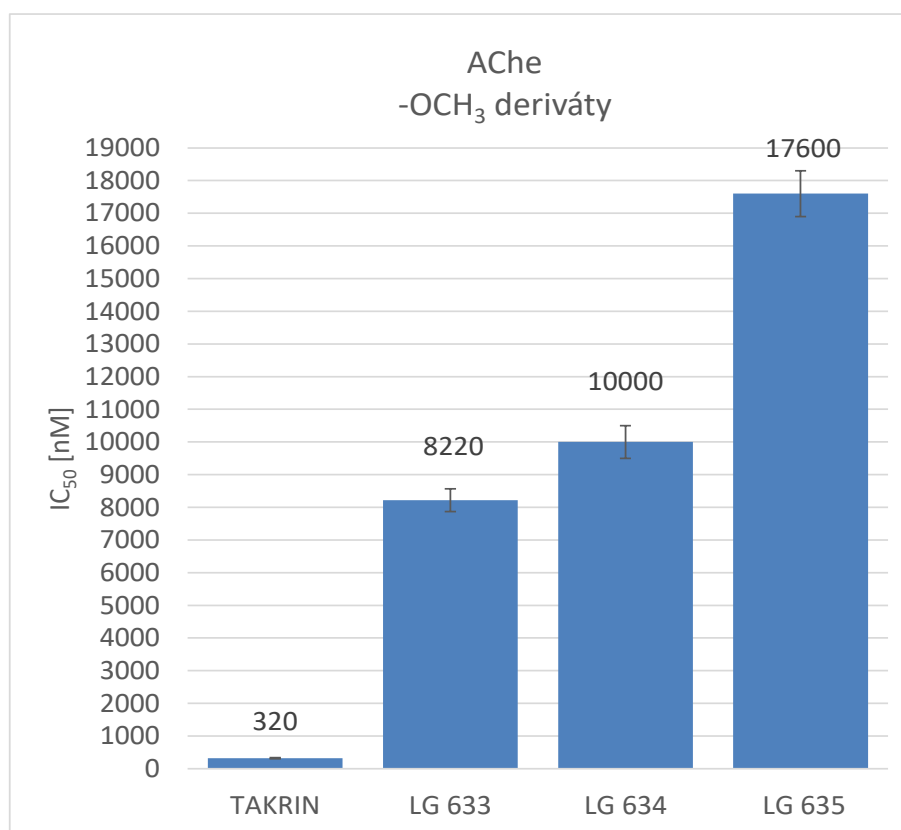
Obr. 17: Hodnoty  $IC_{50}$  derivátů aminochinolinu s halogeny pro BChE. Data jsou znázorněna jako průměr  $\pm$  SD z minimálně čtyř měření.

Z Obr. 17 je patrné, že schopnost inhibovat BChE je stejná jako v případě AChE a pohybuje se tedy ve stejných řádech  $IC_{50}$ . Nejvyšší míru inhibice k BChE vykazala látka LG 624, totožně jak to bylo v případě AChE. S jejím  $IC_{50} = 47,7 \pm 3$  nM je nejúčinnějším inhibitorem BChE ze všech testovaných látek. Z chlorovaných derivátů je další v pořadí LG 625 s  $IC_{50} = 311 \pm 16$  nM. Látka LG 623 při testování její nejvyšší koncentrace nevykázala ani 50% míru inhibice v případě BChE a ani v případě AChE, není proto uvedena na obrázku a jeví se jako nejhorší inhibitor testovaných látek. Nejlepší účinnosti z fluorovaných derivátů prokázala látka LG 620 s  $IC_{50} = 569 \pm 22$  nM.

Zástupci LG 619 a LG 620, obsahující ve své molekule fluor, prokázaly vyšší selektivitu k BChE.

