

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**Modulace protizánětlivé odpovědi sledované využitím  
mikrogliaální buněčné linie SIM-A9**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Hradec Králové 2021

Jitka Tumpachová

## **PROHLÁŠENÍ**

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

V Hradci Králové dne 14. 5. 2021

.....  
Jitka Tumpachová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D. a pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za odborné vedení, konzultace a cenné rady. Dále Mgr. Lubice Múčkové, Ph.D. za vedení při práci v laboratoři, vstřícnost, ochotu a čas, který mi při zpracování diplomové práce věnovala. Poděkování také patří mé rodině za velkou podporu během studia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Jitka Tumpachová

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Konzultant: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Název diplomové práce: Modulace protizánětlivé odpovědi sledované využitím mikrogliaální buněčné linie SIM-A9

Diplomová práce je ve své teoretické části zaměřena na charakteristiku, význam a podíl neurozánětu na vznik a rozvoj neurodegenerativních onemocnění a možnostmi jejich léčby v současné době. Experimentální část je věnována zhodnocení cytotoxicity a protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných látek ze skupiny naftochinonů (K1502, K1503 a K1504) a chromonů (5-EM-13, 5-EM-26 a 5-EM-36). Cytotoxicita byla hodnocena na myší mikrogliaální linii SIM-A9. Komparativně byla v této části navíc využita i neuroblastomová linie SH-SY5Y. Na obou buněčných liniích byla pomocí kolorimetrické metody MTT stanovena hodnota střední toxické koncentrace ( $IC_{50}$ ) a maximální tolerovatelné koncentrace (MTC). Bezpečnost MTC byla následně verifikována pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie u buněčné linie SIM-A9 po stimulaci lipopolysacharidem (LPS) nebo interferonem- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Na buněčné linii SIM-A9 byly dále sledovány protizánětlivé účinky studovaných látek. Látky byly aplikovány v koncentracích odpovídajících 100 %, 50 % a 25 % MTC. Protizánětlivé účinky byly hodnoceny pomocí dvou metod. První metodu představoval enzymový imunisorbentní test (ELISA), pomocí něhož byly stanoveny hladiny prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  po stimulaci buněk LPS. LPS byl přidán 1 hodinu po aplikaci látek. Koncentrace cytokinů byly následně stanoveny 23 hodin po podání LPS. Koncentrace TNF- $\alpha$  byly stanoveny u všech studovaných látek, zatímco hladiny IL-6 pouze u naftochinonů. Jako druhá metoda byla použita Griessova reakce, kterou byla stanovena hladina oxidu dusnatého (NO) vyprodukovaného buňkami do kultivačního média po stimulaci IFN- $\gamma$ . IFN- $\gamma$  byl k SIM-A9 buňkám přidán 1 hodinu po aplikaci látek. Hladiny NO byly stanoveny 47 hodin po podání IFN- $\gamma$  u všech studovaných látek. Z výsledků diplomové práce vyplývá, že deriváty naftochinonů vykazují ve srovnání

se sloučeninami chromonů vyšší cytotoxicitu. Nejvíce toxickou látkou byla K1504. Modulaci zánětlivé odpovědi vyvolané LPS nebo IFN- $\gamma$  ovlivňovala pouze jediná látka, a to K1503. Tento naftochinon v přítomnosti LPS ve všech testovaných koncentracích signifikantně zvyšoval sekreci TNF- $\alpha$ , na druhou stranu ale neovlivňoval produkci IL-6. Po stimulaci IFN- $\gamma$  inhiboval tvorbu NO při nejvyšší testované koncentraci odpovídající MTC o 27 %. Ačkoliv výsledky diplomové práce u nových derivátů naftochinonů a chromonů protizánětlivé účinky neprokázaly, naftochinon K1503 by mohl sloužit jako výchozí struktura pro hledání dalších biologicky účinných látek.

**Klíčová slova:** neurozánět, neuroglie, neurodegenerativní onemocnění, naftochinony, chromony

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Jitka Tumpachová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Consultant: pplk. doc. MUDr. Jaroslav Pejchal, Ph.D. et Ph.D.

Title of diploma thesis: Modulation of anti-inflammatory response in microglial cell line SIM-A9

In the theoretical section, the thesis is focused on the characteristics, significance, and contribution of neuroinflammation in the origin and development of neurodegenerative diseases. The possibilities of their current treatment are discussed. The experimental part is devoted to evaluating the cytotoxicity and anti-inflammatory response of newly synthesized derivatives of naphthoquinones (K1502, K1503 and K1504) and chromones (5-EM-13, 5-EM-26 and 5-EM-36). Cytotoxicity was measured in the mouse microglial line SIM-A9. In addition, the neuroblastoma line SH-SY5Y was used comparatively in this part. The half-maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) and maximum tolerated concentration (MTC) were determined on both cell lines using MTT colorimetric methods. The safety of MTC was subsequently verified by microcapillary flow cytometry in the SIM-A9 cells after lipopolysaccharide (LPS) or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) stimulation. The anti-inflammatory effects of the studied substances were further monitored in SIM-A9 cells. The substances were applied in concentrations corresponding to 100%, 50%, and 25% MTC. Anti-inflammatory effects were measured using two methods. The first method, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), was used to determine concentrations of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ . LPS was added 1 hour after the application of substances. Cytokine concentrations were subsequently measured 23 hours after LPS administration. TNF- $\alpha$  production was assessed in all studied substances, while IL-6 levels were determined only in naphthoquinone derivatives. As a second method, the Griess reaction was utilized to determine nitric oxide (NO) levels produced by the cells into the culture medium after IFN- $\gamma$  stimulation. IFN- $\gamma$  was added to SIM-A9 cells 1 hour after drug application. NO levels were determined 47 hours after IFN- $\gamma$  administration in all test substances. The results of the

thesis show that naphthoquinone derivatives display higher cytotoxicity than chromone compounds. The most toxic substance was K1504. Modulation of the inflammatory response induced by LPS or IFN- $\gamma$  was affected by only one substance K1503. This naphthoquinone significantly increased TNF- $\alpha$  secretion at all studied concentrations in the presence of LPS. On the other hand, K1503 did not affect IL-6 production. After stimulation with IFN- $\gamma$ , K1503 inhibited NO production by 27% at the highest tested concentration, corresponding to MTC. The results did not prove any anti-inflammatory effects of new naphthoquinone and chromone derivatives. However, naphthoquinone K1503 could serve as a starting structure in searching for other biologically active substances.

**Keywords:** neuroinflammation, neuroglia, neurodegenerative diseases, naphthoquinone derivatives, chromone derivatives

## Obsah

Úvod .....	10
<b>1. Zánět – stručná charakteristika.....</b>	<b>11</b>
1.1. Neurozánět.....	11
1.2. Neurogliální buňky .....	12
1.2.1. Rozdělení neurogliálních buněk .....	14
1.3. Neuroimunitní odpověď .....	18
1.3.1. Cytokiny – obecná charakteristika.....	18
1.3.2. Prozánětlivé cytokiny.....	20
1.3.2.1. IL-1 .....	20
1.3.2.2. IL-6.....	21
1.3.2.3. TNF- $\alpha$ .....	21
1.3.2.4. INF- $\gamma$ .....	21
1.3.2.5. PGE <sub>2</sub> .....	22
1.3.3. Protizánětlivé cytokiny .....	22
1.3.3.1. IL-10.....	23
1.3.3.2. TGF- $\beta$ .....	23
<b>2. Význam neurozánětu u neurodegenerativních onemocnění .....</b>	<b>24</b>
2.1. Alzheimerova choroba.....	24
2.1.1. Hypotéza kaskády A $\beta$ a $\tau$ -proteinu .....	25
2.1.2. Hypotéza neurozánětu.....	26
2.1.3. Hypotéza cholinergního poškození a vlivu oxidačního stresu.....	27
2.1.4. Role glutamatergního systému v rozvoji AD.....	28
2.2. Parkinsonova nemoc.....	29
2.3. Roztroušená skleróza.....	31
2.4. Amyotrofická laterální skleróza .....	33
<b>3. Možnosti léčby neurodegenerativních onemocnění .....</b>	<b>35</b>
3.1. Terapeutické strategie v léčbě AD .....	35
3.2. Léčebné strategie u PD .....	37
3.3. Neuroprotektivní strategie u léčby RS .....	39
3.4. Léčebné strategie u ALS .....	41
3.5. Nově syntetizované látky .....	42
3.5.1. Naftochinony.....	42



3.5.2. Chromony .....	43
<b>4. Cíle práce .....</b>	<b>44</b>
<b>5. Materiál a metodika .....</b>	<b>45</b>
5.1. Buněčné linie .....	45
5.1.1. SIM-A9 .....	45
5.1.2. SH-SY5Y .....	46
5.2. Kultivace.....	46
5.3. Pasážování .....	47
5.4. Počítání buněk .....	48
5.5. Studované látky .....	49
5.6. Stanovení cytotoxicity studovaných látek .....	50
5.6.1. Kolorimetrické stanovení cytotoxicity .....	50
5.6.2. Stanovení maximální tolerovatelné koncentrace .....	51
5.7. Sledování protizánětlivého účinku nově syntetizovaných látek.....	53
5.7.1. Stanovení prozánětlivých účinku pomocí enzymové imunoanalýzy.....	53
5.7.2. Griessova reakce .....	55
5.7.3. Statické zpracování dat .....	57
<b>6. Výsledky .....</b>	<b>58</b>
6.1. Sledování cytotoxicity látek .....	58
6.2. Ověření bezpečnosti studovaných látek v prostředí zánětu.....	59
6.3. Sledování protizánětlivých účinků studovaných látek pomocí buněčné linie SIM-A9 .....	62
6.3.1. Sledování produkce cytokinu IL-6.....	62
6.3.2. Sledování produkce cytokinu TNF- $\alpha$ .....	65
6.3.3. Sledování hladiny NO .....	69
<b>7. Diskuse .....</b>	<b>74</b>
<b>8. Závěr.....</b>	<b>77</b>
<b>9. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>78</b>
<b>10. Seznam obrázků .....</b>	<b>80</b>
<b>11. Seznam tabulek .....</b>	<b>85</b>
<b>12. Seznam použité literatury .....</b>	<b>86</b>

## Úvod

Neurodegenerativní onemocnění představují ze zdravotního i sociálně-ekonomického hlediska jedny z nejzávažnějších chorob. Jsou charakterizována progresivní dysfunkcí a ztrátou neuronů v různých částech CNS a s tím souvisejícími příznaky. Jednotlivé nemoci jsou ve svých klinických projevech a složitou etiopatogenézí značně rozdílné. Přesto společně sdílí několik základních patofyziologických procesů spojených s neuronálním poškozením, mezi něž se řadí také neurozánět. (Dugger a Dickson 2017; Erkinen et al. 2018) Neurozánět bývá jednou z hlavních příčin rozvoje nebo zhoršení onemocnění, jako je Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD), roztroušená skleróza (RS) nebo amyotrofická laterální skleróza (ALS). (Chen et al. 2016) V současné době neexistuje léčba, která by daná onemocnění kauzálně ovlivňovala. Dostupné jsou pouze léky zabraňující nebo zlepšující symptomy. Cílem výzkumu je proto neustálé hledání nových terapeutických možností. Protizánětlivé léky by mohly představovat jednu z možných cest ovlivnění neurodegenerativních chorob.

Experimentální část práce je zaměřena na metody *in vitro* testování nově syntetizovaných látek ze skupiny naftochinonů a chromonů. Pro experimenty byly použity buněčné linie SIM-A9 a SH-SY5Y, u nichž byl rovněž popsán proces kultivace, pasážování, počítání buněk. Na zmíněných buněčných liniích byla stanovena cytotoxicita zkoumaných sloučenin pomocí MTT testu. Pro další testování sloužila pouze linie SIM-A9. Na této linii byla testována protizánětlivá aktivita nově syntetizovaných látek.

## 1. Zánět – stručná charakteristika

Pojem zánět představuje odpověď imunitního systému, jež nastává při reakci organismu na poškození tkáně. Tato odpověď vede k odstranění nežádoucích podnětů a je zahájen proces reparace. (Chen et al. 2017) Jedná se o životně důležitý obranný mechanismus přispívající k ochraně a obnovení homeostázy tkáně. (Medzhitov 2008) Nekontrolovaný akutní zánět však může přejít v zánět chronický. Může se tak stát rizikovým faktorem pro řadu chronických zánětlivých onemocnění. (Chen et al. 2017)

Podněty, které mohou stimulovat zánět, zahrnují mikroorganismy, chemické faktory (např. toxiny či dráždivé látky), fyzikální faktory (např. ionizující záření, zranění, popáleniny, omrzliny, cizí tělesa), dále nevhodné imunologické reakce. (Chen et al. 2017).

Na úrovni tkáně je zánět charakterizován příznaky, jako jsou zarudnutí (*rubor*), otok (*tumor*), teplo (*calor*), bolest (*dolor*) a nesprávná funkce tkáně (*funccio laesa*). *Funccio laesa* může představovat útlum nebo také o zvýšenou funkci tkáně projevující se např. hypersekrecí hlenu. Jako celek jsou tyto příznaky výsledkem lokální imunitní, vaskulární a tkáňové odpovědi na poranění nebo jiné poškození. Mezi důležité mikrocirkulační události, jež se vyskytnou během zánětlivého procesu, patří změny vaskulární permeability, zvýšené množství a následná akumulace leukocytů a uvolňování různých mediátorů. (Chen et al. 2017)

### 1.1. Neurozánět

Z historického hlediska byl vždy centrální nervový systém (CNS) ve srovnání s jinými periferními tkáněmi považován za imunologicky „klidný“ orgán. Homeostáza v CNS silně závisí na rovnováze vrozené imunity. Důkazy z předchozích desetiletí na druhou stranu naznačují, že deregulovaná vrozená imunita vůči CNS je jedním z klíčových faktorů, které se podílí na vzniku a progresi široké škály neurologických onemocnění. K rozuzlení vztahů mezi imunitním systémem a CNS bylo proto vyvinuto značné úsilí. Důvodem je fakt, že vědecké poznatky stran patogeneze neurologických onemocnění by mohly významně podpořit včasnou diagnostiku a nové terapie. (Yang a Zhou 2019)

Neurozánět může být lokalizován v CNS, ale také v periferním nervovém systému (PNS). (Matsuda et al. 2019) Je charakterizován řadou buněčných a molekulárních změn. Jeho hlavní úlohou je obnova porušené homeostázy v nervové tkáni a také její ochrana. Může se jednat např. o omezení infekce a eliminaci patogenů, různých buněčných zbytků a nesprávně složených proteinů. Neurozánět doprovází všechna neurologická onemocnění, včetně vývojových, traumatických, ischemických, zánětlivých, metabolických, infekčních, toxických, neoplastických nebo neurodegenerativních. Zánětlivá reakce v CNS je navíc ovlivňována dalšími procesy, např. stárnutím, systémovou infekcí nebo metabolickým syndromem. Nelze ji však vnímat pouze z čistě patologického hlediska. Mechanismy připomínající neurozánět se rozvíjí také během zdravého vývoje CNS. Jako příklad lze uvést zapojení složek komplementu a mikroglíí do tvorby synapsí. (DiSabato et al. 2016; Ransohoff et al. 2015)

Hlavní reaktivní složky CNS tvoří mozkové buňky nazývané neuroglie. Mikroglie jako podtyp gliálních buněk jsou adaptivní buňky imunitního systému infiltrující mozek a míchu. Na zprostředkování zánětu se podílí také cytokiny, chemokiny, reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) a různé sekundární poslové. (Milatovic et al. 2017) Mediátory zánětu jsou produkovány rovněž dalšími rezidentními buňkami CNS (neurony a ostatními typy neuroglíí), buňkami endotelu a periferními imunitními buňkami. Je pozoruhodné, že všechny buňky CNS mají schopnost přispívat k zánětlivému procesu. Neurozánětlivé reakce přináší řadu imunitních, biochemických, fyziologických a psychologických důsledků. (DiSabato et al. 2016; Ransohoff et al. 2015; Milatovic et al. 2017)

## **1.2. Neurogliální buňky**

Populace lidského mozku zahrnuje více než 200 miliard nervových buněk (neuronů a neuroglíí). Dané buňky tvoří složité sítě propojené 15-20 biliony elektrických a chemických synapsí, jež zajišťují výpočetní výkon mozku. Logistickou podporu tohoto vysoce komplexního orgánu obstarává specifická třída buněk zvaných neuroglie. (Verkhatsky et al. 2019)

Pojem neuroglie zavedl v 50. letech 18. století německý lékař Rudolf Virchow. (Butt a Verkhatsky 2018) Podle Virchowa neuroglie představovaly pojivovou substanci, která

se tvořila v mozku, míše a ve vyšších sensorických nervech jako typ tmelu, v němž jsou zároveň zanořeny prvky nervového systému. (Verkhatsky et al. 2019)

V druhé polovině 19. století významní histologové a patologové zabývající problematikou CNS charakterizovali velmi podrobně buněčnou povahu glií a popsali mnoho typů neurogliových buněk. (Chvátal a Verkhatsky 2018) Řada teorií současně zvažovala funkční roli neuroglií v homeostáze mozku, nutriční podpoře, v procesech spánku a svědomí, ale také v neuropatologii. (Verkhatsky et al. 2019)

Glie představují rozmanitou populaci buněk. Mají zastoupení v CNS, PNS, autonomním nebo enterickém nervovém systému. (Verkhatsky et al. 2019) Definice neuroglie je založena na sjednocující základní funkci těchto buněk, kterou je bez ohledu na jejich původ homeostáza nervového systému. Jedná se o funkci zásadní jak pro fyziologický kontext, kdy buňky plní své běžné „úklidové“ povinnosti, tak pro patologický kontext, kdy mohou gliové buňky podstoupit reaktivní remodelaci za účelem zachování, opravy a obnovení fyziologického stavu. Selhání homeostatické funkce má za následek poškození nervové tkáně a rozvoj neurologického onemocnění. (Verkhatsky et al. 2019; Jäkel a Dimou 2017)

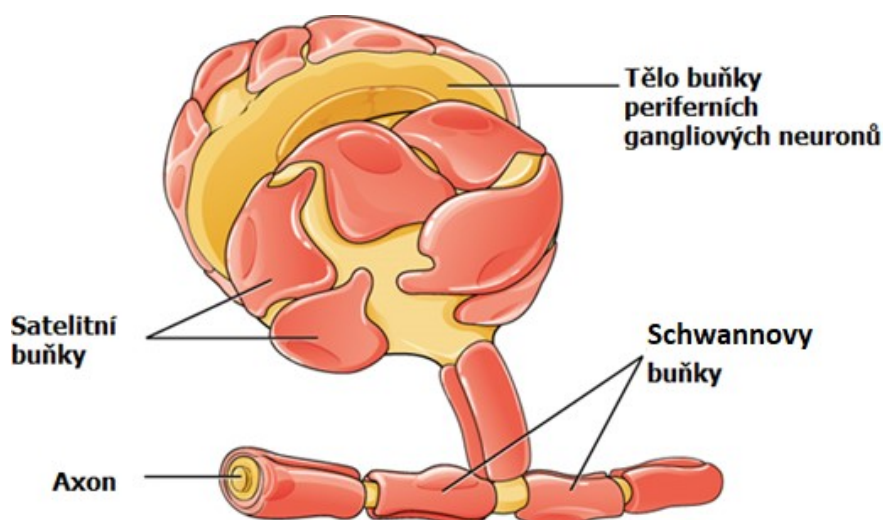
V tomto ohledu se neuroglie staly konečnými podpůrnými buňkami nervového systému, jež ho udržují ve funkčním stavu. Jejich nenahraditelná funkce se odráží ve vývoji nervového systému. Správný fyziologický vývoj umožnil jednotlivým podtypům buněk vykonávat specifické funkce. (Verkhatsky a Nedergaard 2016) Neurogliální opora zasahuje do všech úrovní organizace nervového systému. Na molekulární úrovni vykonávají neuroglie kontrolu nad homeostázou iontů, včetně pH, neurotransmiterů (NT), metabolitů, ROS a RNS. Na buněčné úrovni se astrocyty podílí na neurogenezi. Astrocyty a mikroglie se zapojují na úrovni nervové sítě k regulaci vzniku, zrání a zániku synapsí. Nervová síť je dále udržována myelinizujícími oligodendrocyty a Schwannovými buňkami, zajišťujícími interneuronální konektivitu. Na orgánové úrovni kontrolují astrocyty hematoencefalickou bariéru (BBB), lymfatický tok a upravují funkční hyperémii. Z pohledu systémové úrovně vystupují neuroglie jako centrální chemoreceptory a přispívají k systémové kontrole ventilace, energetického metabolismu a iontové rovnováhy. (Verkhatsky et al. 2019; Attwell et al. 2010; Kettenmann et al. 2013; Tremblay et al. 2011; Peng et al. 2014) Patologické poranění nebo stres z okolního prostředí zahájí gliovou homeostatickou reakci a reaktivitu, při

nichž dochází k remodelaci neuroglií s cílem obrany nervového systému. Neurogliální reaktivita se projevuje astrogliózou, tzn. zvýšením množství aktivních astrocytů v poškozené tkáni, dále dochází k aktivaci mikroglií a u oligodendrocytů k Wallerianské degeneraci. (Verkhatsky et al. 2019; Peng et al. 2014) U mnoha neurologických onemocněních, u kterých byla dále pozorována např. gliová astenie a atrofie, byl usnadněn patologický vývoj nemoci prostřednictvím ztráty nebo snížení homeostatických a obranných schopností. Obecně lze konstatovat, že homeostatická část nervového systému (neuroglie) přirozeně představují základní prvek přispívající ke vzniku, vývoji a následkům neurologických poruch. (Peng et al. 2014)

### **1.2.1. Rozdělení neurogliálních buněk**

Na základě lokalizace neurogliových buněk je možné rozdělení na neuroglie přítomné v PNS a CNS. Neuroglie PNS pochází podobně jako periferní neurony z neurální lišty, což je populace buněk vzniklá odškrcením nervové trubice od zbylého ektodermu a jsou dále klasifikovány. (Verkhatsky et al. 2019) K neurogliím PNS patří různé typy buněk, a to:

1. Schwannovy buňky, které jsou spojené se senzoryckými, motorickými, synaptickými a parasypatickými axony. Schwannovy buňky se dále dělí na tři podtypy. Myelinizující buňky, které se podílí na myelinizaci periferních axonů. Nemyelinizující buňky obklopují více nemyelinizovaných axonů. A nakonec perisynaptické buňky udržují homeostázu v perisynaptickém prostředí. Tyto buňky obklopují periferní synapse (obrázek 1). (Kidd et al. 2013; Verkhatsky et al. 2019)
2. Satelitní buňky obklopují neurony v sympatických, parasypatických a senzoryckých gangliích. Satelitní gliové buňky řídí místní homeostatické procesy a mají schopnost reaktivní remodelace v neuropatologii (obrázek 1). (Hanani 2005)

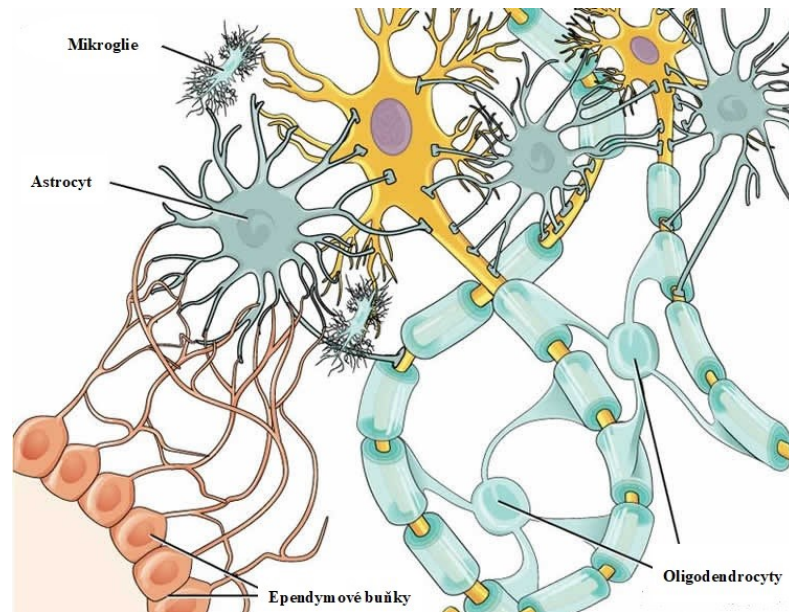


**Obrázek 1** Glie zastoupené v PNS – Schwannovy a satelitní buňky. Převzato a přeloženo z <https://www.technologynetworks.com/neuroscience/news/schwann-cell-discovery-rewrites-the-textbook-on-the-peripheral-nervous-system-321505>.

3. Čichové obalující buňky jsou součástí čichového systému, jež je kombinací periferní a centrální nervové tkáně. Tyto buňky obklopují značnou část nemyelinovaných axonů čichových buněk. Sdílí vlastnosti s gliemi PNS i CNS a podílí se na axonálním růstu do prostředí CNS čichového bulbu. Předpokládá se také jejich vliv na regeneraci čichových axonů. (Ruitenberga et al. 2006; Barnett 2004)
4. Glie zastoupené v enterickém nervovém systému se v této anatomické oblasti podílí, podobně jako v jiných částech nervového systému, na udržení homeostázy. (Grubišić a Gulbransen 2017)

Neuroglie CNS (obrázek 2) se dělí na makroglie (astrocyty, oligodendrocyty, polydendrocyty) původem ektodermálního a mikroglie původem mezodermálního.

Kromě makroglíí a mikroglíí jsou v CNS přítomny také ependymocyty. Jedná se o epitelialní buňky, které lemují komorové dutiny mozku a míchy. Hlavní úloha ependymocytů spočívá ve vytváření bariéry mezi komorovou mozkomíšní tekutinou a mozkovým parenchymem. (Vidovic et al. 2018)



**Obrázek 2** Zobrazení zástupců neurogliálních buněk a ependymocytů. Převzato a přeloženo z <https://neurosciencenews.com/glia-cells-schizophrenia-7139/>.

