

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové**

**VÝVOJ METOD PRO *IN VITRO* TESTOVÁNÍ  
POTENCIÁLNÍCH LÉČIV ALZHEIMEROVY CHOROBY**

**KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Školitel specialista: pplk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Bc. Martina Hrabínová

*„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita pro získání jiného nebo stejného kvalifikačního titulu.“*

*v Hradci Králové dne*

*podpis*

*Děkuji pplk. doc. PharmDr. Danielu Junovi Ph.D. a doc. PharmDr. Tomáši Šimůnkovi Ph.D. za odbornou pomoc a ochotu při řešení mé diplomové práce.*

*Děkuji celé své rodině a přátelům za jejich podporu.*

*Diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky GP303/11/1907 - Nové inhibitory acetylcholinesterasy odvozené od látky 7-MEOTA - potenciální léčiva pro Alzheimerovu chorobu a podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci Dlouhodobého záměru rozvoje organizace 1011 - ZHN.*

## Obsah

1.	Abstrakt .....	6
2.	Abstract .....	7
3.	Zadání diplomové práce - cíle práce .....	9
4.	Úvod .....	10
5.	Teoretická část .....	11
5.1	Alzheimerova nemoc .....	11
5.1.1	Historie .....	11
5.1.2	Epidemiologie .....	11
5.1.3	Léčba .....	13
5.2	Beta-sekretasa .....	14
5.2.1	Struktura beta-sekretasy .....	15
5.2.2	Substráty beta-sekretasy .....	15
5.2.3	Neurodegenerativní onemocnění a beta-sekretasa .....	17
5.2.4	Inhibitory beta-sekretasy .....	18
5.3	Prolylolyloleptidasa .....	18
5.3.1	Struktura prolylolyloleptidasy .....	19
5.3.2	Substráty prolylolyloleptidasy .....	22
5.3.3	Aktivita a lokalizace prolylolyloleptidasy v CNS .....	25
5.3.4	Neurodegenerativní onemocnění a prolylolyloleptidasa .....	25
5.3.5	Inhibitory prolylolyloleptidasy .....	27
5.4	Oxidační stres .....	28
5.4.1	Oxidace lipidů .....	29
5.4.2	Oxidace proteinů .....	30
5.4.3	Oxidace nukleových kyselin .....	30
5.4.4	Alzheimerova nemoc a antioxidanty .....	30
6.	Experimentální část .....	32
6.1	Seznam testovaných látek .....	32
	Označení vzorku .....	32
6.1.1	Testované KS látky .....	35
6.1.2	Standardy .....	35

6.2	Prolyloligopeptidasa .....	36
6.2.1	Seznam chemikálií .....	36
6.2.2	Přístroje .....	36
6.2.3	Metoda stanovení aktivity prolyloligopeptidasy .....	37
6.2.4	Princip metody .....	38
6.2.5	Postup měření .....	38
6.3	Beta-sekretasa .....	38
6.3.1	Seznam chemikálií .....	38
6.3.2	Přístroje .....	39
6.3.3	Metoda stanovení aktivity beta-sekretasy .....	39
6.3.4	Princip metody .....	40
6.3.5	Postup měření .....	40
6.4	Antioxidační aktivita .....	41
6.4.1	Seznam chemikálií .....	41
6.4.2	Přístroje .....	41
6.4.3	Metoda DPPH .....	41
6.4.4	Princip metody .....	42
6.4.5	Postup měření .....	42
7.	Výsledky .....	43
7.1	Zpracování experimentálních dat .....	43
7.2	Prolyloligopeptidasa .....	43
7.3	Antioxidační aktivita .....	45
8.	Diskuze .....	48
8.1	Prolyloligopeptidasa .....	48
8.2	Beta-sekretasa .....	49
8.3	Antioxidační aktivita (DPPH) .....	50
9.	Závěr .....	52
10.	Seznam použitých zkratek .....	53
11.	Literatura .....	54

# 1. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnická bioanalytika – odborný pracovník v laboratorních metodách

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Martina Hrabínová

Školitel: doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek Ph.D.

Školitel specialista: plk. Doc. PharmDr. Daniel Jun Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj metod pro *in vitro* testování potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) je neurodegenerativní onemocnění s rostoucí incidencí. Ač od objevu této nemoci uplynulo již mnoho desítek let, stále neexistuje kauzální léčba, pouze možnost zlepšit dočasně kvalitu života pomocí centrálních inhibitorů acetylcholinesterasy a memantinu. Cílem této práce bylo zavést jednouchou kolorimetrickou metodu stanovení aktivity prolyloligopeptidasy (POP) a beta-sekretasy (BACE), důležitých enzymů zapojených v patogenezi AD, využít těchto metod pro screeningové hodnocení látek navržených jako potenciální léčiva AD a dále zhodnotit jejich antioxidační a antiradikálovou aktivitu. Výsledky ukázaly, že testované látky jsou slabými inhibitory POP, ve srovnání se standardním inhibitorem Z-gly-pro-prolinelem. Standardní inhibitory cholinesterasy, využívané k léčbě AD, nevykázaly žádné schopnosti inhibovat POP. Metodu stanovení BACE se nepodařilo realizovat. Všechny nově syntetizované látky vykazovaly velmi nízkou antioxidační aktivitu. Standardní inhibitory rivastigmin, donepezil, huperzin a galantamin v porovnání s vitamínem C vykazovaly hodnoty srovnatelné či vyšší. Tato nově vyvinutá metoda POP bude využita pro screeningové testování nových látek.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, prolyloligopeptidasa, beta-sekretasa, antioxidant, inhibitor

## 2. Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Healthcare bioanalytics - Specialist in Laboratory Methods

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Martina Hrabínová

Supervisor: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek Ph.D.

Supervisor specialist: Pplk. Doc. PharmDr. Daniel Jun Ph.D.

Title of diploma thesis: Development of method for *in vitro* testing of potential drugs Alzheimer disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease with increasing incidence. Although many decades have passed since the disease was discovered, there is no causal therapy yet. Currently available therapy consists in treatment with central acetylcholinesterase inhibitors and memantine, improving the patient's quality of life. The aim of this study was to develop a simple colorimetric method for the determination of prolyl oligopeptidase (POP) and beta secretase (BACE) activity, important enzymes associated with AD pathogenesis, and to use this method for screening of potential AD drugs and to determine their antioxidant and antiradical activity. Results showed that tested substances were weak inhibitors of POP compared to standard inhibitor Z- Gly-Pro-prolinal. Standard cholinesterase inhibitors used in AD therapy showed no ability to inhibit POP. The method for determination of BACE activity has not been implemented. All the newly synthesized compounds showed very low antioxidant activity. Standard inhibitors rivastigmine, donepezil, galantamine, and huperzine showed comparable or higher values antioxidant activity compared to vitamin C. This novel method developed for POP evaluation will be further used for screening of new substances.

Keywords: Alzheimer's disease, prolyl oligopeptidase, beta secretase, antioxidant, inhibitors





### **3. Zadání diplomové práce - cíle práce**

- a) Rešeršně zpracovat poznatky o metodách stanovení aktivit enzymů prolyllooligopeptidasy (POP) a beta-sekretasy (BACE), zapojených v patogenezi Alzheimerovy choroby (Alzheimer's disease, AD).
- b) Zavést vhodné kolorimetrické metody ke stanovení aktivit enzymů POP a BACE.
- c) Stanovit inhibiční konstanty u nově syntetizovaných látek a určit jejich antioxidační vlastnosti.

## 4. Úvod

Na celém světě v roce 2013 trpělo AD více jak 35 milionů lidí. Tato nemoc je v USA na šestém místě v žebříčku úmrtnosti. Léčba je finančně náročná. V současné době neexistuje lék, který by nemoc zcela vyléčil, existují pouze léky, které symptomy nemoci potlačují a zlepšují tak pacientovi kvalitu života. V roce 2012 stála tato nemoc rozpočet USA 200 miliard dolarů (Jago 2014).

Beta-sekretasa (BACE) je jeden z enzymů zapojených v patofyziologii AD. Štěpí amyloidový prekurzorový protein (APP), čímž dochází ke vzniku abnormálního amyloidového plaku, který je tvořen toxickým amyloidem beta ( $A\beta$ ) (Ghosh a Osswald 2014).

Prolyloligopeptidasa (POP) je enzym zapojený v mnoha fyziologických procesech, její primární funkcí je však řízení hladin všech neuronálních peptidů. Její role v patogenezi AD je neustále diskutována. Bylo prokázáno, že změna aktivity tohoto enzymu potencuje agregaci  $A\beta$  a  $\tau$ -proteinu, markerů AD (Szeltner a Polgár 2008; Laitinen et al. 2001; Hannula et al. 2013).

Oxidační stres (OS) je proces, který je jednou z možných příčin vzniku AD. Vznik reaktivních forem dusíku a kyslíku (RONS) vede k poškození proteinů, nukleových kyselin, zánětu, poškození tkání a následné buněčné apoptóze. OS potencuje agregaci  $A\beta$  peptidu, fosforylaci a polymeraci  $\tau$ - proteinu. Naše endogenní antioxidační mechanismy nejsou vždy efektivní, proto jsou možným terapeutickým prostředkem exogenní antioxidanty, které by odstranili kumulativní účinky oxidačního poškození (Gilgun-Sherki et al. 2001a).

## 5. Teoretická část

### 5.1 Alzheimerova nemoc

#### 5.1.1 Historie

Alzheimerova nemoc (AD) je chronické, progresivní a neurodegenerativní onemocnění. Poprvé byla popsána v roce 1907 německým neurologem Aloisem Alzheimerem u jednapadesátileté ženy Auguste D. Pacientka trpěla ztrátou paměti, měla problémy s vyjadřováním a myšlením, docházelo k náhlým změnám v jejím chování. V té době se tyto příznaky považovaly za klasickou senilní demenci, i když věk pacientky byl nízký. Emil Kraepelin, význačný psychiatr, navrhl pojmenovat tuto nemoc po Aloisi Alzheimerovi (Tanzi a Bertram 2005).

AD je nejčastějším typem demence. Počet lidí postižených touto nemocí se neustále zvyšuje. Rizikovým faktorem je zejména věk. V současné době je postiženo 50 % populace starší 85 let. Významnou roli hrají i hormonální změny v těle. Bylo prokázáno, že AD trpí častěji ženy než muži. Ženám po menopauze klesá koncentrace estrogenu a progesteronu, přičemž estrogen působí v mozku neuroprotektivně prostřednictvím svých dvou receptorů, estrogenního receptoru  $\alpha$  a estrogenního receptoru  $\beta$  (Henderson 2013).

#### 5.1.2 Epidemiologie

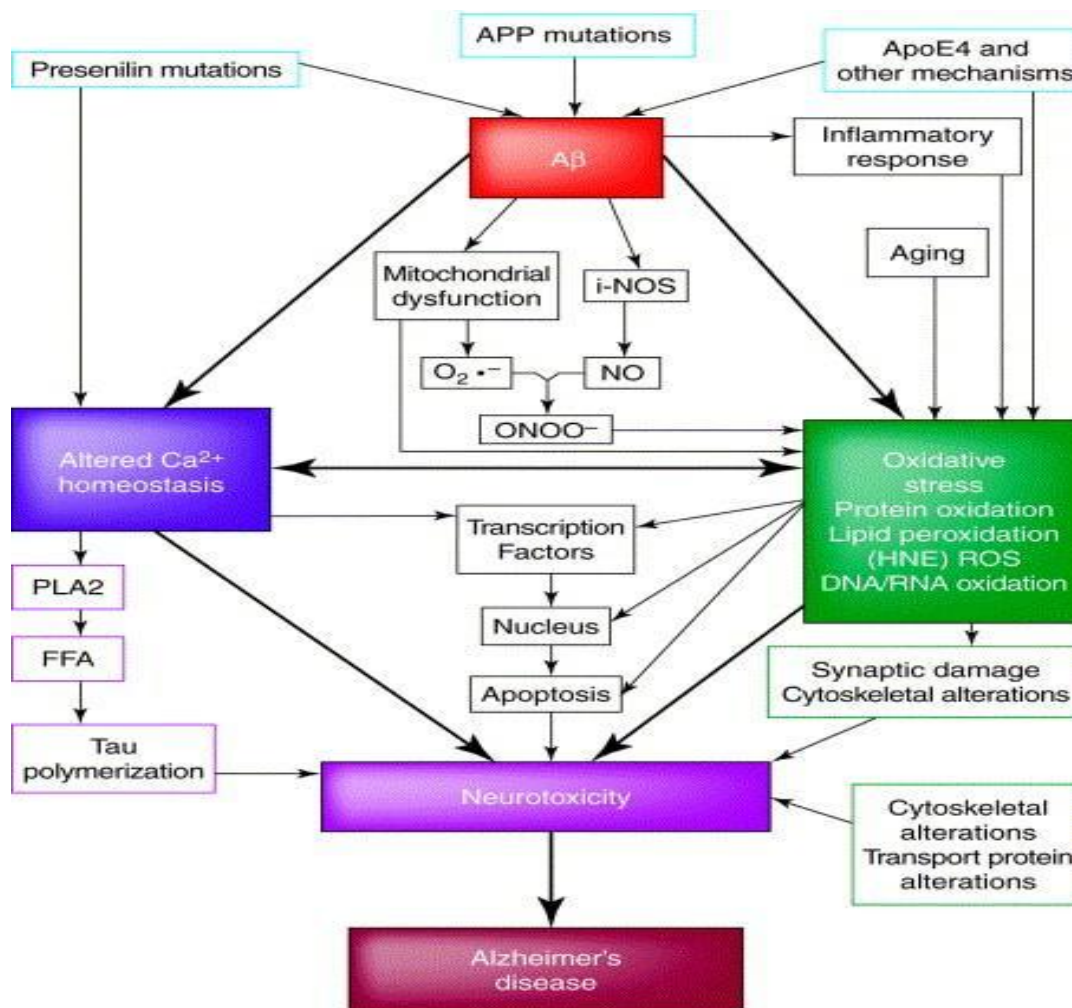
Teorií o příčinách vzniku AD je mnoho (Obrázek 1), v posledních letech jsou preferovány dvě hlavní hypotézy příčiny vzniku AD. První hypotéza tzv. amyloidová kaskádová hypotéza uvádí, že neurodegenerativní proces je série událostí, kdy výsledkem je vznik abnormálního amyloidního plaku. Tento plak je tvořen  $A\beta$ , který vzniká z APP. Dochází k neurodegenerativnímu zánětu a vzniklý amyloid poškozuje neurony. Gen pro APP je uložen na chromozomu 21. Ve většině případů není AD dědičná. Pouze asi 2–7% je podmíněno dědičnou poruchou, která má familiární charakter a rychlý průběh s manifestací ve středním věku (Tanzi a Bertram 2005)

U druhé cytoskeletální degenerativní hypotézy je spouštěcím mechanismem vzniku nemoci cytoskeletální změna  $\tau$ -proteinu. Dochází ke vzniku neurofibrilárního klubka hyperfosforylovaného  $\tau$ -proteinu, který je fosforylován pomocí kinasy 3-glykogensyntasy.

Ve fyziologickém procesu se  $\tau$ -protein váže na tubulin a stabilizuje mikrotubuly. Vyskytuje se jak v pre- tak i post-synaptické membráně v šesti izoformách, které jsou složeny z 352 až 441 aminokyselin (AMK). Jejich molekulová hmotnost je mezi 45 až 65 kDa. Patologicky se  $\tau$ -protein objevuje pouze v jednoduše izoformě (Pooler et al. 2014; Buée et al. 2000).

