

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko–technologická

Hodnocení vlivu nově syntetizovaných modulátorů cholinesteráz na zánětlivou  
odpověď *in vitro*

Bc. Tereza Foltýnková

Diplomová práce

2019

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Foltýnková**  
Osobní číslo: **C17435**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Hodnocení vlivu nově syntetizovaných modulátorů cholinesteráz na zánětlivou odpověď *in vitro***  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

#### Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši na téma cholinesteráz, látek modulujících jejich aktivitu a patologických stavů spojených se změnami jejich aktivity v souladu se Směrnicí Upa č. 9/2012 ve znění dodatku č. 1 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".
2. Teoretické zvládnutí *in vitro* testů důležitých pro hodnocení cytotoxicity a protizánětlivé odpovědi.

#### Experimentální část:

1. Zvládnutí *in vitro* metod (kultivace buněk, *in vitro* testy toxicity - MTT test).
2. Zvládnutí *in vitro* metod hodnocení protizánětlivé odpovědi.
3. Zhodnocení cytotoxicity a protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných látek.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

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

Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany  
v Hradci Králové

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Ľubica Múčková**

Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany  
v Hradci Králové

Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 9. 5. 2019

.....

Bc. Tereza Foltýnková

#### Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé diplomové práce pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi, Ph.D. et Ph.D. za vedení diplomové práce, cenné rady a odborný dohled. Dále mé poděkování také patří Mgr. Lubici Múčkové za vedení experimentální části, trpělivost, ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování práce věnovala.

## ANOTACE

Teoretická část diplomové práce se zaměřuje na cholinesterasy, modulátory jejich aktivity s důrazem na klinicky dostupné centrální a periferní inhibitory cholinesteras a patologické stavy, při kterých jsou tyto léky indikovány, včetně Alzheimerovi choroby a Myastenia gravis. Aktivitu cholinesteras mohou také modulovat naftochinony, které byly testovány v rámci experimentální části.

Experimentální část je zaměřena na hodnocení cytotoxicity a protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných derivátů naftochinonů na mikroglální buněčné linii SIM-A9.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Cholinesterasy, inhibitory cholinesteras, Alzheimerova choroba, Myastenia gravis, mediátory zánětu, cytotoxicita *in vitro*, naftochinony

## TITLE

Evaluation of the influence of newly synthesized cholinesterase modulators on the inflammatory response *in vitro*

## ANNOTATION

The theoretical part of the diploma thesis is focused on cholinesterases, modulators of their activity with emphasis on clinically available central and peripheral cholinesterase inhibitors and pathological conditions in which these drugs are indicated, including Alzheimer's disease and Myasthenia gravis. Activity of cholinesterases can be also modulated by naphthoquinones that have been tested in the experimental section.

The experimental part is focused on evaluation of cytotoxicity and anti-inflammatory response of newly synthesized naphthoquinone derivatives on the microglial cell line SIM-A9.

## KEYWORDS

Cholinesterases, cholinesterase inhibitors, Alzheimer's disease, Myasthenia gravis, mediators of inflammatory response, cytotoxicity *in vitro*, naphthoquinone derivatives

# Obsah

Obsah .....	7
Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	12
Seznam grafů .....	13
Seznam zkratek .....	14
Úvod.....	16
Teoretická část .....	17
1 Cholinesterasy a jejich modulátory.....	17
1.1 Cholinesterasy .....	17
1.1.1 Acetylcholinesterasa .....	19
1.1.2 Butyrylcholinesterasa.....	20
1.2 Modulátory cholinesteras .....	21
1.2.1 Reverzibilní inhibitory cholinesteras .....	21
1.2.1.1 Léčiva s centrálními účinky.....	22
1.2.1.2 Alzheimerova choroba.....	26
1.2.1.3 Léčiva s periferními účinky.....	39
1.2.1.4 Myasthenia gravis.....	42
1.2.2 Naftochinony .....	45
2 Cíle práce .....	47
3 Experimentální část.....	48
3.1 Buněčná linie.....	48
3.2 Kultivace a pasážování.....	48
3.2.1 Proces pasážování .....	49
3.2.2 Počítání buněk.....	49
3.3 Buněčná proliferace v reálném čase.....	50

3.4	Testované látky .....	51
3.5	Stanovení cytotoxicity látek .....	52
3.5.1	Příprava mikrotitrační destičky .....	52
3.5.2	Ovlivnění buněk .....	53
3.5.3	Provedení MTT testu .....	53
3.6	Analýza buněčné smrti .....	53
3.7	Stanovení cytokinů metodou ELISA .....	54
3.8	Statistické zpracování výsledků .....	56
4	Výsledky .....	57
4.1	Proliferace buněk v reálném čase .....	57
4.2	Proliferace buněk po stimulaci LPS .....	58
4.3	Cytotoxicita látek .....	58
4.4	Viability buněk po ovlivnění nově syntetizovanými látkami v prostředí zánětu .....	62
4.5	Buněčná smrt .....	65
4.6	Výběr cytokinů pro testování protizánětlivé odpovědi .....	66
4.7	Produkce cytokinů linií SIM-A9 po stimulaci testovanými látkami .....	68
5	Diskuze .....	77
6	Závěr .....	81
	Použitá literatura .....	82



## Seznam obrázků

Obrázek 1	Struktura AChE úhoře <i>Torpedo californica</i> .....	19
Obrázek 2	Struktura BChE .....	21
Obrázek 3	Struktura GAL .....	23
Obrázek 4	Struktura donepezil hydrochloridu .....	24
Obrázek 5	Struktura rivastigminu .....	26
Obrázek 6	Struktura izoformy ApoE 4 .....	30
Obrázek 7	Amyloidní senilní plaky a neurofibrilární klubka .....	32
Obrázek 8	Komplex neutrálních buněk .....	33
Obrázek 9	Astrocyty .....	35
Obrázek 10	Struktura IL-1ra .....	37
Obrázek 11	Struktura Pyridostigminu .....	39
Obrázek 12	Struktura neostigminu .....	40
Obrázek 13	Struktura distigminu .....	41
Obrázek 14	Struktura Ambenonia .....	42
Obrázek 15	Struktura nervosvalové ploténky; 1 – Presynaptický útvar, 2 – Sarkolema, 3 – Synaptické váčky, 4 – Receptory pro ACh, 5 - Mitochondrie.....	43
Obrázek 16	Linie SIM-A9, snímek byl pořízen světelným mikroskopem, zvětšení 100 × (Nicon, Tokio, Japonsko).....	48
Obrázek 17	Buněčná viabilita stanovená pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie, zobrazující celkový počet životaschopných buněk (vyjádřený jako buňky/ml a v %) a celkový počet buněk (vyjádřený jako buňky/ml). .....	50
Obrázek 18	Struktury testovaných látek. Generováno pomocí ChemSketch (ACD/Labs, Toronko, Kanada). .....	51
Obrázek 19	Reakční schéma MTT testu .....	52
Obrázek 20	Schéma ELISA testu .....	55
Obrázek 21	Růstové křivky buněčné linie SIM-A9.....	57
Obrázek 22	Růstové křivky linie SIM-A9 po stimulaci LPS. ....	58
Obrázek 23	Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1408.....	59
Obrázek 24	Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1409.....	59

Obrázek 25 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1410.....	60
Obrázek 26 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1411.....	60
Obrázek 27 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1412.....	61
Obrázek 28 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1413.....	61
Obrázek 29 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1408 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	63
Obrázek 30 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1409 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	63
Obrázek 31 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1410 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	64
Obrázek 32 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1411 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	64
Obrázek 33 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1412 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	65
Obrázek 34 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1413 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC. ....	65
Obrázek 35 Apoptóza a nekróza buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanými látkami v koncentraci odpovídající jejich MTC.	66
Obrázek 36 Produkce IFN-γ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.....	67
Obrázek 37 Produkce IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.....	67
Obrázek 38 Produkce TNF-α buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.....	68

Obrázek 39 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1408 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	71
Obrázek 40 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1409 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	72
Obrázek 41 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1410 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	73
Obrázek 42 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1411 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	74
Obrázek 43 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1412 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	75
Obrázek 44 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$ buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1413 v koncentraci odpovídající její MTC, $\frac{1}{2}$ MTC a $\frac{1}{4}$ MTC.....	76

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1 Geny kódující ChEs.....	18
Tabulka 2 Výsledná cytotoxicita testovaných látek stanovená po 24 hodinách inkubace od ovlivnění buněk pomocí MTT testu.....	62

## **Seznam grafů**

Graf 1 Demence ve světě – Průměrné zastoupení lidí (v %) s demencí pro danou oblast .....	28
Graf 2 Vývoj demence v České republice .....	28

## Seznam zkratek

A $\beta$	Amyloid beta peptid
AD	Alzheimerova choroba
ADI	Organizace, z ang. Alzheimer's Disease International
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AChR	Acetylcholinový receptor
Apo E	Apolipoprotein E
APP	Amyloidový prekurzorový protein
AMK	Aminokyselina
BDNF	Mozkový neurotrofní faktor
BChE	Butyrylcholinesterasa
Bcl-2	Regulátor apoptózy; protoonkogen
ChE	Cholinesterasa
CNS	Centrální nervový systém
CT	Výpočetní tomografie
CSF	Mozkomíšni mok
CYP	Cytochrom
C3a, C5a	Složky komplementu
E2	Estradiol
GAL	Galantamin
GFAP	Gliální fibrilární protein
GM-CSF	Granulocyty stimulující růstový faktor
HLA	Hlavní histokompatibilní komplex
IACHe	Inhibitor acetylcholinesterasy

IChEs	Inhibitory cholinesteras
IFN- $\alpha$ , $\gamma$	Interferon- $\alpha$ , $\gamma$
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IL-1, 6, 8, 10, 12	Interleukin 1, 6, 8, 10, 12
LPS	Lipopolysacharid
MCP	Monocytový chemotaktický faktor
M-CSF	Makrofágy stimulující růstový faktor
MG	Myastenia gravis
MGFA	Organizace, zabývající se Myastenii gravis
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
MuSk	Protilátky proti tyrosinkináze
NO	Oxid dusnatý
NOS	NO-syntasy
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PET	Pozitronová emisní tomografie
PNS	Periferní nervový systém
SHB6	Globulin vázající pohlavní hormony
SIRS	Syndrom systémové zánětlivé odpovědi
TLR-4	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$ , $\beta$	Faktor způsobující nekrózu- $\alpha$ , $\beta$

## Úvod

Centrální inhibitory cholinesteras (IChEs) jsou léčivy, které našly uplatnění v terapii lehkých až středně pokročilých demencí Alzheimerova typu. Nelze však od podání IChEs očekávat vyléčení Alzheimerovy choroby (AD), ani trvalé odstranění progresu onemocnění. Pouze zpomalují průběh choroby, oddalují vznik těžkých stádií, zlepšují neuropsychiatrické symptomy a celkovou kvalitu života postiženého. V současné době je dostupný Donepezil, Rivastigmin a Galantamin. Tyto léčiva musí procházet hematoencefalickou bariérou, specificky ovlivňovat mozkové cholinesterasy (ChEs) a být dobře tolerovány. Velkým úskalím jsou však nežádoucí vedlejší účinky, projevující se gastrointestinálními příznaky, jako je nechutenství, zvracení, křeče a bolesti břicha. Z důvodu výskytu těchto nežádoucích projevů se hledají nové látky stejně tak účinné, ale s menší toxicitou. Dostupná léčiva funkčně selhávají, protože samotná AD se vyznačuje velice složitou etiopatogenezí, proto je nutné terapii buď kombinovat nebo vyvinout léky schopné ovlivnit průběh AD na více úrovních, včetně modulace zánětu, který je s touto chorobou spojen. Podrobná patogeneze AD je doposud nejasná, existuje však mnoho hypotéz o vzniku AD. Nejstarší teorií vzniku je poškození cholinergního neurotransmiterového systému. Mezi další patří beta amyloidová hypotéza, tau hypotéza, včetně hypotéz zánětu a oxidačního stresu. Další skupinou jsou periferní IChEs, které se uplňují při léčbě onemocnění Myasthenia gravis (MG). Mezi tyto léčiva řadíme Pyridostigmin, Neostigmin, Distigmin a Ambenonia. MG je chronické autoimunitní onemocnění postihující nervosvalový přenos, projevující se postupným slábnutím a zvýšenou únavností svalstva.

Experimentální část je věnována *in vitro* testování protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných modulátorů ChEs. *In vitro* buněčný model představuje snadný, rychlý a hlavně eticky přijatelný přístup. K zavedení buněčného modelu a testování nových látek byly použity elektroimpedanční a kolorimetrické metody a mikrokapilární průtoková cytometrie. Cílem této diplomové práce je zhodnocení proliferace buněčné linie SIM-A9 v prostředí bez zánětu a po stimulaci lipopolysacharidem (LPS), dále stanovení toxikologických indexů  $IC_{50}$  a maximální tolerované koncentrace (MTC) testovaných látek. V neposlední řadě stanovení viability buněk testovaných látkami po stimulaci LPS a na závěr zhodnocení vlivu nově syntetizovaných sloučenin na zánětlivou odpověď.



## **Teoretická část**

### **1 Cholinesterasy a jejich modulátory**

#### **1.1 Cholinesterasy**

Jedná se o enzymy, představující skupinu esterasy. Tyto enzymy hydrolyzují estery cholinu rychleji než ostatní estery za předpokladu, že se porovnávají rychlosti hydrolyzy za optimálních podmínek. V první řadě jsou ChEs odpovědné za rychlou eliminaci acetylcholinesterasy (AChE) v jedné milisekundě po jejím uvolnění na cholinergních synapsích, což umožňuje přesné časované řízení svalové kontrakce. [1,2] Jejich rozmanitost spočívá v genové expresi, umístění, funkcích (zvláště v biologických) a katalytických aktivitách. Kromě jejich zapojení do neurodegenerativních poruch mají i jiné funkce, například růst neuritů, buněčnou proliferaci, ovlivňují tumorigenní procesy a relují megakaryocytopoézu. [3]

Existence ChEs byla postulována Dalem v roce 1914 a demonstrována Loewim a Navrátilem roku 1926. V roce 1937 Marnay a Nachmansohn pozorovali vysoké koncentrace AChE na neuromuskulárních ploténkách a v orgánech elektrických úhořů. Od té doby se ChEs ukázaly jako nejvíce fascinujícím předmětem výzkumu enzymologie a buněčné biologie.

U obratlovců existují dva typy ChEs – AChE a butyrylcholinesterasa (BChE), které vykazují ve své primární struktuře vysokou homologii. [2]

#### *Genové vlastnosti*

Jak již bylo zmíněno, v lidském organismu se nachází AChE a BChE, které mají vysoký stupeň shodnosti aminokyselinové sekvence (< 50 %) a jsou kódovány dvěma odlišnými geny. Tyto dva geny mají podobnou exon-intronovou organizaci, ale radikálně odlišnou nukleotidovou kompozici. AChE je bohatá na guanin a cytosin, zatímco u BChE převládá adenin a thymin. Z genetického hlediska je známo 7 alel, které kódují ChE: gen U (z ang. *usual*), gen A (z ang. *atypical*), gen S (z ang. *silent*), a geny F, H, J a K. Funkce jednotlivých genů jsou shrnuty v tabulce 1. [4]

Tabulka 1 Geny kódující ChEs

Gen	Funkce
Gen U	Řídí syntézu normální, nejrozšířenější plasmatické ChE
Gen A	Řídí syntézu varianty, způsobující snížení aktivity ChE v séru a vykazuje zvýšenou rezistenci k inhibici dibukainem
Gen F	Má na starost syntézu varianty se zvýšenou rezistencí k inhibici fluoridem, na druhou stranu je však významně inhibován dibukainem
Gen S	Kóduje produkt, který nevykazuje žádnou esterázovou aktivitu

Poloha genu pro BChE se nachází na chromosomu 3q26 a pro AChE na 7q22. Tyto čtyři alelické geny mohou být kombinovány k vytvoření genotypů produkujících jednu normální a devět atypických variant. Další varianty genů J, K, H kódují ChE s normální aktivitou, ale následkem porušené syntézy nebo snížené stability molekuly je v plasmě přítomno méně enzymu než za fyziologické situace. Varianta K je spojena s 33%, J s 66% a H s 90% redukcí aktivity. Varianty jsou klinicky významné, neboť způsobují větší citlivost na přítomnost inhibitorů. Následkem je citlivost na myorelaxans sukcinylcholin (suxamethonium), při které homozygoti trpí prodlouženou zástavou dechu po podání této látky ve spojení s chirurgickou anestézií. U bílé populace se nachází homozygotních forem 0,3-0,5 %. [5]

#### *Biochemické vlastnosti*

Lidská ChE byla roku 1968 poprvé sekvenována a klonována. Jedná se o tetramer, který má molekulovou hmotnost 340 kDa a je složena ze 4 identických podjednotek. Všechny obsahují jedno aktivní katalytické místo. Spojení je realizováno prostřednictvím tří disulfidických můstků a nekovalentních hydrofobních interakcí. Podjednotka obsahuje 574 amino-kyselin (AMK) a 9 sacharidových řetězců. Molekulová hmotnost každé z nich je 86 kDa. Díky silným nekovalentním vazbám drží podjednotky pospolu. Z tohoto celku zaujímají 65 kDa AMK a zbytek jsou sacharidy. Molekula zůstává tetrametrem, i když jsou disulfidické vazby mezi řetězci redukovány, alkylovány nebo zcela odstraněny proteolýzou. [6]

### 1.1.1 Acetylcholinesterasa

AChE je enzym, jenž je systematicky nazýván jako acetylcholinacetylhydrolasa a je řazen dle enzymové nomenklatury do třetí třídy, což jsou hydrolytické enzymy. V hydrolytické aktivitě AChE spočívá její hlavní biologický význam, kvůli které je zkoumána.

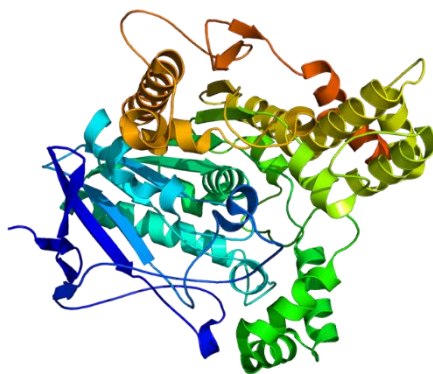
#### *Funkce*

Klíčovým enzymem cholinergních mozkových synapsí a neuromuskulární ploténky je právě AChE. Nachází se především v nervosvalových spojeních a cholinergních synapsích v centrální nervové soustavě (CNS). [7] Hlavní biologickou rolí tohoto enzymu je ukončení přenosu impulsů rychlou hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), následně tak vzniká cholin a acetát [8]. Vyznačuje se velkou katalytickou aktivitou. Každá molekula AChE degraduje 25 000 molekul ACh za jednu sekundu [9].

#### *Struktura*

Struktura AChE byla rozsáhle prozkoumána od 90. let. První experimenty byly provedeny na elektrickém úhoři *Torpedo californica* díky jeho dostupnosti. Tento enzym se, podobně jako lidská varianta, nachází ve formě monomeru, dimeru a tetrameru. Její molekula může obsahovat segment se strukturou podobnou kolagenu, jehož úkolem je zprostředkovat vazbu k buněčné membráně. [10]

Na obrázku 1 [11] je patrné, že se jedná o glykoprotein, který je složený ze 14  $\alpha$ -helixů a 12  $\beta$ -skládaných listů. Tento řetězec je tvořen 523 AMK, uspořádanými do globulární formy. Ve středu této molekuly je umístěno aktivní centrum enzymu a na jeho dně se nachází katalytické centrum tvořené hydroxylovou skupinou serinu. [10]



Obrázek 1 Struktura AChE úhoře *Torpedo californica*

### 1.1.2 Butyrylcholinesterasa

BChE je enzym, který je systematicky nazýván jako acylhydrolasa. BChE je ale známa i pod pojmem pseudocholinesterasa. Její funkce spočívá v hydrolýze butyrylcholinu i ACh.

#### *Funkce*

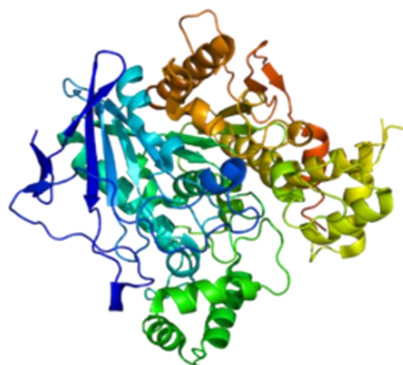
Hydrolýza hydrofobních a hydrofilních karboxylových sloučenin i esterů kyseliny fosforečné patří mezi hlavní funkce BChE. Jeho toxikologický a farmakologický význam je jasný, když se jedná o individuální expozici vůči jedovatým sloučeninám, zaměřeným na vazebná místa ChE. Vzhledem k fyziologickému významu AChE lze vnímat BChE jako endogenní vychytávač anticholinesterasových sloučenin, zejména xenobiotik, jako jsou – sukcinyl-dicholin, organofosfáty, karbamáty, prokain, kokain, heroin, aspirin a další. [12]

BChE je tvořena v různých orgánech, zejména v játrech. Nachází se také ve slinivce břišní a gliových buňkách. Dosahuje sérové hladiny 5 mg/ml a její biologický poločas *in vivo* činí 12 dní, což ji činí stabilní pro skladování. Testování aktivity BChE v plasmě může sloužit jako test funkce jater. [10]

#### *Struktura*

Plasmatická BChE je hydrofilní tetramer složený ze 4 identických podjednotek. Může se vyskytovat v lidském těle i v podobě dimeru a monomeru. Geny pro BChE jsou zakódovány na třetím chromozomu. [13] Biochemické studie ukázaly, že nukleotidové a AMK sekvence související s BChE se vyskytují v různých formách života. Regulují fyziologické funkce, jejichž význam nebyl zcela objasněn. [14]

Na následujícím obrázku 2 [15], je znázorněna struktura BChE, jejíž každá podjednotka má 84 kDa. Vzájemně interagují prostřednictvím svazku 4  $\alpha$ -helixů na C-koncích a ve středové části globule se nachází peptid bohatý na prolin. [16]



Obrázek 2 Struktura BChE

## 1.2 Modulátory cholinesteras

Z hlediska principu mohou být modulátory ChE dvojího typu – inhibitory a reaktivátory. Inhibitory lze dále dělit podle způsobu inhibice na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní inhibitor pouze „soutěží“ o vazebné místo enzymu, a tím brání přístupu ACh. Nevytváří kovalentní vazbu s enzymem, jedná se tedy o proces vratný. Druhý typ inhibitoru je charakterizován reakcí s aktivním centrem ChE. Mezi enzymem a modulátorem vzniká kovalentní vazba, která může být za fyziologických podmínek natolik stabilní, že se jedná o ireverzibilní inhibici, tedy děj nevratný. K jeho ovlivnění mohou ale sloužit v případě některých látek reaktivátory, jež odstarňují kovalentně vázaná rezidua ireverzibilních inhibitorů z fosfátu aktivního katalytického místa enzymů. Ireverzibilní inhibitory i reaktivátory mají však spíše toxikologický význam. [17] Vzhledem k charakteru testovaných látek v této diplomové práci se teoretická část bude dále zaměřovat pouze na reverzibilní inhibitory.

### 1.2.1 Reverzibilní inhibitory cholinesteras

Reverzibilní inhibitory lze dále klasifikovat dle schopnosti prostupovat hematoencefalickou bariérou na látky s centrálním a periferním účinkem. Dělí se na základě náboje léčiva, látky obsahující terciální dusík, nejsou nabité a mají tedy centrální účinky. Naopak léčiva obsahující kvarterní dusík, mají náboj, špatně procházejí hematoencefalickou bariérou a účinkují hlavně na periférii. Centrálně působící, reversibilní IChE se používají jako léčiva v terapii AD. Zpomalují progresi a přestup choroby do těžkých stádií. Na trhu je dostupný Donepezil, dále Rivastigmin a novějším léčivem je Galantamin. Liší se však svojí strukturou, farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi. [18] Jedná se o skupinu léčiv, které brání

enzymatické hydrolýze ACh na nervových synapsích. Navíc snižují tvorbu a toxicitu amyloidu beta (A $\beta$ ). [19] Látky s periferním účinkem jsou užívány v léčbě onemocnění, postihující nervosvalový přenos, jako je například Myastenia gravis (MG). Do této skupiny patří Pyridostigmin, Neostigmin a Distigmin.

### **1.2.1.1 Léčiva s centrálními účinky**

#### ***Galantamin***

Galantamin (GAL) byl poprvé izolován z cibulí sněženek a narcisů. Dnes se vyrábí synteticky a je nejnovějším a zatím nejúspěšnějším léčivem AD. Jedná se o reverzibilní, kompetitivní IChE. [20]

#### ***Struktura***

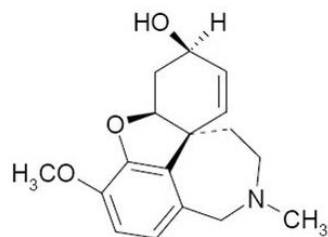
Na obrázku 3 [21] je uvedena chemická struktura GAL. Jedná se o terciární alkaloid, který nepodléhá hydrolytickým reakcím. Pro jeho správný biologický účinek jsou v jeho molekule důležitá čtyři místa. Hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina. [22]

#### ***Farmakodynamické vlastnosti***

GAL účinkuje na nervosvalové spoje, centrální cholinergní synapse i periferní orgány inervované parasympatickými vegetativními vlákny. Na cholinergní synapse má dva různé účinky, které však mohou probíhat i současně:

- a. inhibicí AChE dojde ke zvýšení hladiny ACh dostupného pro aktivitu postsynaptických muskarinových receptorů,
- b. v přítomnosti GAL je zvýšená vazebná afinita ACh na nikotinový receptor (AChR) a působí jako allosterický modulátor.