K nejčastěji zastoupeným neurogliím CNS patří:

1. Astrocyty nebo také astroglie jsou heterogenní populací sídlící v celé oblasti mozku a míchy, v šedé i bílé hmotě. (Verkhratsky et al. 2018) Je pro ně charakteristický hvězdicovitý tvar. (Ludwig a M Das 2021) Mezi astrocyty patří protoplazmatické astrocyty šedé hmoty, vláknité astrocyty bílé hmoty, povrchově spojené astrocyty navazující na kortikální povrch v zadní prefrontální a amygdaloidní kůře, Velátové astrocyty lokalizované v čichové vrstvě nebo *stratum granulosum* mozečku a radiální glie jako prekurzory pluripotentních nervových buněk, jež u savců obvykle mizí po narození. (Verkhratsky et al. 2018) Astrocyty vykonávají klíčové funkce, jako je strukturální integrita BBB, metabolická podpora neuronů, tvorba, údržba a eliminace synapsí, recyklace iontů a NT. (Farhy-Tselnicker a Allen 2018) BBB tvoří výběžky astrocytů společně s endoteliálními buňkami a pericyty. Díky tvorbě a údržbě BBB nedochází k vniknutí toxických látek do CNS a její infiltraci imunitními buňkami. (Liddelw a Barres 2017) Astrocyty se rovněž mohou podílet na imunitní odpovědi mozku na základě mnohých společných vlastností s mikroglialními buňkami, včetně funkčních receptorů pro zánětlivé stimuly. Mají také zachovanou schopnost produkovat různé cytokiny, ROS a další imunitní mediátory. (Eisenkraft et al. 2013)



2. Oligodendrocyty jsou kulaté buňky s dlouhými výběžky, které obalují axony a chrání je vytvořením tzv. myelinového obalu. Oligodendrocyty jsou schopny tvorby myelinového pochvy kolem několika sousedních axonů současně. Tyto buňky hrají zásadní roli v homeostáze, imunitní regulaci a neurotransmisí, kde společně s astrocyty regulují optimální rychlost přenosu informace mezi neurony a gliovými buňkami navzájem prostřednictvím regulace myelinového pláště. Oligodendrocyty jsou velmi citlivé na zánětlivou dysregulaci cytokinů, při níž může docházet ke ztrátě oligodendrocytů a k demyelinizaci. (Haroon et al. 2017)
  
3. Polydendrocyty (N2G glie) jsou rezidentní buňky CNS rovnoměrně zastoupené v šedé i bílé hmotě. Jsou morfologicky i funkčně odlišné od astrocytů, oligodendrocytů, mikroglíí a představují čtvrtý typ neuroglíí v CNS. N2G glie navíc trvale prochází buněčným dělením v CNS dospělých a účastní se procesu remyelinizace. Jejich primární rolí je tvorba oligodendrocytů a tím i procesu myelinizace, proto se také běžně označují jako prekurzorové buňky oligodendrocytů. Odlišují se však expresí proteoglykanu N2G na buněčném povrchu. V případě poškození myelinu dochází k jejich cílené migraci a diferenciaci. Diferenciace buněk N2G a tvorba myelinu pravděpodobně hrají důležitou roli při zdokonalování nervových sítí během vývoje CNS a případně v nervovém systému dospělých. Byly rovněž popsány další funkce zdánlivě nesouvisející s jejich oligodendrogliogenní funkcí. Mezi ně patří schopnost generovat astrocyty v určitých oblastech CNS. Některé N2G buňky mohou zůstat nadále nediferencovanými N2G gliemi. (Hill a Nishiyama 2014; Zuo a Nishiyama 2013)
  
4. Mikroglie patří mezi mononukleární fagocyty v CNS. Jejich populace činí přibližně 10 % buněk. V průběhu buněčného vývoje mají podíl na formování nervových obvodů pomocí modulace síly synaptických přenosů a tvarování neurálních synapsí. Jsou odpovědné za fagocytózu mikroorganismů, odstranění odumřelých buněk, proteinových agregátů, rozpustných a pevných antigenů, které by mohly ohrozit CNS. Za fyziologických podmínek zůstávají mikroglie v klidovém fenotypu a vykonávají neurotropní aktivity. Pokud dojde k narušení

homeostázy, mikroglie se změny v aktivní fenotypy. (Kim et al. 2016; Zhang a An 2007; Eisenkraft et al. 2013) Produkují velké množství faktorů, jako jsou např. cytokiny, chemoatraktanty, ROS nebo neurotropní faktory. Jakmile jsou toxické podněty odstraněny, mikroglie změny svůj fenotyp na protizánětlivý a začnou vylučovat protizánětlivé cytokiny nebo nervový růstový faktor, jehož úlohou je ukončit imunitní odpověď. (Sánchez-Sarasúa et al. 2020) Při narušení funkcí vykonávanými mikroglie se CNS může stát živnou půdou pro akutní nebo chronické patologické procesy. Mikroglie jsou na základě svých genetických a funkčních znaků zapojeny v patogenezi neurodegenerativních onemocnění. (Colonna a Butovsky 2017)

### **1.3. Neuroimunitní odpověď**

Neurozánětlivé reakce jsou zprostředkovány několika klíčovými prozánětlivými cytokiny. Patří mezi ně interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), dále chemokinové ligandy (CCL2, CCL5, CXCL1). Při neuroimunitní odpovědi sehrávají významnou roli i sekundární poslové (NO a PG, ROS a RNS) nebo prostaglandiny (PG). Mnoho z uvedených mediátorů je produkováno aktivovanými rezidentními buňkami CNS, zahrnující mikroglie a astrocyty. Producenty mohou být mimo jiné i endotelové buňky a perivaskulární makrofágy, které jsou rovněž důležité při interpretaci a šíření těchto zánětlivých signálů v CNS. (DiSabato et al. 2016)

#### **1.3.1. Cytokiny – obecná charakteristika**

Cytokiny jsou multifunkční pleiotropní proteiny (o velikosti přibližně 15-25 kDa). Hrají důležitou roli v buněčné komunikaci a aktivaci. (Szelényi 2001; Kim et al. 2016) Podílejí se nejen na imunitní odpovědi, ale také na různých fyziologických a patofyziologických procesech zahrnující PNS i CNS, kde plní funkci imunoregulátorů a neuromodulátorů. Cytokiny ovlivňující CNS mohou mít dva původy, a to periferní a centrální. Uvedené cytokinové kompartmenty vykazují určitý stupeň integrity. Jejich účinky se mohou vzájemně podporovat nebo inhibovat. (Szelényi 2001)

1. Cytokiny pocházející z periferních imunitních orgánů uvolňují hlavně buňky, jako jsou monocyty, makrofágy a lymfocyty. První identifikovanou oblastí, kterou cytokiny „prochází skrz“ BBB, byly tzv. cirkumventrikulární orgány.

Cirkumventrikulární orgány jsou charakterizované fenestrovaným endotelem, tedy absencí BBB. Fenestrovaným endotelem tak mohou do CNS procházet i periferní molekuly charakteru poměrně velkých cytokinů. Další mechanismus průniku přes BBB je prostřednictvím transportéru. (Kim et al. 2016) Cytokiny, jež se dostávají do CNS z periferie, se nepřímo podílí na stimulaci různých funkcí CNS včetně neuroendokrinních odpovědí, ovlivnění chování, horečky a spánku. Účinky jsou zesíleny v případech, kdy se hladina periferních cytokinů zvyšuje např. při systémovém zánětu. Cytokinová aktivace endoteliálních buněk může vést k uvolnění sekundárních posílů (NO, PG), jež představují nepřímou cestu ovlivňující CNS. (Szelényi 2001)

2. Cytokiny jsou také produkovány rezidentními buňkami CNS. Zdrojem cytokinů mohou být neurony, gliové buňky (mikroglie a astrocyty), případně endotelové buňky BBB. (Szelényi 2001; Opal a DePalo 2000) Cytokiny centrálního původu se mohou účastnit komplexních autonomních, neuroendokrinních, metabolických a behaviorálních procesů. Ovlivňují poznání, učení a paměť. (Szelényi 2001)

Pokud však hodnotíme odlišné patologické procesy v CNS, mohou se hlavní producenti zánětlivých mediátorů lišit. Jako příklad lze uvést traumatické a ischemické poškození nervové tkáně, chronická neurodegenerativní onemocnění nebo akutní infekční onemocnění v podobě encefalitis. (Becher et al. 2017) Traumatické a ischemické poškození aktivuje tkáňovou reakci, která nese mnoho podobných znaků. V obou stavech jsou hlavními producenty gliové buňky (mikroglie a astrocyty). Rezidentní buňky CNS jsou hlavním zdrojem i při chronických neurodegenerativních onemocněních. Zatímco zánětlivých mediátorů je u neurodegenerativních stavů hojně, existuje pouze omezený příspěvek od buněk z periferního kompartmentu. (Becher et al. 2017; Heppner et al. 2015) Naopak klasicky definované neurozánětlivé stavy pozorované při zánětlivém demyelinizačním onemocnění (např. RS) a infekce (bakteriální a virová encefalitida) se vyznačují vysokým zastoupením leukocytů, jež napadají parenchym CNS a dochází k drastické ztrátě integrity BBB. Lymfocyty a myeloidní buňky jsou hlavními aktéry zodpovědnými za poškození tkáně. Produkují cytokiny, které podporují zánětlivou kaskádu. (Becher et al. 2017)

Velmi obecně lze cytokiny klasifikovat v závislosti na tom, zda podporují nebo inhibují zánět, jako prozánětlivé nebo protizánětlivé. Oba typy cytokinů mezi sebou úzce spolupracují a udržují určitou rovnováhu. (Szelényi 2001)

### **1.3.2. Prozánětlivé cytokiny**

Prozánětlivé cytokiny jsou za fyziologických podmínek obvykle udržovány na nízké úrovni. Za patologických podmínek se hladiny těchto cytokinů zvyšují až stonásobně nad fyziologickou hodnotu. Reakce na zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů nemusí nutně poškodit normální tkáň. Primárním důvodem nárůstu je obrana a obnovení integrity nervové tkáň. Tyto normální tkáňové odpovědi mohou zpočátku pomáhat odstraňovat příčiny nežádoucího poškození a podílet se na opravách a regeneraci. Pokud by došlo k prodlouženému vystavení prozánětlivým cytokinům, mohly by se opravné a regenerační mechanismy změnit v nežádoucí, které by podpořily zhoršení onemocnění, případně urychlily degenerativní procesy, což by vedlo k tkáňové dysfunkci. (Kim et al. 2016; Zhang a An 2007)

K významným a nejvíce prozkoumaným prozánětlivým cytokinům je možné zařadit rodinu IL-1 s nejznámějším zástupcem IL-1 $\beta$ , dále IL-6 a TNF- $\alpha$ . Do uvedené skupiny se také řadí IL-2 a INF- $\gamma$ . Prozánětlivé cytokiny aktivují cyklooxygenasu-2 (COX-2), zvyšují hladinu PGE<sub>2</sub>, aktivují zánětlivé buňky a vyvolávají zánětlivé reakce. (Kim et al. 2016; Jeon a Kim 2016)

#### **1.3.2.1. IL-1**

IL-1 reprezentuje dva cytokiny označované IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$ . Jedná se o pluripotentní, prozánětlivé cytokiny, které organizují zánětlivé a hostitelské obranné reakce v těle. IL-1 zvyšuje reakce T-lymfocytů na mitogeny, nepřímo aktivuje B-lymfocyty, zvyšuje expresi molekul vaskulární adheze a indukuje řadu dalších prozánětlivých cytokinů, chemokinů a molekul asociovaných se záněť, které tvoří amplifikační kaskádu stimulující imunitní systém. Výsledným působením je nábor makrofágů, lymfocytů a neutrofilů v boji proti infekci a poškození tkáň. (Basu et al. 2004) Kromě imunitních účinků se předpokládá role IL-1 v CNS jako NT, neuromodulátoru a růstového faktoru. Akutní účinky IL-1 mohou zvýšit vnímání a učení, chronické účinky mohou snížit senzorické funkce, zpomalit učení a způsobit únavu. Nízké hladiny IL-1 mohou

usnadňovat paměťové funkce, naopak vysoké hladiny nebo úplná blokáda signalizace IL-1 mohou paměť zhoršovat. Rovněž byly popsány přímé účinky IL-1 na neuronální excitabilitu. (Liu a Quan 2018) Ovlivňuje také aktivitu hypothalamu jako termoregulačního centra organismu, čímž se významně podílí na zvyšování tělesné teploty. Jedná se tedy o endogenní pyrogen. (Liu et al. 1996)

#### **1.3.2.2. IL-6**

Cytokin IL-6 je silným mediátorem buněčné komunikace a má zásadní význam pro regulaci vrozených a adaptivních zánětlivých odpovědí. Mikroglie produkují IL-6 v reakci na bakteriální LPS a TNF- $\alpha$ . Astrocyty jej vylučují v reakci na velké množství stimulů včetně jiných cytokinů (IL-1) nebo poškození neuronů. (Muñoz-Fernández a Fresno 1998) Ačkoliv je IL-6 široce produkován mnoha rezidentními buňkami CNS, receptor pro buněčnou odpověď mají na svém povrchu pouze mikroglie, zatímco astrocyty, oligodendrocyty, endotelové buňky a neurony zmíněný receptor postrádají. (West et al. 2019) Produkce IL-6 je výrazně zvýšena u mnoha neurozánětlivých onemocnění nebo u traumatického poškození CNS. (West et al. 2019)

#### **1.3.2.3. TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  je produkován mnoha buněčnými typy, např. aktivovanými makrofágy, monocyty, dendritickými buňkami, cytotoxickými T-lymfocyty nebo pomocnými T-lymfocyty (Th<sub>1</sub>). (Sonar a Lal 2015) V CNS je TNF- $\alpha$  produkován neurony i gliovými buňkami (astrocyty a mikroglie). Může být důležitým neuromodulátorem ve vývoji CNS a v procesu reparace. Dále se podílí na mnoha patofyziologických procesech zahrnující demyelinizační a degenerativních onemocnění. (Pan et al. 1997) Molekuly TNF- $\alpha$  hrají ústřední roli při aktivaci, proliferaci, diferenciaci a migraci imunitních buněk do CNS, při intracerebrální imunitní odpovědi a produkci cytokinů. Může působit neurotoxicky nebo neurotroficky prostřednictvím svých účinků na astrocyty, mikroglie, oligodendrocyty a neurony. (Muñoz-Fernández a Fresno 1998) Patří mezi další zástupce ze skupiny endogenních pyrogenů. (Chu 2013)

#### **1.3.2.4. INF- $\gamma$**

Molekulu INF- $\gamma$  představuje homodimerní cytokin produkováný aktivovanými Th<sub>1</sub> buňkami a NK buňkami. Vykazuje řadu imunomodulačních schopností, které se

můžou podílet na neurozánětlivém, antivirovém a antiproliferativním působení, jako např. aktivace makrofágů, adheze leukocytů, indukce MHC antigenů a uvolňování prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$  a IL-1). V CNS je INF- $\gamma$  zodpovědný hlavně za aktivaci neurogliálních buněk (opět astrocytů a mikroglíí) a zvýšení exprese MHC molekul II. třídy. Protože je téměř výhradně produkován aktivovanými T-lymfocyty, účastní se onemocnění CNS zejména autoimunitní etiologie, jež je charakterizována T-buněčnou infiltrací. (Muñoz-Fernández a Fresno 1998)

#### **1.3.2.5. PGE<sub>2</sub>**

Uvedený PG jako produkt cyklooxygenace kyseliny arachidonové uvolněné z membránových fosfolipidů se podílí na regulaci fyziologických funkcí nebo reakci na poškození při neurozánětu. Ačkoliv byl považován za jednoho z možných induktorů u neurodegenerace, může mít i příznivé účinky na CNS. PGE<sub>2</sub> má schopnost aktivovat různé populace neuronů v hypothalamu, jež jsou přímo odpovědné za spuštění základních fyziologických odpovědí během reakce akutní fáze zánětu. Indukce horečky a zvýšení plazmatického uvolňování glukokortikoidů jsou příklady zmíněného fyziologického působení. (Zhang a Rivest 2001) PGE<sub>2</sub> rovněž moduluje expresi zánětlivých mediátorů mikroglíálními buňkami (zjištěna inhibice mikroglíální aktivace indukovaná LPS *in vitro*). Tyto údaje spolu s vlivem PGE<sub>2</sub> na stimulaci produkce prozánětlivých cytokinů podporují koncepci, že může mít v CNS dvojí roli, přičemž pro- a protizánětlivý účinek se projeví v závislosti na účinku v cílových buňkách nebo u poranění. (Lima et al. 2012)

#### **1.3.3. Protizánětlivé cytokiny**

Správná funkce imunitního systému vyžaduje neustálou regulaci, aby byla zajištěna ochrana před cizími agens a tolerance vůči vlastním antigenům. K dosažení imunitní rovnováhy působí několik typů regulačních složek, které omezují imunitní reakce. Mezi tyto složky patří specializované buněčné typy, jako jsou např. regulační T-lymfocyty (T<sub>reg</sub>), které produkují řadu mediátorů důležitých pro udržení rovnováhy během imunitních reakcí. (Batlle a Massagué 2019) Různé neuropeptidy vylučované neurony a dalšími buňkami CNS taktéž chrání neurony před zánětem, což pomáhá zmírnit příznaky neurodegenerativních onemocnění. (Kempuraj et al. 2017) Protizánětlivé cytokiny jsou souborem imunoregulačních molekul, které kontrolují prozánětlivou

cytokinovou odpověď. Mezi hlavní protizánětlivé cytokiny patří antagonisty receptoru pro IL-1, dále IL-4, IL-10 a transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). (Opal a DePalo 2000)

#### **1.3.3.1. IL-10**

IL-10 se řadí k nejdůležitějším protizánětlivým cytokinům. Je produkován zejména  $T_{reg}$  lymfocyty. Inhibuje cytotoxicky a buněčně zprostředkovanou imunitu a procesy podporující záněty. (Neumann et al. 2019) Exprese IL-10 se zvyšuje v průběhu většiny onemocnění CNS. Podporuje přežití neuronů a gliových buněk v mozku blokováním účinků proapoptických cytokinů a podporou exprese signálů pro přežití buněk. IL-10 omezuje zánět v mozku snížením syntézy prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 a IL-6), potlačením exprese cytokinových receptorů nebo jejich inhibicí. U T-buněk infiltrujících CNS indukuje anergii inhibicí buněčné signalizace. (Strle et al. 2001) IL-10 inhibuje také produkci nebo sekreci cytokinů IL-12 a IL-23 potřebných pro diferenciaci T-lymfocytů. (Neumann et al. 2019)

#### **1.3.3.2. TGF- $\beta$**

TGF- $\beta$  produkováný  $T_{reg}$  buňkami je důležitým regulátorem buněčné proliferace, diferenciaci a formace extracelulární matrix. Řídí adaptivní imunitu přímou podporou expanze  $T_{reg}$  buněk a inhibicí funkce T-lymfocytů a antigen prezentujících buněk (APC). Podobně řídí vrozený imunitní systém tím, že inhibuje NK buňky a reguluje chování neutrofilů a makrofágů, čímž vytváří síť negativních imunitních regulačních vstupů. (Batlle a Massagué 2019) Signalizace pomocí TGF- $\beta$  je nezbytná pro správný nervový vývoj, neuroendokrinní působení, modulaci synaptického přenosu a udržení fyziologických funkcí nervového systému během života. Patří k hlavním modulátorům zánětlivé odpovědi a podílí se na degenerativních onemocněních. Hlavními producenty TGF- $\beta$  v CNS jsou neuroglie. (Meyers a Kessler 2017)

## 2. Význam neurozánětu u neurodegenerativních onemocnění

Neurozánět na jedné straně vytváří ochranu a podporuje regeneraci CNS, zatímco na druhé může odrážet aktivitu neurodegenerativních procesů. Chronický zánět vyvolává cytotoxické účinky a zvyšuje závažnost příznaků neurodegenerativního onemocnění. (Kempuraj et al. 2017) Bývá jednou z hlavních příčin rozvoje nebo zhoršení různých neurodegenerativních onemocnění, jako je AD, PD, RS a ALS. (Chen et al. 2016)

### 2.1. Alzheimerova choroba

AD je chronické, progresivní neurodegenerativní onemocnění, které se projevuje ztrátou neuronů v některých částech mozku. Zároveň patří mezi nejběžnější formy demence, která způsobuje pokles kognitivních funkcí zahrnující poruchy paměti, porozumění, uvažování, pozornosti, učení, řečové schopnosti a dále také způsobuje narušení schopnosti vykonávat běžné denní činnosti. (Du et al. 2018; Kumar et al. 2021)

Příznaky AD závisí na fázi onemocnění. Počátečním a nejběžnějším příznakem je epizodická ztráta krátkodobé paměti. V rané fázi onemocnění se dále u pacientů projeví zhoršení schopnosti řešit problémy, zhoršení úsudku, časové orientace, nedostatku motivace a dezorganizace. Následuje jazyková porucha a výkonná funkce celkově klesá. Ve střední až pozdní fázi dochází k zvýraznění poruch paměti, orientace a dále projeví poruchy chování, jako je apatie, agitovanost, psychotické příznaky, poruchy spánku. (Kumar et al. 2021; Korábečný et al. 2020) V průběhu AD dochází k výraznému ovlivnění také fyzických schopností. Pacient postupem času ztrácí pohyblivost, své přirozené dovednosti a není schopen se o sebe sám postarat. Přítomna často bývá inkontinence a pacient zůstává zcela odkázaný na péči rodiny nebo pečovatele. (Korábečný et al. 2020)

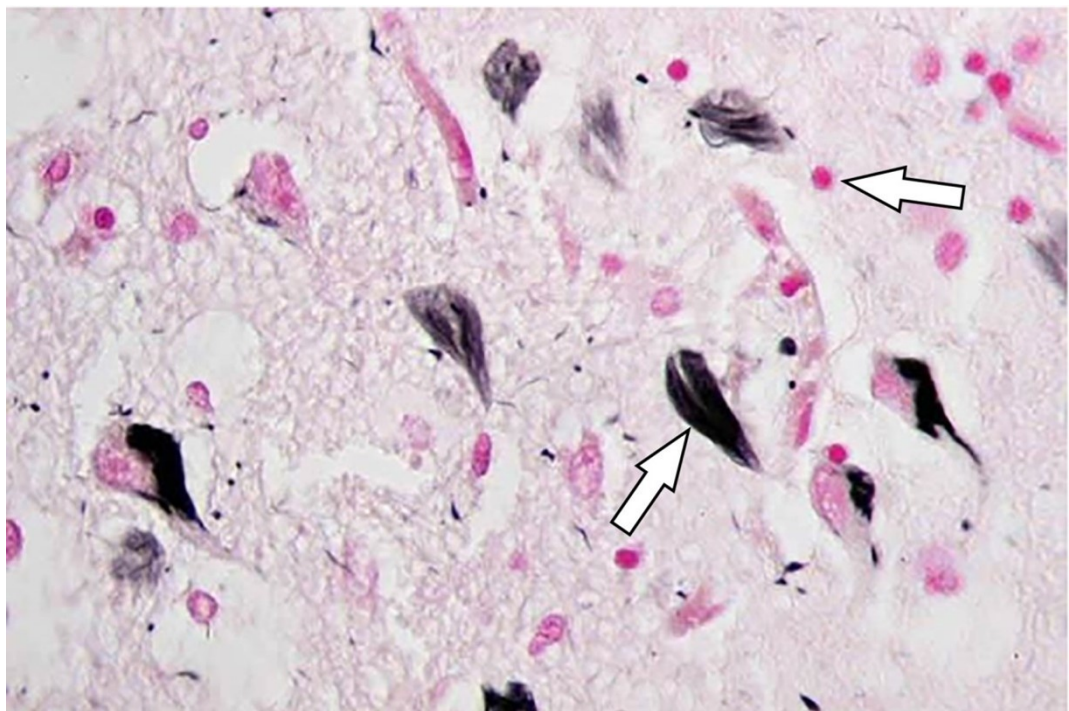
Ačkoliv bylo dosaženo značného pokroku v oblasti poznání patogenetických a patologických pochodů spjatých s AD, přesná příčina vzniku onemocnění není stále objasněna. (Korábečný et al. 2020) Existuje však mnoho hypotéz pomáhajících pochopit příčiny rozvoje AD. Mezi nejznámější patří abnormální ukládání amyloidu  $\beta$  ( $A\beta$ ) v extracelulárních prostorech neuronů a tvorba stočených vláken  $\tau$ -proteinu uvnitř neuronů. Existují však další hypotézy zahrnující např. neurozánět, poškození



cholinergních neuronů, působení oxidačního stresu nebo vliv glutamatergního systému. (Du et al. 2018; Wang a Reddy 2017)

### 2.1.1. Hypotéza kaskády A $\beta$ a $\tau$ -proteinu

Histopatologicky je AD charakterizovaná přítomností dvou hlavních znaků, kterými jsou: intracelulární neurofibrilární klubka (NFT) a extracelulární neuritické plaky (NP) obklopené aktivovanými astrocyty a mikroglie (obrázek 3). (Meraz-Ríos et al. 2013)



**Obrázek 3** Amyloidní plaky (růžová barva) a neurofibrilární klubka (černá barva) v mozku postihnutém AD. Převzato z Zafeiris et al. 2018.