Součástí těchto změn jsou další neuropatofyziologické změny např. zánět, kdy u nemocných AD jsou senilní plaky obklopeny mikroglialními buňkami, které jsou hlavními imunitními buňkami mozku. Dochází k produkci vysokých hladin cytokinů a následkem je vznik zánětlivého procesu (Prokop et al. 2013).

Oxidační stres (OS) je dalším důležitým faktorem v patogenezi AD. Při porušení rovnováhy mezi produkcí volných kyslíkových radikálů a antioxidační kapacitou organismu dochází ke zvýšené oxidaci proteinů, lipidů a deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a k tvorbě toxických látek jako jsou např. peroxidy, alkoholy nebo aldehydy. Takto oxidované biomolekuly se u pacientů s AD nacházejí nejen v mozku, ale i v mozkomíšním moku, krvi a moči. Dochází ke snížení buněčné aktivity, apoptóze, nekróze a vzniku neurodegenerativního onemocnění (Zhang et al. 2013)].



Obrázek 1: Schéma možných příčin vzniku AD (Butterfield et al. 2001)

### 5.1.3 Léčba

Od objevu a popisu této nemoci uběhlo již mnoho desítek let. Stále však nebyl nalezen kauzální lék, který by nemoc zcela vyléčil. Existují pouze léky symptomatické, které nemoc zmírňují a zlepšují na několik let pacientovi kvalitu života, než se nemoc plně projeví. V současné době je dosud nejúčinnější farmakoterapií inhibice acetylcholinesterasy např. donepezilem, neostigminem, fyzostigminem, rivastigminem a podávání antagonisty *N*-methyl-D-aspartátového receptoru (NMAD receptor) memantinem.

U AD je porušena presynaptická část acetylcholinergního neuronu. Dochází ke snížení koncentrace acetylcholintransferasy, která katalyzuje syntézu acetylcholinu. Acetylcholin je jeden z hlavních neurotransmiterů periferního i centrálního nervového systému. Inhibice

acetylcholinesterasy způsobí hromadění acetylcholinu, který stimuluje muskarinové receptory. Inhibitory acetylcholinesterasy zlepšují cholinergní přenos a tím zpomalují průběh této nemoci (Picciotto et al. 2012).

Memantin blokuje NMAD receptor nekompetitivním způsobem. *N*-methyl-D-aspartátový receptor reguluje hladinu neurotransmiteru glutamátu, jehož zvýšená hladina stimuluje nervové buňky. Smrt buněk nastane vlivem excitotoxicity. Memantin je používán jako samostatný lék, nebo také v kombinaci s inhibitory cholinesterasy, obvykle v kombinaci s donepezilem (Rive et al. 2013).

Vývoj nových potenciálních léčiv AD se tak ubírá různými směry. Nejdále ve vývoji a klinickém zkoušení je léčba imunoterapeutiky, Jde o snahu o aktivní imunizaci pomocí protilátek. Protilátky se vážou na rozpustný A $\beta$  a zvyšují tak jeho clearance z mozku do cévního řečiště. Transport APP je pak zprostředkován pomocí lipoproteinového receptoru s nízkou denzitou (Wang et al. 2006). Dále se zkoumají protilátky získané od zdravých dárců, kteří mají vytvořeny přirozené protilátky proti A $\beta$ . Největším problémem této léčby je častý vznik meningoencefalitidy (Geylis et al. 2005).

Dalším směrem v léčbě je vývoj inhibitorů  $\gamma$  a  $\beta$ -secretas, které jsou příčinou vzniku toxického A $\beta$  (Anand et al. 2014).

Ovlivnění  $\tau$ -proteinu jde dvěma směry. Inhibicí fosforylujících kináz a inhibicí agregace  $\tau$ -proteinu (King et al. 2014; Wang et al. 2010).

## 5.2 Beta-sekretasa

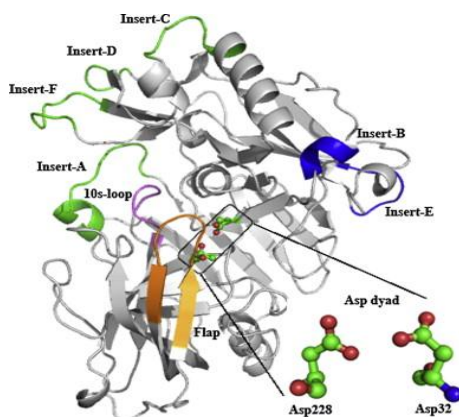
Beta-sekretasa je členem skupiny aspartylových proteas. Tyto proteasy se rozdělují do dvou tříd na pepsinovou (rennin, katepsin D, chymosin, betasekretasa atd.) a na retropepsinovou (HIV-proteasa a malaria-proteasa). BACE byla objevena v roce 1992 a v roce 1999 byla definitivně identifikována (Vassar et al. 2009; Barman a Prabhakar 2013).

BACE se vyskytuje ve dvou formách. BACE1 (EC 3.4.23.46) je složená z 501 AMK a BACE2 (EC 3.4.23.45) z 518 AMK, tyto formy jsou si z 75% podobné.

## 5.2.1 Struktura beta-sekretasy

BACE1 je také nazývána beta APP štěpící enzym 1, memapsin-2 a aspartyl proteasa 2. Ve fyziologickém procesu je důležitá pro tvorbu myelinových pochev nervových buněk. BACE1 je integrální membránový protein, její gen je lokalizován na chromozomu 11q23.2. Nachází se v mnoha tkáních, nejvyšší hladina je však v mozku a slinivce. BACE2 se nejvíce nachází v periferních tkáních v různých hladinách, její gen je lokalizován na chromozomu 21q22.3. Nejvyšší hladinu má v ledvinách. V mozku je většinou v astrocytech, zatímco BACE1 je převážně v neuronech. I když se BACE2 nachází také v mozku, její role v patogenezi AD není zatím zcela objasněna (Ahmed et al. 2010).

Enzym existuje jako monomer nebo také jako dimer. Dimer má vyšší enzymatickou aktivitu než monomer. BACE je syntetizována v endoplazmatickém retikulu. Nematurovaný enzym má molekulovou hmotnost 60 kDa, po maturaci v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu je jeho molekulová hmotnost 70 kDa, zde je aktivita enzymu nejvyšší. Je to dáno pH 4,5, které se zde nachází. Po maturaci je BACE transportována do plasmatické membrány. Enzym obsahuje dvě charakteristická aktivní místa (**Obrázek 2**) Asp228 a Asp32 (Willem et al. 2009).



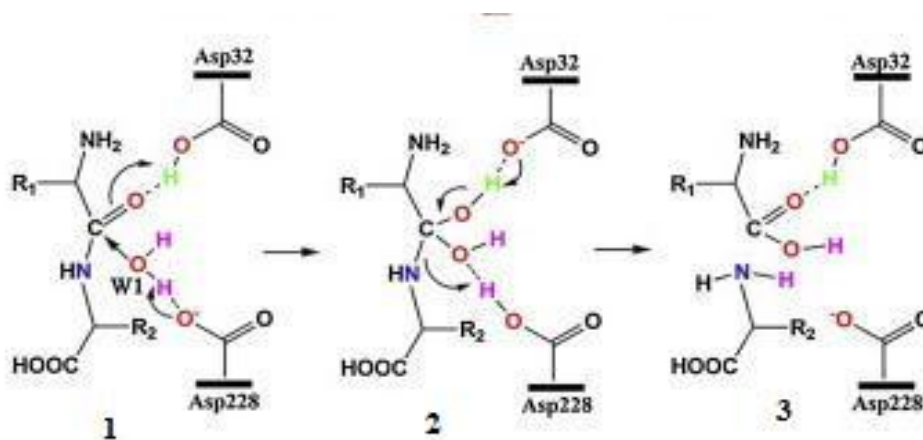
Obrázek 2: Aktivní místa BACE1 - Asp228 a Asp32 (Barman a Prabhakar 2013)

## 5.2.2 Substráty beta-sekretasy

BACE1 se skládá ze dvou hlavních domén, N-terminální domény a C-terminální domény a několika specifických dílčích oblastí, které jsou distribuovány mezi C a N

doménou. Tento specifický úsek patří k nejkritičtější oblasti enzymu. Je složen ze smyčky 10s (Lys9-Tyr14), klapky (Val67-Glu77), insertu-A (Gly158-Leu167), insertu-D (Trp270-Thr274) a insertu-F (Asp311-Asp317). Tato oblast umožňuje vstup a vazbu substrátu do aktivního místa prostřednictvím svých pohybů (**Obrázek 2**).

BACE1 využívá pro štěpení peptidové vazby, v průběhu svého katalytického působení, všeobecného mechanismus acidobazické reakce (Obrázek 3). Tento mechanismus peptidové hydrolýzy zahrnuje dva kroky. Nejprve se deprotonovaný Asp228 chová jako báze a protonovaný Asp32 jako kyselina. V kroku 1 Asp228 vytrhuje proton z katalyzující molekuly vody (W1) a vytváří tak hydroxylový ion (OH<sup>-</sup>). Ten následně nukleofilně atakuje karbonylový uhlík štěpené peptidové vazby a současně Asp32 poskytuje svůj proton karbonylovému kyslíku štěpené peptidové vazby za vzniku tetraedráního geminálního diolu. Od vzniku tohoto meziproductu si Asp228 a Asp32 vymění svou funkci a Asp32 se chová jako báze a Asp228 jako kyselina. Protonovaný Asp228 předá svůj elektron dusíku amidové skupiny (-NH) štěpené peptidové vazby a zároveň Asp32 vytrhuje proton z jedné z hydroxylových skupin geminálního diolu. Tento proces vede k rozštěpení peptidové vazby a vytváří volné amino (-NH<sub>2</sub>) a karboxy (-COOH) konce (Barman a Prabhakar 2013).



Obrázek 3: Acido/bazický mechanismus štěpení peptidické vazby BACE1 (Barman a Prabhakar 2013)

*In vitro* pokusy prokázaly, že BACE štěpí pouze APP vázané v membráně. Jestliže APP ztratí transmembránovou doménu, enzym není schopen ho štěpit. Díky své vysoké  $K_m$ ,



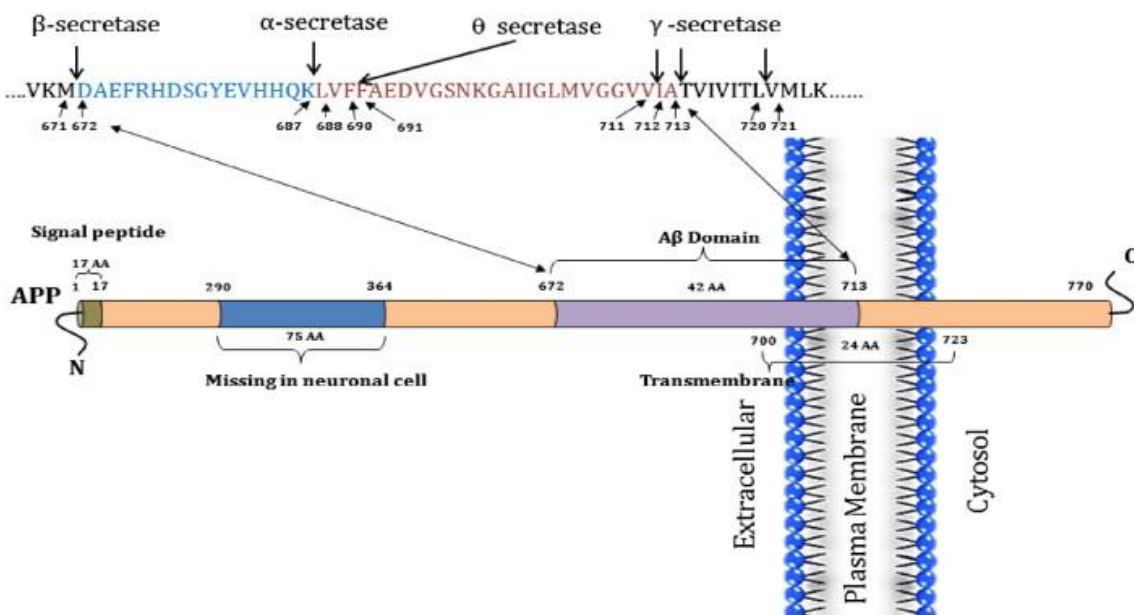
kteřá je kompenzována vysokou koncentrací enzymu a substrátu, je však *in vitro* pokusech enzym schopen štěpit rozpustné substráty specifickým způsobem. BACE1 přijímá širokou škálu substrátů, ale především preferuje substráty s kyselými nebo polárními konci na rozdíl od jiných známých aspartylových proteas (Venugopal et al. 2008).

### 5.2.3 Neurodegenerativní onemocnění a beta-sekretasa

Jednou z hlavních hypotéz vzniku AD je abnormální produkce amyloidního beta peptidu 42 (A $\beta$ <sub>42</sub>). Amyloid beta je produkován z APP. Amyloidový prekursorový protein je integrální membránový protein, s různou délkou řetězce (APP-695, APP-751 a APP-770). Délka řetězce je dána různými variantami sestřihu exonů. Gen APP je lokalizován na 21 chromosomu. APP je zpracováván třemi proteasami (Obrázek 4) a to sekretasou  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  (Suh a Checler 2002). Alfa-sekretasa štěpí APP v C terminální části v pozici 16-17 AMK na amyloidový prekursorový protein alfa (APP $\alpha$ ) a krátký C-terminální fragment (CTF) o 83 AMK (C83). Fragment C83 je následně zpracován  $\gamma$ - sekretasou na netoxický produkt o velikosti 3 kDa (p3). Produkt APP $\alpha$  o velikosti 39-43 aminokyselin je dobře rozpustný a není náchylný ke shlukování. Za fyziologických podmínek je tato cesta preferována.

Beta-sekretasa štěpí za patologických podmínek APP v pozici 671-672 na amyloidový prekursorový protein beta (APP $\beta$ ) na membránu navázaný fragment o délce 99 aminokyselin (C99). Fragment C99 je dále štěpen komplexem  $\gamma$ -sekretasy v pozici 711-713 AMK řetězce za produkce A $\beta$  peptidu. Komplex  $\gamma$ -sekretasy obsahuje čtyři integrální membránové proteiny, včetně katalytické podjednotky preselininu, který usnadňuje štěpení v hydrofobní lipidové dvojvrstvě. Díky tomuto štěpení dochází k uvolnění A $\beta$  peptidu do extracelulárního prostoru. Intracelulární doména APP se uvolní do cytosolu. Po vstupu do jádra funguje jako transkripční faktor.

Gama-sekretasa štěpí fragmenty různé délky 40 a 42 AMK za vzniku amyloidu beta 40 a 42 (A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub>). Beta-amyloid<sub>40</sub> je částečně rozpustný a tolik nepřispívá k tvorbě amyloidních plaků. Beta-amyloid<sub>42</sub> je zodpovědný za tvorbu toxických nerozpustných plaků a za vznik AD. (Sathya et al. 2012).



Obrázek 4: Štěpení APP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  sekretasou (Sathya et al. 2012)

## 5.2.4 Inhibitory beta-sekretasy

Vzhledem k 30 % sekvenční podobnosti BACE1 s ostatními aspartylóvými proteasami je problém připravit specifický inhibitor tohoto enzymu. Tento problém může vyřešit design inhibitoru v závislosti na rozdílech v aktivním místě proteas. Při přípravě specifického inhibitoru BACE1 je třeba brát v úvahu několik faktorů. Vhodná je malá velikost, ne větší než 700 Da. Dále je třeba, aby inhibitor měl dostatečnou inhibiční sílu, malou toxicitu a vhodný farmakokinetický profil. Inhibitor musí mít dostatečnou lipofilitu, aby prošel přes hematoencefalickou bariéru a dosáhl tak účinné koncentrace v mozku (Tang et al. 2003; Vassar et al. 2009).