Modulací nikotinových receptorů je podporováno uvolnění ACh, zvláště při poškození cholinergní funkce. Váže se jak ve spodní části kavity AChE a interaguje s acylvazebnou kapsou prostřednictvím methoxyskupiny, tak s cholin-vazebným místem díky cyklohexenovému kruhu. [23]



Obrázek 3 Struktura GAL

### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Jedná se o alkalickou a slabě lipofilní sloučeninu, jejíž rozpustnost ve vodě činí 31 mg/ml. Je parciálně metabolizován různými cytochromy, zejména CYP2D6 a CYP3A4. Po podání per orálně (*p.o.*) snadno absorbuje nezávisle na lékové formě. Až 75 % podaného GAL je eliminováno metabolizací. Plasmatické koncentrace klesají bioexponenciálně, s biologickým poločasem 8-10 hodin u zdravých osob. Výsledky klinických studií svědčí o tom, že plasmatická koncentrace GAL u pacientů s AD jsou o 30-40 % vyšší než u zdravých mladých jedinců, především vzhledem k věku a snížené funkci ledvin. Z farmakokinetické analýzy vyplývá, že clearance GAL je u žen o 20 % nižší než u mužů. Dávkování GAL musí být titrováno, první měsíc je podáváno 2krát 4 mg, druhý měsíc 2krát 8 mg a třetí měsíc a dále 2 rkrát 12 mg. [24] GAL je mírně toxický. Letální dávka pro potkana *p.o.* je 83,6 mg/kg. Mezi nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky řadíme nevolnost (19 %), zvracení (16 %), ztráta hmotnosti a chuti k jídlu (8 %), závratě (4 %), bolesti břicha, průjemy, neklid a poruchy spánku. Nežádoucí účinky lze inhibovat antidoty. Žádné studie však neuvádí mutagenní nebo teratogenní účinky tohoto léčiva. [22]

### *Vztah mezi galantaminem a zánětem*

GAL se vyznačuje svými neuroprotektivními vlastnostmi vůči toxickému beta amyloidu ( $A\beta$ ) a oxidativnímu stresu. Díky inhibici mozkových AChEs snižuje tvorbu kyslíkových radikálů NO i NOS. Alosterickou modulací AChR ovlivňuje toxicitu  $A\beta$  tím, že zabraňuje konformačním změnám a tvorbě  $\beta$ - skládaných listů. Působí i protizánětlivě, snižuje produkci prozánětlivých mediátorů. [20]

## ***Donepezil***

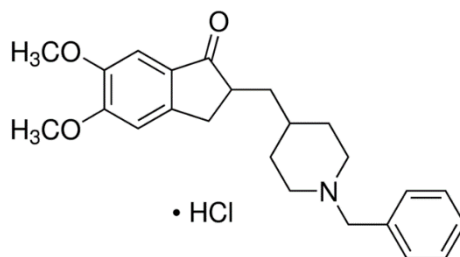
Donepezil je léčivo, které inhibuje reverzibilně AChE, zatímco BChE minimálně a klinicky nevýznamně. Donepezil rovněž aktivuje nikotinové receptory ( $\alpha 4\beta 2$  a  $\alpha 7$ ) a tím dojde k větší expresi antiapoptického faktoru Bcl-2. Chrání tak neurony proti glutamátové toxicitě. Působí současně proti několika mechanismům neurodegenerace. [25]

### *Struktura*

Donepezil hydrochlorid, uvedený na obrázku 4 [26] je druhým léčivým přípravkem schváleným pro léčbu mírného až středního stupně AD. Patří do třídy IChE, řadí se do piperidinových derivátů, obsahujících ve své molekule N-benzylpiperidin a indanovou skupinu. Donepezil se váže v aniontovém místě enzymu. [27]

### *Farmakodynamické vlastnosti*

Donepezil hydrochlorid je *in vitro* více než 1 000krát účinnějším IChE než BChE. U osob s AD, které se zúčastnili klinických studií, způsobilo podávání dávek 58 mg a 10 mg donepezil hydrochloridu jednou denně ustálenou inhibici aktivity AChE. [28]



Obrázek 4 Struktura donepezil hydrochloridu

### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Nejvyšších plasmatických hladin je dosahováno asi za 3-4 hodiny po *p.o.* podání. Biologický poločas tohoto léčiva je 70 hodin a k ustálenému stavu dojde do 3 týdnů od začátku terapie. Asi 95 % donepezilu se u člověka váže na plasmatické bílkoviny. Transport do různých tkání těla nebyl dodnes příliš prostudován. Vylučování léku je realizováno v nezměněném stavu močí nebo je metabolizován systémem cytochromu P450 na další metabolity. [28]



Testování na pokusných zvířatech prokázalo, že léčivo nemá skoro žádné jiné účinky než ty předpokládané, jakožto cholinergní stimulátor. Donepezil nemá mutagenní, genotoxické účinky, ani onkogenní aktivitu. [29]

#### *Vztah mezi donepezilem a zánětem*

Donepezil působí neuroprotektivně a má účinky modifikující AD [30]. Klinická studie uvádí, že po osmi měsících léčby donepezilem došlo ke zmírnění zánětu, tau patologie a ztrátě neuronů. Také bylo prokázáno, že po aplikaci LPS snižuje uvolňování zánětlivých mediátorů, zejména IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  a NO a zabraňuje systémovému zánětu. [31]

#### ***Rivastigmin***

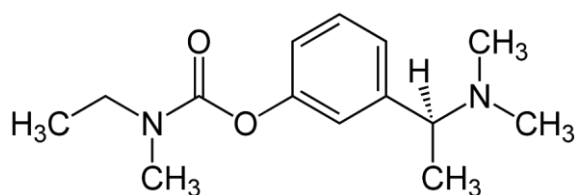
Rivastigmin je inhibitorem AChE a BChE, jehož mechanismem účinku je pseudoireverzibilní inhibice. Dochází tak k zablokování enzymu odbourávajícího ACh a k následnému zvýšení počtu molekul tohoto neuromediátoru. Účinkuje selektivně v hippocampu a neokortexu mozku, tedy oblastí, které jsou při AD nejvíce postiženy. [32]

#### *Struktura*

Jedná se o léčivo karbamátového typu, obrázek 5 [33] o molekulové hmotnosti 250,34 g/mol, Rivastigmin se váže na svůj cílový enzym a dočasně ho inaktivuje [34]. Ve své čisté podobě má charakter bílého jemně krystalického prášku, který je dobře rozpustný ve vodě, ethanolu nebo acetonitrilu [35].

#### *Farmakodynamické vlastnosti*

Rivastigmin zlepšuje poruchy kognitivních funkcí, které jsou u demencí spojené s AD a Parkinsonovou chorobou způsobeny nedostatkem cholinergního přenosu. U zdravých osob dochází ke snížení aktivity AChE a BChE v mozkomíšním moku během 1,5 hodiny po podání *p.o.* 3 mg léčiva o 40 %. Aktivita enzymů se následně vrací k výchozí hodnotě přibližně za 9 hodin po dosažení maximálního inhibičního účinku. U pacientů s AD je inhibice AChE a BChE závislá na dávce až do 6 mg dvakrát denně, což byla nejvyšší testovací dávka.



Obrázek 5 Struktura rivastigminu

### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

K absorpci rivastigminu dochází velmi rychle. Plasmatické koncentrace dosahují maxima přibližně za 1 hodinu od podání. Vazba rivastigminu na bílkoviny je asi 40 %. Rivastigmin přechází hematoencefalickou bariérou. K metabolizaci dochází primárně hydrolyticky díky ChE na dekarbamoylovaný metabolit. Nezměněný rivastigmin v moči nenajdeme, vylučování metabolitů představuje hlavní cestu vylučování. Méně než 1 % celkové dávky je vyloučeno stolicí. Mezi významné nežádoucí účinky řadíme gastrointersticiální projevy, zahrnující nauzeu (38 %) a zvracení (23 %). [29]

### *Vztah mezi rivastigminem a zánětem*

Rivastigmin zabraňuje demyelinizaci, aktivaci mikroglíí a axonálnímu poškození. Dále snižuje reaktivitu T-lymfocytů a produkci prozánětlivých cytokinů TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a IL-17. Léčba rivastigminem má imonomodulační vlastnosti. [36]

Stále větším problémem v terapii pomocí výše zmíněných léčiv jsou vedlejší nežádoucí účinky. Z toho důvodu je snaha o vytvoření derivátů, stejně tak účinných, ale méně toxických. Dostupná léčiva funkčně selhávají, protože samotná AD je choroba se složitou etiopatogenezí. Proto je nutné terapii kombinovat nebo vyvinout léky schopné ovlivnit průběh AD na více úrovních.

#### **1.2.1.2 Alzheimerova choroba**

AD je definována jako závažné progresivní a ireverzibilní neurodegenerativní onemocnění mozku. Jedná se rovněž o nejběžnější příčinu demence. Demence je syndrom nebo skupina syndromů, která má řadu důvodů. Mezi charakteristické symptomy choroby patří problémy

s pamětí, ovládním jazyka, obtížnějším řešením problémů a jinými kognitivními schopnostmi. [37] Představuje asi 50-60 % všech demencí a dalších minimálně 10 % demencí je smíšené etiologie, kde se kromě alzheimerovských změn etiologicky podílejí i například ischemicko-vaskulární změny (mozkové infarkty). Nemoc je poměrně dobře definována patologickými nálezy, které jsou společné pro všechny postižené. Existuje však variabilita, co se týče doby vzniku, rychlosti progresu a některých dalších odchylek klinického nálezu u této nemoci. Značně se mohou lišit genetické predispozice i množství a druh různých faktorů ovlivňující rozvoj a průběh této choroby. [38]

### *Prevalence a incidence onemocnění*

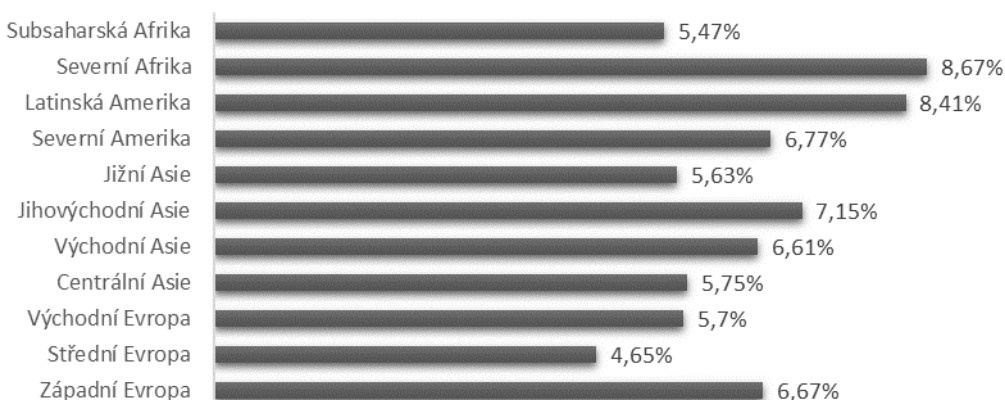
Onemocnění touto chorobou je celosvětově velmi rozšířené. Míra onemocnění není závislá od místa, kde se člověk nachází. Některá místa na planetě jsou ale v počtu onemocnění více zastoupena než jiná. [39]

### *Ve světě*

Podle *Alzheimer's Disease International* (ADI) žilo v roce 2015 na celém světě 46,8 milionů lidí s demencí (odhadem) [39]. Podle přepočtu ADI se objeví nový případ demence každé 3 sekundy a během následujících 20 let dojde ke dvojnásobení počtu lidí s demencí. Lze tedy očekávat, že v roce 2030 bude na planetě žít 74,7 milionů lidí s demencí. Na grafu 1 [40] je ukázáno procentuální zastoupení z roku 2015, které udává počet osob starších 60ti let trpící tímto onemocněním.

Dostupná srovnání organizace ADI ukazují, že v regionu Střední Evropy, kam patří i Česká republika, je zastoupení lidí s demencí nižší, než je průměr jinde ve světě.

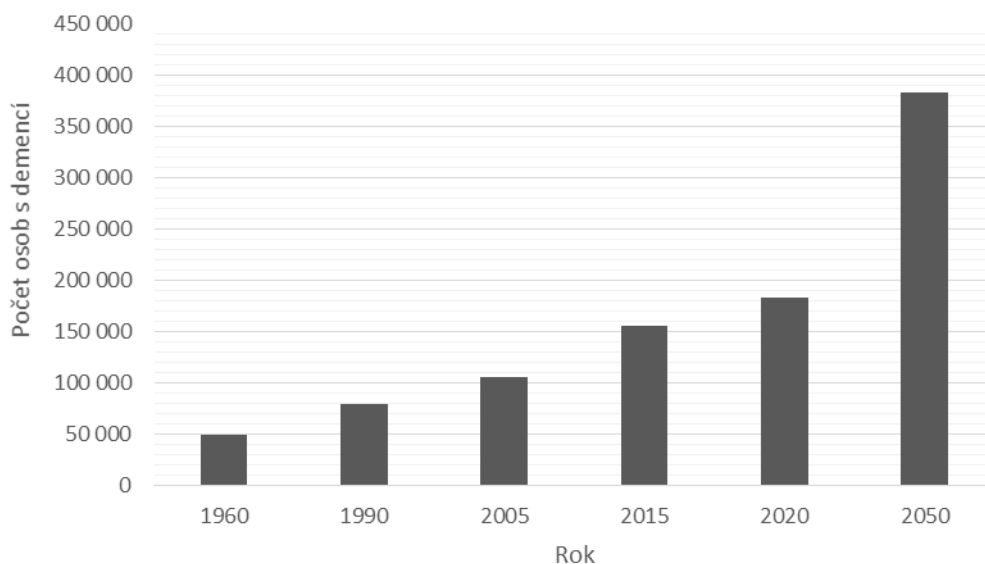
Graf 1 Demence ve světě – Průměrné zastoupení lidí (v %) s demencí pro danou oblast



### V České republice

V roce 2015 byl počet osob s demencí odhadnut na 156 tisíc. Více než dvě třetiny osob jsou ženského pohlaví. Dle odhadů žije u nás 51 tisíc mužů a 105 tisíc žen s demencí. Riziko vzniku demence narůstá s věkem, zlomem tedy lze označit důchodový věk. Z pohledu na historický vývoj prevalence demence, může být zkonstatováno, že počet postižených jedinců neustále narůstá. Tento vývoj je uveden v grafu 2 [40].

Graf 2 Vývoj demence v České republice



Nejvyšší podíl lidí s demencí mají kraje s nejstarší věkovou strukturou. V roce 2015 žilo nejvíce lidí s demencí v Královéhradeckém kraji, následně v Praze a pak Zlínském kraji. Nejméně lidí s AD či jiným typem demence žije v Ústeckém kraji, Středočeském a Karlo-

varském. Nejvyšší úmrtnost je v Plzeňském kraji (41 osob v přepočtu na 100 tisíc obyvatel), následuje Praha (36 osob na 100 tisíc obyvatel) a kraj Královéhradecký (35 osob na 100 tisíc obyvatel). [41]

### *Predispozice ke vzniku onemocnění*

Přesná příčina AD není dosud známa, jde o onemocnění s multifaktoriální etiologií. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory AD patří věk a přítomnost genů přispívajících k jejímu rozvoji. Jako ovlivnitelné faktory označujeme vaskulární faktory, kouření, obezitu, diabetes, hypertenzi, zvýšený cholesterol, nadměrné pití alkoholu nebo úrazy hlavy. [42]

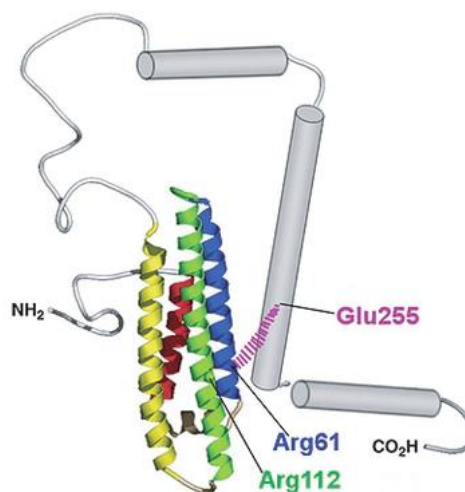
Heritabilita demencí bývá uváděna, jako bezrozměrná veličina v rozmezí 0,4-0,7. Za geny významné pro rodinnou formu AD řadíme presenilin 1 a presenilin 2 a gen pro amyloidový prekursorový protein (APP). Oproti tomu je u sporadické formy demence významně zastoupený gen pro apolipoprotein E (ApoE). Dalšími důležitými geny mohou být BDNF (z ang. *brain derived neurotrophic factor*), geny ve vztahu k cholinergní neurotransmisi a další. V dnešní době jsou také velice významné epigenetické faktory, jako je metylace DNA a acetylace histonů. [43] Dále se na vzniku AD mohou podílet viry nebo také hliník [44].

Dle epidemiologických studií je hypercholesterolemie významným rizikovým faktorem pro vznik AD a hraje významnou roli v patogenezi tohoto onemocnění. Cholesterol kontroluje interakci mezi A $\beta$  a membránou nervových buněk. Tato interakce je rozhodující pro iniciaci neurotoxické kaskády. [45] Zvýšená hladina cirkulujícího cholesterolu koreluje s hladinami A $\beta$  v mozku i krvi pacienta s AD. Cholesterol reguluje produkci a ukládání A $\beta$ , což znamená, že exprese APP a tvorba A $\beta$  mohou být podporovány zvýšenými hladinami cholesterolu. Díky těmto vysokým hladinám dochází navíc ke zhoršení aterosklerózy mozkových tepen, což vede k cerebrovaskulární alteraci, která zvyšuje pravděpodobnost vzniku AD. [46]

S cholesterolem jsou spojeny také apolipoproteiny. Jedná se o bílkoviny, které zajišťují vazbu lipoproteinů na specifická vazebná místa. V mozku mají vliv na neurální reparaci, růst dendritů, synaptickou plasticitu a je popsána i protizánětlivá funkce. Jsou také důležitým přenašečem cholesterolu v mozku. Byly popsány 3 alely genu pro ApoE na 19. chromozomu, a to epsilon 2 ( $\epsilon$ 2), epsilon 3 ( $\epsilon$ 3) a epsilon 4 ( $\epsilon$ 4). Tyto alely kódují 3 izoformy lipoproteinu: ApoE 2, ApoE 3, ApoE 4. [47]

Zdědění  $\epsilon$ 4 výrazně zvyšuje riziko vzniku AD v mladém věku. Lidé s dvěma kopiemi ApoE  $\epsilon$ 4 alely mají 8krát vyšší riziko onemocnění. Přítomnost izoformy ApoE 4, obrázek 6 [48]

je rizikovým faktorem jak pro vznik hyperlipidémie, tak i AD. Avšak jeho přítomnost není nutnou podmínkou pro rozvoj choroby. Apolipoproteiny neovlivňují patogenezi AD pouze vlivem na cholesterol, ale i na aktivitu AChE nebo  $\beta$ -sekretasy (proteasy, stěpící transmembránové proteiny; substrátem může být APP a také jsou zkoumány v souvislosti s oxidativním stresem). [49]



Obrázek 6 Struktura izoformy ApoE 4

### *Cholinergní hypotéza*

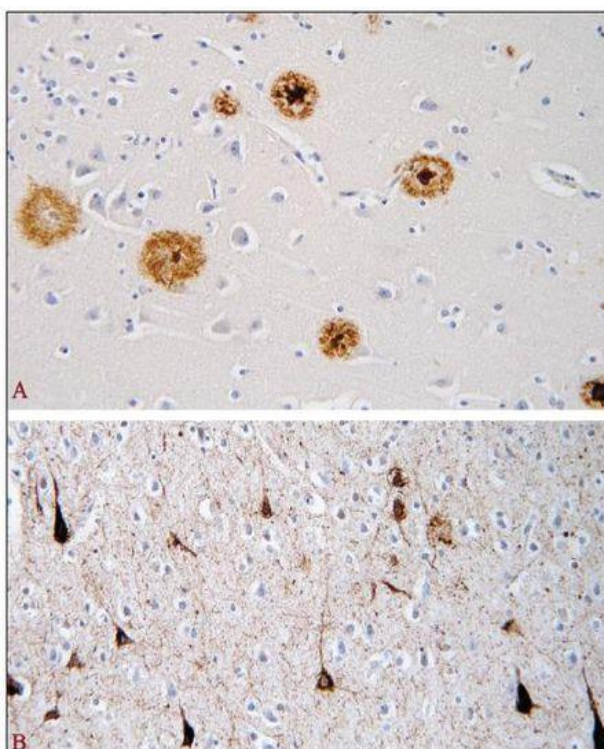
Tato hypotéza je nejstarší teorií, objasňující možné příčiny vzniku AD. Vedla k vývoji léků, které jsou schválené a dodnes používané k léčbě pacientů. Vychází ze ztráty cholinergní aktivity, která byla pozorována u pacientů s AD. Narušení cholinergní neurotransmise se podílí na vzniku řadě chorobných stavů, což souvisí s rolí ACh v kognitivních procesech. Deficit v cholinergním přenosu může potenciálně ovlivnit všechny aspekty poznání a chování, včetně zpracování informací v kortikálním a hipokampálním systému. Narušením cholinergních vstupů do kortexu může narušit poroznost a porušit intuitivní podněty pro rozhodování. Bylo prokázáno, že blokování cholinergních receptorů zhoršuje kódování informací a paměť. Předpokládá se, že ztráta cholinergních neuronů a následné zhoršení dopaminergního přenosu by mohlo být hlavními faktory, které jsou základem psychických symptomů spojených s AD. Blokadou centrálního cholinergního systému skopolaminem u mladých lidí, lze simulovat stejné příznaky jako u osob s AD. Použitím IChEs, jako je fyzostigmin lze poruchu paměti a kognitivních funkcí u těchto otrav vrátit do fyziologického stavu. [50,51]

### *Neurobiologie Alzheimerovy choroby*

U všech neurodegenerativních demencí jsou podkladem patologické změny mozkových bílkovin (proteinopatie) se zmenšováním a zánikem neuronů a následné atrofie (zmenšování) mozku. V případě patologického stavu dochází k proteolytickému štěpení APP  $\beta$ -sekretasou (BACE1) za vzniku A $\beta$ . Vzniká N-koncová ektodoména APP a C-koncový fragment, který je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou, což způsobí uvolnění A $\beta$  o 40 (A $\beta$ 40) nebo 42 AMK (A $\beta$ 42). Jejich poměr pravděpodobně představuje důležitou úlohu v patogenezi AD. [48] Krystaly A $\beta$  pak tvoří základ neurodegenerativních útvarů, tzv. senilních plaků, obrázek 7 [52]. Dochází k aktivaci gliových buněk, produkci cytokinů, zánětlivého enzymu cyklooxygenasy a uvolnění volných kyslíkových radikálů. Zvýšeně se uvolňují excitační AMK L-glutamát, což vede ke zvýšené aktivaci tzv. ionotropních receptorů typu NMDA. Tímto dochází ke zvýšenému vstupu draslíku do neuronů a jejich následné destabilizaci a aktivaci genů včetně těch, které regulují apoptózu a zániku neuronů. [43,44] Hlavní intraneuronální změnou u AD je degenerace  $\tau$ -proteinu, vázaného na neuronální mikrotubuly. Vznikají neurofibrilární klubka a takto postižené neurony taktéž podléhají apoptóze. [53]

### *Význam zánětu*

Aktivované mikroglie, obklopující senilní plaky a zvýšené hladiny komplementového systému, cytokinů, chemokinů a volných radikálů byly pozorovány právě u AD. Tyto důkazy vedly k tomu, že zánětlivý proces neuronů může vést k samovolně vznikajícímu toxickému cyklu, ve kterém je několik faktorů – bílkovinné agregáty, abnormální buněčné agregáty, poškozené neurony a abnormální synapse. Díky těmto faktorům dochází k aktivaci mikroglíí a následnému uvolňování zánětlivých mediátorů, což zhoršuje neuronální poškození. Mezi prozánětlivými molekulami, nalezenými ve spojení s plaky, prominentní roli sehrává interleukin-1 (IL-1) a tumor nekrotizující faktor (TNF). Polymorfismy v regulační oblasti pro IL-1a, IL-1b a TNF jsou spojeny s vyšším rizikem vývoje AD, protože ovlivňují stupeň mikroglíální aktivace. [54]



