

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra antropologie a genetiky člověka**

**Studijní program Biologie**

**Studijní obor Antropologie a genetika člověka**



**Ing. Mgr. Lukáš Sedláček**

**Působení vybraných analogů odvozených od látky 7-MEOTA  
na některé aspekty cholinergního systému**

**Chosen Analogues Derived from Substance 7-MEOTA**

**Action on Some Aspects of Cholinergic System**

**Diplomová práce**

*Vedoucí závěrečné práce:*

**RNDr. Jan Říčný, CSc.**

Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku  
Psychiatrické centrum Praha

**PRAHA 2013**

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

*Praha, srpen 2013* .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce, panu dr. Říčnému, za vstřícnost a cenné rady, které mi poskytoval při její přípravě, paní dr. Čejkové za pomoc s nalezením vhodných antropologických témat souvisejících se zaměřením této závěrečné práce a paní dr. Řípové a personálu Laboratoře biochemie a patofyziologie mozku za vstřícné přijetí a za příležitost prakticky si vyzkoušet a osvojit nové zajímavé poznatky.

Zvláštní poděkování patří mé rodině a nejbližším, kteří mi poskytovali pomoc a podporu po celou dobu mého studia.

## Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	4
1 Úvod.....	5
1.1 Alzheimerova choroba (AD).....	6
1.1.1 Projevy AD.....	7
1.1.2 Důvody vzniku AD.....	10
1.1.3 Genetické předpoklady AD.....	14
1.1.4 Léčba AD.....	20
1.1.5 Léčiva pro léčbu AD.....	22
1.2 Cholinergní systém a cholinomimetická léčba AD.....	23
1.2.1 Acetylcholin (ACh).....	25
1.2.2 Nikotinové acetylcholinové receptory (nAChRs).....	26
1.2.3 Muscarinové acetylcholinové receptory (mAChRs).....	28
1.2.4 Acetylcholinesteráza (AChE).....	30
1.2.5 Inhibitory Acetylcholinesterázy (AChEIs).....	32
2 Cíl práce.....	34
3 Materiál.....	34
3.1 Příprava reakční směsi.....	35
3.1.1 Zkoumané inhibitory AChE.....	37
3.1.2 Substrát acetylthiocholin (ATCh).....	38
3.1.3 Ellmanovo činidlo (DTNB).....	39
3.1.4 Enzym acetylcholinesteráza (AChE).....	39
3.2 Použití spektrofotometru.....	41
3.3 Příprava dat pomocí analytického software (SW).....	42
4 Metody.....	44
4.1 Stanovení intenzity inhibice AChE.....	44
4.2 Zjištění typu inhibice AChE.....	46
4.2.1 Lineweaver-Burkovo vynesení.....	48
4.2.2 Dixonovo vynesení.....	50
4.2.3 Cornish-Bowdenovo vynesení.....	51
5 Výsledky.....	52
6 Diskuze.....	56
7 Závěr.....	57
8 Přílohy.....	59
8.1 Tabulky.....	59
8.2 Obrázky.....	62
8.3 Grafy.....	65
9 Citační rejstřík.....	71

## Abstrakt

Tato práce se zabývá stanovením enzymatické aktivity několika vybraných analogů 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Ten je derivátem takrinu, který se používal k symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (AD), dokud nebyl nahrazen jinými léky s lepším terapeutickým indexem. 7-MEOTA stejně jako takrin terapeuticky působí tím, že inhibuje acetylcholinesterázu (AChE) a zvyšuje tak množství neurotransmiteru acetylcholinu v organismu. Vykazuje podobnou sílu a typ inhibice, ale narušil od takrinu je méně toxický. Některé dříve zkoumané analogy 7-MEOTA byly stejně silnými, nebo dokonce ještě silnějšími inhibitory AChE a tedy i slibnými budoucími léčivy. Navzdory tomu ale látky analyzované v této práci vykazovaly všechny slabší inhibici enzymatické reakce i menší afinitu k AChE. U každé ze zkoumaných sloučenin byly vypočteny ukazatele  $IC_{50}$ ,  $K_i$  a  $K_i'$  a stanoven typ inhibice, kterým na AChE působí. Typ inhibice byl u všech analogů 7-MEOTA smíšený. Ve své teoretické části se práce zabývá projevy a důvodem vzniku AD, genetickými faktory apod., přičemž se snaží využívat i některých poznatků a teorií z antropologického diskurzu.

## Abstract

This thesis deals with effects of some chosen 7-methoxytacrine (7-MEOTA) analogues on enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE). 7-MEOTA is a derivative of tacrine, which had been used for symptomatic treatment of Alzheimer's disease (AD), until drugs with better therapeutic index were developed. 7-MEOTA the same way as tacrine therapeutically acts by inhibition of acetylcholinesterase and a neurotransmitter acetylcholine rise in the organism. It shows similar strength and type of inhibition, but it's less toxic contrary to tacrine. Some of the previously examined analogues of 7-MEOTA were as strong or even stronger AChE inhibitors than 7-MEOTA and so promising future medicaments. However, all the compounds analyzed in this thesis showed weaker enzymatic reaction inhibition and AChE affinity. For each of the examined compounds  $IC_{50}$ ,  $K_i$  and  $K_i'$  were calculated and AChE inhibition type was determined. All the 7-MEOTA analogues showed a mixed type of the inhibition. The theoretical part of this thesis deals with manifestations and origins of AD, its genetic factors etc. and tries to show some of the anthropological findings a theories connected with the theme.

## 1 Úvod

Dle odhadů organizace Alzheimer's Disease International (Wimo a Prince 2010) trpí v současné době demencí celosvětově kolem 36,5 milionu lidí, v roce 2030 jich má být již 65,7 milionu a v roce 2050 dokonce 115,4 milionu. Tento odhadovaný nárůst, související s celkovým stárnutím světové populace, má značný dopad na jednotlivé ekonomiky a v součtu představuje náklady (jak přímé související s profesionální sociální a zdravotnickou péčí, tak nepřímé vynakládané příbuznými a opatrovníky postižených osob) převyšující 600 miliard dolarů, což se dá srovnávat jen s příjmy největších kapitálových společností nebo státních ekonomik. Např. příjmy České republiky za rok 2009 činily zhruba 974,6 miliard korun (Vláda České republiky 2010), což je v přepočtu (při kurzu 17,5 Kč/1 US dolar) přibližně 55,7 miliardy dolarů. Největší nárůst počtu postižených je zaznamenáván v rozvojových oblastech a zemích třetího světa, ale více jak dvě třetiny zmiňovaných nákladů leží na ramenech Západních zemí (Wimo a Prince 2010).

Převažující formou demence je Alzheimerova choroba (AD) vyskytující se převážně u osob staršího věku (sporadická forma)<sup>1</sup>, přičemž při dosažení 65 let se každých pět let riziko výskytu nemoci zdvojnásobuje (Bachman a kol. 1993, Bermejo-Pareja a kol. 2008). Jde o progresivní neurodegenerativní poruchu se střední dobou trvání okolo 8,5 let (od projevu prvních klinických příznaků až po úmrtí). Nejvíce zasažené jsou přitom mozkové struktury asociované s vyššími mentálními funkcemi (Francis a kol. 1999).

Při léčbě AD i jiných patologií se v posledních letech nejvíce uplatňuje cholinomimetická léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterázy (Mangialasche a kol. 2010). Ačkoli léky pro AD na cholinomimetické bázi již nejsou jediným medikamentem pro léčbu této patologie, cholinomimetická terapie stále představuje důležité vědní pole, které si zaslouhuje svou pozornost.

Cílem této kapitoly je nastínit podstatu AD a to jakým způsobem souvisí s lidským cholinergním systémem. Zároveň bych chtěl zmínit metody léčby této patologie vycházející z cholinergní hypotézy AD včetně látek a struktur, které se při ní uplatňují.

---

<sup>1</sup> Zřídka i mnohem dříve ve familiární podobě (Wimo a Prince 2010).

## 1.1 Alzheimerova choroba (AD)

Jak bylo zmíněno, sporadická forma AD patří mezi nejčastější typy demence seniorského věku a ačkoli její fyziologické projevy byly odhaleny až na počátku 20. století (Jellinger 2006), první písemné zmínky o „senilní demenci“ lze vystopovat hluboko do dávnověku. Mezi ty nejstarší, kterých je možné se dopátrat, patří bezesporu spisy mudrce Ptahhotepa (vezíra faraona Džekarea Isesiho) ze starověkého Egypta (z doby kolem roku 2350 př. n. l.), v nichž si stěžuje na potíže spojené s jeho pokročilým věkem. Jeho slovy: „srdce je prázdné, již se nedokáže rozpomenout na minulost“ (anglický překlad viz Janssen a Janssen 1996), přičemž srdcem je myšleno centrum myšlení (dle egyptské tradice).

Postupnou ztrátu paměti a obecný pokles intelektuálních schopností jako doprovodný jev stárnutí následně zmiňovali i mnozí antičtí autoři. Mezi jinými například řečtí filosofové Platón či Aristoteles, či římstí učenci a myslitelé Cicero, Seneca starší (a později i jeho syn), římský císař Marcus Aurelius nebo jeden z nejznámějších starověkých lékařů Klaudios Galénos (Karenberg a Fröstl 2006).

Detekovat případy demence u prehistorických populací bude ale pravděpodobně mnohem těžší, než je tomu u analýzy historických dokumentů. Naštěstí existuje ještě jiný druh zápisu informací než písemný – genetický. Byla identifikována řada genů (viz dále) jejichž alely způsobují zvýšené riziko vzniku AD. S novými metodami analýzy aDNA<sup>2</sup> použitými v nedávné době například při studiu Denisovanské jaderné DNA (Pennisi 2013), se ale možná rozuzlení podobných otázek brzy dočkáme.

Genetické predispozice samozřejmě ještě neznamenají, že se u daného jedince určitá forma demence vyvine. Obzvláště, když vezmeme v úvahu pozdní nástup senilní demence a nízkou střední délku života pravěkých populací, která v mezolitu ani v neolitu nepřekračovala hranici třiceti let (Galor a Moav 2007). Může nám ale mnohé napovědět a ve výjimečných případech snad i výskyt demence doložit, pokud by se našly ostatky odpovídající dostatečně vysokému věku s genetickými markery ukazujícími na možný výskyt patologie. Byť pravděpodobnost takového nálezu je extrémně nízká, stále je nejspíš

---

<sup>2</sup> Z anglického „ancient“ čili „starobylá DNA“.

vyšší, než zachovalý nález postiženého mozku archaického předchůdce anatomicky moderního člověka.

### 1.1.1 Projevy AD

Poškození mozku při AD se projevuje jak v poruchách kognitivních funkcí, tak i v behaviorální rovině. S postupující patologií AD se stupňují i změny v chování. U nemocných se objevují příznaky jako je popudlivost, zmatenost, agresivita, časté změny nálady (Förstl a Kurz 1999), poruchy v řeči (paraphasie) až ztráta řeči (Frank 1996), doprovázené narůstající apatií (Landes a kol. 2001), depresiemi a „cestováním“ (bloudění bez cíle, v kruzích apod.). Změnou prochází tedy i osobnost nemocného (Förstl a Kurz 1999).

Mezi nejzávažnější deficity kognitivních funkcí pak patří poruchy paměti (nejdříve krátkodobé, později i dlouhodobé) vedoucí k obtížím při snaze rozpomenout se na nedávné události, získávat nové informace, nebo dávat věci do kontextu (Bäckman a kol. 2004). Mezi neméně závažné pak patří poruchy abstraktního myšlení, pozornosti, či vnímání (agnozie<sup>3</sup>, misidentifikace, bludy, anosognozie<sup>4</sup>, ...; Förstl a Kurz 1999).

Všem výše zmíněným projevům AD ale předchází projevy fyziologické. Jedná se hlavně o vznik víceméně rozpustných oligomerů ADLLs (A $\beta$ -derived diffusible ligands) vytvářejících se proteolytickým štěpením z transmembránového APP<sup>5</sup> (Amyloid Precursor Protein), které v mozku dále polymerizují a tvoří extracelulární depozita (senilní/amyloidní plaky) amyloidu  $\beta$  (A $\beta$ ; Lambert a kol. 1998). A $\beta$  deriváty existují v několika formách. Mezi nejznámější patří 40-reziduální A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> a 42-reziduální A $\beta$ <sub>(1-42)</sub>, ale existují i další (Benilova a De Strooper 2011) jako např. 43-reziduální A $\beta$ <sub>(1-43)</sub> (Saito a kol. 2011) nebo pyroglutamátem modifikovaný A $\beta$ <sub>(3-42)</sub> (Schilling a kol. 2008), které mohou mít pro patologii AD značný význam. Všechny zmíněné deriváty se mohou vázat na nikotinové acetylcholinové receptory (nAChRs) a způsobovat různými, prozatím ne zcela vysvětlenými mechanismy, neuronální poškození (Fodale a kol. 2006). Vzárust rozpustné

---

<sup>3</sup> Porucha vnímání prostoru vedoucí ke špatné orientaci v prostoru a společně s horší koordinací pohybů i k častějším úrazům.

<sup>4</sup> Nevnímání vlastních limitů (své nemoci apod.).

<sup>5</sup> Ten je kritický pro růst, přežití a obnovu neuronů.

formy A $\beta$  (oligomery) je u AD považován za ukazatel synaptické degenerace a koreluje se závažností poruch kognitivních funkcí lépe, než je tomu u celkové zátěže čítající i nerozpustná depozita (Lue a kol. 1999). I tak jsou ale senilní plaky s poruchami kognitivních funkcí velmi často spojovány (Auld 2002).

Dalšími projevy pak jsou intracelulární formace neurofibrilárních klubíček (Neurofibrillary Tangles; NFT)<sup>6</sup> obsahujících abnormálně fosforylovanou verzi proteinu tau a stejně tak i ztráta neuronů a synapsí, která má pravděpodobně za následek v převážné míře výše zmíněný deficit kognitivních funkcí (Duyckaerts 2009), následovaný poruchami cirkadiálního rytmu (Volicer a kol. 2001) a motoriky (Förstl a Kurz 1999).

Akumulace extracelulárního A $\beta$  se vyskytuje v parenchymu jako difúzní, fokální, nebo stelární depozita (Delaère a kol. 1991) a v některých případech i v rámci cévních stěn arterií, žil i kapilár, což bývá ovlivněno zvýšeným výskytem alel genu APOE4 pro apolipoprotein E (Thal a kol. 2002a). Výskyt parenchymálních a vaskulárních depozit A $\beta$  pak bývá následován akumulací vysoce fosforylovaného proteinu tau, který bývá označován za hlavní indikátor propuknutí Alzheimerovy choroby (Duyckaerts a Hauw 1997) – přestože existují i poznatky, které mohou svědčit o opaku (např. De Felice a kol. 2008). Na rozdíl od amyloidních plaků, které se mohou vyskytovat ve velké míře i u osob s minimálními kognitivními poruchami (Duyckaerts 1997) a jsou tak spíše předzvěstí následné AD, koreluje histopatologie proteinu tau s klinickými symptomy AD velmi dobře (např. se ztrátou neuronů – Cras a kol. 1995).

Patologie proteinu tau většinou začíná v entorhinální kůře, rozšiřuje se do hipokampu a postupně zasahuje i isokortex (Braak a Braak 1991). Dochází ke ztrátě neuronů, jejichž povaha je značně heterogenní a liší se oblast od oblasti. Mechanismus ztráty neuronů a synaptických spojů zatím není dostatečně objasněn, ačkoli souvislost s proteiny A $\beta$  a tau je nasnadě (Duyckaerts 2009). Topografie a progresse amyloidních depozit je přitom jiná, ale stejně jako u výše zmíněné patologie proteinu tau není náhodná a závisí na stádiu nemoci. Dle Braakova schématu (Braak a Braak 1991) se amyloidní plaky nejprve objevují v bazálních částech kortexu, následně pak v celém isokortexu, vyjma primárních

---

<sup>6</sup> Kromě těl neuronů v podobě NFT, se depozita proteinu tau vyskytují i v dendritech jako neuropilová vlákna a v axonech jako neuritické korony senilních plaků (Duyckaerts 2009).

kortikálních částí (hipokampus je zasažen jen mírně), a v konečném stádiu pak již ve všech isokortikálních oblastech včetně sensorických a motorických. Existují ale i jiné studie, které specifikují postup ukládání amyloidních depozit jinak. Např. Thal a kol. (2002b) definuje pět fází progresu (1. isokortex → 2. hipokampus → 3. striatum a diencefalická jádra → 4. různá jádra mozkového kmene → 5. mozeček a přidružená jádra mozkového kmene).

AD se vyskytuje v několika různých klinicko-patologických formách souvisejících s typem postižení<sup>7</sup>, typem propuknutí<sup>8</sup> a souvisejícím postižením<sup>9</sup>. Kromě „pozitivních“ poškození, spojených s akumulací proteinů (tau a A $\beta$ ) a „negativních“ souvisejících se ztrátou neuronů a synaptických spojů, se dá vymezit i oblast související s reaktivními procesy<sup>10</sup>.

Pro stanovení závažnosti Alzheimerovy choroby byly vytvořeny různé hodnotící metody. Metodika Braakových stádií (Braak stages – Braak a Braak 1991) např. definuje šest vzájemně navazujících stádií vycházejících z topografické distribuce NFT a neuropilních vláken. Od původní Khachaturianovy „černobílé“ binární metody je již upuštěno a přednost se dává pravděpodobnostnímu přístupu, při kterém je nutné určit stádium (topografii poškození způsobeného NFT), fázi (topografii amyloidních depozit) a nejlépe i závažnost poškození. Využívána k tomuto účelu bývají různá kritéria (např. NIA<sup>11</sup> Reagan – Ball a kol. 1997) dávající uvedené parametry do vzájemné souvislosti, což v důsledku umožňuje přibližně stanovit pravděpodobnost, s jakou se skutečně jedná o dané onemocnění. Pro zjištění přesné diagnózy je pak možné zvolená kritéria porovnávat s kritérii jiných, podobných nemocí, vytvářet relační tabulky a získávat tak informace o skutečné povaze dané patologie (McKeith a kol. 2005).

---

<sup>7</sup> Kdy se vyskytují téměř bezvýhradně pouze amyloidní plaky (Tiraboschi a kol. 2004), anebo naopak v převážné míře jen NFT (Baner a Jellinger 1994).

<sup>8</sup> Případy s identifikovanou mutací genu  $\epsilon$  či s fokálními deficity spojené např. s afázií – (Mesulam a kol. 2008) alexií či vizuální agnozií (Alladi a kol. 2007).

<sup>9</sup> Např. Lewy body disease (např. Uchikado a kol. 2006), argyrophilic grain disease (Fujino a kol. 2005), vaskulární onemocnění (Jellinger a Attems 2007), hipokampální skleróza (Amador-Ortiz a kol. 2007), inkluze proteinu TDP-43 (Josephs a kol. 2008) a další.

<sup>10</sup> Záněty probíhajícími v senilních placích (Eikelenboom a kol. 2008), astrocytózou v postižených oblastech (Cairns a kol. 1992), a plasticitou (Probst a kol. 1983) spojenou s neurogenézí (Jin a kol. 2004), která se v místech zasažených AD také objevuje, ačkoli se u nově vytvořených neuronů dá předpokládat neschopnost dospět do stádia plné funkčnosti (Li a kol. 2008).

<sup>11</sup> Zkratka: „National Institute on Aging“.

### 1.1.2 Důvody vzniku AD

Přestože systematický průzkum nemoci probíhá již řadu let, stále se nepodařilo zjistit příčinu jejího vzniku. Což nalezení efektivní léčby velmi znesnadňuje. S rostoucím množstvím poznatků se postupně objevovaly (a stále objevují) nejrůznější hypotézy týkající se etiologie AD. Kromě cholinergní hypotézy (viz následující kapitola) bývají velmi často zmiňovány následující 4:

- amyloidní (Hardy a Allsop 1991), kde je hlavní význam přikládán A $\beta$ , genům, které ovlivňují jeho tvorbu apod.,
- tau (Mudher a Lovestone 2002), považující za hlavní spouštěč hyperfosforylovaný protein tau a tvorbu NFT uvnitř nervových buněk<sup>12</sup>,
- glutamatergní (Nyakas a kol. 2011), zaměřující na možnou excitotoxicitu tohoto neuromediátoru, a
- demyelinizační (Bartzokis 2004) podle které dochází k poškození myelinových pochev axonů a tím k přerušení vazeb mezi nimi. Depozita proteinů tau a A $\beta$  pak vidí pouze jako důsledek reparačních procesů zaměřených na opravu těchto poškozených myelinových pochev.

Ale existují i jiné hypotézy, které zmiňují např. účinky oxidativního stresu (Su a kol. 2008), nebo působení viru Herpes simplex u lidí nesoucích specifickou verzi genu pro apolipoprotein E (Itzhaki a Wozniak 2008).

Určitou roli by mohl hrát i acetylkoenzym A (acetyl-CoA), který je využíván neurony a gliovými buňkami k získávání energie a syntéze různých produktů. Cholinergní neurony přitom vyžadují dodatečné množství této látky kvůli syntéze a uvolňování acetylcholinu (viz kapitola Cholinergní systém a cholinomimetická léčba AD). Jsou tedy i náchylnější k degeneraci, pokud je acetyl-CoA nedostatek. Acetyl-CoA sám je v mozku získáván rozkladem pyruvátu<sup>13</sup> za působení enzymu pyruvátdehydrogenázy (PDHC). Její aktivita je přitom nižší u řady neurodegenerativních onemocnění včetně AD, což by mohlo ukazovat na zmíněný nedostatek acetyl-CoA (více viz Szutowicz a kol. 2013 nebo Říčný 2013).

---

<sup>12</sup> Což vede k dezintegraci mikrotubul, kolapsu transportního systému neuronů (Iqbal a kol. 2005) a pravděpodobně i k poruše jejich biochemické komunikace a následné smrti (Chun a Johnson 2007).

<sup>13</sup> Aniont kyseliny pyrohroznové vznikající při glykolýze a alkoholovém i mléčném kvašení.

Objevují se i názory, že jde o adaptivní mechanismus snižující energetickou náročnost mozku ve fázi života, kdy již není tolik nutné vstřebávat nové informace a je možné se více spoléhat na již dříve získané dovednosti (Reser 2009).

Fyziologické projevy vedoucí k úbytku mozkové hmoty se navíc u sporadické formy objevují již před padesátým rokem věku, kdy ostatní projevy nejsou téměř vůbec patrné. Poslední zjištění dokonce zmiňují, že první známky výskytu abnormální formy proteinu tau se dají v lidském mozku vystopovat již v období dětství a puberty (Braak a Del Tredici 2012).

Fyziologické projevy AD se tedy u jedinců objevují v rámci jejich reprodukčně aktivního období. Je proto celkem pravděpodobné, že geny (jako např. výše zmíněný APOE4), které rozvoji AD napomáhají (či ho urychlují), prošly během tisíců let lidské existence určitým evolučním výběrem a v období reprodukčního věku svým nositelům poskytovaly nějakou výhodu umožňující zachovat jejich genetickou výbavu jako přínos generacím svých potomků. Např. dle výzkumu Jaroslava Hubacka a kol. (2001) alela APOE4 genu pro apolipoprotein E zvyšuje jejich vlastníkům šanci na dosažení vyššího vzdělání.<sup>14</sup>

Mozek je vysoce energeticky náročný nástroj. Mnohonásobně náročnější než např. kosterní svalovina (Aiello a Wheeler 1995). Pokles množství mozkových buněk během rozvoje AD, tak může být jednou z cest, jak tuto energetickou náročnost snížit.

*„Ztráta neuronů může někdy paradoxně vylepšit fungování mozku. Tak jako se to děje při odumírání synaptických spojení a neuronů, které nebyly široce využívány ... Vydržování nepoužívaných neuronů za notného množství krve, kyslíku a energie je marnotratné a jejich ztráta udržuje mozek zaostřený (na podstatné aspekty přežití) a efektivní (Doidge 2007:82, přeloženo).“*

Je zajímavé, že alela APOE4 byla pozorována ve zvýšené míře u Khoisanů<sup>15</sup> (Sandholzer a kol. 1995) a stejně tak i u Pygmejů (Zekraoui a kol. 1997). Populací žijících

---

<sup>14</sup> Ve srovnání s nositeli alely APOE2 byl u alely APOE4 poměr vysokoškoláků a lidí se základním vzděláním pětikrát vyšší (Hubacek a kol. 2001).

<sup>15</sup> Khoisan (též Kojisan, Khoesan nebo Khoe-San) je označení etnické skupiny tvořené etniky Khoi-khoi (Hotentoty) a Sany (Křováci). Vyšší Khoi-khoiové se tradičně živili především pastevečtím, menší Sanové lovem a sběračstvím (Zimák 2003:10).

v notně odlišných klimatických podmínkách, ale podobajících se lovecko-sběračským způsobem své obživy. Vzhledem k tomu, že jsou Khoisanové považováni za jedno z nejstarších etnik vůbec (předpokládá se, že se vydělili ze zbytku populace již před více jak 180 000 lety; Semino a kol. 2002), je možné, že zmíněná varianta genu může být zároveň tou nejstarobylejší. V tom případě by naši vzdálení předci byli k výskytu AD mnohem náchylnější, než je lidská populace dnes.

Tuto domněnku může podpořit i fakt, že i jiné etnické skupiny (stále či donedávna) praktikující lovecko-sběračské metody subsistence (původní Australané, Papuánci, Američané nebo Laponci) vykazují zvýšenou míru výskytu alely APOE4. Naproti tomu varianta APOE3, která je nejběžnější, je nejčastější u skupin spoléhajících během své současné i dávné historie především na zemědělství (Corbo a Scacchi 1999).<sup>16</sup>

Vazba mezi genem pro apolipoprotein E a formou obživy je tedy nasnadě. A je celkem pravděpodobné, že alela APOE4 při vhodném způsobu subsistence není ničím maladaptivním, ale právě naopak. Například hladina cholesterolu v plasmě u Khoisanů je relativně nízká (v průměru 149 ml/dl), a proto u nich dvakrát vyšší frekvence výskytu APOE4 nemusí být velký problém. Pokud by ale jejich dosavadní formu subsistence nahradil ten, který je běžný v USA a v Západní Evropě, měli by dvakrát vyšší náchylnost k výskytu arteriosklerózy, než mají dnes (Sandholzer a kol. 1995).

Výše zmíněné etnické skupiny, které k sobě mají fylogeneticky bez debat velmi blízko, je navíc možné srovnat s živočišnými druhy (přesněji savci)<sup>17</sup>, které jsou od člověka evolučně notně vzdálené a přitom vykazují podobné fyziologické, kognitivní i behaviorální znaky spojené rozvojem AD u lidí (Landsberg a Araujo 2005, Head a kol. 2005). A stejně tak jako u lidí i u jiných druhů savců se tyto patologické projevy s věkem pozvolna stupňují (Schultz a kol. 2000).

U hladovějících nebo jinak stresovaných myší byla navíc pozorována reverzibilní produkce hyperfosforylovaného proteinu tau (hlavního fyziologického korelátu AD; Planel a kol.

---

<sup>16</sup> Jiná varianta APOE2 se zase vůbec nevyskytuje u původních Američanů (Corbo a Scacchi 1999). Takže pravděpodobně nebyla v genetické výbavě prvních Amerických kolonizátorů, či byla postupně eliminována.

<sup>17</sup> Na rozdíl od evolučně mnohem starších organismů – ryb, obojživelníků a plazů (Finch a Sapolsky 1999).

2001). Což jednak naznačuje vazbu mezi hladověním a AD a zároveň ukazuje na možnou souvislost s další chorobou, jejíž výskyt se s věkem postupně zvyšuje, s diabetem druhého typu. Porucha produkce inzulínu má totiž, jak se zdá, podstatný vliv na tvorbu abnormální verze tau (Planel a kol. 2007).

Hladovění způsobuje pokles hladiny glukózy, inzulínu a leptinu, vzrůst kortikosteronu (Ahima a kol. 1996) a vede ke značnému poklesu glukózy v mnoha částech mozku (Garriga a Cussó 1992). Je ale možné, že hyperfosforylační proces, který se u potkanů, potom co se nakrmí, vždy vrací do normálu (tau se dehyperfosforyluje; Yanagisawa a kol. 1999), má stejně tak jako v případě výskytu v rámci AD stejný cíl a to šetřit drahocennou energií (Reser 2009). Obzvláště, když vezmeme v potaz zvýšený výskyt alely APOE4 u původních populací praktikujících lovecko-sběračský způsob obživy, anebo neustálé změny klimatických podmínek během střídání dob ledových a meziledových, což pravděpodobně mělo značný vliv i na množství potravy dostupné tehdy žijícím zástupcům lidského druhu (Reed 1997, Wynn 2004).