Hlavní složkou NP je A $\beta$ , což je malý fragment o 40-42 aminokyselinách s molekulovou hmotností 4 kDa. (Meraz-Ríos et al. 2013) Prekurzorem A $\beta$  je integrální membránový protein s názvem amyloidní prekurzorový protein (APP). APP může být štěpen cestou neamyloidní a amyloidní membránově vázanými endoproteasami. Za normálních okolností (ve většině případů) se na proteolytickém štěpení APP podílí  $\alpha$ -sekretasa za vzniku fragmentů sAPP $\alpha$  a fragmentu o 83 aminokyselinách (C83). Fragment C83 je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku benigního produktu p3 (tato cesta je označována za neamyloidní). A $\beta$  vzniká za patologických podmínek postupným štěpením APP  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasou (amyloidní cesta).  $\beta$ -sekretasa nejprve štěpí APP na fragment

sAPP $\beta$  a fragment o 99 aminokyselinách (C99). Tento fragment C99 zůstává vázán na membráně a je následně rychle štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku malých peptidů označovaných jako A $\beta$  a intracelulární C-terminální domény. (Murphy a LeVine 2010) Poté A $\beta$  oligomerizuje a difunduje do synaptických štěrbin, kde interferuje se synaptickou signalizací. Následně dochází k jeho polymerizaci do nerozpustných amyloidních fibril a jejich aglomeraci za vzniku NP. (Korábečný et al. 2020)

A $\beta$  podporuje zánětlivou reakci zprostředkovanou mikroglie a astrocyty, čímž aktivuje signální dráhy, které by mohly vést k neurodegeneraci. Akumulace A $\beta$  v parenchymu a cévách způsobuje migraci mikroglíí a podporuje akutní a chronické zánětlivé reakce proti agregátům, čímž indukuje produkci NO, ROS, prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6) a PG (např. PGE<sub>2</sub>), které by nakonec mohly podporovat smrt neuronů. (Meraz-Ríos et al. 2013)

Polymerizace A $\beta$  vede k aktivaci kinas, což má za následek hyperfosforylaci  $\tau$ -proteinu asociovaného s mikrotubuly, jež za fyziologických podmínek stabilizuje cytoskeletární lešení neuronů, a jeho následnou polymerizaci na nerozpustné NFT. (Tiwari et al. 2019; Meraz-Ríos et al. 2013; Avila et al. 2004) NFT se tedy skládají ze spárovaných spirálových vláken zkráceného abnormálně hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu. (Meraz-Ríos et al. 2013) Tato intracelulární depozita NFT mohou mít za následek narušení struktury buňky a tím i později smrt buňky. (Korábečný et al. 2020)

Vznik NP a NFT podporuje migraci a aktivaci mikroglíí, což vede k zánětlivé reakci přispívající k neurotoxicitě. (Tiwari et al. 2019)

### **2.1.2. Hypotéza neurozánětu**

V současné době existují prokazatelné důkazy dokládající patofyziologický význam neurozánětu u AD. (Korábečný et al. 2020) První důkaz vyplývá ze skutečnosti, že zesílené zánětlivé mechanismy jsou lokalizovány v místech typických pro patologii AD (v limbické a frontální části mozku). V oblastech méně charakteristických pro rozvoj AD je výskyt prozánětlivých ukazatelů minimální, např. v mozečku. Na mikroskopické úrovni jsou zánětlivé mediátory nejvíce exprimovány v blízkosti depozit A $\beta$  a NFT. (Akiyama et al. 2000) U pacientů s AD byl prokázán vyšší výskyt prozánětlivých markerů ve srovnání se zdravými subjekty stejné věkové kategorie. (Korábečný et al. 2020)

Několik klinických studií naznačuje, že konvenční protizánětlivé léky mohou oddálit nástup nebo zpomalit progresi AD. (Akiyama et al. 2000) Přes množství a průkaznost uvedených faktů není zcela vyjasněno, zda je neurozánět ústředním dějem patofyziologie AD nebo jeho důsledkem. (Korábečný et al. 2020) Významné postavení v neurozánětu asociovaném s AD má zvýšená exprese a sekrece IL-1, jež vystupuje jako iniciační faktor ve vztazích mezi aktivovanými mikroglie, astrocyty, stresovanými neurony, NP a NFT (Korábečný et al. 2020) IL-1 přímo zasahuje do molekulárních aspektů zpracování APP v neuronech (podporuje tvorbu a progresi NP) a fosforylace  $\tau$ -proteinu (podporuje hyperfosforylaci a tím tvorbu NFT), ovlivňuje produkci a aktivitu acetylcholinesterasy (AChE; zvýšená produkce a aktivita AChE snižuje aktivitu cholinergního systému), zvyšuje produkci syntasy NO a aktivuje astrocyty. Uvedené procesy vedou k neuronálnímu stresu, dysfunkci až smrti buněk, což dále zvyšuje aktivaci mikroglie a stimuluje další expresi IL-1. Výsledkem působení jmenovaných mechanismů je úbytek kognitivních funkcí a demence. (Griffin 2006)

### **2.1.3. Hypotéza cholinergního poškození a vlivu oxidačního stresu**

Acetylcholin (ACh) je důležitý NT cholinergních neuronů podílející se na kritických fyziologických procesech, jako je pozornost, učení, paměť, reakce na stres, bdělost a spánek, přenos informací ze smyslových orgánů. Poškození cholinergních neuronů bylo považováno za kritickou patologickou změnu, jež vykazovala korelaci s kognitivní poruchou u AD. Toto zjištění vedlo k formulaci cholinergní hypotézy a následnému zavedení inhibitorů cholinesteras (ChEI) při léčbě AD. (Du et al. 2018)

V patogenezi AD může hrát roli také oxidační stres, který je možné definovat jako porušení rovnováhy mezi tvorbou volných radikálů (ROS, RNS) a antioxidační schopností organismu. (Korábečný et al. 2020) Mozek využívá více kyslíku než jiné tkáně a podrobuje se mitochondriálnímu dýchání, což zvyšuje potenciál expozice volným radikálům. Ve skutečnosti je AD spojena s buněčným oxidačním stresem včetně zvýšené oxidace a nitrace proteinů, glykoxidace a lipidové peroxidace. Kromě toho může dojít k mitochondriální dysfunkci a ke zvýšení hladiny ROS v oblastech mozku, kde jsou kumulované A $\beta$ . S progresí AD také koreluje snížení hladin různých antioxidačních mechanismů, včetně superoxid dismutasy (SOD) a hladiny glutationu. Využití antioxidačních sloučenin by teoreticky poskytlo ochranu před oxidačním stresem

a toxicitou A $\beta$ , ale nejedná se pouze o jediný možný rys AD, proto byla antioxidační strategie zpochybněna. (Du et al. 2018; Habtemariam 2019)

#### **2.1.4. Role glutamatergního systému v rozvoji AD**

Glutamát (Glu) představuje nejhojněji se vyskytující excitační NT v CNS. Převážná většina excitační neurotransmise je zprostředkována Glu a jeho receptory zejména ionotropní glutamátové receptory (iGluRs) a dále metabotropními receptory. (Wang a Reddy 2017; Hynd et al. 2004) Pro iGluRs je charakteristická jejich selektivní afinita ke specifickým agonistům, mezi které patří N-methyl-D-aspartát (NMDA), kyselina  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoazol-4-propionová (AMPA) a kyselina kainová (KA). (Hynd et al. 2004)

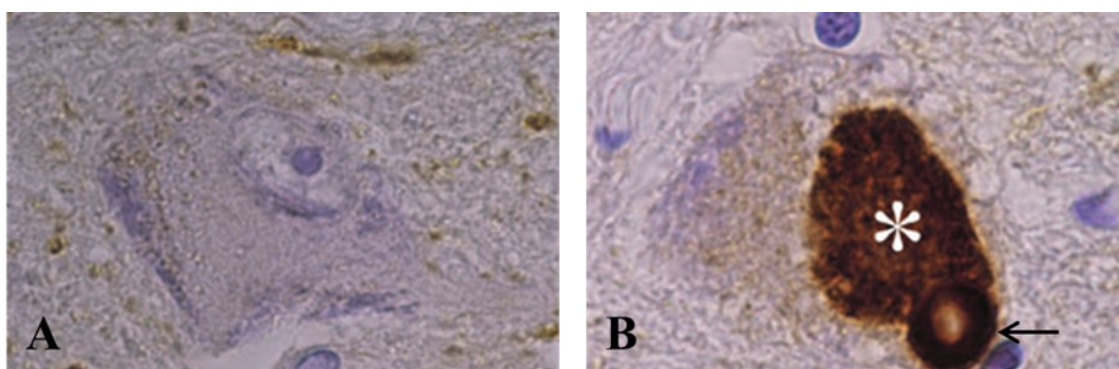
NMDA receptor (NMDAR) představuje hlavní podskupinu iGluRs a je lokalizovaný na postsynaptické membráně excitačních synapsí. (Hynd et al. 2004; Wang a Reddy 2017) NMDAR je aktivován endogenním Glu a glycinem. Pro aktivaci NMDAR je nutné navázání obou NT současně. (Hynd et al. 2004) Aktivace NMDAR vyžaduje jak uvolňování Glu z presynaptických zakončeních, tak dostatečnou depolarizaci postsynaptické membrány. Touto aktivací je umožněn tok vápenatých iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ) z extracelulárního prostoru do neuronů. (Gu a Wang 2018) Tyto receptory plní zásadní roli v řízení postsynaptických aktivit, čímž se podílí na synaptické plasticitě mozku, jakožto základním molekulárním mechanismem učení a paměti. (Gu a Wang 2018; Wang a Reddy 2017)

Při nadměrné stimulaci glutamatergní signalizace dochází k excitotoxicitě, díky níž mohou být nervové buňky poškozeny nebo usmrceny. Taktéž nedostatečná synaptická signalizace NMDAR ohrožuje přežití nervových buněk. Mnoho studií naznačuje, že glutamátová excitotoxicita může mít vliv na pomalu se vyvíjejí neurodegeneraci. (Wang a Reddy 2017) Proto přísná fyziologická regulace glutamatergní neurotransmise hraje významnou roli pro udržení optimálních neuronových funkcí. U AD je však tato regulace narušena. Výsledkem dysregulace je toxické působení Glu jako excitační aminokyseliny. Za patologických podmínek jsou nadměrně aktivovány iGluRs zejména NMDRs. Zmíněná aktivace může být způsobena nadměrným uvolňováním Glu nebo také poruchou jeho zpětného vychytávání. NMDARs vykazují vyšší permeabilitu pro  $\text{Ca}^{2+}$  než

receptory AMPA a KA a mohou vyvolat intracelulární přetížení  $\text{Ca}^{2+}$ , což může zahájit degenerativní kaskády vedoucí až k apoptóze buňky. (Hynd et al. 2004; Korábečný et al. 2020)

## 2.2. Parkinsonova nemoc

PD je komplexní multisystémové onemocnění neznámé etiologie s více patologickými rysy a širokou škálou příznaků ovlivňující celý organismus. (Barnum a Tansey 2012) Ve zjednodušeném pohledu se jedná o druhé nejčastější progresivní neurodegenerativní onemocnění u lidí ve středním nebo vyšším věku. Klinicky je PD charakterizována degenerací a ztrátou dopaminergních neuronů v extrapyramidové dráze středního mozku a gliózou spojenou s tvorbou Lewyho tělísek (LB). (Yan et al. 2018) Při PD dochází také k akumulaci  $\alpha$ -synukleinových proteinů ( $\alpha$ -Syn), které jsou hlavní složkou LB (obrázek 4) v CNS, PNS a autonomním nervovém systému.  $\alpha$ -Syn je protein, který se skládá z 140 aminokyselin, dále je charakterizovaný třemi částmi, a to karboxylového konce (96-140), oblasti tzv. non-amyloid- $\beta$  component (61-95) a amino konce (1-60), který sehrává významnou úlohu v agregaci  $\alpha$ -Syn. Jedná se o rozpustný protein, který je distribuován v neuronech a také ve velké míře v presynaptických zakončeních CNS. (Yan et al. 2018; Rivers et al. 2008) Tyto procesy výsledně vedou ke vzniku konkrétního motorického deficitu. (Barnum a Tansey 2012; Capriotti a Terzakis 2016)



**Obrázek 4** Imunohistochemické zobrazení  $\alpha$ -Syn a Lewyho tělísky v neuronu. (A) Normální neuron bez přítomnosti  $\alpha$ -Syn v cytoplazmě. (B) Neuron obsahující abnormální agregát  $\alpha$ -Syn tvořen tzv. „včasným“ Lewyho tělískem (označen hvězdičkou) a vlastní Lewyho tělískem (označen hvězdičkou) a vlastní Lewyho tělískem (označeno šipkou). Převzato a přeloženo z Wakabayashi et al. 2007.

Extrapyramidový systém za fyziologických podmínek moduluje dobrovolné pohyby, řídí držení těla a koordinaci chůze. Dále ovlivňuje autonomní činnost a řízení pohybů včetně obvyklých úkonů. Degenerace neuronů, které uvolňují dopamin (DA), způsobuje nerovnováhu excitačních (ACh) a inhibičních (DA) NT v dané oblasti. Tato nerovnováha někdy způsobuje nadměrné nekontrolovatelné pohyby nazývané dyskineze, a nedostatek pohybu projevující se např. zmrazením chůze. (Capriotti a Terzakis 2016)

Hlavní hypotéza o progresi PD zahrnuje neurozánět jako základní složku. Předpokládá se, že patologie PD začíná na periférii (enterický plexus), která funguje jako cesta do CNS. (Barnum a Tansey 2012) Tato hypotéza rozděluje PD do několika stupňů dle mechanismu a s tím souvisejícími příznaky, a to:

1. stupeň PD začíná ve střevech, o čemž svědčí velké množství případů, u nichž první příznaky začínají zácpou. Zánětlivá reakce ve střevě může hrát roli při agregaci a nesprávném skládání  $\alpha$ -Syn, což je charakteristické pro PD. Ve střevě existuje rovnováha mezi prospěšnými a nežádoucími bakteriemi. Dysbióza těchto „dobrých“ a „špatných“ bakterií může způsobit ve střevě léze a vytvořit zánětlivou reakci, která se může podílet na nesprávném skládání a přenosu  $\alpha$ -Syn přes neurony, čímž se protein dostává do CNS.
2. stupeň vysvětluje citlivost mozkového kmene na zánět, který se dále projevuje jako poruchy spánku a deprese.
3. stupeň hypotézy zahrnuje zánět postihující buňky produkující DA v *substantia nigra* a začíná charakteristickým motorickým deficitem PD.
4. a poslední stupeň hypotézy PD zahrnuje deficity způsobené zánětem v klíčových oblastech CNS, které regulují výkonnou funkci a paměť. (Barnum a Tansey 2012)

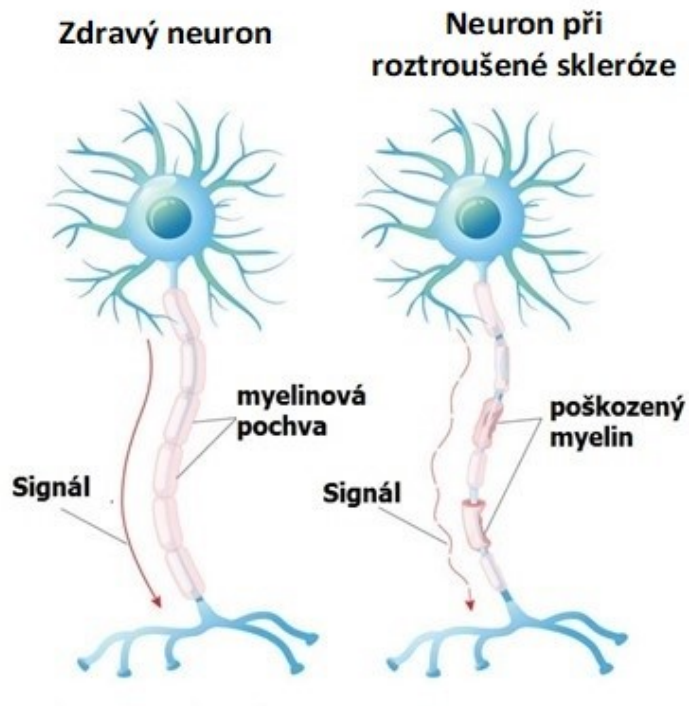
Jak PD postupuje do pozdějších fází, začnou se objevovat závažnější problémy. U podstatné části pacientů s PD bylo pozorováno kognitivní poškození a psychózy. Důležitou strukturou pro poznání je hipokampus. Zde hraje důležitou roli při učení IL-1. Mikroglie jsou bohatým zdrojem IL-1 v hipokampu a jsou rozhodující pro učení, naopak vysoké hladiny IL-1 indukující kognitivní deficity mohou pocházet z „napadení“

nervové tkáni makrofágy. (Barnum a Tansey 2012) Kromě toho byla ve středním mozku pacientů s PD biochemickou analýzou objevena poměrně vysoká hladina dalších prozánětlivých cytokinů, a to TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IFN- $\gamma$ . (Wang et al. 2015)

### **2.3. Roztroušená skleróza**

Nejčastějším invalidizujícím chronickým neurologickým onemocněním mladých dospělých je RS. Pro RS je charakteristický zánět, demyelinizace a neurodegenerace, které přispívají k běžným příznakům kognitivních deficitů, slabosti končetin a únavy. (Zindler a Zipp 2010) V patogenezi, která není zcela objasněna, sehrává klíčovou roli autoimunitní reakce. Aktivace autoimunitních procesů je závislá jak na genetické dispozici jedince, tak na různých spouštěcích faktorech zevního prostředí. Kromě autoimunitní odpovědi organismu sehrávají určitou roli v patogenezi RS také neurodegenerativní pochody. (DeAngelis a Lublin 2008)

První léze, které vznikají při rozvoji RS, jsou charakterizované fokální infiltrací lymfocyty, monocyty a dalšími imunitními buňkami, a to zejména CD4+ a CD8+ T-buňkami. Fokální léze jsou od normálně myelinizované tkáni odděleny poměrně ostrou hranicí. Postupně dochází k poškození BBB a k různým stupňům demyelinizace (obrázek 5), následně remyelinizace nebo axonální ztrátě. Výskyt lézí je nejčastější v bílé hmotě mozku. Existují však důkazy, které naznačují, že šedá hmota mozku by mohla být také postižena. (Naegele a Martin 2014; Zapletalová 2009) Remyelinizace je důležitým reparačním mechanismem a je možné ho pozorovat již v časných fázích onemocnění. V lézích je pozorována zvýšená přítomnost oligodendrocytů, které se podílí na tvorbě nového myelinu. U některých lézí dochází k úplné obnově myelinu. Je zde však nutné zmínit, že nově vznikající myelin je podstatně tenčí v porovnání s myelinem původním. (Stadelmann a Brück 2008)



**Obrázek 5** Schematické znázornění poškození myelinových obalů nervů při RS. Převzato a přeloženo z <https://www.beaumont.org/conditions/multiple-sclerosis>.

Významnou roli v patogenezi RS sehrává zánět. Proces zánětu u RS je podporován několika zánětlivými cytokiny produkovanými samotnými imunitními buňkami např. výše zmíněnými lymfocyty, dále makrofágy a rezidentními buňkami CNS, jako jsou aktivované mikroglie. Následné zánětlivé procesy zahrnují migraci lymfocytů a plazmatických buněk, které syntetizují protilátky proti myelinovému obalu. Aktivované makrofágy a mikroglie jsou přítomny v oblastech CNS i mimo postižené léze, což přispívá k rozšiřování neurozánětu v dosud nepostižených tkáních CNS. (Zindler a Zipp 2010) Zánětlivá ložiska a léze se při RS rozvíjejí ve třech krocích. V první fázi dochází k autoreaktivní aktivaci CD4<sup>+</sup> T-buněk na periférii a jejich přesunu přes BBB do CNS. V další fázi dochází k uvolnění různých cytokinů z CD4<sup>+</sup> T-buněk a založení zánětlivého ložiska. V poslední fázi jsou v zánětlivém prostředí aktivované efektorové mechanismy, které zprostředkovávají poškození myelinu, oligodendrocytů a axonů, což vede k neurologickému poškození. Paralelně dochází k aktivaci procesů, které působí protizánětlivě, dochází k inicializaci opravy, která vede alespoň k částečné remyelinizaci. (Naegelé a Martin 2014) Souběžně se zánětlivou demyelinizací dochází v rané fázi onemocnění k axonální patologii, která koreluje s počtem infiltrujících



imunitních buněk a rozhodujícím způsobem přispívá k závažnosti choroby. (Zindler a Zipp 2010)

## 2.4. Amyotrofická laterální skleróza

ALS je neurodegenerativní onemocnění postihující hlavně, ale ne výhradně, motorické neurony nacházející se v míše, mozkovém kmeni a v kortexu. Degenerace má za následek fascikulace, vede k progresivní svalové slabosti a svalové atrofii. Postihuje také svalstvo dýchacího systému. Průběh ALS je velmi variabilní, střední přežití pacientů je méně než 3 roky. U menšiny pacientů se vyskytuje doprovodná frontotemporální demence. Přibližně 10 % pacientů trpí familiární formou onemocnění vlivem genetické mutace, zatímco zbývajících 90 % má formu sporadickou. (Weishaupt et al. 2016) Vědecké pokroky v genetických studiích umožnily identifikaci genů přispívajících k patogenezi ALS. (Liu a Wang 2017; Philips a Robberecht 2011) Do roku 2018 bylo v souvislosti s familiární ALS identifikováno více než 30 mutací různých genů. (Toth a Atkin 2018) Nejčastější mutací, která je asociovaná s ALS, je mutace genu *SOD1*, která se objevuje přibližně u 20 % postižených. Tato mutace strukturálně pozmění molekulu SOD, což nepřímo snižuje afinitu SOD k zinku (Zn). Zn-deficientní SOD následně může indukovat apoptózu v motorických neuronech mechanismem, který souvisí se zvýšenou hladinou peroxynitritu. (Beckman et al. 2001) K méně častým mutacím, které se také podílejí na rozvoji familiární ALS, patří mutace genu *TARDBP* (výskyt u přibližně 5 % nemocných), *FUS* (přibližně 5 % nemocných) a *ANG* (< 1 %). (Philips a Robberecht 2011)

Navzdory četným preklinickým a klinickým studiím, které byly provedeny za účelem vyhodnocení základní příčiny degenerace motorických neuronů, přesný mechanismus ALS není zcela znám. Patogeneze ALS je multifaktoriální a na jejím rozvoji se může podílet oxidační stres, mitochondriální dysfunkce, axonální poškození, excitotoxicita, agregace proteinů a neurozánět. (Liu a Wang 2017)

U pacientů s ALS je neurozánět charakterizovaný především aktivací astrocytů, ale také dalších imunitních buněk zejména mikroglíí, dále infiltrací T-lymfocytů a nadprodukcí prozánětlivých cytokinů. Zánět CNS byl prokázán v souvislosti se ztrátou neuronů, a to i během presymptomatické fáze ALS. (Liu a Wang 2017) V míše pacientů

s ALS se astrocytóza vyskytuje jak ve ventrálním, tak v dorzálním rohu míchy. Rovněž mohou být zasaženy i místa, kde nervová vlákna kortikospinálního traktu vstupují do šedé hmoty. V mozku se proto astrocytóza vyskytuje v šedé kortikální i bílé subkortikální hmotě. Mikroglióza je nejčastěji patrná v motorické kůře, dále v jádrech mozkového kmene, podél kotikospinálního traktu a ve ventrálním rohu míchy, kde mikroglie interagují s infiltráty T-buněk. Tyto nálezy jsou založeny na studiích *post mortem*. Studium aktivace mikroglíí je poměrně obtížné během časných fází onemocnění a během progresu ALS. Mikroglíální aktivace v motorické kůře, dorsolaterální prefrontální kůře a thalamu pacientů s ALS je možná pomocí zobrazovací pozitronové emisní tomografie. (Philips a Robberecht 2011)

### 3. Možnosti léčby neurodegenerativních onemocnění

#### 3.1. Terapeutické strategie v léčbě AD

Klíčovým přístupem v léčbě AD v současné době zůstává symptomatická terapie. Tu tvoří 3 zástupci ChEI a memantin jako zástupce ovlivňující glutamátergní systém. (Godyń et al. 2016)

V průběhu patogeneze AD dochází ke ztrátě cholinergních neuronů v *nucleus basalis Meynerti* a dalších septálních jádrech, která se široce promítají do kůry, což způsobuje obecný cholinergní deficit. Tato ztráta cholinergního vstupu přispívá ke ztrátě pozornosti a paměťové dysfunkci. ChEI se snaží tento nedostatek zvrátit zvýšením synaptických hladin ACh. (Du et al. 2018) Prvním lékem zavedeným do klinické praxe byl takrin. V roce 2012 byl ale stažen z trhu kvůli závažným vedlejším účinkům, které zahrnovaly zejména hepatotoxicitu. (Watkins et al. 1994) Ačkoliv je inhibice cholinesterasy symptomatickou úlevovou léčbou a její přínosy jsou nepatrné, jedná se v současnosti o nejdostupnější formu léčby. (Du et al. 2018) Pro mírnou až středně těžkou AD jsou schváleny tři ChEI: donepezil, rivastigmin a galantamin. Léky se liší primárně ve svých farmakokinetických profilech a případně v lékových formách, nikoliv v celkové účinnosti. U zmíněných léčiv neexistuje dlouhodobé zabránění progresi onemocnění. (Long a Holtzman 2019)

Donepezil je piperidinový derivát. Je řazen mezi reverzibilní inhibitory AChE, pro kterou vykazuje vysokou selektivitu. Dále je pro donepezil charakteristická významně nižší afinita k butyrylcholinesterase přítomné převážně na periférii. (Shigeta a Homma 2001) Donepezil má delší biologický poločas než ostatní zástupci (více než 70 hodin), což umožňuje podávání jednou denně. (Long a Holtzman 2019)

Rivastigmin je cholinergní dualista, inhibuje AChE i butyrylcholinesterasy. Jde o tzv. pseudoireverzibilní typ ChEI – schopnost inhibovat cholinesterasy trvá déle, než je jeho přítomnost v plazmě. (Jiráček 2012) Je dostupný ve formě perorální a také ve formě transdermální náplasti s kontinuálním uvolňováním. (Long a Holtzman 2019)

Galantamin je alkaloid původně izolovaný z některých druhů rodu *Amaryllidaceae*. Jeho mechanismus účinku spočívá v reverzibilní inhibici AChE (inhibice

butyrylcholinesterasy je nevýznamná) a zároveň v allosterické modulaci nikotinových receptorů.

Nejčastějšími nežádoucími účinky po podání ChEI jsou gastrointestinální příznaky zahrnující nechutenství, nauzeu, zvracení. Méně častými jsou křeče a bolesti hlavy. (Jirák 2012)

Čtvrtou látkou schválenou látkou pro léčbu AD je memantin, nekompetitivní modulátor receptoru NMDA. Memantin inhibuje Glu zprostředkovanou neurotoxicitu, která je spjatá s progresí AD, ačkoliv přesný mechanismus není známý. Stejně jako i ChEI je však přínos léčby poměrně malý a nemá žádný vliv na dlouhodobou progresi nemoci. (Long a Holtzman 2019)

Kromě výše zmíněných léčiv je připravována a klinicky zkoušena řada farmakoterapeutických strategií. (Jirák 2012) Mezi tyto strategie se řadí A $\beta$ -cílená terapie, jejíž snahou je snížit hladiny parenchymálních A $\beta$  a amyloidových depozit v mozkových tkáních. Strategie vychází z využití aktivní či pasivní imunizace nebo použití inhibitorů sekretasy. Zatím jsou však tyto strategie předmětem klinických studií. (Long a Holtzman 2019) Dále jsou zkoušeny látky zaměřené na  $\tau$ -protein a bylo navrženo několik strategií, které by mohly vést ke snížení patogenity  $\tau$ -proteinu.