Obrázek 7 Amyloidní senilní plaky a neurofibrilární klubka; A – Amyloidní senilní plaky u AD, pozitivní v imunochemické reakci s monoklonální protilátkou proti amyloidu- $\beta$ ; B – neurofibrilární klubka u AD, pozitivní v imunochemické reakci s monoklonální protilátkou proti  $\tau$ -proteinu

### *Mediátory zánětu*

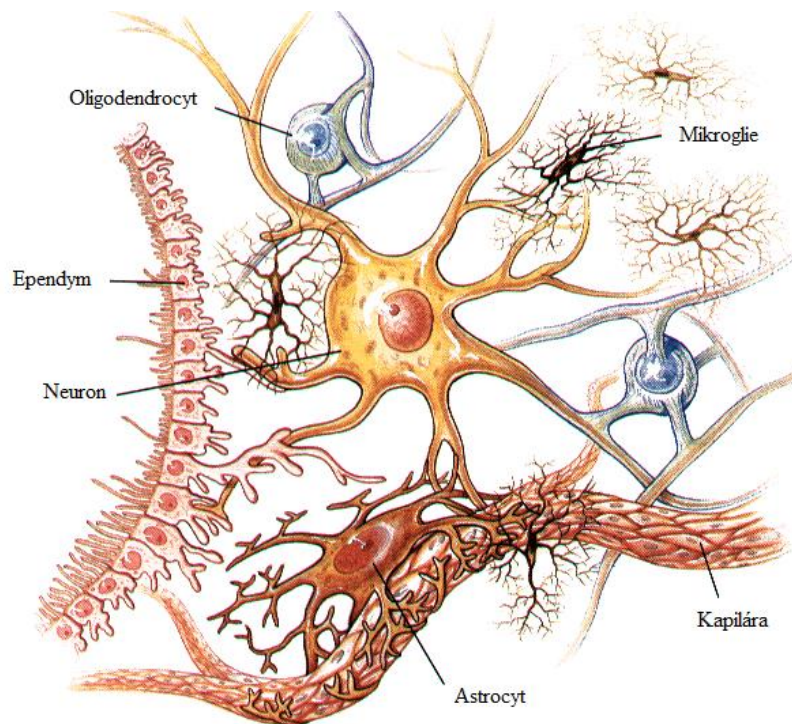
Na obrázku 8 [55] jsou znázorněny hlavní buňky, které se podílejí na zánětlivém procesu u neurodegenerativních onemocnění – mikroglie, astrocyty a z menší části i neurony. Ve všech těchto případech se jedná o buněčné komponenty mozku, které mají mnoho důležitých rolí v jeho homeostáze a funkci. [56]

Jako glie neboli neuroglie se označují neurální buňky s podpůrnou funkcí, které se nacházejí v CNS a periferním nervovém systému (PNS). Novější výzkum naznačuje, že v mozku člověka je počet neuronů přibližně stejný, jako je počet glií. Dle funkce a lokalizace rozlišujeme více typů neuroglií a to astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie. [57]

Glie vytvářejí podpůrnou kostru, která poskytuje nervovému systému strukturální podporu pro neurony. Glie produkují růstové faktory, které brání neuronům v apoptóze. Tyto růstové faktory jsou potřebné pro regeneraci a udržování plasticity neuronů. Mikroglie slouží k odstraňování odpadního materiálu, vznikajícího při poškození nebo zániku neuronů a podílí se také na imunitních procesech probíhajících v CNS. Astrocyty se významnou mírou podílejí na udržování homeostázy prostředí, tvořené extracelulární tekutinou. Dále se glie podílejí



na tvorbě cerebrospinální tekutiny, která obklopuje, vyživuje a chrání neurony před poškozením. V reakci na poškození nervové tkáně jsou aktivovány reparační procesy, přičemž tyto buňky proliferují a indukují vznik astrocytární jizvy. [58]



Obrázek 8 Komplex neutrálních buněk

### *Mikroglie*

Věk je nejdůležitějším rizikovým faktorem pro vývoj sporadické formy AD a s demografickým přechodem na delší životnost je jasné, že výskyt těchto onemocnění se zvýší. Část neurobiologického výzkumu je proto v současné době zaměřena na pochopení toho, jak věk ovlivňuje biologické vlastnosti mikroglie. Mikroglie jsou vysoce citlivé na téměř jakoukoliv formu poranění nebo onemocnění CNS. Při nich dochází k jejich aktivaci, která je charakterizována změnami morfologie, jako je hypertrofie buněčného těla, zvýšené větvení, regulace nebo nová syntéza buněčných povrchových či intracelulárních molekul. [59]

Mikroglie jsou dynamické buňky CNS, které mají klíčovou roli ve vývoji, plasticitě a imunitním dozoru. Během homeostázy provádí mikroglie základní funkce včetně monitorování synapsí, odstraňování apoptických odpadů. Tyto buňky mají rozvětvenou morfologii s dlouhými a tenkými raménky. Jsou vysoce pohyblivé, díky tomu mohou

nepřetržitě sledovat místní mikroprostředí. Distribuce mikroglie v celém mozku je různorodá a mění se u jednotlivých druhů. U člověka tvoří mikroglie v celém mozku až 16 % buněčné populace CNS. Závisí to však na oblasti. Ve vyšší hustotě se vyskytují v bílé než v šedé hmotě mozkové. Vzhledem k jejich podobnosti s makrofágy jsou mikroglie označovány jako rezistentní vrozené imunitní buňky CNS, zajišťující tzv. vrozenou imunitní ochranu jako první a hlavní formu aktivní imunitní obrany mozku. Do CNS migrují během embryonálního vývoje a pocházejí z primitivních myeloidních buněk. Jakmile mikroglie dosáhne konečného diferencovaného stádia, replikace je omezená. Několik studií však uvádí, že mikroglie proliferují i po traumatickém poškození mozku. [59]

Mikroglie jsou klíčovými aktéry koordinující odpovědi na infekci mezi periferním imunitním systémem a CNS. Šíří a reagují na zánětlivé signály počínající v periférii. Po své aktivaci produkují prozánětlivé cytokiny, včetně IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ . Tyto cytokiny jsou nezbytné pro indukci a udržování symptomů nemoci. Dále podporují uvolňování sekundárních zánětlivých mediátorů, jako jsou prostaglandiny a oxidy dusíku. [59]

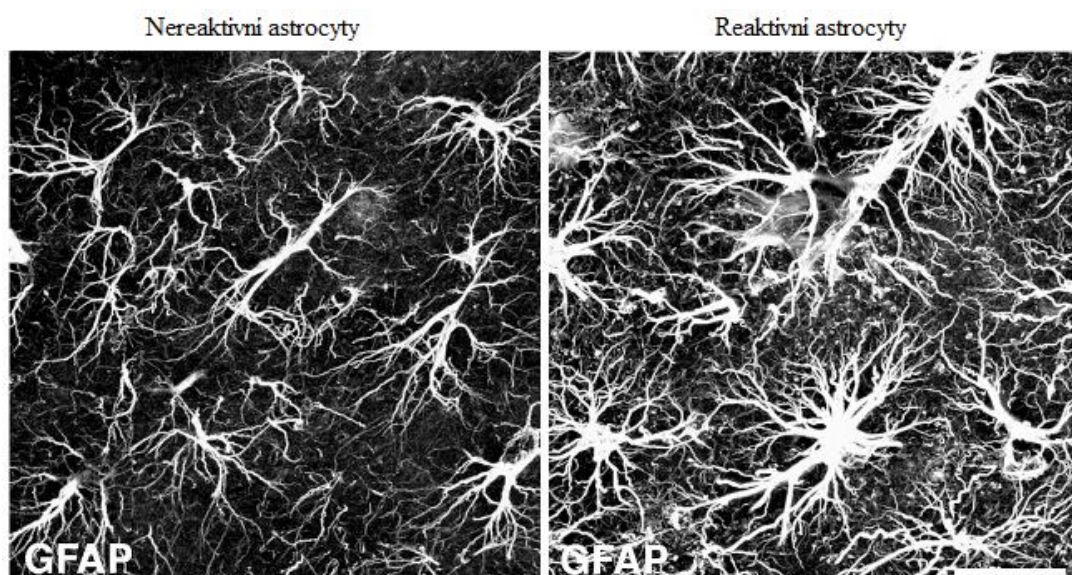
### *Oxid dusnatý*

Oxid dusnatý (NO) je molekulou syntetizovanou syntásami oxidu dusnatého (NOS) a hraje rozhodující roli v řadě fyziologických i patologických procesů v těle člověka. Fyziologická reakce NO závisí na lokálních koncentracích, jakož i na dostupnosti a povaze cílových molekul. Bývá popisován jako dvojsečný meč, spojený s neurodegenerativními poruchami. Nadměrná produkce NO vyvolaná zánětlivými signály byla identifikována jako jedna z hlavních příčin vzniku těchto chorob. Při vysokých koncentracích jsou z NO tvořeny reaktivní druhy dusíku, což vede ke smrti neurálních buněk (nekróze, apoptóze a autofágii). Zánětlivý proces působí na klíčové regulační cesty, jako je excitotoxicita (glutamát hraje roli ve vývoji nervové tkáně, její plasticitě; ve velkých koncentracích působí jako neuronální jed) indukovaná akumulací glutamátu a mikrogliaální aktivace. Aktivované glie exprimují indukovaný NOS a dochází k produkci NO, který vyvolá mobilizaci vápníku z endoplasmatického retikula, čímž uvolní vezikulární glutamát. Je také schopen aktivovat cyklooxygenasu, což je enzym, který přeměňuje kyselinu arachidonovou na prostaglandiny a tromboxany. Kombinace NO s volnými radikály jako je superoxidový anion má za následek tvorbu vysoce reaktivního peroxynitridu. Ten pak může indukovat peroxidaci lipidů a způsobit poškození DNA. [60]

## Astrocyty

Astrocyty jsou nejpočetnějšími neurálními buňkami v CNS, tvořící přibližně 20-50 % objemu lidského mozku. Astrocyty mají několik funkcí, jako je regulace extracelulárních iontů a energetických rezerv, clearance a metabolismus neurotransmiterů a usnadňují udržování fyziologických neurálních funkcí v CNS. Mohou být aktivovány četnými faktory, včetně patogenů, lipopolysacharidem (LPS), oxidativním stresem, volnými mastnými kyselinami stejně dobře jako A $\beta$ . Předpokládá se, že aktivace astrocytů trvá déle než aktivace mikroglíí. Reaktivní astrocyty, obrázek 9 [61] mohou na rozdíl od klidových produkovat cytokiny. Dále generují malé množství A $\beta$ . Prozánětlivé molekuly tvořené reaktivními astrocyty aktivují mikroglie a dochází k další produkci zánětlivých faktorů. [62]

Jako astroglióza se označuje zvýšení počtu astrocytů v důsledku destrukce blízkých neuronů traumatem CNS, infekce, ischemie a vlivem neurodegenerativních chorob. Astroglióza mění molekulární expresi a morfologii astrocytů, což způsobuje tvorbu jizev, které inhibují reparaci CNS. Ukazatelem astrogliózy je zvýšená koncentrace gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP), která je spojena s akumulací plaků a do určité míry i s množstvím neurofibrilárních klubek. V lidském mozku postiženým AD je přítomnost amyloidních despozit spjata s reaktivními astrocyty, silně exprimujícími GFAP. [63] Tato astrocytická aktivace narušuje homeostázu okolních buněk a přispívá k progresi onemocnění [64].



Obrázek 9 Astrocyty

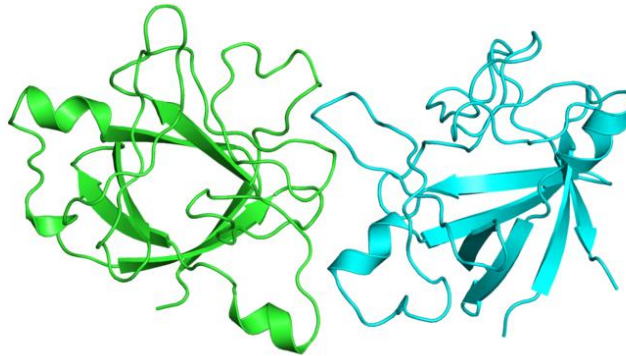
### *Cytokiny, chemokiny a růstové faktory*

Cytokiny a chemokiny jsou proteiny, které koordinují imunitní odpověď v celém těle. Dysregulace cytokinů a chemokinů je hlavním rysem vývoje neurozánětu, neurodegenerace a demyelinizace jak v centrálním, tak v periferním nervovém systému. Patologické stavy v CNS mohou vést k aktivaci mikroglíí, které zprostředkují poranění či smrt neurálních a gliových buněk produkcí prozánětlivých faktorů, jako jsou právě cytokiny a chemokiny. Rovnováha mezi opravnými a prozánětlivými faktory určuje výsledek neurodegenerativního procesu. [65]

Cytokiny jsou malé a nestrukturální proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí od 8 do 40 kDa. Původně nazývané lymfokiny a monokiny, dle jejich buněčného zdroje. Neexistuje žádný motiv AMK sekvence nebo trojrozměrná struktura, která cytokiny spojuje. Jejich biologické aktivity nám umožňují je seskupit do různých tříd. Cytokiny jsou sekretovány různými imunitními buňkami, například T-lymfocyty, makrofágy, přirozenými zabíječi i neimunitními buňkami. Biologické účinky indukované cytokiny zahrnují stimulaci nebo inhibici proliferace buněk, cytotoxicitu, apoptózu, buněčný růst, diferenciaci, zánětlivé reakce i zvýšení regulace exprese proteinů povrchové membrány. Byla zaznamenána řada interakcí mezi cytokiny a složkami senilních plaků u AD. Cytokiny mohou stimulovat sekreci dalších proteinů nalezených v senilních placích. Mezi cytokiny a A $\beta$  mohou nastat synergické účinky. Například IFN- $\gamma$  s A $\beta$  způsobuje uvolňování TNF- $\alpha$  a reaktivních druhů dusíku. Bylo také prokázáno, že IL-1 zvyšuje toxicitu A $\beta$  v buňkách. Některé cytokiny jasně podporují zánět a jsou tedy nazývané prozánětlivými, zatímco jiné cytokiny, potlačující aktivitu prozánětlivých cytokinů, označujeme jako protizánětlivé. IL-4, IL-10 a IL-13 jsou silnými aktivátory B-lymfocytů, avšak mohou být i protizánětlivými cytokiny. IFN- $\gamma$  je dalším příkladem pleiotropní povahy cytokinů. Má antivirovou aktivitu, stejně jako IFN- $\alpha$  a IFN- $\beta$ . IFN- $\gamma$  je také aktivátorem dráhy ovlivňující cytotoxické buňky a je považován za prozánětlivý cytokin, protože zvyšuje aktivitu TNF- $\alpha$  a indukuje produkci NO. [66]

Rodina cytokinů IL-1 obsahuje 2 proteiny IL-1a a IL-1b. Oba přispívají k aktivaci buněk při vazbě na specifické membránové receptory. Na obrázku 10 [67] je naopak uveden IL-1ra, který ve formě glykosylovaného sekrečního proteinu o velikosti 23 kDa vyvazuje a brání jeho působení na buňky. IL-1 je důležitým iniciátorem imunitní odpovědi a hraje klíčovou úlohu při vzniku a vývoji komplexní buněčné zánětlivé kaskády. Zvýšení IL-1b bylo detekováno v mozkomíšním moku a parenchymu v raných hodinách po poranění mozku u lidí. Nicméně

IL-1 hraje také roli v degeneraci neuronů a zvyšuje aktivitu neuronální AChE, mikroglialní aktivaci a další tvorbu IL-1. [68]



Obrázek 10 Struktura IL-1ra

Dalším významným cytokinem je IL-6. IL-6 hraje roli v obraně hostitele s hlavními regulačními účinky na zánětlivou odezvu. Patří do rodiny neuropeptidů a má jak přímé, tak nepřímé neurotrofické účinky. Podporuje astrogliózu, aktivuje mikroglie a stimuluje produkci proteinů akutní fáze. [69]

Jedním z hlavních protizánětlivých cytokinů je IL-10, jehož mRNA můžeme detekovat v čelním a parietálním laloku normálního mozku. Jeho úkolem je neuronální homeostáza. Působí na buňky interakcí se specifickými receptory buněčného povrchu, které jsou přítomny ve všech populacích gliových buněk. IL-10 v těchto buňkách inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako je IL-1 a TNF- $\alpha$ , potlačením exprese jejich receptorů. [70]

Heterodimerický cytokin IL-12 je produkován aktivovanými monocyty, makrofágy a gliovými buňkami. Jeho funkce spočívá v podpoře zánětu i patologických procesů. Dle výsledků studie, lze usoudit, že plasmatické hladiny IL-12 byly pozorovány v závislosti na závažnosti AD. [68]

Chemokiny jsou skupinou cytokinů s chemotaktickými vlastnostmi. Chemokiny jsou nezbytné pro aktivaci a migraci leukocytů. Monocytový chemotaktický protein (MCP) je členem rodiny chemokinů a hraje významnou roli při zánětlivých procesech, včetně aterosklerózy a neurodegenerativních chorob. Mikroglie produkují MCP a stimulují astrocyty, které se společně podílejí na degradaci peptidů A $\beta$ . Zvýšená produkce MCP-1 byla prokázána u neurodegenerativních onemocnění. Existují důkazy, že plasmatické hladiny MCP-1 by mohly být použity jako biomarkery k monitorování zánětlivého procesu u AD. [71]

Dalším druhem molekul regulujících funkce imunitního i nervového systému jsou růstové faktory. Tyto proteiny podporují přežití buněk CNS i PNS. Hrají roli ve vývoji mozku, stimulaci axonálního růstu a regulují růst různých druhů buněk v mozku a periférii. Neuronální růstový faktor je nejsilnějším růstovým faktorem schopným působit proti buněčné smrti cholinergních neuronů. Zvýšené hladiny byly nalezeny právě v mozkomíšním moku u pacientů s AD. Jeho vztah k patogenezi [72]

### *Příznaky onemocnění*

Mezi příznaky, které by nás měly varovat o možném onemocnění, řadíme ztrátu paměti, která ovlivňuje schopnost plnit každodenní úkoly. Občasné zapomínání pracovních úkolů, telefonní čísel, jména kolegů a vzpomnutí na ně později je zcela normální. Lidé trpící AD však zapomínají častěji a nevybaví si je ani později. Mají problémy s vykonáváním běžných činností a řeči. Každý z nás má občas problém najít správné slovo, ale člověk s AD zapomíná i na jednoduchá slova, nahrazuje je nesprávnými výrazy a věty pak nedávají smysl. Pacienti s AD podléhají časové a místní dezorientaci, kdy se ztratí i ve vlastní ulici a nevědí, kde jsou, jak se tam dostali a jak se dostanou domů. Mají špatný nebo zhoršující se racionální úsudek a problémy s abstraktním myšlením. Lehce povšimnutelnými příznaky mohou být i změny v náladě nebo chování. Člověk s AD podléhá prudkým změnám nálad, náhle a nečekaně propukne pláč a hned následně hněv, bez zjevných příčin. Můžeme pozorovat změnu osobnosti a ztrátu iniciativy. [73]

Kromě poruchy paměti, intelektu, úsudku a jiných kognitivních funkcí je AD velice často doprovázena celou řadou nekognitivních symptomů a poruch chování. Nejčastěji se setkáváme s apatií nebo naopak agitovaností. V počátcích onemocnění se může objevit deprese a úzkost, častá je i spánková inverze. Mohou se objevovat i halucinace, bludy, verbální a brachiální agresivita. Dle současných podložených studií by měl každý pacient s AD, u kterého se objevily poruchy chování, být léčen některým z IChEs. [74]

Lidé v závěrečné fázi onemocnění jsou vázáni na lůžko a vyžadují nepřetržitou péči. Onemocnění je nakonec fatální. [37]

### 1.2.1.3 Léčiva s periferními účinky

Periferní IChEs zvyšují poptávku ACh na nervosvalových ploténkách a na synapsích vegetativního nervového systému. Mezi tyto léky řadíme Pyridostigmin, Neostigmin, Distigmin a Ambenonium. [75]

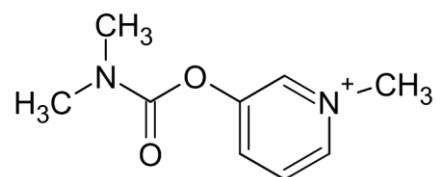
#### *Pyridostigmin*

##### *Struktura*

Pyridostigmin je farmakologicky používán jako bromidová sůl - Pyridostigmin bromid. Dle organizace, zabývající se chemickou nomenklaturou je označován jako N- dimethylkarbamát, znázorněný na obrázku 11 [76]

##### *Farmakologické a farmakodynamické vlastnosti*

Toto léčivo neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru. Má pomalejší nástup účinku než Neostigmin, účinkuje však déle. Je proto u myastenických pacientů lépe snášen. [77]



Obrázek 11 Struktura Pyridostigminu

##### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Pyridostigmin je metabolizován pouze v malé míře. Hlavní metabolit pyridostigminu, 3-hydroxy-N-methylpyridin, vzniká hydrolýzou mateřské látky. Oba jsou vylučovány močí. Nežádoucí účinky, jako u ostatních látek této skupiny, souvisí zejména s inhibicí AChE ve vegetativním nervovém systému. Mohou se projevovat jako nauzea, zvracení, průjem, křeče, slinění, brachykardie a svalové křeče. [77]



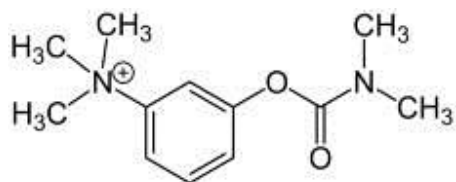
## ***Neostigmin***

### *Struktura*

Chemický název neostigminu je 3-(dimethylcarbamoyloxy)-N,N,N-trimethylbenzenaminium, uvedený na obrázku 12. [78]

### *Farmakologické a farmakodynamické vlastnosti*

Účinky neostigminu se nejvýrazněji projevují na nervosvalové ploténce kosterních svalů, v oblasti oka, urogenitálního ústrojí a kardiovaskulárního systému. [79]



Obrázek 12 Struktura neostigminu

### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Vzhledem k jeho nízké lipofilitě má po podání *p.o.* malou absolutní biologickou dostupnost. Částečně se transformuje v játrech a je vylučován močí, část v nezměněné podobě a část ve formě metabolitů. Po jeho podání se mohou vyskytovat reakce přecitlivělosti, brachykardie, průjem, nevolnost a svalové záškuby. [79]

## ***Distigmin***

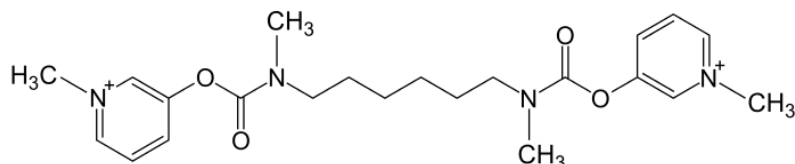
### *Struktura*

Dle organizace, zabývající se chemickou nomenklaturou se jedná o biskvarterní amoniovou sloučeninu (1-methylpyridin-1-ium-3-yl)-N-methyl-N-[6-[methyl-(1-methylpyridin-1-ium-3-yl)oxycarbonylamino]hexyl]karbamát, uvedenou na obrázku 13 [80].



### *Farmakologické a farmakodynamické vlastnosti*

Léčivo způsobuje zvýšení tonu a peristaltiky v gastrointestinálním traktu, zvýšení napětí stěny močového měchýře, děložní a příčně pruhované svaloviny. V oku způsobuje kontrakci ciliárního svalu a snížení nitroočního tlaku. Snižuje také akci srdeční. Ve vyšších dávkách způsobuje paralýzu svalů. [81]



Obrázek 13 Struktura distigminu

### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Absolutní biologická dostupnost distigminu po podání *p.o.* je 4,65 %. Biologický poločas přípravku je 64 hodin. Většina podané látky je vylučována biliární sekrecí stolicí. Mezi nežádoucí účinky distigminu lze přiřadit excesivní cholinergní stimulaci, projevující se nauzeou, průjmem, brachykardií, šokem, depresi, úzkostí a rozmazaným viděním. [81]

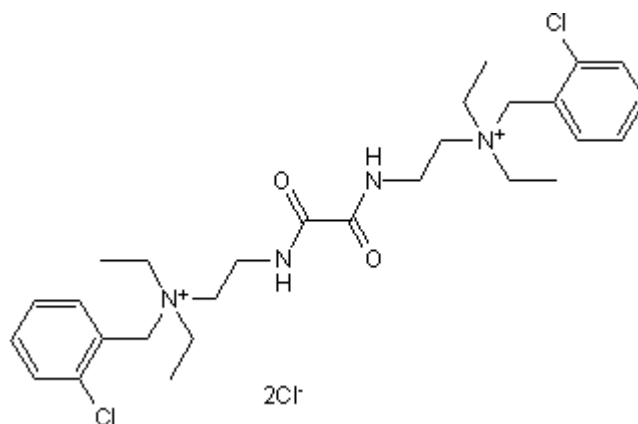
## **Ambenonium**

### *Struktura*

Ambenonium je symetrický bis- kvarterní amoniový ion na bázi oxalamidů, který má ethyl a 2-chlor benzylové skupiny připojené k dusíkům, obrázek 14 [82].