Tab. 8: Tabulka testovaných derivátů substituovaná methoxy skupinou

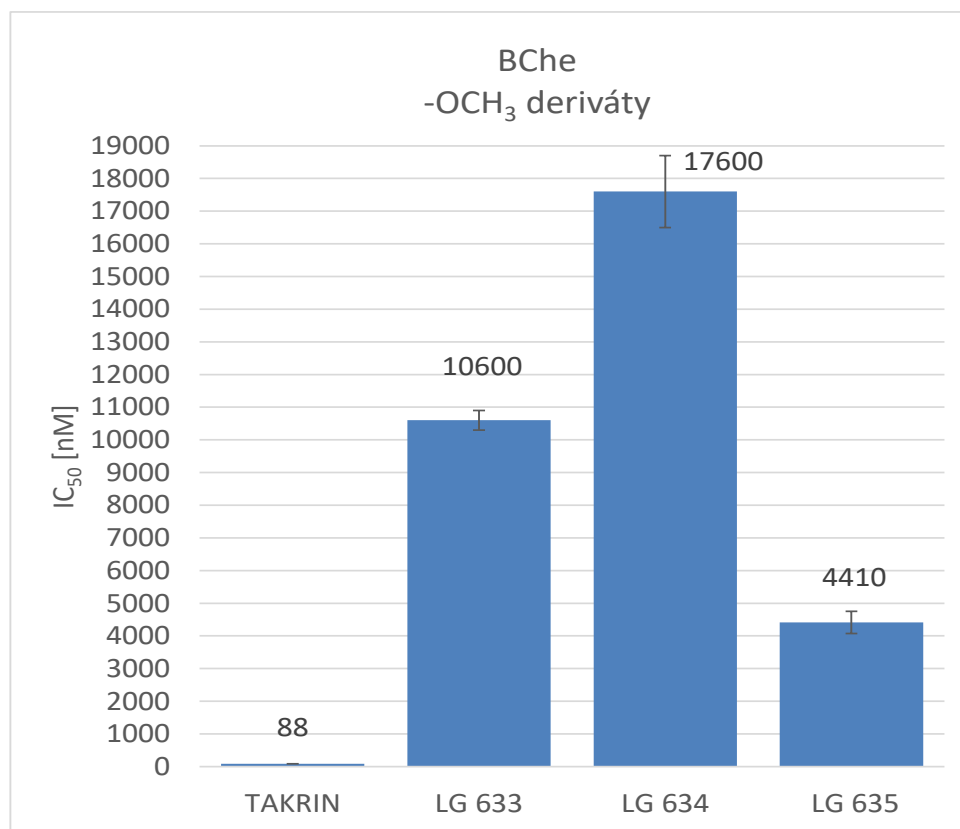
Sloučenina	R1	R2	R3	R4	R5	SI
THA	H	H	H	H	6C	<b>0,275</b>
LG 633	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	5C	1,2896
LG 634	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	6C	1,76
LG 635	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	7C	<b>0,2506</b>



Obr. 18: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminocholinu s methoxy skupinou pro AChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD ze čtyř měření.

Poslední skupinu testovaných derivátů tvořily inhibitory, jejichž základní skelet je substituován methoxy skupinou v poloze 6 aminocholinového základu. (Tab. 8) Největší afinitu k AChE projevila látka LG 633, která obsahuje cyklopentanový kruh. Látka LG 634 s hodnotou IC<sub>50</sub> = 10 000 ± 500 nM se projevil jako druhý nejúčinnější inhibitor skupiny. LG 634 neboli 7-

MEOTA má však o 3 řády nižší inhibiční potenciál než neúčinnější inhibitor testovaných látek LG 624.



Obr. 19: Hodnoty IC<sub>50</sub> derivátů aminochinolinu s methoxy skupinou pro BChE. Data jsou znázorněna jako průměr ± SD z minimálně tří měření.

Obr. 19 s deriváty aminochinolinu s methoxy skupinou ukazuje, že nejlepšího inhibičního výsledku vůči BChE dosáhla látka LG 635 s IC<sub>50</sub>= 4410 ± 340 nM, která má ve své struktuře cykloheptanový kruh. Inhibiční účinnost látky LG 635 je 4x vyšší než v případě látky LG 634, která má IC<sub>50</sub>= 17600 ± 1100 nM.

Vyšší míru selektivity k BChE prokázala látka LG 635 a s hodnotou SI 0,2506 je nejselektivnější zástupcem testovaných derivátů pro BChE.

## 7. Diskuze

AD jako nejčastější forma demence s nepředvídatelnými faktory vzniku se stává stále větším problémem pro stárnoucí populaci jak po stránce sociální, zdravotní, ale i ekonomické. V celosvětovém žebříčku je AD uvedena jako pátá nejčastější příčina smrti u osob starších 65 let. AD představuje těžce řešitelnou zátěž veřejného zdraví, a proto je v současné době zásadní prioritou zdravotnického výzkumu. Dostupná léčiva ovlivňují jednotlivé patogenetické články, zpomalí postup demence a postiženým zkvalitní průběh života, avšak postup choroby nezastaví ani ji nevyлéčí. K terapii jsou schválené AChEI (rivastigmin, galantamin, donepezil) a inhibitor glutamanergních receptorů typu NMDA memantin. (Jirák, 2009) AChEI jsou zodpovědné za zvyšování koncentrace ACh, potřebného k cholinergnímu přenosu. Za fyziologických podmínek je cholinergní transmise ukončena rozkladem ACh enzymem AChE v synaptické šterbině. Při manifestaci AD je však přítomnost AChE výrazně snížena, zatímco přítomnost BChE se zvyšuje. (Brunovský, 2007) V pokročilých stádiích BChE pak rozkládá ACh v mozku díky nedostatku AChE. Tento fakt potvrzuje studie, kdy na myších modelech bylo dokázáno, že BChE přebírá schopnost hydrolyzovat ACh v případě snížené hladiny AChE. (Hepnarová, 2018) V patofyziologii kromě postiženého cholinergního systému hraje roli koagulace a agregace specifických proteinů – depozita amyloidních plaků v mozkové tkáni, které mají přímý neurotoxický efekt a navíc působí imunogenně, čímž prohlubují oxidační stres a poškození mozkové tkáně volnými radikály. (Chmátalová, 2014)