## 5.3 Prolyloligopeptidasa

Prolyloligopeptidasa (POP, EC 3.4.21.26) patří do poměrně nové skupiny serinových peptidas. Poprvé byla popsána v roce 1991. Tato skupina zahrnuje dipeptidylpeptidasu IV (DPPIV, EC 3.4.14.5), acylaminoacylpeptidasu (ACPH, EC 3.4.19.1) a POP. Později byla doplněna o čtvrtý enzym oligopeptidasu B (OB, EC 3.4.21.83).

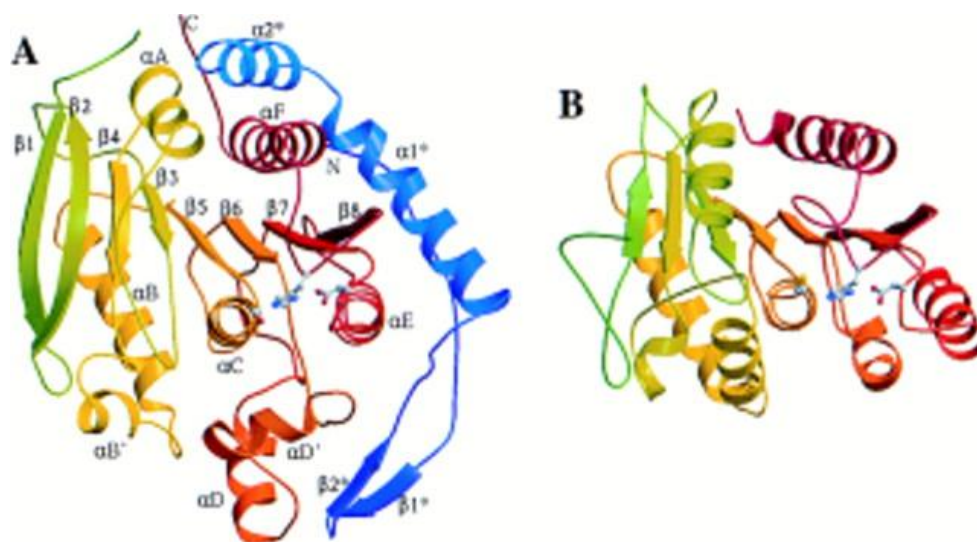
POP a OB jsou endopeptidasy nacházející se v cytosolu. ACPH a DDPIV jsou exopeptidasy.

Enzymy se nachází v různých eukaryotních a prokaryotních organismech a jsou přítomny v mnoha tkáních. Chování jednotlivých peptidas je různé a je dáno jejich specifitou. Tyto proteasy hydrolyzují peptidy o délce ne více než 30 AMK, které v terminální C části obsahují prolin (Rawlings et al. 1991).

### 5.3.1 Struktura prolyloloigopeptidasy

POP byla poprvé objevena v lidské děloze jako oxytocin degradující enzym (Koida a Walter 1976). Nejprve byla pojmenována jako post-prolin štěpící enzym. Vzhledem k tomu, že hydrolyzuje peptid v C terminální části obsahující prolin, byla později přejmenována na prolylendopeptidasu. Podle nomenklatury byl název pozměněn na prolyloloigopeptidasu patřící do rodiny S9, klan SC.

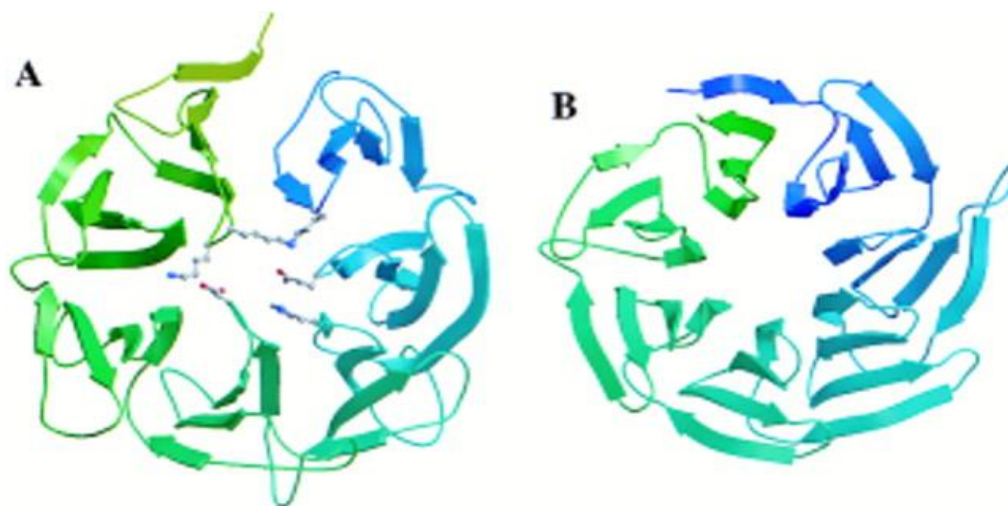
Její velikost je přibližně 80 kDa a je rozdílná podle organismu, z kterého byla purifikována. Má jednoduchý proteinový řetězec o délce 710 AMK, který byl identifikován pomocí rentgenové krystalografie při rozlišení 1,4 Å. Tento enzym obsahuje peptidasovou doménu s katalytickou triádou Ser554, His680, Asp641 kovalentně propojenou se sedmiramennou  $\beta$ -vrtulovou doménou (Polgár 2002).



Obrázek 5: A - Doména POP s typickým hydrolasovým  $\alpha/\beta$  křížením enzymu

B - Struktura dinelaktonové hydrolasy (Fülöp et al. 1998)

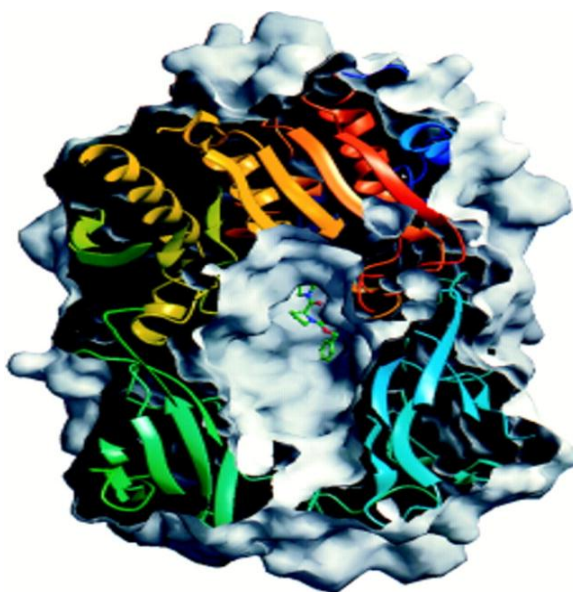
Na obrázku č. 5A je znázorněna peptidasová doména s typickým  $\alpha/\beta$  uspořádáním. Tato doména je složena ze dvou částí zahrnující 1–72 a 428–710 AMK proteinového řetězce. V N terminální části jsou dva krátké antiparalelní  $\beta$  skládané listy a dva dlouhé  $\alpha$  helixy, které jsou spojeny s mnohem větší C terminální částí prostřednictvím dvaceti tří vodíkových vazeb, disulfidických můstků a mnoha hydrofobních interakcí. V této části je typické  $\alpha/\beta$  hydrolasové křížení proteinu. Je zde osmivlákný  $\beta$  skládaný list, který je, kromě prvních dvou vláken, spojený paralelním způsobem. Beta skládaný list je značně zkroucený, první a poslední vlákna mezi sebou svírají úhel  $110^\circ$ , který je z jedné strany obklopen šesti  $\alpha$  helixy s označením A-F s doménou na druhé straně. Prostorové uspořádání  $\beta$  vláken je 1, 2 -1x,2x a 1x. Jednotlivé složky sekundární struktury byly predikovány již dříve, vyjma složek  $\alpha A$ ,  $\alpha D'$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 3$ . Podstatné pro stabilitu enzymu je, že jeho trojrozměrná struktura  $\beta$  vlákna 2-8 a helixy A-F je těsně propojena, přestože katalytická doména POP vykazuje nízkou podobnost mezi sekvencemi. Na obrázku 5B je nejmenší a nejjednodušší člen hydrolasové domény enzymů, dinelactonová hydrolysa, která v třídímní struktuře ukazuje stejnou podobnost se sekundární strukturou POP.



Obrázek 6: A- POP s typickou  $\beta$ -vrtulovou doménou

B- Struktura G-proteinu, podjednotky  $\beta$  domény (Fülöp et al. 1998)

Na obrázku 6A je znázorněna vrtulová doména. Je to část mezi 73 a 427 AMK proteinového řetězce. Tato doména patří k relativně malým, ale početným beta vrtulovým doménám. Základem je sedmivrtulová opakující se čtyřvláknová antiparalelní beta struktura skládaného listu. Vlákna jsou zkřížena a hvězdicovitě uspořádána kolem centrálního tunelu. Jsou sbalena a zajištěna hydrofobními interakcemi, které jsou k zajištění strukturní stability proteinu nejdůležitější. Na obr. 6A je proteinový řetězec sedmivrtulové domény POP s viditelným projasněním kolem pomyslné osy sedmivrtulové domény. Beta listy jsou spojeny v řadě za sebou ( $\beta 1/1$  směrem k  $\beta 7/4$ ) kolem centrální osy. Řetězec je stabilizován vzájemnými hydrofobními interakcemi mezi prvním (modrým) a posledním (zeleným) listem. V zúžení vstupu do centrálního tunelu na obrázku 6A jsou vidět molekulární modely, kde se nacházejí aminokyseliny Lys82, Glu134, His180, Asp242, Lys389 a Lys390. Na obrázku Obrázek 6 B je struktura G-proteinu  $\beta$  podjednotky. Spojení mezi dvěma terminálními konci základního polypeptidového řetězce je zajištěno vodíkovými vazbami mezi N terminálním koncem (modrá) a třemi antiparalelními  $\beta$  vlákny z C terminálního konce (zelená).



Obrázek 7: Vnější povrch POP (Fülöp et al. 1998)

**Obrázek 7** ukazuje vnější povrch POP, který je poskládán z polypeptidového řetězce. Dlouhá kavita s centrální doménou, která se rozšiřuje v centrální tunel, je přístupná skrz zúžený otvor na spodní straně vrtulové domény. V centrálním tunelu je vidět molekulární model kovalentně navázaného inhibitoru Z-Pro-prolinalu (Fülöp et al. 1998).

Díky této speciální struktuře je enzym selektivní pro oligopeptidy ne delší než 30 AMK. Kratší oligopeptidy bez sekundární struktury reagují s tímto enzymem snadněji a difundují nejjednodušší cestou do aktivního místa (Medrano et al. 1998). Z této vlastnosti vyplývá, že dlouhé biologicky aktivní peptidy, které většinou ve své struktuře obsahují prolin, jsou chráněny před proteolýzou v cytosolu (Fülöp et al. 2000).

### 5.3.2 Substráty prolyloligopeptidasy

Přírodní krátké peptidy obsahující uvnitř řetězce prolin jsou potenciálními substráty POP. Některé peptidy mohou být nedostupné díky své buněčné lokalizaci a také díky své sekundární modifikaci. Jejich účinky byly potvrzeny *in vitro* na tkáňových homogenátech, purifikovaných tkáních a na rekombinantních enzymech. V *in vivo* testech nebyly některé *in vitro* vlastnosti prokázány.

Následující Tabulka 1 představuje jak široké je spektrum působení POP ve fyziologických procesech. Primární funkcí POP je hydrolýza vazby obsahující prolin, ale může hydrolyzovat i jiné peptidické vazby např. Ala-Thr a Val-Gly, ale také Cys-Xaa peptidickou vazbu v neobvyklých neuroprotektivních peptidech např. humaninu. Nicméně se ukazuje, že hlavní fyziologická role POP je v regulaci hladin všech neuronálních peptidů. Její inhibice může mít tedy přímý vliv na centrální nervový systém, který ovlivňuje chování, náladu, vnímání, zpracování podnětů, učení a paměť. Podílí se na vzniku neurodegenerativních onemocnění jako je např. AD a Parkinsonova choroba (García-Horsman et al. 2007).

Tabulka 1: Malé (30 AMK) biologicky aktivní peptidy – potenciální substráty POP  
(García-Horsman et al. 2007)

<b>Substrát</b>	<b>Biologický význam</b>
<b>Substance-P</b>	Zánětlivý proces
<b>TRH</b>	Cholinergní transmise
<b>GnRH</b>	Sekrece LH, FSH, neurotransmitery v hypotalamu
<b>Arginin-Vasopresin</b>	Cholinergní transmise, učení, paměť,
<b>RAS</b>	Angiotensin I, II - hypertense
<b>Bradykinin</b>	Vazodilatace - ↓ TK, podobnost s ACE
<b>Oxytocin</b>	Porod, kojení- vztah matka x potomek
<b>β-Endorphin</b>	Neurotransmise, periferní nervový systém
<b>Neurotensin</b>	Regulace dopaminerních transmisí, endokrinní a parakrinní funkce
<b>α-MSH</b>	Pigmentace, vlasy, pokožka, sexuální aktivita
<b>β-Casomorphin</b>	Opioidní účinky
<b>LVV-hermorphin-7</b>	TK, léčba AD
<b>Urotensin II</b>	Vasokonstrikce
<b>Morphiceptin</b>	Opioidní účinky
<b>Humanin</b>	Neuroprotektivní účinky před AB, cytoprotektivní účinky
<b>Octadecaneuropeptide</b>	Syntéza neuroaktivních steroidů v CNS
<b>Endomorphin-1</b>	Opioidní účinky
<b>Endomorphin-2</b>	Opioidní účinky
<b>Enkelytin</b>	Opioidní účinky
<b>Tyr-MIF-I</b>	Neurotransporter
<b>Tyr-W-MIF-I</b>	Opioidní účinky
<b>Dynorphin-A</b>	Opioidní účinky
<b>Galanin</b>	Obrana proti neurodegenerativním onemocnění, Roztroušená skleróza, stimulace chuti k jídlu

<b>Neuromedin U</b>	Neuropeptid-kontrakce hladkého svalstva, T K, bolest
<b>Kinetensin</b>	Neuropeptid
<b>Orexin</b>	Neuroexitační mediátor, regulace příjmu potravy, regulace spánku a bdění, deficit souvisí s narkolepsií
<b>Somatostatin</b>	Regulace růstového hormonu, štítné žlázy, inhibice gastrinu, inhibice inzulínu, glukagonu
<b>B-MSH</b>	Hyperpigmentace, stimulace aldosteronu
<b>Tuftsín</b>	Stimulace fagocytární a baktericidní aktivity neutrofilních granulocytů a makrofágů
<b>Gastrin</b>	Peptidický hormon – stimulace žaludečních šťáv
<b>Melanin concentrating hormone</b>	Regulace příjmu potravy, regulace spánku a bdění