### *Farmakologické a farmakodynamické vlastnosti*

Ve srovnání s neostigminem má výhodu delšího farmakologického působení a menších nežádoucích účinků na gastrointestinální trakt [83].



Obrázek 14 Struktura Ambenonia

#### *Farmakokinetické vlastnosti a nežádoucí účinky*

Účinky ambenonia nastupují 15-20 minut po *p.o.* podání. Vrchol plasmatické koncentrace je dosažen asi po 1-2 hodinách a doba trvání účinku se uvádí 5-6 hodin. Jako vedlejší účinky lze pozorovat pocení, bledost, rozostřené vidění, zvýšení krevního tlaku, úzkost a deprese. [83]

#### *Léčebná indikace IChEs*

Léčiva s periferními účinky jsou určena k léčbě atonií střev a močového měchýře, bulbárních syndromů různé etiologie a myastenia gravis. Myastenia gravis je onemocněním, v jehož etiopatogenezi sehrává významou roli imunitní systém. Periferní IChEs zlepšují příznaky tohoto onemocnění, nedochází však k ovlivnění patogeneze. Ve všech případech nemusí být ale léčba těmito látkami účinná. Pacienti s protilátkami proti svalově specifické tyrosin kinase (MuSK) jsou vůči IChE buď rezistentní, nebo se u nich může projevit hypersenzitivní reakce. [75] Z tohoto hlediska by proto mohli pacienti s touto chorobou vývojem nových léčiv s procholinergním a protizánětlivým účinkem benefitovat, zejména pak u látek s omezeným prostupem přes hematoencefalickou bariéru.

#### **1.2.1.4 Myasthenia gravis**

MG je chronické nervosvalové onemocnění, charakterizované slabostí příčně pruhovaného svalstva, vlivem narušené komunikace mezi nervovými a svalovými buňkami. Tato autoimunitní choroba, je způsobena tvorbou autoprotilátek proti AChR kosterního svalu. Tyto protilátky blokují jeho funkci, dokonce tento receptor spolu s komplementem ničí. U 15-20 %

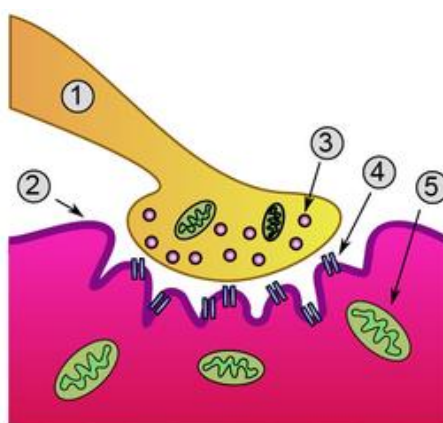
nemocných však nejsou žádné protilátky detekované. MG byla poprvé popsána Tomášem Willisem roku 1672. [84]

Onemocnění dělíme na podskupiny dle věku pacienta na počátku onemocnění, podle patologie thymu a profilu protilátek [85]. Toto rozdělení má velký význam v dalším rozhodování o postupu léčby [86]. Nejčastějším druhem je séropozitivní MG (SPMG), objevující se před 45 rokem života. Charakteristická je u této varianty hyperplazie thymu a autoprotiilátky proti AChR. Dalším typem je MG asociovaná s thymomem, jejíž incidence ve světě dosahuje 10-15 %. Může vznikat v každém věku. Jsou zde přítomny autoprotiilátky proti AChR a titinu. Posledním typem je séronegativní MG (SNMG), jejíž incidence ve světě činí 7 %. Častěji propuká u mladších osob a typická je přítomnost autoprotiilátek vůči MuSK. [85]

Tato choroba obvykle začíná padáním očních víček, což je způsobeno slabostí očních svalů. Časem se však může rozšířit i na svaly obličeje a krku. Dále můžeme pozorovat špatně srozumitelnou řeč, potíže při žvýkání a polykání a dýchací obtíže. [87]

#### *Struktura a fyziologie nervosvalového přenosu*

Nervosvalový přenos je realizován na nervosvalové ploténce, což je typ chemické synapse, jejíž funkcí je přenos vzruchu z neuronu na vlákno kosterního svalu. Ploténka je složená z presynaptického útvaru představovaného axonálním zakončením motorického neuronu (obrázek 15). [88] Další částí je synaptická štěrbina a postsynaptický útvar, představující plasmatickou membránu na kosterním svalu.



Obrázek 15 Struktura nervosvalové ploténky; 1 – Presynaptický útvar, 2 – Sarkolema, 3 – Synaptické váčky, 4 – Receptory pro ACh, 5 - Mitochondrie

Axonální zakončení motorického neuronu obsahuje kromě mitochondrií i synaptické vezikuly, obsahující ACh. Tyto vezikuly se nacházejí na postsynaptické membráně v blízkosti AChR a tvoří pohotovostní zásobu ACh. Množství v jedné vezikule odpovídá tzv. kvantu, což odpovídá 5 000–10 000 molekulám ACh. K uskutečnění nervového přenosu je nutné uvolnění několika set kvant ACh, která vedou k masivní depolarizaci postsynaptické membrány a vytvoření ploténkového potenciálu. Tento proces nastává tehdy, když akční potenciál periferního nervu způsobí influx iontů kalcia. [89] Další část tvoří synaptická štěrbin, obsahující bazální laminu. Jejím úkolem je modulace nervosvalového přenosu pomocí extracelulární matrix. Postsynaptická membrána tvoří záhyby, na kterých jsou exprimovány nikotinové AChR. Na dně těchto záhybů jsou napětově řízené sodíkové kanály, které se aktivují při ploténkovém potenciálu a vedou k zvýšenému influxu iontů natria a šíření akčního potenciálu na sarkolemě. [90]

Tento AChR je ligandem řízený iontový kanál. Jestliže dojde k navázání molekul ACh na specifická vazebná místa, dojde k otevření iontového kanálu a vlákno podléhá depolarizaci a kontrakci. Enzymem, který nervosvalového přenos ukončuje je AChE. V případě MG je AChR zablokovan protilátkou a nemůže dojít k navázání ACh. [91]

### *Epidemiologie*

Napříč tomu, že incidence a prevalence se časem zvyšuje, MG je stále relativně vzácné onemocnění. Prevalence choroby je 150-190 osob na jeden milion obyvatel. Celosvětový počet nemocných je kolem 1 milionu. Choroba postihuje obě pohlaví, avšak poměr žen k mužům je 2:1, přičemž nejvíce jsou k onemocnění náchylné mladší ženy a starší muži. Zatímco ještě před 50 lety přesahovala mortalita onemocnění 50 %, s rozvojem intenzivní péče a zavedením nových léčebných postupů nedosahuje ani 0,5 %. MG může být u 10 % případů provázána i jinými autoimunitními chorobami, jako jsou autoimunitní tyreoiditis, lupus nebo revmatoidní artritida. [91]

Lékaři v České republice diagnostikují mezi 130 a 150 případy za jeden rok. V přepočtu to činí až 240 pacientů na 1 milion obyvatel. [91]

### *Příčiny vzniku onemocnění*

Příčiny tohoto onemocnění jsou známy. Mohou být způsobeny vlivem zevního prostředí, genetickými faktory nebo hormonálními vlivy. Každá složka má svoji specifitu, ovlivňuje manifestaci i průběh choroby. K indukci MG může dojít v souvislosti s některými léky, jako je D-penicilamin. [91] Riziko nese i léčba IFN- $\alpha$ . Pacienti léčení tímto cytokinem produkují řadu protilátek a může u nich dojít k vyvolání autoimunitní choroby. Na manifestaci MG má také vliv infekční agens. V tomto případě je největší pozornost věnována herpetickým virům, např. viru Epstein-Barrové nebo poliovirům. Viry mohou spouštět tkáňově specifickou autoimunitní odpověď a tím i autoimunitní chorobu. [92] Několik genetických lokusů, včetně genů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) i jiných je spojeno se vznikem MG. Úkolem MHC je rozpoznávání cizorodých antigenů a po vazbě na jejich povrch je prezentují ostatním buňkám imunitního systému. Nejvíce reprodukovatelnou genetickou asociací s MG je haplotyp HLA-A1, B8, DR3 a určité varianty genů kódující Fc gamma receptory (Fc $\gamma$ R).[93] Bylo také prokázáno, že pravděpodobnost MG je výrazně vyšší u monozygotických dvojčat v porovnání s dizygotickými dvojčaty, což silně naznačuje genetickou predispozici [94]. Je také známo, že řada autoimunitních chorob je častější u žen než u mužů a během těhotenství dochází k výkyvům jejich závažnosti. Zvýšenou aktivitou estrogenových receptorů dochází k progresi autoimunitní odpovědi stimulací Th<sub>1</sub> buněčné odpovědi. [95]

### **1.2.2 Naftochinony**

Látky, které jsou testovány v rámci experimentální části diplomové práce, jsou deriváty naftochinonu. Naftochinon je organickou látkou, odvozenou od naftalenu se dvěma oxo skupinami navázanými na naftalenový kruh. Samotný se naftochinon se vykazuje cytotoxicitou, ale také širokými farmakologickými účinky. Mechanismus cytotoxického účinku spočívá v indukci ztráty potenciálu na mitochondriální membráně. Výsledkem je pak rozvrat energetického metabolismu buněk. [96] Cytotoxické vlastnosti naftochinonu lze přičíst inhibici enzymů regulujících replikaci DNA, topoisomeras I a II. Topoisomerasy se vážou k DNA, inhibují replikaci, interagují s proteiny a zasahují do přenosu elektronů na mitochondriální membráně. [96]

Naftochinon i jeho deriváty vykazují inhibiční účinek vůči ChEs. [97,98] Vykazují také protizánětlivé účinky. Kobayashi a kol. prokázali, že 1,4-naftochinon inhibuje sekreci

cytokinů, NO a cyklooxygenasy-2 indukované 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetátem a LPS. Způsobil tak výrazné snížení akutního zánětu. Na myších modelech, kde byl zánět indukovan pomocí LPS, vykazoval potlačení produkce TNF- $\alpha$ . [99] Deriváty naftochinonu dokáží rovněž vázat amyloidový protein a zabraňovat tak tvorbě oligomerů. Jsou tedy efektivním inhibítorem oligomerizace A $\beta$ <sub>42</sub> *in vitro* [100]. Vyznačují se také antibakteriálními, antifungálními, antivirálními, antiparazitickými a antipyretickými účinky. [101] Dokázány byly také významné farmakologické účinky na kardiovaskulární a reprodukční systém. Rostliny s obsahem naftochinonů našly využití v tradičním léčitelství, zejména v léčbě nádorových a parazitárních onemocněních. Kayashima a kol. potvrdili, že 1,4-naftochinon silně inhibuje jak růst buněk lidského karcinomu tlustého střeva, tak i angiogenezi. Tyto výsledky naznačují, že 1,4-naftochinon může být užitečný při léčbě rakoviny. [102]

Úbytek acetylcholinergní transmise, tvorba amyloidních plaků, zánět a oxidační stres sehrávají důležitou roli v rozvoji AD. Z tohoto hlediska by naftochinony, které pozbývají genotoxické vlastnosti, mohly ovlivňovat patogenezi této nemoci na více úrovních a být účinnější než dosavadní léčiva.

## 2 Cíle práce

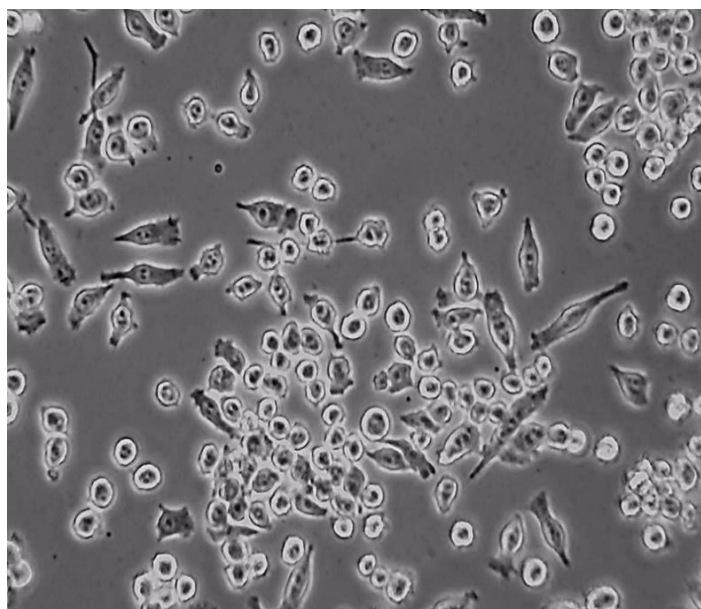
- a) Zhodnocení proliferace buněčné linie SIM-A9 v prostředí bez zánětu a po stimulaci LPS.
- b) Stanovení toxikologických indexů  $IC_{50}$  a maximální tolerované koncentrace (MTC) testovaných látek.
- c) Stanovení viability buněk testovaných látek po stimulaci LPS.
- d) Zhodnocení produkce prozánětlivých cytokinů buněčnou linií SIM-A9 po stimulaci LPS.
- e) Zhodnocení vlivu nově syntetizovaných sloučenin na zánětlivou odpověď.

### 3 Experimentální část

Tato část je věnována *in vitro* metodám, zejména kultivaci buněk a testování toxicity. Dále metodám hodnocení protizánětlivé odpovědi, hodnocení cytotoxicity a protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných látek.

#### 3.1 Buněčná linie

Ke sledování protizánětlivých účinků testovaných látek *in vitro* byla použita mikroglální buněčná linie SIM-A9 (ATCC, Mannassas, Virginia, USA), uvedená na obrázku 16. Tato buněčná linie je izolována postnatálně z kortikální mozkové tkáně myši.



Obrázek 16 Linie SIM-A9, snímek byl pořízen světelným mikroskopem, zvětšení 100 × (Nicon, Tokio, Japonsko)

#### 3.2 Kultivace a pasážování

Buněčná linie byla kultivována v plastových lahvích s plochou 75 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Švýcarsko) v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Binder CB 160, Tuttlingen, Německo) při 37 °C s obsahem 5 % CO<sub>2</sub> a relativní vlhkostí 95 %.

Pro kultivaci bylo použito Dulbecovo modifikované Eaglovo médium se směsí živin F12 (obsahuje kromě nezbytných iontů také glukózu, velké množství aminokyselin, vitamínů a důležitých látek) v poměru 1:1 (DMEM/F12, Biosera, Nuaille, Francie), které bylo dále



suplementováno fetálním bovinním sérem (10 % celkového objemu; Biosera), koňským sérem (5 % celkového objemu; Biosera), kombinací antibiotik streptomycin a penicilin (1 % celkového objemu; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a L-glutaminem (finální koncentrace látky je 2 mM; Sigma-Aldrich).

### **3.2.1 Proces pasážování**

Pasážování je proces, který slouží k přenesení buněčné linie do čerstvého kultivačního média. Proces pasážování byl prováděn při konfluenci 75-85 % v laminárním boxu, který je opatřen HEPA filtrem (EuroClone, Milán, Itálie). Nejdříve bylo odsáto médium z kultivační lahve a přeneseno do centrifugační zkumavky (Techno Plastic Products AG). Dále bylo provedeno mechanické uvolnění buněk pomocí buněčné škrabky (Techno Plastic Products AG). Uvolněné buňky byly přeneseny do stejné centrifugační zkumavky. Následoval oplach kultivační lahve PBS (Sigma Aldrich) a celý obsah byl převeden do zkumavky. Centrifugace (Centrifuga Hettich 320 R, Tuttlingen, Německo) probíhala při 600 otáčkách za minutu po dobu 4 minut při laboratorních podmínkách (20 °C). Po centrifugaci byl odsán supernatant a vzniklá peleta buněk byla resuspendována v 1 ml média a doplněna na celkový objem 14 ml. Následně z této suspenze bylo odpipetováno 50 µl pro počítání buněk pomocí mikrokapilárního průtokového cytometru (Muse™ Cell Analyzer, Merck Millipore, Hayward, Kalifornie, USA). Do kultivační lahve bylo přidáno 25 ml nového média a určitý objem buněčné suspenze.

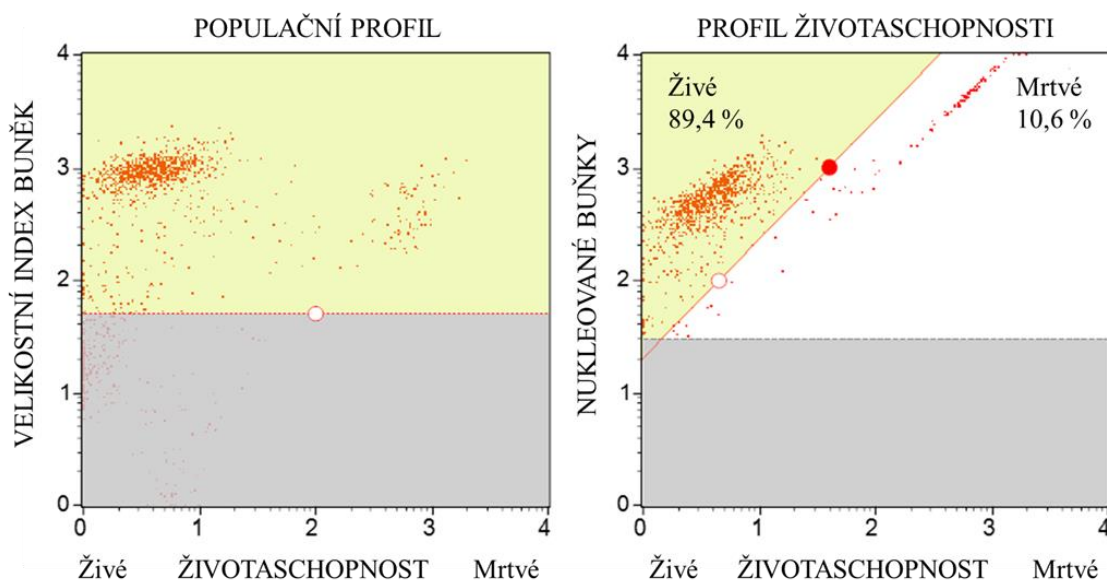
### **3.2.2 Počítání buněk**

Počet buněk byl stanoven pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie využívající mikrokapilární průtokový cytometr The Muse™ Cell analyzer (Merck Millipore). Pomocí této metody je možné zjistit počet životaschopných buněk (vyjádřené jako buňky/ml a v %) a celkový počet buněk (vyjádřené jako buňky/ml).

Reagenční činidlo The Muse™ Count & Viability Reagent (Merck Millipore) je směsí dvou fluorescenčních barviv. První složka je schopná se vázat na DNA v případě poškození integrity buněčné membrány a umožňuje nám tak zjistit životaschopnost buněk. Druhá složka je opět DNA vázající se barvivo, které je schopné proniknout membránou buněk a obarvit tak všechny buňky, které obsahují jádro. To nám umožní diferencovat jaderné a nejaderné buňky

a taktéž úlomky buněk. [103] Pro analýzu bylo smícháno 50  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze a spolu se 100  $\mu\text{l}$  reagenčního činidla, promícháno a 5 minut inkubováno při laboratorní teplotě.

Výstup z mikrokapilárního průtokového cytometru je znázorněn na obrázku 17. Zobrazuje životaschopné buňky uvedené v množství/ml (nebo množství/%) a celkové buňky/ml. Levý doplot ukazuje životaschopnost vztaženou k velikosti buněk. Pravý doplot znázorňuje životaschopnost buněk vztaženou k celkovému počtu jaderných buněk.



Obrázek 17 Buněčná viabilita stanovená pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie, zobrazující celkový počet životaschopných buněk (vyjádřený jako buňky/ml a v %) a celkový počet buněk (vyjádřený jako buňky/ml).

### 3.3 Buněčná proliferace v reálném čase

Ke sledování buněčné proliferace v reálném čase byl použit systém xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA). Tento systém využívá speciální destičku, která obsahuje 96 jamek (E-plate 96; ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA) opatřenými zlatými mikroelektrodami v dolní části každé jamky. Proliferace buněk je sledována jako změna v elektrické impedanci. [104]

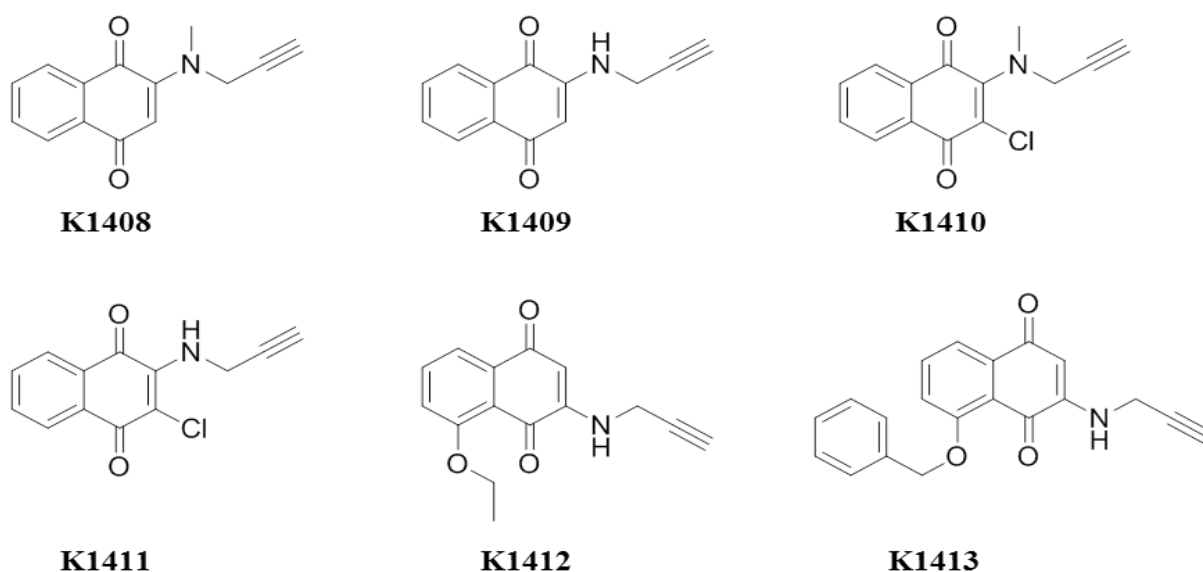
E-destička byla nejprve naplněna 50  $\mu\text{l}$  DMEM/F12 na jamku pro měření pozadí signálu. Pro tuto analýzu byla buněčná linie SIM-A9 dávkována v objemu 100  $\mu\text{l}$  na jamku. Buňky byly nasazeny v různých hustotách v rozmezí od  $2,5 \times 10^3$  –  $30 \times 10^3$  na jamku. Destička byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu 20 minut, aby buňky sedimentovaly. Následně byla

destička připojena k monitorovací jednotce, umístěné v CO<sub>2</sub> inkubátoru a sledována buněčná proliferace při 37 °C po dobu 83 hodin. Elektrický impedanční signál vyjádřený jako bezrozměrná jednotka buněčný index a byl automaticky zaznamenáván každých 60 minut. Experiment byl proveden v hexaplikátě ve dvou nezávislých experimentech a nezávisle v čase. [105]

Současně s touto analýzou proběhlo sledování buněčné proliferace SIM-A9 po stimulaci LPS (*Escherichia Coli*, sérotyp O111:B4, Sigma-Aldrich), který byl dávkován pro finální koncentraci 1 µg/ml. Při tomto experimentu byly buňky nasazeny v hustotách  $5 \times 10^3$ ,  $7,5 \times 10^3$  a  $10 \times 10^3$  na jamku. Tyto experimenty byly provedeny v hexaplikátě ve dvou nezávislých experimentech a nezávisle v čase.

### 3.4 Testované látky

Všechny testované sloučeniny K1408-K1413 jsou uvedeny na obrázku 18.



Obrázek 18 Struktury testovaných látek. Generováno pomocí ChemSketch (ACD/Labs, Toronko, Kanada).

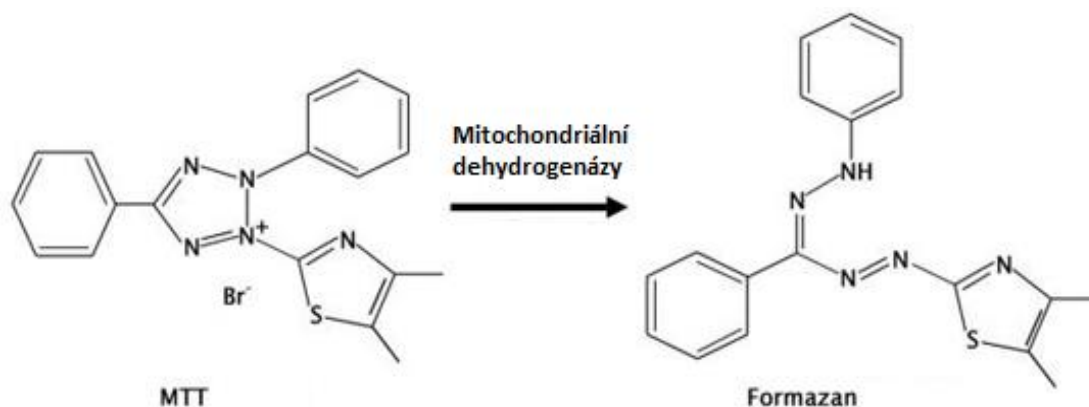
Tyto sloučeniny byly syntetizovány na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové, Česká republika). Čistota testovaných látek byla (> 90 %) ověřena pomocí kapalinové chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Stacionární fázi představoval list hliníku potažený silikagelem 60 F<sub>254</sub> (VWR, Stříbrná Skalice, Česká republika, mobilní fázi tvořil roztok n-butanolu, kyseliny octové (oba od Sigma-Aldrich) a deionizované vody (vyrobené pomocí filtračního zařízení Aqual 25;

Aqual s.r.o., Brno, Česká republika) v poměru 5:1:2. Struktura látek byla verifikována pomocí nukleární magnetické rezonance (Varian Gemini 300, Varian Comp., Palo Alto, Kalifornie, USA)

### 3.5 Stanovení cytotoxicity látek

Ke stanovení cytotoxicity látek byla použita kolorimetrická metoda využívající tetrazoniovou sůl 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromid (MTT; Sigma-Aldrich).