Tento víceprvkový charakter příčin vzniku AD zvyšuje snahu hledat léčivo, které by bylo schopné ovlivnit několik patologických jevů najednou. Značná část testovaných látek prošla ve svém vývoji až do třetí fáze klinických studií, avšak přes veškeré úsilí farmaceutického výzkum nebyl od roku 2002 (registrace memantinu), schválen žádný nový preparát k léčbě AD. Hlavní překážkou v klinickém testování je nutnost prostupu přes HEB, nedostatečná účinnost, nedostatečná specifita vůči daným terapeutickým cílům a nedostačující znalost farmakodynamických vlastností testovaných látek. (Hroudová, 2017) Nejnovějším konceptem v terapii je MTDL design molekul. Takové farmakofory jsou strukturně příbuzné látkám, které již v terapii AD mají svůj význam. Jedná se například o hybridní molekuly s duálním účinkem, kdy se zkombinuje molekula AChEI spolu s látkou, která disponuje jinými vlastnostmi. Může jít o antagonistu kalciových kanálů, antioxidant či antagonistu  $\beta$ -sekretasy. (Rampa, 2011). Molekula AChEI jako potenciální MTDL byla použita jako základ syntézy molekul i v této práci. Cílem bylo farmakologické stanovení látek, které byly nasyntetizovány



tak, aby ovlivňovaly postižený cholinergní systém. Měření bylo podrobena 27 nově připravených substancí. Jejich struktura byla navržena na základě předpokladu, že obměnou molekuly THA vzniknou nové deriváty, u nichž by měla být snížena toxicita, dále budou mít multifunkční charakter a jednou z jejich funkcí bude inhibiční aktivita na AChE a BChE.

Molekula THA je obecně často pro syntézu MTDLs využívána. THA má nízkou molekulovou hmotnost, dobře penetruje skrz HEB, účinně inhibuje AChE v mozku a zároveň má vliv i na BChE, k níž prokazuje i lepší selektivitu. (Tumiatti, 2010) Studie prováděny na THA odhalily postupně i jeho další účinky, čímž je vysvětlováno, proč je tak důležitým prvkem v hledání multifaktoriálního farmakoforu. THA mimo jiné blokuje aktivitu MAOs, inhibuje zpětné vychytávání 5-hydroxytryptofanu a dopaminu, blokuje draslíkové iontové kanály a mAChR. Není však stále jasné, zda za terapeutický účinek zodpovídá inhibice ChEs nebo jeho další farmakologické vlastnosti. (Proctor a Harvey, 2000) Avšak dle (Fisher et al., 2000) jeho působení pravděpodobně souvisí s neselektivním muskarinovým antagonismem nebo agonismem  $M_1$  s paralelním  $M_2$  antagonismem. Muskarinový antagonismus na  $M_2$  muskarinovém receptoru vede ke zvýšenému uvolňování ACh v mozkové tkáni. Tento druh muskarinové interakce poskytuje slibnou terapeutickou účinnost při léčbě AD. 7-MEOTA vykazuje ještě vyšší afinitu k muskarinovým receptorům než takrin. Z tohoto hlediska lze 7-MEOTA považovat za slibnější derivát THA (Sepsova et al., 2015)

I přesto, že inhibiční aktivita 7-MEOTA je nižší v porovnání s THA ( $IC_{50AChE} = 10,5 \mu M$ ), lze ji prozatím považovat za nejlepší substituovaný derivát THA. (Spilovska, 2015) Kromě výrazného vlivu na AChR a lepších antioxidačních vlastností disponuje 7-MEOTA příznivějším toxikologickým profilem. Ve studii (Soukup et al., 2013) to potvrdily zjištěné hodnoty  $LD_{50}$ .  $LD_{50}$  THA pozorované skupiny myších jedinců po intramuskulární aplikaci činila 29 mg/kg, kdežto v případě 7-MEOTA byla  $LD_{50}$  125mg/kg. Tyto pozitivní vlastnosti, včetně dobré penetrace skrz HEB umožňují její další použití jako podklad pro syntézu nových inhibitorů ChEs v hledání léčiva multifaktoriálního charakteru v terapii AD.

Při syntéze našich testovaných sloučenin je základ tvořen 4- aminochinolinem, k němuž byl přikondenzován skelet buď s 5, 6 nebo 7 uhlíky. Bylo zjištěno, že THA, jež obsahuje ve svém skeletu 6 uhlíků, se při kontaktu s AChE váže prostřednictvím své 4-aminochinolinové části, přičemž zacyklený kruh je důležitý při blokování katalytického místa enzymu. (Steinberg et al., 1975). Na aromatickém kruhu THA byly v různých polohách navázané jednotlivé funkční skupiny. Jednalo se o halogenidy, methyl či methoxy skupiny. Proctor a Harvey, 2000

prokázali, že v důsledku van der Waalsových interakcí vzniká komplex mezi THA a AChE a dochází k přenosu náboje v periferním místě na enzymu. Katalytické místo AChE se účastní elektrostatických interakcí s aminokyselinami tryptofan a fenylamin. (Vieira, 2019)

Dalším zkoumaným parametrem bylo ovlivnění inhibiční aktivity velikostí nasyceného přikondenzovaného kruhu s 5, 6 nebo 7 uhlíky. Nejlepších inhibičních vlastností dosáhly látky s cyklem tvořeným 6C, stejně jako má THA. Dalším zjištěným poznatkem pro všechny testované látky je, že sloučeniny s cyklem tvořeným 7C mají převážně hodnoty  $IC_{50}$  vyšší v porovnání s inhibitory s 5C či 6C. Rozsáhlejší vliv na inhibiční účinnost měla poloha, počet a druh navázaných funkčních skupin.