U léčby, která by modulovala neuroimunitní nebo přímo mikrogliaální odpověď, existuje velký terapeutický potenciál. (Jirák 2012) Za zmínku stojí PPAR $\gamma$  agonisté. PPARs (Peroxisome-Proliferator-Activated Receptors) jsou transkripční faktory patřící do skupiny jaderných receptorů, jež hrají zásadní roli v energetickém metabolismu. (Korábečný et al. 2020; Tyagi et al. 2011) PPAR $\gamma$  agonisté směřují diferenciaci imunitních buněk na protizánětlivé fenotypy a inhibují expresi zánětlivých cytokinů. (Tyagi et al. 2011) Přibývá množství důkazů naznačujících inhibici mikrogliaální aktivity u onemocnění souvisejících se zánětem. (Zhang et al. 2018) Další výsledky *in vitro* prokázaly, že PPAR $\gamma$  agonisté inhibují syntézu APP a A $\beta$  předpokládaným ovlivněním  $\beta$ -sekretasové aktivity. Dosud nicméně neexistuje žádná komplexní studie, jež by zmíněný účinek potvrdila. (Korábečný et al. 2020)

### 3.2. Léčebné strategie u PD

Podobně jako u AD nebyl doposud objeven kauzální lék na PD. Cílem léčby je pouze poskytnout symptomatickou úlevu a minimalizovat dyskinezi. (Yuan et al. 2010) Existuje mnoho farmakologických látek používaných k léčbě motorických poruch. Režimy léčby závisí na věku a symptomech, které se snaží pacient kontrolovat. (Capriotti a Terzakis 2016)

Hlavní motorické příznaky se vyskytují v důsledku deficitu DA. Nahrazení DA, stimulace mozku k uvolňování DA prostřednictvím agonisty nebo inhibice jeho rozpadu jsou farmakologické strategie používané u PD. (Capriotti a Terzakis 2016) Zlatým standardem pro symptomatickou léčbu PD je substituční léčba DA levodopou (L-Dopa). (Yuan et al. 2010) Ve standardních přípravcích je L-Dopa kombinována s inhibitory periferní DOPA-dekarboxylasy benserazidem nebo karbidopou. (Růžička 2009) Další současné léčebné terapie dostupné pro léčbu motorických příznaků zahrnují, agonisty DA (námelové, neergolinové), inhibitory monoaminoxidasy-B (MAO-B), injekční formu agonisty DA (apomorfin), inhibitory katechol-O-methyltransferasy (COMT), antagonisty NMDAR a anticholinergika. Pro pokračující motorické fluktuace a dyskineze lze zvážit rovněž hlubokou mozkovou stimulaci. (Radhakrishnan a Goyal 2018)

L-Dopa jako prekurzor DA poskytuje největší symptomatický přínos. Lékaři však předpis L-Dopa oddalují co nejdéle, protože její účinnost časem klesá. Bývá předepisována do kombinace s karbidopou, která inhibuje periferní rozklad L-Dopa, čímž umožňuje přestoupit většímu podílu L-Dopa do CNS. (Radhakrishnan a Goyal 2018) Na počátku i v průběhu onemocnění může L-Dopa vést k rozvoji motorických komplikací, kterými jsou motorické fluktuace a dyskineze. Jak onemocnění postupuje, mohou nastat fluktuace tzv. „on/off“ periody, kdy lék příznaky choroby kontroluje nebo když pod kontrolou nejsou. (Nashatizadeh et al. 2009)

Farmakologické účinky agonistů DA jsou dosaženy přímou stimulací postsynaptického receptoru pro DA ve striatu. Mezi zástupce agonistů DA se řadí pramipexol, ropinirol, rotigotin, léčiva odvozená od námelu bromokriptin a pergolid. (Nashatizadeh et al. 2009) Zástupci jsou účinní při léčbě časně PD a zpomalují rozvoj motorických komplikací v porovnání s L-Dopa ale obecně se považují za méně účinné než L-Dopa. (Horstink et al. 2006)

Selektivní ireverzibilní inhibitory MAO-B (zástupci selegilin, rasagilin) brání rozkladu L-Dopa a DA. (Riederer a Laux 2011) Mohou být použity jako symptomatické léky první volby v indikovaných případech v časném stádiu PD. (Růžička 2009) Doporučují se zejména pro léčbu akineze a motorických fluktuací v monoterapii nebo také jako adjuvantní léčiva u pacientů s pozdními komplikacemi PD. (Riederer a Laux 2011; Růžička 2009)

Inhibitory COMT mohou prodloužit plazmatický poločas L-Dopa, čímž relativně zvyšují její dostupnost v CNS. (Yuan et al. 2010) Entakapon a tolkapon jsou léčiva dostupné pro léčbu pokročilého stádia PD. Používají se pouze v kombinaci s L-Dopa. (Nashatizadeh et al. 2009) Inhibitor COMT první volby v současné době představuje entakapon vzhledem k potenciální hepatotoxicitě tolkaponu. Pokud dojde k nasazení léčby tolkaponem, je zapotřebí pravidelně kontrolovat hladiny jaterních enzymů. (Růžička 2009)

V patofyziologii PD jsou také zahrnuty změny v glutamátergním přenosu, ve kterém hraje velkou roli opět NMDAR. (Vanle et al. 2018) Zhang et al. (2019) zjistil, že koncentrace Glu v séru pacientů s PD je vyšší než u zdravých subjektů. Výsledná nadměrná aktivace NMDAR se může podílet na zhoršení dyskinezi a také závažných motorických komplikací vyplívajících ze současných strategií náhrady DA. Proto byla navržena farmakoterapie s potenciálem obnovit normální glutamátergní funkce. V současnosti se k léčbě dyskinezi používá slabý antagonist NMDAR amantadin. (Zhang et al. 2019) U amantadinu byl prokázán antidyskinetický účinek. Amantadin se využívá jako součást kombinované léčby pozdních hybných komplikací choroby. V časně fázi onemocnění lze amantadin indikovat i v monoterapii, ale vykazuje pouze mírný symptomatický účinek. (Růžička 2009)

Anticholinergní léčiva patří mezi nejstarší antiparkinsonika. Jedná se užitečné adjuvantní léky při léčbě L-Dopa. Jsou účinné při zmírnění příznaků třesu a rigidity bez změny bradykineze. Anticholinergika však často způsobují mnoho nežádoucích účinků, jako jsou např. sucho v ústech, snížené pocení, zadržování moči, reakce v CNS (zmatenost, psychiatrické příznaky). Tyto příznaky mohou představovat problém u starších pacientů. Mezi používané anticholinergní léčiva patří biperiden, orfenadrin a procykolidin. (Tansey et al. 2007; Yuan et al. 2010)

Nelze opomenout oblast preklinického výzkumu zahrnující vývoj strategií pro inhibici gliové reakce nebo cílení na zánětlivé cytokiny. (Tansey et al. 2007) Bylo prokázáno, že jediná injekce lentiviru snižující produkci TNF v modelu myšího PD indukovaného 6-hydroxydopaminem zmírnila dopaminergní neuronální toxicitu. Další výzkumná skupina uvedla, že podávání lenti-DN-TNF do *substantia nigra* potkanů oslabilo indukovanou dopaminergní ztrátu neuronů a motorické příznaky. Jiné studie naopak prokázaly vliv aktivace PPAR na regulaci mikrogliaálně zprostředkované zánětlivé reakce u PD. Agonisté PPAR potlačili aktivaci mikroglíí. (Lee et al. 2019)

### 3.3. Neuroprotektivní strategie u léčby RS

Zásadním přístupem léčby RS je v současné době včasná a dostatečná léčba relaps-remitentní formy RS (RR-RS), neboť se jedná o nevléčitelné onemocnění. Neuroprotektivní strategie léčby RR-RS zahrnuje léčbu akutních exacerbací - atak a dlouhodobou léčbu, mající za cíl snížení závažnosti a počtu atak. (Krasulová a Havrdová 2008; Meluzínová 2010) Dlouhodobá imunomodulační léčba může zabránit následkům trvalého neurologického postižení vedoucí k postupné invalidizaci pacientů. (Meluzínová 2010) V případě agresivního průběhu onemocnění bývá nasazena intenzivní imunomodulační léčba. (Havrdová 2008)

Při akutní atace RS, jinými slovy při relapsu, je indikována vysoká dávka kortikosteroidů – standardně methylprednisolonu, který vykazuje nejmenší riziko mineralokortikoidních nežádoucích účinků. Obvyklá dávka je 1 g denně intravenózně 3-7 dnů do celkové dávky 3-5 g. Perorální cestou (*p.o.*) lze podávat také stejné dávky methylprednisolonu se stejným účinkem. Důležitá je také prevence a ochrana před vedlejšími účinky kortikosteroidů. Mezi tato opatření patří ochrana žaludeční sliznice podáváním inhibitorů protonové pumpy (IPP) nebo H<sub>2</sub>-antihistaminik, dále substituce kaliem, prevence osteoporózy (především podávání vitamínu D, kalcia a magnezia), u pacientů s diabetem je zásadní pravidelná kontrola glykemie a přizpůsobení dietního režimu případně zvýšení dávek inzulínu/antidiabetik. Také další riziková pacientů musí být pečlivě monitorováni např. pacienti trpící kardiovaskulárními nebo psychiatrickými onemocněními. Po léčbě vysokými dávkami kortikosteroidu se pokračuje podáváním kortikosteroidu *p.o.* ve schématu s postupným snižováním dávek.

Účinek kortikosteroidů však nemá prokazatelný dlouhodobý efekt, který by mohl vést k oddálení neurologického postižení. Je proto nutné včasné zahájení dlouhodobé imunomodulační terapie, vedoucí k omezení zánětlivé aktivity, snížení počtu a intenzity relapsů, což výsledně vede ke zpomalení progresi onemocnění. (Havrdová 2008; Meluzínová 2010; Krasulová a Havrdová 2008) Pro léčbu RS je možné zvážit glatirameracetát (GA) a INF- $\beta$ . Obě léčiva jsou zavedena jako léčba první volby modifikující průběh choroby (tzv. disease modifying drugs). Tato léčba snižuje četnost relapsu, zlepšuje závažnost relapsu a zpomaluje progresi postižení u pacientů s RR-RS. (Zapletalová 2009)

GA je sestaven ze standardizované směsi syntetických polypeptidů. Jedná se o náhodný kopolymer 4 aminokyselin L-Glu, L-lysinu, L-alaninu, L-tyrosin. Sekvence aminokyselin, která tvoří GA, je podobná myelinbazickému proteinu (MBP). Na základě podobnosti s MBP dochází k vazbě GA na molekulu MHC II. třídy APC. GA poté působí jako falešný antigen. Jeho podání vede k posunu imunitní odpovědi od Th<sub>1</sub> k Th<sub>2</sub> subpopulaci lymfocytů. Th<sub>2</sub> lymfocyty následně produkují protizánětlivé cytokiny jako např. IL-10. T-lymfocyty rovněž dále omezuje snížením migrace, proliferace a indukci apoptózy.

Terapeutický účinek INF- $\beta$  je způsobeným širokým spektrem imunomodulačních vlastností včetně modulace exprese cytokinů, snížení prezentace antigenu, kostimulačních adhezních molekul, potlačení proliferace a migrace T-lymfocytů, rovněž snižuje propustnost BBB. (Zindler a Zipp 2010; Havrdová 2008; Krasulová a Havrdová 2008; Meluzínová 2010) Existují důkazy, že kromě imunomodulačních účinků mají GA a INF- $\beta$  také přímé neuroprotektivní účinky. (Zindler a Zipp 2010)

Další nová imunomodulační léčba látkou fingolimod vykazuje rovněž neuroprotektivní účinky. Jedná se o agonistu sfingosin-1-fosfátu (S1P), který ovlivňuje migraci lymfocytů zachycením T-buněk v sekundárních lymfatických orgánech, ovlivňuje astrogliózu a podporuje remyelinizaci působením na receptory S1P na astrocytech a oligodendrocytech. (Zindler a Zipp 2010)

Pro léčbu aktivní RS nebo při neúčinnosti/nesnášenlivosti léků první volby je dostupná humánní monoklonální protilátka natalizumab. Jde o protilátku proti adhezivní molekule  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrinu na povrchu lymfocytů umožňující jejich průnik cévní stěnou k cílové tkáni. Díky navázání natalizumabu na tuto molekulu dochází k zabránění



migrace lymfocytů do CNS. (Krasulová a Havrdová 2008; Meluzínová 2010) Natalizumab patří mezi léky druhé volby. Mezi ně lze dále zařadit intravenózní imunoglobuliny, klasická imunosupresiva jako azathioprin, metotrexát nebo mykofenolát mofetil. (Meluzínová 2010)

U pacientů s agresivním průběhem onemocnění je nutné zvážit tzv. eskalační léčbu. Při ní dochází ke zvýšení dávek užívaného přípravku či ke jeho změně, nasazení natalizumabu nebo použití některého z cytostatických režimů. U maligního průběhu choroby, při němž došlo k selhání ostatních léčebných postupů, bývá zvážena a indikována imunoablativní terapie s podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (CD34+). (Krasulová a Havrdová 2008; Havrdová 2008; Meluzínová 2010)

### **3.4. Léčebné strategie u ALS**

Specifický lék na ALS v současné době neexistuje. Léčba spočívá v podávání neuroprotektivních léčiv a dále léčiv symptomatických zmírňujících projevy nemoci. (Štětkařová 2018) Péče o pacienty s ALS zahrnuje multidisciplinární přístup zapojující odborníky různých specializací např. neurology, pneumology, odborníky na výživu, fyzioterapeuty, logopedy, specializované sestry. (Brown a Al-Chalabi 2017) Významnou roli dále hraje zapojení paliativní medicíny. (Vlčková 2016)

V ČR je jedinou dosud schválenou látkou, která má prokazatelný vliv na zpomalení progresu ALS, riluzol. Riluzol snižuje glutamatergní neurotransmisi blokováním napětově řízených sodíkových kanálů na presynaptických neuronech. (Štětkařová 2018) I přes omezený terapeutický efekt metaanalýza kontrolovaných studií prokázala, že riluzol může mít vliv na prodloužení doby přežití. Avšak důkazy o zlepšení svalové síly nebo plicních funkcích nejsou. Nebyla prokázána ani účinnost v pozdních stádiích onemocnění. Léčba riluzolem je relativně bezpečná, i když častým nežádoucím účinkem mohou být zvýšené hladiny jaterních enzymů. Kvůli tomuto riziku je zapotřebí kontrolovat jaterní funkce po nasazení léku. (Brown a Al-Chalabi 2017; Vlčková 2016; Štětkařová 2018)

Další látkou používanou při léčbě ALS je edavaron, o němž se předpokládá, že působí jako antioxidační látka. Jeho příznivý účinek na progresi onemocnění byl

prokázán v selektované skupině pacientů s časným nástupem nemoci a rychlou progresí. Dosud byla léčba edavaronem schválena pouze v pár zemích. Evropská léková agentura nicméně dosud léčbu tímto lékem neschválila. (Brown a Al-Chalabi 2017)

Významná je rovněž symptomatická terapie, která se zaměřuje na zlepšení různých orgánových projevů. Zahrnuje farmakologické a nefarmakologické intervence. Gastrointestinální potíže se nejčastěji projeví poruchou polykání a s ní související sníženým příjmem potravy. Důležitá je prevence malnutrice a včasné řešení dysfagie. Dochází k úpravě stravy změnou konzistence, doplňování zásadních složek zejména proteinů, nacvičování manévrů usnadňující polykání. Při těžkých obtížích je nutné zajistit výživu enterálně pomocí nazogastrické sondy nebo perkutánní endoskopické gastrostomie. Mezi časté problémy patří také zácpa, urologické a dýchací obtíže a bolesti. Spasticita je přítomna u většiny pacientů, používanými léky na uvolnění jsou baklofen a tizanidin (ačkoliv nebyly provedeny žádné randomizované kontrolované studie). Sialorea (nadměrné slinění a hromadění slin) může být léčena anticholinergními léčivy např. skopolaminem, amitriptylinem aj. Péče o pacienty v terminálních stádiích onemocnění zahrnuje především tlumení úzkosti, stresu a dušnosti. Klíčovou rolí ve všech stádiích ALS však hraje psychická podpora jak pacientů, tak rodiny. (Brown a Al-Chalabi 2017; Vlčková 2016)

### **3.5. Nově syntetizované látky**

#### **3.5.1. Naftochinony**

Jednou ze skupin nově syntetizovaných látek použitých v experimentální části diplomové práce jsou deriváty naftochinonu. Naftochinon sám o sobě disponuje širokými farmakologickými účinky a vykazuje poměrně vysokou cytotoxicitu. Deriváty naftochinonu také prokázaly schopnost interagovat s několika farmakologickými cíli, čímž vykazují širokou škálu aktivit. Mechanismus účinku a případné cytotoxicity spočívá ve vazbě na DNA, čímž inhibují proces replikace, dále interagují s různými proteiny včetně enzymů, dochází k poškození integrity buněčných membrán a mimo jiné zasahují do mitochondriálního elektronového transportního řetězce. (Babula et al. 2007) Nejstabilnější forma 1,4-naftochinon se stala základním kamenem pro vývoj léčiv. U některých sloučenin byla hodnocena schopnost zastavit buněčný růst nebo zabít

nádorové buňky. V subtoxických dávkách aktivují dráhy adaptivní reakce na stres v neuronech a chrání je před silným stresem. Nedávné studie pomohly osvětlit neuroprotektivní účinky a inhibici agregace A $\beta$  podávaných derivátů 1,4-naftochinonu. Tento fakt naznačuje, že skelet naftochinonu může být použit jako základ AD léčiv. (Campora et al. 2021) Liu et al. (2020) uvedli, že některé deriváty 1,4-naftochinonu významně inhibovaly produkci NO indukovanou LPS v buněčné linii myších makrofágů. Na základě těchto účinků lze odhadnout potenciální využití naftochinonů v léčbě neurozánětu provázejícího zmíněná onemocnění CNS.

### **3.5.2. Chromony**

Chromony jsou skupinou látek přirozeně se vyskytujících v přírodě. Molekuly obsahující jádro chromonu vykazují řadu biologických vlastností, včetně protizánětlivých, antimikrobiálních, antialergenních, protinádorových a dalších. Protizánětlivý účinek byl prokázán u derivátů chromonu jako důsledek působení různých molekulárních mechanismů, např. inhibice cyklooxygenasy, lipooxygenasy-5 nebo produkce NO (Silva et al. 2016). Liu et al. (2012) popsali derivát chromonu, jež významně snížil produkci NO, IL-1 $\beta$ , a IL-6 indukovanou LPS a snížil hladiny exprese mRNA indukovatelné formy syntasy NO v makrofázích. Deriváty chromonu mohou v budoucnosti poskytnout novou terapeutickou možnost v léčbě zánětlivých onemocnění.

## 4. Cíle práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo sledování protizánětlivých účinků nově syntetizovaných látek, a to 3 naftochinonů a 3 chromonů. Dílčími cíli předkládané práce byly:

1. Zhodnocení cytotoxicity látek na dvou různých buněčných liniích, a to neuroblastomové linii SH-SY5Y a myší mikrogliaální linii SIM-A9.
2. Určení bezpečné koncentrace, která nemá vliv na buněčnou životaschopnost v prostředí zánětu u myší mikrogliaální linie SIM-A9.
3. Sledování protizánětlivých účinků studovaných látek na mikrogliaální linii SIM-A9 pomocí stanovení cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  po stimulaci buněk LPS v 24hodinovém časovém intervalu.
4. Sledování změny hladiny NO pomocí Griessovy reakce v kultivačním mediu po stimulaci SIM-A9 buněk INF- $\gamma$  a ovlivnění studovanými látkami v 48hodinovém časovém intervalu.

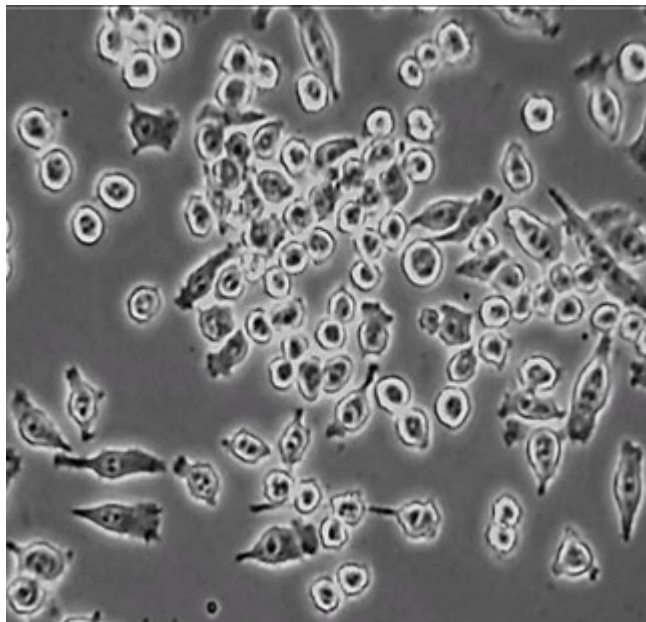
## 5. Materiál a metodika

### 5.1. Buněčné linie

Ke sledování protizánětlivých účinků nově syntetizovaných látek byla použita buněčná linie SIM-A9 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Na této buněčné linii byla stanovena cytotoxicita látek, která byla sledována také na buněčné linii SH-SY5Y (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### 5.1.1. SIM-A9

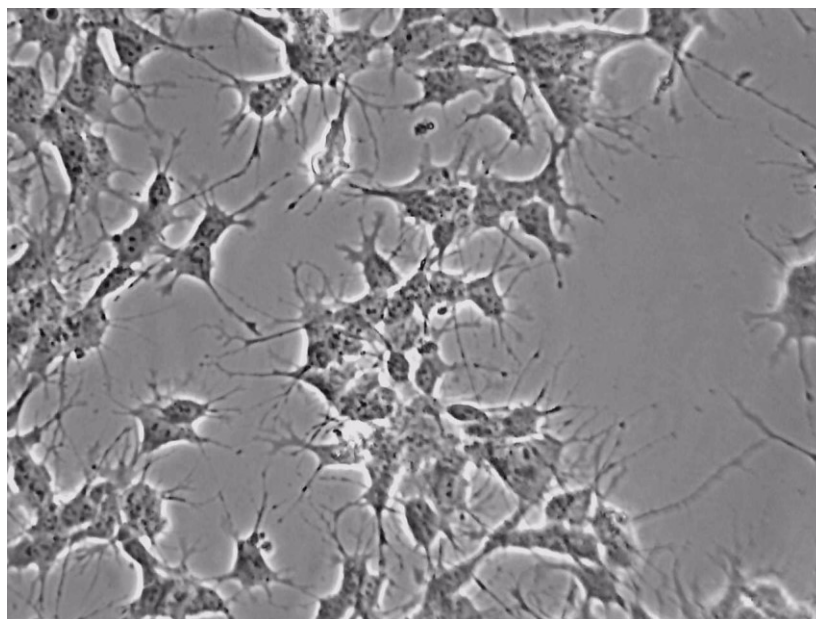
SIM-A9 je buněčnou linií spontánně imortalizovaných mikroglíí primární gliové kultury izolované postnatálně z myších kortikálních tkání. (Nagamoto-Combs et al. 2014) Buněčná linie SIM-A9 je poměrně často využívána v *in vitro* studiích zánětu. Tyto buňky jsou schopné po stimulaci LPS nebo  $\text{INF-}\gamma$  produkovat různé mediátory zánětu, a to IL-6,  $\text{TNF-}\alpha$ , COX-2, NO a další chemokiny a cytokiny. (Dave et al. 2020; Sibbitts a Culbertson 2020)



**Obrázek 6** Buněčná linie SIM-9. Snímek byl pořízen pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse TS100-F, Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveným digitální kamerou (AM7023CT Dino-Lite, Nová Tchaj-pej, Taiwan) při zvětšení 200 x.

### 5.1.2. SH-SY5Y

SH-SY5Y buňky podobné neuroblastům jsou subklonem rodičovské buněčné linie neuroblastomu SK-N-SH. Rodičovská buněčná linie byla vytvořena v roce 1970 z biopsie kostní dřevě, která obsahuje jak buňky podobné neuroblastům, tak buňky podobné epitelu. SH-SY5Y mají stabilní karyotyp skládající se ze 47 chromozomů. (Shibley et al. 2016)



**Obrázek 7** Buněčná linie SH-SY5Y. Snímek byl pořízen pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse TS100-F, Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveným digitální kamerou (AM7023CT Dino-Lite, Nová Tchaj-pej, Taiwan) při zvětšení 200 x.

## 5.2. Kultivace

Obě použité buněčné linie byly kultivované v kultivačních lahvích s povrchem 75 cm<sup>2</sup> (T75, Techno Plastic Products - TPP, Trasadingen, Švýcarsko) v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Binder CB160, Tuttlingen, Německo) Inkubace probíhala za podmínek 37 °C, s obsahem 5 % CO<sub>2</sub> a relativní vlhkostí vzduchu 95 %.

Pro kultivaci buněčné linie SIM-A9 bylo použito Eaglovo médium modifikované Dulbeccovým obohacené o směs živin F-12 (DMEM/F12, Biosera, Nuaille, Francie). Toto médium bylo dále suplementované fetálním bovinním sérem (FBS, výsledná

koncentrace v celkovém objemu kultivačního média byla 10 %, Biosera), koňským sérem (DHS, výsledná koncentrace 5 %, Biosera), směsí antibiotik streptomycinu a penicilinu (ATB, výsledná koncentrace 1 %, Sigma-Aldrich) a L-glutaminem (výsledná koncentrace 2 mM, Sigma-Aldrich).

Buněčná linie SH-SY5Y byla kultivovaná v růstovém médiu DMEM suplementovaným FBS (výsledná koncentrace 10 %, Biosera), roztokem neesenciálních aminokyselin (NAA, výsledná koncentrace 1 %, Thermo Fisher Scientific, Eugeno, OR, USA), ATB (výsledná koncentrace 1 %, Sigma-Aldrich) a L-glutaminem (výsledná koncentrace 2,5 mM, Sigma-Aldrich).

### **5.3. Pasážování**

Při procesu pasážování dochází k přenosu buněčné kultury nebo určitého počtu buněk do čerstvého kultivačního média. Pasážování bylo prováděno v laminárním boxu s HEPA filtrem (BioAir Safeflow 1.2, EuroClone, Pero Miláno, Itálie). Nejprve bylo z kultivační láhve odsáto původní růstové médium a pomocí buněčné škrabky (TPP) v případě buněčné kultury SIM-A9 byly buňky mechanicky uvolněny a poté přeneseny do centrifugační zkumavky (TPP). K oplachu láhve bylo použito přibližně 10 ml fosfátového pufru (PBS, Sigma-Aldrich) a celý obsah byl převeden do stejné centrifugační zkumavky. V případě buněčné linie SH-SY5Y byl k uvolnění buněk z kultivační láhve použit enzym akutasa (Biosera) a následně byly buňky přeneseny do centrifugační zkumavky v objemu 14 ml.

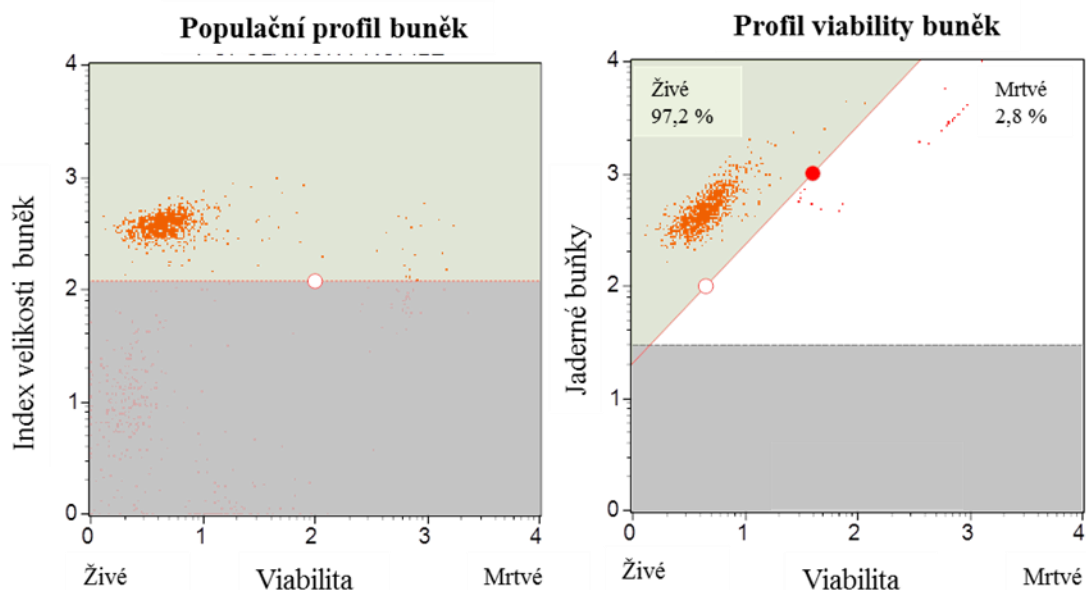
Odstředování probíhalo ve stolní centrifuze (Universal 320/320 R, Hettich, Tuttlingen, Německo) při 600 otáčkách za minutu po dobu 4 minut. Po centrifugaci následovalo odsátí většiny supernatantu a vzniklá peleta byla v 1 ml kultivačního média resuspendována a doplněna do celkového objemu 10 ml kultivačním médiem. Ze vzniklé suspenze byl odpipetován přesný objem, který sloužil k následnému počítání buněk. Posledním krokem pasážování bylo doplnění kultivační láhve 25 ml média a přidání vypočítaného objemu buněčné suspenze potřebného pro další kultivaci. Kultury je nezbytné pasážovat každých 3-5 dní.