Ve viabilních buňkách dochází k redukcí žlutě zbarveného MTT na nerozpustný formazan fialového zbarvení, obrázek 19 [106] Tato reakce probíhá na mitochondriálních membránách vlivem mitochondriálních dehydrogenas živých buněk.[106]



Obrázek 19 Reakční schéma MTT testu

#### 3.5.1 Příprava mikrotitrační destičky

Do 96jamkové mikrotitrační destičky (Techno Plastic Products AG) bylo přidáno 100  $\mu$ l buněčné suspenze, která byla získána pasážováním. Hustota buněk v jedné jamce byla  $7,5 \times 10^3$  buněk. Destička byla 10 minut ponechána při laboratorní teplotě a následně vložena do inkubátoru na dobu 24 hodin.

### 3.5.2 Ovlivnění buněk

Z testovaných látek byly připraveny zásobní roztoky v dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich), ze kterých byly dále připraveny pracovní roztoky o požadované koncentraci pomocí kultivačního média. Tyto pracovní roztoky byly dále seriově ředěny v poměru 1:1. Takto připravené koncentrační řady byly přidány k buňkám v objemu 100  $\mu$ l na jamku. Každá destička obsahovala řadu pro negativní kontrolu, do které bylo přidáno 100  $\mu$ l kultivačního média. Pozitivní kontrola pak obsahovala dodecylsulfoxid sodný (Sigma-Aldrich). Po napipetování všech řad byla destička vložena do inkubátoru na 24 hodin.

Současně proběhlo kolorimetrické stanovení buněčné viability linie SIM-A9 po stimulaci LPS (finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml), dexametasonem (DMX; finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml) a jejich kombinaci a kombinaci LPS s nově syntetizovanými látkami (ve finálních koncentracích odpovídající MTC a jeho sestupné koncentrační řady).

### 3.5.3 Provedení MTT testu

Životaschopnost buněk byla detekovaná po 24 hodinách inkubace s testovanými sloučeninami. Po 24 hodinách bylo z jamek odsáto médium a nahrazeno 100  $\mu$ l čerstvým médiem obsahujícím MTT. Následně byla provedena inkubace při 37 °C po dobu 45 minut. Médium s MTT bylo následně odsáto a vzniklý formazan rozpuštěn v DMSO. Intenzita zabarvení roztoku je pak přímo úměrná viabilitě buněk. Mikrotitrační destičky byly 5 minut protřepány a změřena absorbance jednotlivých jamek pomocí Multi-Mode Reader Microplate Synergy 2 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) při vlnové délce 570 nm. Každý experiment byl proveden v triplicátu ve třech (stanovení IC50) nebo čtyřech (viability buněk po ovlivnění nově syntetizovanými látkami v prostředí zánětu) nezávislých experimentech a nezávisle v čase.

### 3.6 Analýza buněčné smrti

Pro stanovení buněčné smrti byla použita mikrokapilární průtoková cytometrie (Merck Millipore). Tato metoda umožňuje kvantitativní analýzu neapoptických, včasných apoptických, pozdně apoptických a nekrotických buněk. Test Muse<sup>TM</sup> Annexin V a test mrtvých buněk (Merck Millipore) je založen na detekci fosfatidylserinu na povrchu apoptických buněk. Činidlo také obsahuje membránově nepropustný 7-aminoaktinomycin D, který se používá k odlišení nekrotických buněk od ranných apoptických nebo živých buněk. Měření

buněčné smrti bylo provedeno po 24 hodinách inkubace s LPS (finální koncentrace 1 µg/ml), dexametasonem (DMX; finální koncentrace 1 µg/ml), jejich kombinací a kombinací LPS s nově syntetizovanými látkami (ve finální koncentraci odpovídající MTC). Byly také měřeny buňky inkubované s čistým médiem jako negativní kontrola.

Příprava vzorků byla provedena dle pokynů výrobce. Po inkubaci byly buňky z každé jamky shromážděny do zkumavky (Techno Plastic Products AG) a centrifugovány při 1000 otáčkách/minutu po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po centrifugaci byl odstaněn supernatant a buněčné suspenze byly připraveny přidáním čistého média DMEM/F12. Následně bylo 100 µl buněčné suspenze smícháno se 100 µl reagentie Muse<sup>TM</sup> Annexin V & Dead Cell Assay a vzorky inkubovány 20 minut při laboratorní teplotě a ve tmě. Každý experiment byl proveden v triplikátu ve třech nezávislých experimentech a nezávisle v čase. [107]

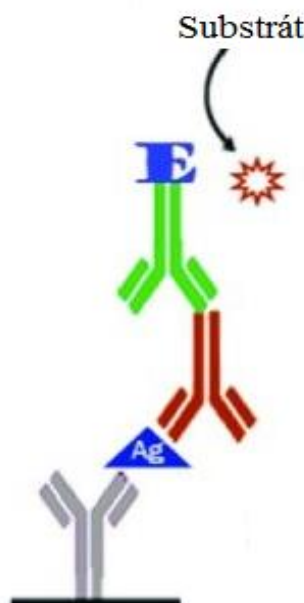
### 3.7 Stanovení cytokinů metodou ELISA

*In vitro* stanovení cytokinů je používáno ke zjištění schopnosti buněčné populace produkovat cytokiny po stimulaci aktivačními stimuly. Jejich produkce rovněž může odrážet aktivitu a progresi zánětlivého onemocnění. V této práci jsme se zaměřili na hodnocení hladin cytokinů IFN-γ, IL-1β, IL-6 a TNF-α.

Enzymová imunoanalýza, obrázek 20 [108] (z ang. *enzyme-linked immuno sorbent assay*; ELISA) využívá sendvičového uspořádání enzymu. Jamky mikrotitrační destičky jsou potaženy monoklonální či polyklonální protilátkou specifickou pro stanovovaný analyt. [109]

Pro stanovení IFN-γ byl použit anti-mouse IFN-γ kit (katalogové číslo 88-8314-88; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), pro změření IL-1β byl použit anti-mouse IL-1β kit (katalogové číslo 88-7013-88; Thermo Fischer Scientific), pro zhodnocení IL-6 byl použit anti-mouse IL-6 kit (katalogové číslo ab47596; Abcam, Cambridge, Velká Británie) a pro stanovení TNF-α byl použit anti-mouse TNF-α kit (katalogové číslo 88-7324-88; Thermo Fischer Scientific). Jamky mikrotitrační destičky (Nunc Maxisorp<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich) byly dle návodu výrobce potaženy přidáním 100 µl primární protilátky specifické pro stanovovaný analyt. Destička byla zalepena nepropustnou fólií a inkubována při 4 °C přes noc. Obsah jamek byl odstraněn a třikrát promyt promývacím pufrem (300 µl na jamku; součást kitů). Destička byla přenesena na savý papír, aby se odstranila všechna přebývajících tekutina. Jamky byly následně zablokovány ředícím pufrem (200 µl; součást kitů) a následně byla destička inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po proběhnuté inkubaci byl pufr

z destičky odstraněn a jednou promyt promývacím pufrem (300  $\mu$ l na jamku). Poté byla destička vysušena a zalepena. Takto připravená destička byla skladována v lednici.



Obrázek 20 Schéma ELISA testu

Následovalo nasazení buněčné linie SIM-A9 v hustotě  $7,5 \times 10^3$  buněk na jamku. Dále byla destička inkubována 24 hodin při 37 °C. Dalším krokem byla příprava koncentračních řad testovaných látek K1408 – K1413 tak, aby finální koncentrace v jamce odpovídala MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. Tyto látky, DMX (finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml) a DMSO (finální koncentrace 0,2 %) byly přidány v objemu 100  $\mu$ l k buňkám a inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Poté bylo přidáno 10  $\mu$ l LPS (finální koncentrace 1  $\mu$ g/ml, vynechány byly pouze negativní kontroly s DMSO a DMX) a inkubováno dalších 23 hodin při 37 °C.

Pro stanovení koncentrace cytokinů bylo použito 100  $\mu$ l supernatantu získaného z jednotlivých jamek kultivačních destiček, které bylo napipetováno do předem připravené ELISA destičky. Rovněž byl přidán standard (100  $\mu$ l; součást kitů) sériově ředěný 1:1 pomocí ředícího pufru pro konstrukci kalibrační křivky. Destička byla zalepena a inkubována při 4 °C přes noc. Obsah destičky byl poté odstraněn a 5krát promyt promývacím pufrem. Následovalo přidání 100  $\mu$ l detekční protilátky konjugované s biotinem (součást kitů) a inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. Následně byl obsah destičky opět odstraněn. Destička byla promyta podobně jako v předchozím kroku a vysušena. Následovalo přidání 100  $\mu$ l křenové peroxidasy konjugované s avidinem (součást kitů) do každé jamky a inkubováno při laboratorní teplotě 30 minut. Po inkubaci byl tento obsah odstraněn, destička promyta 7krát

promývacím pufrem a vysušena. Dále bylo přidáno 100  $\mu$ l substrátu 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinu (součást kitů) a destička inkubována při laboratorní teplotě 15 minut. Nakonec bylo přidáno 50  $\mu$ l tzv. stop pufru (součást kitů) pro zastavení reakce. Měření absorbance proběhlo pomocí Multi-Mode Reader Microplate Synergy 2 při vlnové délce 450 nm. Každý experiment byl proveden v hexaplikátu ve třech nezávislých experimentech a nezávisle v čase.

### 3.8 Statistické zpracování výsledků

Hodnoty  $IC_{50}$  byly vypočteny pomocí čtyřparametrických nelineárních regresí pomocí statistického softwaru (GraphPad Prism 8, San Diego, Kalifornie, USA) z logaritmicke dávkově závislé křivky. Hodnoty  $IC_{50}$  byly vyjádřené jako průměr hodnot z tří nezávislých experimentů  $\pm$  směrodatná odchylka (SD).

MTC byla definována jako nejvyšší koncentrace nevykazující statistickou odlišnost vůči kontrolní skupině pomocí nepárového t-testu (GraphPad Prism 8).

Pro analýzu buněčné smrti, přežívání buněk a ELISA analýzu byla použita metoda mnohonásobného porovnání. Ke zjištění signifikantního rozdílu mezi jednotlivými skupinami jsme použili neparametrickou metodu ANOVA (GraphPad Prism 8), která je základní metodou pro testování hypotéz o středních hodnotách více než dvou skupin. Následně byla *post hoc* použita Fisherova analýza (z ang. Fisher Least Significant Difference [LSD]; GraphPad Prism 8). Rozdíly mezi skupinami byly považovány za signifikantní při statistické hladině významnosti  $p \leq 0,05$ .

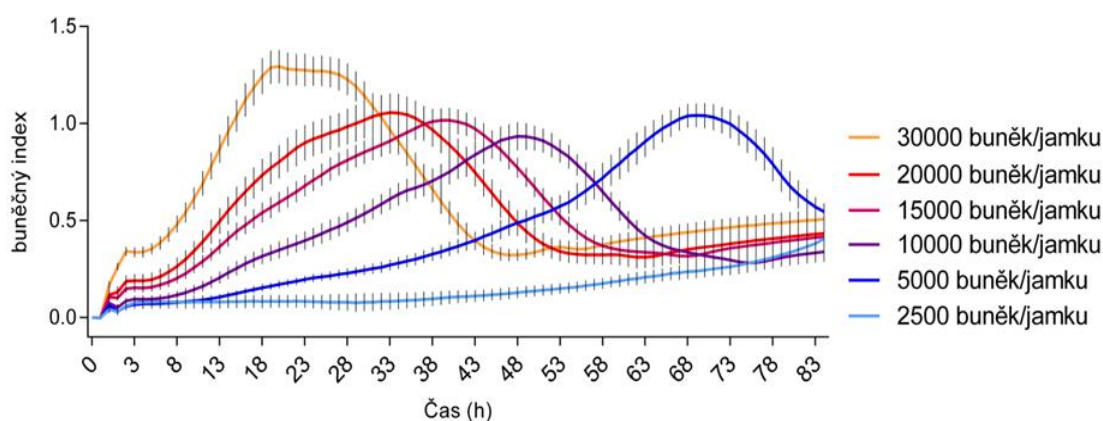


## 4 Výsledky

### 4.1 Proliferace buněk v reálném čase

Záznam proliferace buněčné linie SIM-A9 v reálném čase je uvedený na obrázku 21. Bylo testováno šest různých hustot buněk nasazených do jamek E-destičky. Výsledkem xCELLigence analýzy je křivka, závislá na čase a buněčném indexu. Kontakt buněk se dnem jamky zvyšuje celkovou měrnou impedanci, která je monitorována systémem a přepočítána na buněčný index. Zvýšení buněčného indexu tedy odpovídá nárůstu počtu buněk v jamce. Proliferace buněk SIM-A9 při různých koncentracích byla sledována po dobu 84 hodin.

Impedance v reálném čase byla měřena z důvodu nastavení správné koncentrace buněk na jamku pro další experimenty. Na počátku elektroimpedanční analýzy dochází k mírnému vzestupu impedance, což je způsobeno přisedáním buněk. Dále dochází k adaptaci buněk, což se projeví počátečním lineárním charakterem křivky (klidová fáze). Následuje období proliferace buněk s exponenciálním růstem (exponenciální fáze). V této fázi buňky intenzivně spotřebovávají živiny obsažené v kultivačním mediu. Předposlední fázi charakterizuje zastavení růstu buněk (stacionární fáze). Klesá obsah živin a hromadí se zplodiny metabolismu. Konečnou fází je úbytek buněk (fáze odumírání). Výsledky analýzy ukazují, že se zvyšující se koncentrací buněk se průběh jednotlivých fází urychluje.



Obrázek 21 Růstové křivky buněčné linie SIM-A9.

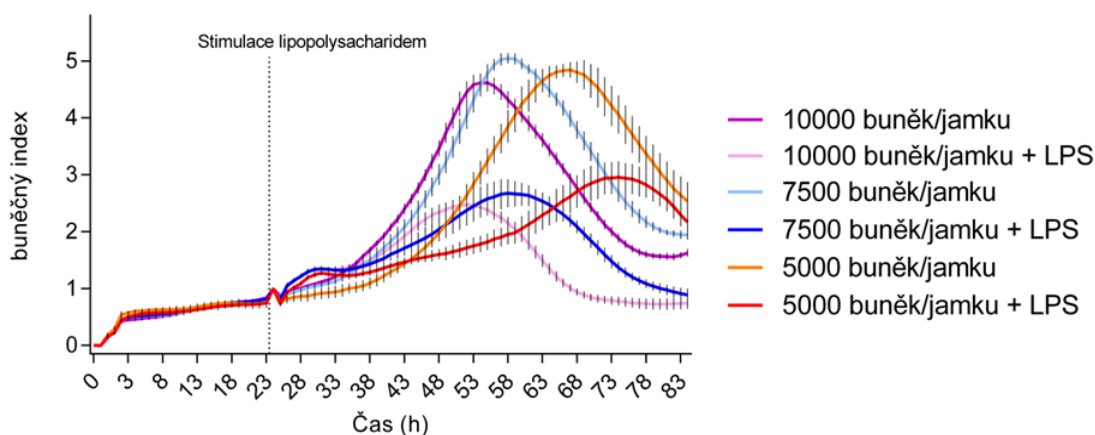
Elektroimpedanční analýza proliferace při různých hustotách buněk na jamku E-destičky. Buněčná viabilita, vyjádřená jako normalizovaný buněčný index, byla zaznamenávána každých 60 minut přístrojem xCELLigence.

Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD vypočítaného z hexaplikátu ( $n = 6$ ).

## 4.2 Proliferace buněk po stimulaci LPS

Pro další experimenty byly vybrány 3 koncentrace buněk SIM-A9 ( $5 \times 10^3$ ,  $7,5 \times 10^3$  a  $10 \times 10^3$  na jamku). Záznam o proliferaci buněčné linie a vlivu LPS v reálném čase je uvedený na obrázku 22. Ke stimulaci buněk pomocí LPS došlo po 23 hodinách inkubace. Skupiny neléčené LPS byly ovlivněny pouze přidáním kultivačního media.

Proliferace buněk po stimulaci LPS se na počátku mírně zvýšila, následovala krátká klidová perioda a poté obnovení exponenciálního růstu. V porovnání s neovlivněnými buňkami byla ale jejich proliferační schopnost asi dvakrát menší.

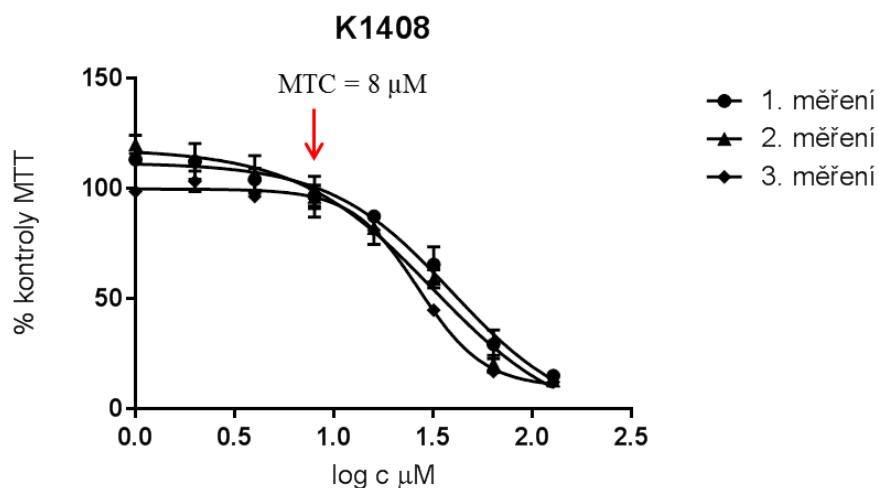


Obrázek 22 Růstové křivky linie SIM-A9 po stimulaci LPS.

Elektroimpedanční analýza proliferace buněk při různých hustotách buněk SIM-A9 na jamku E-destičky. Buněčná viabilita, vyjádřená jako normalizovaný buněčný index, byla zaznamenávána každých 60 minut přístrojem xCELLigence. Po 23 hodinách inkubace došlo k ovlivnění buněk pomocí LPS. Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  SD vypočítaného z hexaplikátu ( $n = 6$ ).

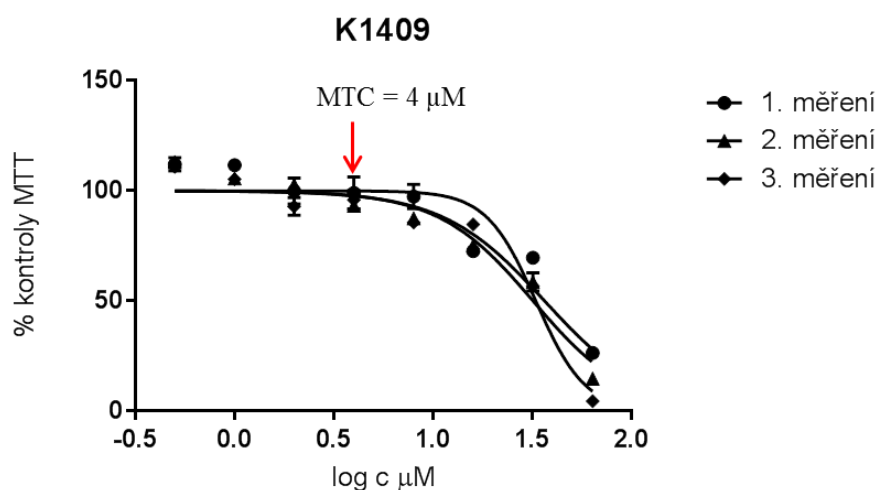
## 4.3 Cytotoxicita látek

Cytotoxicita nově syntetizovaných látek byla hodnocena po 24 hodinách inkubace pomocí MTT testu. Výsledkem analýzy byly dávkově závislé křivky (obrázek 23 – 28). Z těchto křivek byl následně vyjádřen toxikologický index  $IC_{50}$ .



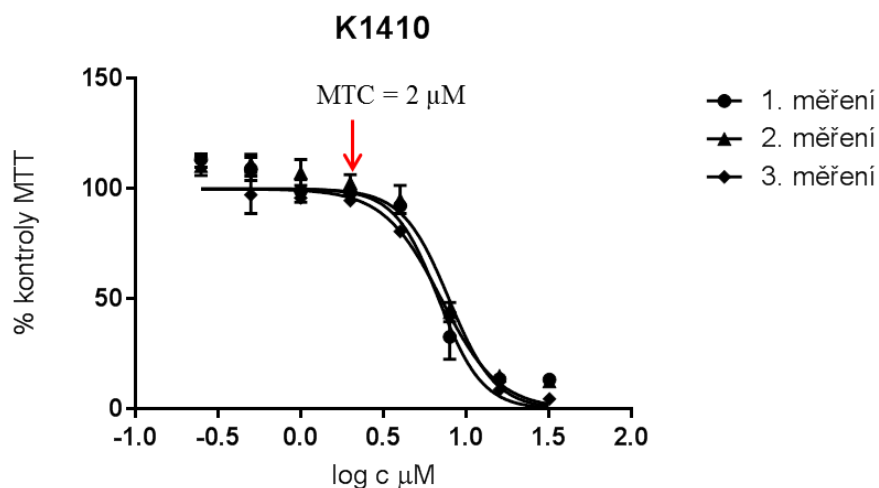
Obrázek 23 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1408.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).



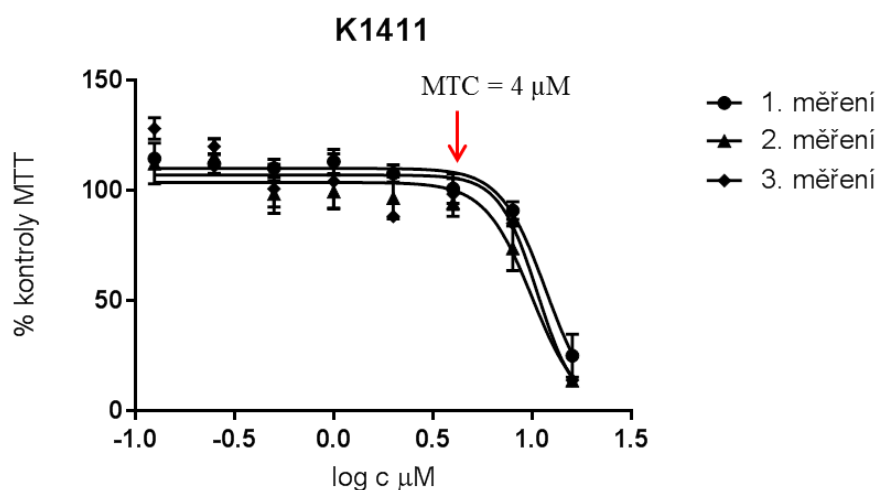
Obrázek 24 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1409.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).



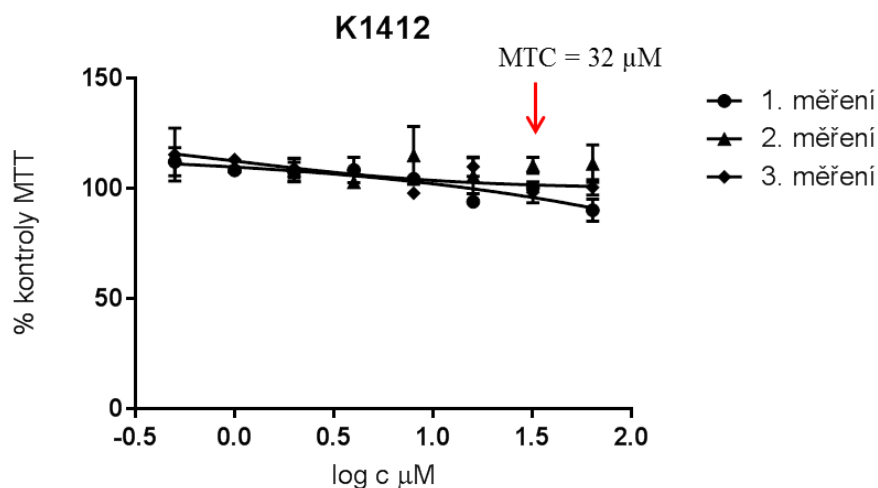
Obrázek 25 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1410.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).