U methylovaných testovaných derivátů hraje významnou roli umístění  $CH_3$  skupiny, kdy při jejím přesunu z polohy 7 do polohy 6 inhibiční účinek stoupá na hodnotu stovek nM. V rozsáhlé studii Recatini et al., 2000 se potvrzuje, že substitucí v poloze 6 akridinového skeletu dává vznik účinnějším analogům než v poloze 7 s hodnotou  $IC_{50}= 100$  nM. LG 629 má však prokazatelně nižší afinitu k BChE a s inhibičním potenciálem  $IC_{50}= 1000$  nM je vůči ní 7x méně účinná než v případě AChE. Důvodem může být nepříznivá poloha methylové skupiny v poloze 7, jež svou přítomností může tvořit stérickou překážku v aktivním místě BChE. Toto bylo prokázáno již v roce 2010 ve studii Camps a kol., kdy při substituci THA v poloze 6 atomem chloru došlo k optimální inhibici lidské AChE. Avšak za použití BChE bylo zjištěno negativní působení atomu chloru v poloze 6 THA, jež svou blízkostí narušuje vazbu v aktivním místě lidské BChE. (Camps et al., 2010)

Nejpočetnější skupinu testovaných látek tvoří halogenované deriváty. Na rozdíl od methylové skupiny jsou halogeny schopné darovat své elektrony s volným párem k účasti na vodíkové vazbě. Zástupci z řad halogenů zvyšují lipofilitu dané molekuly, čímž zajišťují prostup skrz HEB a zároveň díky svým elektronakceptorovým vlastnostem zvyšují inhibiční potenciál. (Recatini, 2000).

Skupina testovaných látek substituovaných atomem bromu a chloru v poloze 6 aminochinolinového skeletu vykázala míru inhibice v řádech mikrom. V porovnání s methylovou skupinou se inhibiční účinnost prokazatelně snížila. Lepších inhibičních výsledků jak vůči AChE tak i BChE, dosáhly substance, jež obsahují ve své molekule chlor. U bromovaných analogů jsme získali o řád nižší inhibiční aktivitu a z monohalogenovaných derivátů dosáhla látka LG 608 slabého inhibičního účinku  $IC_{50}= 5$   $\mu$ M. I při změně polohy atomu bromu do polohy 7 aminochinolinového skeletu nelze předpokládat zvýšení inhibičních

vlastností. Tento předpoklad potvrzuje studie z roku 2000, kdy bromovaný analog THA dosáhl hodnot  $IC_{50}$  řádově obdobných jako v případě našeho měření, tedy  $IC_{50}$  rovno  $10 \mu M$ . (Proctor a Harvey, 2000)

Při použití fluoru v molekule se hodnoty inhibičního potenciálu projevily příznivěji a všechny látky mají inhibiční účinnost ve stovkách nM. Práce Harvey a Proctor, 2000 zaměřená na testování účinnosti takrinových analogů prokázala, že přítomnost fluoru či chloru v poloze 6 poskytuje rovnocenné výsledky inhibice a pouze fluorované deriváty působí vůči BChE stejně jako v případě AChE. Látky z této skupiny derivátů mají dokonce o 2 řády vyšší inhibiční aktivitu než v praxi používaný standard 7-MEOTA. (Kozurková, 2011)

U námi zjištěných výsledků se prokázala u látek LG 619 a LG 620, které obsahují ve své molekule fluor, dokonce vyšší míra selektivity vůči BChE. Může to být ovlivněno tím, že objem aktivního místa u BChE je větší než v případě AChE, a tudíž elektronegativní atom fluoru je stéricky lépe disponován do kavity enzymu díky zvýšené hustotě elektronů na aromatickém jádře THA a pevnějším van der Waalsovým interakcím.

Index selektivity je důležitý parametr v hledání účinného inhibitoru, jelikož v pokročilých stádiích AD BChE přebírá roli AChE při rozkladu ACh. Proto mají v pokročilé fázi nemoci pacienti významnější benefit ze selektivních BChEI. Prozatím však není zcela jasné pravidlo, v kterém stádiu a kdy použít selektivní AChEI, selektivní BChEI či neselektivní ChEsI. (Hepnarová, 2018)

Z testovaných látek vyjadřovala většina látek vyšší selektivitu k AChE, pouze 6 substancí se prokázalo selektivněji k BChE – LG 561, LG 639, LG 619, LG 620, LG 632 a LG 635.