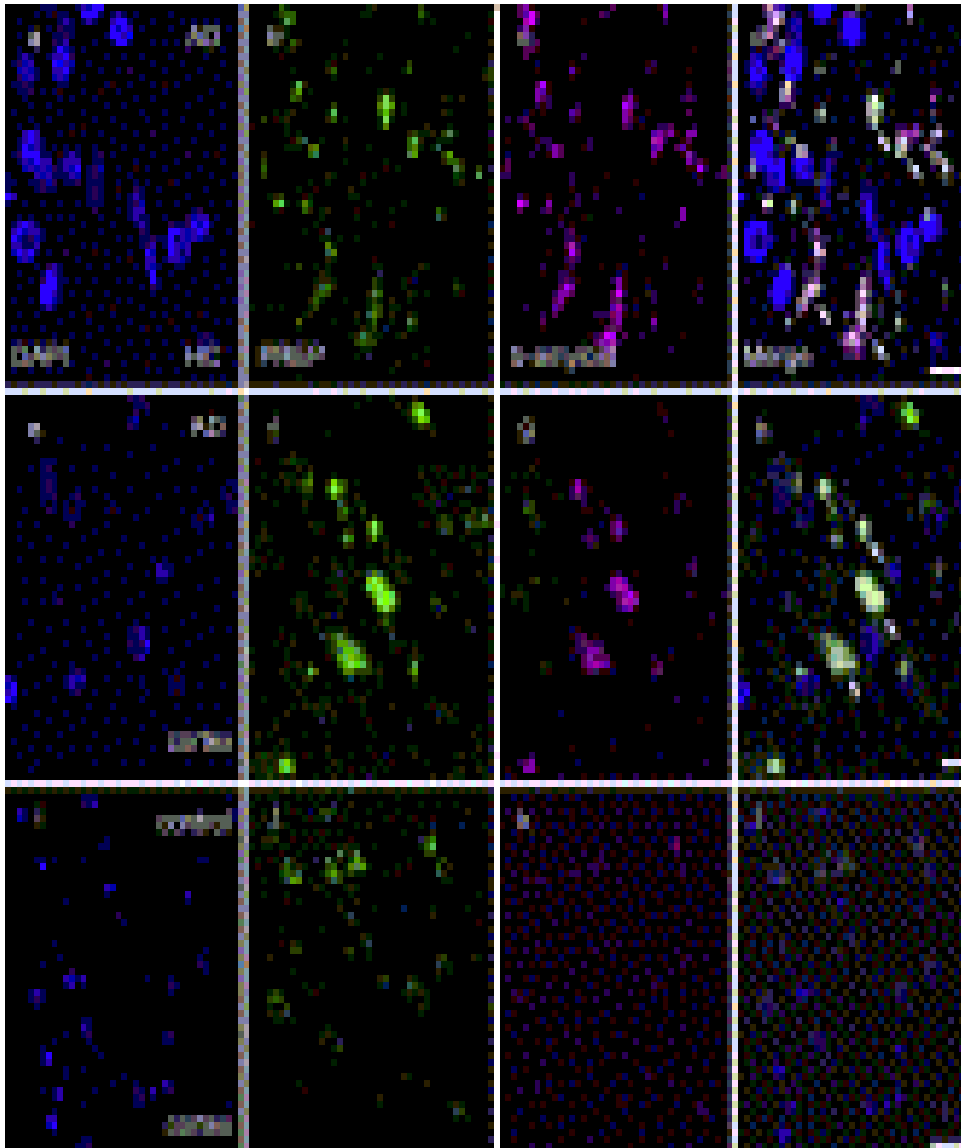
### 5.3.3 Aktivita a lokalizace prolyloligopeptidasy v CNS

POP vykazuje v různých tkáních mozku rozdílnou aktivitu. Nejvyšší aktivita je v cerebrálním kortexu, zatímco v jiných oblastech vykazuje mnohem nižší aktivitu. Vyšší aktivita je např. v mozečku a nepatrně nižší aktivita je v mozkovém kmeni. Distribuce POP aktivity mezi různé neuronální buněčné typy byla analyzována v několika studiích na zvířecích modelech. Nejvyšší aktivita byla v neuronech, astrocytech a gliových buňkách, zatímco snížená aktivita byla pozorována v oligodendrocytech.

Kromě cytosolu je aktivita POP lokalizována v membránách rozmanitých buněčných typů. Největší aktivita je v cytosolu, ale byla také nalezena v mitochondriálních frakcích, intracelulárních membránách endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Pomocí imunofluorescenčních technik byla také prokázána jako dočasná komponenta mikrotubulinového cytoskeletu a tubulinu v gliových a neuroblastomových rakovinových buňkách. Nejvyšší koncentrace POP byla nalezena v perinukleárních šterbinách, ale ne v jádře mozkových buněk, což je například v rozporu s nálezem v periférii, kde se POP nachází i v jádře, což vysvětluje nepoměr s rychlejší proliferací POP v periferních buňkách, než v CNS (Myöhänen et al. 2009).

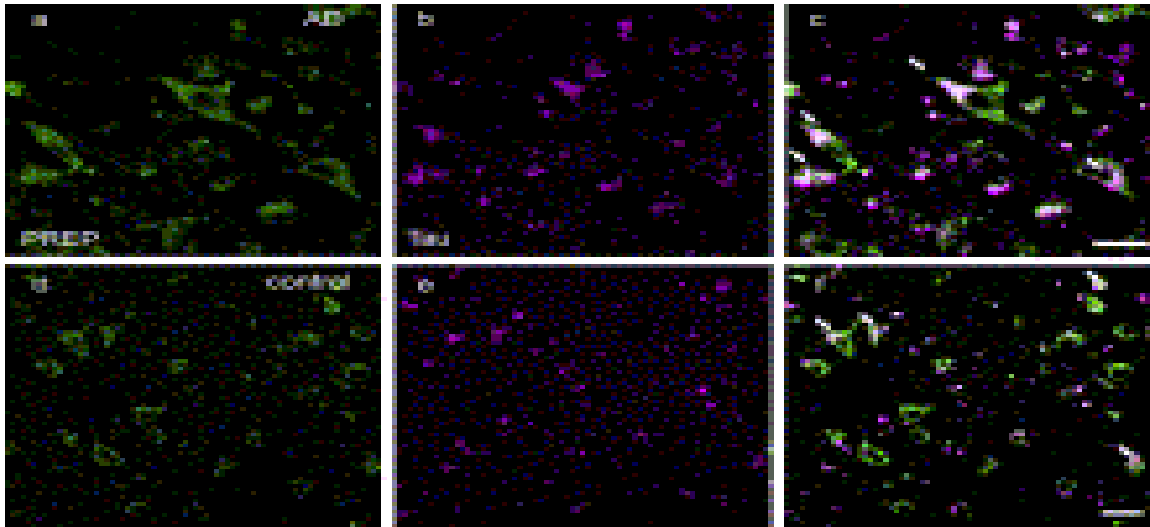
### 5.3.4 Neurodegenerativní onemocnění a prolyloligopeptidasa

Velké množství studií potvrzuje, že hladiny různých neuropeptidů v mozku jsou pozměněny u pacientů, kteří trpí neurodegenerativními onemocněními, jež vyvolávají ztrátu paměti. Většina těchto změn byla doložena post-mortem pomocí imunofluorescenční mikroskopické analýzy – spolulokalizací markerů nemoci a enzymu POP. Vzorok byly získány z tkáňových řezů nemocného pacienta (**Obrázek 8**), u kterého bylo prokázáno neurodegenerativní onemocnění (označení: a-h). Řez a-d je hipokampus, e-i entrohinal cortex - první cíl AD. Kontrolou byl řez tkáně od pacienta bez neurodegenerativního onemocnění (označení: i-j). POP- zelená,  $\beta$  amyloid – fialová. Poslední sloupec je překryv POP a  $\beta$  amyloidu. Bílá barva informuje, že změna aktivity POP v buňkách potencuje vznik  $\beta$  amyloidu.



Obrázek 8: POP x A $\beta$  (Hannula et al. 2013)

Následující **Obrázek 9** sleduje další marker AD  $\tau$ -protein v souvislosti se změnou aktivity POP v řezu tkáně z hippocampu. Obrázek a-c je řez tkáně pacienta, u kterého byla potvrzena AD. Obrázek d – f byl řez tkáně od pacienta bez neurodegenerativního onemocnění. POP - zelená,  $\tau$ -protein – fialová. Poslední sloupeček je překryv POP a  $\tau$ - proteinu. Bílá barva informuje, že změna aktivity POP v buňkách potencuje vznik  $\tau$ - proteinu.



Obrázek 9: POP a Tau protein (Hannula et al. 2013)

Díky tomuto zjištění se POP jeví jako vhodný cíl léčby neurodegenerativních onemocnění (Hannula et al. 2013).

### 5.3.5 Inhibitory prolyl oligopeptidasy

Inhibitory POP jsou přírodního i syntetického původu. Přírodním zástupcem je např. berberin, baicalin, nebo endogenní peptidy získané z tkání potkanů a prasat. Hodnota inhibiční konstanty u těchto inhibitorů se pohybuje v mikromolárních koncentracích.

Objev, že inhibitory POP jsou schopny obnovit paměť, jejíž ztráta byla navozena působením skopolaminu, způsobil velký rozmach ve vývoji syntetických inhibitorů POP. Hodnota inhibiční konstanty se pohybuje v nanomolárních koncentracích. Tyto substráty obsahují ve své struktuře prolin, nebo analoga prolinu. Díky tomu mohou být také substrátem POP. Důležitým substituentem je pyrrolidinová struktura, která je klíčová pro vazbu inhibitoru do aktivního místa enzymu. Kyano, hydroxyacetylová a aldehydová skupina zvyšují afinitu inhibitorů k enzymu (García-Horsman et al. 2007).

## 5.4 Oxidační stres

Nerovnováha mezi buněčnou produkcí reaktivních forem dusíku a kyslíku (RONS) a schopností buňky bránit se proti nim se nazývá oxidační stres (OS). RONS zahrnují jak volné radikály, tak i látky, které radikály nejsou. Volným radikálem je látka, která obsahuje jeden nebo více nepárových elektronů. Ztráta elektronů je tzv. oxidace. Volné radikály jsou okamžitě redukovány, protože jiné molekuly jim dodají své elektrony. Nejčastější buněčné volné radikály jsou hydroxylový radikál ( $\text{OH}\cdot$ ), superoxid anion radikál ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) a oxid dusnatý ( $\text{NO}\cdot$ ). Jiné molekuly jako peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a peroxyinitrit ( $\text{ONOO}$ ), nejsou volnými radikály, ale jsou zapojeny v procesech OS.

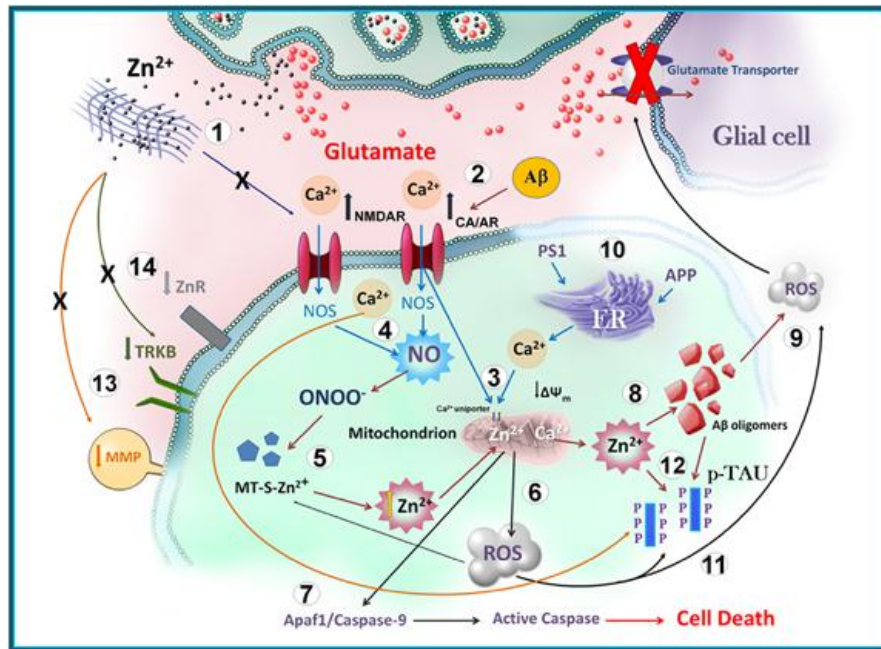
Lidský mozek představuje pouze dvě procenta z celkové váhy těla, ale spotřebovává 20 % z celkového objemu kyslíku dodaného respiračním systémem. Jeho vysoké nároky na energii způsobují, že mnohem snadněji podléhá OS, než jiné orgány (Chen a Zhong 2014a).

RONS jsou zapojeny jak ve fyziologických, tak i patologických procesech. Ve fyziologických procesech působí jako modulátory vnitřních biologických procesů, včetně signálu transdukce, transkripce, nebo programované buněčné smrti (Cui et al. 2004).

V neurodegenerativních procesech způsobuje OS poškození buněk mechanismem apoptózy tak, že RONS oxidují životně důležité buněčné komponenty, jako jsou lipidy, proteiny a DNA (Gilgun-Sherki et al. 2001a).

Mnoho výzkumů potvrdilo, že OS je důležitým faktorem, který přispívá k iniciaci a progresi AD. Vysoké hladiny kovů, oxidovaných proteinů, lipidů, mitochondriální dysfunkce a oxidativní poškození jaderné a mitochondriální DNA manifestují oxidativní poškození mozku. Zvýšené hladiny těchto markerů byly nalezeny nejen v mozku, ale i v cerebrospinální (mozkomíšní) tekutině, krvi a moči pacientů trpících AD (Markesbery 1997; Zhao a Zhao 2013).

Mechanismy, které vedou k narušení redoxní rovnováhy a vzniku volných radikálů, nejsou stále jednoznačně určeny. Navíc důkazy potvrzují, že oxidační stres potencuje agregaci  $\text{A}\beta$  peptidu, fosforylaci a polymeraci  $\tau$ -proteinu. Vzniká tak začarovaný kruh (**Obrázek 10**), kdy stále není jednoznačně jasné, zda je OS příčinou vzniku AD, či je důsledkem vzniku AD (Zhao a Zhao 2013).



Obrázek 10: Příčina a důsledek AD na základě OS (Corona et al. 2011)

### 5.4.1 Oxidace lipidů

Mozek je bohatý na fosfolipidy, které jsou důležité v procesech neurotransmise, základních neuronálních interakcích a kognici. Fosfolipidy v mozku obsahují vysoký poměr polynenasycených mastných kyselin (PUFAs), zejména  $\omega$ -3-mastnou kyselinu a arachidonovou kyselinu. Bylo zjištěno, že jak se zvyšuje hladina volných radikálů v mozku, tak obsah PUFAs postupně klesá. Navíc lipidové hydroperoxydy jsou většinou nestabilní a v přítomnosti železa se automaticky rozkládají na různé produkty, jako například malondialdehyd, akrolein, 4-hydroxy-2-trans-nonenal (4-HNE), nasycené a nenasycené ketony, epoxidy a n-alifatické aldehydy C6-C13. Díky svým elektrofilním vlastnostem je akrolein mnohem reaktivnější než  $\alpha,\beta$ -aldehydy a je schopen i ve velmi nízkých koncentracích měnit transmembránovou a cytoskeletární strukturu proteinu.

4-HNE je schopen inhibovat syntézu DNA, RNA a proteinů. Hraje také důležitou roli v neurotoxicitě indukované glutamátem při AD. Glutamát exitotoxin působí přes NMDA receptor, zvyšuje intracelulární volné radikály, které jsou ze synapse odstraněny glutamátovým transportem, zejména gliovým glutamátovým transportem GLT-1. A $\beta$  peptid inhibuje vylučování glutamátu, potencuje vazbu 4-HNE na glutamátové transportéry a

sníží glutamin syntetasu, která katalyzuje přeměnu glutamátu. Vzniká přebytek intraneuronálního  $\text{Ca}^{2+}$  a následkem je buněčná smrt.

Dalším produktem peroxidace lipidů jsou isoprostany (F2-IsoPs, F4-IsoPs). Isoprostany vznikají z arachidonové kyseliny následkem její esterifikace. Zvyšující se hladina F2-IsoPs a F4-IsoPs je detekována v cerebrospinální tekutině u AD.