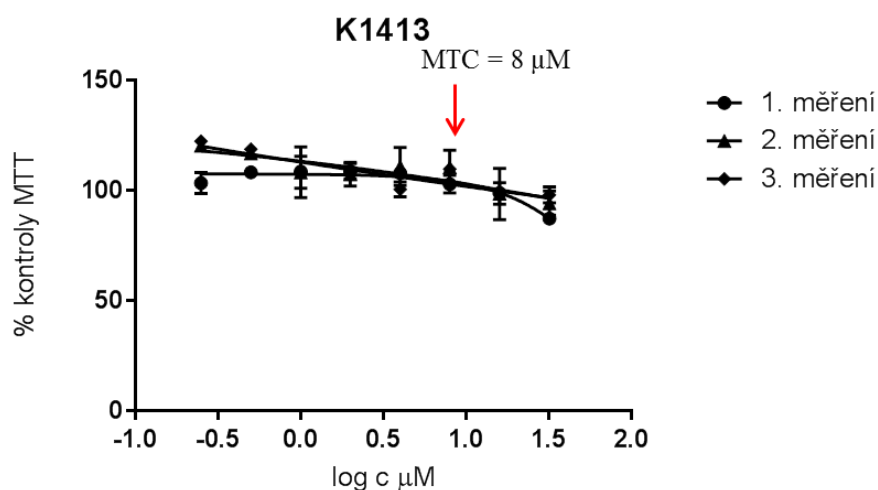
Obrázek 26 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1411.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).



Obrázek 27 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1412.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).



Obrázek 28 Dávkově závislá křivka po ovlivnění SIM-A9 buněk koncentrační řadou látky K1413.

Červená šipka znázorňuje maximální tolerovanou koncentraci (MTC) látky, která nezpůsobila signifikantní pokles viability buněk v porovnání s neovlivněnou kontrolou (nepárový t-test).

Výsledky hodnot  $IC_{50}$  u jednotlivých látek jsou shrnuty v tabulce 2. Z výše uvedených dat  $IC_{50}$  lze konstatovat, že nejvíce toxickou látkou je K1410 ( $IC_{50} = 7,3 \mu\text{M}$ ). Dále  $IC_{50}$  vzrůstala vůči K1410 v následujícím pořadí K1411 < K1409 < K1408. Tyto látky jsou 1,4-, 4,8- a 5,0krát méně toxické než derivát K1410. Nejméně toxickou látku nelze přesně určit.

Jedná se o látky K1413 ( $IC_{50} > 32 \mu\text{M}$ ) a K1412 ( $IC_{50} > 64 \mu\text{M}$ ), u kterých stanovit tento toxikologický index nebylo možné z důvodu nízké rozpustnosti.

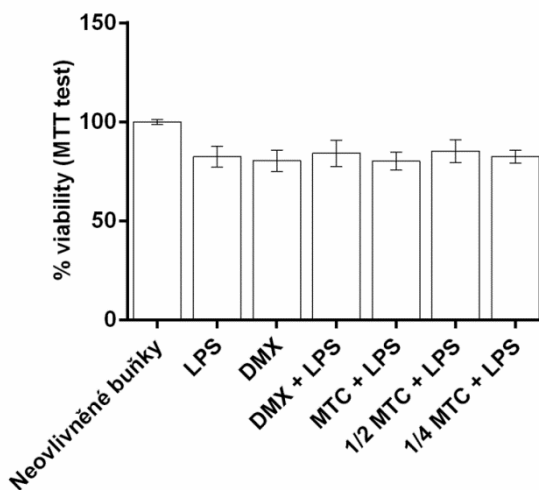
Tabulka 2 Výsledná cytotoxicita testovaných látek stanovená po 24 hodinách inkubace od ovlivnění buněk pomocí MTT testu.

látka	$IC_{50} \pm SD (\mu\text{M})$	MTC ( $\mu\text{M}$ )
K1408	$36,05 \pm 2,28$	8
K1409	$34,59 \pm 2,33$	4
K1410	$7,28 \pm 0,56$	2
K1411	$10,37 \pm 0,58$	4
K1412	> 64	32
K1413	> 32	8

Cytotoxicita látek je vyjádřena jako toxikologický index  $IC_{50}$  získaný jako průměr  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů provedených v triplicátě ( $n = 3$ ). Hodnota MTC reprezentuje nejvyšší koncentraci testované látky, při které nebyl nalezen signifikantní rozdíl ve srovnání s kontrolní skupinou (nepárový t-test).

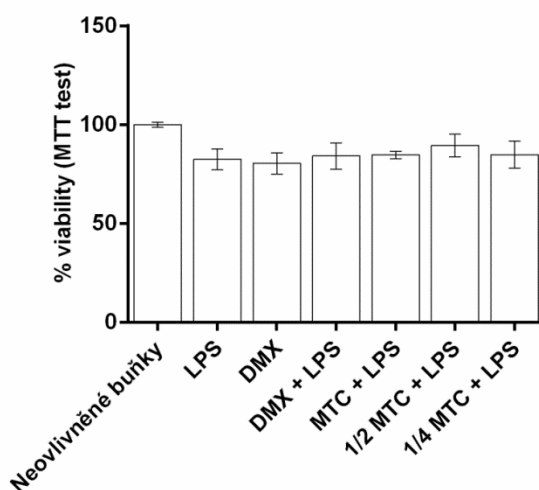
#### 4.4 Viability buněk po ovlivnění nově syntetizovanými látkami v prostředí zánětu

Následně byla stanovena viabilita SIM-A9 buněčné linie v přítomnosti nově syntetizovaných sloučenin v koncentracích odpovídajících jejich MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC a LPS pomocí MTT testu. Souběžně byl hodnocen efekt DMX podaného samostatně nebo v kombinaci s LPS. Jako kontrolu jsme použily čisté buňky v médiu. Životaschopnost byla detekována po 24 hodinách. Výsledky analýzy jsou znázorněny na obrázcích 29 – 34. Byl pozorován pouze jediný signifikantní výsledek. Ve srovnání se skupinou stimulovanou pouze LPS vedla látka K1411 v koncentraci odpovídající  $\frac{1}{2}$  MTC k mírnému 1,1násobnému zvýšení viability ( $p = 0,034$ ).



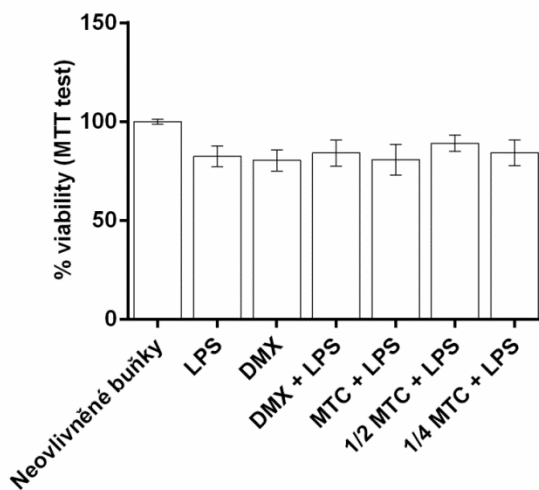
Obrázek 29 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1408 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1408. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.



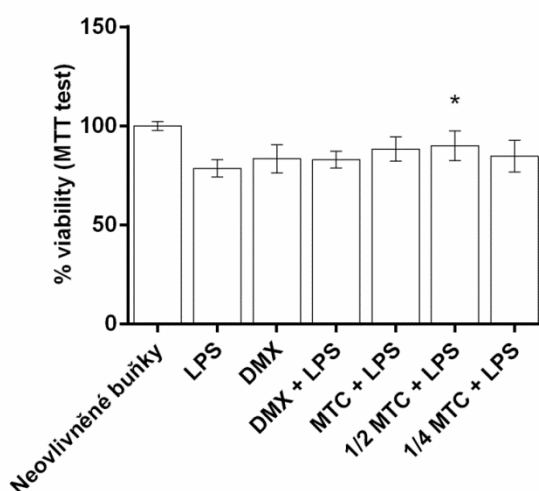
Obrázek 30 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1409 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1409. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.



Obrázek 31 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1410 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC.

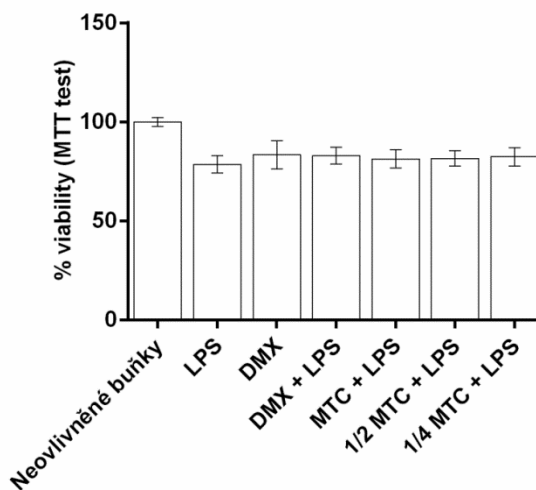
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1410. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.



Obrázek 32 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1411 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC.

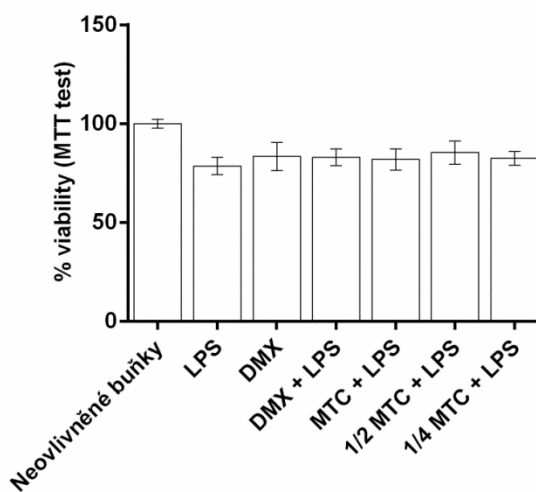
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1411. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl proti buňkám ovlivněných LPS ( $p \leq 0,05$ ).





Obrázek 33 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1412 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1412. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.



Obrázek 34 Viabilita buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanou látkou K1413 v koncentracích odpovídajících jejich MTC, ½ MTC a ¼ MTC.

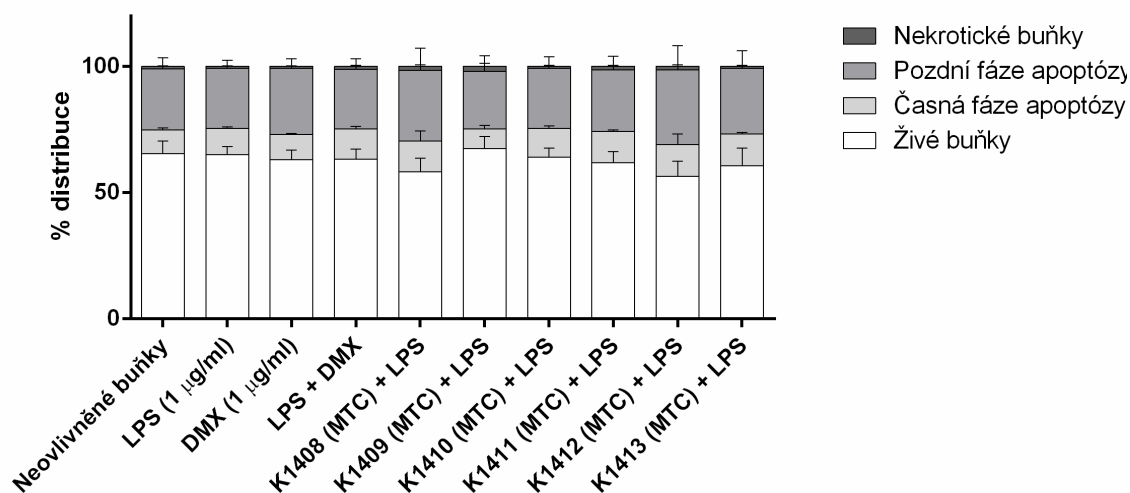
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1413. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.

## 4.5 Buněčná smrt

Pro ověření bezpečnosti podání látek v koncentracích odpovídajících MTC byla provedena analýza buněčné smrti pomocí mikrokapilárního průtokového cytometru po inkubaci trvajících

24 hodin s testovanými látkami a LPS. Paralelně byl stanoven efekt DMX podaného samostatně nebo v kombinaci s LPS. Kontrolou byly čisté buňky v médiu.

Výsledná data jsou uvedena na obrázku 35. Výsledky analýzy nenalezly ve srovnání s kontrolní skupinou nebo buňkami ovlivněnými LPS signifikantní rozdíly.



Obrázek 35 Apoptóza a nekróza buněčné linie SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX, jejich kombinace a kombinace LPS s testovanými látkami v koncentraci odpovídající jejich MTC.

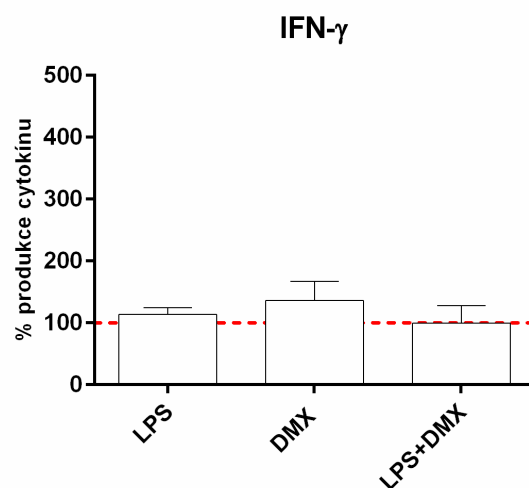
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX a látkou K1413. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS.

#### 4.6 Výběr cytokinů pro testování protizánětlivé odpovědi

K testování protizánětlivých účinků *in vitro* na buněčné linii SIM-A9 byla použita enzymová imunoanalýza v sendvičovém uspořádání. Mezi testovanými cytokiny byly IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ . Hodnoty IL-1 $\beta$  se nacházely pod úrovní detekce ELISA kitu, proto nebylo možné jeho koncentrace stanovit. Při sledování změny hladiny IFN- $\gamma$  nebyl mezi jednotlivými skupinami nalezen signifikantní rozdíl, obrázek 36.

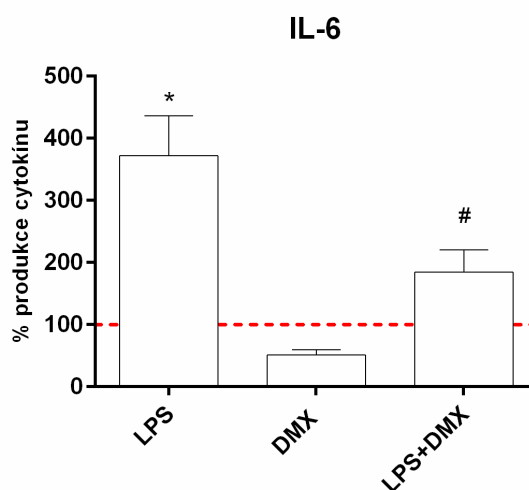
Po stimulaci LPS se produkce IL-6 signifikantně zvýšila 1,7krát oproti kontrolní skupině ovlivněné DMSO ( $p < 0,001$ ). DMX snížil hladinu testovaného cytokinu 1,8 násobně v porovnání s produkcí IL-6 u buněk stimulovaných LPS ( $p = 0,003$ ; obrázek 37).

Aplikace LPS signifikantně zvýšila produkci TNF- $\alpha$  1,4krát oproti kontrolní skupině ( $p < 0,001$ ). DMX dokázal snížit hladinu testovaného cytokinu 1,4násobně v porovnání s produkcí TNF- $\alpha$  u buněk stimulovaných LPS ( $p = 0,010$ ; obrázek 38).



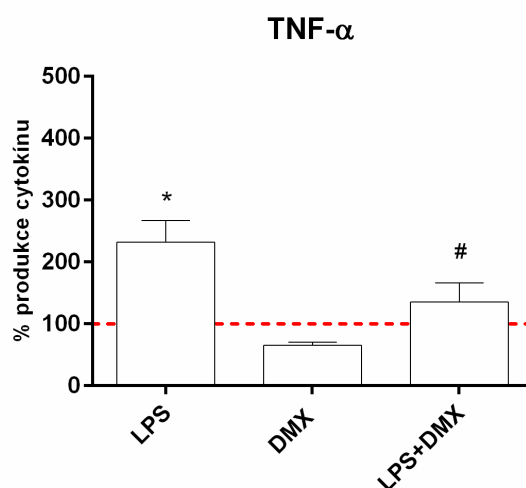
Obrázek 36 Produkce IFN- $\gamma$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.

DMX byl podán 1 hodinu před aplikací LPS. Test byl hodnocen 23hodinovým intervalem po ovlivnění LPS. Procenta znázorňují produkci cytokinu v porovnání s kontrolou, která byla ovlivněna DMSO a vztažena k 100 % (červeně značená přímkou).



Obrázek 37 Produkce IL-6 buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.

DMX byl podán 1 hodinu před aplikací LPS. Test byl hodnocen 23hodinovým intervalem po ovlivnění LPS. Procenta znázorňují produkci cytokinu v porovnání s kontrolou, která byla ovlivněna DMSO a vztažena k 100 % (červeně značená přímkou). A symbol \*vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).



Obrázek 38 Produkce TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění LPS, DMX a jejich kombinací.

DMX byl podán 1 hodinu před aplikací LPS. Test byl hodnocen 23hodinovým intervalem po ovlivnění LPS. Procenta znázorňují produkci cytokinu v porovnání s kontrolou, která byla ovlivněna DMSO a vztažena k 100 % (červeně značená přímka). Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.7 Produkce cytokinů linií SIM-A9 po stimulaci testovanými látkami

Pomocí ELISA metody v sendvičovém uspořádání byla dále testována produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  linií SIM-A9 po ovlivnění nově syntetizovanými látkami K1408 – K1413 nebo DMX po dobu 1 hodiny a následné aplikaci LPS. Koncentrace cytokinů byla stanovena v 23hodinovém intervalu po podání LPS.

Dvojice sloučenin K1408 a K1409, K1410 a K1411, K1412 a K1413 byly vždy měřeny na jedné ELISA destičce, účinek DMX na produkci IL-6 a TNF- $\alpha$  jsou proto uvedeny pouze u první látky v rámci těchto dvojic.

V porovnání s buňkami ovlivněnými LPS zvyšovala látka K1408 v koncentraci odpovídající  $\frac{1}{4}$  MTC 1,2násobně produkci cytokinu IL-6 ( $p = 0,003$ ). DMX v tomto experimentu produkci IL-6 stimulovanou LPS tlumil (2,0krát,  $p < 0,001$ ). Ve srovnání s touto skupinou byly nicméně koncentrace tohoto cytokinu ve skupinách léčených K1408 při MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC signifikantně 2,0- ( $p < 0,001$ ), 2,2- ( $p < 0,001$ ) a 2,5násobně ( $p < 0,001$ ) vyšší. V případě TNF- $\alpha$  nevykazovala sloučenina K1408 ve srovnání s LPS léčenou skupinou statisticky významný rozdíl. Snížení tvorby TNF- $\alpha$  stimulované LPS bylo pozorováno, pouze pokud byl použit DMX (2,3krát,  $p = 0,008$ ). V porovnání s touto skupinou byly koncentrace

TNF- $\alpha$  ve skupinách léčených K1408 v koncentracích odpovídající MTC, MTC $\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{4}$  MTC signifikantně vyšší 2,1- ( $p = 0,006$ ), 2,1- ( $p = 0,006$ ), resp. 2,5krát ( $p = 0,004$ ).

Po ovlivnění látkou K1409 došlo, v porovnání s buňkami ovlivněnými pouze LPS, k zvýšení produkce IL-6, a to 1,6krát ( $p = 0,0001$ ) při MTC, 1,7krát ( $p < 0,0001$ ) při  $\frac{1}{2}$  MTC a 2,0krát ( $p < 0,0001$ ) při  $\frac{1}{4}$  MTC. V porovnání se skupinou léčenou DMX byly tyto hodnoty 3,3-, 3,5-, resp. 3,9krát vyšší (všechna  $p < 0,001$ ). V případě TNF- $\alpha$  jsme pozorovali signifikantní zvýšení produkce TNF- $\alpha$  při koncentraci pouze při koncentraci odpovídající MTC, a to 1,1násobně ( $p = 0,016$ ). Srovnání s kombinací DMX a LPS ukázalo statisticky vyšší hodnoty ve všech skupinách léčených látkou K1409, a to 2,6krát ( $p = 0,001$ ) při MTC, 2,4krát ( $p < 0,001$ ) při  $\frac{1}{2}$  MTC a 2,3krát ( $p = 0,002$ ) při  $\frac{1}{4}$  MTC.

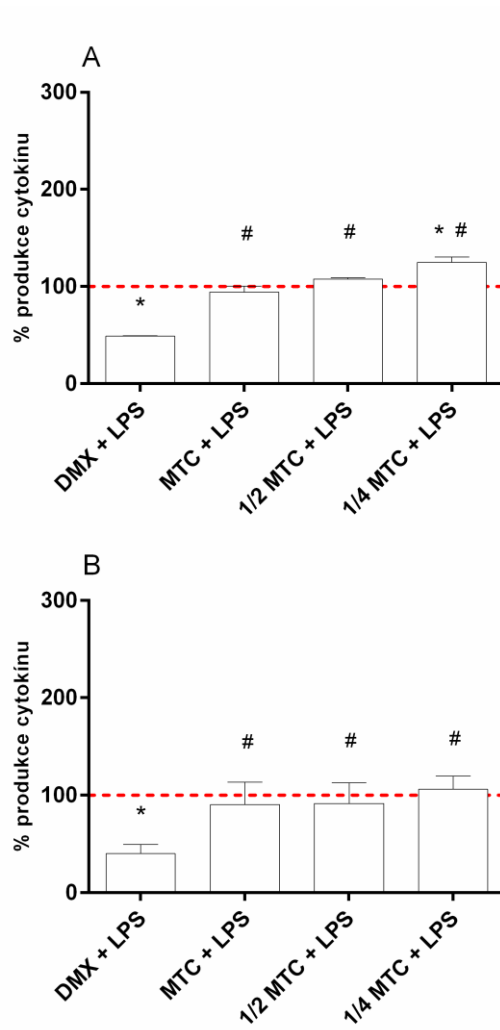
V porovnání s buňkami ovlivněnými pouze LPS zvyšovala látka K1410 koncentraci IL-6 ve skupinách ovlivněných MTC (1,4krát,  $p = 0,002$ ) a  $\frac{1}{2}$  MTC (1,5 krát,  $p = 0,002$ ). DMX v rámci tomto experimentu produkci IL-6 navozenou LPS tlumil (1,9krát,  $p < 0,001$ ). Ve srovnání s touto skupinou byly naměřené koncentrace tohoto cytokiny ve skupinách léčených sloučeninou K1408 při MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC signifikantně vyšší 2,7-, 2,8- a 2,5násobně (všechna  $p < 0,001$ ). V případě TNF- $\alpha$  signifikantní vliv na jeho produkci zaznamenán nebyl. Snížení tvorby TNF- $\alpha$  stimulované LPS bylo pozorováno, pouze když byl aplikován DMX (2,7krát,  $p = 0,002$ ). V porovnání s kombinací DMX a LPS byly ve skupinách ovlivněných K1410 při MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC signifikantně 3,15-, 3,1- a 2,8násobně vyšší koncentrace TNF- $\alpha$  (všechna  $p < 0,001$ ).

Látka K1411 zvyšovala produkci stimulovanou LPS ve všech skupinách, a to 1,4krát ( $p = 0,048$ ) při MTC, 1,4krát ( $p = 0,032$ ) při  $\frac{1}{2}$  MTC a 1,5krát ( $p < 0,001$ ) při  $\frac{1}{4}$  MTC. V porovnání se skupinou léčenou DMX byly tyto hodnoty 2,5-, 2,6-, resp. 2,8násobně vyšší (všechna  $p < 0,0001$ ). U druhého cytokinu byl ve srovnání s pozitivní kontrolou pozorován signifikantní nárůst pouze při koncentraci odpovídající odpovídající MTC, a to 1,5krát ( $p = 0,019$ ). Pokud bychom výsledky porovnali s buňkami ovlivněnými kombinací DMX a LPS byly nalezeny statisticky významné změny ve všech skupinách. Při MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC byla produkce TNF- $\alpha$  zvýšena 4,0-, 3,6- a 3,5násobně (všechna  $p < 0,001$ ).