U disubstituované skupiny atomy halogenů v polohách 6 a 8 aminochinolinového cyklu lze očekávat navýšení inhibičního účinku na úrovni CNS díky zvýšené lipofilitě dvěma atomy halogenu. Je žádoucí, aby lipofilitou zvýšená penetrace do CNS, přinesla navýšení inhibičního potenciálu. Gregor a kol., 1992 již potvrdili, že chlorem substituované deriváty THA jsou mnohonásobně účinnější než jiné izomery podrobené testování. Důvodem může být indukce dipólového momentu, správná orientace a efekt na  $pK_a$  sloučeniny, což přispívá k pevnější interakci mezi  $\pi$ - $\pi$  elektrony derivátů THA a elektrony aromatických kyselin v aktivním místě enzymu.

Pozitivní vliv může být zajištěn také udržením nekoplanárního uspořádání inhibitoru a působením elektrostatických a hydrofobních interakcí při vazbě na enzym. (Bieger, 1967)

Lepší inhibiční vlastnosti se však v tomto případě nepotvrdily, zavedením dalšího atomu halogenu do struktury se inhibiční aktivita snížila a nejlepší inhibitory této skupiny jsou tak 3x méně účinné než látky ze skupiny s jedním atomem halogenu. V rozsáhlé studii z roku 2000 (Proctor a Harvey, 2000) přidáním druhého atomu F se taktéž potvrzuje snížení účinnosti proti oběma ChEs, přičemž však index selektivity byl výraznější vůči BChE než proti AChE.

V poslední testované skupině methoxyderivátů byly výsledky inhibiční aktivity poměrně nízké v řádech tisíců nM, kdy nejvyššího inhibičního účinku dosáhla látka LG 633  $IC_{50}=8220$  nM. Použití methoxy skupiny v poloze 6 aminochinolinového cyklu se jeví tedy jako nevýhodné. Pozitivum zavedení toho substituentu tkví v nižší toxicitě AChEI a tento parametr může být předmětem dalšího testování. Důvodem může být patrná strukturální podobnost této skupiny vybraných derivátů se standardem 7-MEOTA, která právě nevykazuje díky své odlišné metabolické cestě výraznou hepatotoxicitu na rozdíl od THA. Výsledek odpovídá i vzájemnému porovnání obou standardů, kdy THA inhibuje obě ChEs o 2 řády účinněji než 7-MEOTA. (Korábečný, 2011)

Největším inhibičním potenciálem z terapeuticky účinných a v praxi používaných AChEI disponuje donepezil s  $IC_{50}=22$  nM. Tento inhibiční účinek je srovnatelný jako v případě našich testovaných látek LG 610 a LG 609, které ve své molekule obsahují chlor v poloze 6 aminochinolinového cyklu. Dalším terapeuticky využívaným zástupcem AChEI je galantamin. Jeho inhibiční potenciál při působení na AChE je  $IC_{50}=800$  nM, což je účinnost obdobná jako v případě testovaných derivátů substituovaných fluorem v poloze 6 u látek LG 621 a LG 620.

V procesu inhibice hraje tedy významnou roli jednak druh zvolených substituentů a zároveň i jejich umístění. Ve skupině chlorovaných derivátů, kde je chlor umístěn v poloze 6 aminochinolinového skeletu je inhibiční účinnost vůči ChEs v hodnotách jednotek  $\mu$ M. Avšak při přesunu chloru do polohy 5 aminochinolinového cyklu u struktur LG 624 a LG 625 se míra inhibice výrazně zvýšila. Tyto zmíněné inhibitory jsou nejúčinnějšími ze všech testovaných látek. Látka LG 624 s hodnotou  $IC_{50AChE}=33,4$  nM a  $IC_{50BChE}=62$  nM prokázala nejlepší inhibiční potenciál skupiny díky své strukturně blízké analogii s 6-Cl-THA. 6-Cl-THA je řazen k silným reverzibilním inhibitorům AChE a má vyšší inhibiční účinnost vůči AChE v porovnání s THA. (Recatini, 2000) 6-chlor-THA je prozatím jeden z nejúčinnějších derivátů THA. Byl testován i jeho toxikologický profil a na základě výsledků se jeví jako vhodný základ pro syntézu nových léčiv s multifaktoriálním charakterem pro terapii AD bez prokázaných známek toxicity in vivo. (Misík, 2018) Jeho silných inhibičních vlastností je nejspíše docíleno

jednak zvýšenou lipofilitou a také přítomností dipólového momentu, který má vliv na orientaci inhibitoru při vazbě do aktivního místa AChE. Inhibiční vliv na BChE je však prokazatelně nižší. Inhibiční potenciál vůči BChE je  $IC_{50}=1780$  nM. 6-Cl-THA má tedy vysokou míru selektivitu vůči AChE. SI je rovno 100, což je hodnota srovnatelná jako v případě AChEI donepezilu (SI= 1100). (Spilovská, 2017) Ve studii (Kaniakova et al., 2018) se dokonce pokusili o syntézu nového hybridu, který vznikl kombinací 6-chlor-THA s memantinem. Při *in vivo* testování se prokázalo, že tato nová multifunkční látka by mohla nést jak inhibiční, tak neuroprotektivní vlastnosti vůči AChE vyšší než dané původní substance.