Teorii „spořivé“ alely či genů (Corbo a Scacchi 1999), která bývá často zmiňována i u diabetes mellitus druhého typu (Stoeger 2008), proklamující, že tyto patologie vznikly jako adaptace na nedostatek potravy, však může do určité míry zpochybnit nedávné zjištění britských vědců. Dle jejich názoru totiž stařecká cukrovka není nevyléčitelným onemocněním a tedy záležitostí čistě geneticky naprogramovanou s věkem jako nejdůležitější proměnnou. Po několika týdnech přísné nízkokalorické diety je totiž její průběh možné zvrátit a vrátit citlivost organismu na inzulín na normální mez (Taylor 2013).

Navíc, jak upozorňují Finch a Sapolsky (1999), alela APOE3 se u žádných jiných organismů nevyskytuje. Je tedy výlučně lidskou formou genu pro apolipoprotein E. To jednak dokládá archaičnost alely APOE4 (běžné například u primátů), ale i ukazuje na možnou adaptivní roli APOE3 spojenou s lidskou dlouhověkostí a potřebou dostatečných intelektuálních kapacit i v pozdějším věku.

### 1.1.3 Genetické předpoklady AD

Před tím, než Alois Alzheimer poprvé v roce 1907 u své 55 leté pacientky identifikoval fyziologické projevy AD (Goedert a Spillantiny 2006), byla spojitost závažnosti onemocnění a dědičnosti už nějakou dobu známa (Bertram a Tanzi 2005). První formální studie byla ale publikována až o mnoho let později (Sjögren a kol. 1953).

Následovala řada studií, které postupně prokazovaly zvýšený výskyt AD u příbuzných léčených pacientů. Například Heston a kol. (1981) potvrdil výskyt AD u 40 % příbuzných 125 pacientů (u nichž byla choroba doložena pitvou). Podobně Chui a kol. (1985) objevil známky AD u 45 % příbuzných 146 pacientů nebo Mayeux a kol. (1985) u 37 % příbuzných 121 pacientů.

Dědičnost choroby potvrzují i geminologické (dvojčecí) studie (Pericak-Vance a Haines 1995). Konkordance u monozygotních dvojčat se podle nich pohybuje v rozmezí 40 – 50 %. U dizygotních dvojčat je ale toto rozmezí mnohem větší. Činí 10 – 50 % a ukazuje tedy, podobně jako jiné příbuzenské studie, na zvýšený vliv genetických faktorů. Vystopovat lze dokonce autozomálně dominantní typ dědičnosti (např. Nee a kol. 1983) a stejně tak i značnou spojitost časného rozvoje nemoci s Downovým syndromem a trisomií chromosomu 21 (Wisniewski a kol. 1985).

Jak již bylo zmíněno výše, AD se vyskytuje ve dvou typech. Ve familiárním, který je spojován hlavně s časným nástupem nemoci (EOAD)<sup>18</sup>, a ve sporadickém, spojovaným s pozdějším nástupem nemoci (LOAD)<sup>19</sup>. EOAD tvoří zhruba 1–6 % celkové prevalence AD – tedy spíše jen její nepatrnou část. První příznaky choroby se u tohoto typu začínají objevovat mezi 30–60 rokem života. Nástup mnohem častější formy LOAD se pak řadí až za tento interval, konkrétně do doby mezi 60 a 65 rokem života. Přibližně 60 % pacientů s ranou formou nemoci má v rodinné anamnéze více příbuzných trpících AD a z těchto familiárních případů pak zhruba 13 % vykazuje autozomálně dominantní typ dědičnosti s minimálně třemi předcházejícími generacemi trpícími touto chorobou (Bekris a kol. 2010).

---

<sup>18</sup> Z anglického „Early On-set Alzheimer disease“.

<sup>19</sup> Z anglického „Late On-set Alzheimer Disease“.

Vyjma zmíněného zlomku výskytů AD ve familiární podobě, kde jde o poruchy jednotlivých genů, valná většina případů vykazuje mnohem komplexnější multifaktoriální typ dědičnosti, zahrnující kromě řady vzájemně působících genů i vliv environmentálního prostředí (Kamboh 2004).

Autozomálně dominantní vzor dědičnosti byl zatím identifikován především u genů pro Amyloid Precursor Protein (APP), Presenilin 1 (PSEN1) a Presenilin 2 (PSEN2). Gen pro APP se vyskytuje na dlouhém raménku 21. chromozomu (21q21.2), jeho příspěvek k dědičné formě nemoci je zhruba do 5 % a patologicky se začíná projevovat mezi 40–60 rokem života. PSEN1 je kódován genem na dlouhém raménku 14. chromozomu (14q24.3), k riziku vzniku EOAD přispívá ze všech výše zmiňovaných genů nejvíce – 50 až 75 % a i nástup choroby je u něj nejčasnější – mezi 30–58 lety. Posledně zmiňovaný, PSEN2 se nachází na dlouhém raménku 1. chromozomu (1q31-q42) a přispívá k autozomálně dominantní variantě AD naopak nejméně – do 1 %, s nástupem nemoci v rozmezí 45 až 88 let (Vilatela a kol. 2012).

V polovině 80. let (Glennner a Wong 1984a) byl z amyloidních plaků spojovaných s AD izolován polypeptid, který byl nazván amyloid beta  $A\beta$ , kvůli své struktuře připomínající částečně list složený do tvaru písmene beta. Podobný protein byl nalezen i u Downova syndromu. Oba dva proteiny se přitom skládaly z identické sekvence 28 aminokyselin (Glennner a Wong 1984b). Vazebné studie pak lokalizovaly gen na dlouhém raménku 21. chromozomu, který měl na svědomí časný rozvoj (po 40. roce) amyloidních depozit a neuropatologických projevů AD u Downova syndromu. Odtud už byl jen krůček k izolaci zmíněného genu i k odhalení jeho skutečného produktu APP. Ten je ve skutečnosti mnohem větší, než jeho deriváty ve formě  $A\beta$  (Goldgaber a kol. 1987).

Později byly také identifikovány u členů postižených rodin první mutace tohoto genu. Například Goate a kol. (1991) objevil missense mutaci, která díky záměně aminokyseliny (podobně jako třeba u srpkovité anémie) vede k abnormální verzi výsledného proteinu.

APP je kódován 18 exony, tvořen 770 aminokyselinami a štěpen třemi druhy proteáz –  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  sekretázou (Tomiyama a kol. 2008). Pouze  $\beta$  a  $\gamma$  sekretázy jsou ale schopné vytvářet  $A\beta$  shlukující se do nebezpečných oligomerů (viz kapitola o projevech AD). Většina odhalených mutací se přitom nachází na 16 a 17 exonu, které kódují štěpné místo pro

$\gamma$  sekretázu (Tandon a kol. 2000). K dnešnímu datu bylo identifikováno již více jak 30 missense mutací genu pro APP. Přibližně 25 z nich je patogenních a ve většině případů vedou k rozvoji EOAD (Cruts a kol. 2012). Detekovány byly také dvě recesivní mutace APP genu lišící se od převažujících dominantních forem především tím, že způsobují onemocnění pouze v homozygotním stavu (Di Fede a kol. 2009, Giaccone a kol. 2010).

V případě Downova syndromu jsou patologické projevy AD patrně způsobeny nadprodukcí APP spojenou s nadbytečnou kopií 21. chromozomu (Zekanowski a Wojda 2009). Delece a duplikace se sice také objevují, ale jsou velmi vzácné a s neúplnou penetrací (Hooli a kol. 2012). Důležitost APP při vzniku AD dokládá také alela A673T nalezená u islandské populace, která zhruba o 40 % snižuje produkci amyloidních peptidů *in vitro* a zároveň i snižuje pokles kognitivních schopností u zdravých jedinců (Jonsson a kol. 2012)

O něco později po APP byl identifikován gen PSEN1 jako hlavní příčina familiární formy AD (Cruts a kol. 1996). PSEN1 společně s dalšími geny kóduje látky potřebné pro správnou a stabilní funkci  $\gamma$  sekretázy. Skládá se z 12 exonů, které kódují 467 aminokyselin (De Strooper a kol. 1998). Jeho různé mutace způsobují nejzávažnější formy EOAD v převážné většině s plnou penetrací (Bekris a kol. 2010).<sup>20</sup> U jedné ze studovaných mutací PSEN1 bylo například identifikováno postupné snižování kognitivních schopností jejich nositelů v době předcházející zhruba o dvě dekády nástup prvních klinických příznaků (Acosta-Baena a kol. 2011). Přitom nástup choroby je zde velice nízký – atakuje hranici 30 let (Vilatela a kol. 2012).

Výrazně méně nebezpečný je pak PSEN2 objevený v polovině devadesátých let (Levy-Lahad a kol. 1995). Jedná se o gen velice podobný PSEN1, který je s ním v mnoha místech sekvenčně homologní (Rogaev a kol. 1995). PSEN2 se skládá z 12 exonů kódujících 448 aminokyselin (Kimberly a kol. 2003). Podobně jako PSEN1 má vliv na aktivitu a funkci  $\gamma$  sekretázy a změnu poměru  $A\beta_{(1-42)}$  k  $A\beta_{(1-40)}$  u člověka i u myši (Baulac a kol. 2003). Stejně jako v případě mutací APP je pak výsledkem nadměrné zvýšení hladiny  $A\beta_{(1-42)}$ , což poté nejspíše vede k odumírání neuronů a demenci (viz amyloidní hypotéza vzniku AD výše).

---

<sup>20</sup> Ačkoli byly popsány i případy s neúplnou penetrací (Rossor a kol. 1996).

Kromě výše zmíněných, je také možné, že se při rozvoji (nejen) EOAD uplatňují i některé mutace genu pro protein tau. Nadbytek patologické hyperfosforylované verze tau se nevyskytuje pouze u AD, ale i u jiných nemocí, mezi které patří například frontotemporální demence. U familiární autozomálně dominantní formy tohoto onemocnění přitom byly nalezeny mutace tau genu na 17 chromozomu, které by s rozvojem nemoci mohly přímo souviset (Hutton a kol. 1998).

Gen pro tau produkuje řadu různých izoforem v závislosti na různém sestřihu molekuly mRNA – nejdelší protein je přepisován z 11 exonů, proto je analýza účinků obtížnější (Goedert a kol. 1992). Přesto bylo zjištěno, že některé mutace zmíněného genu snižují schopnost proteinu tau interagovat s mikrotubulami neuronů (což může vést až k jejich smrti) a zároveň způsobují jeho nadprodukcí, která pak vede k hromadění tohoto proteinu v mozcích pacientů trpících AD (Munshi a Ahuja 2010)

Genetické základy LOAD jsou ale zdá se mnohem komplexnější, než je tomu v případě EOAD. Klasické mendelistické vzorce dědičnosti se u ní bohužel zatím nalézt nepodařilo a jak již bylo zmíněno, s velkou pravděpodobností se jedná o multifaktoriální onemocnění zahrnující řadu genů ve vzájemné interakci současně s vlivem zevních faktorů. Většina případů LOAD je sporadická s žádnou rodinou anamnézou nemoci (Vilatela a kol. 2012).

Hlavní rizikový genetický faktor, který byl prozatím odhalen, je již zmiňovaná alela genu APOE4 pro apolipoprotein E, vyskytující se ve zvýšené frekvenci u pacientů trpících LOAD (Kamboh 2004). Lidský apolipoprotein E se vyskytuje v řadě orgánů. Nejvíce v játrech a dále pak v mozku (Mahley a Rall 2000). V tom je produkován převážně astrocyty, v menší míře pak mikroglie a za určitých podmínek i neurony (Kim a kol. 2009). Je jedním z hlavních lipoproteinů regulujících metabolismus lipidů (řízení jejich transportu a distribuce mezi různými tkáněmi a typy buněk; Mahley 1988).

Gen pro tento protein se nachází na dlouhém raménku 19. chromozomu (19q13.32) a je tvořen čtyřmi exony kódujícími 299 aminokyselin. Všechny tři výše zmíněné alely (APOE2–4) jsou formou dvou jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v rámci čtvrtého exonu (Mahley 2000).

Problémová APOE4 se vyskytuje u více jak 50 % pacientů trpících LOAD. Jedna její alela zvyšuje riziko výskytu této nemoci třikrát, dvě kopie dokonce dvanáctkrát (Corder a kol. 1993). Alela APOE2 naopak vykazuje spíše protektivní účinky proti LOAD (Corder a kol. 1994). Výskyt APOE4 ale automaticky neznamená, že se patologie rozvine. A naopak i u lidí s jinými alelami genu existuje možnost, že dříve či později AD postihne i je. Polymorfismus genu pro apolipoprotein E proto není možné brát jako spolehlivý ukazatel možného výskytu LOAD u pacienta (Roses 1996).

To, že k rozvoji AD notnou měrou přispívá, dokazují ale například studie provedené za použití magnetické rezonance na nositelích APOE4 – dětech, adolescentech i na pacientech trpících AD. U všech těchto skupin byl pozorován znatelný pokles v objemu entorhinální kůry (Shaw a kol. 2007). U padesátníků s touto alelou byl navíc rozpoznán větší pokles kognitivních schopností než u nositelů jiné verze tohoto genu (Caselli a kol. 2009), což společně ukazuje na možný rozvoj patologie již od raného věku.

Mezi geny způsobující náchylnost ke vzniku LOAD patří i dynamin 2 (DNM2) objevený u japonské populace. Zajímavé přitom je, že problémy patrně způsobuje pouze v nepřítomnosti alely APOE4 (Aidaraliev a kol. 2008). DNM2 je definován dvěma SNP a nachází se na krátkém raménku 19 chromozomu (19p13.2). Je homologní k dynaminu 1 a stejně jako on se nejspíše uplatňuje při neurodegenerativních procesech spojovaných s A $\beta$  (Kelly a kol. 2005).

Kromě výše zmíněných APOE4 a DNM2 existuje i celá řada dalších genů potenciálně nebezpečných pro vznik LOAD. U žádného z nich ale zatím ještě nebyly publikovány tak přesvědčivé výsledky, jako právě u APOE4 (Vilatela a kol. 2012).

Mezi jinými je možné zmínit například některé varianty genu, který se nachází na krátkém raménku 12. chromozomu (12p13.3) pro alfa-2-makroglobulin – glykoprotein s inhibičním účinkem na proteinázy, který byl nalezen v neuritických placích (Blacker a kol. 1998). Nebo třeba specifické alely genů ABCA1 (Wavrant-De Vrieze a kol. 2007), ABCA2 (Mace a kol. 2005), uplatňující se při metabolismu cholesterolu a fosfolipidů.

Velice slibně se přitom jeví celo-genomové asociační studie (GWAS)<sup>21</sup> snažící se odhalit statisticky významné polymorfismy DNA testováním statisíců SNP v rámci celého genomu pacientů trpících LOAD proti genomu zdravých jedinců (Manolio 2010). Mohou tak být velmi užitečné při odhalování kandidátních genů – dalších potenciálních faktorů působících na vznik a rozvoj LOAD.

Dvě z těchto studií nedávno identifikovaly rizikové alely genů pro klusterin, někdy nazývaný i apolipoprotein J (CLU nebo také APOJ), fosfatidylinositol vázající klathrin shromažďující protein<sup>22</sup> (PICALM) a pro CR1 (jenž se uplatňuje při tvorbě receptoru Knopsovi krevní skupiny)<sup>23</sup>. První z nich se nachází na krátkém raménku 8. chromozomu (8p21-p12), druhý na dlouhém 11. chromozomu (11q14) a třetí na dlouhém raménku 1. chromozomu (1q32).

První studie testovala 5964 případů LOAD proti 10188 zdravým jedincům (PICALM a CLU – Harold a kol. 2009), druhá 5887 případů proti 8508 zdravým jedincům (CLU a CR1 – Lambert a kol. 2009). Proběhla i nezávislá ověřovací studie na rozdílných subjektech (všechny byly starší 60 let) čítající 15239 jedinců z různých částí světa. Navíc se zaměřila i na interakci zmíněných genů navzájem mezi sebou a také s genem pro apolipoprotein E. Výsledky potvrdili zvýšené riziko výskytu LOAD pro zkoumané alely těchto tří genů a navíc odhalily ještě více závažný synergický efekt v případě APOE4 a PICALM (Jun a kol. 2010).

V jiné GWAS byly zase například testovány SNP genů běžně spojovaných s EOAD (APP, PSEN1 a PSEN2), tak aby bylo možné stanovit, zda se nějakým způsobem nepodílejí i na vzniku LOAD. Analyzována byla DNA 3940 pacientů s LOAD a 13373 zdravých jedinců. Výsledky ale zmíněnou domněnku nepotvrdily (Cruchaga a kol. 2012).

Tyto GWAS přitom reprezentují jen malou část z celé řady rozsáhlých studií, které byly v posledních letech publikovány a jež obsahují ještě větší počet kandidátních genů. Například v roce 2011 bylo zveřejněno 12 studií popisujících více jak 40 nových

---

<sup>21</sup> Z anglického „Genome-Wide Association Study“.

<sup>22</sup> Anglicky: „Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein“.

<sup>23</sup> Anglický název zní: „Complement Component (3b/4b) Receptor 1 (Knops blood group)“.

rizikových polymorfismů. Ani přes jejich velké množství nebyla ale ani s jejich pomocí zatím identifikována žádná varianta genu, která by vykazovala tak silné korelace jako již výše zmíněná alela APOE4 (Vilatela a kol. 2012).

V případě EOAD s autozomálně dominantním typem dědičnosti je riziko vzniku choroby u potomků pacientů trpících EOAD 50 %. U LOAD je ale kvůli zahrnutí celé další řady faktorů situace mnohem složitější. Přesto se odhaduje, vzhledem k velkému rozšíření této choroby, že riziko onemocnět LOAD je u kohokoli zhruba 10–15 %. U přímých potomků pacientů s LOAD se pak toto riziko zvyšuje na 20–25 % (Bird 1993). Bohužel, jak již bylo zmíněno, spolehlivě je prozatím možné v presymptomatické fázi geneticky stanovit pouze rozvoj EOAD.

K pochopení genetických příčin AD (obzvláště LOAD) vede zatím ještě, jak se zdá, dlouhá a trnitá cesta. Přesto je genetika, co se týče výzkumu AD, momentálně nejprogressivnější oblastí (Bertram a Hampel 2011). Počet nových genetických faktorů spojovaných s rizikem vzniku sporadické formy AD se každý měsíc neustále zvyšuje (Bertram a kol. 2007). Objem genů, jejichž kumulativní působení může zvyšovat (třeba i nepatrnou měrou) riziko AD tak nabírá stále větších rozměrů, což zároveň i vybízí ke studiu a k porozumění tomuto komplexnímu systému (Bertram a Hampel 2011). Jeho lepší a hlubší pochopení přitom bude patrně v následujících letech stěžejní pro vývin nových diagnostických nástrojů a snad i efektivnějších a účinnějších léků.

#### **1.1.4 Léčba AD**

Systematický biochemický výzkum mozku pacientů trpících Alzheimerovou chorobou začal na přelomu 60. a 70. let dvacátého století se snahou najít a jasně definovat neurochemické abnormality způsobující vznik a rozvoj této nemoci. V polovině 70. let pak byl u nemocných postižených AD objeven výrazný deficit enzymu cholin acetyltransferázy (ChAT)<sup>24</sup>, zodpovědného za syntézu acetylcholinu (Bowen a kol. 1976). Následné objevy pak potvrdily významný presynaptický cholinergní deficit (např. Whitehouse a kol. 1983)

---

<sup>24</sup> Systematický IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) název: acetyl-CoA:choline O-acetyltransferase; EC (Enzyme Commission) číslo: 2.3.1.6

a díky odhalení vazby mezi acetylcholinem (ACh), učením a pamětí (Drachman a Leavitt 1974) pak tyto studie daly vzniknout cholinerní hypotéze Alzheimerovy choroby.

Ta staví na předpokladu, že degenerace cholinerních neuronů v bazálním předním mozku, a s tím spojená ztráta cholinerních vazeb s mozkovou kůrou a dalšími jinými oblastmi, výrazně přispívá k postupnému zhoršování kognitivních funkcí pozorovatelných u pacientů trpících AD (Bartus a kol. 1982). Předpokládá také, že podávání léků, umocňujících působení centrálních funkcí cholinerního systému v organismu, může vést ke zlepšení kognitivních a případně i behaviorálních projevů souvisejících s výskytem AD (Francis a kol. 1999).

Mezi přístupy vycházející z cholinerní hypotézy AD patřily např. prvotní pokusy zaměřující se na náhradu prekurzorů ACh (např. cholinem nebo lecitinem), které ale nedokázaly zvýšit centrální cholinerní aktivitu. Jiné přístupy se pak zaměřovaly na využití inhibitorů cholinesteráz (ChEI), které hydrolýzu acetylcholinu redukují, a posléze pak i na muscarinové (Fisher 2008) a nikotinové (Dunbar a kol. 2007) cholinerní mozkové receptory.

Z pochopení molekulární patologie nemoci se pak dále ještě vyvinuly přístupy zahrnující například nervový růstový faktor<sup>25</sup> (NGF<sup>26</sup>; Treanor a kol. 1995). Proběhly i výzkumy zaměřující se na využití fetálních tkáňových štěpů bohatých na ACh a jejich implantaci do poškozené tkáně (Ridley a kol. 1994).

Jako nejúspěšnější a nejsnáze aplikovatelný se ale ukázal přístup vycházející z cholinerní hypotézy AD zaměřený na cholinomimetickou symptomatickou léčbu AD s použitím inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE) a butyrylcholinesterázy (BChE). To dokládá i fakt, že většina současných léků určených k léčbě AD je právě na této bázi (Mangialasche a kol. 2010).

---

<sup>25</sup> Ten vychází z faktu, že cholinerní neurony v bazálním předním mozku obsahují receptory citlivé na NGF. Při nitrožilním podávání tohoto růstového faktoru bylo pozorováno zpomalení rozvoje nemoci a určité zlepšení v behaviorální i kognitivní oblasti (Treanor a kol. 1995).

<sup>26</sup> Z angličtiny: Nerve Growth Factor. Používá se i označení Nerve Neurotrophic Factor.

### 1.1.5 Léčiva pro léčbu AD

První léčivo, které bylo schváleno k léčbě AD (v některých, ale ne ve všech zemích) byl takrin. Představoval první generaci cholinomimetických drog. Ačkoli jeho podávání pacientům s AD vedlo k statisticky významným pozitivním výsledkům (Eagger a Harvey 1995), měl i řadu nepříznivých vedlejších účinků, mezi které patřila především hrozící hepatotoxicita vedoucí často k dočasnému přerušení léčby (Wilcock a kol. 1994) a dále pak nevolnost, zvracení či průjem (Schneider 1993) spojený s přílišnou stimulací cholinergního systému v periferních částech organismu (Francis a kol. 1999).

Při vývoji druhé generace cholinomimetických léků pak bylo cílem odstranit či alespoň výrazně omezit negativní vedlejší účinky, které se vyskytovaly u první generace léčiv určených pro symptomatickou léčbu AD, a zároveň tím i umožnit co nejvíce posunout hranici pro maximální možnou medikaci léčiva, tak aby se dalo dosáhnout co nejlepších terapeutických účinků. Mezi léčiva na bázi inhibice cholinesterázy (ChE), kterým se do té či oné míry podařilo zmíněné požadavky splnit, patřili např. donepezil (Rogers a kol. 1996), rivastigmin (Corey-Bloom a kol. 1998) či galantamin (Aerssens a kol. 1999), které jsou pro léčbu AD používány dodnes (Mangialasche a kol. 2010).

Nyní se pro symptomatickou léčbu AD využívá pouze jeden lék, který není na bázi inhibice ChE (Tabulka 1). Jde o memantin (chemická struktura ChEI a memantinu viz Obrázek 1). Tento nekompetitivní blokátor NMDA glutamerních receptorů<sup>27</sup> na rozdíl od ChEI nezvyšuje cholinergní transmissi, ale zaměřuje se na snižování excitotoxicity glutamátu (Mangialasche a kol. 2010) a bývá často používán i v kombinaci s některým z cholinomimetických léčiv (Tariot a kol. 2004).

Z výše zmíněných cholinomimetických drog není v Evropě povolen donepezil (ačkoli např. v USA je pro léčbu AD schválen) a jiné cholinomimetické léčivo (působící jako inhibitor AChE) Huperzin-A (Wang a kol. 2009) je zase schváleno pouze v Číně a v několika dalších státech je pak povoleno jako doplněk stravy. Klinické testy mimo Čínu pro něj při tom neexistují (Mangialasche a kol. 2010).

---

<sup>27</sup> NMDA (N-methyl-D-aspartátové) receptory jsou glutamátem řízené iontové kanály, nacházející se v centrální nervové soustavě. Mimo jiné mají význam pro synaptickou plasticitu a funkce spojené s učením (Li a Tsien 2009).

V současné době probíhá mnoho klinických a experimentálních studií (Obrázek 2) snažících se vyvinout nová léčiva, která by nejen zmírňovala projevy nemoci, ale dokázala by, v nejlepším případě, její rozvoj i zvrátit. Mnoho studií bohužel v nedávné době ztroskotalo v důsledku manažerských a strategických chyb, které nedovolily posunout daná léčiva do další fáze vývoje (Mangialasche a kol. 2010). Řada z nich při tom dle Mangialasche a kol. (2010) spočívala v neschopnosti překonat silně zakořeněné redukcionistické paradigma<sup>28</sup>: „jeden protein – jedna droga – jedna nemoc“, které se objevilo v nedávné době v souvislosti s hlubším pochopením podstaty nemoci.

## 1.2 Cholinergní systém a cholinomimetická léčba AD

Cholinergní systém využívající neuromediátoru ACh zasahuje do různých částí organismu a uplatňuje se v rámci různých orgánových soustav a systémů (dýchací, trávicí, endokrinní, rozmnožovací, ...). Je součástí jak centrální nervové soustavy (CNS), tak periferní (PNS), ale spojován je nejčastěji s její autonomní vegetativní částí (autonomní nervová soustava; ANS) a jejími parasympatickými nervy, které jsou převážně cholinergní<sup>29</sup>. Tato strukturální komplexita cholinergního systému může následně vést k nežádoucím komplikacím při cholinomimetické léčbě<sup>30</sup>, pokud je cílená hlavně na CNS (jako v případě AD).

Cholinergní systém mozku, na který se cholinomimetická léčba AD převážně zaměřuje, se skládá z šesti hlavních centrálních cest (Ch1 – Ch6), kterými proudí nervové vzruchy z jader (*nucleus*) cholinergními vlákny do inervovaných oblastí (Mesulam a kol. 1983). Cholinergní neurony v bazálním předním mozku tvořící mediální septum (MS; skupina Ch1), vertikální a horizontální rameno *stria diagonalis* (VRSD a HRSD; skupiny Ch2 a Ch3) a *nucleus basalis Meynerti*<sup>31</sup> (NBM; skupina Ch4) inervují celou mozkovou kůru a části limbického systému (Kobayashi a Isa 2002).

---

<sup>28</sup> Správnější model by dle zmíněných autorů měl být spíše víceúrovňový (na úrovni genů, proteinů, organel, buněk, orgánů, celého organismu, prostředí) a síťový (droga většinou ovlivňuje více entit) než jednoúrovňový lineární, který vedl u mnoha studií, jak bylo zmíněno, k neúspěchu.

<sup>29</sup> U postgangliových synapsí sympatiku jsou cholinergní pouze ty, které jsou umístěny na potních žlázách.

<sup>30</sup> Např. různé vedlejší účinky léčiv, jako je nevolnost, zvracení, apod. (Schneider 1993).

<sup>31</sup> U laboratorních potkanů je tato část nazývána *nucleus basalis magnocellularis* (Lucas-Meunier a kol. 2003).

Neurony MS inervují hipokampus a neurony VRSD a HRSD zase anteriorní část *gyrus cingulatus* a čichový bulbus. VRSD navíc také míří do hipokampu. NBM pak vysílá projekce do amygdaly, do zbytku kortikálního pláště, do frontoparietálního *operculum* a do mediálních kortikálních regionů (Auld a kol. 2002). Cholinergní neurony *nucleus tegmentalis posterolateralis* (skupina Ch5) a *nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (skupina Ch6) zase inervují pontomedulární retikulární formaci, střední vrstvu *superior colliculus*, různá talamická jádra a dopaminergní neurony v okolí *tegmentum pontis* (Kobayashi a Isa 2002).