## 5.4. Počítání buněk

Před samotným experimentem bylo nutné buňky spočítat pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie. Pomocí této metody byl stanoven počet buněk mikrokapilárním průtokovým cytometrem The Muse<sup>TM</sup> Cell analyzer (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Tento analyzátor využívá fluorescenční detekci k provedení buněčné analýzy, která je vysoce kvantitativní. Životoschopné i mrtvé buňky jsou odlišně obarveny na základě jejich propustnosti pro barviva v reagenčním činidle, která jsou schopná navázat se na DNA. Reagenční činidlo obsahuje dvě fluorescenční barviva. První složka činidla je schopná proniknout membránou buněk a navázat se na jejich DNA. Dojde k obarvení všech jaderných buněk, což umožňuje odlišení buněk s jádrem od nejaderných buněk a různých úlomků. Druhé fluorescenční barvivo je také schopno vazby na DNA, ale pouze v případě poškození integrity buněčné membrány u mrtvých nebo umírajících buněk. Tato složka umožňuje odlišení životoschopných buněk (nejsou touto složkou obarveny) a mrtvých nebo umírajících buněk, které obarveny jsou. Tak lze odlišit jaderné, nejaderné buňky a případné buněčné zbytky.

K provedení samotného počítání buněk bylo nutno v mikrozkušavce (Eppendorf, Vídeň, Rakousko) smísit 50  $\mu$ l buněčné suspenze spolu s 100  $\mu$ l reagenčního činidla. Takto připravená směs byla promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně byl stanoven počet buněk na 1 ml buněčné suspenze, počet životoschopných buněk na 1 ml suspenze a buněčná životoschopnost v % (obrázek 8).

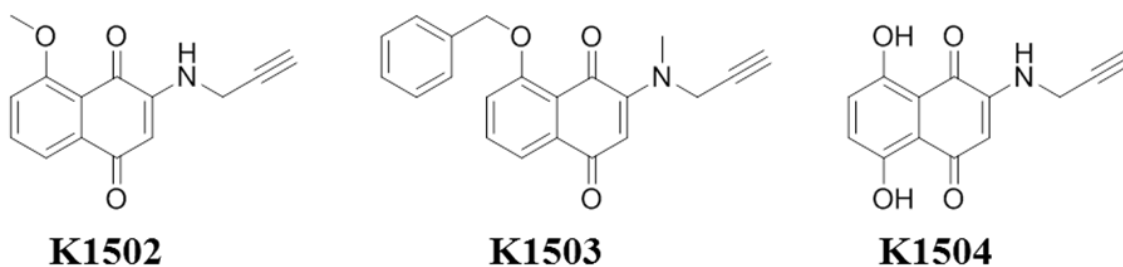




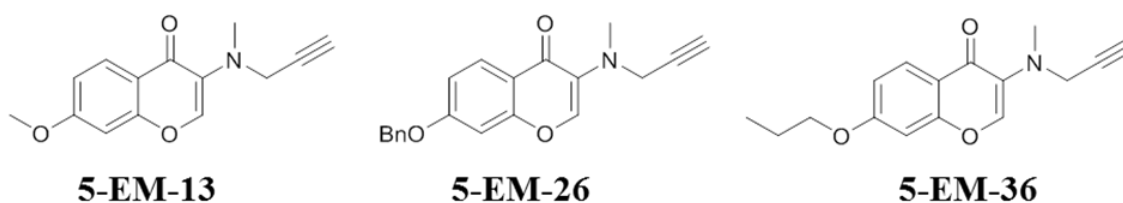
**Obrázek 8** Výstup z mikrokapilárního průtokového cytometru, který vyjadřuje celkový počet buněk (vlevo) a procento životaschopných a mrtvých buněk (vpravo).

### 5.5. Studované látky

Studované látky byly připraveny na Katedře toxikologie a vojenské farmacie fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci králové (Univerzita obrany). Jednalo se o dvě skupiny látek, přičemž do první skupiny byly zařazeny 3 deriváty naftochinonů (obrázek 9) a druhou skupinu tvořily 3 nově syntetizované chromony (obrázek 10).



**Obrázek 9** Studované látky patřící do skupiny naftochinonů.



**Obrázek 10** Studované látky patřící do skupiny chromonů.

## 5.6. Stanovení cytotoxicity studovaných látek

Ke sledování cytotoxicity studovaných látek a k následnému určení MTC (koncentrace, která nemá vliv na viabilitu buněk) byla použita kolorimetrická metoda využívající tetrazoliovou sůl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT, Sigma-Aldrich). Kromě toho byly MTC stanovené pomocí MTT testu dále ověřeny v prostředí zánětu pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie.

### 5.6.1. Kolorimentické stanovení cytotoxicity

MTT test slouží k měření buněčné metabolické aktivity jako indikátor životaschopnosti, proliferace a cytotoxicity buněk. Jedná se o kolorimetrickou metodu, která je založena na redukci ve vodě rozpustné žluté tetrazoliové soli 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromid (MTT; Sigma-Aldrich) na fialové až fialovomodré krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami působením mitochondriálních reduktas. Ve vodě nerozpustný formazan je poté solubilizován pomocí organického rozpouštědla dimethylsulfoxidu (DMSO, Sigma-Aldrich). Výsledný barevný roztok se kvantifikuje měřením absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí multifunkčního spektrofotometru pro mikrotitrační destičky. Intenzita absorbance je přímo úměrná množství metabolicky aktivních, a tedy životaschopných buněk. (Kumar et al. 2018)

### *Postup stanovení*

Do 96jamkových mikrotitračních destiček (TTP) byl nasazen objem 100  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze v množství  $7 \times 10^3$  buněk na jamku pro buněčnou linii SIM-A9 a  $15 \times 10^3$  buněk na jamku pro buňky SH-SY5Y získané pasážírováním. Destičky byly nechány 10 minut při laboratorní teplotě, poté byly přemístěny na 24 hodin do  $\text{CO}_2$  inkubátoru.

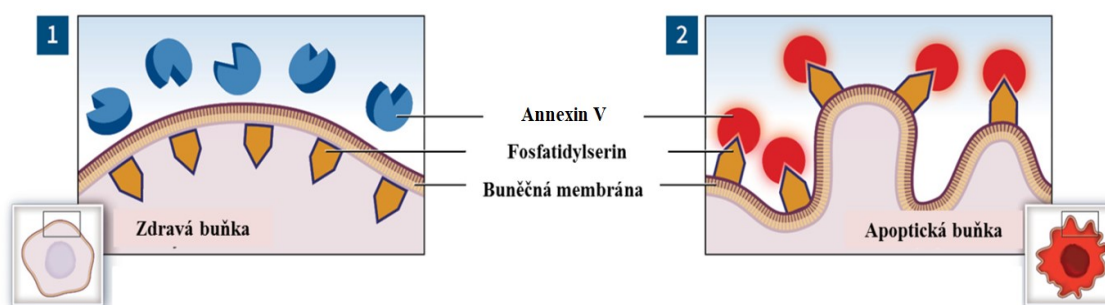
Po 24hodinové inkubaci došlo k ovlivnění buněk. Ze zásobních roztoků studovaných sloučenin v DMSO byly připraveny pracovní roztoky, které byly dále sériově zředěny v kultivačním médiu DMEM/F12 (SIM-A9) či DMEM (SH-SY5Y) v poměru 1:1. Následně pak byla připravená koncentrační řada přidána k buňkám. V každé destičce zůstaly dva sloupce buněk neovlivněny (k buňkám bylo přidáno pouze 100  $\mu\text{l}$  média), což sloužilo pro negativní kontrolu u vyhodnocení testu. Pozitivní kontrola spočívala v přidání dodecylsiranu sodného (Sigma-Aldrich) do posledního sloupce destičky, kde byly buňky působením této látky usmrceny.

Následující den po 24 hodinách inkubace byla pomocí kolorimetrické metody zjištěna životaschopnost buněk. Médium bylo z jamek destičky odsáto a buňky byly ponechány 1 hodinu v prostředí 100  $\mu\text{l}$  roztoku MTT v kultivačním médiu (výsledná koncentrace byla 5 mg/ml. Po uplynutí doby inkubace byl obsah jamek znovu odsán a následně bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  DMSO, které mělo za následek lýzu buněk a rozpuštění formazanu. Destičky byly promíchány v třepačce (ICA MS 3 digital, ICA-Werke, GmbH & Co., Staufen, Německo). Měření absorbance probíhalo pomocí multidetekční čtečky mikrotitračních destiček TECAN Spark (Tecan, Grödig, Rakousko) při vlnové délce 570 nm. Pokus byl proveden v triplicátu a nezávisle na čase třikrát opakován. (Hepnarova et al. 2019; Muckova et al. 2019b)

#### **5.6.2. Stanovení maximální tolerovatelné koncentrace**

MTC, která byla zjištěna pomocí MTT testu, byla dále ověřena stanovením apoptického profilu buněk využitím mikrokapilární průtokové cytometrie. Tato metoda umožňuje kvantitativní analýzu několika skupin buněk, a to neapoptických, časně apoptických, pozdně apoptických a mrtvých buněk. The Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell Assay test (Merck Millipore) využívá k identifikaci apoptických buněk protein annexin V, který má vysokou afinitu k aniontovému fosfolipidu fosfatidylserinu (PS). V živých

buňkách je PS lokalizován na cytoplazmatickém povrchu plazmalemy. Buněčná membrána však během apoptózy prochází strukturálními změnami, které zahrnují translokaci PS z vnitřní do vnější vrstvy buněčné membrány. Díky těmto změnám dochází k navázání fluorescenčně značeného annexinu V na PS apoptických buněk, čímž jsou detekovány (obrázek 11). Činidlo dále obsahuje barvivo 7-aminoaktinomycin D (7-AAD). 7-AAD za fyziologických okolností neproniká buněčnou membránou, avšak v případě narušení integrity membrány vstupuje do buněk, kde se díky své vysoké afinitě váže na DNA. Tato složka reagenčního činidla umožňuje rozlišení živých (negativní na obě barviva) a časně apoptotických buněk (pozitivní na annexin V) od buněk v pozdní fázi apoptózy (pozitivní na annexin V) a nekrotických buněk (pozitivní na obě barviva). (Demchenko 2013; Muckova et al. 2019a)



**Obrázek 11** Externalizace PS u apoptické buňky a vazba annexinu V. Převzato a přeloženo z <https://abbkineeuro.wordpress.com/2018/07/06/abfluor-488-annexin-v-apoptosis-detection-kit-from-abbkine/>.

### *Postup stanovení*

Experiment byl proveden pouze s buněčnou linií SIM-A9. Buňky byly nasazené do 12jamkové destičky (TTP) o hustotě  $5 \times 10^4$  buněk na jamku a 24 hodin inkubovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Další den byly buňky ovlivněny studovanými látkami a inkubovány dalších 24 hodin. Koncentrace látek odpovídala předpokládané MTC, která neměla vliv na životaschopnost buněk při stanovení cytotoxicity látek pomocí MTT testu. K takto ovlivněným buňkám byl po 1 hodině inkubace přidán LPS nebo INF- $\gamma$ .

V případě, že byl zánět v SIM-A9 buňkách indukován pomocí LPS, byl za dobu 24hodinové inkubace obsah jamek (médiu a buňky) přepipetován do centrifugačních zkumavek (TTP). V případě indukce zánětu pomocí IFN- $\gamma$  byl tento krok uskutečněn až po 48hodinové inkubaci.

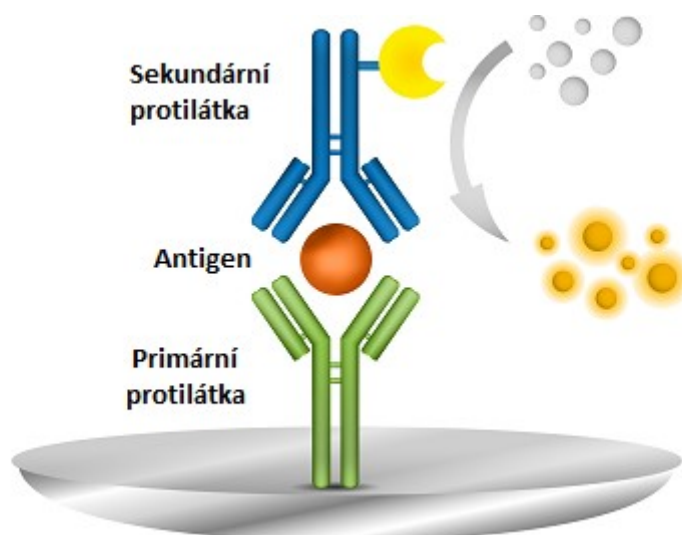
Takto připravená suspenze buněk byla centrifugována. Po 4 minutách centrifugace při rychlosti 1000 otáček za minutu byl ze zkumavky odsán supernatant a peleta buněk byla resuspendována v čerstvém kultivačním médiu. Poté byl odebrán objem 100  $\mu$ l, k suspenzi bylo přidáno 100  $\mu$ l reagentie z kitu Muse Annexin V & Dead Cell Assay (Merck Millipore) a takto ovlivněné vzorky byly inkubovány 20 minut za laboratorní teploty v prostředí bez přístupu světla. (Muckova et al. 2019a)

Pro stanovení apoptické aktivity touto technikou byl použit mikrokapilární průtokový cytometr The Muse<sup>TM</sup> Cell analyzer (Merck Millipore, Darmstadt, Německo). Experiment byl proveden v triplikátu pro každou testovanou látku a opakován ve 3 měřeních nezávislých na čase. (Muckova et al. 2019a)

## **5.7. Sledování protizánětlivého účinku nově syntetizovaných látek**

### **5.7.1. Stanovení prozánětlivých účinků pomocí enzymové imunanalýzy**

K sledování protizánětlivých účinků nově syntetizovaných látek byl použit enzymový imunosorbentní test (ELISA, z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) v sendvičovém uspořádání (obrázek 12). U tohoto provedení jsou mikrotitrační destičky potaženy záchytnou protilátkou. Po nanesení vzorku a promytí jsou dále přidány protilátky označené enzymem. Po inkubaci a promytí je enzymová aktivita odhalena zabarvením díky přidání enzymového substrátu. Analyt je výsledně vázán mezi dvěma molekulami protilátek, z nichž každá detekuje odlišný epitop antigenu. Z toho je také odvozen název sendvičová ELISA. (Aydin 2015) Pomocí této metody byla sledována hladina IL-6 a TNF- $\alpha$  po stimulaci SIM-A9 buněk LPS v koncentraci 1  $\mu$ g/ml.



**Obrázek 12** Schéma sendvičového provedení ELISA testu. Převzato a přeloženo z <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>.

### *Postup stanovení*

Pro sledování cytokinu IL-6 byl použit reagenční kit IL-6 Murine ELISA Set (katalogové číslo ab47596; Abcam, Cambridge, Velká Británie) a pro sledování hladiny cytokinu TNF- $\alpha$  byl zvolen reagenční kit TNF alpha Mouse ELISA Kit (katalogové číslo 88-7324-88; Thermo Fischer Scientific). Pro samotný experiment byly buňky SIM-A9 nasazeny do mikrotitrační kultivační destičky (TPP) v hustotě  $7 \times 10^3$  buněk v objemu 200  $\mu$ l a kultivované přes noc. Další den byly buňky ovlivněny připravenými roztoky dexamethasonu (DMX, výsledná koncentrace 1  $\mu$ g/ml), DMSO (výsledná koncentrace 0,1 %) a studovanými látkami (finální koncentrace odpovídala MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC dané látky). Takto ovlivněné buňky byly inkubovány 1 hodinu v CO<sub>2</sub> inkubátoru při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byl do jednotlivých jamek přidán LPS, přičemž výsledná koncentrace odpovídala 1  $\mu$ g/ml. V kultivační destičce byly také negativní kontroly, které obsahovaly pouze kultivační médium a roztok DMSO nebo DMX. Mikrotitrační destičky byly kultivovány dalších 23 hodin v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Potažení jamek mikrotitrační destičky (Nunc Maxisorp™, Sigma-Aldrich) protilátkou bylo uskutečněno dle pokynů výrobce. Do jamek bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku, který obsahoval primární protilátku na základě stanovovaného cytokinu. Poté byla destička zakryta folií a inkubována. Inkubace probíhala přes noc při 4 °C. Následně byl odsán obsah jamek, které dále musely být propláchnuty puforem o objemu 300  $\mu$ l

na jamku. K promývání destiček byla použita promývačka mikrotitračních destiček 50TS (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA). Po promytí byla destička převrácena na absorpční papír, což umožnilo odstranění přebytečné tekutiny. Následovalo blokování destičky (200  $\mu$ l blokovacího pufru naneseného do každé jamky) a ponechání při laboratorní teplotě 60 minut. Opět byl obsah aspirován, destička promyta, zbavena přebytečné tekutiny, zakryta a uchovávána v lednici při 4 °C.

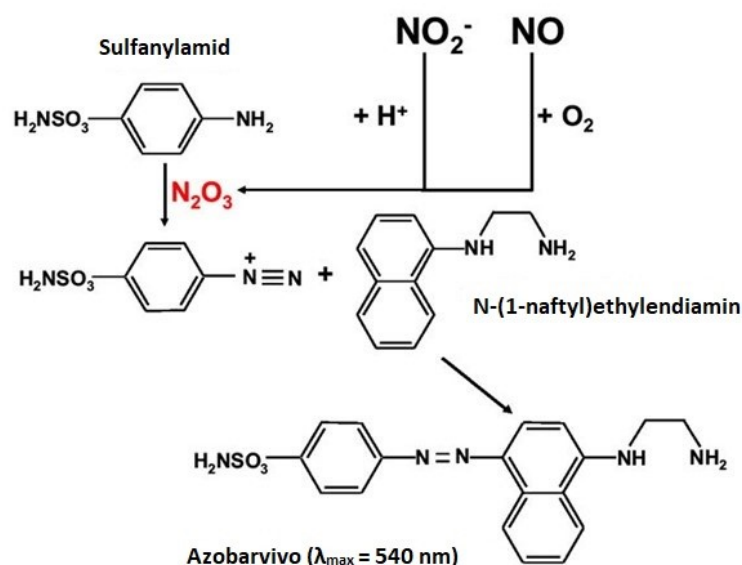
Do takto připravené ELISA destičky byly napipetovány vzorky supernatantu o objemu 100  $\mu$ l z jednotlivých jamek s nasazenými a ovlivněnými buňkami. Taktéž byl přidán sériově naředěný (1:1) standard o objemu 100  $\mu$ l jednotlivých sledovaných cytokinů. Dle doporučení výrobce, byla destička opět zalepena neprodyšnou folií a ponechána přes noc při teplotě 4 °C. Druhý den byl obsah jamek aspirován a 5krát promyt pomocí promývačky pro mikrotitrační destičky. Poté byla přidána detekční protilátka konjugovaná s biotinem v objemu 100  $\mu$ l na jamku, destička byla překryta nepropustnou folií a inkubována 1 hodinu pro detekci TNF- $\alpha$  a 3 hodiny pro detekci IL-6 při laboratorní teplotě. Po uplynutí stanovené doby byl obsah jamek aspirován a destičky 5krát propláchnuty. Následně byla přidána křenová peroxidasa konjugovaná se streptavidinem v objemu 100  $\mu$ l na jamku, destička byla překryta folií a ponechána 30 minut při laboratorní teplotě. Obsah jednotlivých jamek byl opět odstraněn, destička byla 5krát promyta a následně vysušena. Do každé jamky byl přidán roztok substrátu tetramethylbenzidinu o objemu 100  $\mu$ l a destička byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po uplynutí doby inkubace byl do každé jamky přidán tzv. „stop pufr“ o objemu 100  $\mu$ l pro ukončení reakce. Měření absorbance bylo uskutečněno při vlnové délce 450 nm pomocí multifunkční čtečky mikrotitračních destiček Multi-Mode Reader Microplate Synergy 2 (BioTek). Jednotlivé experimenty byly provedeny v hexaplikátech ve 4 časově nezávislých experimentech.

### **5.7.2. Griessova reakce**

Další metodou pro sledování protizánětlivého účinku je použití Griessovy reakce, pomocí níž byla sledována produkce NO, která byla indukována v buňkách SIM-A9 působením myšího INF- $\gamma$ . NO se účastní mnoha fyziologických procesů, mezi které patří mimo jiné podíl na imunitní odpovědi. Vzhledem k extrémně krátkému biologickému

poločasu tohoto plynného volného radikálu byly vyvinuty alternativní strategie pro detekci jeho produktů rozpadu.

Jedná se tedy o nepřímé stanovení NO, které zahrnuje spektrofotometrické měření stabilních produktů rozkladu, a to dusičnanů ( $\text{NO}_3^-$ ) a dusitanů ( $\text{NO}_2^-$ ). Tato metoda vyžaduje, aby  $\text{NO}_3^-$  byl redukován na  $\text{NO}_2^-$ , který je následně stanoven Griessovou reakcí. Jde o dvoustupňovou diazotační reakci. Jako nitrosační činidlo zde vystupuje oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ).  $\text{N}_2\text{O}_3$  reaguje se sulfanilamidem za vzniku diazoniového iontu, který je potom spojen s N-(1-naftyl)ethylendiaminem za vzniku azosloučeniny obsahující chromofor, který silně absorbuje světlo při vlnové délce 548 nm (obrázek 13) (Bryan a Grisham 2007).



**Obrázek 13** Schéma Griessovy reakce. Převzato a přeloženo z Bryan a Grisham 2007.

### Postup stanovení

Ke sledování změny hladiny NO v kultivačním médiu byly použity buňky SIM-A9. Buňky byly v den experimentu nasazeny do 96jamkové destičky o hustotě  $4 \times 10^3$  buněk na jamku v kultivačním médiu DMEM/F12. Přes noc byla připravená destička kultivována v  $\text{CO}_2$  inkubátoru. Další den byl k buňkám přidán IFN- $\gamma$  ve výsledné koncentraci 3 ng/ml a následně byly přidány studované látky v koncentraci, která odpovídala MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Takto ovlivněné buňky byly inkubovány v  $\text{CO}_2$  inkubátoru při 37 °C 48 hodin. Pro pozitivní kontrolu byly použity buňky inkubované



pouze s IFN- $\gamma$  a buňky inkubovány pouze v kultivačním médiu sloužily jako negativní kontrola. Po uplynutí doby inkubace bylo 90  $\mu$ l kultivačního média přepipetováno do měřicí kultivační destičky spolu s 10  $\mu$ l Griessovy reagensie. Buňky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance pomocí multidetekční čtečky mikrotitračních destiček TECAN Spark při vlnové délce 548 nm. Experimenty byly uskutečněny v triplicátech v pěti časově nezávislých experimentech.

### **5.7.3. Statické zpracování dat**

Analýza naměřených dat byla uskutečněna pomocí statistického programu GraphPad Prism (verze 6.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Toxikologické indexy  $IC_{50}$  (poloviční inhibiční koncentrace) byly vypočítány pomocí 4-parametrické nelineární regrese. Pro zpracování výsledků stanovení apoptózy, enzymové imunoanalýzy a hladiny NO byl použit program Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) s následnou statistickou analýzou pomocí softwaru GraphPad Prism. Pro stanovení statisticky významných rozdílů byla použita jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) s následnou *post hoc* analýzou dle Dunneta při statistické hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 6. Výsledky

### 6.1. Sledování cytotoxicity látek

Cytotoxicita látek byla stanovena na 2 buněčných liniích SH-SY5Y a SIM-A9 pomocí kolorimetrické metody využívající tetrazoliovou MTT sůl. Pro buněčnou linii SIM-A9 byla dále stanovena také MTC odpovídající koncentraci, která neměla vliv na buněčnou životaschopnost po 24 hodinách.

Výsledky cytotoxicity látek pro buněčnou linii SH-SY5Y jsou shrnuty v tabulce 1. Nejméně toxickou látkou pro SH-SY5Y buňky byla látka s označením 5-EM-13. Dále cytotoxicita látek stoupala v pořadí 5-EM-26, 5-EM-36, K1502, K1503 a K1504, přičemž hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých látek byly 2,2-, 3,9-,  $\geq 22,7$ -, 24,7- a 48,4krát nižší v porovnání s nejméně toxickou látkou.

**Tabulka 1** Střední toxická koncentrace ( $IC_{50}$ ) a maximální bezpečná koncentrace (MTC) studovaných látek měřená na buněčné linii SH-SY5Y ve 24hodinovém intervalu od podání. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM ze 4 nezávislých experimentů.

Studovaná látka	SH-SY5Y	
	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	MTC ( $\mu$ M)
<b>K1502</b>	>32	~32
<b>K1503</b>	29,4 $\pm$ 1,9	8
<b>K1504</b>	15,0 $\pm$ 1,5	4
<b>5-EM-13</b>	726,1 $\pm$ 51,2	32
<b>5-EM-26</b>	332,3 $\pm$ 13,5	16
<b>5-EM-36</b>	184,5 $\pm$ 7,5	16

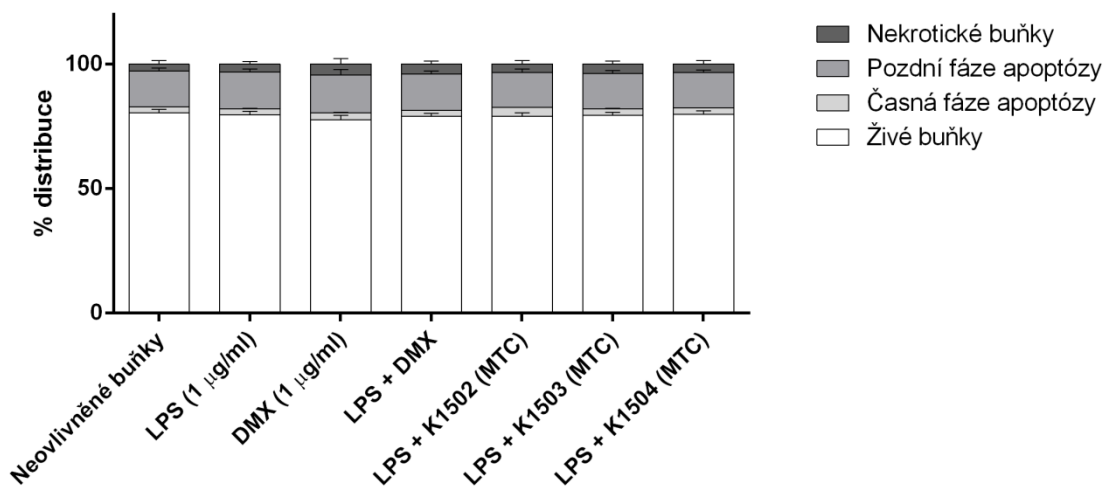
Toxikologické indexy  $IC_{50}$  a hodnoty MTC pro buněčnou linii SIM-A9 jsou zobrazeny v tabulce 2. Nejméně toxickou látkou pro tuto linii byla látka patřící do skupiny chromonů 5-EM-26, přičemž její hodnota  $IC_{50}$  byla  $470,7 \pm 23,3 \mu\text{M}$ . Na základě získaných výsledků se cytotoxicita studovaných látek dále zvyšovala v pořadí: 5-EM-13, 5-EM-36, K1502, K1503 a K1504. Toxikologické indexy  $IC_{50}$  byly u jednotlivých látek 1,3-, 2,3-, 4,1-, 25,3-, 88,8krát nižší než u nejméně toxické látky.