6-Cl-THA s hodnotou  $IC_{50AChE}=17,60$  nM je však stále 2x účinnější než LG 624 a nadále tak zůstává nejsilnější testovaným inhibitorem AChE. (Gregor, 1992)

Žádný z testovaných derivátů nevykazoval vlastnosti potenciálního léčiva, které by mohlo sloužit k terapii AD. Syntetizované deriváty THA neprojevily takové vlastnosti, které se při jejich výzkumu předpokládaly. Do budoucna je potřeba provést další *in vitro* a *in vivo* testování našich molekul a prokázat případně i jiné multifunkční vlastnosti. Z hlediska dalších syntéz potenciálních léčiv AD by bylo žádoucí zaměřit se na molekulu 6-chlor-THA. Sama o sobě vykazuje velmi silných inhibičních vlastností a je možné, že při změnách ve struktuře či při spojení s jiným farmakoforem, dá za vznik účinným derivátům se zachovalou aktivitou i v molekule MTDLs.

## 8. Závěr

Cílem této práce bylo stanovit inhibiční koncentrace nově syntetizovaných potencionálních léčiv AD. Hodnocení látek proběhlo na základě stanovení inhibiční koncentrace *in vitro* pro obě ChEs, jejich porovnání se standardem a vypočtení indexu selektivity pro jednotlivé substance. Celkem bylo testování podrobena 27 derivátů aminochinolinu a jednotlivé deriváty se lišily v počtu, druhu navázaných funkčních skupin a velikosti uhlíkového zacykleného řetězce. Většina z testovaných látek neprokázala větší inhibiční schopnost než takrin, který byl použit jako standard. Ze všech testovaných látek čtyři látky projeví vyšší inhibiční aktivitu vůči AChE. Látka LG 629, substituovaná methylovou skupinou v poloze 7 aminochinolinového cyklu, látka LG 632 s methylovou skupinou v poloze 5 aminochinolinového cyklu a látky LG 625 a LG 624, substituované v poloze 5 aminochinolinového cyklu atomem chloru. Zvolené substituenty chlor a methylová skupina měly nejzásadnější vliv na inhibiční potenciál.

Dalším sledovaným parametrem byl index selektivity. Většina z testovaných látek projeví vyšší selektivitu k AChE, pouze šest substancí se prokázalo být selektivnější k BChE. Ze skupiny testovaných látek, které mají nejlepší inhibiční schopnosti pouze látka LG 632 prokázala vyšší selektivitu k BChE. Nejvyšší index selektivity byl zjištěn u látky LG 627 (SI 24,32).

Všechny čtyři látky LG 629, LG 632, LG 625 a LG 624 prokázaly největší inhibiční aktivitu ze skupiny testovaných látek a v budoucnu by bylo vhodné zaměřit se na jejich další testování. Jednou z možností by mohla být skutečnost, že interagují s NMDA receptory a lze je považovat za dualní látky.

Nejlepší potenciál ze všech testovaných látek měla látka LG 624 substituovaná atomem chloru v poloze 5 aminochinolinového kruhu. Projeví nejvyšší inhibiční účinek vůči AChE ( $IC_{50} = 34$  nM) i vůči BChE ( $IC_{50} = 62$  nM). Látku LG 624 lze tedy považovat jako vhodného kandidáta pro *in vivo* testování jako potencionální léčivo AD.

## Použité zdroje a prameny

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry web site, [online, 15.2.2020]  
Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>.

Aldridge WN. (1953) Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.*, 53(1), 110-117.

Allerdice PW., Gardner H., Lockridge O. et al. (1991) The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, *Genomics.*, 11(2), 452-454.

Bagad M. et al. (2013) Towards understanding Alzheimer's Disease: An Overview, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4 (4), 286

Brunovský M. (2007) Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2, 107-111.

Bieger D., Wassermann O. (1967) Ionization constants of cholinesterase-reactivating bispyridinium aldoximes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 19 (12), 844-847.

Cokugras N. (2003) Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish Journal of Biochemistry*, 28, 54-61.

Čolović, M. B., et al. (2013) Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11 (3), 315-335.

Radic Z., Taylor P. (2006) Structure and function of cholinesterases in Toxicology of organophosphate & carbamate compounds, R. Gupta. Editor. *Elsevier Academic Press*. London. 161-186.

Lincová D., Farahali H. (2007) *Základní aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, 160-200.

Sussman J. L. et al. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.*, 253, 872-879.

Pohanka M. (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomed. Pap. Med.*, 155(3):219-230.

Blennow K., de Leon M. J., Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 368, 387-403.

Jirák Roman et al. (1999) *Demence*. Praha 4, Maxdorf s.r.o., ISBN 80-85800-44-6, 110.

Jirák Roman (2008) Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby, *Neurologie pro praxi*, 9(4), 240-44.

Jirák Roman (2015) Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí, *Česká a slovenská Psychiatrie*, 111(3), 127-132.

Jiráček Roman (2002) Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby, *Psychiatrie pro praxi*, 2, 55-58.