#### **5.4.2 Oxidace proteinů**

Zvyšující se hladina karbonylovaných proteinů je ukazatelem oxidativního poškození proteinů v mozku. Karbonylované proteiny vznikají buď přímou oxidací volných postranních AMK, nebo konjugací s reaktivními produkty peroxidace lipidů a pokročilé glykace (Valko et al. 2006).

Reakce různých RONS s tyrosinem jsou příčinou produkce 3-nitrotyrosinu a 3,3'-dityrosinu. Mimo to je nitrace proteinů časným markerem v patogenezi AD. Především celková nitrace proteinů v inferior parietal lobule (nižším asociačním lalůčku) a v hippocampu u pacientů s mírnou kognitivní poruchou, je mnohem vyšší, než u zdravých kontrolních pacientů (Chen a Zhong 2014a).

#### **5.4.3 Oxidace nukleových kyselin**

Oxidace jaderné DNA, mitochondriální DNA a RNA vede k tvorbě mnoha různě modifikovaných purinových a pyrimidinových bází především 8-hydroxy-2'-deoxyguanosinu (8-OHdG). U pacientů s AD byla hladina 8-OHdG v mitochondriální DNA, která byla získána z úseku parietal cortex, třikrát vyšší, než u zdravých pacientů. Zajímavé je, že se 8-OHdG objeví již před typickými znaky AD, jako jsou např. neurofibrilární klubka (NFTs) a  $\text{A}\beta$  plaky a před agregací  $\text{A}\beta$  peptidu.

Všechny produkty oxidace lipidů, proteinů a nukleových kyselin v krvi jsou důležitými biomarkery v rané diagnostice AD (Chen a Zhong 2014; Moreira et al. 2008).

#### **5.4.4 Alzheimerova nemoc a antioxidanty**

Lidský organizmus využívá řady fyziologických procesů k ochraně před škodlivými účinky RONS. Významnou roli zde mají především antioxidanty. Antioxidanty můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin na enzymatické, které pomáhají rozkládat RONS na méně nebezpečné sloučeniny, a na neenzymatické, které vylučují RONS, nebo pomáhají

regenerovat jiné antioxidanty. Enzymatické antioxidanty zahrnují např. superoxiddismutasu (SOD), glutathion peroxidázu (GPX), katalázu (CAT), kyselinu askorbovou (vitamin C),  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), glutathion (GSH),  $\beta$ -karoten a retinol (vitamin A). Hladiny enzymů, které regulují OS za fyziologických podmínek, jsou u AD pozměněny, a tudíž nejsou schopny ochránit organismus před poškozením.

Antioxidanty jsou jak přírodního, tak i syntetického původu. K přírodním látkám s antioxidačními účinky, které přijímáme potravou, patří vitamín E, C a karotenoidy. Vitamin E je účinný při zlepšování kognitivních funkcí u pacientů s AD, ale výsledky studií ukazují na velké interindividuální rozdíly. Ne všichni pacienti reagují stejně na vitamin E, což je způsobeno rozdílnou absorpcí tohoto vitamínu u jednotlivých pacientů. Stejná dávka vitamínu E tak nemá stejný antioxidační účinek *in vivo* u všech léčených pacientů (Viña et al. 2004).

Zelenina, ovoce, vláknina, zelený čaj, červené víno a aromatické léčivé rostliny jsou zdrojem dalších přírodních látek, kterým je v poslední době přikládán mnohem větší význam než je vitamin C a E. Patří sem zejména polyfenolické sloučeniny, jako jsou flavonoidy, katechiny, a fenolické kyseliny.

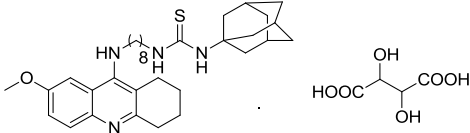
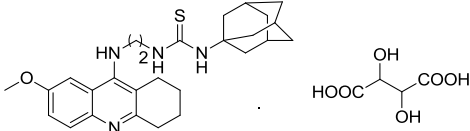
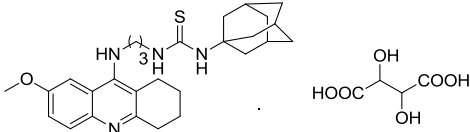
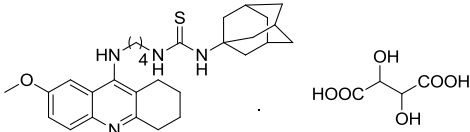
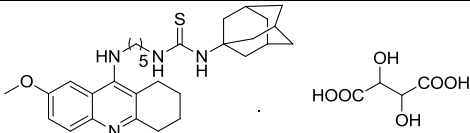
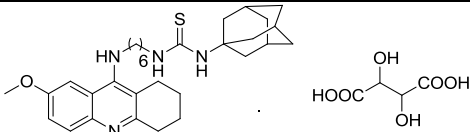
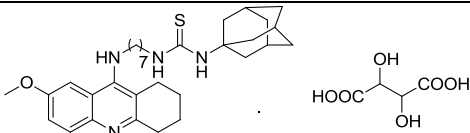
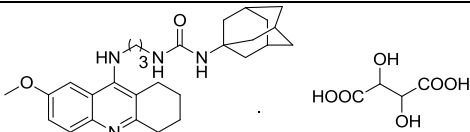
Ochranné účinky flavonoidů v biologických systémech jsou připisovány jejich schopnosti přenášet elektrony volných radikálů, chelatovat kovy, aktivovat antioxidační enzymy, redukovat  $\alpha$ -tokoferolové radikály a inhibovat oxidázy (Heim et al. 2002).

Nicméně protože naše endogenní antioxidační obrana není zcela efektivní a protože náš organismus je v dnešní době ve větší míře vystaven škodlivým faktorům životního prostředí, bylo by vhodné připravit antioxidanty, které by procházely přes hemoencefalickou bariéru (Blood Brain Barrier, BBB) a tím by mohly snížit kumulativní účinky oxidačního poškození. Antioxidanty, které byly zkoumány jako potenciální terapeutické prostředky, neprocházejí přes BBB, i když některé z nich prokázaly omezenou účinnost na zvířecích modelech, nebo v malých klinických studiích. Dosud žádný z aktuálně dostupných antioxidantů neukázal velkou účinnost. Z tohoto důvodu by všechny nové antioxidační molekuly, které jsou navrženy pro potenciální neuroprotektivní léčbu akutních nebo chronických neurologických poruch, měly procházet přes BBB (Gilgun-Sherki et al. 2001b) .

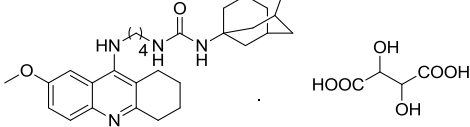
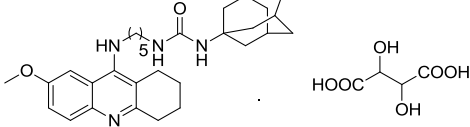
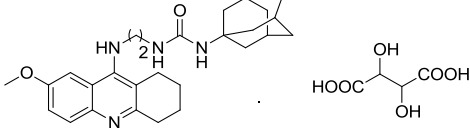
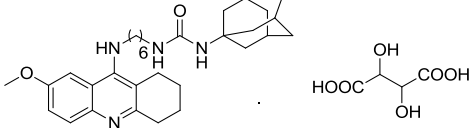
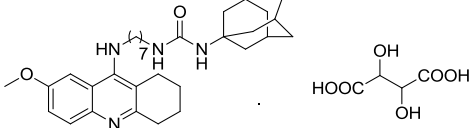
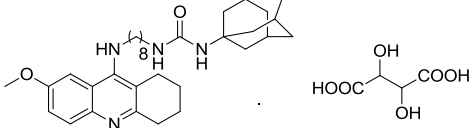
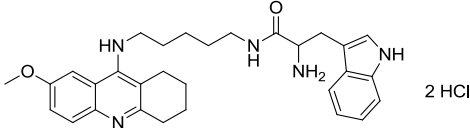
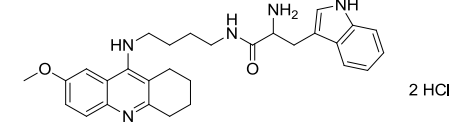
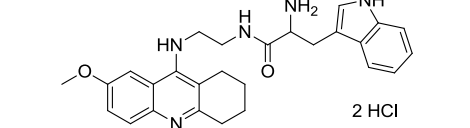
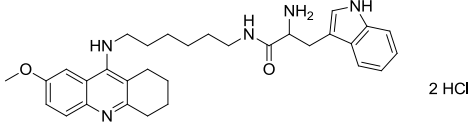
## 6. Experimentální část

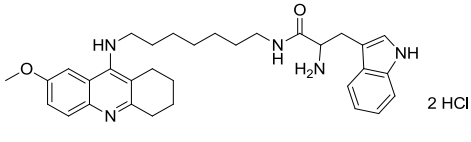
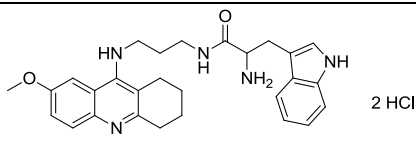
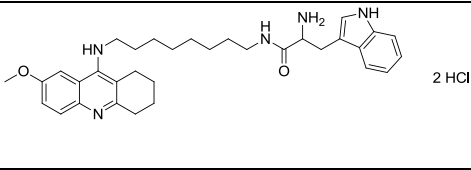
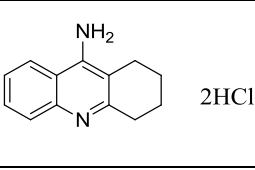
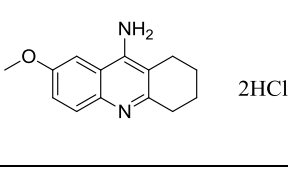
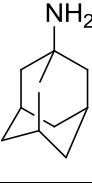
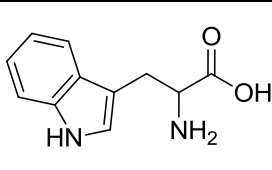
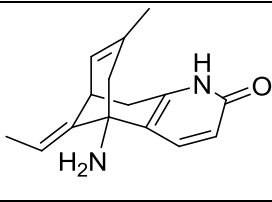
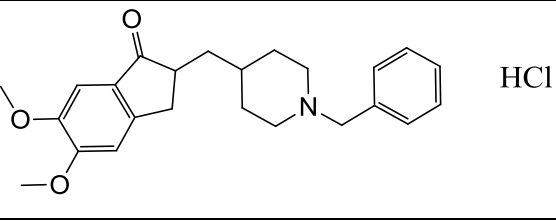
### 6.1 Seznam testovaných látek

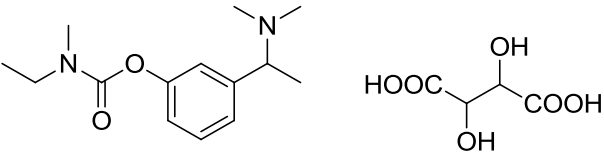
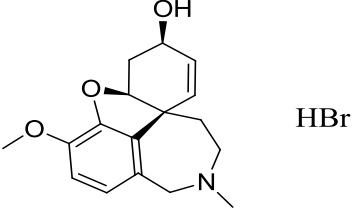
Tabulka 2: Seznam testovaných látek

Označení vzorku	Struktura
1-KS-18	
1-KS-21	
1-KS-22	
1-KS-30	
1-KS-31	
1-KS-33	
1-KS-35	
1-KS-40	



<b>1-KS-42</b>	
<b>1-KS-45</b>	
<b>1-KS-46</b>	
<b>1-KS-47</b>	
<b>1-KS-50</b>	
<b>1-KS-51</b>	
<b>1-KS-53</b>	
<b>1-KS-58</b>	
<b>1-KS-59</b>	
<b>1-KS-61.1</b>	

<p><b>1-KS-62</b></p>	
<p><b>1-KS-63.1</b></p>	
<p><b>1-KS-66.1</b></p>	
<p><b>Takrin hydrochlorid</b></p>	
<p><b>7-MEOTA hydrochlorid</b></p>	
<p><b>1-Adamantylamin</b></p>	
<p><b>Tryptofan</b></p>	
<p><b>(±)-Huperzin A</b></p>	
<p><b>Donepezil hydrochlorid</b></p>	

<p><b>Rivastigmin tartarát</b></p>	 <p>The image shows the chemical structure of Rivastigmin, which consists of a central benzene ring with a dimethylaminoethyl ester group at the 1-position and a dimethylaminoethyl group at the 4-position. To its right is the structure of tartaric acid, represented as HOOC-CH(OH)-CH(OH)-COOH.</p>
<p><b>Galantamin hydrobromid</b></p>	 <p>The image shows the chemical structure of Galantamin, a complex bicyclic alkaloid with a tropane-like core and a piperidine ring. To its right is the label 'HBr', indicating its hydrobromide salt form.</p>

### 6.1.1 Testované KS látky

Všechny testované látky KS byly připraveny na Katedře toxikologie Univerzity obrany Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Jejich čistota byla potvrzena metodou NMR na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Tyto látky vykazovaly vysoké inhibiční vlastnosti na acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BChE), hodnoty  $IC_{50}$  se pohybovaly v  $\mu M$  koncentracích, proto byly vybrány, jakožto potenciální léčiva AD do následujících testů.

### 6.1.2 Standardy

Standardní látky byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich spol. s.r.o.:

- 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin hydrochlorid monohydrát (Takrin) - k. č. A3773
- 1-Adamantylamin – k. č. 138576
- Tryptofan – k. č. T-0254
- ( $\pm$ )-Huperzin A – k. č. H5777
- Donepezil hydrochlorid – k. č. 1224981

Standardní látka byla zakoupena u firmy INC Biomedical, INC., USA:

- Galantamin hydrobromid – k. č. 159782

Dar Univerzity Pardubice, Katedra fyzikální chemie:

- Rivastigmin tartrát

Standardní látka syntetizovaná na Katedře toxikologie Univerzity obrany Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Její čistota byla potvrzena metodou NMR na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy:

- 7-metoxytakrin (7-MEOTA)

## 6.2 Prolyloligopeptidasa

### 6.2.1 Seznam chemikálií

Chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich spol. s.r.o.:

- NaCl – k. č. S7653-25G
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – k. č. 30427
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – k. č. 60220
- POP lidská rekombinantní – k. č. O9515
- 1,4-dioxan bezvodý – k. č. 296309
- Z-Gly–Pro-4-nitroanilid – k. č. 96286
- Albumin – k. č. A2153
- DMSO - k. č. 1370
- Z-gly-pro-prolinal – k. č. SML 0205

Chemikálie byla zakoupena u firmy Penta spol. s.r.o.:

- KCl - k. č. 16210-31000

Chemikálie byla zakoupena u firmy Biomedica ČS spol. s.r.o.:

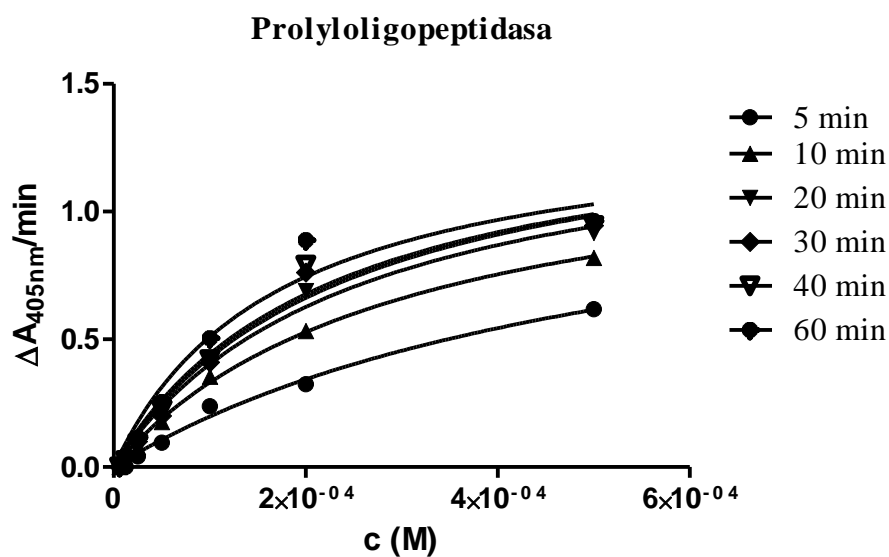
- POP lidská rekombinantní – k. č. 4308-SE-010

### 6.2.2 Přístroje

- Váhy Mettler Toledo AB204-S (Metler Toledo International, Inc., Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex digital 10P (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo)
- Třepačka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biosan Medical - Biological Research & Technologies, Litva)
- Sušárna Venticell 55 (BMT Medical Technology s.r.o., Česká republika)
- Vortex LABdancer IP 40 (IKA-WERKE GmbH Janke & Kunkel, Německo)
- Automatický mikrodestičkový rieder EL800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski VT, USA)

### 6.2.3 Metoda stanovení aktivity prolyloligopeptidasy

Byla optimalizována kolorimetrická metoda pro stanovení aktivity lidské rekombinantní POP, složení reakčních směsí, časové závislosti z hlediska dosažení maximální účinnosti metody (Matheussen et al. 2012). Byla změřena hodnota  $K_m$  substrátu Z-gly-pro-4-nitroanilidu pro optimalizaci koncentrace substrátu (Tab. 3) a následná časová závislost rychlosti konverze substrát (Graf 1).