**Tabulka 2** Střední toxická koncentrace ( $IC_{50}$ ) a maximální bezpečná koncentrace (MTC) studovaných látek stanovena na buněčné linii SIM-A9 ve 24hodinovém intervalu od podání. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM ze 4 nezávislých experimentů.

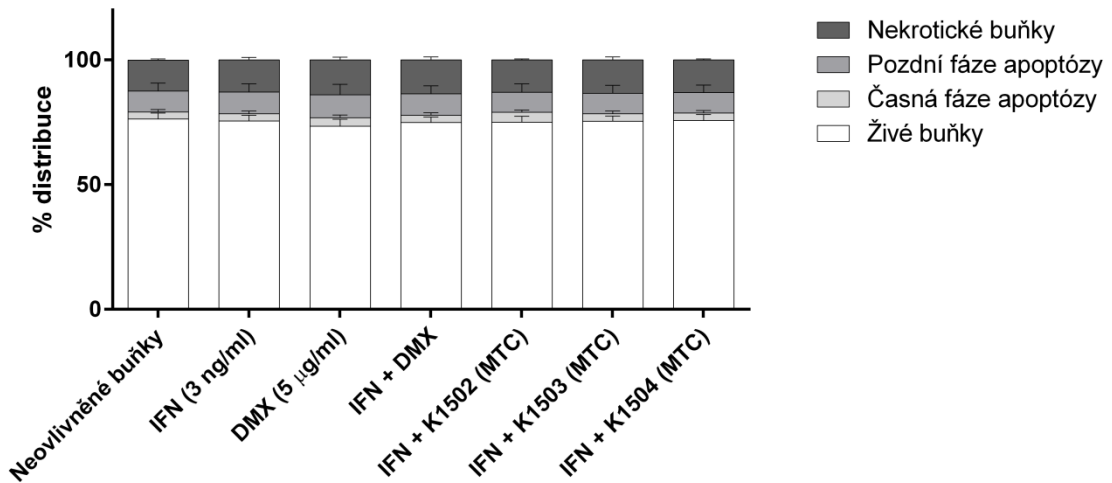
Studovaná látka	SIM A-9	
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	MTC ( $\mu\text{M}$ )
<b>K1502</b>	$115,6 \pm 4,2$	8
<b>K1503</b>	$18,6 \pm 1,7$	3
<b>K1504</b>	$5,3 \pm 0,2$	0,4
<b>5-EM-13</b>	$357,9 \pm 10,7$	16
<b>5-EM-26</b>	$470,7 \pm 23,3$	8
<b>5-EM-36</b>	$205,2 \pm 12,5$	8

## 6.2. Ověření bezpečnosti studovaných látek v prostředí zánětu

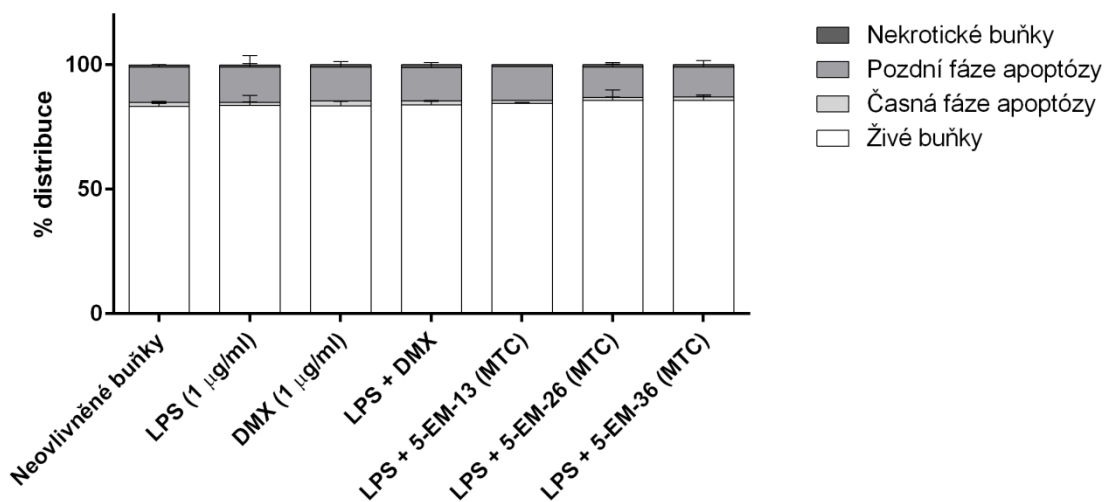
Pomocí MTT testu byly stanoveny hodnoty MTC, která neměla vliv na buněčnou životaschopnost. Tato koncentrace byla dále ověřena pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie v prostředí zánětu, který byl indukován LPS nebo myším IFN- $\gamma$ . V případě indukce zánětu pomocí LPS byla bezpečnost těchto koncentrací ověřena po 24 hodinách inkubace (obrázek 14 a 15). Při indukci zánětu IFN- $\gamma$  byla bezpečnost ověřena po 48hodinové inkubaci se studovanými látkami (obrázek 16 a 17). Ve všech případech nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v porovnání s neovlivněnou kontrolou.



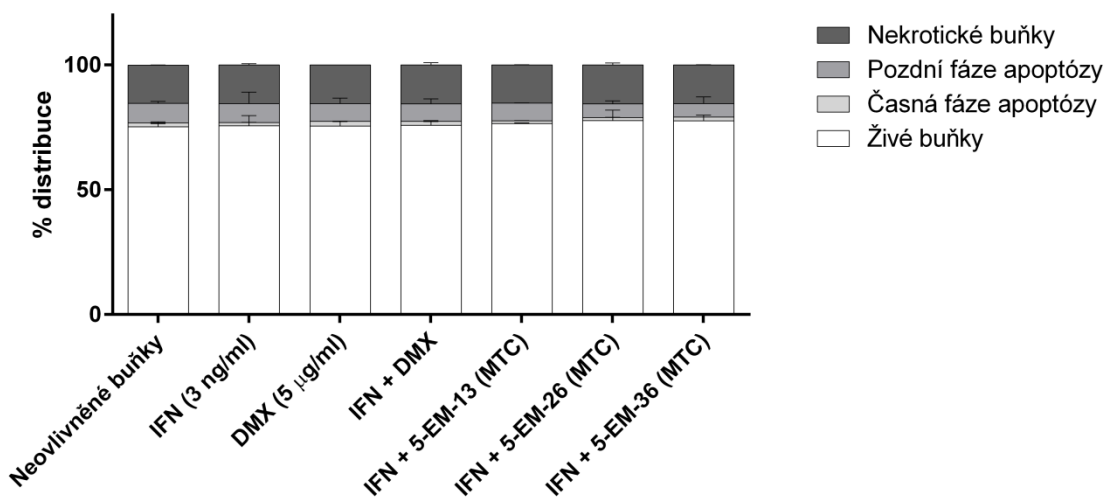
**Obrázek 14** Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění 2-propargylamino-naftochinony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací LPS (přidáno 1 h po ovlivnění naftochinony) po celkové 24hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z 3 nezávislých experimentů.



**Obrázek 15** Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění 2-propargylamino-naftochinony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací IFN- $\gamma$  (přidáno 1 h po ovlivnění naftochinony) po celkové 48hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z 3 nezávislých experimentů.



**Obrázek 16** Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění chromony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací LPS (přidáno 1 h po ovlivnění chromony) po celkové 24hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z 3 nezávislých experimentů.



**Obrázek 17** Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění chromony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací INF- $\gamma$  (přidáno 1 h po ovlivnění chromony) po celkové 48hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z 3 nezávislých experimentů.

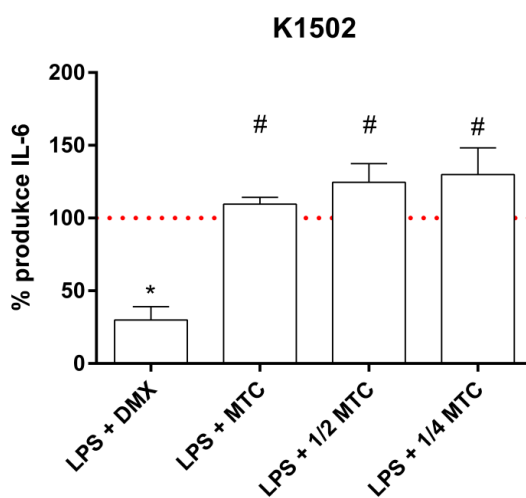
### 6.3. Sledování protizánětlivých účinků studovaných látek pomocí buněčné linie SIM-A9

Pro sledování protizánětlivých účinků studovaných látek byla použita mikroglíální buněčná linie SIM-A9. Pomocí metody ELISA v sendvičovém uspořádání byly sledovány dva cytokiny, a to IL-6 a TNF- $\alpha$ . Protizánětlivý účinek byl sledován po stimulaci buněk LPS s předchozím ovlivněním buněk studovanými látkami.

Dále byl sledován také vliv studovaných látek na změnu hladiny NO v kultivačním médiu po stimulaci buněk myším IFN- $\gamma$  v kombinaci se studovanými sloučeninami. Pro toto stanovení byla použita kolorimetrická metoda využívající Griessovu reakci.

#### 6.3.1. Sledování produkce cytokinu IL-6

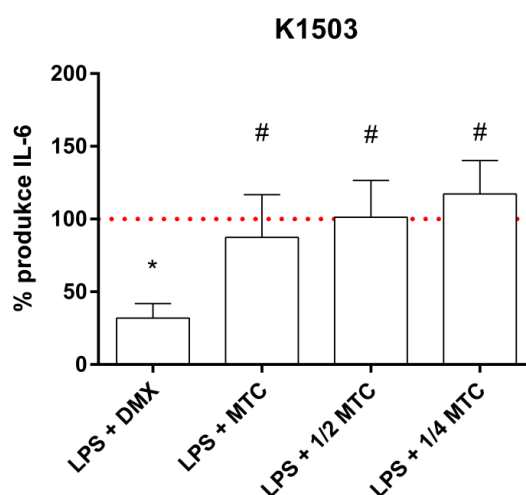
Změna hladiny cytokinu IL-6 v kultivačním médiu buněk po jejich ovlivnění DMX nebo látkou K1502 v koncentracích, které odpovídaly MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC nebo  $\frac{1}{4}$  MTC je znázorněna na obrázku 18.



**Obrázek 18** Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1502 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1502. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

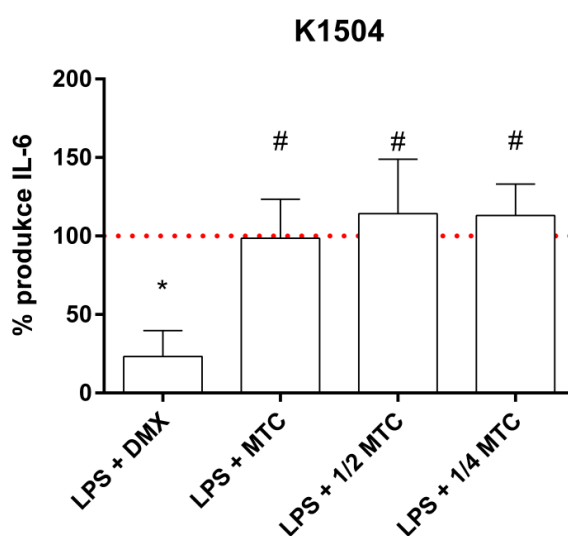
Z výsledků je zřejmé, že po stimulaci LPS v kombinaci s DMX došlo k poklesu produkce IL-6 3,3krát. Naopak po stimulaci buněk LPS v kombinaci s látkou K1502 nebyl pozorován, žádný signifikantní rozdíl. V porovnání s DMX byla hladina IL-6 u všech testovaných koncentrací této látky signifikantně vyšší, a to pro MTC 3,7násobně, ½ MTC 4,2násobně a ¼ MTC 4,3násobně.

Efekt látky K1503 na hladinu IL-6 v kultivačním médiu indukovanou pomocí LPS je znázorněn na obrázku 19. Jako standardní léčba byl opět použit DMX, který snížil množství IL-6 v médiu 3,1krát. V porovnání pozitivní kontrolou nevykazovala látka K1503 jakýkoliv signifikantní efekt. V případě porovnání jednotlivých testovaných koncentrací látky K1503 s DMX došlo ke zvýšení množství IL-6 v médiu 2,7-, 3,2- a 3,7krát.



**Obrázek 19** Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1503 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1503. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

Změna produkce IL-6 buňkami SIM-A9 po jejich stimulaci LPS a následnou léčbou DMX a látkou K1504 je znázorněna na obrázku 20. V případě kombinace LPS a DMX nastal 4,3násobný pokles množství IL-6 v porovnání s pozitivní kontrolou. Stejně jako u předcházejících látek, nebyla detekována žádná změna hladiny IL-6 v případě ovlivnění buněk LPS v kombinaci s látkou K1504 v porovnání se skupinou ovlivněnou pouze LPS. Naopak v porovnání s DMX byla hladina IL-6 4,2-, 4,9- a 4,9krát vyšší při testovaných koncentracích, které odpovídaly MTC, ½ MTC a ¼ MTC.



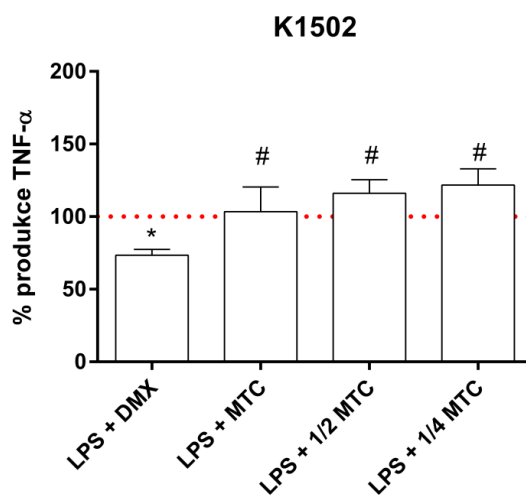
**Obrázek 20** Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1504 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1504. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

Na skupině studovaných látek patřící mezi chromony nebylo z epidemiologických a časových důvodů možné stanovit hladiny IL-6 po stimulaci buněk LPS s následnou léčbou těmito látkami.



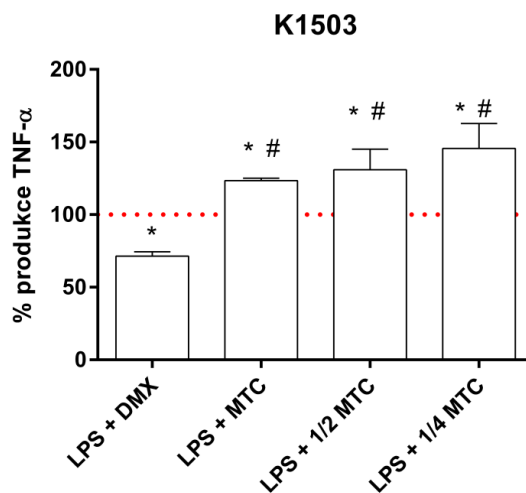
### 6.3.2. Sledování produkce cytokinu TNF- $\alpha$

Dalším sledovaným cytokinem byl TNF- $\alpha$ . Data získaná po stimulaci buněk LPS s předchozím ovlivněním DMX a látkou K1502 jsou znázorněny na obrázku 21. Ke snížení hladiny cytokinu TNF- $\alpha$  došlo pouze v případě, když byl k buňkám přidán také DMX, a to 1,4krát. Při použití látky K1502 nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v porovnání s pozitivní kontrolou, kdy byly buňky ovlivněny pouze LPS. V porovnání s buňkami, které byly kultivovány s kombinací LPS a DMX, došlo k statisticky významnému nárůstu produkce TNF- $\alpha$  po přidání látky K1502 a LPS, a to 1,4-, 1,6- a 1,7krát.

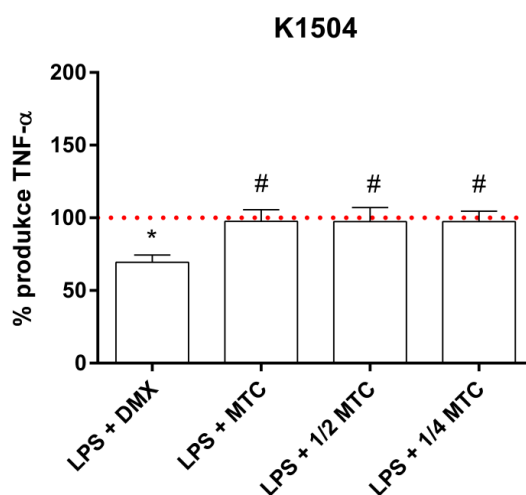


**Obrázek 21** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1502 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1502. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

Na obrázku 22 jsou znázorněny výsledky produkce TNF- $\alpha$  po stimulaci buněk LPS s předchozím ovlivněním DMX nebo látkou K1503. Signifikantní pokles hladiny tohoto cytokinu nastal v případě kultivace buněk s DMX, a to 1,4krát. Naopak po přidání studované látky K1503 ve všech třech koncentracích došlo k dalšímu zhoršení zánětlivé odpovědi. Produkce TNF- $\alpha$  byla dále zvýšena 1,2-, 1,3- a 1,5násobně v porovnání s pozitivní kontrolou. Produkce byla tím pádem signifikantně vyšší i v porovnání s buňkami, které byly inkubovány s kombinací LPS a DMX, a to 1,7-, 1,8- a 2,0krát.



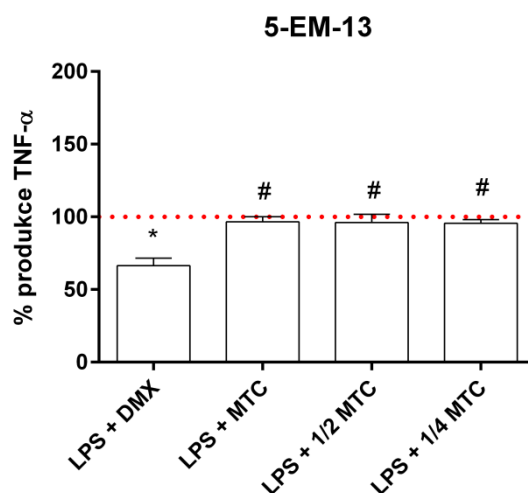
**Obrázek 22** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1503 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1503. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.



**Obrázek 23** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1504 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1504. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

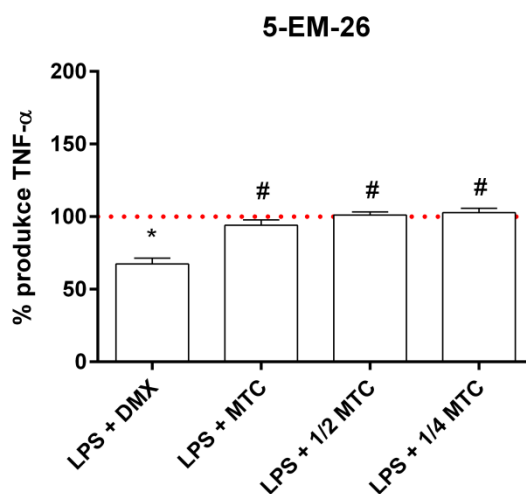
V případě studované látky K1504 (obrázek 23) nebyl opět pozorován v porovnání s pozitivní kontrolou žádný statisticky významný rozdíl. Při ovlivnění buněk LPS a následně DMX došlo k 1,4násobnému poklesu produkce TNF- $\alpha$ . V případě testovaných koncentrací látky K1504 docházelo ve srovnání s DMX k nárůstu TNF- $\alpha$  v kultivačním médiu, a to při všech použitých koncentracích 1,4krát.

V další části byly testovány nově syntetizované chromony a jejich vliv na hladinu TNF- $\alpha$  po stimulaci buněk LPS. Na obrázku 24 jsou shrnuty výsledky k látce 5-EM-13. Kromě DMX, kdy byla hladina cytokinu TNF- $\alpha$  snížena 1,5krát, nebylo pozorováno žádné jiné signifikantní snížení množství tohoto cytokinu. V případě porovnání DMX s látkou 5-EM-13, došlo opět k zvýšení produkce TNF- $\alpha$  u všech testovaných koncentracích, a to 1,5krát.



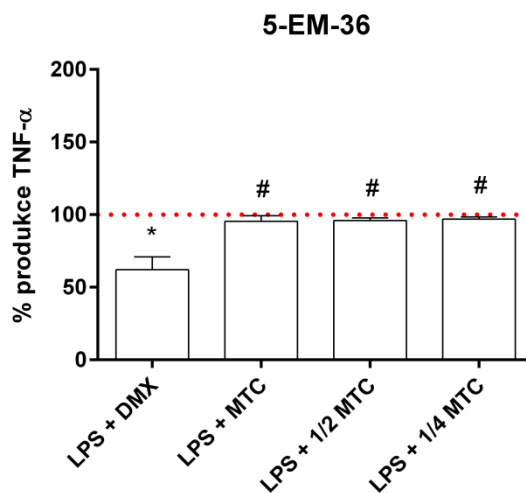
**Obrázek 24** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-13 v koncentraci odpovídající její MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-13. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

Druhou studovanou látkou z této skupiny byla sloučenina s označením 5-EM-26 (obrázek 25), která opět nevykazovala žádné protizánětlivé účinky. Referenční látka DMX naopak snižovala produkci TNF- $\alpha$  1,5násobně. V porovnání s buňkami kultivovanými s kombinací LPS a DMX, došlo po ovlivnění buněk látkou 5-EM-26 k statisticky významnému nárůstu produkce TNF- $\alpha$ , a to 1,3krát při nejvyšší sledované koncentraci a 1,5krát při dvou nižších koncentracích.



**Obrázek 25** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-26 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-26. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

Stejný efekt byl pozorován také při použití poslední studované sloučeniny 5-EM-36 (obrázek 26). DMX v tomto případě snížil množství TNF- $\alpha$  vyprodukovaného buňkami 1,6krát. Naopak při kultivaci buněk s touto látkou došlo v porovnání s DMX ke zvýšení produkce TNF- $\alpha$  u všech použitých koncentracích stejně, a to 1,5krát.

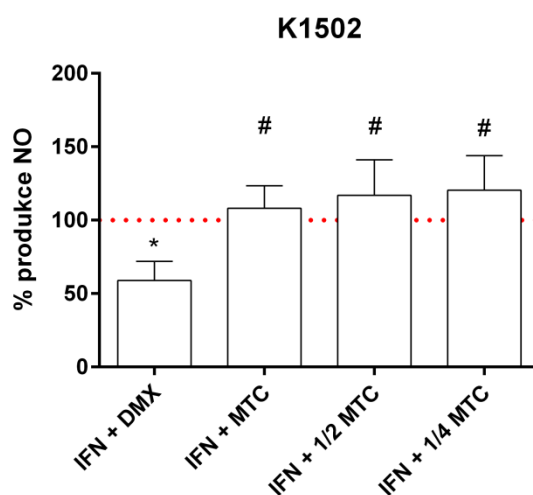


**Obrázek 26** Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-36 v koncentraci odpovídající její MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-36. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.

### 6.3.3. Sledování hladiny NO

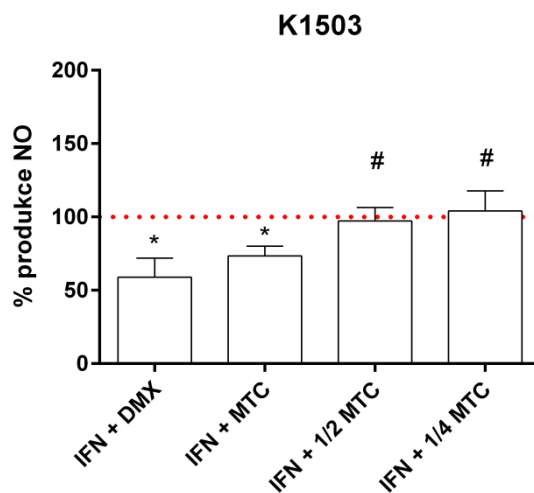
Pomocí Griessovy reakce byla stanovena hladina NO v kultivačním médiu buněk po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  po 48hodinovém časovém intervalu. Studovanými látkami byly naftochinony a chromony. Jako standardní protizánětlivý lék byl opět použit DMX, který oproti pozitivní kontrole snižoval produkci NO o 41 %.

První studovanou látkou byl naftochinon K1502 (obrázek 27). V porovnání s DMX byla produkce NO do kultivačního média v případě látky K1502 1,8- (MTC), 2,0- (1/2 MTC) a 2,1násobně (1/4 MTC) vyšší.

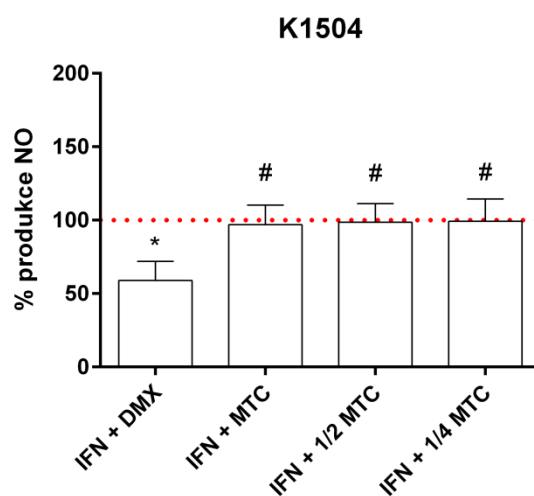


**Obrázek 27** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1502 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.

Ve skupině naftochinonů byla zaznamenána jedna látka, konkrétně K1503 (obrázek 28), která při nejvyšší testované koncentraci odpovídající MTC této látky způsobila pokles NO o 27 %. Mezi efektem DMX a nejvyšší koncentrací látky K1503 nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. U koncentrací odpovídajících  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC byla hladina NO v porovnání s DMX zvýšena 1,6- a 1,8krát.