Jiráček Roman (2009) Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencií, *Neurologie pro praxi*, 10(6), 1-5.

Sussman J. L., Silman I. (1992) Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Struct. Biol.*, 5(2), 721-729.

Johnson G., Moore SW. (2006) The peripheral anionic site of acetylcholinesterase, structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.*, 12(2), 2017-225.

Petrovič M., Sedláček M. et al. (2004) Působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klin.farmakol.Farm.*, 18, 81-89.

Lombardo S., Maskos U. (2015) Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, 96, part B, 255-262.

Zvěřová M. (2017) Alzheimerova demence. Praha: Grada Publishing, 100-144, ISBN 97880271105618

Fenclová E. et al. (2020) Rizikové faktory Alzheimerovy nemoci, *Čes. a slov. Psychiatrie*, 116(2), 59–65.

Nachmannsohn D., Wilson IB. (1951) The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.*, 12, 259-339.

Koukolík F., Jiráček R. (1998) Alzheimerova nemoc a další demence. Praha: Grada Publishing, 27-44, ISBN 8071696153.

Thies, W., Bleiler L. (2012) Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Association, 8(2), 131-168.

Patočka J., Kuča K., Jun D. (2004) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body. *Acta Medica*. (Hradec Kralove), 47(4), 215-225.

Sporty J. L., Lemire S.W. et al. (2010) Immunomagnetic separation and quantification of butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum. *Anal. Chem.* 82(15), 6593-600.

Korábečný J., Spilovská K., Benek O. et al. (2012) Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Čes. slov. Farm.*, 61, 210-221.

Ressner Pavel (2004) Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba, *Neurologie pro praxi*, 1-6.

Preiss Marek et al. (1998) Klinická neuropsychologie, Praha 7; Grada Publishing, ISBN 80-7169-443-6.

Dvir H., Silman I., Harel M., Rosenberry T. L. & Sussman, J. L. (2010) Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.*, 187, 10–22.



Roth M., Tym E., Mountjoy C. et al. (1986) A standardised instrument for the diagnosis of mental disorder in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br. J. Psychiatry*, 149, 698-709.

Saxena A., Redman A. M., Jiang X et al. (1997) Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry*, 36(48), 14642-51.

Bolis L., Licinio J., Govoni S. (2005) Handbook of the autonomic nervous system in health and disease. *Taylor a Francis e-Library*, 5-7.

Martínková J. (2007) Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha: Grada Publishing a.s., ISBN: 978-80-247-1356-4

Ambler Z. (2010) Neurofyziologie a elektrodiagnostika nervosvalového přenosu. *Neurologie pro praxi*; 11(2), 81–84

Skoumalová A. (2011) Periferní markery oxidačního stresu u Alzheimerovy choroby. *Klin. Biochem. Metab.*, 19(40), No. 4, 218-222.

Vnoučková K., Jiráček R. (2003) Rivastigminum. *Remedia*, 13(6), 1-6.

Jiráček Roman (2009) Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia*, 19(5), 342-345.

Korábečný J., Zemek F., Soukup O., et al. (2014) Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: current state and future perspectives, *Drug Design and Discovery in Alzheimer's disease*, 3-39

Lee N. Y., Choi H. O., Kang Y. S. (2012) The acetylcholinesterase inhibitors competitively inhibited an acetyl L-carnitine transport through the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.*, 37, 1499–1507.

Soukup, O. et al. (2013) A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr. Alzheimer Res.*, 10, 893–906.

Wlodek S. T., Antosiewicz J., McCammon J. A., Straatsma T. P., Gilson M. K., Briggs J. M., Humblet C., Sussman J. L. Binding of tacrine and 6-chlorotacrine by acetylcholinesterase, (1996) *Biopolymers*, 38, 109–117

Pang Y. P., Quiram P., Jelacic T., Hong F., Brimijoin S. (1996) Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 271, 23646–23649

Li W., Xue J., Niu C., Fu H., Lam C. S., Luo J., Chan H. H., Xue H., Kan K. K., Lee N. T., Li C., Pang Y., Li M., Tsim K. W., Jiang H., Chen K., Li X., Han Y. (2007) Synergistic neuroprotection by bis (7)-tacrine via concurrent blockade of N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase. *Mol. Pharmacol.* 71, 1258–1267.