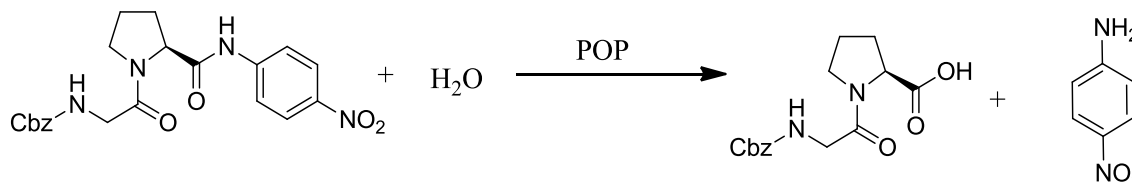
Graf č. 1: Časová závislost rychlosti konverze substrátu

Tabulka 3: Optimalizace koncentrace substrátu

<b>t (min)</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b><math>K_m</math> (M)</b>	1,59E-04	3,981E-005	5,442E-005
<b>t (min)</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b><math>K_m</math> (M)</b>	6,763E-005	6,961E-005	5,887E-005

## 6.2.4 Princip metody

Enzym POP štěpí (hydrolyzuje) substrát Z-gly-pro-4-nitroanilid v místě mezi prolinem a 4-nitroanilidem. Dochází k barevné změně reakční směsi z bezbarvé na žlutou. Přírůstek absorbance se měří při vlnové délce 405 nm.



## 6.2.5 Postup měření

POP byla rozpuštěna v 0,01M Na/K fosfátovém pufru o pH 7,4. Pufr obsahoval 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl. Kvůli stabilizaci enzym obsahoval 0,01 % albuminu. Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO nebo v H<sub>2</sub>O podle své rozpustnosti v koncentraci 10<sup>-1</sup> (výchozí roztok pro přípravu koncentrační řady). Byla připravena její koncentrační škála od 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-8</sup> M. Substrát Z-gly-pro-4-nitroanilid byl rozpuštěn v 1,4-dioxanu (5 mM).

Stanovení aktivity enzymu bylo provedeno s použitím 96 jamkové mikrotitrační destičky tak, že destička obsahovala v jedné jamce 5 μl enzymu (3U/ml) + 170 μl 0,01 M fosfátového pufru o pH 7,4, 5 μl testované látky dané koncentrace a 5 μl POP. Vše bylo promícháno, inhibice proběhla po dobu 5 minut. Pak bylo přidáno 20 μl substrátu Z-gly-pro-4-nitroanilinu a inkubováno 30 min při 37°C. Celkový objem reakční směsi byl 200 μl. Změna aktivity POP byla změřena s pomocí ELISA readeru při vlnové délce 405 nm. Stejným způsobem byla změřena aktivita čistého enzymu. Přidaný objem inhibitoru byl nahrazen pufr. Dále byl proměřen kontrolní vzorek testované látky bez enzymu a slepý pokus pufru se substrátem. Jako referenční standardní inhibitor byl použit Z-prolinal.

## 6.3 Beta-sekretasa

### 6.3.1 Seznam chemikálií

Chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich spol. s.r.o:

- BACE1 lidská rekombinantní - S4195
- N- $\alpha$ -benzoyl-D,L-arginine p-nitroanilide (D,L-BAPNA)- k. č. B4878
- DMSO - k. č. 1370

Chemikálie byla zakoupena u firmy MERCK spol. s.r.o.:

- CH<sub>3</sub>COOH (100%) - k. č. K31469263 247

Chemikálie byla zakoupena u firmy Penta spol. s.r.o.:

- CH<sub>3</sub>COONa .3H<sub>2</sub>O – k. č. 70790-31000

Chemikálie byly zakoupeny u firmy Cayman Pharma spol. s.r.o.:

- Anatabin – k. č. 11001
- BACE1 lidská rekombinantní - k. č. 14645

Chemikálie byly zakoupeny u firmy Baria spol. s.r.o.:

- BACE1 lidská rekombinantní (Abnova) – k. č. H00023621-P01
- BACE1 lidská rekombinantní (BioVision) – k. č. 7609-5

Chemikálie byla zakoupena u firmy Invitrogen Life technologies spol. s.r.o.:

- BACE1 lidská rekombinantní - k. č. P2947

### 6.3.2 Přístroje

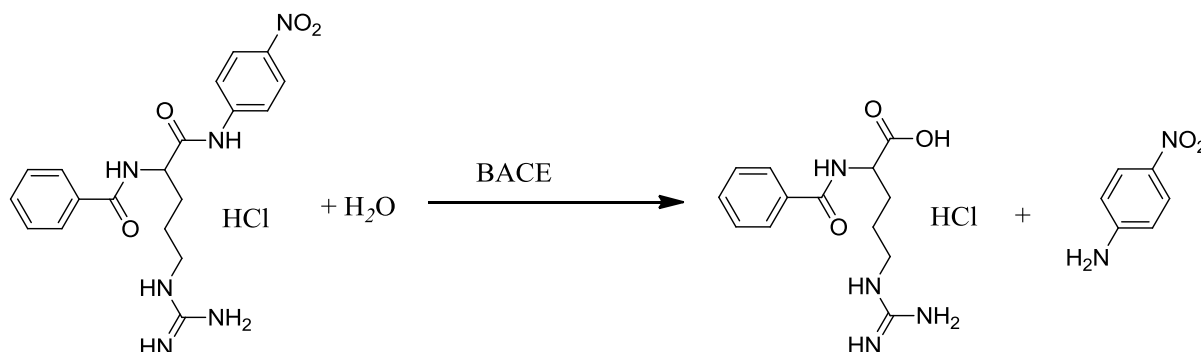
- Váhy Mettler Toledo AB204-S (Mettler Toledo International, Inc., Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex digital 10P (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo)
- Třepačka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biosan Medical - Biological Research & Technologies, Litva)
- Vortex LABdancer IP 40 (IKA-WERKE GmbH Janke & Kunkel, Německo)
- Rieder Paradigm TM Detection Platform (Beckman Coulter Ireland Inc., Irsko)

### 6.3.3 Metoda stanovení aktivity beta-sekretasy

Tato metoda je založena na článku Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors (Mancini et al. 2007).

### 6.3.4 Princip metody

Enzym BACE štěpí (hydrolyzuje) substrát D,L-BAPNA mezi argininem a p-nitroanilidem. Dochází k barevné změně reakční směsi z bezbarvé na žlutou. Přírůstek absorbance se měří při vlnové délce 405 nm.



### 6.3.5 Postup měření

BACE1 byla rozpuštěna ve 20 mM acetátovém pufru o pH 4,5. Pufr obsahoval 0,8064 ml ledové kyseliny octové a 0,9797g octanu sodného v 1l. Lahvička s enzymem byla udržována v ledové lázni a k enzymu byl postupně přidáván alikvotní objem acetátového pufru, až bylo dosaženo doporučeného objemu, nebo aktivity enzymu výrobcem. Enzym obsahoval kvůli stabilizaci 0,01 % albuminu. Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO nebo v H<sub>2</sub>O podle své rozpustnosti v koncentraci 10<sup>-1</sup> M (výchozí roztok pro přípravu koncentrační řady). Byla připravena její koncentrační škála od 10<sup>-1</sup> až 10<sup>-8</sup> M. Chromogenní substrát D,L-BAPNA byl rozpuštěn v DMSO a dále naředěn H<sub>2</sub>O tak, aby výsledná koncentrace ve vzorku nebyla víc jak 5%. Koncentrace substrátu vycházela z hodnoty K<sub>m</sub> (4,07 mM) uvedené v článku. Výsledná koncentrace v substrátu v analyzované směsi byla 10 mM. Studium aktivity enzymu bylo provedeno s použitím 96 jamkové mikrotitrační destičky tak, že destička obsahovala v jedné jamce 5 μl enzymu (5 U/ml) + 45 μl 20 mM acetátového pufru pH 4,5 a 50 μl substrátu BAPNA (N-α-benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid). Aktivita enzymu byla hodnocena po inkubaci destičky při 37 °C po dobu 60, 90 a 120 min na základě přírůstku absorbance při vlnové délce 405 nm s pomocí ELISA readeru. Stejným způsobem byla změřena aktivita čistého



enzymu. Přidaný objem inhibitoru je nahrazen pufrem. Dále byl proměřen kontrolní vzorek testované látky bez enzymu a slepý pokus pufru se substrátem.

Jako referenční standardní inhibitor byl použit anatabin.

## **6.4 Antioxidační aktivita**

### **6.4.1 Seznam chemikálií**

Chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich spol. s.r.o.:

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) – k. č. D9132
- Metanol – k. č. 34966
- L-askorbová kyselina – k. č. 7506
- DL- $\alpha$ -tokoferolacetát – k. č. 29992

### **6.4.2 Přístroje**

- Váhy Mettler Toledo AB204-S (Metler Toledo International, Inc., Švýcarsko)
- Ultrazvuková lázeň Sonorex digital 10P (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo)
- Třepačka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biosan Medical - Biological Research § Technologies, Litva)
- Vortex LABdancer IP 40 (IKA-WERKE GmbH Janke & Kunkel, Německo)
- Rieder Paradigm<sup>TM</sup> Detection Platform (Beckman Coulter Ireland Inc., Irsko)

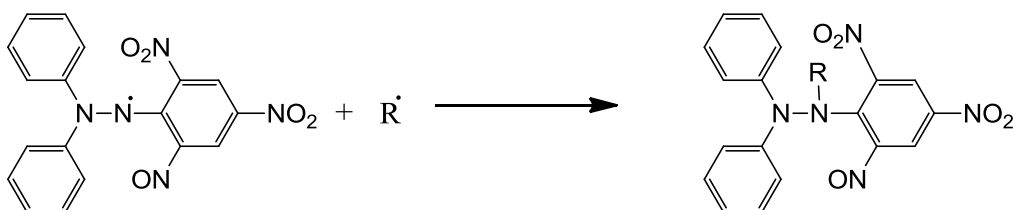
### **6.4.3 Metoda DPPH**

Tato metoda je považována za jednu ze základních metodik pro posouzení antiradikálové aktivity čistých látek i různých směsných vzorků. Spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem. Při reakci dochází k redukci radikálu. Pokles absorbance se měří po uplynutí konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky, ale lze také využít metodu HPLC nebo

elektronovou spinovou rezonanci (Espín et al. 2000; Yokozawa et al. 1998; Nanjo et al. 1996; Yamaguchi et al. 1998).

#### 6.4.4 Princip metody

Přítomnost antioxidantů s antiradikálovou aktivitou způsobí redukci barevného stabilního radikálu DPPH na bezbarvou neutrální molekulu. Rychlost a rozsah odbarvení (pokles absorbance) jsou přímo úměrné antioxidační (antiradikálové) účinnosti analyzované látky. Antioxidační aktivita se vyjádří jako účinná koncentrace antioxidantu, která je potřebná k redukci radikálu DPPH na 50 % (hodnota  $EC_{50}$ ). Pro charakterizaci antioxidační účinnosti lze také využít hodnotu antiradikálové aktivity  $ARP=1/EC_{50}$ .



#### 6.4.5 Postup měření

DPPH byl rozpuštěn v metanolu (0,2 mM). Testovaná látka byla připravena v koncentraci  $10^{-1}$  M (výchozí roztok pro přípravu koncentrační řady). Byla připravena její koncentrační škála od  $10^{-1}$  až  $10^{-8}$  M.

Do mikrotitrační polystyrenové čiré 96 jamkové destičky s rovným dnem bylo napipetováno 100  $\mu$ l 0,2 mM roztoku DPPH. K tomu bylo přidáno 100  $\mu$ l testované látky dané koncentrace. Celkový objem reakční směsi byl 200  $\mu$ l. Destička byla promíchána na třepačce mikrodestiček a nechala se stát ve tmě za laboratorní teploty. Pokles absorbance vzorků byl sledován při vlnové délce 515 nm. Jako referenční standardy byly použity DL- $\alpha$ -tokoferolacetát a kyselina L-askorbová.