Přítom funkce jednotlivých oblastí inervovaných cholinergními drahami se velmi liší a stejně tak se liší i funkce jednotlivých částí cholinergního systému mozku. Cholinergní systém bazálních jader a neokortexu výrazně ovlivňuje vizuální složku pozornosti (Sahakian a Coull 1994, Pang a kol. 1993), ale naopak se nijak neuplatňuje v paměťových procesech (Voytko a kol. 1994, Winkler a kol. 1995). Septo-hipokampální cholinergní dráhy se naproti tomu zase podílejí na krátkodobých prostorových (pracovních) paměťových procesech (McAlonan a kol. 1995) a dráhy mezi *stria diagonalis* a *gyrus cingulatus* pro změnu na schopnosti kondicionálního učení v závislosti na vizuálních podnětech (Muir a kol. 1996).

Navíc cholinergní vazby mezi bazálními jádry a amygdalou se nejspíš uplatňují při potlačování afektivního podmiňování (Selden a kol. 1991) a cholinergní dráhy mozkového kmene inervující thalamus pravděpodobně zase ovlivňují, společně s dopaminergními neurony středního mozku, procesy související s primárním nabuzením organismu a behaviorální aktivací. Tyto procesy se pak uplatňují při cyklech<sup>32</sup> souvisejících se střídáním bdělého stavu a spánku (Semba 1993), což se pravděpodobně děje prostřednictvím inhibice delta vln charakteristických pro hluboký spánek (Steriade a kol. 1991).

Obecná angažovanost cholinergního systému ve strukturách souvisejících s celkovým nabuzením organismu, pozorností a soustředěním tak např. u pokročilejší formy AD může zlepšovat některé základní behaviorální či kognitivní schopnosti, ale dle názoru, který zastává Everitt a Robbins (1997), nemůže nabuzovat/povzbuzovat to, co již vzhledem

---

<sup>32</sup> Cirkadiánní a ultradiánní (zde obzvláště spánkové) rytmy.

k pokročilé demenci neexistuje. Zároveň ale existují náznaky, že se cholinergní systém uplatňuje i při neurogenezi (Cooper-Kuhn a kol. 2004), což výše zmíněnou tezi, že by se cholinergní léčba měla zaměřit pouze na první stádia nemoci (kdy mozek ještě není tolik poškozený), do jisté míry vyvrací.

Cholinergní hypotéza spojuje cholinergní systém mozku s AD, zároveň ale hraje roli i při různých jiných onemocněních jako je např. Parkinsonova choroba (Dubois a kol. 1983), Creutzfeldt-Jakobova choroba (Arendt a kol. 1984), Downův syndrom (Yates a kol. 1980), Korsakovův syndrom (Arendt a kol. 1983) nebo *dementia pugilistica*<sup>33</sup> (Uhl a kol. 1982). Navíc je pravděpodobné, že určitý deficit ve fungování cholinergního systému se uplatňuje i při běžné nepatologické formě stařecké demence (Schliebs a Arendt 2011). Stejně tak je ale možné, že svou roli hraje (konkrétněji nAChRs) i v případě hyperkinetické poruchy spojené s poruchou pozornosti<sup>34</sup>. Postižení jsou pak více náchylní ke kompenzační nikotinové závislosti, která nahrazuje stimulaci nikotinových acetylcholinových receptorů (Potter a kol. 2006).

### 1.2.1 Acetylcholin (ACh)

Acetylcholin je neuromediátor tvořící společně se svými receptory (muskarinovými a nikotinovými), pojmenovanými podle jeho známých agonistů (muskarin a nikotin), jedny z hlavních složek cholinergního systému organismů. Svou činností podporuje funkce cholinergního systému (viz výše), které ale do dnešních dnů stále nebyly všechny dostatečně spolehlivě a uspokojivě objasněny (Van der Zee a kol. 2011).

Systematický název ACh  $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3]$  je 2-acetoxy-N,N,N-trimethylethanaminium a chemicky se jedná o ester kyseliny octové  $[\text{CH}_3\text{COOH}]$  a cholinu  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OHX}^-]$ <sup>35</sup>. Je syntetizován ChAT, enzymem (monomerní globulární

---

<sup>33</sup> Známá také jako chronická boxerská encefalopatie nebo boxerská demence.

<sup>34</sup> Známá také jako Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), dříve lehká dětská encefalopatie (LDE) či lehká mozková dysfunkce (LMD).

<sup>35</sup> X<sup>-</sup> znázorňuje anion (např. chloridový či hydroxilový).

protein; Oda 1999) vytvářeným v perikaryonech<sup>36</sup> cholinergních neuronů a dopravovaným pomocí axoplasmatického<sup>37</sup> transportu až k jejich synaptickým koncům (Frizell 1970).

ChAT katalyzuje transfer acetylové skupiny [COCH<sub>3</sub>] z acetylkoenzymu A [CH<sub>3</sub>COSCoA] na cholin za vzniku ACh a koenzymu A (CoASH) během reakce probíhající v synaptických koncích cholinergních neuronů. Zmíněný acetylkoenzym A, důležitá součást této reakce, je u savců produkován v mitochondriích z glukózy. Intracelulární cholin je zase částečně syntetizován intracelulárně (respektive získáván degradací složitějších, cholin obsahujících molekul; Blusztajn a Wurtman 1983) a částečně přejímán z extracelulární tekutiny několika transportními systémy (např. pomocí vysokoafinního cholinového přenašeče HACU<sup>38</sup>; Simon a kol. 1976, Suszkiw a Pilar 1976). Celá reakce při tom probíhá v rámci jediného kroku a to i reverzně (Oda 1999):



ACh, produkováný ChAT, se spolu se svými receptory podílí na modulaci synaptické odpovědi vycházející z interakce mezi excitačními (převážně glutamatergními; Vidal a Changeux 1993) a inhibičními vstupy (hlavně GABAergními; Alkondon a kol. 2000). Zmíněné receptory, konkrétně nikotinové (nAChRs) a muskarinové acetylcholinové receptory (mAChRs), se nacházejí na presynaptických a postsynaptických koncích neuronů v různých částech organismu. Každý typ se při tom skládá z několika skupin, které mají různé specifické funkce (Tabulka 2).

### 1.2.2 Nikotinové acetylcholinové receptory (nAChRs)

Nikotinové acetylcholinové (ionotropní) receptory se vyskytují v muskulárním a neuronálním typu a jejich struktura a podjednotky se do jisté míry liší. Odlišnost těchto dvou typů dokládají i sekvence aminokyselin podjednotek nAChRs, které se při srovnání těchto dvou typů u stejných druhů živočichů, shodují pouze ze 40 až 50 % (Sargent 1993).

---

<sup>36</sup> Tedy v tělech buněk.

<sup>37</sup> Schopnost axonu transportovat důležité látky ve směru anterográdním (od buňky) i retrográdním (k buňce).

<sup>38</sup> Zkratka „High-Affinity Choline Uptake“.

Muskulární nikotinové receptory tvoří pět proteinových podjednotek (dvě  $\alpha$  a dále po jedné  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  – ta se nachází pouze v dospělé formě a  $\gamma$  – ta místo ní jen v embryonální formě). Každá z nich se skládá ze čtyř transmembránových domén (M1–M4) a dvou extracelulárních hydrofilních segmentů (N- a C- konce). M2 doména každé podjednotky se podílí na propustnosti pórů pro kationty ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ; Galzi a Changeux 1995). Dvě podjednotky  $\alpha$  nacházející se na N-koncích receptorů jsou důležité pro navázání agonistů a jejich počet značí, že pro otevření iontového kanálu je potřeba současné vazby právě dvou molekul dané agonistické látky (ligandu; Kao a Karlin 1986).

Neuronální nikotinové receptory se skládají z extracelulárních segmentů (N- a C-konce) a čtyř hydrofóbních transmembránových domén (M1–M4; Galzi a Changeux 1995). Mají charakteristickou pentamerickou strukturu a v případě obratlovců jejich podjednotky kóduje 11 genů, což umožňuje existenci velkého množství různých nAChRs. Osm ze zmíněných genů kóduje alfa podjednotky ( $\alpha 2$ – $\alpha 9$ ) a tři kódují beta podjednotky ( $\beta 2$ – $\beta 4$ ; Graham a kol. 2003). Po tom, co se agonista nAChRs naváže na specifickou část receptoru, změní se konfigurace tohoto receptoru a otevře se vnitřní pór umožňující proudění kationtů (Graham a kol. 2003).

Nejznámějším agonistou nAChRs je bezpochyby nikotin, podle kterého tento druh cholinergních receptorů nese svůj název. Je mimo jiné známý svými povzbudivými účinky (Potter a kol. 2006). Mezi antagonisty nAChRs pak patří např. některé látky obsažené v jedech, jako jsou třeba šípové jedy kurare a mnohé další. Jedním z kurare jedů je i tubokurare<sup>39</sup>, mezi jehož nejvýznamnější toxiny patří alkaloid tubokurarin<sup>40</sup> získávaný z rostliny *Chondrodendron tomentosum* (chondrodendron plstnatý) a vážící se na nAChRs PNS (Roerig a kol. 1997). Mezi další významné antagonisty pak patří ještě další rostlinné alkaloidy jako třeba dihydro- $\beta$ -erythroidin (DHBE) obsažený v semenech rostlin rodu *Erythrina* (zarděnice) nebo N-methyllycaconitin získávaný ze semen rostliny *Delphinium brownii* (druh stračky; Dwoskin 2000). Ale stejně tak existují antagonisty i v rámci živočišných jedů. Jako např.  $\alpha$ -bungarotoxin a n-bungarotoxin obsažené v jedu hada *Bungarus multicinctus* (bungar pruhovaný; Luetje 1990).

---

<sup>39</sup> Název je odvozen ze způsobu skladování v bambusových tyčích. Používá se také označení bambusové kurare či moderněji Menispermaceae-kurare podle rostlin čeledi chebulovité/lunoplodovité.

<sup>40</sup> Známy též jako d-tubokurare nebo DTC.

Mezi další důležité látky vážící se na nAChRs a ovlivňující fungování nikotinového cholinergního systému jsou také alosterické ligandy<sup>41</sup>. Ty mohou působit jako aktivátory, ale i inhibitory nikotinových receptorů. Pokud působí jako aktivátory, prodlužují dobu, po kterou je otevřen iontový kanál a zvyšují iontovou vodivost (Pereira a kol. 1993). Organofosforické anticholinesterázy (AChEI) patří mezi aktivátory nikotinových receptorů (Liu a Kato 1994), zatímco jiné, jako různá anestetika, etanol či barbituráty, zase mezi inhibitory (Paterson a Nordberg 2000).

Nikotinové acetylcholinové receptory jsou všechny propustné pro sodné, draselné a vápenaté ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ ), nicméně permeabilita<sup>42</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  je u neuronálního typu mnohem vyšší, než u muskulárního (Seguela a kol. 1993, Vernino a kol. 1994). Díky tomu mohou nAChRs způsobit výrazné zvýšení intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrace (Mulle a kol. 1992), která pak může mít vliv na synaptickou plasticitu (McGehee 2002). Důležitá je ale i neurotropní role nAChRs při formování synapsí a neuritické refrakci během raného vývoje (Torrao a Britto 2002).

Presynaptické umístění neuronálních nAChRs jim při aktivaci umožňuje modulovat množství uvolňovaných neurotransmiterů a to tím, že regulují intracelulární koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , která má na zmíněné uvolňování značný vliv (Wonnacott 1997). Nikotinové receptory se ale nacházejí i na postsynaptické úrovni (Frazier a kol. 1998), kde jejich aktivace spouští rychlý zpětný tok kationtů (Alkondon a kol. 2000). Extrasynaptické nAChRs pak upravují některé neuronální funkce (Lindstrom 1997) jako třeba uvolňování neurotransmiterů nebo lokální vzrušivost (Dani 2001).

### 1.2.3 Muscarinové acetylcholinové receptory (mAChRs)

Muscarinové acetylcholinové receptory jsou metabotropní<sup>43</sup>, rozlišuje se u nich pět typů ( $M_1$ – $M_5$ ) vytvářených proteiny generovanými pěti různými geny (m1–m5). Každý muskarinový receptor tvoří glykoprotein se sedmi transmembránovými šroubovicemi, extracelulárním N-koncem a intracelulárním C-koncem (Hulme a kol. 1990). Každý z pěti

---

<sup>41</sup> Nazývané také alosterické regulátory.

<sup>42</sup> Schopnost membrán propouštět tekutiny (propustnost).

<sup>43</sup> Označované také jako „receptory spřažené s G-proteiny“.

typů mAChRs se váže k jiným G-proteinům, které mohou modulovat (buď přímo, nebo pomocí druhých posluš<sup>44</sup>) aktivaci iontových kanálů (Nathanson 2000).

Mezi mAChRs existují dvě skupiny, které vzájemně liší svým působením a funkcemi (a to více než v rámci dané skupiny; viz Tabulka 2). Konkrétně jde o skupinu tvořenou typy M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> a M<sub>5</sub> a o skupinu do které se řadí typy M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub>. První skupina stimuluje skrze na *toxinum pertussis*<sup>45</sup> necitlivý G-protein (G<sub>q/11</sub>) fosfoinozitolovou cestu, která může uzavírat K<sup>+</sup> kanál a tím buňky depolarizovat. Druhá skupina receptorů zase inhibuje adenylátcyklázu skrze na *toxinum pertussis* citlivý G-protein (G<sub>i</sub>), čímž může inhibovat transmembránový Ca<sup>2+</sup> kanál (Egan a North 1986, Caulfield a Birdsall 1998).

Mezi agonisty mAChRs patří muskarin (podle kterého tyto receptory získaly své jméno) – alkaloid získávaný z jedovaté houby *Amanita muscaria* (muchomůrka červená; Caulfield a Birdsall 1998). Mezi antagonisty pak např. atropin, alkaloid obsažený v rostlině *Atropa belladonna* (rulík zlomocný; Ehlert a kol. 1991) nebo MT-7, toxin obsažený v jedu hada *Dendroaspis angusticeps* (mamba zelená; Adem a Karlsson 1997). Velkým problémem je ale stále nedostatek dostatečně selektivních agonistů a antagonistů pro jednotlivé skupiny a typy mAChRs (Caulfield a Birdsall 1998, Van der Zee a kol. 2011).

Muscarinové receptory jsou přítomny v centrálním i periferním nervovém systému jak pre, tak post i extra-synapticky (Caulfield a Birdsall 1998, Mrzljak a kol. 1998). Postsynaptické mAChRs způsobují depolarizaci neuronů inhibicí různých K<sup>+</sup> toků (McCormick a Prince 1986, Madison a kol. 1987, Zhang a kol. 1992), ale mohou také např. inhibovat Ca<sup>2+</sup> kanály v hippocampu (Gähwiler a Brown 1987). M<sub>1</sub> a M<sub>3</sub> receptory se vyskytují na postsynaptické úrovni (Levey a kol. 1991), M<sub>2</sub> a M<sub>4</sub> zase na presynaptické, kde se buď jako autoreceptory podílejí na negativní zpětné vazbě (Zhang a kol. 2002), nebo jako heteroreceptory regulují synaptickou transmissi působením na Ca<sup>2+</sup> kanály (Van der Zee a Luiten 1999). Jakou funkci mají mAChRs typu M<sub>5</sub> nacházející se v povrchových vrstvách mozkové kůry zatím ještě zjištěno nebylo (Reever a kol. 1997, Van der Zee a kol. 2011).

---

<sup>44</sup> Anglicky „second messenger“.

<sup>45</sup> Toxin produkovaný bakterií *bordetella pertussis*, původcem černého kašle (pertuse).

### 1.2.4 Acetylcholinesteráza (AChE)

Acetylcholinesterázy<sup>46</sup> (AChEs) hydrolyzují neuromediátor ACh na ionty kyseliny octové ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) a cholinu ( $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}^-$ , jinak též bilineurin), čímž ukončují neurotransmisi na cholinergních synapsích. Mají proto velmi důležitou úlohu v cholinergním systému a jejich inhibitory bývají často velmi toxické, čehož se využívá např. při výrobě pesticidů či chemických zbraní jako jsou nervové plyny (Giacobini 2000). Používají se ale i při léčbě různých patologií, jako je třeba AD (viz výše).

Stejně jako jiné ChE patří mezi serinové hydrolázy. Ty se navzájem odlišují podle toho, jaký substrát hydrolyzují. AChEs nejvíce působí na cholinový ester ACh a výrazně méně hydrolyzují butyrylcholin (BCh). Ten je zase mnohem účinněji rozkládán (společně např. s propionylcholinem) butyrycholinesterázami<sup>47</sup> (BChEs), které patří mezi nespecifické ChE. Ty na rozdíl od AChEs nemají specifický substrát, na který by působily více než na jiné estery (Massoulié a Bon 1982).

U bezobratlých se vyskytuje variabilní počet cholinesterázových genů (jediný u octomilky obecné – Hall a Spierer 1986, čtyři různé geny u háďátka obecného – Combes a kol. 2000). Obratlovci ale mají pro AChE jediný gen (Massoulié a kol. 1993) a ptáci i savci navíc vlastní speciální gen pro BChE (Arpagaus a kol. 1990). Funkce jeho produktu je ale do určité míry zahalena tajemstvím (Whittaker 1993).

U člověka existuje velké množství lidských alelických variant BChE (Bartels a kol. 1992) a produkce samotného enzymu v podstatě není příliš nutná (absence nevyvolává žádnou patologii). Jedinou známou výjimkou je událost, při níž je jedinec vystaven působení sukcinylcholinu (např. ve formě myorelaxans během chirurgického zákroku). Pokud tato sloučenina není hydrolyzována působením BChE, může dojít následně k zástavě dýchání. Vzhledem k tomu, že se BChE vyskytuje v rozpustné podobě v plasmě savců, je možné, že slouží jako pojistka proti difúzi ACh do krevního řečiště. Zároveň ale možná slouží díky svému širokému okruhu substrátů i jako obrana proti orálně podaným toxickým látkám

---

<sup>46</sup> Systematický (IUPAC) název: *acetylcholine acetylhydrolase*, EC 3.1.1.7.

<sup>47</sup> Systematický (IUPAC) název: *acetylcholine acylhydrolase*, EC 3.1.1.8; vzhledem k nomenklatuře se nabízí i název propionylcholinesteráza.

jako jsou různé pesticidy či rostlinné alkaloidy včetně kokainu (Neville a kol. 1990, Lockridge a Masson 2000).

Katalytické domény AChE a BChE tvoří kulovitá seskupení vytvářená  $\beta$  skládanými listy<sup>48</sup> a  $\alpha$  šroubovicemi (skladba  $\alpha/\beta$ ; Ollis a kol. 1992) podobně jako u jiných esteráz (Cousin a kol. 1998). Vzhledem k rychlému působení AChE při hydrolyze ACh (vysoká katalytická aktivita) je pozoruhodné, že aktivní část proteinu se nachází uvnitř úzké a dlouhé dutiny a může tak být dosažena jen relativně těžko. Na rozdíl od BChE se vyskytují u AChE v okolí její katalytické dutiny (obsahující aktivní místo enzymu) aromatické zbytky, které u AChE vytváří acylovou kapsu, což jí umožňuje zmíněnou specifitu pro ACh (BCh přes tuto překážku neprojde; Harel a kol. 1992, Vellom a kol. 1993).

Substráty a inhibitory se ale mohou vázat i na periferní části nacházející se u vstupu do katalytické dutiny, která pravděpodobně slouží jako první vazební místo pro pozitivně nabitě substráty na jejich cestě k aktivnímu místu (Szegletes a kol. 1999, Mallender a kol. 2000). Rozložení nabitých reziduí v proteinu pak generuje elektrostatický dipól, který s velkou pravděpodobností<sup>49</sup> přitahuje pozitivně nabitě substráty směrem k aktivnímu místu enzymu a možná tím i vysvětluje, proč se toto aktivní místo nalézá tak hluboko uvnitř úzké katalytické prolákliny (Ripoll a kol. 1993).

Katalytická doména AChE se skládá z N- a C-konce, které vzájemně nedotýkají, ale přesto jsou spolu v úzkém kontaktu. Stabilita či flexibilita enzymu se pak různě mění v závislosti na mutagenезi reziduí nacházejících se právě v tomto regionu (Morel a kol. 1999).

Gen pro AChE produkuje různé katalytické podjednotky (Obrázek 3), které obsahují stejné katalytické domény pojící se s různými C-terminálními peptidy (Massoulié a kol. 1998). U obratlovců se vyskytují různé typy AChE podjednotek, přičemž nejznámější jsou typy R („Readthrough“; AChE<sub>R</sub>), H („Hydrophobic“; AChE<sub>H</sub>) a T („Tailed“; AChE<sub>T</sub>).

AChE<sub>R</sub> je rozpustný monomer, který se vyskytuje v embryonálních tkáních a v buněčných kulturách (Li a kol. 1991). Jeho výskyt se různí v závislosti na biologickém druhu

---

<sup>48</sup> Anglicky „ $\beta$  sheets“.

<sup>49</sup> Ačkoli to ještě nebylo dostatečně věrohodně prokázáno (Shafferman a kol. 1994).

(v myších erythrocytech, ale v lidských ne; Li a kol. 1993), ale také vzhledem k vnějším stresovým faktorům (oproti běžnému stavu se vyskytuje i v myších mozcích, pokud jsou myši podrobeny stresovým zátěžovým situacím; Kaufer a kol. 1998).

AChE<sub>H</sub> tvoří dimery s glykofosfatidylinositolovými (GPI)<sup>50</sup> kotvami. Tento enzym je obsažen v různých tkáních parejnoka elektrického (svaly, elektrický orgán), ale vyskytuje se i u savců. Hlavně v jejich hematopoetických buňkách<sup>51</sup>, kde může participovat na eliminaci ACh z krevního řečiště. U kostnatých ryb<sup>52</sup>, plazů a ptáků ale nalezen nebyl.

AChE<sub>T</sub> vytváří široké množství oligomerických forem včetně homo-oligomerů (monomery, dimery a tetrametry), ale i heteromerické vazby tetrametrů s kolagenem Q (ColQ) nebo s membránovou kotvou bohatou na prolin (PRiMA)<sup>53</sup>. Tyto podjednotky existují u všech druhů obratlovců a jsou jediným typem podjednotek vyskytujícím se u BChE (Massoulié a kol. 1998).

Kromě těchto tří známějších typů katalytických podjednotek existuje i tzv. S forma („Soluble“), která byla objevena u rodů hadů *Bungarus* a *Naja* čeledi korálovcovití (Frobert a kol. 1997). Tito hadi produkují monomery AChE prostřednictvím svých jedových žláz, ale ačkoli jsou v jejich jedu ve velkém množství, patrně nepřispívají k jeho toxicitě (Cousin a kol. 1996).

### 1.2.5 Inhibitory Acetylcholinesterázy (AChEIs)

Existují různé třídy AChEI. Patří mezi ně např. aminoakridiny (včetně takrinu), kabarmáty (jako třeba fysostigmin, nebo rivastigmin), benzylpiperidiny (donepezil), terciální alkaloidy (galantamin; Dale a kol. 2003) nebo různé organofosfáty čítající nejrůznější nervové plyny (tabun, sarin, soman, cyklosarin) a pesticidy (chlorpyrifos, diazinon, malation; Pohanka a kol. 2008).

---

<sup>50</sup> Z anglického názvu „glycophosphatidylinositol“.

<sup>51</sup> Neboli v buňkách podílejících se na krvetvorbě.

<sup>52</sup> Jeden z používaných českých názvů pro parafyletickou skupinu *Osteichthyes* (Ryby).

<sup>53</sup> Z anglického názvu „proline-rich membrane anchor“.

AChEIs inhibují aktivitu enzymu AChE a tím zvyšují hladinu a dobu působení ACh na jeho receptory (Dale a kol. 2003). Některé, jako donepezil, působí reverzibilně (kompetitivně blokací deacetylačního procesu, ale i nekompetitivně; Nochi a kol. 1995) – reverzibilně se váží na hydrofobní region enzymu, čímž alostericky modulují jeho katalytickou aktivitu (Snape a kol. 1996). Jiné, třeba jako karbamát heptylfyzostigmin, působí „pseudoreverzibilně“ – enzym tyto inhibitory štěpí, což vede k jeho kovalentní modifikaci. Takováto inhibice je nekompetitivní (s ACh) a nevratná. Avšak spojení karbamátu s esterickou částí je (díky rychlému metabolismu a rychlé dekarbamylaci, která ChE regeneruje) jen dočasné (řádově několik minut; Moriearty a Becker 1992). Zbytek jako třeba metrifonat nebo zmíněné organofosfátové jedy působí ireverzibilně (Ringman a Cummings 1999).

Mnoho těchto látek je používáno k léčbě různých patologií včetně AD (viz výše a Tabulka 1). Mimo jiné mezi ně patří látka 7-MEOTA [9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin] odvozená od takrinu [9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin]. Ta je díky pozměněné molekulární struktuře mnohem méně toxická než zmíněný takrin a některé její analogy [N-alkyl-7-methoxytakrin] jsou na tom podobně. Důležitá je při tom struktura daných analogů (respektive délka jejich alkylového zbytku; Korabecny a kol. 2010).

Připojení 7-methoxy skupiny k molekule takrinu vede ke snížení inhibičních schopností výsledné sloučeniny, ale zároveň snižuje výše zmíněnou toxicitu do tolerovatelných mezí. Následná alkylace aromatické aminové skupiny látky 7-MEOTA (Obrázek 4) pak ukazuje další zajímavé výsledky. Zatímco alkylové skupiny  $C_2$ – $C_4$ <sup>54</sup> a  $C_{10}$ – $C_{15}$  jsou méně efektivní ChEI, anebo tímto způsobem neúčinkují vůbec, sloučeniny obsahující řetězce  $C_5$ – $C_9$  projevují lepší výsledky než samotná látka 7-MEOTA, od které jsou odvozené. Konkrétně látka s hexylovým řetězcem se ukazuje být výrazným AChEI a látka s heptylovým řetězcem zase např. dobrým BChEI (i když horším než takrin). Navíc látka s dodecylovým alkylovým řetězcem ( $C_{12}$ ) se zdá být selektivním AChEI bez jakékoli inhibice BChE, což může být velmi slibný fakt při léčbě AD (Korabecny a kol. 2010).

Některé studie (Dale a kol. 2003) totiž selektivní AChEI upřednostňují, protože způsobují méně nežádoucích vedlejších efektů než neselektivní, inhibující i BChE. Přesto ale existují

---

<sup>54</sup> Označení dle délky alkylových řetězců (počtu uhlíkových atomů).

i studie, které vyzdvihují lepší terapeutický účinek neselektivních ChEI (Bartorelli a kol. 2005) jako je rivastigmin.

Výzkum ChEI i nadále pokračuje a podobných projektů je celá řada (Mangialasche a kol. 2010). Snad jednou dosáhnou cíle v podobě léčiva schopného vývoj té či oné patologie zastavit či zvrátit. Podobný cíl si vytkla i tato diplomová práce. Pomocí testování látek potenciálně vhodných pro cholinomimetickou symptomatickou léčbu AD přispět k objevení nových léků, které by pomohly zmírnit obtíže pacientů a zátěž kladenou na jejich nejbližší.

## **2 Cíl práce**

Vzhledem k dobrým inhibičním vlastnostem některých zkoumaných analogů látky 7-MEOTA se nabízí hypotéza, že i některé další deriváty této látky mohou vykazovat stejné, nebo lepší inhibiční vlastnosti uplatnitelné při léčbě AD. Možná dokonce lepší než ty, které byly pozorovány u analogů, jež byly prozkoumány už dříve.

Od kolegů z Hradce Králové získala Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku (LBPM) Psychiatrického centra Praha (PCP) k otestování 7 nových sloučenin (viz kapitola materiál) a cílem této diplomové práce pak bylo stanovit jejich účinek na enzymatickou aktivitu AChE. Konkrétně pak intenzitu a typ inhibice, kterým na enzym působí.

## **3 Materiál**

K získání analyzovatelných dat bylo vždy nutné si připravit směs chemických sloučenin. Kromě enzymu a inhibitoru také substrát acetylthiocholin a Ellmanovo činidlo, známé též pod zkratkou DTNB.

Acetylthiocholin (ATCh) je rozkládán acetylcholinesterázou stejně jako neurotransmitter acetylcholin, ale obsahuje navíc thio skupinu. Ta po rozpadu acetylthiocholinu reaguje s Ellmanovým činidlem, což způsobuje žluté zbarvení roztoku. To je pak možné měřit prostřednictvím spektrofotometru a následně analyzovat za použití vhodných softwarových nástrojů.