- Hepnarova V. et al. (2018) The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 292-306.
- Sepsova, V. et al., (2015) Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *General Physiology and Biophysics*, 34 (2), 189–200.
- Musiek E. S., Schindler S. E. (2013) Alzheimer disease: current concepts & future directions, *Missouri Medicine*, 110, 395-400.
- Reiter R. J., Tan D.X., Manchester L. C., Terron M. P., Flores L. J., Koppisepi S. (2007) Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv. Med. Sci.*, 52, 11–28.
- Žďárová-Karasová J. et al. (2010) Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů. *Chem.listy*. 104, 46-50.
- Thomson P. (2018) Amyloid hypothesis vs Tau Hypothesis, [online, 24.3. 2020] Dostupné z: <https://www.stressmarq.com/amyloid-hypothesis-vs-tau-hypothesis/?v=3e8d115eb4b3>.
- Ganguli M., Dodge H., Shen Ch. et al. (2005) Alzheimer Disease and Mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch. Neurol.*, 62, 779-784.
- Korábečný J., Nepovimová E., Cikánková T., Špilovská K. et al. (2018) Newly developed drugs for Alzheimer's disease in relation to energy metabolism, cholinergic and monoaminergic neurotransmission, *Neuroscience*, 370, 191-206. IF 3.382.
- Finkel R. et al. (2008) *Pharmacology*. Lippincott Williams & Wilkins, 40-50.
- Soukup O. et al., (2010) Interaction of nerve agent antidotes with cholinergic system. *Current Medical Chemistry*. 17, 1-3.
- Unzeta M., Esteban G., Bolea I. et al. (2016) Multi-Targeted Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease, *Front. Neurosci.*, 10, 205.
- Cavalli A., Bolognesi M., Minarini A., Rosini M., Tumiatti V., Recanatini M., Melchiorre C. (2008) Multi-targeted-Directed Ligands to Combat Neurodegenerative Diseases, *J. Med. Chem.*, 51, 347-372.
- Kadmiri N. et al. (2014) Novel presenilin mutations within Moroccan patients with early-onset Alzheimer's Disease, *Neuroscience*, 269, 215-222.
- Gregor V. E. et al. (1992) The synthesis and in vitro acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of tacrine (Cognex®) derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2(8), 861-864.
- Butterfield D. A. et al. (2007) Roles of amyloid  $\beta$ -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 658-677.

- Ferreira M. et al. (2002) Nicotinic ACh receptor subtypes on gastrointestinally projecting neurones in the dorsal motor vagal nucleus of the rat. *J. Physiol.* 545(3), 1007–1016.
- Franková V. (2016) Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby, *Interní Med.*,18(2), 87-90 [Psychiatr. praxi 2015; 16(3): 79-82].
- Avila J. et al. (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions, *Physiol. Rev.* 84(2), 361-384.
- Mandelkow E. (2012) Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration, *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2(7).
- Teich AF., Arancio O. (2012) Is the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease therapeutically relevant?, *Biochem. Journal*, 446(2), 165-177.
- Youdim MB. (2005) Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders, *Trends Pharmacol.Sci.*, 26(1), 27-35.
- Ibach B., Haen E. (2004) Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.*, 10(3), 231-251.
- Davis KL., Powchik P., Tacrine, *Lancet. J.*, 345(8950), 625-630.
- Korabecny J., Musilek K., Holas O, Binder J, Zemek F. et al. (2010) Synthesis and in vitro evaluation of N-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg Med Chem Lett.*, 20(20),6093-95.
- Jiang H., Luo X., Bai D. (2003) Progress in clinical, pharmacological, chemical and structural biological studies of huperzine A: a drug of traditional Chinese medicine origin for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.*, 10, 2231–2252.
- Štěpánková Š., Komers K. (2008) Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors, *Current Enzyme Inhibition*, 4, 160-171.
- Chmátalová.Z., Skoumalová A. (2014) Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledy, *Klin. Biochem. Metab.*, 22 (43), 2014, No. 4, 189–195.
- Hroudová J. (2017) Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby, *Psychiatr. praxi*, 18(1), 7-10.
- Misik J. et al. (2018) Cholinesterase Inhibitor 6-Chlorotacrine - In Vivo Toxicological Profile and Behavioural Effects, *Curr. Alzheimer. Res.*, 15(6), 552-560.
- Recanatini M., Cavalli A. et al. (2000) SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: Synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J. Med. Chem.* 43, 2007–2018 .

Fisher, A. et al. (2000) M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents in Alzheimer's disease. *Rationale and perspectives. Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, 315–320.

Proctor G. R., Harvey A. L. (2000) Synthesis of tacrine analogues and their structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 7, 295-302.

Tumiatti V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C. (2010) Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 17(17), 1825-38.

Rampa, A., Belluti, F., Gobbi, S. & Bisi, A. (2011) Hybrid-based multi-target ligands for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2716–2730.

Steinberg G. M., Mednick M. L., Maddox J., Rice R. (1975) A hydrophobic binding site in acetylcholinesterase, *J. Med. Chem.*, 18, 1056.

Korabecny J, Musilek K, Zemek F. et al. (2011) Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine—new tacrine derivate with cholinergic properties, *Bioorg Med Chem Lett*, 21(21), 6563–6566.

Spilovská K., Koráběčný J., Horová A. et al. (2015) Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Med. Chem. Res.*, 24 (6), 2645 – 2655.

Vieira, I., Camargo, L. T. F. M., Ribeiro, L. et al. (2019) Structure–activity relationship of tacrine and its analogues in relation to inhibitory activity against Alzheimer's disease. *J Mol Model*, 25, 11.

Camps P. et al. (2010) Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates, *Chemico-Biological Interactions*, 187(1), 411-415.

Spilovská K., Koráběčný J. et al. (2017) Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation, *Journal Molecules*, 22(6), 1006.