## 7. Výsledky

### 7.1 Zpracování experimentálních dat

Ke zpracování dat byl použit software Microsoft Excel software (Redmont, WA, USA) a GraphPad Prism verze 5.02 pro Windows (GrapPad Software, San Diego, CA, USA)

### 7.2 Prolyl oligopeptidasa

Tabulka 4: Výsledky aktivity POP

Označení vzorku	POP IC <sub>50</sub> ± SEM (M)
1-KS-18	2,06E-04 ±1,87E-05
1-KS-21	2,69E-04±3,06E-05
1-KS-22	1,85E-05±2,65E-06
1-KS-30	1,04E-04±3,12E-05
1-KS-31	3,11E-04±3,12E-05
1-KS-33	3,41E-04±8,94E-05
1-KS-35	5,65E-04±7,23E-05
1-KS-40	2,41E-04±9,90E-05
1-KS-42	1,53E-04±4,88E-05
1-KS-45	2,41E-04±4,98E-05
1-KS-46	>7,90E-05
1-KS-47	1,06E-04±2,01E-05
1-KS-50	1,86E-04±8,93E-06

<b>1-KS-51</b>	1,52E-04±1,57E-05
<b>1-KS-53</b>	5,17E-05 ± 3,18E-06
<b>1-KS-58</b>	1,02E-04±3,28E-06
<b>1-KS-59</b>	2,59E-04±1,55E-05
<b>1-KS-61.1</b>	4,90E-04 ±6,10E-05
<b>1-KS-62</b>	>1,00E-1
<b>1-KS-63.1</b>	2,28E-03±2,12E-04
<b>1-KS-66.1</b>	4,85E-05±3,32E-06
<b>Takrin</b>	>1,00E-1
<b>7-MEOTA</b>	>7,90E-04
<b>1-Adamantylamin</b>	1,07E-03±6,66E-05
<b>Tryptofan</b>	>1,00E-1
<b>(±)-Huperzin A</b>	>1,00E-3
<b>Donepezil hydrochlorid</b>	>1,00E-2
<b>Rivastigmin tartarát</b>	>1,00E-1
<b>Galantamin hydrobromid</b>	>1,00E-1
<b>Z-pro-prolinal</b>	2,017E-09±4,134E-10

### 7.3 Antioxidační aktivita

Tabulka 5: Výsledky antioxidační aktivity

Označení vzorku	Antioxidační aktivita EC <sub>50</sub> ± SEM (M)				Antiradikálová síla (10 min) 1/EC <sub>50</sub> (1/M)
	10 min	15 min	30 min	60 min	
<b>1-KS-18</b>	1,72E-03 ± 2,62E-04	1,70E-03 ± 2,34E-04	1,08E-03 ± 4,39E-05	3,82E-04 ± 9,86E-05	5,82E+02
<b>1-KS-21</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-22</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-30</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-31</b>	2,23E-02 ± 4,28E-03	2,28E-02 ± 4,62E-03	2,70E-02 ± 6,94E-03	> 1,00E-1	4,49E+01
<b>1-KS-33</b>	3,67E-02 ± 9,63E-03	2,26E-02 ± 5,34E-03	2,45E-02 ± 6,08E-03	6,34E-02 ± 1,47E-02	2,73E+01
<b>1-KS-35</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-40</b>	> 1,00E-1	9,25E-02 ± 3,64E-02	4,84E-02 ± 7,03E-03	> 1,00E-1	2,91E+00
<b>1-KS-42</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-45</b>	3,14E-02 ± 3,63E-03	2,64E-02 ± 4,42E-03	2,86E-02 ± 9,09E-03	> 1,00E-1	3,18E+01
<b>1-KS-46</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-47</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02
<b>1-KS-50</b>	4,44E-02 ± 1,53E-03	3,74E-02 ± 1,02E-03	3,95E-02 ± 3,49E-03	> 1,00E-1	2,25E+01
<b>1-KS-51</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E+02

Označení vzorku	Antioxidační aktivita EC <sub>50</sub> ± SEM (M)				Antiradikálová síla (10 min) 1/EC <sub>50</sub> (1/M)
	10 min	15 min	30 min	60 min	
<b>1-KS-53</b>	5,34E-03 ± 1,28E-04	4,93E-03 ± 7,09E-05	4,74E-03 ± 4,26E-04	> 1,00E-2	1,87E+02
<b>1-KS-58</b>	1,09E-02 ± 2,13E-03	1,05E-02 ± 2,36E-03	1,14E-02 ± 3,74E-03	> 1,00E-1	9,16E+01
<b>1-KS-59</b>	2,18E-04 ± 1,67E-05	1,88E-04 ± 1,55E-05	1,73E-04 ± 1,06E-05	1,73E-04 ± 7,23E-06	4,58E+03
<b>1-KS-61.1</b>	9,64E-03 ± 9,97E-04	9,25E-03 ± 8,36E-04	9,54E-03 ± 7,81E-04	> 1,00E-1	1,04E+02
<b>1-KS-62</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	>1,00E+02
<b>1-KS-63.1</b>	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	> 1,00E-2	>1,00E+02
<b>1-KS-66.1</b>	5,66E-03 ± 1,32E-04	4,87E-03 ± 1,06E-04	4,42E-03 ± 1,28E-04	4,46E-03 ± 8,29E-04	1,77E+02
<b>Tacrine</b>	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	>1,00E+01
<b>MEOTA</b>	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	>1,00E+01
<b>1-Adamantylamin</b>	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	> 1,00E-1	>1,00E+01
<b>Tryptofan</b>	1,40E-02 ± 2,57E-03	1,29E-02 ± 2,42E-03	> 1,00E-2	> 1,00E-2	7,13E+01
<b>(±)-Huperzin A</b>	3,31E-07 ± 4,48E-08	4,04E-07 ± 6,10E-08	4,71E-07 ± 6,53E-08	6,28E-07 ± 7,85E-08	3,02E+06
<b>Donepezil HCl</b>	3,04E-06 ± 8,13E-07	3,34E-06 ± 1,07E-06	2,04E-06 ± 3,59E-07	3,09E-06 ± 7,19E-07	3,29E+05
<b>Rivastigmin tartarát</b>	1,04E-06 ± 1,71E-07	1,37E-06 ± 2,62E-07	2,06E-06 ± 5,21E-07	3,04E-06 ± 1,16E-06	9,60E+05
<b>Galantamin HBr</b>	8,90E-06 ± 2,09E-06	7,74E-06 ± 1,91E-06	6,74E-06 ± 1,74E-06	5,62E-06 ± 1,76E-06	1,12E+05

Označení vzorku	Antioxidační aktivita EC <sub>50</sub> ± SEM (M)				Antiradikálová síla (10 min) 1/EC <sub>50</sub> (1/M)
	10 min	15 min	30 min	60 min	
<b>Vitamin C</b>	1,90E-05 ± 5,94E-07	1,85E-05 ± 3,08E-06	1,99E-05 ± 6,83E-07	3,38E-05 ± 1,45E-06	5,27E+04
<b>D, L-<math>\alpha</math>- tokoferolacetat</b>	2,36E-01 ± 7,36E-02	2,00E-01 ± 3,28E-02	1,23E-01 ± 1,84E-02	1,44E-01 ± 5,53E-02	4,24E+00

## 8. Diskuze

### 8.1 Prolyl oligopeptidasa

Byla optimalizována kolorimetrická metoda pro stanovení aktivity POP, která je vhodná pro rychlé screeningové testování látek.

Všech 21 testovaných inhibitorů obsahuje ve své struktuře 7-MEOTA, méně toxický derivát takrinu působící jako neselektivní inhibitor AChE a BChE. Tento derivát je vždy postupně prodlužujícím řetězcem spojen u vzorku 1-KS-18 až 1-KS-51 s adamantylem, který ovlivňuje glutamátový systém blokadí *N*-methyl-*D*-aspartátových receptorů. Vzorek 1-KS-18 až 1-KS-35 má mezi spojovacím řetězcem a adamantylem thiomocovinu, v tomto případě je nejlepším inhibitorem POP vzorek 1-KS-22, který má tříuhlíkatý spojovací řetězec, hodnota  $IC_{50}$  je  $10^{-5}$  M. Vzorky 1-KS-40 až 1-KS-51 mají mezi spojovacím řetězcem a adamantylem močovinu, tato skupina je z pohledu inhibice vyrovnána, hodnota  $IC_{50}$  je  $10^{-4}$  M. Vzorky 1-KS-53 až 1-KS-66.1 mají adamantyl nahrazený tryptofanem, který je důležitým prekurzorem neurotransmiteru serotoninu. V této skupině je nejlepším inhibitorem vzorek 1-KS-53, obsahující ve svém spojovacím řetězci 5 uhlíků a 1-KS-66.1, mající 8 uhlíků. Jejich hodnota  $IC_{50}$  byla okolo  $10^{-5}$  M. Problémem vzorků obsahující adamantyl byla jejich špatná rozpustnost. V porovnání se standardním inhibitorem *Z*-gly-pro-prolinalem, jehož  $IC_{50}$  se pohybuje v nM koncentracích, jsou testované vzorky slabými inhibitory POP. Standardní inhibitory cholinesterasy, využívané k léčbě AD, nevykázaly schopnost inhibovat POP. Pouze výchozí látka syntézy 1-adamantylamin měl hodnotu  $IC_{50}$  v mM koncentracích.

Bohužel zatím žádná látka, která nemá ve své struktuře prolin, neprokázala v testech velkou inhibiční účinnost POP. Cílem současné léčby AD je připravit látky, které by svůj léčebný účinek zaměřovaly více terapeutickými směry. Z tohoto důvodu byly do našich testů zařazeny KS látky, které inhibují AChE a BChE již v  $\mu$ M koncentracích (Hernández-Rodríguez et al. 2014).



## 8.2 Beta-sekretasa

Kolorimetrickou metodu stanovení aktivity BACE dle článku Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors (Mancini et al. 2007) se nepodařilo zrealizovat.

Lidská rekombinantní BACE1 byla nakoupena od různých dodavatelů. Enzym od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. (Praha) nevykázal v pokusu aktivitu. Obsah lahvičky byl naředěn na objem 1 ml, dle doporučení od dodavatele. Enzym od firmy Invitrogen (dodavatel Life Technologies Czech Republic s.r.o., Praha) byl naředěn dle článku (Mancini et al. 2007) na výslednou aktivitu 0,33 U/ml a použit po alikvótech 50 ul. Vzorek opět nevykázal v pokusu aktivitu. Dále jsme zakoupili enzym od firmy Biovision (dodavatel Baria s.r.o. Psáry), který měl vykazovat aktivitu okolo 600 U, takže byl přibližně 3x koncentrovanější než preparát od Invitrogenu a od firmy Abnova od stejného dodavatele. S těmito enzymy byl proveden vždy stejný postup, jako s enzymem od firmy Invitrogen. Ani jeden z preparátů nebyl aktivní. Nakonec byl zakoupen enzym od firmy Cayman Pharma s.r.o. (Neratovice). Lahvička obsahuje dle výrobce 25 µg enzymu, aktivita není uvedena. Do lahvičky byl postupně pipetován objem pufru 50 µl až do celkového objemu 500 µl. Enzym opět nevykázal aktivitu. Funkčnost substrátu byla ověřena s pomocí trypsinu (finální koncentrace 0,25 %), který substrát štěpí podobně jako BACE1.

V experimentu bylo provedeno hodnocení více druhů pufrů (acetátový s pH 4 a 4,5; fosfátový s pH 7,4 a 8). Nejvyšší aktivita BACE1 je v literatuře popisována při pH 4 - 4,5. Je to dáno tím, že enzym se nachází např. v endosomálním (lysozomálním) aparátu, Golgiho aparátu, kde se nacházejí degradační enzymy (kyselé hydrolázy) (Venugopal et al. 2008). V literatuře je doporučeno prostředí pro reakci 20-50 mM acetátový pufr s pH 4,5. V našem experimentu jsme použili koncentraci 20mM. I přes volbu různých druhů pufrů a délky reakčního času nevykázal žádný z preparátů aktivitu, přitom použitý substrát byl funkční.

V dodacích listech k enzymu je prakticky u všech preparátů uvedeno, že je enzym málo stabilní. Aktivita enzymu je deklarována max. 6 měsíců od data výroby, při dodržení skladovacích podmínek. Po naředění by měl být uchováván na ledu, okamžitě zamrazen, nebo nejlépe ještě týž den zpracován, což jsme provedli. Doprava enzymu byla od každé firmy realizována jinak. Některá dodala enzym za normální teploty, jiná v gelovém balení a

jediná firma Cayman Pharma s.r.o. na suchém ledu. Je proto možné, že důsledkem dopravy dochází k degradaci enzymu. Výsledná nízká aktivita pak nemusí být dostatečná pro kolorimetrické hodnocení aktivity.

Alternativou je fluorescenční hodnocení, kde je využíváno velké množství fluorescenčních substrátů. Problémem bývá jejich špatná rozpustnost, což u některých znemožňuje stanovit hodnotu  $K_m$  nutnou pro optimalizaci substrátu (Mancini et al. 2011). Tato metoda je vhodná pouze pro látky, které nevykazují fluorescenci či absorpenci v oblasti budících vlnových délek, užívaných při fluorescenční metodě. Tím se však možné spektrum hodnocených látek značně zužuje, z tohoto důvodu by také nebylo možné měřit značnou část látek sledovaných v této práci..

### 8.3 Antioxidační aktivita (DPPH)

Pro změření antioxidační aktivity látek byla využita základní metoda DPPH. Tato metoda vychází z originální metody z roku 1958 (Blois 1958).

Postupem doby došlo k modifikaci této metody. V literatuře jsou popsány různé vlnové délky pro měření absorbance od 515 do 520 nm. Pro náš experiment jsme zvolili vlnovou délku 515 nm, vzhledem k rozsahu užitého měřicího přístroje. Dále jsou v literatuře doporučeny různé reakční časy, nejčastěji 5 min až 30 minut, ale také i šestihodinové měření. Naše vzorky byly proměřeny při 10, 15, 30 a 60 minutách. Reakce probíhala ve tmě a za laboratorní teploty. V literatuře je uváděna laboratorní teplota 35 a 37 °C (Musa et al. 2013; Molyneux 2004).

Všechny nově syntetizované testované látky ukazovaly velmi nízkou antioxidační aktivitu a antiradikálovou sílu, která je dána jejich strukturou. Ve své struktuře neobsahují žádnou skupinu, která by měla silný rezonanční efekt, který by stabilizoval volný elektron. Standardní inhibitory rivastigmin, donepezil, huperzin a galantamin v porovnání s vitamínem C vykazovaly hodnoty srovnatelné či vyšší, než standard vitamín C, jehož  $EC_{50}$  byla  $10^{-5}$  M a byla stabilní po celou dobu měření. Huperzin vykazoval nejvyšší antioxidační účinky, hodnota  $EC_{50}$  byla  $10^{-7}$  M.

D,L- $\alpha$ -tokoferolacetát je antioxidant s opožděným účinkem ve srovnání s klasickým tokoferolem, jehož antioxidační síla je dána p-alkoxy skupinou a metylovým substituentem

na aromatickém jádře. V prostředí metanolu dochází k deesterifikaci acetylové skupiny D,L- $\alpha$ -tokoferolacetátu a ke vzniku metylesteru kyseliny octové a uvolňování tokoferolu (Ali et al. 2013).

## 9. Závěr

Podářilo se optimalizovat kolorimetrickou metodu pro stanovení aktivity POP. Bylo otestováno 21 nově syntetizovaných látek řady KS, vybrané inhibitory AChE - huperzin, donepezil, rivastigmin, galantamin a výchozí látky syntézy látek KS. V porovnání se standardním inhibitorem Z-gly-pro-prolinalem, jehož  $IC_{50}$  se pohybuje v nM koncentracích, jsou testované vzorky slabými inhibitory POP. Standardní inhibitory acetylcholinesterasy, využívané k léčbě AD, nevykázaly schopnost inhibovat POP.

Kolorimetrickou metodu stanovení aktivity BACE se nepodařilo realizovat i přes různé zkoušené přístupy a nákup enzymu od rozličných dodavatelů. Naším záměrem je však pokračovat ve vývoji této metody.

Dále byla u látek KS, inhibitorů AChE a výchozích látek syntézy změřena jejich antioxidační aktivita a spočítána antiradikálová aktivita. Pro její hodnocení byla využita základní metoda s DPPH radikálem. Všechny nově syntetizované testované látky měly velmi nízkou antioxidační aktivitu, která je dána jejich strukturou. Standardní inhibitory AChE rivastigmin, donepezil, huperzin a galantamin v porovnání s vitamínem C vykazovaly hodnoty srovnatelné či vyšší, než tento standardní antioxidant. Inhibitor huperzin vykazoval nejvyšší antioxidační účinky.