Pro stanovení aktivity cholinesteráz byla vyvinuta celá řada metodik – kolorimetrické (Hestrin 1949), titrační (Nenner 1970), elektrometrické (Michel 1949), spektrofotometrické (Voss a Sachsse 1970), enzymové (Abernethy a kol. 1986), měření za pomoci změny pH s využitím indikátoru (Winter 1960) a další. Řada z nich je ale velmi náročná na úpravu vzorků, na čas potřebný k měření apod. (Worek a kol. 1999).

Pro získání analyzovatelných dat proto byla zvolena kolorimetrická Ellmanova metodika (Ellman a kol. 1961), která je velmi citlivá a zároveň i dostatečně efektivní. Metodika je v diplomové práci rozdělena na část popisující přípravu, zpracování a uchovávání materiálu, sekci zahrnující extrakci dat a část týkající se analýzy údajů, které byly z materiálu extrahovány.

### 3.1 Příprava reakční směsi

Do každé plastové kyvety byl vždy pipetován roztok následujících sloučenin:

1. 0,5 ml 150 milimolárního (mM) lehce zásaditého sodného pufru (Na-P) pH<sup>55</sup> 8,0
2. 0,2 ml redestilované vody (H<sub>2</sub>O) pro kontrolní směs bez inhibitoru na začátku každé série měření, nebo 0,1 ml jednotlivých inhibitorů AChE v různých koncentracích a 0,1 ml H<sub>2</sub>O
3. 0,1 ml 5 mM DTNB naředěný v 250 mM Na-P pH 8,0
4. 0,1 ml vzorku AChE společně s 10 mM Na-P pH 7,0, jedno-molárním roztokem kuchyňské soli (1 M NaCl), 50 mM chloridem hořečnatým (MgCl<sub>2</sub>) a jednoprocenním roztokem surfaktantu<sup>56</sup> C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub> známého pod označením Triton X-100
5. 0,1 ml 5 mM roztoku substrátu ATCh

Látky byly do kyvet pipetovány v pořadí, jaké je naznačeno na předchozím seznamu. Základem byl vždy 150 mM sodný pufr (používána mikropipeta s maximem 1 ml), do kterého buď byly přidány 0,2 ml čisté vody, anebo 0,1 ml AChEI a 0,1 ml H<sub>2</sub>O (používána jedna mikropipeta s maximem 0,1 ml).

---

<sup>55</sup> Z anglického „potential of hydrogen“, česky též vodíkový exponent. Vyjadřuje kyselost či zásaditost roztoku.

<sup>56</sup> Jinak nazýván také tenzid, saponát, či smáčedlo. Nejběžnějším příkladem surfaktantu je mýdlo.

0,2 ml H<sub>2</sub>O bylo pipetováno na začátku každého dubletu či tripletu měření, aby se zkontrolovalo, zda byl spektrofotometr i reakční směs připraveny správně. Zároveň ale také proto, aby v rámci zobrazovacího systému spektrofotometru (SW dodávaného se zařízením, běžícího pod operačním systémem MS Windows) byla vynesena křivka (v ideálním případě přímka), podle které by bylo možné porovnávat všechny následující měření obsahující rostoucí koncentrace inhibitorů.

Následně byly přidány 0,2 ml DTNB (rozpuštěného v 250 mM sodném pufru) smíchaného se směsí enzymu (AChE) a dalších látek (chloridy, neutrální pufr, sufraktant). Tento roztok (v seznamu tvořený body 3. a 4.) byl vždy připraven na počátku celého testovacího dne (tak aby hodnoty byly snadno srovnatelné) a uchováván při snížené teplotě v lednici (používána mikropipeta s maximem 0,2 ml). Původní roztoky (3 a 4) byly ale většinou připraveny samostatně (i když to nebyla úplná nutnost) a slity do jednoho a promíchány (v uzavřené zkumavce rotací ruky) až těsně před započítáním sérií měření na spektrofotometru.

Reakční směs byla nakonec aktivována přidáním substrátu ATCh. Otvor kyvety byl zakryt čtverečkem parafilmu<sup>57</sup> a obsah protřepán rotací ruky. Kyveta vložena do spektrofotometru, v měřícím SW vynulovány hodnoty absorpčních jednotek (AU)<sup>58</sup> a spuštěno měření.

Roztok pufru s chloridem sodným a hořečnatým pro ředění enzymu byl připraven na začátku následující řady pokusů a uchováván v ledničce při zhruba 4°C. Pro přípravu výsledné směsi pipetované do kyvet byla tedy vždy využívána tato stejná směs.

Stejně tak roztok Tritonu X-100 byl uchováván při snížené teplotě. Připraven byl 25% a při každé sérii pokusů pak byl naředěn na 1%.

NaCl, MgCl<sub>2</sub>, Triton X-100, krystalický ATCh a ACh (chemická čistota p.a.), redestilovaná voda a sodné pufrы o různých pH byly uchovávány při pokojové teplotě.

---

<sup>57</sup> Laboratorní folie z parafinového (petrolejového) vosku.

<sup>58</sup> Z anglického „Absorbance Units“. Absorbance, ve spektroskopii také nazývaná optická hustota, určuje poměr záření dopadajícího na materiál a té jeho části, která skrze něj prochází. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, ale pro zlepšení komunikace se AU používá jako arbitrární jednotka.

Všechny pipety byly kalibrovány vážením příslušného objemu redestilované vody na analytické váze.

### 3.1.1 Zkoumané inhibitory AChE

Sedmi zkoumaným látkám odvozeným od 7-MEOTA byla přiřazena označení PC\_6, PC\_13, PC\_32, PC\_37, PC\_41, PC\_48 a PC\_49 (jejich strukturální vzorce viz Obrázek 5). Vždy se jednalo o trihydrochloridy ( $\cdot 3\text{HCl}$ ), u kterých byl na aromatickou amino-skupinu připojen alkylový řetězec obsahující mimo jiné pyrazinový heterocyklus (benzenové jádro s atomy dusíku místo 1. a 4. uhlíku).

Pro testování byly inhibitory (krystalické látky) rozpuštěny v redestilované vodě. Nejprve byl připraven nejsilnější 3 mM roztok, který byl dále ředěn. Vznikly tak další roztoky o 1 mM, 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  a 1  $\mu\text{M}$  koncentraci. Do kyvety bylo následně pipetováno vždy 0,1 ml. Proto byla výsledná koncentrace v testovaném vzorku pokaždé jen desetinná. V kyvetách tak byla jedna z následujících koncentrací 300  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , nebo pro kontrolu  $\text{H}_2\text{O}$ . Pouze u některých AChEI byly použity koncentrace 33  $\mu\text{M}$ , 3,3  $\mu\text{M}$  a 0,33  $\mu\text{M}$  (v důsledku trochu jiného způsobu ředění), což bylo vždy důsledně zaneseno do protokolu. Zkumavky s roztokem byly pokaždé řádně protřepány laboratorními míchačkami.

Při testování každé série bylo pokaždé postupováno od redestilované vody a nejnižší koncentrace inhibitoru až po ty nejvyšší. Nebylo proto třeba tak často měnit pipetovací špičky. Využívána byla 5 ml a 0,2 ml pipeta.

Nejnižší koncentrace inhibitoru byla volena tak, aby byl vliv inhibitoru na enzymatickou aktivitu minimální, nejlépe zanedbatelný. Jednalo se tedy i o určitý způsob kontroly při porovnání výsledků s roztokem bez inhibitoru (na zobrazovacím zařízení – viz kapitola Použití spektrofotometru), který byl také testován na začátku každé série měření rostoucích koncentrací inhibitoru pro danou koncentraci substrátu. Různé látky ale způsobovaly různě silnou inhibici. Proto pro některé inhibitory byla nejnižší koncentrace 0,1  $\mu\text{M}$  a pro jiné 0,3  $\mu\text{M}$  (případně 0,33  $\mu\text{M}$ ).

Všechny testované inhibitory byly v dodané formě krystalické látky, které bylo nejprve nutné navážít na laboratorních vahách, a pak rozpustit v odpovídajícím množství H<sub>2</sub>O. Molekulární váhy jednotlivých AChEI byly následující:

- PC\_6: 539,74
- PC\_13: 553,99
- PC\_32: 568,02
- PC\_37: 553,99
- PC\_41: 586,06
- PC\_48: 618,86
- PC\_49: 487,79

Pro kontrolu a srovnání výsledků byly stejným způsobem připraveny a proměřeny látky 7-MEOTA a ACh. Tedy AChEI, od kterého byly všechny ostatní zkoumané inhibitory odvozeny a neurotransmitter, který se běžně nachází v lidském těle, a který byl během pokusů nahrazen látkou ATCh. V tomto případě ale acetylcholin působil jako kompetitivní inhibitor substrátu acetylthiocholinu.

Molekulární váhy těchto dvou látek byly:

- 7-MEOTA: 250,72
- ACh: 273,12

### **3.1.2 Substrát acetylthiocholin (ATCh)**

Substrát acetylthiocholin (C<sub>7</sub>H<sub>16</sub>NOS) byl vždy připravován ve čtyřech různých koncentracích – 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM a 0,8 mM. Základní koncentrace byla 0,5 mM, ze které byly většinou naředěny i obě slabší koncentrace. 0,5 mM ATCh bylo tedy připraveno nejvíce a zároveň byl pro všechny koncentrace inhibitorů vždy proměřován třikrát – tedy vždy byly provedeny 3 série měření (triplet či triplikát). Hlavně proto, aby se vyloučily jakékoli chyby (v postupech pipetování apod.). Zbylé tři koncentrace substrátu byly použity pro 2 série měření (dublet či duplikát). Jen v některých případech bylo sérií naměřeno více, pokud bylo potřeba hodnoty více zpřesnit či verifikovat.

Do zásoby se pravidelně připravoval vodný roztok krystalického ATCh s přídavkem 1  $\mu\text{mol}$  kyseliny chlorovodíkové (kvůli vyšší stabilitě ATCh v mírně kyselém prostředí) o vyšší molární koncentraci, který byl pak před proměřováním určitého inhibitoru vždy naředěn. Nebylo proto potřeba tak často opětovně navažovat krystalickou látku a také se tím zamezovalo případným chybám, které by při tomto procesu mohly vzniknout. Zároveň se tím i zvyšovala pravděpodobnost, že se koncentrace roztoků použitých při měření inhibice enzymatické aktivity bude vzájemně lišit jen zanedbatelně. Nevyužitý zásobní roztok byl skladován při  $-40^{\circ}\text{C}$  v mrazničce.

### 3.1.3 Ellmanovo činidlo (DTNB)

Ellmanovo činidlo (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová) je žlutá krystalická látka (jemný prášek), která se rozpouští v mírně zásaditém sodném pufru (pH 8,0). K naředění byla použita 250 mM koncentrace. Jak již bylo zmíněno výše, reaguje s thio skupinou (SH) acetylthiocholinu za průběžného žloutnutí pipetovaného roztoku.

ATCh je nejprve rozštěpen (hydrolyzován) acetylcholinesterázou na kyselinu octovou [ $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ] a thiocholin [ $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}^-$ ]. Thiocholin následně reaguje s DTNB za vzniku 5-merkpto-2-nitrobenového aniontu ( $\text{TNB}^-$ ), který je detekovatelný fotometricky při vlnové délce 412 nanometrů (nm) – viz Obrázek 6 (Žďárová-Karasová a kol. 2010).

Stejně jako ATCh byl připravován ve vyšší koncentraci do zásoby. Před každou sadou měření pak byl tento roztok rozmrazen a naředěn do potřebné finální koncentrace.

### 3.1.4 Enzym acetylcholinesteráza (AChE)

Podobně jako DTNB nebo ATCh i enzym acetylcholinesteráza byl připravován do zásoby a zbytek vždy zamrazován při teplotě  $-40^{\circ}\text{C}$ . Byl získáván z mozkové tkáně (vypreparovaný mozek bez mozečku a čichových bulbů) potkanů z chovné stanice LBPM. Potkany (dospělí samci laboratorního kmene potkanů Wistar, stáří cca 2 měsíce) usmrcovali zaměstnanci chovné stanice.

Získaný vzorek mozku byl vždy pečlivě navážen na laboratorních vahách – nejprve v transportním obalu (hliníková fólie – alobal), pak samotný obal a rozdíl byl zaznamenán jako váha štetu. Poté byl vzorek nakrájen skalpelem na drobnější kusy a následně

homogenizován ve slaném pufru (připraveným podle postupu publikovaném Suzanne Bon a kol. 1979), který se skládal z 10 mM neutrálního sodného pufru (Na-P pH 7,0), 1 M NaCl a 50 mM MgCl<sub>2</sub>.

Rozdrcení a rozmělnění preparátu probíhalo v Potter-Elvehjemově glass-teflon homogenizéru při 1200 otáčkách za minutu v zhruba 10 ml slaného pufru. Palička homogenizéru projela zkumavkou vždy pětkrát, pak byla směs chvíli chlazená a poté znovu pětkrát promixována.

Potom byly zkumavky promyty ještě dalšími přibližně 6 ml tohoto roztoku a vše bylo slito do jedné větší uzavíratelné zkumavky, která pak byla doplněna uvedeným pufrům na 20 ml objemu. Následně byl do roztoku přidán 1 ml 20 procentního Tritonu X-100, tak aby jeho finální koncentrace ve směsi byla 1%.

Zkumavka se pevně uzavřela a byla promíchávána rotací ruky vždy po 2 minutách po dobu 10 minut, tak aby se zintenzivnilo působení surfaktantu (narušování buněčných membrán). Mezi tím se směs pokaždé chladila v přepravním boxu naplněným ledem. Poté, byla látka rozlita rovnoměrně do dvou připravených zkumavek a centrifugována v přístroji Beckman J2-HS při 13000 otáčkách za minutu a 4°C po dobu 30 minut. Supernatant<sup>59</sup> pak byl pozorně přelit do další zkumavky, tak aby se do tekutiny nedostal pelet a následně rozpipetován do 2 ml zkumavek a zamražen při -40°C.

Všechny tyto mikrozkušavky byly pečlivě označeny včetně data přípravy. Uchováváním (i při nízkých teplotách) totiž aktivita enzymu postupně klesá a musí pak být kompenzována snižováním podílu extrakčního slaného pufru do finálního roztoku před danou sérií měření.

Před přípravou testované směsi byl vždy potřebný počet mikrozkušavek rozmražen a 15 minut centrifugován ve stolní laboratorní odstředivce (Eppendorf 5415R) při 12 000 otáčkách za minutu a 4°C. To odstranilo zbylé nečistoty, které se v roztoku mohly vyskytovat. Supernatant byl potom pomocí extrakčního pufru rozředěn do potřebné

---

<sup>59</sup> Tekutina nacházející se nad odstředěným sedimentem.

koncentrace, následně smíchán s naředěným DTNB a během testování roztoku v kyvetách uchovávan v chladničce při snížené teplotě.

### 3.2 Použití spektrofotometru

K měření zabarvení roztoku byl použit spektrofotometr Shimadzu UV-2101PC nastavený na absorpenci 412 nm. Snímal tedy množství fialového světla, kousek za hranicí ultrafialového (400nm), procházejícího roztokem. Intenzita tohoto světelného spektra se přitom průběžně měnila s tím, jak se měnila barva roztoku postupným štěpením ATCh. Všechna měření na spektrofotometru probíhala za pokojové teploty.

Měření u každého zkoumaného roztoku (směsí s určitou koncentrací analyzovaného inhibitoru) probíhalo vždy po dobu 120 sekund. Každou půl-sekundu jeden odečet. Během této doby byly do grafu postupně zaznamenávány hodnoty značící rostoucí množství AU (osa x představovala čas v sekundách a osa y absorpční jednotky). Vynesená závislost byla prakticky vždy lineární. Čím větší byl sklon proložené přímky, tím slabší byla inhibice (vždy u kontrol bez inhibitoru nebo u nejnižších koncentrací AChEI). Nejsilnější inhibice, kterou měly pokaždé nejsilnější koncentrace inhibitorů, byla vždy značena vodorovnou nebo téměř vodorovnou čarou. Hodnoty mohly být i záporné (nepřímá úměra), protože na počátku všech měření byl přístroj kalibrován tak, aby všechna následující měření byla vždy co nejlépe a nejpochopitelněji lineárně zachycena. Použita při tom byla reakční směs bez enzymu („blank“).

Pokud křivka nebyla příliš lineární, jednalo se pokaždé téměř jistě o chybu. Občas se například stalo, že při protřepávání roztoku v kyvetě uniklo na její povrch nepatrné množství tekutiny, které pak výsledky měření enzymatické aktivity roztoku obsaženého v dané kyvetě značně zkreslilo. Pouze u dvou zkoumaných inhibitorů (PC\_41 a PC\_48) došlo při nejvyšších koncentracích k zakalení roztoku v kyvetě a k abnormálním výsledkům absorpance. Proto u nich nemohly být nejvyšší koncentrace použity.

Shimadzu UV-2101PC je schopný v paměti udržet bohužel maximálně jen 10 záznamů. Proto musely výsledky měření často exportovány. Tento spektrofotometr používá formát souborů DIF (Data Interchange Format). Jedná se o textový formát, který byl vyvinut na začátku osmdesátých let a je široce kompatibilní i se soudobými tabulkovými kalkulátory

(kromě produktů firmy Microsoft například kancelářské balíky OpenOffice.org a další). Pro další analýzu pak byly využity aplikace MS Excel a GraphPad Prism 3.0 (dále jen GraphPad).

### 3.3 Příprava dat pomocí analytického software (SW)

Získaná data převedená z formátu DIF do aplikace MS Excel (XLS či XLSX)<sup>60</sup> byla následně „fitována“ (napasována, proložena) lineární regresí v programu GraphPad (nezávislá proměnná x – bod v čase během měření, závislé proměnné y – naměřené hodnoty AU). Byla tím vypočtena směrnice přímky, která udávala AU za jednotku času v daném vzorku.

V rámci tabulkového kalkulátoru MS Excel pak byly všechny odpovídající hodnoty jednotlivých dubletů či tripletů získaných směrníc zprůměrovány. Tak aby pro každou koncentraci inhibitoru při dané koncentraci substrátu, vyšla jedna konkrétní hodnota (hodnota blanku byla odečtena již dříve – viz kalibrace v předcházející kapitole). Pro každý zkoumaný inhibitor (včetně kontrolních 7-MEOTA a ACh) tak vzhledem ke čtyřem různým koncentracím substrátu (viz výše) vznikly 4 sady údajů.

Z těchto průměrů byl následně vypočten průměr za minutu (hodnota\*60), který byl dále přepočten na průměr/min na 1 ml použitého enzymatického preparátu. Při tom bylo nutné věnovat pozornost poměru extrakčního pufu k rozmražené látce (ke které se vždy přidával), tak aby mohly být hodnoty z různých měření vzájemně srovnatelné. Podobným způsobem byla vypočtena i směrodatná odchylka za minutu na 1 ml enzymatického preparátu.

Další výpočty opět probíhaly za pomoci analytického SW GraphPad. Získané průměry a směrodatné odchylky za minutu přepočtené na 1 ml enzymatického preparátu byly s jeho pomocí využity k určení maximální rychlosti inhibované enzymatické reakce  $V_{max}$ . Data byla transformována tak, aby se místo koncentrací inhibitoru na ose x nacházely jejich logaritmické hodnoty (průměry tvořily nezávislé proměnné y) a výsledky pak byly získány aplikací nelineární regrese. Aby se počátek regresních křivek vždy shodoval, byl nastaven

---

<sup>60</sup> Inherentní formáty aplikace MS Excel. XLSX je novější (od verze 2007), založený na značkovacím jazyku XML (Extensible Markup Language).

jako konstanta s nulovou hodnotou. Výsledné grafy pak představovaly závislost rychlosti enzymatické reakce ( $V_i$  – osa y) na koncentraci daného inhibitoru (I; osa x), případně jeho logaritmu ( $\log I$ ). Vždy se jednalo o čtyři křivky odpovídající čtyřem různým koncentracím substrátu ATCh.

$V_{\max}$  byla potom za pomoci MS Excel použita k vypočtení normalizovaných hodnot průměrů a směrodatných odchylek za minutu na 1 ml enzymatického preparátu. Tyto údaje pak byly opět zpracovány prostřednictvím GraphPadu, přičemž i maximální hodnota křivek nyní mohla být vzhledem k provedené normalizaci nastavena jako konstanta (s velikostí 1). Až na normalizaci byly hodnoty obdobné jako v předchozím případě, ale křivky v grafech již byly lépe srovnatelné (viz Graf 1 pro látku PC\_13, případně Graf 5 pro ACh).

Ze stejných (nenormalizovaných) hodnot vycházelo i Dixonovo vynesení (Dixon 1953). Pouze bylo nutné provést transformaci závislých proměnných y (průměrů směrníc/minutu/1 ml enzymatického preparátu) na jejich převrácenou hodnotu ( $1/y$ ). Na ose x tak byly zobrazeny koncentrace rostoucí inhibitorů a na ose y převrácená hodnota rychlosti enzymatické reakce ( $1/V_i$ ). Opět byly zobrazovány čtyři linky (přímky) nelineární regrese podle čtyř koncentrací použitého substrátu (viz Graf 3 pro látku PC\_13, případně Graf 7 pro ACh).

Stejným způsobem bylo vytvořeno i detailní Dixonovo vynesení. To umožňuje lépe definovat, na jakém místě se v grafu nachází průsečík všech zmíněných přímek.

Pro další zpracování bylo třeba data přeskupit tak, aby nezávislé proměnné x tvořily jednotlivé koncentrace substrátu ATCh. Závislé proměnné reprezentovaly opět průměry směrníc/minutu/1 ml enzymatického preparátu. Výsledný pomocný graf tak určoval závislost rychlosti enzymatické reakce ( $V_i$  – osa x) na koncentraci substrátu (S – osa y). Přímky nelineární regrese potom znázorňovaly jednotlivé koncentrace inhibitorů (viz Graf 9).

Pro vytvoření vynesení Lineweaver-Burkovo (Lineweaver a Burk 1934) pak bylo tato data (závislost  $V_i$  na S) nutné dále transformovat vypočtením jejich převrácených hodnot. Na grafu tak byla zobrazena závislost  $1/V_i$  na  $1/S$ . Přímky nelineární regrese, stejně jako

v předchozím případě, představovaly jednotlivé koncentrace inhibitorů (viz Graf 2 pro látku PC\_13, případně Graf 6 pro ACh).

Především za účelem kontroly poté byla provedena ještě jedna transformace dat a z nich pak zkonstruováno vynesení Cornish-Bowdena (Cornish-Bowden 1974). Jako nezávislá proměnná byly použity rostoucí koncentrace inhibitorů AChE a jako závislá proměnná podíl substrátu a rychlosti enzymatické reakce ( $S/V_i$ ). Přímkami nelineární regrese pak v grafech tvořily jednotlivé použité koncentrace substrátů (viz Graf 4 pro látku PC\_13, případně Graf 8 pro ACh). Podobným způsobem bylo vytvořeno i detailní vynesení Cornish-Bowdena, aby bylo možné (stejně jako u detailního Dixonova vynesení) lépe graficky stanovit průsečík jednotlivých přímk.

Během měření se samozřejmě mohly vyskytnout chyby, které nebylo možné ihned identifikovat, a které následně mohly zkreslovat výsledky analýzy dat. K jejich omezení poskytuje GraphPad možnost jednotlivé body z výpočtů i z grafů eliminovat. Hodnoty jsou ve zdrojových datech zaneseny, ale jsou zvýrazněny a při zpracování údajů se s nimi nepočítá. Některé body, které příliš vybočovaly po vynesení přímk a neúměrně je tím modifikovaly, byly tímto způsobem odstraněny. Tento postup byl proveditelný díky dostatku absolvovaných spektrofotometrických měření a použitelných hodnot.

## 4 Metody

Data, připravená výše zmíněným způsobem, byla dále využita pro podrobnou analýzu enzymatických reakcí, na které působily různé koncentrace zkoumaných inhibitorů AChE. Především bylo nutné stanovit normalizovaný průběh enzymatických reakcí a inhibiční konstantu  $IC_{50}$  pro jednotlivé inhibitory, určující intenzitu inhibice rozkladu substrátu. Dalším krokem pak bylo zjistit typ inhibice, kterým inhibitory na použitý substrát působí a určit inhibiční konstantu  $K_i$ .

### 4.1 Stanovení intenzity inhibice AChE

K určení intenzity inhibice rozkladu substrátu acetylcholinesterázou bylo nutné stanovit normalizované průběhy enzymatických reakcí. K tomu byly využity grafy znázorňující závislost zlogaritmovaných koncentrací inhibitorů na normalizované rychlosti enzymatických reakcí – viz Graf 1 pro látku PC\_13, případně Graf 5 pro ACh.

Vzhledem k tomu, že počátek křivek (každá pro jednu z použitých koncentrací substrátu ATCh) vychází z, respektive směřuje do jednoho bodu, je možné intenzitu inhibice při různých koncentracích substrátu velice dobře porovnat. Obzvlášť pokud chceme zjistit výši ukazatele  $IC_{50}$  (neboli „polovinu maximální inhibiční koncentrace“)<sup>61</sup>.

Ten představuje koncentraci látky (inhibitoru), které je nutné k 50% inhibici reakce (či obecněji biologické, respektive biochemické funkce) *in vitro*. Tedy k jejímu zpomalení na polovinu (např. inhibicí enzymů, blokováním receptorů apod.). Čím nižší je tento ukazatel, tím silnější je inhibice rozkladu zkoumané látky. K zpomalení reakce je totiž potřeba méně molekul inhibitoru, než u reakcí s vyšším  $IC_{50}$ .

Pokud na grafech normalizovaných průběhů enzymatických reakcí spustíme kolmici k ose x zhruba uprostřed zobrazených koncentrací inhibitorů, z rozdílů výše křivek pro různé substráty můžeme vyčíst jejich jednotlivé ukazatele  $IC_{50}$ . Samozřejmě spíše přibližné, ale celkem vhodné pro představu toho, jak pro různé koncentrace inhibitoru množství potřebné aktivní látky roste, nebo klesá.

Pro koncentrovanější substráty lze předpokládat pozvolnější pokles rychlosti inhibované enzymatické reakce, než u méně koncentrovaných. Z porovnání křivek grafu tak můžeme také zhruba vyčíst, o kolik by musel být použitý inhibitor koncentrovanější, aby byl schopný stejně účinně inhibovat stejný substrát o vyšší molární koncentraci. Stačí jen protnout křivky rovnoběžkou s osou x a z průsečíků svést kolmice ke koncentracím inhibitorů.

K výpočtu jednotlivých  $IC_{50}$  byla využita nelineární regrese v programu GraphPad. Poskytovala lepší formát výstupu než lineární regrese a naprosto stejné hodnoty. Samozřejmě je ale možné využívat k výpočtům i lineárně regresní model. Lze přitom vycházet z rovnice lineární funkce:  $Y = a * X + b$ . K výpočtu  $IC_{50}$  je pak možné použít vzorec  $IC_{50} = (0,5 - b) / a$ .

---

<sup>61</sup> Z anglického „half maximal inhibitory concentration“. IC znamená koncentrace inhibitoru („inhibitor concentration“), index 50 značí 50 %.

## 4.2 Zjištění typu inhibice AChE

Ke zjištění typu inhibice bylo využito Dixonovo a Lineweaver-Burkovo vynesení. K ověření výsledků pak navíc ještě vynesení Cornish-Bowdenovo. Lineweaver-Burkovo a Cornish-Bowdenovo vynesení poskytují zhruba stejné výsledky a dokážou typ inhibice definovat konkrétněji, než Dixonovo vynesení. To je ale zase vhodnější pro výpočet disociační konstanty  $K_i$ .

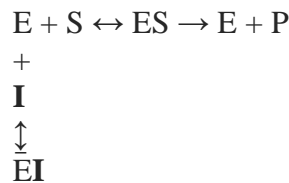
Jak již bylo zmíněno výše, inhibice enzymatických reakcí může být jednak reverzibilní (vratná, použití například při přípravě léčiv), anebo ireverzibilní (nevratná, použití při výrobě jedů – např. organofosfátových neurotoxinů). Toto základní rozdělení určuje primární povahu inhibičních látek.