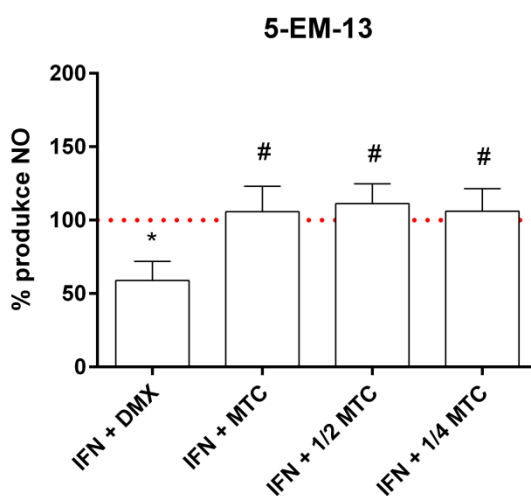
**Obrázek 28** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1503 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.



**Obrázek 29** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1504 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.

V případě posledního studovaného naftochinonu K1504 (obrázek 29) byla hladina NO v porovnání s DMX 1,6- (v případě koncentrace odpovídající MTC) nebo 1,7násobně vyšší (v případě koncentrací  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC).

Ve druhé skupině látek (deriváty chromonů) nebyl detekován u žádné studované látky signifikantní pokles produkce NO do kultivačního média. U první sledované sloučeniny, 5-EM-13 (obrázek 30), byl v porovnání se skupinou ovlivněnou DMX pozorován 1,8- (MTC), 1,9- ( $\frac{1}{2}$  MTC) a 1,8- ( $\frac{1}{4}$  MTC) násobný nárůst hladiny NO.

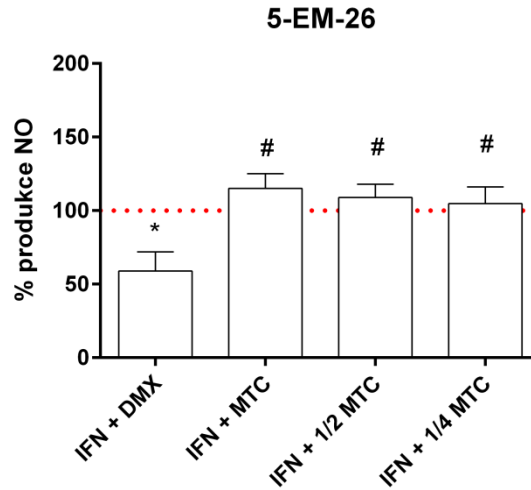


**Obrázek 30** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-13 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.

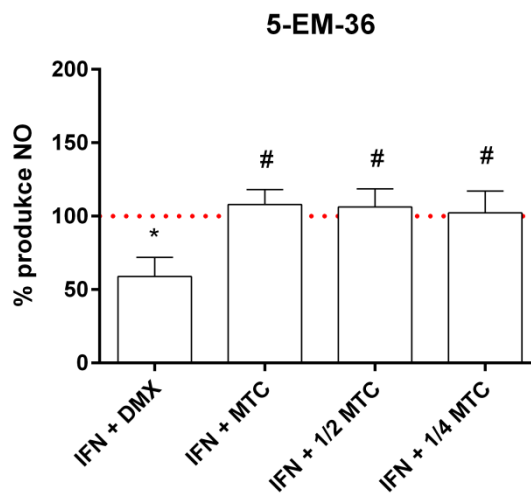
V případě druhé studované látky z této skupiny byl detekován při použité koncentraci MTC 2,0násobný nárůst NO (obrázek 31). Při použití dvou nižších koncentrací  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC byl sledován v obou případech 1,8násobný nárůst NO v porovnání s buňkami ovlivněnými DMX.

Poslední látkou z této skupiny byl chromon s označením 5-EM-36 (obrázek 32). V porovnání se standardní protizánětlivou látkou DMX došlo ke zvýšení hladiny při jednotlivých testovaných koncentracích 1,8- (MTC a  $\frac{1}{2}$  MTC) a 1,7krát.





**Obrázek 32** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-26 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.



**Obrázek 31** Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-36 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů.

## 7. Diskuse

Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo sledování protizánětlivých účinků nově syntetizovaných látek, a to 3 naftochinonů a 3 chromonů. Naftochinon a jeho deriváty disponují širokým spektrem farmakologických účinků. Jedná se například o antibakteriální, antifungální, antivirální, antiparazitární, insekticidní, antiflogistické nebo antipyretické vlastnosti. (Babula et al. 2007) Z hlediska modulace neurozánětu stojí za zmínku schopnost 1,4-naftochinonu významně inhibovat produkci NO indukovanou LPS. (Liu a kol. 2020). Deriváty 1,4-naftochinonu rovněž aktivují dráhy adaptivní reakce na stres v neuronech a chrání je před silným stresem. Nedávné studie pomohly osvětlit neuroprotektivní účinky vlivem inhibice agregace A $\beta$ . Tento fakt naznačuje, že skelet naftochinonu může být použit jako základ léčiv AD. (Campora et al. 2021) Podobné pleiotropní účinky vykazují i chromony. (Liu et al. 2012) Protizánětlivý účinek byl prokázán u několika derivátů chromonu. Tento účinek vychází z působení různých molekulárních mechanismů zahrnujících např. inhibici cyklooxygenasy, lipooxygenasy-5 nebo produkce NO. (Silva et al. 2016)

Výše jmenované vlastnosti tak ukazují, že by deriváty naftochinonu a chromonu mohly najít uplatnění jako potenciální léčiva v terapii zánětlivých chorob včetně neurozánětu. Na druhou stranu bývá ale jejich využití často komplikováno poměrně vysokou toxicitou. (Babula et al. 2007; Bouhenna et al. 2018) Před stanovením protizánětlivých účinků bylo proto nejprve nutné cytotoxicitu studovaných látek otestovat. Cytotoxicita byla stanovena na 2 buněčných liniích SIM-A9 a SH-SY5Y. Buněčná linie SIM-A9 bývá využívána v zánětlivých *in vitro* studiích k analýze změn intracelulárních anebo sekrečních zánětlivých mediátorů. Zmíněná buněčná linie vykazuje klíčové vlastnosti primárních mikroglií a slouží jako snadno dostupná alternativa k primárním buňkám pro dané studie. (Dave et al. 2020; Nagamoto-Combs et al. 2014) Použití buněčné linie SH-SY5Y v *in vitro* systémech je důležité z pohledu kontinuální proliferace. Tyto buňky jsou navíc z biochemického i funkčního hlediska velmi podobné neuronům. (Kovalevich a Langford 2013; Biedler et al. 1973)

Pro vyhodnocení cytotoxicity byly použity hodnoty toxikologických indexů IC<sub>50</sub> po 24hodinové inkubaci s nově syntetizovanými deriváty. Látky ze skupiny chromonů vykazovaly u obou buněčných linií nižší toxicitu. Pro linii SIM-A9 se jevila nejméně toxickou sloučenina 5-EM-26. Nejméně toxickou látkou pro SH-SY5Y buňky byla látka

s označením 5-EM-13. Naopak nejvíce toxickou látku pro obě buněčné linie představoval naftochinon K1504. Toxicita K1504 je pravděpodobně podmíněna volnými hydroxylovými skupinami v poloze 5 a 8. V případě benzyloxy (K1503) nebo methoxy (K1502) skupiny v poloze 8 (bez současné přítomnosti volné fenolické skupiny v poloze 5) toxicita klesala.

Pomocí MTT testu byly rovněž vyhodnoceny maximální bezpečné koncentrace látek (MTC), jež neměly v 24hodinovém intervalu vliv na buněčnou viabilitu. Znalost těchto hodnot je důležitá pro další testování, a to ze dvou hledisek. Umožňuje jednak sjednotit hodnocení účinku nově syntetizovaných látek na maximálních koncentracích, které neovlivňují viabilitu buněčného systému. Navíc pomáhá vyloučit dopad změn počtu buněk na produkci cytokinů. Vlivem zánětu se její hodnota může hypoteticky měnit. Z tohoto důvodu je nutné bezpečnost MTC otestovat i po zánětlivé stimulaci. Na druhou stranu zánětlivé prostředí významně mění aktivitu reduktas. (Quattrini a La Motta 2019; Zolfaghari et al. 2012) To může vést k interferenci s výsledky MTT testu, proto byla pro potvrzení MTC zvolena odlišná metoda. Byla použita mikrokapilární průtoková cytometrie, při níž byly buňky značeny annexinem V a 7-AAD. Pomocí těchto dvou barviv lze v populaci odlišit živé, časně a pozdně apoptotické a nekrotické buňky. (Demchenko 2013; Muckova et al. 2019a) Jako buněčný model byla v tomto i v následujících experimentech použita pouze mikrogliální buněčná linie SIM-A9. Mikroglie za patologických podmínek produkují zánětlivé molekuly (např. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, různé chemokiny, ROS, RNS a NO), které mohou poškodit různé struktury (např. neuronální DNA a proteiny) a v konečném důsledku vyvolat apoptózu. (Sibbitts a Culbertson 2020) Pro indukci prozánětlivého stavu u SIM-A9 buněk byl použit dva odlišné stimuly - bakteriální LPS a myší IFN- $\gamma$ . V případě indukce zánětu pomocí LPS byla bezpečnost těchto koncentrací ověřena po 24 hodinách inkubace. Při indukci zánětu IFN- $\gamma$  byla bezpečnost ověřena po 48hodinové inkubaci s studovanými látkami. Tyto časové intervaly odpovídaly následujícím modelům hodnotícím protizánětlivou odpověď. Ve všech případech nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v porovnání s neovlivněnou kontrolou, čímž byla potvrzena bezpečnost MTC studovaných látek. Stimulace buněčné linie SH-SY5Y prozánětlivými stimuly je rovněž možná, avšak vyžaduje nejprve diferenciaci pomocí faktorů, jako je např. kyselina retinová. (Das et al. 2012) Diferenciace SH-SY5Y buněk nicméně nebyla v rámci diplomové práce testována.

Poslední série experimentů byla zaměřena na hodnocení protizánětlivého účinku nových látek. Látky byly aplikovány v koncentracích odpovídající 100 %, 50 % nebo 25 % MTC. Po hodinové inkubaci následovala stimulace LPS nebo IFN- $\gamma$ . LPS působí prostřednictvím Toll-like receptoru 4, po jehož aktivaci spouští uvolňování prozánětlivých a cytotoxických látek, jako je TNF- $\alpha$  a IL-6. (Nagamoto-Combs et al. 2014; Ta et al. 2019) Stimulace SIM-A9 buněk závisí na koncentraci LPS a době inkubace. (Dave et al. 2020) V případě našeho modelu byla produkce obou cytokinů do kultivačního media hodnocena v 23hodinovém intervalu po aplikaci LPS pomocí metody ELISA. Pro stanovení IL-6 byly použity pouze látky ze skupiny naftochinonů, u nichž nebyl žádný vliv na hladiny IL-6 pozorován. Rovněž nebyla pozorována jakákoliv inhibice produkce TNF- $\alpha$ . Naopak látka K1503 ve všech zvolených koncentracích expresi TNF- $\alpha$  zvyšovala.

Stanovení hladiny NO v kultivačním médiu buněk pomocí Griessovy reakce představovalo druhou metodu sledování protizánětlivého účinku. K stimulaci NO byl v tomto případě použit INF- $\gamma$ . Při interakci INF- $\gamma$  se svým receptorem dochází k aktivaci cytoplazmatických kinas (Jak1, Jak2), které regulují transkripční faktory ovlivňující expresi indukovatelné NO-syntasy. (Blanchette et al. 2003) Z důvodu poměrně nízké odpovědi buněk SIM-A9 na podání INF- $\gamma$  v 23hodinovém intervalu (nepublikovaná data) byl interval stimulace prodloužen o 24 hodin. V něm již byla odpověď pro hodnocení protizánětlivého účinku dostatečná. Ve skupině naftochinonů byla zaznamenána jedna látka, konkrétně K1503, která při nejvyšší testované koncentraci odpovídající MTC způsobila pokles NO o 27 %. U ostatních derivátů naftochinonu a chromonu nebyl jakýkoliv signifikantní vliv na produkci NO detekován.

## 8. Závěr

Diplomová práce byla zaměřena na testování cytotoxicity a protizánětlivého účinku nově syntetizovaných látek ze skupiny naftochinonů (K1502, K1503 a K1504) a chromonů (5-EM-13, 5-EM-26 a 5-EM-36). Buněčná viabilita byla měřena na neuroblastomové linii SH-SY5Y a mikroglialní linii SIM-A9. Deriváty naftochinonů vykazovaly ve srovnání se sloučeninami chromonů vyšší cytotoxicitu. Nejvíce toxickou látkou byla K1504. Protizánětlivý účinek byl hodnocen pouze na mikroglialní linii SIM-A9. Žádná z nově syntetizovaných látek neovlivňovala indukci zánětlivé reakce po stimulaci LPS (v 24hodinovém intervalu) nebo IFN- $\gamma$  (v 48hodinovém intervalu) s jedinou výjimkou, kterou představoval naftochinon K1503. K1503 v koncentraci odpovídající MTC snížil po následné stimulaci IFN- $\gamma$  produkci NO do kultivačního média. V přítomnosti LPS naopak zvyšoval sekreci TNF- $\alpha$ , avšak neovlivňoval produkci IL-6. Ačkoliv výsledky diplomové práce u nových derivátů naftochinonů a chromonů protizánětlivé účinky neprokázaly, naftochinon K1503 by mohl sloužit jako výchozí struktura pro hledání dalších biologicky účinných látek.

## 9. Seznam použitých zkratek

7-AAD	7-aminoaktinomycin D
A $\beta$	Amyloid beta
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
APC	Antigen prezentující buňka
APP	Amyloidní prekurzorový protein
BBB	Hematoencefalická bariéra
COMT	Katechol-O-methyltransferasa
CNS	Centrální nervový systém
COX-2	Cyklooxygenasa-2
DA	Dopamin
DMX	Dexamethason
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GA	Glatiramer-acetát
Glu	Glutamát
ChEI	Inhibitor cholinesterasy
iGluR	Ionotropní glutamátový receptor
IL-1	Interleukin-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-23	Interleukin-23
INF- $\gamma$	Interferon gamma
INF- $\beta$	Interferon beta
LB	Lewyho tělíska

L-Dopa	Levodopa
LPS	Lipopolysacharid
MAO-B	Monoaminoxidasa-B
MBP	Myelinbazický protein
MTC	Maximální tolerovatelná koncentrace
NFT	Neurofibrilární klubka
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMDAR	Receptor pro N-methyl-D-aspartát
NO	Oxid dusnatý
NP	Neuritické plaky
NT	Neurotransmitter
PD	Parkinsonova choroba
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PNS	Periferní nervový systém
PS	Fosfatidylserin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RR-RS	Relaps-remitentní forma roztroušené sklerózy
RS	Roztroušená skleróza
S1P	Sfingosin-1-fosfát
SOD	Superoxid dismutasa
TGF- $\beta$	Transformující růstový faktor beta
Th <sub>1</sub>	Subpopulace 1 pomocných T-lymfocytů
Th <sub>2</sub>	Subpopulace 2 pomocných T-lymfocytů
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor alfa
Treg	Regulační T-lymfocyt
Zn	Zinek

## 10. Seznam obrázků

- Obrázek 1 Glie zastoupené v PNS – Schwannovy a satelitní buňky. Převzato a přeloženo z <https://www.technologynetworks.com/neuroscience/news/schwann-cell-discovery-rewrites-the-textbook-on-the-peripheral-nervous-system-321505>. ..... 15
- Obrázek 2 Zobrazení zástupců neurogliálních buněk a ependymocytů. Převzato a přeloženo z <https://neurosciencenews.com/glia-cells-schizophrenia-7139/>. ..... 16
- Obrázek 3 Amyloidní plaky (růžová barva) a neurofibrilární klubka (černá barva) v mozku postihnutém AD. Převzato z Zafeiris et al. 2018. .... 25
- Obrázek 4 Imunohistochemické zobrazení  $\alpha$ -Syn a Lewyho tělíska v neuronu. (A) Normální neuron bez přítomnosti  $\alpha$ -Syn v cytoplazmě. (B) Neuron obsahující abnormální agregát  $\alpha$ -Syn tvořen tzv. „včasným“ Lewyho tělískem (označen hvězdičkou) a vlastní Lewyho tělísko (označen hvězdičkou) a vlastní Lewyho tělísko (označeno šipkou). Převzato a přeloženo z Wakabayashi et al. 2007..... 29
- Obrázek 5 Schematické znázornění poškození myelinových obalů nervů při RS. Převzato a přeloženo z <https://www.beaumont.org/conditions/multiple-sclerosis>. ..... 32
- Obrázek 6 Buněčná linie SIM-9. Snímek byl pořízen pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse TS100-F, Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveným digitální kamerou (AM7023CT Dino-Lite, Nová Tchaj-pej, Taiwan) při zvětšení 200 x. .... 45
- Obrázek 7 Buněčná linie SH-SY5Y. Snímek byl pořízen pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Eclipse TS100-F, Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveným digitální kamerou (AM7023CT Dino-Lite, Nová Tchaj-pej, Taiwan) při zvětšení 200 x. .... 46
- Obrázek 8 Výstup z mikropilárního průtokového cytometru, který vyjadřuje celkový počet buněk (vlevo) a procento životaschopných a mrtvých buněk (vpravo). ..... 49
- Obrázek 9 Studované látky patřící do skupiny naftochinonů. .... 49
- Obrázek 10 Studované látky patřící do skupiny chromonů. .... 50
- Obrázek 11 Externalizace PS u apoptické buňky a vazba annexinu V. Převzato a přeloženo z <https://abbkineeuro.wordpress.com/2018/07/06/abfluor-488-annexin-v-apoptosis-detection-kit-from-abbkine/>. .... 52
- Obrázek 12 Schéma sendvičového provedení ELISA testu. Převzato a přeloženo z <https://www.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>. ..... 54



Obrázek 13 Schéma Griessovy reakce. Převzato a přeloženo z Bryan a Grisham 2007. ....	56
Obrázek 14 Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění 2-propargylamino-naftochinony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací LPS (přidáno 1 h po ovlivnění naftochinony) po celkové 24hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z 3 nezávislých experimentů. ....	60
Obrázek 15 Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění 2-propargylamino-naftochinony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací IFN- $\gamma$ (přidáno 1 h po ovlivnění naftochinony) po celkové 48hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z 3 nezávislých experimentů.....	60
Obrázek 16 Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění chromony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací LPS (přidáno 1 h po ovlivnění chromony) po celkové 24hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr± SEM z 3 nezávislých experimentů.....	61
Obrázek 17 Apoptotický profil SIM-A9 buněk po jejich ovlivnění chromony v koncentraci, která odpovídala maximální bezpečné koncentraci jednotlivých látek a jejich stimulací INF- $\gamma$ (přidáno 1 h po ovlivnění chromony) po celkové 48hodinové inkubaci. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z 3 nezávislých experimentů.....	61
Obrázek 18 Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1502 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1502. Symbol * vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.....	62
Obrázek 19 Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1503 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1503. Symbol * vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů.....	63

- Obrázek 20 Produkce cytokinu IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1504 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1504. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 64
- Obrázek 21 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1502 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1502. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 65
- Obrázek 22 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1503 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1503. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 66
- Obrázek 23 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1504 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1504. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 66
- Obrázek 24 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-13 v koncentraci odpovídající její MTC, ½ MTC a ¼ MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-13. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 67

- Obrázek 25 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-26 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-26. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 68
- Obrázek 26 Produkce cytokinu TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou 5-EM-36 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou 5-EM-36. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným LPS ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací LPS a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z hexaplikátů ze 4 časově nezávislých experimentů..... 69
- Obrázek 27 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1502 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 70
- Obrázek 28 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1503 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 71
- Obrázek 29 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou K1504 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 71

- Obrázek 30 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-13 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 72
- Obrázek 31 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-36 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 73
- Obrázek 32 Produkce NO buněčnou linií SIM-A9 po jejich stimulaci IFN- $\gamma$  a následným ovlivněním buněk DMX a látkou 5-EM-26 v koncentracích odpovídajících MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými se samotným IFN ( $p \leq 0,05$ ). Symbol # vyjadřuje statistiky významný rozdíl v porovnání s buňkami inkubovanými spolu s kombinací IFN a DMX ( $p \leq 0,05$ ). Data jsou vyjádřena jako průměr  $\pm$  SEM z triplikátů z 5 časově nezávislých experimentů. .... 73

## 11. Seznam tabulek

- Tabulka 1 Střední toxická koncentrace ( $IC_{50}$ ) a maximální bezpečná koncentrace (MTC) studovaných látek měřená na buněčné linii SH-SY5Y ve 24hodinovém intervalu od podání. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM ze 4 nezávislých experimentů. .... 58
- Tabulka 2 Střední toxická koncentrace ( $IC_{50}$ ) a maximální bezpečná koncentrace (MTC) studovaných látek stanovena na buněčné linii SIM-A9 ve 24hodinovém intervalu od podání. Hodnoty  $IC_{50}$  jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM ze 4 nezávislých experimentů. .... 59

## 12. Seznam použité literatury

AKIYAMA, Haruhiko, Steven BARGER, Scott BARNUM, Bonnie BRADT, Joachim BAUER, Greg M. COLE, Neil R. COOPER, Piet EIKELENBOOM, Mark EMMERLING, Berndt L. FIEBICH, Caleb E. FINCH, Sally FRAUTSCHY, W.S.T. GRIFFIN, Harald HAMPEL, Michael HULL, Gary LANDRETH, Lih-Fen LUE, Robert MRAK, Ian R. MACKENZIE, Patrick L. MCGEER, M. Kerry O'BANION, Joel PACHTER, Guilio PASINETTI, Carlos PLATA-SALAMAN, Joseph ROGERS, Russell RYDEL, Yong SHEN, Wolfgang STREIT, Ronald STROHMEYER, Ikuo TOOYOMA, Freek L. VAN MUISWINKEL, Robert VEERHUIS, Douglas WALKER, Scott WEBSTER, Beatrice WEGRZYNIAK, Gary WENK a Tony WYSS-CORAY, 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. **21**(3), 383–421. ISSN 0197-4580.

ATTWELL, David, Alastair M. BUCHAN, Serge CHARPAK, Martin LAURITZEN, Brian A. MACVICAR a Eric A. NEWMAN, 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* [online]. **468**(7321), 232–243. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature09613

AVILA, Jesús, José J. LUCAS, Mar PÉREZ a Félix HERNÁNDEZ, 2004. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiological Reviews* [online]. **84**(2), 361–384. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.00024.2003

AYDIN, Suleyman, 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* [online]. **72**, Festschrift to highlight the career of Abba J. Kastin as a founding editor, researcher, and educator in the peptide field, 4–15. ISSN 0196-9781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012

BABULA, P., V. ADAM, L. HAVEL a R. KIZEK, 2007. Naftochinony a jejich farmakologické vlastnosti. *Česká a slovenská farmacie*. **56**(3), 114–120.

BARNETT, Susan C., 2004. Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? *Journal of Neurotrauma* [online]. **21**(4), 375–382. ISSN 0897-7151. Dostupné z: doi:10.1089/089771504323004520

BARNUM, Christopher J. a Malú G. TANSEY, 2012. Neuroinflammation and Non-motor Symptoms: The Dark Passenger of Parkinson's Disease? *Current Neurology and Neuroscience Reports* [online]. **12**(4), 350–358. ISSN 1534-6293. Dostupné z: doi:10.1007/s11910-012-0283-6

BASU, Anirban, J. Kyle KRADY a Steven W. LEVISON, 2004. Interleukin-1: A master regulator of neuroinflammation. *Journal of Neuroscience Research* [online]. **78**(2), 151–156. ISSN 1097-4547. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/jnr.20266

BATLLE, Eduard a Joan MASSAGUÉ, 2019. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* [online]. **50**(4), 924–940. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024

BECKMAN, Joseph S, Alvaro G ESTÉVEZ, John P CROW a Luis BARBEITO, 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends in Neurosciences* [online]. **24**(11), S15–S20. ISSN 0166-2236. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-2236(00)01981-0

BECHER, Burkhard, Sabine SPATH a Joan GOVERMAN, 2017. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews. Immunology* [online]. **17**(1), 49–59. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri.2016.123

BIEDLER, J. L., L. HELSON a B. A. SPENGLER, 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*. **33**(11), 2643–2652. ISSN 0008-5472.