## 10. Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease)
ACPH	Acylaminoacylpeptidasa
AChE	Acetylcholinesterasa
AMK	Aminokyselina
APP	Amyloidní prekurzorový protein
APP <sub>α</sub>	Amyloidní prekurzorový protein alfa
APP <sub>β</sub>	Amyloidní prekurzorový protein beta
ARP	Antiradikálová síla
Aβ	Amyloid beta
Aβ <sub>40</sub>	Amyloid beta <sub>40</sub>
Aβ <sub>42</sub>	Amyloidní beta peptid 42
BACE	Beta-sekretáza
BBB	Hematoencefalická bariéra ( Blood Brain Barrier)
BChE	Butyrylcholinesterasa
C83	83 AMK
C99	99 AMK
CAT	Katalasa
CTF	C terminální fragment
D,L-BAPNA	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPPIV	Dipeptidylpeptidasa IV
EC <sub>50</sub>	Polovina maximální efektivní koncentrace látky
F2-IsoPs	Isoprostaglandin F2
F4-IsoPs	Isoprostaglandin F4
GLT-1	Gliový glutamátový transportér
GPX	Glutathionperoxidasa
GSH	Glutathion
IC <sub>50</sub>	Koncentrace inhibitoru, při které klesne aktivita enzymu na 50 %
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
NTFs	Neurofibrilární klubko
OB	Oligopeptidasa B
OS	Oxidační stres
POP	Prolyloligopeptidasa
PUFAs	Polynenasycené mastné kyselina
RONS	Reaktivní formy kyslíku a dusíku
4-HNE	4-hydroxy-2-trans-nonenal
7- MEOTA	7-methoxytakin
8-OHdG	8-hydroxy-2'-deoxyguanosin

## 11. Literatura

AHMED, Rachel R, Christopher J HOLLER, Robin L WEBB, Feng LI, Tina L BECKETT a M Paul MURPHY, 2010. BACE1 and BACE2 enzymatic activities in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry* [online]. 2., roč. 112, č. 4, s. 1045–1053. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06528.x

ALI, Hussein M., Ahmed ABO-SHADY, Hany A. Sharaf ELDEEN, Hany A. SOROR, Wafaa G. SHOUSHA, Osama A. ABDEL-BARRY a Ahmed M. SALEH, 2013. Structural features, kinetics and SAR study of radical scavenging and antioxidant activities of phenolic and anilinic compounds. *Chemistry Central Journal* [online]. 16.3., roč. 7, č. 1, s. 53 [vid. 29. duben 2014]. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-7-53

ANAND, R, Kiran Dip GILL a Abbas Ali MAHDI, 2014. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* [online]. 1., roč. 76 Pt A, s. 27–50. ISSN 1873-7064. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2013.07.004

BARMAN, Arghya a Rajeev PRABHAKAR, 2013. Elucidating the catalytic mechanism of  $\beta$ -secretase (BACE1): a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach. *Journal of molecular graphics & modelling* [online]. 3., roč. 40, s. 1–9. ISSN 1873-4243. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmglm.2012.12.010

BLOIS, Marsden S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* [online]. 26.4., roč. 181, č. 4617, s. 1199–1200 [vid. 28. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1038/1811199a0

BUÉE, L, T BUSSIÈRE, V BUÉE-SCHERRER, A DELACOURTE a P R HOF, 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain research. Brain research reviews*. 8., roč. 33, č. 1, s. 95–130.

BUTTERFIELD, D.Allan, Jennifer DRAKE, Chava POCERNICH a Alessandra CASTEGNA, 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid  $\beta$ -peptide. *Trends in Molecular Medicine* [online]. 1.12., roč. 7, č. 12, s. 548–554. ISSN 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/S1471-4914(01)02173-6

CORONA, C., A. PENSALFINI, V. FRAZZINI a S. L. SENSI, 2011. New therapeutic targets in Alzheimer's disease: brain deregulation of calcium and zinc. *Cell Death & Disease* [online]. 23.6., roč. 2, č. 6, s. e176 [vid. 28. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.1038/cddis.2011.57

CUI, Ke, Xiaoling LUO, Keyi XU a M R VEN MURTHY, 2004. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* [online]. 8., roč. 28, č. 5, s. 771–799. ISSN 0278-5846. Dostupné z: doi:10.1016/j.pnpbp.2004.05.023

FÜLÖP, V, Z BÖCSKEI a L POLGÁR, 1998. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*. 24.7., roč. 94, č. 2, s. 161–170. ISSN 0092-8674.

FÜLÖP, V, Z SZELTNER a L POLGÁR, 2000. Catalysis of Serine Oligopeptidases Is Controlled by a Gating Filter Mechanism. *EMBO reports* [online]. 9., roč. 1, č. 3, s. 277–281. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.1093/embo-reports/kvd048

GARCÍA-HORSMAN, J A, P T MÄNNISTÖ a J I VENÄLÄINEN, 2007. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* [online]. 2., roč. 41, č. 1, s. 1–24. ISSN 0143-4179. Dostupné z: doi:10.1016/j.npep.2006.10.004

GEYLIS, Valeria, Vitaly KOURILOV, Zeev MEINER, Inger NENNESMO, Nenad BOGDANOVIC a Michael STEINITZ, 2005. Human monoclonal antibodies against amyloid-beta from healthy adults. *Neurobiology of aging* [online]. 5., roč. 26, č. 5, s. 597–606. ISSN 0197-4580. Dostupné z: doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.008

GHOSH, Arun K a Heather L OSSWALD, 2014. BACE1 ( $\beta$ -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Chemical Society reviews* [online]. 2.4. ISSN 1460-4744. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs60460h

GILGUN-SHERKI, Y, E MELAMED a D OFFEN, 2001a. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 6., roč. 40, č. 8, s. 959–975. ISSN 0028-3908.

GILGUN-SHERKI, Yossi, Eldad MELAMED a Daniel OFFEN, 2001b. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* [online]. 6., roč. 40, č. 8, s. 959–975 [vid. 21. duben 2014]. ISSN 0028-3908. Dostupné z: doi:10.1016/S0028-3908(01)00019-3

HANNULA, M J, T T MYÖHÄNEN, J TENORIO-LARANGA, P T MÄNNISTÖ a J A GARCIA-HORSMAN, 2013. Prolyl oligopeptidase colocalizes with  $\alpha$ -synuclein,  $\beta$ -amyloid, tau protein and astroglia in the post-mortem brain samples with Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience* [online]. 9.7., roč. 242, s. 140–150. ISSN 1873-7544. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.049

HEIM, Kelly E., Anthony R. TAGLIAFERRO a Dennis J. BOBILYA, 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 10., roč. 13, č. 10, s. 572–584 [vid. 21. duben 2014]. ISSN 0955-2863. Dostupné z: [http://www.jnutbio.com/article/S0955-2863\(02\)00208-5/abstract](http://www.jnutbio.com/article/S0955-2863(02)00208-5/abstract)

HENDERSON, Victor W, 2013. Alzheimer's disease: Review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* [online]. 28.5. ISSN 1879-1220. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsbmb.2013.05.010

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, Maricarmen, José CORREA-BASURTO, Federico MARTÍNEZ-RAMOS, ITZIA IRENE PADILLA-MARTÍNEZ, Claudia G. BENÍTEZ-CARDOZA, Elvia MERA-JIMÉNEZ a Martha Cecilia ROSALES-HERNÁNDEZ, 2014. Design of Multi-Target Compounds as AChE, BACE1, and Amyloid- $\beta_{1-42}$  Oligomerization Inhibitors: In Silico and In Vitro Studies. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. [vid. 28. duben 2014]. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-140471

CHEN, Zhichun a Chunjiu ZHONG, 2014a. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin* [online]. 24.3. ISSN 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-013-1423-y

CHEN, Zhichun a Chunjiu ZHONG, 2014b. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neuroscience bulletin* [online]. 24.3. ISSN 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-013-1423-y

JAGO, Charlotte, 2014. Alzheimer's Disease: One Year Later. *Life Sciences Connect* [online] [vid. 28. duben 2014]. Dostupné z: <http://lsconnect.thomsonreuters.com/alzheimers-disease-year-later/>

KING, Margaret K, Marta PARDO, Yuyan CHENG, Kimberlee DOWNEY, Richard S JOPE a Eléonore BEUREL, 2014. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. *Pharmacology & therapeutics* [online]. 1., roč. 141, č. 1, s. 1–12. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2013.07.010

KOIDA, M a R WALTER, 1976. Post-proline cleaving enzyme. Purification of this endopeptidase by affinity chromatography. *The Journal of biological chemistry*. 10.12., roč. 251, č. 23, s. 7593–7599. ISSN 0021-9258.

LAITINEN, K S, T VAN GROEN, H TANILA, J VENÄLÄINEN, P T MÄNNISTÖ a I ALAFUZOFF, 2001. Brain prolyl oligopeptidase activity is associated with neuronal damage rather than beta-amyloid accumulation. *Neuroreport*. 29.10., roč. 12, č. 15, s. 3309–3312. ISSN 0959-4965.

MANCINI, Francesca, Angela DE SIMONE a Vincenza ANDRISANO, 2011. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 6., roč. 400, č. 7, s. 1979–1996. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-4963-x

MANCINI, Francesca, Marina NALDI, Vanni CAVRINI a Vincenza ANDRISANO, 2007. Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Analytical and bioanalytical chemistry* [online]. 7., roč. 388, č. 5-6, s. 1175–1183. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1356-2

MATHEEUSSEN, Veerle, Anne-Marie LAMBEIR, Wolfgang JUNGRAITHMAYR, Nelson GOMEZ, Kathleen MC ENTEE, Pieter VAN DER VEKEN, Simon SCHARPÉ a Ingrid DE MEESTER, 2012. Method comparison of dipeptidyl peptidase IV activity assays



and their application in biological samples containing reversible inhibitors. *Clinica Chimica Acta* [online]. 18.2., roč. 413, č. 3–4, s. 456–462. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2011.10.031

MEDRANO, F J, J ALONSO, J L GARCÍA, A ROMERO, W BODE a F X GOMIS-RÜTH, 1998. Structure of proline iminopeptidase from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a prototype for the prolyl oligopeptidase family. *The EMBO journal* [online]. 2.1., roč. 17, č. 1, s. 1–9. ISSN 0261-4189. Dostupné z: doi:10.1093/emboj/17.1.1

MOLYNEUX, Philip, 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* roč. 26, č. 2, s. 211–219.

MOREIRA, Paula I, Akihiko NUNOMURA, Masao NAKAMURA, Atsushi TAKEDA, Justin C SHENK, Gjumrakch ALIEV, Mark A SMITH a George PERRY, 2008. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free radical biology & medicine* [online]. 15.4., roč. 44, č. 8, s. 1493–1505. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.002

MUSA, Khalid Hamid, Aminah ABDULLAH, Bambang KUSWANDI a M. Amrun HIDAYAT, 2013. A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food Chemistry* [online]. 15.12., roč. 141, č. 4, s. 4102–4106 [vid. 29. duben 2014]. ISSN 0308-8146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.112

MYÖHÄNEN, Timo T, J Arturo GARCÍA-HORSMAN, Jofre TENORIO-LARANGA a Pekka T MÄNNISTÖ, 2009. Issues about the physiological functions of prolyl oligopeptidase based on its discordant spatial association with substrates and inconsistencies among mRNA, protein levels, and enzymatic activity. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society* [online]. 9., roč. 57, č. 9, s. 831–848. ISSN 0022-1554. Dostupné z: doi:10.1369/jhc.2009.953711

NANJO, F, K GOTO, R SETO, M SUZUKI, M SAKAI a Y HARA, 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free radical biology & medicine.* roč. 21, č. 6, s. 895–902. ISSN 0891-5849.

PICCIOTTO, Marina R, Michael J HIGLEY a Yann S MINEUR, 2012. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* [online]. 4.10., roč. 76, č. 1, s. 116–129. ISSN 1097-4199. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2012.08.036

POLGÁR, L, 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cellular and molecular life sciences: CMLS.* 2., roč. 59, č. 2, s. 349–362. ISSN 1420-682X.

POOLER, Amy M, Wendy NOBLE a Diane P HANGER, 2014. A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis. *Neuropharmacology* [online]. 1., roč. 76 Pt A, s. 1–8. ISSN 1873-7064. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.018

PROKOP, Stefan, Kelly R MILLER a Frank L HEPPNER, 2013. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*. 10., roč. 126, č. 4, s. 461–477. ISSN 1432-0533.

RAWLINGS, N D, L POLGAR a A J BARRETT, 1991. A new family of serine-type peptidases related to prolyl oligopeptidase. *The Biochemical journal*. 1.11., roč. 279 ( Pt 3), s. 907–908. ISSN 0264-6021.

REA, Dean a Vilmos FÜLÖP, 2006. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. *Cell biochemistry and biophysics* [online]. roč. 44, č. 3, s. 349–365. ISSN 1085-9195. Dostupné z: doi:10.1385/CBB:44:3:349

RIVE, Benoît, Serge GAUTHIER, Sophie COSTELLO, Caroline MARRE a Clément FRANÇOIS, 2013. Synthesis and comparison of the meta-analyses evaluating the efficacy of memantine in moderate to severe stages of Alzheimer's disease. *CNS drugs* [online]. 7., roč. 27, č. 7, s. 573–582. ISSN 1172-7047. Dostupné z: doi:10.1007/s40263-013-0074-x

SATHYA, M., P. PREMKUMAR, C. KARTHICK, P. MOORTHI, K. S. JAYACHANDRAN a M. ANUSUYADEVI, 2012. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta* [online]. 24.12., roč. 414, s. 171–178 [vid. 27. březem 2014]. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.08.013

SUH, Yoo-Hun a Frederic CHECLER, 2002. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological reviews*. 9., roč. 54, č. 3, s. 469–525. ISSN 0031-6997.

TANZI, Rudolph E a Lars BERTRAM, 2005. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* [online]. 25.2., roč. 120, č. 4, s. 545–555. ISSN 0092-8674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2005.02.008

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC a M. MAZUR, 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 10.3., roč. 160, č. 1, s. 1–40 [vid. 22. duben 2014]. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009

VASSAR, Robert, Dora M KOVACS, Riqiang YAN a Philip C WONG, 2009. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. 14.10., roč. 29, č. 41, s. 12787–12794. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009

VENUGOPAL, Chitra, Christina M DEMOS, K S Jagannatha RAO, Miguel A PAPPOLLA a Kumar SAMBAMURTI, 2008. Beta-secretase: structure, function, and evolution. *CNS & neurological disorders drug targets*. 6., roč. 7, č. 3, s. 278–294. ISSN 1871-5273.

VIÑA, Jose, Ana LLORET, Rafael ORTI; a Dolores ALONSO, 2004. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine* [online]. 2., roč. 25, č. 1–2, Oxidative Stress in Aging and Disease - Mitochondrial Aging, Neuronal Function and Neurodegeneration, and Oxidative Metabolic Disorders and Diseases, s. 117–123 [vid. 21. duben 2014]. ISSN 0098-2997. Dostupné z: doi:10.1016/j.mam.2004.02.013

WANG, Wei, Sandeep NEMA a Dirk TEAGARDEN, 2010. Protein aggregation--pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceutics* [online]. 10.5., roč. 390, č. 2, s. 89–99. ISSN 1873-3476. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2010.02.025

WANG, Yan-Jiang, Hua-Dong ZHOU a Xin-Fu ZHOU, 2006. Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: progress, problems and perspectives. *Drug discovery today* [online]. 10., roč. 11, č. 19-20, s. 931–938. ISSN 1359-6446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2006.08.004

WILLEM, Michael, Sven LAMMICH a Christian HAASS, 2009. Function, regulation and therapeutic properties of beta-secretase (BACE1). *Seminars in cell & developmental biology* [online]. 4., roč. 20, č. 2, s. 175–182. ISSN 1084-9521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.003

YAMAGUCHI, T, H TAKAMURA, T MATOBA a J TERAOKA, 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 6., roč. 62, č. 6, s. 1201–1204. ISSN 0916-8451.

YOKOZAWA, T, C P CHEN, E DONG, T TANAKA, G I NONAKA a I NISHIOKA, 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology*. 15.7., roč. 56, č. 2, s. 213–222. ISSN 0006-2952.

ZHANG, Xiao Dan, Xiang Qian LIU, Yang Hee KIM a Wan Kyunn WHANG, 2013. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research* [online]. 2.10. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-013-0252-x

ZHAO, Yan a Baolu ZHAO, 2013. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 25.7., roč. 2013 [vid. 30. března 2014]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2013/316523