Inhibitory lze ale ještě rozdělit podle toho, jakým způsobem a kam na enzym nasedají. Můžeme tak vydělit inhibici kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. Enzymatickou reakci jde mimo jiné znázornit následujícím způsobem (prvně publikováno Michaelisem a Mentenovou 1913):



Kde E představuje enzym, S substrát, P produkt (v této diplomové práci kyselinu octovou a cholin, případně thiocholin) a ES enzymosubstrátový komplex. Enzym reaguje nejprve se substrátem za vzniku ES a teprve poté se štěpí na enzym a produkt.

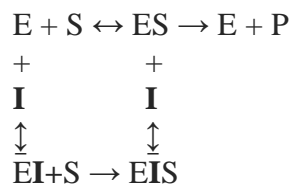
U kompetitivního typu inhibice se inhibitor (I) váže na pouze na volný enzym (neobsazenou vazebnou část) a soupeří tak se substrátem o nasednutí na prázdné (třeba i právě uvolněné) aktivní místo enzymu. Rostoucí koncentrace substrátu přitom vylepšuje jeho „bojovou“ pozici a inhibitor je tak postupně čím dál tím více vytlačován. Stává se tedy čím dál tím méně účinný a dostatečně vysokou koncentrací substrátu pak lze účinek inhibitoru zcela odstranit. Kompetice substrátu a inhibitoru je přitom umožněna především strukturou inhibitoru – do značné míry podobnou struktuře substrátu (tedy alespoň co se týče její vazebné části nasedající na enzym). Vzhledem k předchozímu zobrazení, lze tento proces zhruba vyjádřit takto:



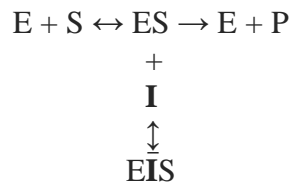
EI představuje inaktivní komplex enzymu s inhibítorem. Reverzibilita tohoto procesu je znázorněna oboustrannou šipkou.

V rámci nekompetitivního typu enzym nasedá jak na volný enzym, tak i na enzymosubstrátový komplex, a navíc substrát může nasedat i na komplex enzymu s inhibítorem. Je to způsobeno tím, že na rozdíl od kompetitivní inhibice nemusí v případě nekompetitivní inhibice substrát soupeřit s inhibítorem o aktivní místo enzymu. Inhibitor totiž u tohoto typu inhibice nasedá úplně někam jinam – mimo aktivní místo enzymu a nechává tak zmíněnou lokaci zcela volnou pro případné připojení substrátu. Stejně tak ale může inhibitor i kdykoli nasednou na enzymosubstrátový komplex.

Kvůli rozdílnému vazebnému místu inhibitoru a substrátu navíc zvýšení koncentrace substrátu nemůže z principu nikdy snížit inhibiční aktivitu inhibitoru (což může být velice výhodné při výrobě léčiv). Zmíněná série vazeb se dá přibližně znázornit následujícím schématem, kde EIS představuje komplex substrátu s enzymem, na kterém je již mimo aktivní místo navázaný inhibitor:



U posledního typu – akompetitivní inhibice se inhibitor váže pouze na enzymosubstrátový komplex. Tedy až poté, co navázání substrátu vhodně pozmění konformaci působícího enzymu. To znamená, že se inhibitor vždy připojuje mimo aktivní místo enzymu. Dalším důsledkem pak je zvyšování možnosti inhibice enzymatické reakce při navyšování koncentrace substrátu v roztoku. S rostoucí koncentrací substrátu (při dostatečném množství enzymu) se zvyšuje i množství enzymosubstrátového komplexu ES a tím i množství molekul vhodných pro nasednutí inhibitoru. Tento druh reakce lze zhruba znázornit následujícím diagramem:



#### 4.2.1 Lineweaver-Burkovo vynesení

Jedním ze způsobů, jak graficky odhadnout typ inhibice, je Lineweaver-Burkovo vynesení. Jedná se o lineární zobrazení vztahů daných rovnicí Michaelise a Mentenové (1913), které navrhli Lineweaver a Burk (1934).

Rovnice Michaelis-Mentenové platí za předpokladu (výchozích podmínek) konstantní koncentrace enzymosubstrátového komplexu a mnohem větší koncentrace substrátu než enzymu. Znázorňuje závislost maximální rychlosti enzymatické reakce  $V_{\max}$  na koncentraci substrátu  $S$  a ve standardním tvaru se jedná o hyperbolu. Zapsat ji lze v tomto tvaru:

$$v = \frac{V_{\max} / S}{K_m + S}$$

Rychlost reakce (aktivitu enzymu) zde značí  $v$  a  $K_m$  je tzv. Michaelisova konstanta, která je rovna součtu míry přeměny enzymosubstrátového komplexu na enzym a produkt ( $k_2$ ) a zpět na enzym a substrát ( $k_{-1}$ ) vyděleného mírou přeměny enzymu se substrátem na enzymosubstrátový komplex ( $k_1$ ). Neboli, vyjádřeno vzorcem:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Podobně jako  $K_m$  i  $k_{-1}$ ,  $k_1$  a  $k_2$  jsou zde konstanty charakterizující afinitu enzymu k danému substrátu.  $K_m$  samotná pak značí takovou koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce ( $v$ ) polovinou rychlosti maximální ( $V_{\max}$ ). Čím nižší je  $K_m$ , tím je zmíněná afinita vyšší. Uvádí se v jednotkách koncentrace, obvykle mol/l a nezávisí na koncentraci enzymu. Lze ji proto určit například i pro nepřečištěné enzymové preparáty, tkáňové řezy nebo jiné biologické struktury, obsahující studovaný enzym. Vyčíst jde například z grafu zobrazujícího závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu (viz Graf 9).

Zmíněná úprava Lineweavera a Burka, na jejímž základě je pak možné graficky analyzovat rovnici Michaelis-Mentenové, vypadá následovně:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Směrnice závislosti převrácené hodnoty rychlosti enzymatické reakce na převrácené hodnotě koncentrace substrátu je zde dána výrazem  $K_m / V_{\max}$ . Průnik přímky enzymatické reakce o osou  $1/v$  představuje převrácenou hodnotu maximální rychlosti reakce ( $1/V_{\max}$ ), průnik s osou  $1/S$  naproti tomu odpovídá převrácené záporné hodnotě Michaelisovy konstanty ( $-1/K_m$ ).

V případě kompetitivního typu inhibice se s narůstající koncentrací inhibitoru maximální rychlost enzymatické reakce nemění ( $V_{\max}$  je konstantní), ale  $K_m$  se postupně zvyšuje. Přímky reakcí pro různé koncentrace inhibitoru se proto vždy protínají ve stejném bodě na ose  $y$  ( $1/v$ ) a mění se jen jejich sklon. Čím silnější koncentrace inhibitoru je použita, tím je sklon přímky strmější (viz Graf 6 pro látku ACh).

U nekompetitivní inhibice se přímky protínají na ose  $x$  ( $1/S$ ). S rostoucí koncentrací inhibitorů se maximální rychlost reakce pomalu snižuje, ale  $K_m$  zůstává konstantní. Opět, čím vyšší je koncentrace inhibitoru, tím je přímka reakce v rámci vnesení Lineweaver-Burka strmější.

V případě posledního vyhraněného typu, akompetitivní inhibice, se  $V_{\max}$  i Michaelisova konstanta při zvyšování koncentrace inhibitoru  $I$  postupně snižuje. V grafu Lineweaver-Burkova vnesení se to pak projevuje paralelitou přímek enzymatické reakce pro jednotlivé koncentrace inhibitorů. Přímky se tedy neprotínají vůbec a ty, které představují reakci při vyšší koncentraci  $I$ , se obvykle nacházejí ve směru osy  $y$  nad těmi, které reprezentují nižší koncentrace.

Kromě výše zmíněných typů inhibice je ale možné pomocí této grafické metody identifikovat i jistou formu inhibice smíšeného typu. Ta značí druh reakce, během které dochází jak ke kompetici inhibitoru se substrátem o vazebné místo enzymu, tak k navazování inhibitoru mimo toto vazebné místo. Jedná se tedy o nevyhraněný typ, zahrnující procesy spojené jak s kompetitivním, tak nekompetitivním typem inhibice. V grafu Lineweaver-Burkova vnesení se pak projevuje průsečíkem přímek

enzymatických reakcí ve druhém kvadrantu roviny kartézské soustavy souřadnic (dané kolmými osami  $x$  a  $y$ ). Souřadnice průsečíku tak tvoří hodnoty  $1/v$  a  $-1/S$ . Vztahy týkající se sklonu přímek jsou přitom stejné jako v předchozích případech (viz Graf 2 pro látku PC\_13).

#### 4.2.2 Dixonovo vynesení

Dixonovo vynesení (Dixon 1953) je grafická metoda, který se běžně používá k určení inhibiční (rovnovážné disociační) konstanty  $K_i$  enzymatických reakcí. S jeho pomocí je možné definovat i Michaelisovu konstantu  $K_m$ , ale primárně se používá ke zjištění  $K_i$ .

Konstanta  $K_i$  představuje koncentraci inhibitoru potřebnou k dosažení poloviny maximální inhibice enzymatické reakce a lze si ji představit jako poměr násobků koncentrací inhibitoru ( $I$ ) a enzymu ( $E$ ) ke komplexu enzymu s navázaným inhibitorem ( $EI$ ). Případně stejný poměr týkající se enzymosubstrátového komplexu. Čím je hodnota konstanty nižší, tím je inhibitor silnější. Zmíněný vztah je možné vyjádřit následovně:  $K_i = E \cdot I / EI$ , respektive  $K_i' = ES \cdot I / EIS$ .

U kompetitivního typu inhibice se vyskytuje pouze  $K_i$ , u akompetitivního pouze  $K_i'$  a u nekompetitivního jsou výše konstant zhruba identické a kvůli zjednodušení výpočtů se považují za vzájemně ekvivalentní ( $K_i = K_i'$ ). Navazování substrátu u posledně zmíněného typu probíhá jak na samostatný enzym, tak na enzymosubstrátový komplex, což je totožné se smíšeným typem inhibice. Na rozdíl od nekompetitivního typu ale nejsou u smíšené inhibice disociační konstanty ve vzájemné rovnováze ( $K_i \neq K_i'$ ).

V rámci Dixonova vynesení se  $K_i$  odvozuje z průsečíku přímek pro různé koncentrace substrátu. Stačí nalézt odpovídající hodnotu na ose  $x$  (reprezentující rostoucí koncentraci inhibitoru  $I$ ) a  $K_i$  se pak rovná  $-I$ . Z Dixonova vynesení ale bohužel nejde přesně vyčíst typ inhibice tak jako je to možné u vynesení Lineweaver-Burka nebo Cornish-Bowdena (posledně zmíněné viz další kapitola). Není u něj totiž možné identifikovat smíšený typ reakce. Vyčíst z něj jde pouze kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní typ inhibice.

Sklopy přímek, případně polohy u paralelních, zde mají opačné tendence než v případě vynesení Lineweaver-Burka. Přímky představující reakci při nejnižších koncentracích

substrátu jsou nejstrmější, respektive nejnižze položené (u paralelních), vzhledem k těm reprezentujícím průběh při vyšších koncentracích.

V případě kompetitivní nebo smíšené inhibice se přímky protínají v druhém kvadrantu soustavy souřadnic (podobně jako u smíšeného typu v rámci Lineweaver-Burkovo vnesení). Pro grafické určení  $-K_i$  je tedy nutné spustit kolmici z průsečíku k ose  $x$ . Vzhledem ke stejnému způsobu zobrazení ale není možné tyto dva druhy inhibice graficky spolehlivě odlišit (viz Graf 3 pro látku PC\_13 nebo Graf 7 pro ACh).

U nekompetitivní inhibice se přímky různých koncentrací substrátu protínají na ose  $x$ . Hodnota, kterou průsečík na této ose vytíná se tedy přímo rovná zápornému tvaru inhibiční konstanty ( $-K_i$ ).

Při akompetitivním typu inhibice jsou přímky vzájemně rovnoběžné a  $K_i$  tak v tomto případě graficky zjistit nejde. Akompetitivní typ inhibice je ale velmi vzácný, proto tento fakt ve většině případů není příliš na závadu.

Pokud vycházíme z faktu, že Dixonovo vnesení je formou lineárního grafického zobrazení, můžeme k výpočtu  $K_i$  použít rovnici přímky  $y = A + Bx$ . Z té je pak možné odvodit vztah:  $x = (a_1 - a_2) / (b_2 - b_1)$ . Výsledkem je hodnota průsečíku ( $-K_i$ ). Pokud pak tímto způsobem vypočteme veškeré průsečíky pro všechny vnesené přímky koncentrací substrátu, můžeme z nich vypočítat průměr. Ten by pak měl ve formě absolutní hodnoty s dostatečnou přesností vystihovat výši inhibiční konstanty  $K_i$  pro zkoumaný inhibitor.

### 4.2.3 Cornish-Bowdenovo vnesení

Vnesení Cornish-Bowdena (Cornish-Bowden 1974) bylo použito pro kontrolu zjištěných typů inhibice. Podobně jako Dixonovo vnesení umožňuje graficky určit hodnotu inhibiční konstanty  $K_i$  (přesněji řečeno  $K_i'$ ), ale na rozdíl od něj dokáže navíc rozlišit smíšený a kompetitivní typ inhibice (podobně jako tomu je u vnesení Lineweaver-Burka).

Pokud se přímky protínají na ose rostoucích koncentrací inhibitoru (osa  $x$ ), jde o nekompetitivní inhibici. Hodnota průsečíku na ose  $x$  udává  $-K_i' = K_i$ . V případě, že se průnik přímek nachází ve třetím kvadrantu soustavy souřadnic, jedná se o smíšenou inhibici (viz Graf 4 pro látku PC\_13) a stejně jako u akompetitivní je pro získání  $-K_i'$

nutno vést kolmici průsečíkem k ose x. U akompetitivní inhibice se přitom průnik přímek nachází v druhém kvadrantu. Pro kompetitivní typ inhibice ale bohužel hodnotu  $K_i$  graficky zjistit nejde, protože podobně jako u Dixonova vynesení jsou i v tomto případě přímky koncentrací substrátu vzájemně rovnoběžné (viz Graf 8 pro látku ACh).

Sklon přímek (případně poloha) se zde chová stejným způsobem jako při vynesení Lineweaver-Burka. Čím je koncentrace substrátu vyšší, tím je přímka strmější, případně vynesena výše nad přímkami reprezentujícími nižší koncentrace substrátu.

## 5 Výsledky

Spektrofotometricky dle Ellmanovy metody bylo proměřeno celkem 7 analogů látky 7-MEOTA, plus ACh a samotná látka 7-MEOTA. Pro všechny tyto sloučeniny bylo následně vytvořeno vynesení Lineweaver-Burka, Cornish-Bowdena a Dixonovo vynesení a také normalizovaný průběh enzymatické reakce (příklady viz část Přílohy, kapitola Grafy; zbytek materiálů viz samostatný soubor ve formátu ZIP).

Všechny látky vykazovaly stejný smíšený typ inhibice jako 7-MEOTA a afinita k aktivnímu místu enzymu u nich byla vždy nižší než u 7-methoxytakrinu (viz Graf 10). Intenzita inhibice u nich byla pokaždé méně výrazná než u sloučeniny, z které byly odvozeny (viz Graf 11). Všechny zkoumané látky jsou tedy méně efektivní inhibitory AChE než 7-MEOTA.

Intenzitu inhibice dokládají naměřené hodnoty ukazatele  $IC_{50}$  (Tabulka 3). Ve všech případech jsou tyto ukazatele u vyšších koncentrací substrátu vyšší. Intenzita inhibice je u nich tedy slabší. Pokles intenzity inhibice pro vyšší koncentrace se přitom mezi jednotlivými inhibitory vzájemně liší.

Například pro 0,8 mM koncentrací ATCh látky PC\_6 lze pozorovat mnohem vyšší pokles intenzity inhibice ve srovnání s 0,5 mM koncentrací, než u ostatních testovaných analogů. U PC\_13, PC\_32, PC\_41 a PC\_48 je tento pokles vzhledem k PC\_6 jen zhruba poloviční, u PC\_37 třetinový a u PC\_49 při srovnání naměřených hodnot tvoří méně jak pětinu rozdílu  $IC_{50}$  pro nejvyšší koncentrace substrátu PC\_6.

Podobně velké rozdíly v poklesu intenzity inhibice lze pozorovat i u jiných koncentrací ATCh. Obzvláště u hodnot rozdílů 0,5 mM a 0,2 mM koncentrace substrátu. Látky PC\_32 a PC\_37, které se liší pouze v jednom methylovém zbytku (viz Obrázek 5), vykazují ve srovnání s ostatními analogy zřetelně nejvýraznější pokles intenzity inhibice. Například u PC\_6, PC\_41 nebo PC\_49 je tento pokles ve srovnání s nimi jen zhruba poloviční.

Obecně lze ale říci, že ve většině případů odpovídá pokles intenzity inhibice mezi koncentracemi substrátu u jednotlivých inhibitorů celkové míře intenzity inhibice enzymatické reakce ve srovnání s ostatními inhibitory. Při porovnání získaných dat tedy téměř vždy platí pravidlo, že inhibitor, který byl méně účinný při jedné koncentraci ATCh, byl zároveň méně účinný i při těch ostatních.

Vyskytly se ale výjimky. Obzvláště mezi velice podobnými sloučeninami jakými jsou látky PC\_32 a PC\_37. Rozdíly jsou zde sice jen nepatrné, ale existují. Pokles inhibice je tak pro nejnižší koncentrace ATCh u PC\_32 vyšší, než u PC\_37. Pro 0,2 a 0,5 mM koncentrace je to již ale naopak a pro 0,8 mM koncentraci ATCh je pak opět pokles inhibice u PC\_32 výraznější, než u PC\_37.

Podobně u látek PC\_13 a PC\_41 nebo například PC\_6 a PC\_32. Všechny koncentrace substrátů, až na 0,5 mM, vykazují o něco větší pokles inhibice enzymatické aktivity u analogů PC\_32 a PC\_41. Při 0,5 mM koncentraci se ale situace obrací a větší pokles lze pozorovat u inhibitorů PC\_13 a PC\_32.

Pokud by se ale měly zkoumané analogy 7-MEOTA celkově seřadit dle své aktivity, pak by jasným vítězem byla látka PC\_49, která jako jediná nemá na konci alkylového řetězce na pyrazinový heterocyklus připojeno benzenové jádro (viz Obrázek 5).  $IC_{50}$  má u ní nejnižší hodnoty a řadí ji tak hned za výchozí látku 7-MEOTA. Další pořadí by mohlo být zhruba následující (od nejsilnější inhibice po nejslabší): PC\_13, PC\_48, PC\_41, PC\_37, PC\_32, PC\_6.

Pro kontrolu byl stanoven i normalizovaný průběh enzymatické reakce za použití ACh jako kompetitivního inhibitoru ATCh. Výsledky měření potvrdily správný postup provádění Ellmanovy metodiky. Jak získané hodnoty, tak jejich grafická analýza (pomocí výše zmíněných vynesení) potvrdily mnohem nižší intenzitu inhibice u ACh než u zkoumaných

analogů 7-MEOTA a také vyhraněný kompetitivní typ inhibice (souboj mezi alternativními substráty o aktivní místo enzymu) oproti smíšenému typu ostatních inhibitorů (nasedajících i mimo aktivní místo).

Výsledky všech použitých grafických metod potvrdily u zkoumaných analogů a látky 7-MEOTA smíšený typ inhibice a u ACh kompetitivní. Při měření inhibiční konstanty  $K_i$  pak byly zjištěny údaje uvedené v Tabulce 4. Opět byla hodnota určována i pro látky 7-MEOTA a acetylcholin. A stejně jako při zjišťování normalizovaného průběhu enzymatické reakce byla inhibice (potažmo afinita k aktivnímu místu enzymu vyjádřená  $K_i$ ) za použití 7-methoxytakrinu nejsilnější a při proměřování ACh nejslabší.

Nejvyšší afinitu k aktivnímu místu enzymu projevovala látka PC\_48 (sloučenina s bromem na konci alkylového řetězce) následovaná analogy PC\_49 a PC\_37. Ještě nižší afinitu pak projevovala látka PC\_13 a nejnižší (nepočítáme-li ACh) trojice sloučenin PC\_32, PC\_6 a PC\_41. Tyto tři analogy se v afinitě k aktivnímu místu lišily jen minimálně.

Kromě disociačních konstant pro afinitu inhibitorů k enzymu, je možné podobným způsobem vypočítat i jejich disociační konstantu  $K_i'$  pro afinitu k enzymosubstrátovému komplexu. Vzhledem k tomu, že všechny zkoumané analogy vykazovaly smíšenou inhibici, dá se za tímto účelem velice dobře využít Cornish-Bowdenovo vynesení. Naměřené hodnoty  $K_i'$  pro všechny zkoumané inhibitory jsou uvedené v Tabulce 5.

Jak je vidno, inhibice enzymatické reakce prostřednictvím navázání inhibitoru na enzymosubstrátový komplex byla několikanásobně nižší, než inhibice navázáním na volné aktivní místo samotného enzymu. Navíc se výsledky míry inhibice vyjádřené ukazatelem  $K_i'$  ve srovnání s  $K_i$  i do určité míry liší.

Nejsilnější afinitu inhibitoru k enzymosubstrátovému komplexu lze pozorovat u analogu PC\_41. Je téměř totožná s afinitou látky 7-MEOTA, přestože afinita k volnému enzymu je ve srovnání s ní u PC\_41 mnohem nižší. Další vysokou afinitu danou ukazatelem  $K_i'$  (ale již jen téměř poloviční ve srovnání s látkou PC\_41) vykazuje i analog PC\_49.

Slabší inhibici navázáním analogu mimo aktivní místo enzymu pak je možné pozorovat u látek PC\_32 a PC\_48. Míra inhibice se přitom u nich liší jen minimálně, přestože

sloučenina PC\_48 vykazovala nejvyšší afinitu k volnému enzymu (viz výše). Ještě slabší afinitu potom vykazují dvojice látek PC\_13 a PC\_37, u které je rozdíl ve výši  $K_i'$  také celkem zanedbatelný. Jasně nejnižší afinitu k enzymosubstrátovému komplexu pak vyazuje analog PC\_6 – ve srovnání s látkou 7-MEOTA téměř čtyřikrát nižší.

Pořád je ale mnohem silnější než afinita, s kterou se k enzymosubstrátovému komplexu váže ACh.  $K_i'$  pro kompetitivní inhibici ACh je vzhledem k charakteru inhibice v podstatě o tři řády vyšší než v případě analogu 7-MEOTA. Naměřená hodnota tak může sloužit jako kontrola správnosti prováděných postupů. Aktivní místo AChE bylo evolučně vymodelováno tak, aby ACh co nejefektivněji odchytilo. Pokud by  $K_i'$  pro ACh nebylo výrazně vyšší než  $K_i$  a afinita mimo aktivní místo enzymu tedy výrazně nižší, nejednalo by se o kompetitivní typ inhibice, ale s největší pravděpodobností o chybu (v měření, výpočtech, ...).

Z naměřených hodnot inhibičních konstant je také možné vyčíst, že smíšená inhibice látky 7-MEOTA a jejích analogů má blíže ke kompetitivnímu typu, než k akompetitivnímu ( $K_i < K_i'$ ). Nejblíže k nekompetitivnímu typu (u kterého množství substrátu neovlivňuje intenzitu inhibice) má látka PC\_41. Ačkoli je její afinita k aktivnímu místu enzymu více jak dvakrát vyšší než na enzymosubstrátový komplex, pořád jsou její hodnoty rovnovážnému stavu inhibičních konstant ze všech zkoumaných inhibitorů nejméně vzdálené. Například u 7-MEOTA je hodnota  $K_i$  ve srovnání s  $K_i'$  desetkrát nižší.

Pokud bychom měli zhodnotit celkovou afinitu inhibitorů k enzymu ( $K_i + K_i'$ ), pak nejsilnější inhibici projevuje látka 7-MEOTA, následovaná PC\_41 (především díky vysoké afinitě k enzymosubstrátovému komplexu) a s o něco větším odstupem látkou PC\_49. Následuje dvojice látek PC\_48 a PC\_32 a potom dvojice PC\_13 a PC\_37. U té se výsledné hodnoty téměř rovnají. Nejslabší inhibici pak (pokud nebudeme brát v úvahu ACh) hlavně díky vysoké  $K_i'$  vyazuje sloučenina PC\_6.

Výsledné hodnoty afinity můžeme také srovnat s ukazatelem  $IC_{50}$ . Můžeme tak například zjistit, že látka s nejslabší afinitou (PC\_6) projevuje i nejslabší inhibici enzymatické reakce a podobně látka s nejsilnější afinitou (7-MEOTA) je zároveň pro všechny použité koncentrace substrátu i nejsilnějším testovaným inhibitorem.

## 6 Diskuze

Během zpracování diplomové práce bylo získáno množství důležitých dat, které pomohly pochopit způsob, jímž zkoumané sloučeniny působí na enzymatický rozklad substrátu (ACh, ATCh) prostřednictvím AChE a zjistit intenzitu, s jakou jsou schopny tento proces zvrátit.

Cholinergní systém, na který by tyto inhibitory měly působit, se ale neskládá jen z ACh, AChE a jejich produktů (viz kapitola Cholinergní systém a cholinomimetická léčba AD). Stejně důležité je i působení inhibitorů na receptory (nikotinové a muskarinové) cholinergního systému a na nespecifickou ChE butyrylcholinesterázu.

V budoucnu proto bude nutné proměřit jejich afinitu jak k těmto receptorům, tak i ke zmíněné BChE. Fakt, že BChE nemá jasně daný substrát a patrně se vyvinula jako prostředek ochrany organismu vůči jedům založeným na cholinergní bázi, pak předpovídá i jedno z možných využití zkoumaných látek. Celá řada živočišných, rostlinných i umělých inhibitorů acetylcholinesterázy patří mezi velice účinné neurotoxiny (viz předchozí kapitoly). Kromě symptomatické léčby AD, by se tak zkoumané analogy 7-MEOTA mohly případně využít i pro vývin protijedů – reaktivátorů AChE a jejich receptorů.

K vývinu protijedů a nových léčiv AD ale vede dlouhá a náročná cesta zahrnující mimo jiné testování toxicity zkoumaných sloučenin. Nejprve na potkanech, později snad i primátech. A je samozřejmě možné, že žádný z inhibitorů analyzovaných v této práci nenajde nikdy své praktické využití. To, jak nepatrný zlomek výzkumných projektů ve farmakologii pak dojde ke zdárnému konci a přinese kýžené ovoce v podobě látky s dostatečně vysokým terapeutickým indexem<sup>62</sup> a vhodnými terapeutickými účinky, lze doložit například studií Mangialasche a kol. (2010) – viz Obrázek 2.

---

<sup>62</sup> Poměr dávky léčiva, protijedu apod., které vyvolává léčebný účinek, k dávce způsobující otravu. Čím je vyšší, tím je látka méně toxická a nehrozí tedy tolik riziko předávkování, případně nutnost dočasně přerušit léčbu (tak jako to bylo nutné např. u takrinu – viz výše).

Přesto nové poznatky, například aktivita některých dříve testovaných analogů 7-MEOTA (Korábečný a kol. 2010), poskytují naději, že i tak závažnou chorobu, jakou AD beze sporu je, bude časem možné účinně léčit. I kdyby to znamenalo jen výraznější potlačení neblahých symptomů, který její rozvoj doprovázejí.

Lepší způsob terapie medikamenty, než cholinomimetická léčba, zatím bohužel objeven nebyl. Jediný Memantin, jako látka založená na jiném principu než na inhibici AChE, vykazuje podobně příznivé účinky jako AChEIs a zároveň je dostatečně bezpečný, tak aby mohl být používán jako léčivo AD. Proto další výzkum v oblasti AChEIs je přinejmenším žádoucí.

Analogy 7-MEOTA představují jen jednu formu AChEIs, ale vzhledem k velice dobrým inhibičním vlastnostem takrinu a řady látek od něj odvozených, představují tyto sloučeniny zajímavou výzvu, která by při snaze o nalezení léčiv vhodných k léčbě AD neměla zůstat nevyslyšena.

## **7 Závěr**

Tato diplomová práce se snažila alespoň malou měrou přispět k řešení problému, který sužuje současnou stárnoucí společnost. Díky lepší zdravotní péči se průměrná délka dožití ve světě neustále prodlužuje a spolu s tím se i mnohem více objevují choroby pozdního věku, které se v dobách, kdy byla střední délka života mnohem nižší, vyskytovaly spíše zřídka. Toto prodlužování má sice své biologicky dané hranice, ale i v rámci současného stavu náklady na péči spojené s těmito chorobami (včetně AD) výraznou měrou zatěžují rozpočty nejenom vyspělých států Západu.