BLANCHETTE, Julie, Maritza JARAMILLO a Martin OLIVIER, 2003. Signalling events involved in interferon- $\gamma$ -inducible macrophage nitric oxide generation. *Immunology* [online]. **108**(4), 513–522. ISSN 0019-2805. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01620.x

BOUHENNA, Mustapha M., Nabil MAMERI, Mónica V. PÉREZ, Oualid TALHI, Khaldoun BACHARI, Artur M. S. SILVA a Walter LUYTEN, 2018. Anticancer Activity Study of Chromone and Coumarin Hybrids using Electrical Impedance Spectroscopy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* [online]. **18**(6), 854–864. ISSN 1875-5992. Dostupné z: doi:10.2174/1871520618666180130102259

BROWN, Robert H. a Ammar AL-CHALABI, 2017. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *The New England Journal of Medicine* [online]. **377**(2), 162–172. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1603471

BRYAN, Nathan S. a Matthew B. GRISHAM, 2007. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free radical biology & medicine* [online]. **43**(5), 645–657. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026

BUTT, Arthur a Alexei VERKHRATSKY, 2018. Neuroglia: Realising their true potential. *Brain and Neuroscience Advances* [online]. **2** [vid. 2021-04-15]. ISSN 2398-2128. Dostupné z: doi:10.1177/2398212818817495

CAMPORA, Marta, Valeria FRANCESCONI, Silvia SCHENONE, Bruno TASSO a Michele TONELLI, 2021. Journey on Naphthoquinone and Anthraquinone Derivatives: New Insights in Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals* [online]. **14**(1), 33. Dostupné z: doi:10.3390/ph14010033

CAPRIOTTI, Teri a Kristina TERZAKIS, 2016. Parkinson Disease. *Home Healthcare Now* [online]. **34**(6), 300–307. ISSN 2374-4529. Dostupné z: doi:10.1097/NHH.0000000000000398

- COLONNA, Marco a Oleg BUTOVSKY, 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology* [online]. **35**(1), 441–468. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358
- DAS, Nando Dulal, Mi Ran CHOI, Kyoung Hwa JUNG, Ji Hyun PARK, Hyung Tae LEE, Seung Hyun KIM a Young Gyu CHAI, 2012. Lipopolysaccharide-mediated protein expression profiling on neuronal differentiated SH-SY5Y cells. *BioChip Journal* [online]. **6**(2), 165–173. ISSN 2092-7843. Dostupné z: doi:10.1007/s13206-012-6209-1
- DAVE, Kandarp M., Lalah ALI a Devika S. MANICKAM, 2020. Characterization of the SIM-A9 cell line as a model of activated microglia in the context of neuropathic pain. *PLOS ONE* [online]. **15**(4), e0231597. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0231597
- DEANGELIS, Tracy a Fred LUBLIN, 2008. Multiple sclerosis: new treatment trials and emerging therapeutic targets. *Current Opinion in Neurology* [online]. **21**(3), 261–271. ISSN 1350-7540. Dostupné z: doi:10.1097/WCO.0b013e328300c70d
- DEMCHENKO, Alexander P., 2013. Beyond annexin V: fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology* [online]. **65**(2), 157–172. ISSN 0920-9069. Dostupné z: doi:10.1007/s10616-012-9481-y
- DISABATO, Damon, Ning QUAN a Jonathan P. GODBOUT, 2016. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *Journal of neurochemistry* [online]. **139**(Suppl 2), 136–153. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1111/jnc.13607
- DU, Xiaoguang, Xinyi WANG a Meiyu GENG, 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration* [online]. **7** [vid. 2021-01-12]. ISSN 2047-9158. Dostupné z: doi:10.1186/s40035-018-0107-y
- DUGGER, Brittany N. a Dennis W. DICKSON, 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **9**(7) [vid. 2021-05-06]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a028035
- EISENKRAFT, Arik, Avshalom FALK a Arseny FINKELSTEIN, 2013. The Role of Glutamate and the Immune System in Organophosphate-induced CNS Damage. *Neurotoxicity Research* [online]. **24**(2), 265–279. ISSN 1476-3524. Dostupné z: doi:10.1007/s12640-013-9388-1
- ERKKINEN, Michael G., Mee-Ohk KIM a Michael D. GESCHWIND, 2018. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **10**(4) [vid. 2021-05-06]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a033118
- FARHY-TSELNICKER, Isabella a Nicola J. ALLEN, 2018. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Development* [online]. **13** [vid. 2020-12-10]. ISSN 1749-8104. Dostupné z: doi:10.1186/s13064-018-0104-y



GODYŃ, Justyna, Jakub JOŃCZYK, Dawid PANEK a Barbara MALAWSKA, 2016. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological reports: PR* [online]. **68**(1), 127–138. ISSN 1734-1140. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharep.2015.07.006

GRIFFIN, W Sue T, 2006. Inflammation and neurodegenerative diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. **83**(2), 470S-474S. ISSN 0002-9165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/83.2.470S

GRUBIŠIĆ, Vladimir a Brian D. GULBRANSEN, 2017. Enteric glia: the most alimentary of all glia. *The Journal of Physiology* [online]. **595**(2), 557–570. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1113/JP271021

GU, Qiang a Cheng WANG, 2018. Chapter 18 - The NMDA Receptors: Physiology and Neurotoxicity in the Developing Brain. In: William SLIKKER, Merle G. PAULE a Cheng WANG, ed. *Handbook of Developmental Neurotoxicology (Second Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, s. 207–214 [vid. 2021-04-13]. ISBN 978-0-12-809405-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809405-1.00018-3

HABTEMARIAM, Solomon, 2019. Natural Products in Alzheimer's Disease Therapy: Would Old Therapeutic Approaches Fix the Broken Promise of Modern Medicines? *Molecules* [online]. **24**(8), 1519. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24081519

HANANI, Menachem, 2005. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Research Reviews* [online]. **48**(3), 457–476. ISSN 0165-0173. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresrev.2004.09.001

HAROON, Ebrahim, Andrew H MILLER a Gerard SANACORA, 2017. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* [online]. **42**(1), 193–215. ISSN 0893-133X. Dostupné z: doi:10.1038/npp.2016.199

HAVRDOVÁ, E., 2008. Roztroušená skleróza. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **71/104**(2), 121–132.

HEPNAROVA, Vendula, Lubica MUCKOVA, Avi RING, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Jan MISIK, Martina HRABINOVA, Daniel JUN a Ondrej SOUKUP, 2019. Pharmacological and toxicological in vitro and in vivo effect of higher doses of oxime reactivators. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **383**, 114776. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2019.114776

HEPPNER, Frank L., Richard M. RANSOHOFF a Burkhard BECHER, 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neuroscience* [online]. **16**(6), 358–372. ISSN 1471-0048. Dostupné z: doi:10.1038/nrn3880

HILL, Robert A a Akiko NISHIYAMA, 2014. NG2 Cells (Polydendrocytes): Listeners to the Neural Network with Diverse Properties. *Glia* [online]. **62**(8), 1195–1210. ISSN 0894-1491. Dostupné z: doi:10.1002/glia.22664

HORSTINK, M., E. TOLOSA, U. BONUCCELLI, G. DEUSCHL, A. FRIEDMAN, P. KANOVSKY, J. P. LARSEN, A. LEES, W. OERTEL, W. POEWE, O. RASCOL, C. SAMPAIO, EUROPEAN FEDERATION OF NEUROLOGICAL SOCIETIES, a MOVEMENT DISORDER SOCIETY-EUROPEAN SECTION, 2006. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *European Journal of Neurology* [online]. **13**(11), 1170–1185. ISSN 1468-1331. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-1331.2006.01547.x

HYND, Matthew R., Heather L. SCOTT a Peter R. DODD, 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* [online]. **45**(5), 583–595. ISSN 0197-0186. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2004.03.007

CHEN, Linlin, Huidan DENG, Hengmin CUI, Jing FANG, Zhicai ZUO, Junliang DENG, Yinglun LI, Xun WANG a Ling ZHAO, 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* [online]. **9**(6), 7204–7218. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.23208

CHEN, Wei-Wei, Xia ZHANG a Wen-Juan HUANG, 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports* [online]. **13**(4), 3391–3396. ISSN 1791-3004. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2016.4948

CHU, Wen-Ming, 2013. Tumor necrosis factor. *Cancer letters* [online]. **328**(2), 222–225. ISSN 0304-3835. Dostupné z: doi:10.1016/j.canlet.2012.10.014

CHVÁTAL, Alexandr a Alexei VERKHRATSKY, 2018. An Early History of Neuroglial Research: Personalities. *Neuroglia* [online]. **1**(1), 245–257. Dostupné z: doi:10.3390/neuroglia1010016

JÄKEL, Sarah a Leda DIMOU, 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **11** [vid. 2021-04-15]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00024

JEON, Sang Won a Yong Ku KIM, 2016. Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World Journal of Psychiatry* [online]. **6**(3), 283–293. ISSN 2220-3206. Dostupné z: doi:10.5498/wjp.v6.i3.283

JIRÁK, Roman, 2012. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství*. **8**(3), 107–108. ISSN 18012434.

KEMPURAJ, Duraisamy, Ramasamy THANGAVEL, Govindhasamy P. SELVAKUMAR, Smita ZAHEER, Mohammad E. AHMED, Sudhanshu P. RAIKWAR, Haris ZAHOOR, Daniyal SAEED, Prashant A. NATTERU, Shankar IYER a Asgar ZAHEER, 2017. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **11** [vid. 2020-12-17]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00216

KETTENMANN, Helmut, Frank KIRCHHOFF a Alexei VERKHRATSKY, 2013. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* [online]. **77**(1), 10–18. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023

KIDD, Grahame J., Nobuhiko OHNO a Bruce D. TRAPP, 2013. Biology of Schwann cells. *Handbook of Clinical Neurology* [online]. **115**, 55–79. ISSN 0072-9752. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9

KIM, Yong-Ku, Kyoung-Sae NA, Aye-Mu MYINT a Brian E. LEONARD, 2016. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. **64**, 277–284. ISSN 0278-5846. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnpbp.2015.06.008

KORÁBEČNÝ, Jan, Ondřej SOUKUP a Martin VALIŠ, 2020. *Alzheimerova nemoc: patofyziologie, klinika, farmakoterapie*. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-643-6.

KOVALEVICH, Jane a Dianne LANGFORD, 2013. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1078**, 9–21. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-640-5\_2

KRASULOVÁ, Eva a Eva HAVRDOVÁ, 2008. LÉČBA RELAPS-REMITENTNÍ ROZTROUŠENÉ SKLERÓZY MOZKOMÍŠNÍ. *Neurologie pro praxi*. **9**(4), 218–222. ISSN 12131814.

KUMAR, Anil, Jaskirat SIDHU, Amandeep GOYAL a Jack W. TSAO, 2021. Alzheimer Disease. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-04-11]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>

KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL, 2018. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2018**(6). ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095505

LEE, Yujeong, Seulah LEE, Seung-Cheol CHANG a Jaewon LEE, 2019. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. *Archives of Pharmacal Research* [online]. **42**(5), 416–425. ISSN 1976-3786. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-019-01133-0

LIDDELOW, Shane A. a Ben A. BARRES, 2017. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* [online]. **46**(6), 957–967. ISSN 1074-7613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006

LIMA, Isabel Vieira de Assis, Leandro Francisco Silva BASTOS, Marcelo LIMBORÇO-FILHO, Bernd L. FIEBICH a Antonio Carlos Pinheiro DE OLIVEIRA, 2012. Role of Prostaglandins in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation* [online]. **2012**, e946813. ISSN 0962-9351. Dostupné z: doi:10.1155/2012/946813

LIU, Hailiang, Rui XU, Lili FENG, Wenjie GUO, Ning CAO, Cheng QIAN, Peng TENG, Lu WANG, Xuefeng WU, Yang SUN, Jianxin LI, Yan SHEN a Qiang XU, 2012. A Novel Chromone Derivative with Anti-Inflammatory Property via Inhibition of ROS-Dependent Activation of TRAF6-ASK1-p38 Pathway. *PLOS ONE* [online]. 7(8), e37168. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0037168

LIU, Hongju, Chong YAN, Changqun LI, Tingting YOU a Zhigang SHE, 2020. Naphthoquinone Derivatives with Anti-Inflammatory Activity from Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Talaromyces* sp. SK-S009. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 25(3). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25030576

LIU, Changlu, Toshihiro TAKAO, Kozo HASHIMOTO a Errol B. DE SOUZA, 1996. Interleukin-1 Receptors in the Nervous System. In: Nancy J. ROTHWELL, ed. *Cytokines in the Nervous System* [online]. Boston, MA: Springer US, Neuroscience Intelligence Unit, s. 21–40 [vid. 2021-04-27]. ISBN 978-1-4615-9695-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-9695-0\_3

LIU, Jia a Fei WANG, 2017. Role of Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Cellular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology* [online]. 8 [vid. 2021-01-12]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.01005

LIU, Xiaoyu a Ning QUAN, 2018. Microglia and CNS Interleukin-1: Beyond Immunological Concepts. *Frontiers in Neurology* [online]. 9 [vid. 2021-04-27]. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2018.00008

LONG, Justin M. a David M HOLTZMAN, 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [online]. 179(2), 312–339. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2019.09.001

LUDWIG, Parker E. a Joe M DAS, 2021. Histology, Glial Cells. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2021-03-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441945/>

MATSUDA, Megumi, Yul HUH a Ru-Rong JI, 2019. Roles of Inflammation, Neurogenic inflammation, and Neuroinflammation in Pain. *Journal of anesthesia* [online]. 33(1), 131–139. ISSN 0913-8668. Dostupné z: doi:10.1007/s00540-018-2579-4

MEDZHITOV, Ruslan, 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* [online]. 454(7203), 428–435. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature07201

MELUZÍNOVÁ, Eva, 2010. Současné možnosti léčby roztroušené sklerózy. *Neurologie pro praxi*. 11(5), 307–311. ISSN 12131814.

MERAZ-RÍOS, Marco A., Danira TORAL-RIOS, Diana FRANCO-BOCANEGRA, Juana VILLEDA-HERNÁNDEZ a Victoria CAMPOS-PEÑA, 2013. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience* [online]. 7 [vid. 2020-12-17]. ISSN 1662-5145. Dostupné z: doi:10.3389/fnint.2013.00059

MEYERS, Emily A. a John A. KESSLER, 2017. TGF- $\beta$  Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. **9**(8) [vid. 2021-04-29]. ISSN 1943-0264. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a022244

MILATOVIC, Dejan, Snjezana ZAJA-MILATOVIC, Richard M. BREYER, Michael ASCHNER a Thomas J. MONTINE, 2017. Chapter 55 - Neuroinflammation and Oxidative Injury in Developmental Neurotoxicity. In: Ramesh C. GUPTA, ed. *Reproductive and Developmental Toxicology (Second Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, s. 1051–1061 [vid. 2021-03-22]. ISBN 978-0-12-804239-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804239-7.00055-X

MUCKOVA, L., N. VANOVA, J. MISIK, D. HERMAN, J. PEJCHAL a D. JUN, 2019a. Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. **56**, 110–117. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2019.01.013

MUCKOVA, Lubica, Jaroslav PEJCHAL, Petr JOST, Nela VANOVA, David HERMAN a Daniel JUN, 2019b. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. **42**(3), 252–256. ISSN 0148-0545. Dostupné z: doi:10.1080/01480545.2018.1432641

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A. a M. FRESNO, 1998. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon-gamma and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiology* [online]. **56**(3), 307–340. ISSN 0301-0082. Dostupné z: doi:10.1016/s0301-0082(98)00045-8

MURPHY, M. Paul a Harry LEVINE, 2010. Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. **19**(1), 311. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-1221

NAEGELE, Matthias a Roland MARTIN, 2014. The good and the bad of neuroinflammation in multiple sclerosis. *Handbook of Clinical Neurology* [online]. **122**, 59–87. ISSN 0072-9752. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52001-2.00003-0

NAGAMOTO-COMBS, Kumi, Joshua KULAS a Colin K. COMBS, 2014. A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. **233**, 187–198. ISSN 1872-678X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.021

NASHATIZADEH, Muhammad M, Kelly E LYONS a Rajesh PAHWA, 2009. A review of ropinirole prolonged release in Parkinson's disease. *Clinical Interventions in Aging*. **4**, 179–186. ISSN 1176-9092.

NEUMANN, Christian, Alexander SCHEFFOLD a Sascha RUTZ, 2019. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. *Seminars in Immunology* [online]. **44**, 101344. ISSN 1096-3618. Dostupné z: doi:10.1016/j.smim.2019.101344

OPAL, S. M. a V. A. DEPALO, 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* [online]. **117**(4), 1162–1172. ISSN 0012-3692. Dostupné z: doi:10.1378/chest.117.4.1162

PAN, W., J. E. ZADINA, R. E. HARLAN, J. T. WEBER, W. A. BANKS a A. J. KASTIN, 1997. Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* [online]. **21**(5), 603–613. ISSN 0149-7634. Dostupné z: doi:10.1016/s0149-7634(96)00047-4

PENG, Liang, Vladimir PARPURA a Alexei VERKHRATSKY, 2014. EDITORIAL Neuroglia as a Central Element of Neurological Diseases: An Underappreciated Target for Therapeutic Intervention. *Current Neuropharmacology* [online]. **12**(4), 303–307. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X12999140829152550

PHILIPS, Thomas a Wim ROBBERECHT, 2011. Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *The Lancet Neurology* [online]. **10**(3), 253–263. ISSN 1474-4422. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(11)70015-1

QUATTRINI, Luca a Concettina LA MOTTA, 2019. Aldose reductase inhibitors: 2013-present. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. **29**(3), 199–213. ISSN 1744-7674. Dostupné z: doi:10.1080/13543776.2019.1582646

RADHAKRISHNAN, Divya M. a Vinay GOYAL, 2018. Parkinson's disease: A review. *Neurology India* [online]. **66**(7), 26. ISSN 0028-3886. Dostupné z: doi:10.4103/0028-3886.226451

RANSOHOFF, Richard M., Dorothy SCHAFER, Angela VINCENT, Nathalie E. BLACHÈRE a Amit BAR-OR, 2015. Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics* [online]. **12**(4), 896–909. ISSN 1933-7213. Dostupné z: doi:10.1007/s13311-015-0385-3

RIEDERER, Peter a Gerd LAUX, 2011. MAO-inhibitors in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology* [online]. **20**(1), 1–17. ISSN 1226-2560. Dostupné z: doi:10.5607/en.2011.20.1.1

RIVERS, Robert C., Janet R. KUMITA, Gian Gaetano TARTAGLIA, Matthew M. DEDMON, Amol PAWAR, Michele VENDRUSCOLO, Christopher M. DOBSON a John CHRISTODOULOU, 2008. Molecular determinants of the aggregation behavior of  $\alpha$ - and  $\beta$ -synuclein. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* [online]. **17**(5), 887–898. ISSN 0961-8368. Dostupné z: doi:10.1110/ps.073181508

RUITENBERG, Marc J., Jana VUKOVIC, Julijana SARICH, Samantha J. BUSFIELD a Giles W. PLANT, 2006. Olfactory Ensheathing Cells: Characteristics, Genetic Engineering, and Therapeutic Potential. *Journal of Neurotrauma* [online]. **23**(3–4), 468–478. ISSN 0897-7151. Dostupné z: doi:10.1089/neu.2006.23.468

RŮŽIČKA, E., 2009. Doporučený postup při zahájení léčby Parkinsonovy nemoci. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*. **72/105**(5), 487–490.

SÁNCHEZ-SARASÚA, Sandra, Iván FERNÁNDEZ-PÉREZ, Verónica ESPINOSA-FERNÁNDEZ, Ana María SÁNCHEZ-PÉREZ a Juan Carlos LEDESMA, 2020. Can We Treat Neuroinflammation in Alzheimer's Disease? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(22) [vid. 2021-04-30]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21228751

- SHIGETA, M. a A. HOMMA, 2001. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS drug reviews* [online]. 7(4), 353–368. ISSN 1080-563X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1527-3458.2001.tb00204.x
- SHIPLEY, Mackenzie M., Colleen A. MANGOLD a Moriah L. SZPARA, 2016. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* [online]. (108) [vid. 2021-01-23]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/53193
- SIBBITTS, Jay a Christopher T. CULBERTSON, 2020. Measuring stimulation and inhibition of intracellular nitric oxide production in SIM-A9 microglia using microfluidic single-cell analysis. *Analytical Methods* [online]. 12(38), 4665–4673. ISSN 1759-9679. Dostupné z: doi:10.1039/D0AY01578D
- SILVA, Carlos F. M., Diana C. G. A. PINTO a Artur M. S. SILVA, 2016. Chromones: A Promising Ring System for New Anti-inflammatory Drugs. *ChemMedChem* [online]. 11(20), 2252–2260. ISSN 1860-7187. Dostupné z: doi:10.1002/cmde.201600359
- SONAR, Sandip a Girdhari LAL, 2015. Role of Tumor Necrosis Factor Superfamily in Neuroinflammation and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* [online]. 6 [vid. 2021-01-09]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00364
- STADELMANN, Christine a Wolfgang BRÜCK, 2008. Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *Journal of Neurology* [online]. 255(1), 12–18. ISSN 1432-1459. Dostupné z: doi:10.1007/s00415-008-1003-7
- STRLE, K., J. H. ZHOU, W. H. SHEN, S. R. BROUSSARD, R. W. JOHNSON, G. G. FREUND, R. DANTZER a K. W. KELLEY, 2001. Interleukin-10 in the brain. *Critical Reviews in Immunology*. 21(5), 427–449. ISSN 1040-8401.
- SZELÉNYI, Judith, 2001. Cytokines and the central nervous system. *Brain Research Bulletin* [online]. 54(4), 329–338. ISSN 0361-9230. Dostupné z: doi:10.1016/S0361-9230(01)00428-2
- ŠTĚTKÁŘOVÁ, I., 2018. Nové poznatky v dia-gnostice a léčbě amyotrofické laterální sklerózy. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 81(5), 546–554. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2018546
- TA, Thuy-Truc, Hasan Onur DIKMEN, Simone SCHILLING, Bruno CHAUSSE, Andrea LEWEN, Jan-Oliver HOLLNAGEL a Oliver KANN, 2019. Priming of microglia with IFN- $\gamma$  slows neuronal gamma oscillations in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 116(10), 4637–4642. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1813562116
- TANSEY, Malú G., Melissa K. MCCOY a Tamy C. FRANK-CANNON, 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology* [online]. 208(1), 1–25. ISSN 0014-4886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2007.07.004

TIWARI, Sneham, Venkata ATLURI, Ajeet KAUSHIK, Adriana YNDART a Madhavan NAIR, 2019. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine* [online]. **14**, 5541–5554. ISSN 1176-9114. Dostupné z: doi:10.2147/IJN.S200490

TOTH, Reka P. a Julie D. ATKIN, 2018. Dysfunction of Optineurin in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Glaucoma. *Frontiers in Immunology* [online]. **9** [vid. 2021-04-01]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2018.01017

TREMBLAY, Marie-Ève, Beth STEVENS, Amanda SIERRA, Hiroaki WAKE, Alain BESSIS a Axel NIMMERJAHN, 2011. The Role of Microglia in the Healthy Brain. *The Journal of Neuroscience* [online]. **31**(45), 16064–16069. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011

TYAGI, Sandeep, Paras GUPTA, Arminder Singh SAINI, Chaitnya KAUSHAL a Saurabh SHARMA, 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research* [online]. **2**(4), 236–240. ISSN 2231-4040. Dostupné z: doi:10.4103/2231-4040.90879

VANLE, Brigitte, William OLCOTT, Jaime JIMENEZ, Luma BASHMI, Itai DANOVITCH a Waguih William ISHAK, 2018. NMDA antagonists for treating the non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Translational Psychiatry* [online]. **8** [vid. 2021-04-19]. ISSN 2158-3188. Dostupné z: doi:10.1038/s41398-018-0162-2

VERKHRATSKY, Alexei, Nancy Ann Oberheim BUSH, Maiken NEDERGAARD a Arthur BUTT, 2018. The Special Case of Human Astrocytes. *Neuroglia* [online]. **1**(1), 21–29. Dostupné z: doi:10.3390/neuroglia1010004

VERKHRATSKY, Alexei, Margaret S. HO, Robert ZOREC a Vladimir PARPURA, 2019. The Concept of Neuroglia. *Advances in experimental medicine and biology* [online]. **1175**, 1–13. ISSN 0065-2598. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-9913-8\_1

VERKHRATSKY, Alexei a Maiken NEDERGAARD, 2016. The homeostatic astroglia emerges from evolutionary specialization of neural cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* [online]. **371**(1700). ISSN 1471-2970. Dostupné z: doi:10.1098/rstb.2015.0428

VIDOVIC, Diana, Raul Ayala DAVILA, Richard M. GRONOSTAJSKI, Tracey J. HARVEY a Michael PIPER, 2018. Transcriptional regulation of ependymal cell maturation within the postnatal brain. *Neural Development* [online]. **13**(1), 2. ISSN 1749-8104. Dostupné z: doi:10.1186/s13064-018-0099-4

VLČKOVÁ, Eva, 2016. Amyotrofická laterální skleróza. *Neurologie pro praxi* [online]. **17**(6), 362–365. ISSN 12131814, 18035280. Dostupné z: doi:10.36290/neu.2016.076

WAKABAYASHI, Koichi, Kunikazu TANJI, Fumiaki MORI a Hitoshi TAKAHASHI, 2007. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of  $\alpha$ -synuclein aggregates. *Neuropathology* [online]. **27**(5), 494–506. ISSN 1440-1789. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00803.x



- WANG, Qinqin, Yingjun LIU a Jiawei ZHOU, 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration* [online]. 4 [vid. 2021-03-29]. ISSN 2047-9158. Dostupné z: doi:10.1186/s40035-015-0042-0
- WANG, Rui a P. Hemachandra REDDY, 2017. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 57(4), 1041–1048. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-160763
- WATKINS, Paul B., Hyman J. ZIMMERMAN, Margaret J. KNAPP, Stephen I. GRACON a Karen W. LEWIS, 1994. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA* [online]. 271(13), 992–998. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1994.03510370044030
- WEISHAUPT, Jochen H., Tony HYMAN a Ivan DIKIC, 2016. Common Molecular Pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Dementia. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 22(9), 769–783. ISSN 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2016.07.005
- WEST, Phillip K., Barney VIENCKHOU, Iain L. CAMPBELL a Markus J. HOFER, 2019. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. *Glia* [online]. 67(10), 1821–1841. ISSN 1098-1136. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/glia.23634
- YAN, Fudong, Ying CHEN, Min LI, Yingqing WANG, Wenmin ZHANG, Xiaochun CHEN a Qinyong YE, 2018. Gastrointestinal nervous system  $\alpha$ -synuclein as a potential biomarker of Parkinson disease. *Medicine* [online]. 97(28) [vid. 2021-03-29]. ISSN 0025-7974. Dostupné z: doi:10.1097/MD.00000000000011337
- YANG, Qiao-qiao a Jia-wei ZHOU, 2019. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* [online]. 67(6), 1017–1035. ISSN 1098-1136. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/glia.23571
- YUAN, Hong, Zhen-Wen ZHANG, Li-Wu LIANG, Quan SHEN, Xiang-Dang WANG, Su-Mei REN, Hong-Jie MA, Shu-Jun JIAO a Ping LIU, 2010. Treatment strategies for Parkinson's disease. *Neuroscience Bulletin* [online]. 26(1), 66–76. ISSN 1673-7067. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-010-0302-z
- ZAPLETALOVÁ, Olga, 2009. *Léčba časných stadií roztroušenej sklerózy mozkomíšni – Neurologie – Okruhy tém – Remedia – farmakoterapeutický časopis* [online] [vid. 2021-04-15]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Okruhy-temat/Neurologie/Lecba-casnych-stadii-roztrousene-sklerozy-mozkomisni/8-1e-Fn.magarticle.aspx>
- ZHANG, J. a S. RIVEST, 2001. Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. *Journal of Neurochemistry* [online]. 76(3), 855–864. ISSN 0022-3042. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00080.x
- ZHANG, Jun-Ming a Jianxiong AN, 2007. Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics* [online]. 45(2), 27–37. ISSN 0020-5907. Dostupné z: doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e

ZHANG, Lijuan, Jinqiang ZHANG a Zili YOU, 2018. Switching of the Microglial Activation Phenotype Is a Possible Treatment for Depression Disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **12** [vid. 2021-04-30]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2018.00306

ZHANG, Zhu, Shiqing ZHANG, Pengfei FU, Zhang ZHANG, Kaili LIN, Joshua Ka-Shun KO a Ken Kin-Lam YUNG, 2019. Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **20**(18) [vid. 2021-04-19]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20184391

ZINDLER, Eva a Frauke ZIPP, 2010. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* [online]. **24**(4), The State of Neuroprotection, 551–562. ISSN 1521-6896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpa.2010.11.001

ZOLFAGHARI, Reza, Qiuyan CHEN a A. Catharine ROSS, 2012. DHRS3, a retinal reductase, is differentially regulated by retinoic acid and lipopolysaccharide-induced inflammation in THP-1 cells and rat liver. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* [online]. **303**(5), G578-588. ISSN 1522-1547. Dostupné z: doi:10.1152/ajpgi.00234.2012

ZUO, Hao a Akiko NISHIYAMA, 2013. Polydendrocytes in development and myelin repair. *Neuroscience Bulletin* [online]. **29**(2), 165–176. ISSN 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-013-1320-4