V porovnání s buňkami ovlivněnými pouze LPS zvyšovala látka K1412 signifikantně produkci IL-6 ve skupinách ovlivněných MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC 1,2krát ( $p = 0,016$ ), 1,6krát ( $p = 0,003$ ) a 1,7krát ( $p = 0,04$ ). Aplikace DMX u tomto experimentu produkci IL-6 navozenou LPS tlumila (2,1násobně,  $p < 0,001$ ). Ve srovnání s buňkami ovlivněnými

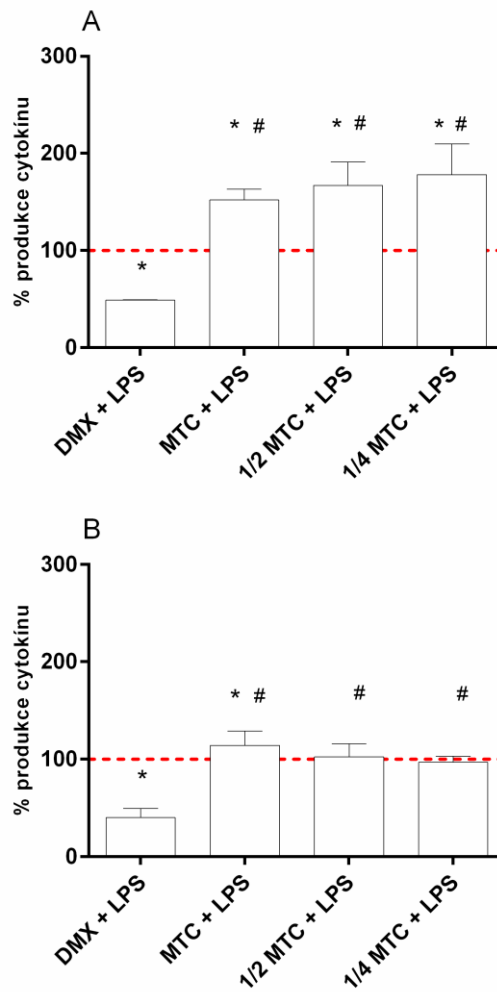
kombinací DMX a LPS byly tyto hodnoty 2,6násobně ( $p = 0,003$ ), 3,4násobě ( $p < 0,001$ ) a 3,6násobně ( $p = 0,003$ ) vyšší. V případě TNF- $\alpha$  byl signifikantní vliv na jeho produkci zaznamenán pouze u skupiny ovlivněné látkou K1412 v koncentraci odpovídající  $\frac{1}{4}$  MTC (1,3krát,  $p = 0,034$ ). Statisticky významné snížení tvorby TNF- $\alpha$  stimulované LPS bylo pozorováno pouze po aplikaci DMX (1,8násobně,  $p < 0,001$ ). V porovnání s touto skupinou byly ve skupinách ovlivněných K1410 při MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC hodnoty koncentrace signifikantně TNF- $\alpha$  1,3krát ( $p = 0,012$ ), 1,9krát ( $p < 0,001$ ) a 2,3krát ( $p < 0,0001$ ) zvýšené.

Poslední testovanou byla látka K1413. Jako jediná vykazovala potenciální protizánětlivý účinek, neboť byla schopna ve srovnání s buňkami ovlivněnými pouze LPS signifikantně snížit koncentraci IL-6 v koncentraci odpovídající MTC a  $\frac{1}{2}$  MTC, a to 1,6- ( $p < 0,001$ ) a 1,3krát ( $p = 0,040$ ). V porovnání se skupinou buněk, které byly ovlivněny kombinací DMX a LPS nebyl při MTC statisticky významný rozdíl zaznamenán. Tento rozdíl byl pouze při srovnání se skupinami léčenými K1413 v koncentracích odpovídajících  $\frac{1}{2}$  MTC (1,1krát,  $p = 0,007$ ), a  $\frac{1}{4}$  MTC (1,4krát,  $p < 0,0001$ ). V případě TNF- $\alpha$  bylo v porovnání s pozitivní kontrolou pozorováno signifikantní snížení produkce tohoto cytokinu jen při MTC (2,1krát,  $p < 0,0001$ ). V této skupině nebyl rovněž pozorován statisticky významný rozdíl ve srovnání s kombinací DMX a LPS. Ten byl naopak zaznamenán ve skupinách ovlivněných  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC, ve kterých byly koncentrace TNF- $\alpha$  shodně 1,5krát ( $p = 0,023$ , repektive 0,018) vyšší.



Obrázek 39 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1408 v koncentraci odpovídající její MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC.

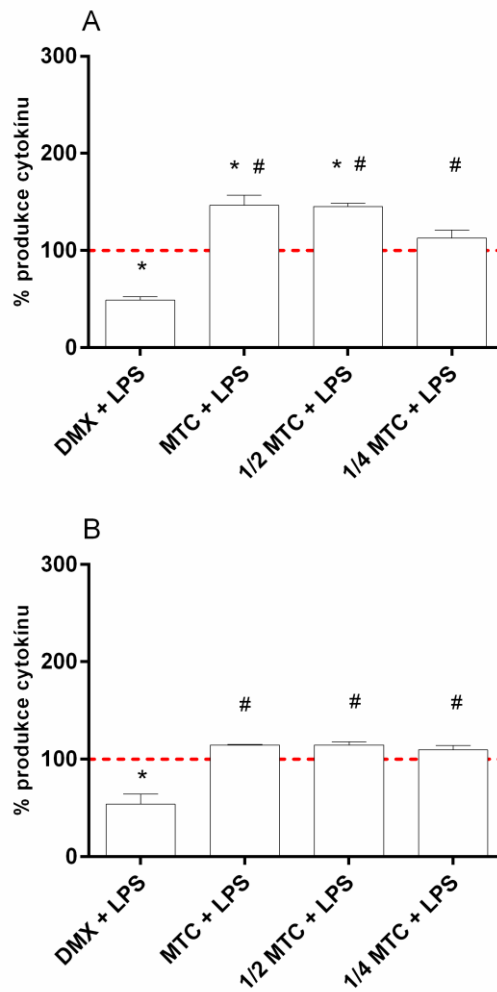
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1408. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).



Obrázek 40 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1409 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC.

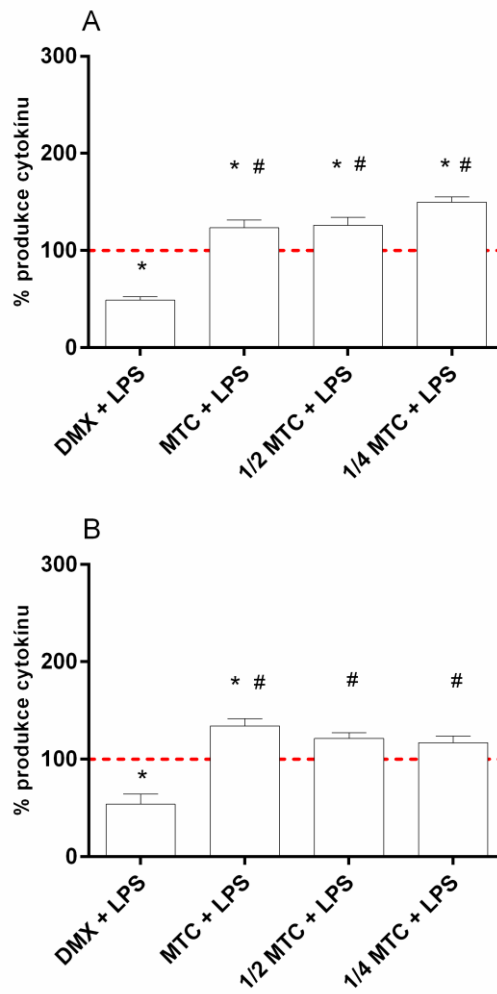
LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1409. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).





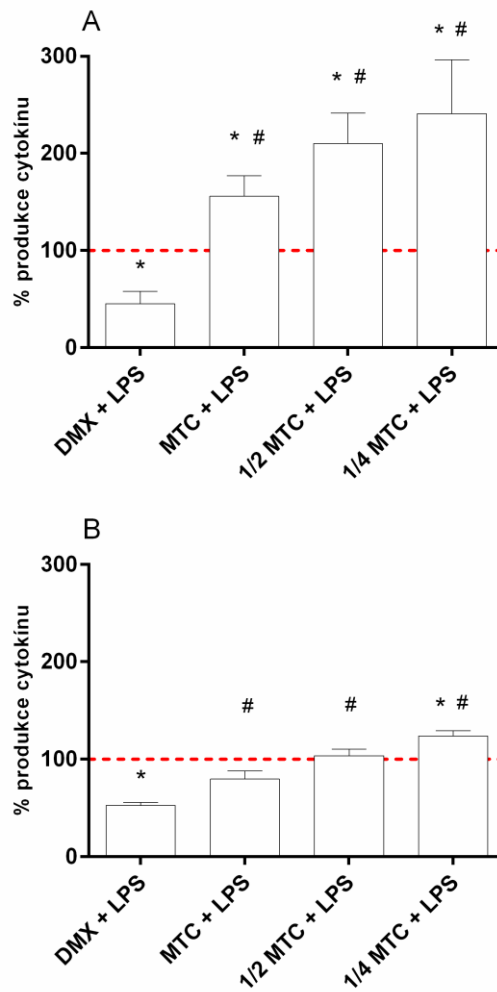
Obrázek 41 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1410 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1410. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).



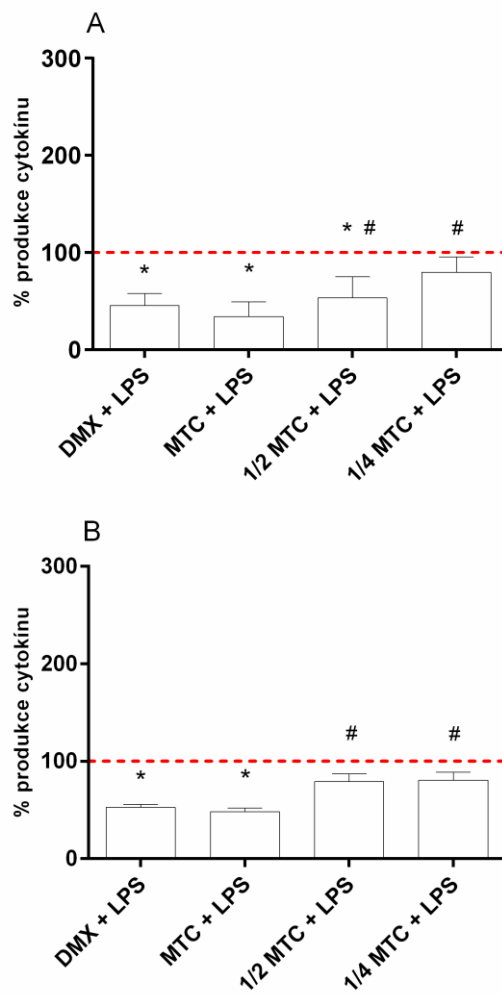
Obrázek 42 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1411 v koncentraci odpovídající její MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1411. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).



Obrázek 43 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1412 v koncentraci odpovídající její MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1412. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).



Obrázek 44 Produkce cytokinů IL-6 a TNF- $\alpha$  buněčnou linií SIM-A9 po ovlivnění DMX nebo látkou K1413 v koncentraci odpovídající její MTC, 1/2 MTC a 1/4 MTC.

LPS byl aplikován 1 hodinu po ovlivnění buněk DMX nebo látkou K1413. Viabilita byla stanovena pomocí MTT testu 23 hodin po přidání LPS. Symbol \* vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou ( $p \leq 0,05$ ). Znak # vyjadřuje statisticky významný rozdíl v porovnání s LPS ( $p \leq 0,05$ ).

## 5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zhodnocení protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných modulátorů ChEs *in vitro*. Ústřední strukturou testovaných látek byl naftochinon. Jedná se o organickou sloučeninu odvozenou od naftalenu se dvěma oxo skupinami navázanými na naftalenový kruh. Naftochinon i jeho deriváty vykazují inhibiční účinek vůči ChEs. [110, 97, 98] Na druhou stranu například 1,2-naftochinon je rovněž efektivním inhibitorem oligomerizace A $\beta$ <sub>42</sub> *in vitro* [111]. Tyto oligomery jsou schopné narušit normální funkce neurálních buněk a působit neurotoxicky [112]. Deriváty naftochinonů jsou navíc zkoumány pro své protizánětlivé a antioxidační účinky [113]. Úbytek acetylcholinergní neurotransmise, tvorba amyloidních plaků, zánět i oxidační stres sehrávají významnou roli v rozvoji AD [114]. Z tohoto hlediska by naftochinony mohly ovlivnit patogenezi této nemoci na více úrovních a účinněji mírnit její průběh. Uplatnění by rovněž mohly nalézt u jiných chorob, jež jsou spojeny s poklesem cholinergní transmise a zánětlivým procesem.

Pro testování protizánětlivých účinků nově syntetizovaných látek byla vybrána buněčná linie SIM-A9. Jedná se o spontánně imortalizované mikrogliaální buňky odvozené z kortikálních tkání mozku myši získaných postnatálně. Mikroglie jsou imunitními buňkami nervového systému, které nepřetržitě prozkoumávají své místní prostředí. Aktivují se v abnormálních či nepříznivých podmínkách a zahajují zánětlivý proces. Využití primárních mikrogliaálních linií pro laboratorní účely nicméně vyžaduje dlouhý a náročný proces preparace. [115] Buňky SIM-A9 tyto nevýhody překračují. Představují rovněž vhodný *in vitro* model pro přímou aplikaci exogenních stimulačních nebo inhibičních látek. Například po expozici A $\beta$  nebo LPS sekretují cytokiny, zejména IL-6 a TNF- $\alpha$ . [116] Lze také hodnotit děje jako jsou migrace, proliferace či jejich fagocytická aktivita. Výhodou je rovněž jejich kontinuální proliferační schopnost. [117]

Důležitým krokem v toxikologických analýzách je určení proliferační schopnosti dané buněčné linie. K nastavení modelu *in vitro* pro další experimenty byla aplikována elektroimpedanční metoda xCELLigence umožňující sledování proliferace buněk v reálném čase [118]. Buňky SIM-A9 byly nasazeny v různých hustotách v rozsahu 2,5 – 30 × 10<sup>3</sup> na jamku a analyzovány po dobu 84 hodin. Vzhledem k designu dalšímu experimentů je nutné pro produkci zánětlivých ukazatelů zvolit co možná nejvyšší koncentraci buněk. V průběhu 48 h by se však buněčná populace měla nacházet v exponenciální fázi růstové křivky, neboť přechod buněk do stacionárního stavu nebo fáze odumírání by mohl s produkcí

cytokinů interferovat. Tento požadavek splňovaly pouze koncentrace  $< 10 \times 10^3$  buněk na jamku.

Dále bylo nutné stanovit, do jaké míry aplikace LPS ovlivňuje průběh růstové křivky. Na základě předchozích výsledků byly zvoleny koncentrace  $5 \times 10^3$ ,  $7,5 \times 10^3$  a  $10 \times 10^3$  buněk na jamku. Dle dostupné literatury je LPS schopný indukovat zánětlivou odpověď u buněčné linie SIM-A9 v koncentračním rozsahu 0,1 – 2,5  $\mu\text{g/ml}$  [119,120]. Pro další experimenty jsme proto zvolili koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . LPS byl podán v intervalu 23 h po nasazení buněk. Pro další experimenty jsme proto zvolili koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ . LPS byl podán v intervalu 23 h po nasazení buněk. Z analýzy vyplývá, že po stimulaci tímto endotoxinem dochází k inhibici růstu buněčné kultury. Ačkoliv LPS stimulací receptorů na povrchu buněk imunitního systému může vést k produkci nadměrného množství ROS a RNS, jejichž důsledkem může být lýza buňky [121,122], následující experimenty měřící apoptózu a nekrózu buněk SIM-A9 po podání LPS neprokázaly, že by zde byl vztah s těmito buněčnými ději. Nair a kol. na druhou stranu sledovali vliv LPS na metabolickou aktivitu primárních neuroglií. Jejich experimenty demonstrovaly, že stimulací Toll-like receptorů (TLR) dochází k fragmentaci mitochondrií, zvýšení produkce ROS a k metabolickému přeprogramování buněk z oxidativní fosforylace ke glykolýze [123]. Zdá se tedy, že by LPS podobným způsobem mohl ovlivňovat metabolickou aktivitu buněk SIM-A9 a snižovat tak jejich proliferaci. U buněk kultivovaných v koncentraci  $10 \times 10^3$  na jamku bylo navíc možné v přítomnosti LPS pozorovat mírný pokles růstové křivky v intervalu 46 až 48 hodin. Pro další experimenty byla proto zvolena koncentrace  $7,5 \times 10^3$  buněk na jamku.

Při této koncentraci buněk byla nejprve testována cytotoxicita nově syntetizovaných látek K1408 – K1413. Ta byla vyjádřena prostřednictvím toxikologického indexu  $\text{IC}_{50}$  po 24 hodinách od ovlivnění. Nejvíce toxické se jevily látky K1410 a K1411. Obě sloučeniny se oproti látkám K1408 a K1409 liší přítomností atomu chloru navázaného v pozici 2 na molekule 1,4-naftochinonu. Tato modifikace se z hlediska cytotoxicity jeví proto jako nejméně perspektivní. Naopak přidání ethoxy- a benzyloxyskupiny na pozici 8 dochází k významnému ovlivnění rozpustnosti látek a cytotoxicita K1412 a K1413 nemohla být přesně zhodnocena. Pro další experimenty je ale nutné pracovat s koncentracemi, jež viabilitu buněk neovlivňují. Byla proto u jednotlivých látek stanovena maximální koncentrace, která nezpůsobuje signifikantní změny životaschopnosti buněk stanovené MTT testem vůči neovlivněné kontrole (MTC). MTC byla stanovena u všech nově syntetizovaných derivátů naftochinonů.

Vzhledem k charakteru MTC (jedná se o koncentraci na hranici cytotoxicity) a hypotetické možnosti změny účinků látek v zánětlivém prostředí byla následně hodnocena viabilita SIM-A9 buněčné linie v přítomnosti nově syntetizovaných sloučenin a LPS. K testování byl nejprve použit MTT test. Buňky SIM-A9 byly nejprve vystaveny látkám K1408 – K1413 v koncentracích odpovídajících jejich MTC,  $\frac{1}{2}$  MTC a  $\frac{1}{4}$  MTC. V intervalu 1 hodiny byl přidán LPS a v 24hodiovém intervalu byl test zhodnocen. Výsledky analýzy potvrdily, že žádná z látek účinek LPS dále neovlivňuje s jedinou výjimkou. Podání K1411 v koncentraci odpovídající  $\frac{1}{2}$  MTC vedlo k mírnému, ale signifikantnímu zvýšení hodnot MTT testu. Tento test představuje kolorimetrickou metodu založenou na přeměně žluté tetrazoliové soli na fialový formazan. K tomu dochází pouze v živých, metabolicky aktivních buňkách. Pokud naopak dojde k poškození energetického metabolismu, konverze MTT na formazan klesá nebo není možná. Jedná se především o aktivitu redukcujících enzymů, které se podílejí na vzniku formazanu, jako jsou např. mitochondriální dehydrogenasy. [124] S ohledem na vliv LPS na energetický metabolismus mikroglií je proto možné, že výsledek testu v tomto případě spíše odráží pouze vlastní alteraci metabolismu než ztrátu životaschopnost buněk, přičemž látka K1411 v koncentraci  $\frac{1}{2}$  MTC je schopna tento účinek ovlivnit. Kvůli poměrně hraničním změnám by však bylo vhodné tuto hypotézu potvrdit dalšími testy, jako je např. měření mitochondriálního potenciálu. [125]

Vzhledem k limitům MTT testu v případě LPS bylo nutné bezpečnost MTC nově syntetizovaných látek ověřit další metodou. Vybrána byla mikrokapilární průtoková cytometrie zaměřená na detekci časně a pozdně apoptotických a nekrotických buněk pomocí Annexinu V a 7-aminoaktinomycin D. Annexin V váže fosfatidylserin, který je považován za ukazatel apoptózy pokud se vyskytuje ve vnější vrstvě povrchové membrány. [126] 7-aminoaktinomycin D naopak vykazuje afinitu k DNA, proniká však pouze do buněk s narušenou integritou buněčné membrány. [127] Výsledky analýzy bezpečnost MTC K1408 – K1413 potvrdily.

V další fázi testování bylo nejprve nutné prokázat produkci vybraných cytokinů buňkami SIM-A9 po stimulaci LPS a zdali je možné jejich expresi ovlivnit dexametazonem. Dexametazon je glukokortikoid se silnými protizánětlivými účinky [128] k jehož účinku je možné efekt nově syntetizovaných látek vztáhnout. Výběr kandidátů vycházel z literatury. Zaměřili jsme se na obecně prozánětlivé cytokiny relevantní pro AD, jako jsou IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  a INF- $\gamma$  [129,130,131]. Výsledky naší studie prokázaly, že LPS u buněčné linie SIM-A9 indukuje v 23hodinovém intervalu produkci IL-6 a TNF- $\alpha$ . Tuto reakci bylo možné

dexametazonem tlumit. Naopak produkce IL-1 $\beta$  se ve všech skupinách nacházela pod úrovní detekce ELISA kitu. Jeho hodnocení bylo proto pro další testování neperspektivní. Jako neperspektivní se rovněž jevila detekce IFN- $\gamma$ . Ačkoliv se jeho koncentrace nacházely nad úrovní detekce kitu, LPS jeho expresi u SIM-A9 buněk neovlivňoval.

Následovala poslední fáze experimentů zaměřená na hodnocení vlivu nově syntetizovaných sloučenin na zánětlivou odpověď *in vitro*. Buňky SIM-A9 byly nejprve vystaveny látkám K1408 – K1413 v koncentraci odpovídající MTC, ½ MTC a ¼ MTC. V intervalu 1 hodiny byl přidán LPS a v 24hodiovém intervalu byla zhodnocena produkce IL-6 a TNF- $\alpha$ . Na základě výsledků je možné účinky látky rozdělit do 3 skupin. Látky K1408, K1409, K1411 a K1412 produkci cytokinů indukovanou LPS zesilovaly. Zatímco u IL-6 bylo možné pozorovat její vzestup s klesající koncentrací látek, exprese TNF- $\alpha$  vzrostla jen po aplikaci MTC látek K1409 a K1411 nebo ¼ MTC látky K1412. Odlišný charakter odpovědi vykazoval naftochinon K1410. Tento derivát zvyšoval pouze produkci IL-6, a to v koncentracích odpovídajících MTC a ½ MTC. Tato látka by proto mohla teoreticky nalézt využití v případě, že budou nalezeny jiné (pozitivní) účinky. Pro její aplikaci *in vivo* bude nezbytné dodržovat koncentrace, při kterých nedochází k zesílení imunitní odpovědi. Protizánětlivé účinky byly v rámci této práce pozorovány pouze u sloučeniny K1413. Její účinek byl nicméně zaznamenán pouze v poměrně úzkém koncentračním rozmezí. Jejich terapeutické využití stran AD je proto možné zhodnotit pouze v kontextu inhibiční aktivity vůči ChEs či tvorbě amyloidních plaků. Tato data v době psaní diplomové práce nicméně nebyla k dispozici. V každém případě by však tento derivát 1,4-naftochinonu mohl sloužit jako výchozí látka pro syntézu dalších molekul.



## 6 Závěr

V rámci této diplomové práce byl zaveden *in vitro* model pro testování protizánětlivé odpovědi nově syntetizovaných látek v podobě mikrogliální buněčné linie SIM-A9.

Na tomto modelu byla otestována toxicita derivátů 1,4-naftochinonu (látek K1408 – K1413) a stanovena bezpečná koncentrace, při které byl dále hodnocen protizánětlivý jejich účinek. Ten byl nalezen pouze u sloučeniny K1413. Látku K1413 lze na základě výsledků doporučit k dalšímu testování, jako je například zhodnocení inhibiční aktivity vůči ChEs. Rovněž lze sloučeninu K1413 doporučit jako výchozí látku pro syntézu nových molekul.