V Evropě a USA se přírůstky obyvatelstva téměř zastavily a řada zemí z této kulturní oblasti se potýká s potenciálním, nebo reálným úbytkem autochtonní populace. V rozvojových zemích (jako např. v Indii, státech Afriky apod.) je ale situace opačná. Značný přírůstek obyvatelstva společně s kvalitnější lékařskou péčí dává tušit v následujících letech i velmi výrazný nárůst obyvatelstva seniorského věku. Náklady na zaopatření pacientů trpících nemocemi jako je AD, tak patrně mnohonásobně vzrostou.

Z tohoto důvodu je důležité hledat řešení, dokud je ještě čas a náklady, i když vysoké, je možné na globální úrovni ještě udržet v rozumných mezích. Toto řešení se snaží i nalézt i výzkumný projekt, v rámci kterého byla zpracovávána tato diplomová práce.

Cílem práce bylo zanalyzovat sedm vybraných AChEIs vytvořených kolegy z FVZ OB (Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany) v Hradci králové a stanovit u nich intenzitu a způsob, kterým působí na enzymatickou aktivitu AChE.

Žádný z těchto zkoumaných analogů látky 7-MEOTA bohužel nedosahoval takových kvalit, jako původní látka, z které byly odvozeny. Síla inhibice byla vždy nižší a stejně tak i afinita k vazebnému místu enzymu. Přesto je ale možné, že i tak tyto látky najdou své uplatnění. Ve hře je totiž také jejich afinita k cholinergním neuronům, terapeutický index, toxicita, hydrodynamické vlastnosti a také případné využití ve formě reaktivátorů AChE a jejich receptorů. Tedy využití jako protijedy vůči neurotoxinům založeným na cholinergní bázi.

Tato práce představuje sice jen malý zlomek v rámci ohromného množství úsilí, které je věnováno snaze najít vhodný lék a vyléčit hrozbu skrývající se pod označením AD. Přesto pevně věřím, že cíle, které si vytyčila i naplnila. A to jak v praktické, tak ve své teoretické části. Snad se v brzké době pro zmíněnou hrozbu nalezne vhodné řešení ve formě účinného léčiva a práce podobné této, již nadále nebudou třeba.

## 8 Přílohy

### 8.1 Tabulky

Léčivo	Stádium nemoci	Symptomatické působení	Potenciální neuroprotektivní působení
<b>AChE inhibitory – zlepšují kognici, chování, a funkční a globální klinický stav</b>			
Donepezil	Všechny stádia	AChEI	Možné snížení produkce a toxických účinků A $\beta$ ; ovlivňuje expresi izoforem AChE; zvyšuje expresi nikotinových receptorů
Rivastigmin	Mírné až střední	AChEI a BChEI	Možné snížení produkce a toxických účinků A $\beta$ ; ovlivňuje expresi izoforem AChE; zvyšuje expresi nikotinových receptorů
Galantamin	Mírné až střední	AChEI (modulace nikotinových receptorů)	Možné snížení produkce a toxických účinků A $\beta$ ; ovlivňuje expresi izoforem AChE; zvyšuje expresi nikotinových receptorů
Huperzin-A	Mírné až střední	AChEI	Ovlivňuje zpracování APP podporou sekrece rozpustného APP $\alpha$ ; antioxidant, anti-apoptózní účinky; ochrana mitochondrií
<b>Antagonisti NMDA receptorů – zlepšují kognici, chování, a funkční stav</b>			
Memantin	Střední až vážné	Nekonkurující, na náboji závislý antagonisti NMDA receptorů	Snižuje toxicitu A $\beta$ , zabraňuje hyperfosforylaci tau, zmírňuje záněty spojené s mikroglie; zvyšuje uvolňování NGF z astroglie.

AChEI – Inhibitor acetylcholinesterázy; BChEI – Inhibitor butyrylcholinesterázy;

NMDA – N-methyl-D-asparagová kys.

Tabulka 1 – Drogy schválené pro léčbu AD (Mangialasche a kol. 2010)

Podtyp receptoru	Lokace	Působení	Funkce
nAChRs ( $\alpha 3$ ) <sub>3</sub> , ( $\beta 2$ ) <sub>2</sub>	Homogenně ve ventrální části mediální <i>habena</i> , hipokampus	Aktivace selektivního kationového kanálu, synaptická a parakrinová transmise	Paměť a učení
nAChRs ( $\alpha 4$ ) <sub>2</sub> , ( $\beta 2$ ) <sub>2</sub>	Hipokampální části CA1 a CA3, <i>gyrus dentatus</i> , hypothalamus, <i>colliculus inferior</i> , <i>substantia grisea centralis</i> , <i>nucleus interpeduncularis</i> , <i>nucleus ruber</i>		
nAChRs ( $\alpha 7$ ) <sub>5</sub>	Parietální kůra, frontální kůra, hipokampus, temporální kůra, limbická oblast, mozeček		
nAChRs ( $\alpha 4$ ) <sub>3</sub> , ( $\beta 2$ ) <sub>2</sub>	Mozková kůra, hipokampální neurony, thalamus a <i>habena</i> , interpedunkulární systém		Paměť a učení, údržba a diferenciacie neuronů
nAChRs ( $\alpha 6$ ) <sub>3</sub> , ( $\beta 2$ ) <sub>2</sub>	Ventrální mezencefalón a <i>locus caeruleus</i> , katecholaminergní jádra		
nAChRs ( $\alpha 3$ ) <sub>2</sub> , ( $\beta 4$ ) <sub>2</sub> , $\alpha 5$	Mediální <i>habena</i> , dorsální mícha, <i>nucleus interpeduncularis</i>	Aktivace selektivního kationového kanálu, synaptická transmise	Paměť a učení
nAChRs ( $\alpha 3$ ) <sub>2</sub> , ( $\beta 4$ ) <sub>3</sub>	Mediální <i>habena</i> ; dorso-kaudální prodloužená mícha a epifýza		
mAChRs M <sub>1</sub>	Mozková kůra, hipokampus, thalamus, přední mozek, kaudální regiony mozku	G <sub>α12/11</sub> , fosfolipáza C <sub>β</sub> , diacylglycerol a inozitol 1,4,5-trifosfát (IP <sub>3</sub> )	Paměť a učení, dlouhodobá potenciace (LTP) a útlum, synaptická plasticita, údržba a diferenciacie neuronů
mAChRs M <sub>3</sub>	Telencefalické struktury, <i>corpus striatum</i>		
mAChRs M <sub>5</sub>	<i>Substantia nigra</i> , <i>corpus striatum</i>		Paměť a učení, LTP a útlum, synaptická plasticita
mAChRs M <sub>2</sub>	Presynaptická část, thalamus, mozeček, <i>corpus striatum</i> , rostrální regiony mozku, varolův most	G <sub>α12/10</sub> , inhibice adenylátcyklázy, zpětný tok K <sup>+</sup>	Synaptická modulace
mAChRs M <sub>4</sub>	Presynaptická část, telencefalické struktury, <i>corpus striatum</i>		

Tabulka 2 – Lokace, působení a funkce nAChRs a mAChRs (Ehlert a Tran 1990, Pratico a kol. 2005, Zoli a kol. 1998, Fodale a kol. 2006)

Látka	0,1 mM	0,1 mM 95 % CI	0,2 mM	0,2 mM 95 % CI	0,5 mM	0,5 mM 95 % CI	0,8 mM	0,8 mM 95 % CI
<b>7-MEOTA</b>	6,659E-06	6,403E-06 – 6,921E-06	8,772E-06	8,239E-06 – 9,339E-06	1,243E-05	1,154E-05 – 1,339E-05	1,381E-05	1,299E-05 – 1,466E-05
<b>PC_6</b>	2,169E-05	1,944E-05 – 2,422E-05	2,467E-05	2,278E-05 – 2,673E-05	2,791E-05	2,546E-05 – 3,062E-05	3,756E-05	3,527E-05 – 4,834E-05
<b>PC_13</b>	1,554E-05	1,311E-05 – 1,844E-05	1,783E-05	1,560E-05 – 2,041E-05	2,288E-05	2,154E-05 – 2,436E-05	2,787E-05	2,526E-05 – 3,081E-05
<b>PC_32</b>	2,097E-05	1,822E-05 – 2,417E-05	2,366E-05	2,138E-05 – 2,563E-05	3,044E-05	2,927E-05 – 3,166E-05	3,565E-05	3,203E-05 – 3,973E-05
<b>PC_37</b>	2,060E-05	1,615E-05 – 2,627E-05	2,430E-05	2,212E-05 – 2,670E-05	3,106E-05	2,968E-05 – 3,241E-05	3,440E-05	3,259E-05 – 3,627E-05
<b>PC_41</b>	1,798E-05	1,593E-05 – 1,990E-05	1,947E-05	1,788E-05 – 2,080E-05	2,266E-05	2,069E-05 – 2,483E-05	2,820E-05	2,690E-05 – 2,941E-05
<b>PC_48</b>	1,603E-05	1,380E-05 – 1,898E-05	1,980E-05	1,825E-05 – 2,155E-05	2,485E-05	2,265E-05 – 2,719E-05	3,114E-05	2,839E-05 – 3,367E-05
<b>PC_49</b>	9,099E-06	6,712E-06 – 1,233E-05	1,302E-05	1,234E-05 – 1,374E-05	1,568E-05	1,418E-05 – 1,734E-05	1,738E-05	1,410E-05 – 2,132E-05
<b>ACh</b>	2,837E-04	2,686E-04 – 2,991E-04	3,939E-04	3,859E-04 – 4,011E-04	8,895E-04	7,469E-04 – 1,089E-03	1,170E-03	1,117E-03 – 1,222E-03

Tabulka 3 – Naměřené hodnoty ukazatele IC<sub>50</sub> s 95 % intervalem spolehlivosti (CI)

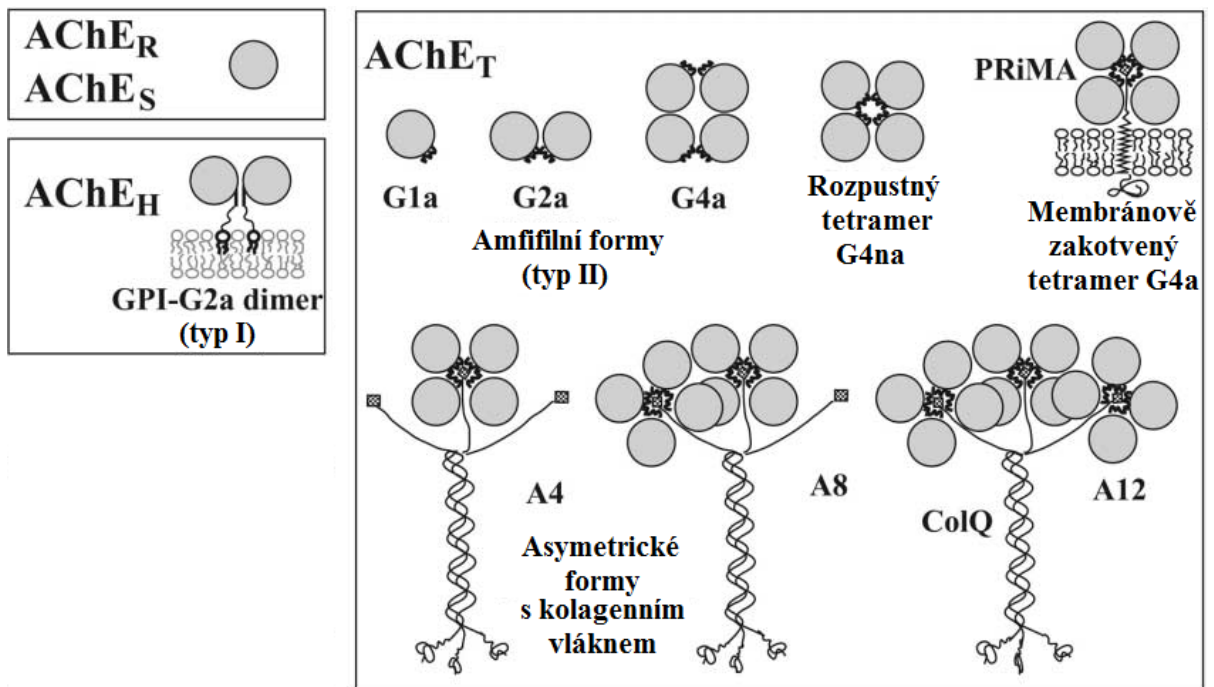
Látka	K <sub>i</sub>	SD
<b>7-MEOTA</b>	2,29E-06	5,94E-07
<b>PC_6</b>	9,69E-06	2,14E-06
<b>PC_13</b>	7,43E-06	3,09E-06
<b>PC_32</b>	1,05E-05	1,94E-06
<b>PC_37</b>	6,52E-06	1,09E-06
<b>PC_41</b>	9,89E-06	2,40E-06
<b>PC_48</b>	3,88E-06	5,41E-07
<b>PC_49</b>	5,10E-06	3,55E-06
<b>ACh</b>	1,14E-04	5,39E-05

Tabulka 4 – Naměřené hodnoty inhibiční konstanty K<sub>i</sub> včetně směrodatné odchylky (SD) odvozené vždy z šesti hodnot K<sub>i</sub> (průsečíků křivek koncentrací substrátu)

Látka	K <sub>i</sub> '	SD
<b>7-MEOTA</b>	2,32E-05	2,46E-05
<b>PC_6</b>	7,84E-05	1,50E-05
<b>PC_13</b>	5,80E-05	4,81E-05
<b>PC_32</b>	4,62E-05	3,43E-05
<b>PC_37</b>	5,93E-05	4,64E-05
<b>PC_41</b>	2,33E-05	2,72E-05
<b>PC_48</b>	4,95E-05	2,58E-05
<b>PC_49</b>	3,76E-05	2,59E-05
<b>ACh</b>	1,44E-02	1,02E-02

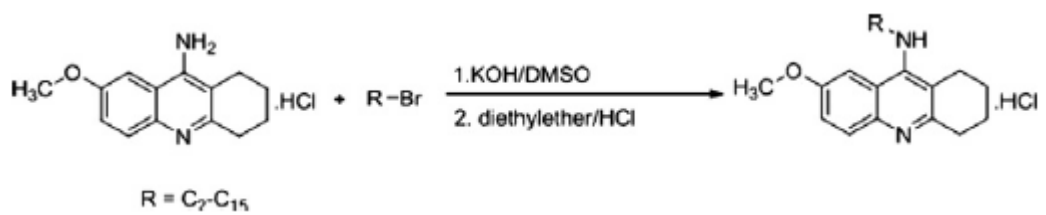
Tabulka 5 – Naměřené hodnoty inhibiční konstanty K<sub>i</sub>' včetně směrodatné odchylky (SD) odvozené vždy z šesti hodnot K<sub>i</sub>' (průsečíků křivek koncentrací substrátu)



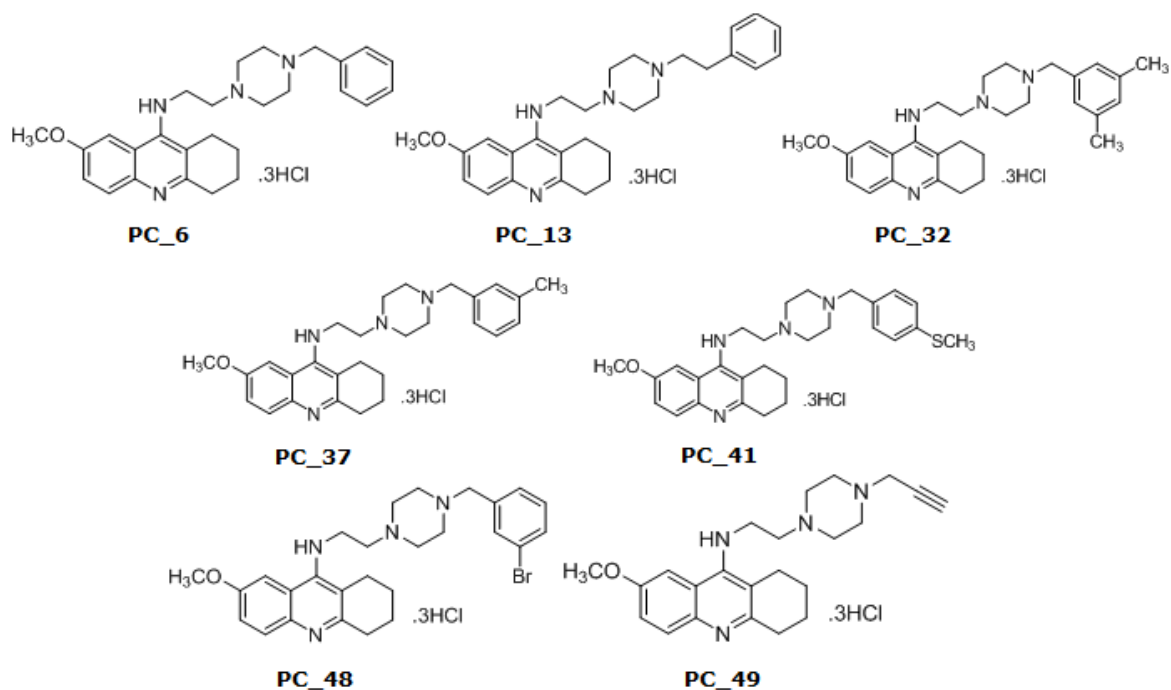


G1–G4 – kulovité formy s jednou, dvěma či čtyřmi podjednotkami. A4–A12 – asymetrické formy s jedním, dvě či třemi tetrametry.

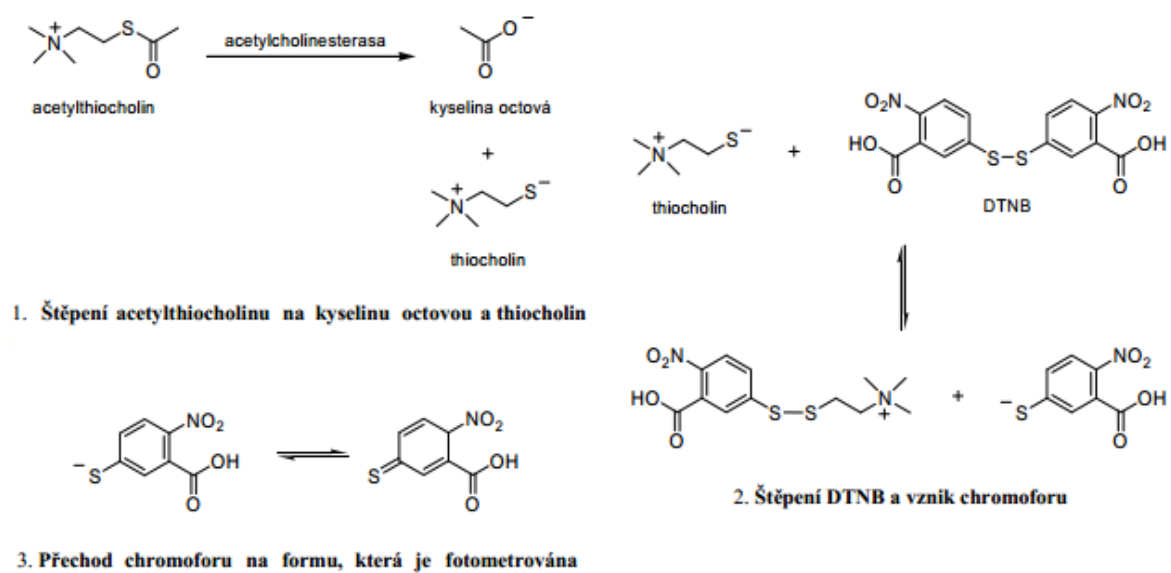
Obrázek 3 – Typy katalytických podjednotek a pokročilých molekulárních forem acetylcholinesteráz (Massoulié 2002)



Obrázek 4 – Syntéza N-alkyl-7-methoxytakrinu (Korabecny a kol. 2010)

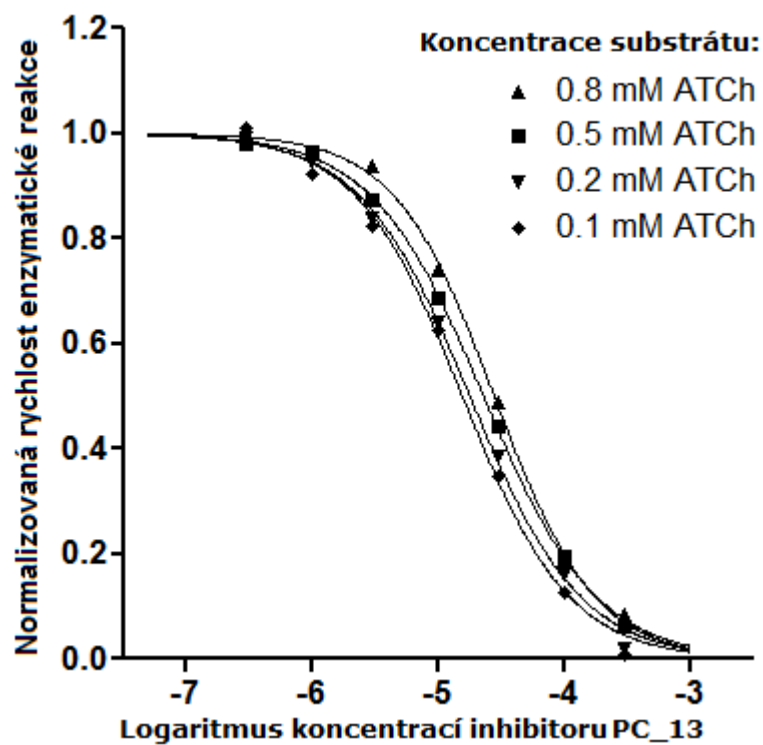


Obrázek 5 – Analyzované inhibitory AChE

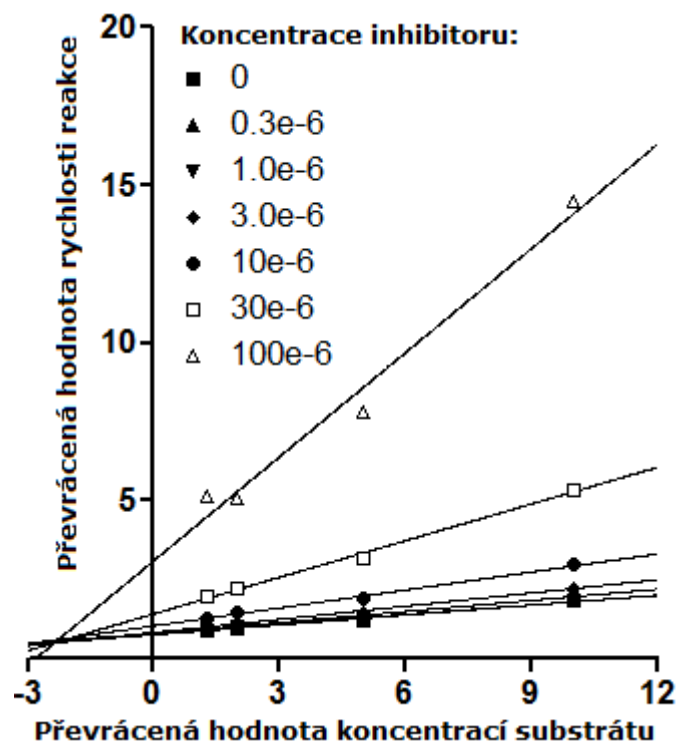


Obrázek 6 – Reakce ATCh s DTNB (Žďárová-Karasová a kol. 2010)

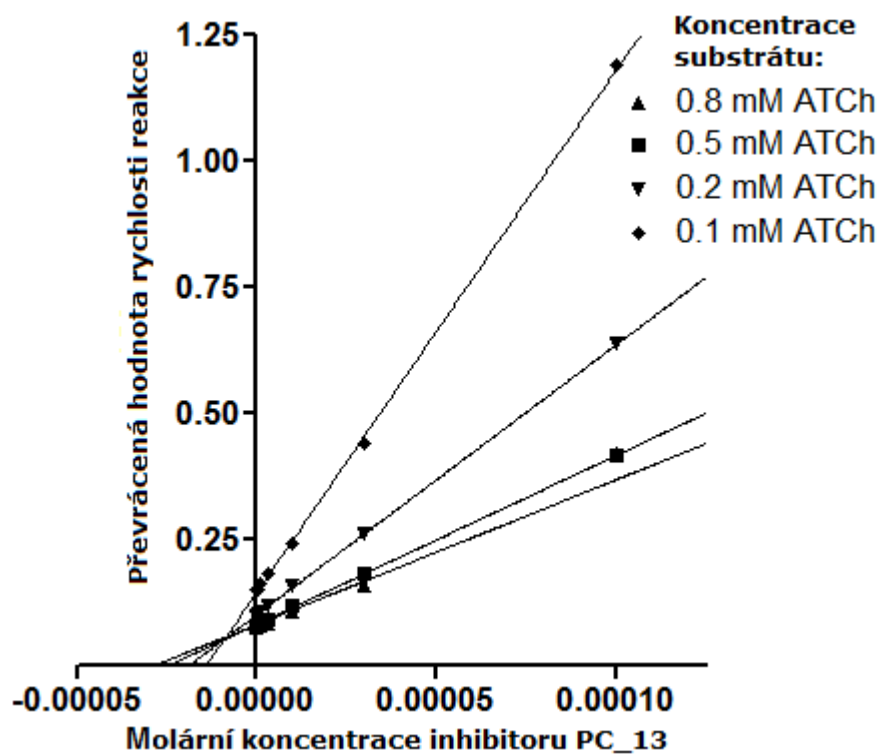
### 8.3 Grafy



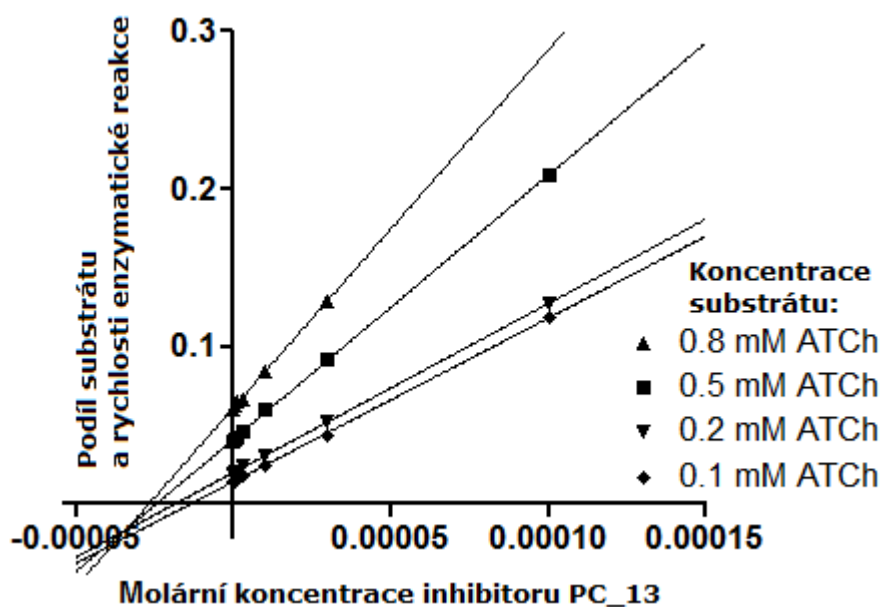
Graf 1 – Normalizovaný průběh inhibice AChE látkou PC\_13



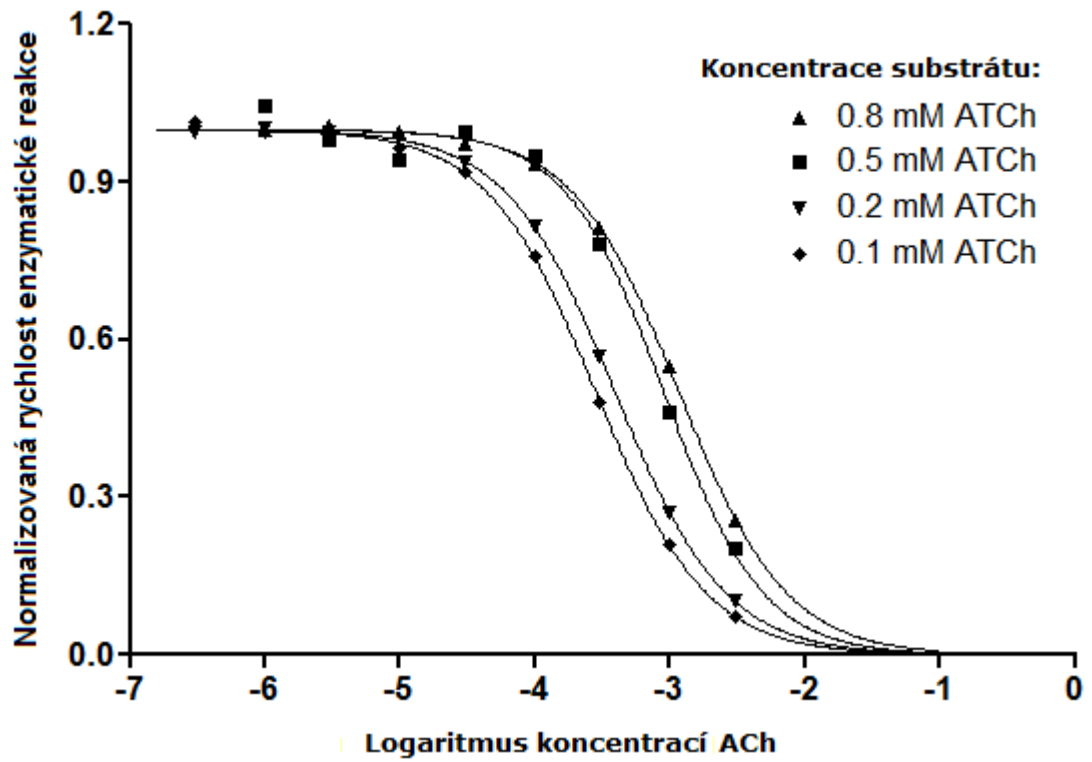
Graf 2 – Lineweaver-Burkovo vynesení pro látku PC\_13



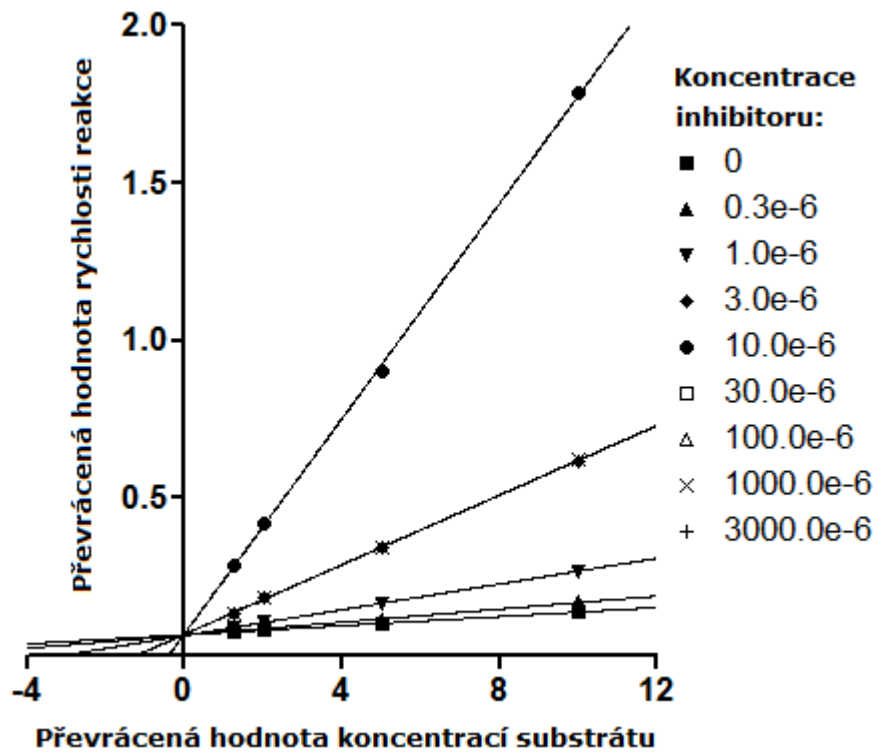
Graf 3 – Dixonovo vynesení pro látku PC<sub>13</sub>



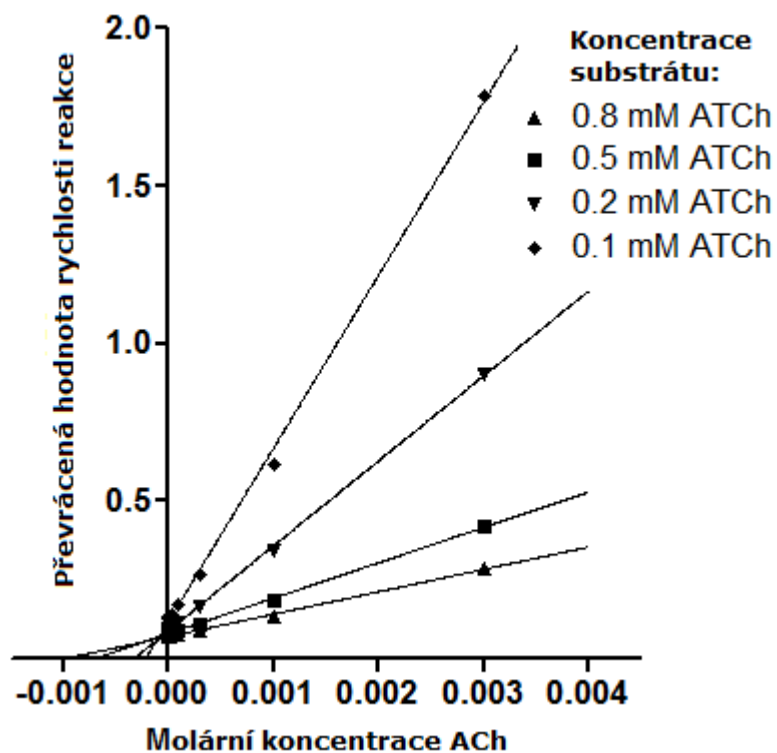
Graf 4 – Cornish-Bowdenovo vynesení pro látku PC<sub>13</sub>



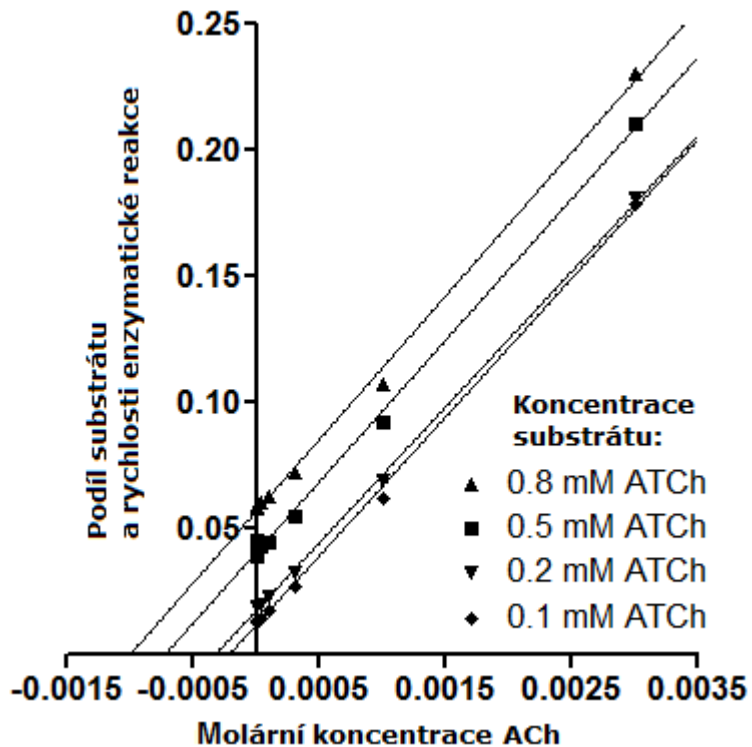
Graf 5 – Normalizovaný průběh inhibice AChE látkou ACh



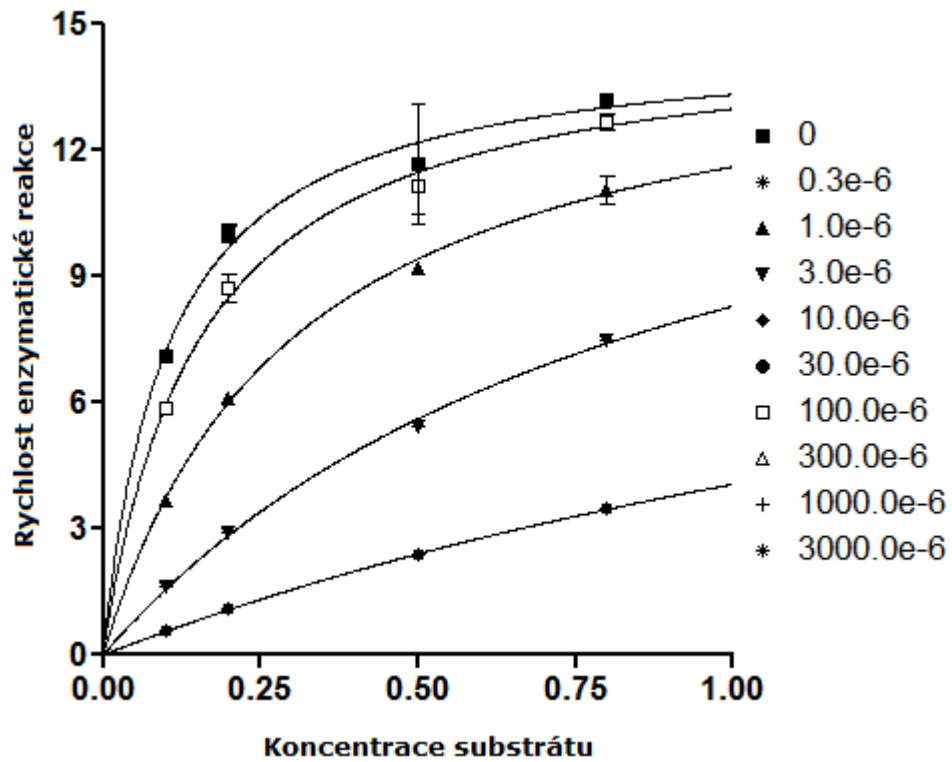
Graf 6 – Lineweaver-Burkovo vynesení pro látku ACh



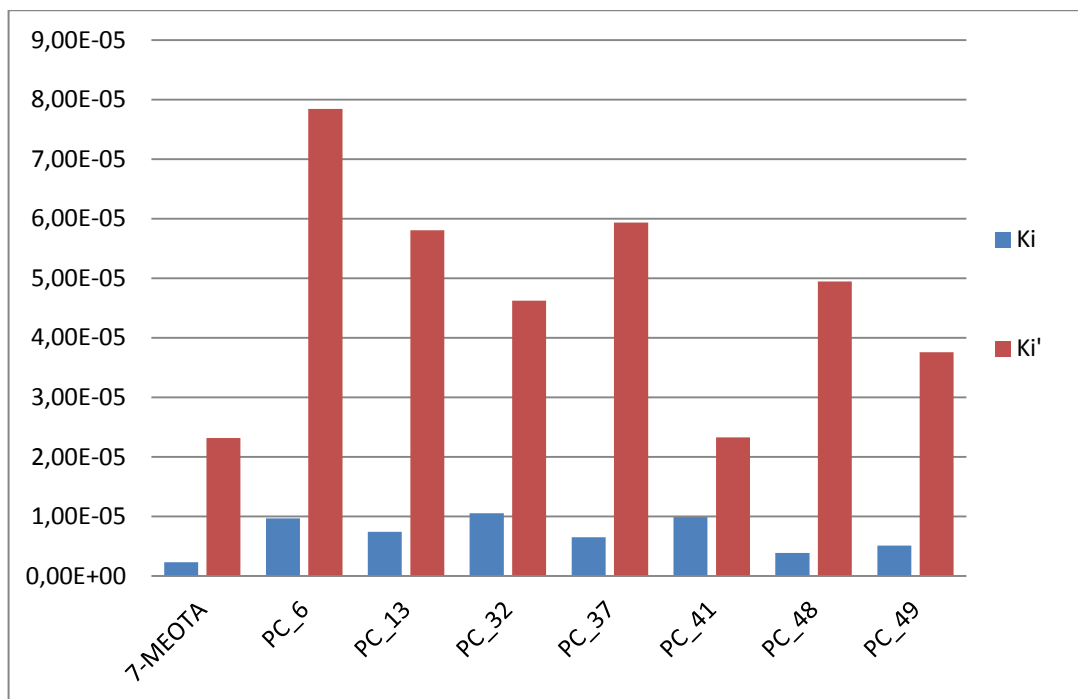
Graf 7 – Dixonovo vynesení pro látku ACh



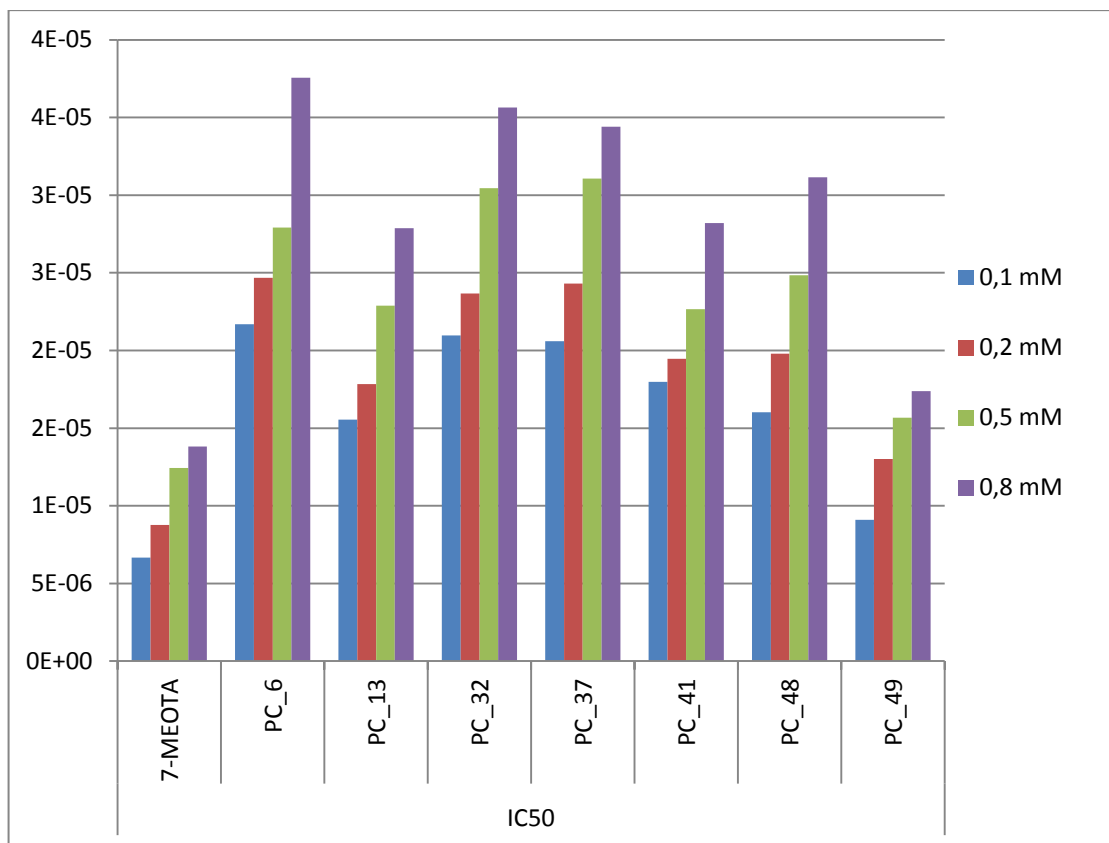
Graf 8 – Cornish-Bowdenovo vynesení pro látku ACh



Graf 9 – Pomocný graf, ukazující závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu, pro látku ACh



Graf 10 – Hodnoty inhibičních konstant  $K_i$  a  $K_i'$  pro látku 7-MEOTA a její analyzované analogy



Graf 11 – Hodnoty  $IC_{50}$  pro jednotlivé koncentrace substrátu látky 7-MEOTA a jejích analyzovaných analogů

## 9 Citační rejstřík

- ABERNETHY, MH, PM GEORGE, JL HERRON A RT EVANS, 1986. PLASMA CHOLINESTERASE PHENOTYPING WITH USE OF VISIBLE-REGION SPECTROPHOTOMETRY. *CLINICAL CHEMISTRY*. 1., ROČ. 32, Č. 1, S. 194–197. ISSN 0009-9147.
- ACOSTA-BAENA, NATALIA, DIEGO SEPULVEDA-FALLA, CARLOS MARIO LOPERA-GOMEZ, MARIO CESAR JARAMILLO-ELORZA, SONIA MORENO, DANIEL CAMILO AGUIRRE-ACEVEDO, AMANDA SALDARRIAGA A FRANCISCO LOPERA, 2011. PRE-DEMENTIA CLINICAL STAGES IN PRESENILIN 1 E280A FAMILIAL EARLY-ONSET ALZHEIMER'S DISEASE: A RETROSPECTIVE COHORT STUDY. *LANCET NEUROLOGY* [ONLINE]. 3., ROČ. 10, Č. 3, S. 213–220. ISSN 1474-4422. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S1474-4422(10)70323-9
- ADEM, A A E KARLSSON, 1997. MUSCARINIC RECEPTOR SUBTYPE SELECTIVE TOXINS. *LIFE SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 60, Č. 13-14, S. 1069–1076. ISSN 0024-3205. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0024-3205(97)00049-0
- AERSSENS, J, P RAEYMAEKERS, S LILIEFELD A W PARYS, 1999. APOE GENOTYPE AND RESPONSE TO GALANTAMINE TREATMENT IN ALZHEIMER'S DISEASE. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS*. ROČ. 65, Č. 4, S. A195. ISSN 0002-9297.
- AHIMA, RS, D PRABAKARAN, C MANTZOROS, DQ QU, B LOWELL, E MARATOSFLIER A JS FLIER, 1996. ROLE OF LEPTIN IN THE NEUROENDOCRINE RESPONSE TO FASTING. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 382, Č. 6588, S. 250–252. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/382250A0
- AIDARALIEVA, NURIPA JENISHBEKOVNA, KOUZIN KAMINO, RYO KIMURA, MITSUKO YAMAMOTO, TAKESHI MORIHARA, HIROAKI KAZUI, RYOTA HASHIMOTO, TOSHIHISA TANAKA, TAKASHI KUDO, TOMOYUKI KIDA, JUN-ICHIRO OKUDA, TAKESHI UEMA, HIDEHISA YAMAGATA, TETSURO MIKI, HIROYASU AKATSU, KENJI KOSAKA A MASATOSHI TAKEDA, 2008. DYNAMIN 2 GENE IS A NOVEL SUSCEPTIBILITY GENE FOR LATE-ONSET ALZHEIMER DISEASE IN NON-APOE-EPSILON 4 CARRIERS. *JOURNAL OF HUMAN GENETICS* [ONLINE]. 4., ROČ. 53, Č. 4, S. 296–302. ISSN 1434-5161. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S10038-008-0251-9
- AIELLO, LC A P WHEELER, 1995. THE EXPENSIVE-TISSUE HYPOTHESIS - THE BRAIN AND THE DIGESTIVE-SYSTEM IN HUMAN AND PRIMATE EVOLUTION. *CURRENT ANTHROPOLOGY* [ONLINE]. 4., ROČ. 36, Č. 2, S. 199–221. ISSN 0011-3204. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1086/204350
- ALKONDON, M, EFR PEREIRA, HM EISENBERG A EX ALBUQUERQUE, 2000. NICOTINIC RECEPTOR ACTIVATION IN HUMAN CEREBRAL CORTICAL INTERNEURONS: A MECHANISM FOR INHIBITION AND DISINHIBITION OF NEURONAL NETWORKS. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 20, Č. 1, S. 66–75. ISSN 0270-6474.
- ALLADI, S, J. XUEREB, T. BAK, P. NESTOR, J. KNIBB, K. PATTERSON A J. R. HODGES, 2007. FOCAL CORTICAL PRESENTATIONS OF ALZHEIMER'S DISEASE. *BRAIN* [ONLINE]. ROČ. 130, Č. 10, S. 2636–2645. ISSN 0006-8950. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1093/BRAIN/AWM213
- AMADOR-ORTIZ, CATALINA, WEN-LANG LIN, ZESHAN AHMED, DAVID PERSONETT, PETER DAVIES, RANJAN DARA, NEILL R. GRAFF-RADFORD, MICHAEL L. HUTTON A DENNIS W. DICKSON, 2007. TDP-43 IMMUNOREACTIVITY IN HIPPOCAMPAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE. *ANNALS OF NEUROLOGY* [ONLINE]. 5., ROČ. 61, Č. 5, S. 435–445. ISSN 0364-5134. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/ANA.21154
- ARENDT, T, V BIGL A A ARENDT, 1984. NEURON LOSS IN THE NUCLEUS BASALIS OF MEYNERT IN CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. ROČ. 65, Č. 1, S. 85–88. ISSN 0001-6322.
- ARENDT, T, V BIGL, A ARENDT A A TENNSTEDT, 1983. LOSS OF NEURONS IN THE NUCLEUS BASALIS OF MEYNERT IN ALZHEIMERS-DISEASE, PARALYSIS AGITANS AND KORSAKOFFS DISEASE. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. ROČ. 61, Č. 2, S. 101–108. ISSN 0001-6322.
- ARPAGAU, M, M KOTT, KP VATSIS, CF BARTELS, BN LADU A O LOCKRIDGE, 1990. STRUCTURE OF THE GENE FOR HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE - EVIDENCE FOR A SINGLE COPY. *BIOCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 29, Č. 1, S. 124–131. ISSN 0006-2960. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1021/B100453A015
- AULD, DS, TJ KORNECOOK, S BASTIANETTO A R QUIRION, 2002. ALZHEIMER'S DISEASE AND THE BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC SYSTEM: RELATIONS TO BETA-AMYLOID PEPTIDES, COGNITION, AND TREATMENT STRATEGIES. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 68, Č. 3, S. 209–245. ISSN 0301-0082. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0301-0082(02)00079-5
- BÄCKMAN, L, S JONES, AK BERGER, EJ LAUKKA A BJ SMALL, 2004. MULTIPLE COGNITIVE DEFICITS DURING THE TRANSITION TO ALZHEIMER'S DISEASE. *JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE* [ONLINE]. 9., ROČ. 256, Č. 3, S. 195–204. ISSN 0954-6820. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1365-2796.2004.01386.X
- BACHMAN, DL, PA WOLF, RT LINN, JE KNOEFEL, JL COBB, AJ BELANGER, LR WHITE A RB DAGOSTINO, 1993. INCIDENCE OF DEMENTIA AND PROBABLE ALZHEIMERS-DISEASE IN A GENERAL-POPULATION - THE FRAMINGHAM-STUDY. *NEUROLOGY*. 3., ROČ. 43, Č. 3, S. 515–519. ISSN 0028-3878.
- BALL, M, H BRAAK, P COLEMAN, D DICKSON, C DUYSKAERTS, P GAMBETTI, L HANSEN, B HYMAN, K JELLINGER, W MARKESBERY, D PERL, J POWERS, J PRICE, JQ TROJANOWSKI, H WISNIEWSKI, C PHELPS A Z KHACHATURIAN, 1997. CONSENSUS RECOMMENDATIONS FOR THE POSTMORTEM DIAGNOSIS OF ALZHEIMER'S DISEASE. *NEUROBIOLOGY OF AGING*. ROČ. 18, Č. 4, 1, S. S1–S2. ISSN 0197-4580.
- BANCHER, C A KA JELLINGER, 1994. NEUROFIBRILLARY TANGLE PREDOMINANT FORM OF SENILE DEMENTIA OF ALZHEIMER-TYPE - A RARE SUBTYPE IN VERY OLD SUBJECTS. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. 12., ROČ. 88, Č. 6, S. 565–570. ISSN 0001-6322.
- BARTELS, CF, K JAMES A BN LADU, 1992. DNA MUTATIONS ASSOCIATED WITH THE HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE J-VARIANT. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS*. 5., ROČ. 50, Č. 5, S. 1104–1114. ISSN 0002-9297.
- BARTORELLI, L, C GIRALDI, M SACCARDO, S CAMMARATA, G BOTTINI, AM FASANARO, A TREQUATTRINI A UPGRADE STUDY GRP, 2005. EFFECTS OF SWITCHING FROM AN ACHE INHIBITOR TO A DUAL ACHE-BUCHE INHIBITOR IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE. *CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION* [ONLINE]. 11., ROČ. 21, Č. 11, S. 1809–1817. ISSN 0300-7995. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1185/030079905X65655
- BARTUS, RT, RL DEAN, B BEER A AS LIPPA, 1982. THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS OF GERIATRIC MEMORY DYSFUNCTION. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 217, Č. 4558, S. 408–417. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.7046051
- BARTZOKIS, G, 2004. AGE-RELATED MYELIN BREAKDOWN: A DEVELOPMENTAL MODEL OF COGNITIVE DECLINE AND ALZHEIMER'S DISEASE. *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. 1., ROČ. 25, Č. 1, S. 5–18. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2003.03.001