## Použitá literatura

- [1] Miao, Y., He, N., & Zhu, J.-J. (2010). *History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition*. *Chemical Reviews*, 110(9), 5216–5234. doi:10.1021/cr900214c
- [2] Stepankova, S., & Komers, K. (2008). *Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors*. *Current Enzyme Inhibition*, 4(4), 160–171. doi:10.2174/157340808786733631
- [3] Whitacre, D.M. (2011). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 212, 29-53. doi 10.1007/978-1-4419-8453-1\_2
- [4] Schwarz, M., Glick, D., Loewenstein, Y., & Soreq, H. (1995). *Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons*. *Pharmacology & Therapeutics*, 67(2), 283–322. doi:10.1016/0163-7258(95)00019-d
- [5] Soreq, H., Zamir, R., Zevin-Sonkin, D., & Zakut, H. (1987). *Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16*. *Human Genetics*, 77(4), 325–328. doi:10.1007/bf00291419
- [6] Lockridge, O. (1988). *Structure of human serum cholinesterase*. *BioEssays*, 9(4), 125–128. doi:10.1002/bies.950090406
- [7] Soreq, H., & Seidman, S. (2001). *Acetylcholinesterase — new roles for an old actor*. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294–302. doi:10.1038/35067589
- [8] Tougu, V. (2001). *Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition*. *Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents*, 1(2), 155–170. doi:10.2174/1568015013358536
- [9] Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F.-M. (1993). *Molecular and cellular biology of cholinesterases*. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31–91. doi:10.1016/0301-0082(93)90040-y
- [10] Pohanka M. (2011). *Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology*. *Biomed*, 155(3), 219–230. doi 10.5507/bp.2011.036 219
- [11] Protein data bank, dostupné [online] z <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=816780EE>, [cit. 20-10-2018]

- [12] Neşe Çokuğraş A. (2003). *Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. Turkish Journal of Biochemistry*, 28 (2), 54-61. ISSN 0250-4685
- [13] Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K. P., Bartels, C. F., La Du, B. N., & Lockridge, O. (1990). *Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. Biochemistry*, 29(1), 124–131. doi:10.1021/bi00453a015
- [14] Sridhar, G. R., Rao, A. A., Srinivas, K., Nirmala, G., Lakshmi, G., Suryanarayna, D., Hanuman, T. (2010). *Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome. Medical Hypotheses*, 75(6), 648–651. doi:10.1016/j.mehy.2010.08.008
- [15] Protein data bank, dostupné [online] z <http://www.rcsb.org/pdb/results/results.do?tabtoshow=Current&qrid=457182BB>, [cit. 2-11-2018]
- [16] Lockridge, O. (2015). *Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. Pharmacology & Therapeutics*, 148, 34–46. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- [17] Hampl F., Paleček J. (2002). *Farmakochemie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 80-7080-495-5.
- [18] Pidrman V. (2007). *Farmakologie demence. Psychiatrie pro praxi* (8)5, 202–205. Dostupné [online] z <https://www.psychiatriepropraxi.cz/magno/psy/2007/mn2.php>, [cit. 11-10-2018]
- [19] Vohánka S. (2017). *Látky a nervosvalový přenos. Neurologie pro praxi* 18(1), 11–14. Dostupné [online] z [https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-201701-0003\\_Leky\\_a\\_nervosvalovy\\_prenos.php](https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-201701-0003_Leky_a_nervosvalovy_prenos.php), [cit. 12-10-2018]
- [20] Jiráček R. (2015). *Galantamin a jeho úloha v léčbě kognitivních funkcí, Česká a Slovenská Psychiatrie* 111(3), 127–132. ISSN 1212-0383
- [21] Patočka J., dostupné [online] z <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article &sid=80>, [cit. 5-9-2018]
- [22] Krejčová G., Ševelová L. (2003). *Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. Vojenské Zdravotnické Listy* 72(1), 37-44. Dostupné [online] z [https://mmsl.cz/artkey/mms-200301-0009\\_present-knowledge-about-galanthamine-as-a-reversible-acetylcholinesterase-inhibitor.php](https://mmsl.cz/artkey/mms-200301-0009_present-knowledge-about-galanthamine-as-a-reversible-acetylcholinesterase-inhibitor.php), [cit. 2-12-2018]

- [23] Jiráček R. (2012). Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* 8(3), 107-108. Dostupné [online] z [https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201203-0002\\_Farmakoterapie\\_Alzheimerovy\\_choroby.php](https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201203-0002_Farmakoterapie_Alzheimerovy_choroby.php), [cit. 4-12-2018]
- [24] Příbalový leták Galantamin, dostupný [online] z <https://www.lekarna.cz/galantamin-mylan-16mg-7x16mg-i-tobolky/#pribalovy-letak>, [cit. 5-12-2018]
- [25] Jiráček R. (2009). Terapie Alzheimerovy choroby a příbuzných neurodegenerativních demencí. *Neurologie pro praxi* 10(6), 384-389. Dostupné [online] z [https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200906-0013\\_Terapie\\_Alzheimerovy\\_choroby\\_a\\_pribuznych\\_neurodegenerativnich\\_demenci.php](https://www.neurologiepropraxi.cz/artkey/neu-200906-0013_Terapie_Alzheimerovy_choroby_a_pribuznych_neurodegenerativnich_demenci.php), [cit. 5-1-2019]
- [26] Sigma-Aldrich, dostupné [online] z <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6821?lang=en&region=CZ>, [cit. 6-10-2018]
- [27] Sugimoto H. (1999). *Structure±activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: Donepezil hydrochloride for the treatment of Alzheimer's Disease. Pure Appl. Chem* 71(11), 2031-2037. doi.org/10.1351/pac199971112031
- [28] Příbalový leták Donepezil, dostupné [online] z <https://pribalovy-letak.info/donepezil-mylan-5-mg-potahovane-tablety>, [cit. 12-10-2018]
- [29] Databáze léčiv, Dostupné [online] z <https://mediately.co/cz/drugs>, [cit. 5-10-2018]
- [30] Kim, H. G., Moon, M., Choi, J. G., Park, G., Kim, A.-J., Hur, J., ... Oh, M. S. (2014). Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo. *NeuroToxicology*, 40, 23–32. doi:10.1016/j.neuro.2013.10.004
- [31] Yoshiyama, Y., Kojima, A., Ishikawa, C., & Arai, K. (2010). Anti-Inflammatory Action of Donepezil Ameliorates Tau Pathology, Synaptic Loss, and Neurodegeneration in a Tauopathy Mouse Model. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(1), 295–306. doi:10.3233/jad-2010-100681
- [32] Jiráček R., Vnoučková K. (2003). *Rivastigminum. Centrum pro Alzheimerovu chorobu, Psychiatrická klinika I. LF UK, Praha 13*, 372–378. Dostupné [online] z <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Rivastigminum/6-I-dW.magarticle.aspx>, [cit. 25-1-2019]
- [33] Wikiwand, dostupné [online] z <http://www.wikiwand.com/en/Rivastigmine>, [cit. 7-11-2018]

- [34] Pubchem, dostupné [online] z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/donepezil#section=Top>, [cit. 12-10-2018]
- [35] Edukafarm, dostupné [online] z <http://www.edukafarm.cz/c853-rivastigmin>, [cit. 8-11-2018]
- [36] Nizri, E., Irony-Tur-Sinai, M., Faranesh, N., Lavon, I., Lavi, E., Weinstock, M., & Brenner, T. (2008). Suppression of neuroinflammation and immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine. *Journal of Neuroimmunology*, 203(1), 12–22. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.018
- [37] Alzheimer's Association (2017). *2017 Alzheimer's disease facts and figures, Alzheimer's & Dementia*, 13(4), 325–373. doi:10.1016/j.jalz.2017.02.001
- [38] Kalueff, A. V. (2007). *Neurobiology of Memory and Anxiety: From Genes to Behavior. Neural Plasticity*, 1–12. doi:10.1155/2007/78171
- [39] Prince M. (2015). *World Alzheimer Report. The Global Observatory for Ageing and Dementia Care*, 1-42. Dostupné [online] z <https://www.alz.co.uk/research/worldalzheimerreport2015summary.pdf>, [cit. 5-1-2019]
- [40] Praha: Česká alzheimerská společnost (2014). *Zpráva o stavu demence (2014)*. ISBN 978-80-86541-50-1
- [41] Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky. *Regionální zpravodajství Národního zdravotnického informačního systému* [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2016 [cit. 24-3-2018]. Dostupné z: <http://reportingtest.uzis.cz/bm>
- [42] Jiráček R., Laňková J. (2007). *Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Demence*, 1-10, dostupné [online] z <https://www.svl.cz/files/files/Doporucene-postupy-2003-2007/Demence.pdf>, [cit. 7-1-2019]
- [43] Hosák L. a kol. (2015). *Psychiatrie a pedopsychiatrie. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum*. ISBN 978-80-246-2998-8
- [44] Fišar, Z. (2001). *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie, Psyché*, 116-135. ISBN 80-247-0061-1

- [45] Yang, X., Askarova, S., & Lee, J. C.-M. (2010). *Membrane Biophysics and Mechanics in Alzheimer's Disease. Molecular Neurobiology*, 41(2-3), 138–148. doi:10.1007/s12035-010-8121-9
- [46] Cibičková L., Palička V. (2005). *Alzheimerova choroba, cholesterol a apolipoprotein E – nové souvislosti. Klinická Biochemie Metabolism.*, 13 (34), No. 3, 127–130
- [47] Corder, E. H., Saunders, A. M. (1993). *Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. Science*, 261(5123), 921-923
- [48] Iurescia, S., Fioretti, D., Mangialasche, F., & Rinaldi, M. (2010). *The Pathological Cross Talk Between Apolipoprotein E and Amyloid- $\beta$  Peptide in Alzheimer's Disease: Emerging Gene-Based Therapeutic Approaches. Journal of Alzheimer's Disease*, 21(1), 35–48. doi:10.3233/jad-2010-100009
- [49] Guo, L., LaDu, M. J., & Van Eldik, L. J. (2004). *A Dual Role for Apolipoprotein E in Neuroinflammation: Anti- and Pro-Inflammatory Activity. Journal of Molecular Neuroscience*, 23(3), 205–212. doi:10.1385/jmn:23:3:205
- [50] H. Ferreira-Vieira, T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. (2016). *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115. doi:10.2174/1570159x13666150716165
- [51] Bartus, R., Dean, R., Beer, B., & Lippa, A. (1982). *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science*, 217(4558), 408–414. doi:10.1126/science.7046051
- [52] Rektorová I., (2009). *Neurodegenerativní demence. Cesk Slov Neurol N*, 72/105(2): 97–109. [online], dostupné z [http://www.csmn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/neurodegenerativni-demence-32888?confirm\\_rules=1](http://www.csmn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/neurodegenerativni-demence-32888?confirm_rules=1), [cit. 9-1-2019]
- [53] Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). *Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. Neuropeptides*, 52, 1–18. doi:10.1016/j.npep.2015.06.008
- [54] Minghetti, L. (2005). *Role of inflammation in neurodegenerative diseases. Current Opinion in Neurology*, 18(3), 315–321. doi:10.1097/01.wco.0000169752.54191
- [55] Cell Diagram, dostupné [online] z <https://www.celldiagram.net/>, [cit. 5-9-2018]
- [56] Tuppo, E. E., & Arias, H. R. (2005). *The role of inflammation in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2), 289–305. doi:10.1016/j.biocel.2004.07.009
- [57] Dylevský I. (2009). *Speciální kineziologie. Praha: Grad*, 1-170. ISBN 978-80-247-1648-0.

- [58] Mravec B. (2013). Nervový systém I, Morfológický a funkčný podklad signalizácie, 1-89. ISBN 987-80-89607-10-5
- [59] Norden, D. M., & Godbout, J. P. (2013). Review: Microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(1), 19–34. doi:10.1111/j.1365-2990.2012.01306.x
- [60] Yuste, J. E., Tarragon, E., Campuzano, C. M., & Ros-Bernal, F. (2015). Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. doi:10.3389/fncel.2015.00322
- [61] Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17513–17518. doi:10.1073/pnas.0602841103
- [62] Liu, L., & Chan, C. (2014). The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 15, 6–15. doi:10.1016/j.arr.2013.12.007
- [63] Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. doi:10.1016/j.tins.2009.08.002
- [64] Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). *Astrocyte activation and reactive gliosis*. *Glia*, 50(4), 427–434. doi:10.1002/glia.20207
- [65] Ramesh, G., MacLean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and Chemokines at the Crossroads of Neuroinflammation, Neurodegeneration, and Neuropathic Pain. *Mediators of Inflammation*, 2013, 1–20. doi:10.1155/2013/480739
- [66] Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–15. doi:10.1100/2012/756357
- [67] Uniprot, dostupné [online] z <https://www.uniprot.org/uniprot/P18510>, [cit. 5-11-2018]
- [68] Lee, K. S., Chung, J. H., Choi, T. K., Suh, S. Y., Oh, B. H., & Hong, C. H. (2009). Peripheral Cytokines and Chemokines in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28(4), 281–287. doi:10.1159/000245156
- [69] Hammacher, A., Ward, L. D., Simpson, R. J., Weinstock, J., Treutlein, H., & Yasukawa, K. (1994). Structure-Function analysis of human IL-6: Identification of two distinct regions that are important for receptor binding. *Protein Science*, 3(12), 2280–2293. doi:10.1002/pro.5560031213
- [70] Richwine, A. F., Sparkman, N. L., Dilger, R. N., Buchanan, J. B., & Johnson, R. W. (2009). Cognitive deficits in interleukin-10-deficient mice after peripheral injection of

- lipopolysaccharide. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(6), 794–802. doi: 10.1016/j.bbi.2009.02.020
- [71] Ji, R.-R., Xu, Z.-Z., & Gao, Y.-J. (2014). *Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 533–548. doi:10.1038/nrd4334
- [72] Counts E., S. (2016). Cerebrospinal fluid proNGF: A Putative Biomarker for Early Alzheimer's Disease, *Curr Alzheimer Res.* 13(7), 800–808. doi: 10.1007/s13311-016-0481-z
- [73] Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., dostupné [online] z <http://www.alzheimer.cz/>, [cit. 15-10-2018]
- [74] Brunovský M. (2007). *Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby*, *Neurol. pro praxi* 2, 112–117, dostupné [online] z [https://www.solen.cz/artkey/neu-2007020012\\_Inhibitory\\_cholinesteraz\\_v\\_lecbe\\_alzheimerovy\\_nemoci.php](https://www.solen.cz/artkey/neu-2007020012_Inhibitory_cholinesteraz_v_lecbe_alzheimerovy_nemoci.php), [cit. 9-1-2019]
- [75] Piťha j. (2018). *Místo farmakoterapie v léčbě myastenia gravis*, *Klinická farmakologie a farmacie* 32(2), 8-12
- [76] Struktura Pyridostigminu, dostupné [online] z <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00545>, [cit. 6-2-2019]
- [77] Příbalový leták pyridostigmin, dostupné [online] z <https://pribalovy-letak.info/mestinon>, [cit. 5-4-2019]
- [78] Struktura Neostigminu, dostupné [online] z <https://www.doccheck.com/de/detail/photos/13881-neostigmin-strukturformel>, [cit. 6-4-2019]
- [79] Příbalový leták neostigmin, dostupné [online] z <https://pribalovy-letak.info/syntostigmin>, [cit. 7-4-2019]
- [80] Struktura Distigminu, dostupné [online] z [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/distigmine\\_bromide](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/distigmine_bromide), [cit. 8-4-2019]
- [81] Příbalový leták Distigmin, dostupné [online] z <https://pribalovy-letak.info/ubretid-5-mg>, [cit. 9-4-2019]
- [82] Struktura Distigminu, dostupné [online] z <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ambenonium#section=2D-Structure>, [cit. 10-4-2019]
- [83] Příbalový leták Abenonium, dostupný [online] z <https://pribalovy-letak.info/mytelase>, [cit. 10-4-2019]
- [84] Myastenia gravis, dostupné [online] z <http://www.myastheniagravis.cz/>, [cit. 8-12-2018]



- [85] Piřha J. (2012). *Myasthenia gravis na prahu 3. tisíciletí. Postgraduální medicína, 14 (2), 189-200*, dostupné [online] z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/myasthenia-gravis-na-prahu-3-tisicileti-463472>, [cit. 5-9-2018]
- [86] Guptill, J. T., Soni, M., & Meriggioli, M. N. (2015). *Current Treatment, Emerging Translational Therapies, and New Therapeutic Targets for Autoimmune Myasthenia Gravis. Neurotherapeutics, 13(1), 118–131*. doi:10.1007/s13311-015-0398-y
- [87] Abbas Jowkar, dostupné [online] z <https://emedicine.medscape.com/article/1171206-overview>, [cit. 3-9-2018]
- [88] Dostupné [online] z [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synapse\\_diag4.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synapse_diag4.png), [cit. 9-1-2019]
- [89] Martyn, J. A. J., Fagerlund, M. J., & Eriksson, L. I. (2009). *Basic principles of neuromuscular transmission. Anaesthesia, 64, 1–9*. doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05865.x
- [90] Piřha J. (2010). *Myasthenia gravis a ostatní poruchy nervosvalového přenosu. Praha: Maxdorf, Jessenius, 14-39*. ISBN 978-80-7345-230-8.
- [91] Piřha J. (2012). *Myasthenia gravis na prahu 3. tisíciletí. Postgraduální medicína, 14 (2), 189-200*, dostupné [online] z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/myasthenia-gravis-na-prahu-3-tisicileti-463472>, [cit. 5-9-2018]
- [92] Pascuzzi M., R. at al. (2007). *Medications and Myasthenia Gravis. Department of Neurology Indiana University School of Medicine, 1-22*.
- [93] Salmon E., J. (1996). *Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. J Clin Invest, Volume 97(5), 1348-135*. doi: 10.1172/JCI118552
- [94] Namba T. (1971). *Myasthenia gravis occurring in twins. J Neurol Neurosurg Psychiatry 34(5), 531–534*.
- [95] Delpy, L., at al. (2005). *Estrogen Enhances Susceptibility to Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by Promoting Type 1-Polarized Immune Responses. The Journal of Immunology, 175(8), 5050–5057*. doi:10.4049/jimmunol.175.8.5050
- [96] Babula P., et al. (2006). *Naftochinony - biosyntéza, výskyt a metabolismus v rostlinách, Česká a Slovenská farmacie, 55, 151-159*
- [97] Marastoni, M., Trapella, C., Scotti, A., Fantinati, A., Ferretti, V., Marzola, E., ... Preti, D. (2017). *Naphthoquinone amino acid derivatives, synthesis and biological activity as proteasome inhibitors. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 32(1), 865–877*. doi:10.1080/14756366.2017.1334649

- [98] Boonyaketguson, S., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., & Trisuwan, K. (2018). *Naphthoquinones from the leaves of Rhinacanthus nasutus having acetylcholinesterase inhibitory and cytotoxic activities. Fitoterapia, 124, 206–210.* doi:10.1016/j.fitote.2017.11.011
- [99] Kobayashi, K., Nishiumi, S., Nishida, M., Hirai, M., Azuma, T., Yoshida, H., ... Yoshida, M. (2011). *Effects of Quinone Derivatives, such as 1,4-Naphthoquinone, on DNA Polymerase Inhibition and Anti-Inflammatory Action. Medicinal Chemistry, 7(1), 37–44.* doi:10.2174/157340611794072742
- [100] Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., Jiménez-Aliaga, K. L., Ortega, A., Molina, M. T., Buxaderas, E., ... Csáky, A. G. (2010). *In vitro antiamyloidogenic properties of 1,4-naphthoquinones. Biochemical and Biophysical Research Communications, 400(1), 169–174.* doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.038
- [101] Tandon, V. K., Chhor, R. B., Singh, R. V., Rai, S., & Yadav, D. B. (2004). *Design, synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antifungal and anticancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14(5), 1079–1083.* doi:10.1016/j.bmcl.2004.01.002
- [102] Kayashima, T., Mori, M., Yoshida, H., Mizushima, Y., & Matsubara, K. (2009). *1,4-Naphthoquinone is a potent inhibitor of human cancer cell growth and angiogenesis. Cancer Letters, 278(1), 34–40.* doi:10.1016/j.canlet.2008.12.020
- [103] Luminex, dostupné [online] z <https://www.luminexcorp.com>, [cit. 1-2-2019]
- [104] Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J. C., Marcus, T. F., Ramos, R. (2014). *xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. OncoTargets and Therapy, 985.* doi:10.2147/ott.s62887
- [105] Muckova, L., Pejchal, J., Jost, P., Vanova, N., Herman, D., & Jun, D. (2018). *Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. Drug and Chemical Toxicology, 1–5.* doi:10.1080/01480545.2018.1432641
- [106] Desai, Sharav & S. Sukhramani, Prakash & S. Sukhramani, Poonam & R. Tirthani, Sonal & A. Desai, Sarav & P. Suthar, Maulik. (2011). *Biological cytotoxicity evaluation of spiro[azetidine-2, 3'-indole]-2', 4(1'H)-dione derivatives for anti-lung and anti-breast cancer activity. SCHOLAR RESEARCH LIBRARY. 3. 236-243.*

- [107] Muckova, L., Vanova, N., Misik, J., Herman, D., Pejchal, J., & Jun, D. (2019). *Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. Toxicology in Vitro, 56, 110–117.* doi:10.1016/j.tiv.2019.01.013
- [108] Heiat M., Rajbar R., Alavian SM. (2014). *Classical and Modern Approaches Used for Viral Hepatitis Diagnosis, Hepatology, 14(4), 1-8.* doi: 10.5812/hepatmon.17632
- [109] Lequin, R. M. (2005). *Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry, 51(12), 2415–2418.* doi:10.1373/clinchem.2005.051532
- [110] Cespedes, C. L., Muñoz, E., Salazar, J. R., Yamaguchi, L., Werner, E., Alarcon, J., & Kubo, I. (2013). *Inhibition of cholinesterase activity by extracts, fractions and compounds from Calceolaria talcana and C. integrifolia (Calceolariaceae: Scrophulariaceae). Food and Chemical Toxicology, 62, 919–926.* doi:10.1016/j.fct.2013.10.027
- [111] Necula, M., Kayed, R., Milton, S., & Glabe, C. G. (2007). *Small Molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid  $\beta$  Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct. Journal of Biological Chemistry, 282(14), 10311–10324.* doi:10.1074/jbc.m608207200
- [112] Zhang, T., Xu, W., Mu, Y., & Derreumaux, P. (2013). *Atomic and Dynamic Insights into the Beneficial Effect of the 1,4-Naphthoquinon-2-yl-L-tryptophan Inhibitor on Alzheimer's  $A\beta$ 1–42 Dimer in Terms of Aggregation and Toxicity. ACS Chemical Neuroscience, 5(2), 148–159.* doi:10.1021/cn400197x
- [113] Milackova, I., Prnova, M. S. (2014). *2-Chloro-1,4-naphthoquinone derivative of quercetin as an inhibitor of aldose reductase and anti-inflammatory agent. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 30(1), 107–113.* doi:10.3109/14756366.2014.892935
- [114] Butterfield, D. A., Griffin, S., Munch, G., & Pasinetti, G. M. (2002). *Amyloid  $\beta$ -peptide and amyloid pathology are central to the oxidative stress and inflammatory cascades under which Alzheimer's disease brain exists. Journal of Alzheimer's Disease, 4(3), 193 – 201.* doi:10.3233/jad-2002-4309
- [115] Lian, H., Roy, E., & Zheng, H. (2016). *Protocol for Primary Microglial Culture Preparation. BIO-PROTOCOL, 6(21).* doi:10.21769/bioprotoc.1989
- [116] Meßmer, U. K., Briner, V. A., & Pfeilschifter, J. (1999). *Tumor necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide induce apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells. Kidney International, 55(6), 2322–2337.* doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00473.x

- [117] Nagamoto-Combs, K., Kulas, J., & Combs, C. K. (2014). *A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia*. *Journal of Neuroscience Methods*, *233*, 187–198. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.05.021
- [118] Urcan, E., Haertel, U., Styllou, M., Hickel, R., Scherthan, H., & Reichl, F. X. (2010). *Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts*. *Dental Materials*, *26*(1), 51–58. doi:10.1016/j.dental.2009.08.007
- [119] Gill, E. L., Raman, S., Yost, R. A., Garrett, T. J., & Vedam-Mai, V. (2018). *l-Carnitine Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide Production of SIM-A9 Microglia Cells*. *ACS Chemical Neuroscience*, *9*(5), 901–905. doi:10.1021/acschemneuro.7b00468
- [120] Samaradivakara, S. P., Samarasekera, R., Handunnetti, S. M., Weerasena, O. V. D. S. J., Al-Hamashi, A. A., Slama, J. T., Tillekeratne, L. M. V. (2018). *A Bioactive Resveratrol Trimer from the Stem Bark of the Sri Lankan Endemic Plant Vateria copallifera*. *Journal of Natural Products*. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00892
- [121] Focà, A., Liberto, M. C., Quirino, A., & Matera, G. (2012). *Lipopolysaccharides: From Eryines to Charites*. *Mediators of Inflammation*, *2012*, 1–6. doi:10.1155/2012/684274
- [122] Galanos, C., & Freudenberg, M. A. (1993). *Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action*. *Mediators of Inflammation*, *2*(7), 11–16. doi:10.1155/s0962935193000687
- [123] Nair, S., Sobotka, K. S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., ... Hagberg, H. (2019). *Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo*. *Glia*. doi:10.1002/glia.23587
- [124] Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). *Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives*. *Acta Histochemica*, *120*(3), 159–167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005
- [125] Dringen, R. (2005). *Oxidative and Antioxidative Potential of Brain Microglial Cells*. *Antioxidants & Redox Signaling*, *7*(9-10), 1223–1233. doi:10.1089/ars.2005.7.1223
- [126] Schutte, B., Nuydens, R., Geerts, H., & Ramaekers, F. (1998). *Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells*. *Journal of Neuroscience Methods*, *86*(1), 63–69. doi:10.1016/s0165-0270(98)00147-2
- [127] Loborg, H., Lindén, E., Lönn, A., Skoglund, P., & Rundquist, I. (1995). *High affinity binding of 7-aminoactinomycin D and 4',6-diamidino-2-phenylindole to human*

*neutrophilic granulocytes and lymphocytes. Cytometry, 20(4), 296–306.*  
doi:10.1002/cyto.990200405

[128] Saklatvala, J. (2002). *Arthritis Research, 4(3), 146.* doi:10.1186/ar398

[129] Stamouli, EC., Politis, AM. (2016). *Pro-inflammatory cytokines in Alzheimer's disease. Psychiatriki, 27(4), 264-275.* doi: 10.22365/jpsych.2016.274.264

[130] Chiarini, A. (2006). *The killing of neurons by beta-amyloid peptides, prions, and pro-inflammatory cytokines. Embryology, 111(4), 221–246*

[131] Jabbari Azad, F., Talaei A, et al. (2014). *Association between cytokine production and disease severity in Alzheimer's disease. Alergy and Astma immunol, 13(6), 433–439*