- BAULAC, S, MJ LAVOIE, WT KIMBERLY, J STRAHLE, MS WOLFE, DJ SELKOE A WM XIA, 2003. FUNCTIONAL GAMMA-SECRETASE COMPLEX ASSEMBLY IN GOLGI/TRANS-GOLGI NETWORK: INTERACTIONS AMONG PRESENILIN, NICAISTRIN, A $\beta$ 1, PEN-2, AND GAMMA-SECRETASE SUBSTRATES. *NEUROBIOLOGY OF DISEASE* [ONLINE]. 11., ROČ. 14, Č. 2, S. 194–204. ISSN 0969-9961. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0969-9961(03)00123-2
- BEKRIS, LYNN M., CHANG-EN YU, THOMAS D. BIRD A DEBBY W. TSUANG, 2010. GENETICS OF ALZHEIMER DISEASE. *JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY AND NEUROLOGY* [ONLINE]. 12., ROČ. 23, Č. 4, S. 213–227. ISSN 0891-9887. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1177/0891988710383571
- BENILOVA, IRYNA A BART DE STROOPER, 2011. AN OVERLOOKED NEUROTOXIC SPECIES IN ALZHEIMER'S DISEASE. *NATURE NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 8., ROČ. 14, Č. 8, S. 949–950. ISSN 1097-6256. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NN.2871
- BERMEJO-PAREJA, F., J. BENITO-LEON, S. VEGA, M. J. MEDRANO, G. C. ROMAN A NEUROLOGICAL DISORDERS CENT SPAIN, 2008. INCIDENCE AND SUBTYPES OF DEMENTIA IN THREE ELDERLY POPULATIONS OF CENTRAL SPAIN. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 264, Č. 1-2, S. 63–72. ISSN 0022-510X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.JNS.2007.07.021
- BERTRAM, L A RE TANZI, 2005. THE GENETIC EPIDEMIOLOGY OF NEURODEGENERATIVE DISEASE. *JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION* [ONLINE]. ROČ. 115, Č. 6, S. 1449–1457. ISSN 0021-9738. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1172/JCI24761
- BERTRAM, LARS A HARALD HAMPEL, 2011. THE ROLE OF GENETICS FOR BIOMARKER DEVELOPMENT IN NEURODEGENERATION. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. 12., ROČ. 95, Č. 4, SI, S. 501–504. ISSN 0301-0082. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.PNEUROBIO.2011.09.011
- BERTRAM, LARS, MATTHEW B. MCQUEEN, KRISTINA MULLIN, DEBORAH BLACKER A RUDOLPH E. TANZI, 2007. SYSTEMATIC META-ANALYSES OF ALZHEIMER DISEASE GENETIC ASSOCIATION STUDIES: THE ALZGENE DATABASE. *NATURE GENETICS* [ONLINE]. 1., ROČ. 39, Č. 1, S. 17–23. ISSN 1061-4036. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NG1934
- BIRD, THOMAS D, 1993. ALZHEIMER DISEASE OVERVIEW. IN: ROBERTA A PAGON, MARGARET P ADAM, THOMAS D BIRD, CYNTHIA R DOLAN, CHIN-TO FONG A KAREN STEPHENS, ED. *GENEREVIEWS™* [ONLINE]. SEATTLE (WA): UNIVERSITY OF WASHINGTON, SEATTLE [VID. 9. SRPEN 2013]. DOSTUPNÉ Z: HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/BOOKS/NBK1161/
- BLACKER, D, MA WILCOX, NM LAIRD, L RODES, SM HORVATH, RCP GO, R PERRY, B WATSON, SS BASSETT, MG MCINNIS, MS ALBERT, BT HYMAN A RE TANZI, 1998. ALPHA-2 MACROGLOBULIN IS GENETICALLY ASSOCIATED WITH ALZHEIMER DISEASE. *NATURE GENETICS*. 8., ROČ. 19, Č. 4, S. 357–360. ISSN 1061-4036.
- BLUSZTAJN, JK A RJ WURTMAN, 1983. CHOLINE AND CHOLINERGIC NEURONS. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 221, Č. 4611, S. 614–620. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.6867732
- BON, S, M VIGNY A J MASSOULIE, 1979. ASYMMETRIC AND GLOBULAR FORMS OF ACETYLCHOLINESTERASE IN MAMMALS AND BIRDS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 76, Č. 6, S. 2546–2550. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.76.6.2546
- BOWEN, DM, CB SMITH, P WHITE A AN DAVISON, 1976. NEUROTRANSMITTER-RELATED ENZYMES AND INDEXES OF HYPOXIA IN SENILE DEMENTIA AND OTHER ABIOTROPHIES. *BRAIN* [ONLINE]. ROČ. 99, Č. SEP, S. 459–496. ISSN 0006-8950. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1093/BRAIN/99.3.459
- BRAAK, H A E BRAAK, 1991. NEUROPATHOLOGICAL STAGING OF ALZHEIMER-RELATED CHANGES. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. ROČ. 82, Č. 4, S. 239–259. ISSN 0001-6322.
- BRAAK, HEIKO A KELLY DEL TREDICI, 2012. WHERE, WHEN, AND IN WHAT FORM DOES SPORADIC ALZHEIMER'S DISEASE BEGIN? *CURRENT OPINION IN NEUROLOGY* [ONLINE]. 12., ROČ. 25, Č. 6, S. 708–714. ISSN 1350-7540. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1097/WCO.0B013E32835A3432
- CAIRNS, NJ, A CHADWICK, PJ LUTHER A PL LANTOS, 1992. ASTROCYTOSIS, BETA-A4-PROTEIN DEPOSITION AND PAIRED HELICAL FILAMENT FORMATION IN ALZHEIMERS-DISEASE. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 112, Č. 1-2, S. 68–75. ISSN 0022-510X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0022-510X(92)90134-7
- CASELLI, RICHARD J., AMYLOU C. DUECK, DAVID OSBORNE, MARWAN N. SABBAGH, DONALD J. CONNOR, GEOFFREY L. AHERN, LESLIE C. BAXTER, STEVEN Z. RAPCSAK, JIONG SHI, BRYAN K. WOODRUFF, DONA E. C. LOCKE, CHARLENE HOFFMAN SNYDER, GENE E. ALEXANDER, ROSA RADEMAKERS A ERIC M. REIMAN, 2009. LONGITUDINAL MODELING OF AGE-RELATED MEMORY DECLINE AND THE APOE EPSILON 4 EFFECT. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* [ONLINE]. ROČ. 361, Č. 3, S. 255–263. ISSN 0028-4793. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1056/NEJM0A0809437
- CAULFIELD, MP A NJM BIRDSALL, 1998. INTERNATIONAL UNION OF PHARMACOLOGY. XVII. CLASSIFICATION OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*. ROČ. 50, Č. 2, S. 279–290. ISSN 0031-6997.
- COMBES, D, Y FEDON, M GRAUSO, JP TOUTANT A M ARPAGAU, 2000. FOUR GENES ENCODE ACETYLCHOLINESTERASES IN THE NEMATODES CAENORHABDITIS ELEGANS AND CAENORHABDITIS BRIGGSAAE. CDNA SEQUENCES, GENOMIC STRUCTURES, MUTATIONS AND IN VIVO EXPRESSION. *JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 300, Č. 4, S. 727–742. ISSN 0022-2836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1006/JMBI.2000.3917
- COOPER-KUHN, CM, J WINKLER A HG KUHN, 2004. DECREASED NEUROGENESIS AFTER CHOLINERGIC FOREBRAIN LESION IN THE ADULT RAT. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 77, Č. 2, S. 155–165. ISSN 0360-4012. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/JNR.20116
- CORBO, RM A R SCACCHI, 1999. APOLIPOPROTEIN E (APOE) ALLELE DISTRIBUTION IN THE WORLD. IS APOE\*4 A 'THRIFTY' ALLELE? *ANNALS OF HUMAN GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 63, Č. 4, S. 301–310. ISSN 0003-4800. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1046/J.1469-1809.1999.6340301.X
- CORDER, EH, AM SAUNDERS, NJ RISCH, WJ STRITTMATTER, DE SCHMECHEL, PC GASKELL, JB RIMMLER, PA LOCKE, PM CONNALLY, KE SCHMADER, GW SMALL, AD ROSES, JL HAINES A MA PERICAKVANCE, 1994. PROTECTIVE EFFECT OF APOLIPOPROTEIN-E TYPE-2 ALLELE FOR LATE-ONSET ALZHEIMER-DISEASE. *NATURE GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 7, Č. 2, S. 180–184. ISSN 1061-4036. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NG0694-180
- CORDER, EH, AM SAUNDERS, WJ STRITTMATTER, DE SCHMECHEL, PC GASKELL, GW SMALL, AD ROSES, JL HAINES A MA PERICAKVANCE, 1993. GENE DOSE OF APOLIPOPROTEIN-E TYPE-4 ALLELE AND THE RISK OF ALZHEIMERS-DISEASE IN LATE-ONSET FAMILIES. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 261, Č. 5123, S. 921–923. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.8346443
- COREY-BLOOM, J, 1998. THE EFFICACY AND SAFETY OF ENA-713 IN PATIENTS WITH MILD TO MODERATELY SEVERE ALZHEIMER'S DISEASE. *JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY*. 9., ROČ. 46, Č. 9, S. S12. ISSN 0002-8614.

- CORNISH-BOWDEN, ATHEL, 1974. A SIMPLE GRAPHICAL METHOD FOR DETERMINING THE INHIBITION CONSTANTS OF MIXED, UNCOMPETITIVE AND NON-COMPETITIVE INHIBITORS (SHORT COMMUNICATION). *BIOCHEMICAL JOURNAL*. ROČ. 137, Č. 1, S. 143–144. ISSN 0264-6021.
- COUSIN, X, C CREMINON, J GRASSI, K MEFLAH, G CORNU, B SALIOU, S BON, J MASSOULIE A C BON, 1996. ACETYLCHOLINESTERASE FROM BUNGARUS VENOM: A MONOMERIC SPECIES. *FEBS LETTERS* [ONLINE]. ROČ. 387, Č. 2-3, S. 196–200. ISSN 0014-5793. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0014-5793(96)00447-4
- COUSIN, X, T HOTELIER, K GILES, JP TOUTANT A A CHATONNET, 1998. ACHEDB: THE DATABASE SYSTEM FOR ESTHER, THE ALPHA/BETA FOLD FAMILY OF PROTEINS AND THE CHOLINESTERASE GENE SERVER. *NUCLEIC ACIDS RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 26, Č. 1, S. 226–228. ISSN 0305-1048. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1093/NAR/26.1.226
- CRAS, P, MA SMITH, PL RICHEY, SL SIEDLAK, P MULVIHILL A G PERRY, 1995. EXTRACELLULAR NEUROFIBRILLARY TANGLES REFLECT NEURONAL LOSS AND PROVIDE FURTHER EVIDENCE OF EXTENSIVE PROTEIN CROSS-LINKING IN ALZHEIMER-DISEASE. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. 4., ROČ. 89, Č. 4, S. 291–295. ISSN 0001-6322.
- CRUCHAGA, CARLOS, SUMITRA CHAKRAVERTY, KEVIN MAYO, FRANCESCO L. M. VALLANIA, ROBI D. MITRA, KELLEY FABER, JENNIFER WILLIAMSON, TOM BIRD, RAMON DIAZ-ARRASTIA, TATIANA M. FOROUD, BRADLEY F. BOEVE, NEILL R. GRAFF-RADFORD, PAMELA ST. JEAN, MICHAEL LAWSON, MARGARET G. EHM, RICHARD MAYEUX, ALISON M. GOATE A NIA-LOAD NCRAD FAMILY STUDY CONSOR, 2012. RARE VARIANTS IN APP, PSEN1 AND PSEN2 INCREASE RISK FOR AD IN LATE-ONSET ALZHEIMER'S DISEASE FAMILIES. *PLOS ONE* [ONLINE]. ROČ. 7, Č. 2. ISSN 1932-6203. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0031039
- CRUTS, M, L HENDRIKS A C VANBROECKHOVEN, 1996. THE PRESENILIN GENES: A NEW GENE FAMILY INVOLVED IN ALZHEIMER DISEASE PATHOLOGY. *HUMAN MOLECULAR GENETICS*. ROČ. 5, Č. SI, S. 1449–1455. ISSN 0964-6906.
- CRUTS, MARC, JESSIE THEUNS A CHRISTINE VAN BROECKHOVEN, 2012. LOCUS-SPECIFIC MUTATION DATABASES FOR NEURODEGENERATIVE BRAIN DISEASES. *HUMAN MUTATION* [ONLINE]. 9., ROČ. 33, Č. 9, SI, S. 1340–1344. ISSN 1059-7794. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/HUMU.22117
- DALE, MC, SE LIBRETTO, C PATTERSON, J ANDERSON, T CHOUDHURY, F MCCAFFERTY, C MCWILLIAM A M RICHARDSON, 2003. CLINICAL EXPERIENCE OF GALANTAMINE IN DEMENTIA: A SERIES OF CASE REPORTS. *CURRENT MEDICAL RESEARCH AND OPINION* [ONLINE]. ROČ. 19, Č. 6, S. 508–518. ISSN 0300-7995. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1185/030079903125002054
- DANI, JA, 2001. OVERVIEW OF NICOTINIC RECEPTORS AND THEIR ROLES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *BIOLOGICAL PSYCHIATRY* [ONLINE]. ROČ. 49, Č. 3, S. 166–174. ISSN 0006-3223. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0006-3223(00)01011-8
- DE FELICE, FERNANDA G., DIANA WU, MARY P. LAMBERT, SARA J. FERNANDEZ, PAULINE T. VELASCO, PASCALE N. LACOR, EILEEN H. BIGIO, JASNA JERICIC, PAUL J. ACTON, PAUL J. SHUGHRUE, ELIZABETH CHEN-DODSON, GENE G. KINNEY A WILLIAM L. KLEIN, 2008. ALZHEIMER'S DISEASE-TYPE NEURONAL TAU HYPERPHOSPHORYLATION INDUCED BY A BETA OLIGOMERS. *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. 9., ROČ. 29, Č. 9, S. 1334–1347. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.02.029
- DE STROOPER, B, P SAFTIG, K CRAESSAERTS, H VANDERSTICHELE, G GUHDE, W ANNAERT, K VON FIGURA A F VAN LEUVEN, 1998. DEFICIENCY OF PRESENILIN-1 INHIBITS THE NORMAL CLEAVAGE OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 391, Č. 6665, S. 387–390. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/34910
- DELAÈRE, P, C DUYNCKAERTS, Y HE, F PIETTE A JJ HAUW, 1991. SUBTYPES AND DIFFERENTIAL LAMINAR DISTRIBUTIONS OF BETA-A4 DEPOSITS IN ALZHEIMERS-DISEASE - RELATIONSHIP WITH THE INTELECTUAL STATUS OF 26 CASES. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. ROČ. 81, Č. 3, S. 328–335. ISSN 0001-6322.
- DI FEDE, GIUSEPPE, MARCELLA CATANIA, MICHELA MORBIN, GIACOMINA ROSSI, SILVIA SUARDI, GIULIA MAZZOLENI, MARCO MERLIN, ANNA RITA GIOVAGNOLI, SARA PRIONI, ALESSANDRA ERBETTA, CHIARA FALCONE, MARCO GOBBI, LAURA COLOMBO, ANTONIO BASTONE, MARTEN BEEG, CLAUDIA MANZONI, BRUNA FRANCESCUCCHI, ALBERTO SPAGNOLI, LAURA CANTU, ELENA DEL FAVERO, EFRAT LEVY, MARIO SALMONA A FABRIZIO TAGLIAVINI, 2009. A RECESSIVE MUTATION IN THE APP GENE WITH DOMINANT-NEGATIVE EFFECT ON AMYLOIDOGENESIS. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 323, Č. 5920, S. 1473–1477. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.1168979
- DIXON, M., 1953. THE DETERMINATION OF ENZYME INHIBITOR CONSTANTS. *BIOCHEMICAL JOURNAL*. ROČ. 55, Č. 1, S. 170–171. ISSN 0264-6021.
- DOIDGE, N., 2010. *THE BRAIN THAT CHANGES ITSELF: STORIES OF PERSONAL TRIUMPH FROM THE FRONTIERS OF BRAIN SCIENCE* [ONLINE]. B.M.: SCRIBE PUBLICATIONS. ISBN 9781921753091. DOSTUPNÉ Z: HTTP://BOOKS.GOOGLE.CZ/BOOKS?ID=0H7YSOFES5AC
- DRACHMAN, DA A J LEAVITT, 1974. HUMAN MEMORY AND CHOLINERGIC SYSTEM - RELATIONSHIP TO AGING. *ARCHIVES OF NEUROLOGY*. ROČ. 30, Č. 2, S. 113–121. ISSN 0003-9942.
- DUBOIS, B, M RUBERG, F JAVOYAGID, A PLOSKA A Y AGID, 1983. A SUBCORTICO-CORTICAL CHOLINERGIC SYSTEM IS AFFECTED IN PARKINSONS-DISEASE. *BRAIN RESEARCH*. ROČ. 288, Č. 1-2, S. 213–218. ISSN 0006-8993.
- DUNBAR, GEOFFREY C., FRASER INGLIS, RAMANA KUCHIBHATLA, TONMOY SHARMA, MARK TOMLINSON A JAMES WAMSLEY, 2007. EFFECT OF ISPRONICLINE, A NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR PARTIAL AGONIST, IN SUBJECTS WITH AGE ASSOCIATED MEMORY IMPAIRMENT (AAMI). *JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY* [ONLINE]. 3., ROČ. 21, Č. 2, S. 171–178. ISSN 0269-8811. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1177/0269881107066855
- DUYCKAERTS, C A JJ HAUW, 1997. PREVALENCE, INCIDENCE AND DURATION OF BRAAK'S STAGES IN THE GENERAL POPULATION: CAN WE KNOW? *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. ROČ. 18, Č. 4, S. 362–369. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0197-4580(97)00047-X
- DUYCKAERTS, C, T UCHIHARA, D SEILHEAN, Y HE A JJ HAUW, 1997. DISSOCIATION OF ALZHEIMER TYPE PATHOLOGY IN A DISCONNECTED PIECE OF CORTEX. *ACTA NEUROPATHOLOGICA*. 5., ROČ. 93, Č. 5, S. 501–507. ISSN 0001-6322.
- DUYCKAERTS, CHARLES, BENOIT DELATOUR A MARIE-CLAUDE POTIER, 2009. CLASSIFICATION AND BASIC PATHOLOGY OF ALZHEIMER DISEASE. *ACTA NEUROPATHOLOGICA* [ONLINE]. ROČ. 118, Č. 1, S. 5–36. ISSN 0001-6322. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S00401-009-0532-1
- DWOSKIN, LP, R XU, JT AYERS A PA CROOKS, 2000. RECENT DEVELOPMENTS IN NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR ANTAGONISTS. *EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS* [ONLINE]. ROČ. 10, Č. 10, S. 1561–1581. ISSN 1354-3776. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1517/13543776.10.10.1561
- EAGGER, SA A RJ HARVEY, 1995. CLINICAL HETEROGENEITY - RESPONDERS TO CHOLINERGIC THERAPY. *ALZHEIMER DISEASE & ASSOCIATED DISORDERS* [ONLINE]. ROČ. 9, Č. 2, S. 37–42. ISSN 0893-0341. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1097/00002093-199501002-00007

- EGAN, TM A RA NORTH, 1986. ACETYLCHOLINE HYPERPOLARIZES CENTRAL NEURONS BY ACTING ON AN M2 MUSCARINIC RECEPTOR. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 319, Č. 6052, S. 405–407. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/319405A0
- EHLERT, FJ, FM DELEN, SH YUN A P TRAN, 1991. DIFFERENTIAL COUPLING OF SUBTYPES OF THE MUSCARINIC RECEPTOR TO SIGNALING MECHANISMS IN BRAIN AND PERIPHERAL-TISSUES. IN: S KITO, T SEGAWA A RW OLSEN, ED. *NEURORECEPTOR MECHANISMS IN BRAIN*. S. 301–312. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY. ISBN 0-306-43821-6.
- EHLERT, FJ A LLP TRAN, 1990. REGIONAL DISTRIBUTION OF M1, M2 AND NON-M1, NON-M2 SUBTYPES OF MUSCARINIC BINDING-SITES IN RAT-BRAIN. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*. 12., ROČ. 255, Č. 3, S. 1148–1157. ISSN 0022-3565.
- EIKELENBOOM, PIET, ROB VEERHHUIS, ATOOSA FAMILIAN, JEROEN J. M. HOOZEMANS, WILLEM A. VAN GOOL A ANNEMIEKE J. M. ROZEMULLER, 2008. NEUROINFLAMMATION IN PLAQUE AND VASCULAR BETA-AMYLOID DISORDERS: CLINICAL AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS. *NEURODEGENERATIVE DISEASES* [ONLINE]. ROČ. 5, Č. 3-4, S. 190–193. ISSN 1660-2854. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1159/000113699
- ELLMAN, GL, KD COURTNEY, V ANDRES A RM FEATHERSTONE, 1961. A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 7, Č. 2, S. 88–&. ISSN 0006-2952. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- EVERITT, BJ A TW ROBBINS, 1997. CENTRAL CHOLINERGIC SYSTEMS AND COGNITION. *ANNUAL REVIEW OF PSYCHOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 48, S. 649–684. ISSN 0066-4308. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1146/ANNUREV.PSYCH.48.1.649
- FINCH, CE A RM SAPOLSKY, 1999. THE EVOLUTION OF ALZHEIMER DISEASE, THE REPRODUCTIVE SCHEDULE, AND APOE ISOFORMS. *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. ROČ. 20, Č. 4, S. 407–428. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0197-4580(99)00053-6
- FISHER, ABRAHAM, 2008. M1 MUSCARINIC AGONISTS TARGET MAJOR HALLMARKS OF ALZHEIMER'S DISEASE THE PIVOTAL ROLE OF BRAIN M1 RECEPTORS. *NEURODEGENERATIVE DISEASES* [ONLINE]. ROČ. 5, Č. 3-4, S. 237–240. ISSN 1660-2854. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1159/000113712
- FODALE, V., D. QUATTRONE, C. TRECROCI, V. CAMINITI A L. B. SANTAMARIA, 2006. ALZHEIMER'S DISEASE AND ANAESTHESIA: IMPLICATIONS FOR THE CENTRAL CHOLINERGIC SYSTEM. *BRITISH JOURNAL OF ANAESTHESIA* [ONLINE]. ROČ. 97, Č. 4, S. 445–452. ISSN 0007-0912. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1093/BJA/AEL233
- FÖRSTL, H A A KURZ, 1999. CLINICAL FEATURES OF ALZHEIMER'S DISEASE. *EUROPEAN ARCHIVES OF PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 12., ROČ. 249, Č. 6, S. 288–290. ISSN 0940-1334. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S004060050101
- FRANCIS, PT, AM PALMER, M SNAPE A GK WILCOCK, 1999. THE CHOLINERGIC HYPOTHESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE: A REVIEW OF PROGRESS. *JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY* [ONLINE]. ROČ. 66, Č. 2, S. 137–147. ISSN 0022-3050. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1136/JNPN.66.2.137
- FRANK, EM, HL MCDADE A WK SCOTT, 1996. NAMING IN DEMENTIA SECONDARY TO PARKINSON'S, HUNTINGTON'S, AND ALZHEIMER'S DISEASES. *JOURNAL OF COMMUNICATION DISORDERS* [ONLINE]. ROČ. 29, Č. 3, S. 183–197. ISSN 0021-9924. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0021-9924(95)00021-6
- FRAZIER, CJ, AV BUHLER, JL WEINER A TV DUNWIDDIE, 1998. SYNAPTIC POTENTIALS MEDIATED VIA ALPHA-BUNGAROTOXIN-SENSITIVE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN RAT HIPPOCAMPAL INTERNEURONS. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 18, Č. 20, S. 8228–8235. ISSN 0270-6474.
- FRIZELL, M, HASSELGR.PO A SJOSTRAN.J, 1970. AXOPLASMIC TRANSPORT OF ACETYLCHOLINESTERASE AND CHOLINE ACETYLTRANSFERASE IN VAGUS AND HYPOGLOSSAL NERVE OF RABBIT. *EXPERIMENTAL BRAIN RESEARCH*. ROČ. 10, Č. 5, S. 526–&. ISSN 0014-4819.
- FRÖBERT, Y, C CREMINON, X COUSIN, MH REMY, JM CHATEL, S BON, C BON A J GRASSI, 1997. ACETYLCHOLINESTERASES FROM ELAPIDAE SNAKE VENOMS: BIOCHEMICAL, IMMUNOLOGICAL AND ENZYMATIC CHARACTERIZATION. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 1339, Č. 2, S. 253–267. ISSN 0167-4838. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0167-4838(97)00009-5
- FUJINO, Y, DS WANG, N THOMAS, M ESPINOZA, P DAVIES A DW DICKSON, 2005. INCREASED FREQUENCY OF ARGYROPHILIC GRAIN DISEASE IN ALZHEIMER DISEASE WITH 4R TAU-SPECIFIC IMMUNOHISTOCHEMISTRY. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY*. 3., ROČ. 64, Č. 3, S. 209–214. ISSN 0022-3069.
- GÄHWILER, BH A DA BROWN, 1987. MUSCARINE AFFECTS CALCIUM-CURRENTS IN RAT HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL CELLS-INVITRO. *NEUROSCIENCE LETTERS* [ONLINE]. ROČ. 76, Č. 3, S. 301–306. ISSN 0304-3940. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0304-3940(87)90419-8
- GALOR, ODED A OMER MOAV, 2007. THE NEOLITHIC REVOLUTION AND CONTEMPORARY VARIATIONS IN LIFE EXPECTANCY. *JOURNAL OF ECONOMIC LITERATURE* [ONLINE]. ISSN 0022-0515. DOSTUPNÉ Z: HTTP://WWW.BROWN.EDU/DEPARTMENTS/ECONOMICS/PAPERS/2007/2007-14\_PAPER.PDF
- GALZI, JL A JP CHANGEUX, 1995. NEURONAL NICOTINIC RECEPTORS - MOLECULAR-ORGANIZATION AND REGULATIONS. *NEUROPHARMACOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 34, Č. 6, S. 563–582. ISSN 0028-3908. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0028-3908(95)00034-4
- GARRIGA, J A R CUSSÓ, 1992. EFFECT OF STARVATION ON GLYCOGEN AND GLUCOSE-METABOLISM IN DIFFERENT AREAS OF THE RAT-BRAIN. *BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 591, Č. 2, S. 277–282. ISSN 0006-8993. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0006-8993(92)91708-M
- GIACCONE, GIORGIO, MICHELA MORBIN, FABIO MODA, MARIO BOTTA, GIULIA MAZZOLENI, ANDREA UGGETTI, MARCELLA CATANIA, MARIA LUISA MORO, VERONICA REDAELLI, ALBERTO SPAGNOLI, ROBERTA SIMONA ROSSI, MARIO SALMONA, GIUSEPPE DI FEDE A FABRIZIO TAGLIAVINI, 2010. NEUROPATHOLOGY OF THE RECESSIVE A673V APP MUTATION: ALZHEIMER DISEASE WITH DISTINCTIVE FEATURES. *ACTA NEUROPATHOLOGICA* [ONLINE]. 12., ROČ. 120, Č. 6, S. 803–812. ISSN 0001-6322. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S00401-010-0747-1
- GIACOBINI, E, 2000. CHOLINESTERASE INHIBITORS STABILIZE ALZHEIMER'S DISEASE. IN: JH GROWDON, RJ WURTMAN, S CORKIN A RM NITSCH, ED. *MOLECULAR BASIS OF DEMENTIA*. S. 321–327. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. ISBN 1-57331-283-5.
- GLENNER, GG A CW WONG, 1984A. ALZHEIMERS-DISEASE - INITIAL REPORT OF THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL CEREBROVASCULAR AMYLOID PROTEIN. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* [ONLINE]. ROČ. 120, Č. 3, S. 885–890. ISSN 0006-291X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0006-291X(84)80190-4

- GLENNER, GG A CW WONG, 1984B. ALZHEIMERS-DISEASE AND DOWNS-SYNDROME - SHARING OF A UNIQUE CEREBROVASCULAR AMYLOID FIBRIL PROTEIN. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* [ONLINE]. ROČ. 122, Č. 3, S. 1131–1135. ISSN 0006-291X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0006-291X(84)91209-9
- GOATE, A, MC CHARTIERHARLIN, M MULLAN, J BROWN, F CRAWFORD, L FIDANI, L GIUFFRA, A HAYNES, N IRVING, L JAMES, R MANT, P NEWTON, K ROOKE, P ROQUES, C TALBOT, M PERICAKVANCE, A ROSES, R WILLIAMSON, M ROSSOR, M OWEN A J HARDY, 1991. SEGREGATION OF A MISSENSE MUTATION IN THE AMYLOID PRECURSOR PROTEIN GENE WITH FAMILIAL ALZHEIMERS-DISEASE. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 349, Č. 6311, S. 704–706. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/349704A0
- GOEDERT, M, MG SPILLANTINI, NJ CAIRNS A RA CROWTHER, 1992. TAU-PROTEINS OF ALZHEIMER PAIRED HELICAL FILAMENTS - ABNORMAL PHOSPHORYLATION OF ALL 6 BRAIN ISOFORMS. *NEURON* [ONLINE]. 1., ROČ. 8, Č. 1, S. 159–168. ISSN 0896-6273. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0896-6273(92)90117-V
- GOEDERT, MICHEL A MARIA GRAZIA SPILLANTINI, 2006. A CENTURY OF ALZHEIMER'S DISEASE. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 314, Č. 5800, S. 777–781. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.1132814
- GOLDGABER, D, MI LERMAN, OW MCBRIDE, U SAFFIOTTI A DC GAJDUSEK, 1987. CHARACTERIZATION AND CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF A CDNA-ENCODING BRAIN AMYLOID OF ALZHEIMERS-DISEASE. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 235, Č. 4791, S. 877–880. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.3810169
- GRAHAM, AJ, MA RAY, EK PERRY, E JAROS, RH PERRY, SG VOLSEN, S BOSE, N EVANS, J LINDSTROM A JA COURT, 2003. DIFFERENTIAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNIT EXPRESSION IN THE HUMAN HIPPOCAMPUS. *JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY* [ONLINE]. ROČ. 25, Č. 2, S. 97–113. ISSN 0891-0618. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0891-0618(02)00100-X
- HALL, LMC A P SPIERER, 1986. THE ACE LOCUS OF DROSOPHILA-MELANOGASTER - STRUCTURAL GENE FOR ACETYLCHOLINESTERASE WITH AN UNUSUAL 5' LEADER. *EMBO JOURNAL*. 11., ROČ. 5, Č. 11, S. 2949–2954. ISSN 0261-4189.
- HARDY, J A D ALLSOP, 1991. AMYLOID DEPOSITION AS THE CENTRAL EVENT IN THE ETIOLOGY OF ALZHEIMERS-DISEASE. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 12, Č. 10, S. 383–388. ISSN 0165-6147. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0165-6147(91)90609-V
- HAREL, M, JL SUSSMAN, E KREJCI, S BON, P CHANAL, J MASSOULIE A I SILMAN, 1992. CONVERSION OF ACETYLCHOLINESTERASE TO BUTYRYLCHOLINESTERASE - MODELING AND MUTAGENESIS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 89, Č. 22, S. 10827–10831. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.89.22.10827
- HAROLD, DENISE, RICHARD ABRAHAM, PAUL HOLLINGWORTH, REBECCA SIMS, AMY GERRISH, ET AL., 2009. GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIES VARIANTS AT CLU AND PICALM ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE. *NATURE GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 41, Č. 10, S. 1088–U61. ISSN 1061-4036. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NG.440
- HEAD, E, K MOFFAT, P DAS, E SARSOZA, WW POON, G LANDSBERG, CW COTMAN A MP MURPHY, 2005. BETA-AMYLOID DEPOSITION AND TAU PHOSPHORYLATION IN CLINICALLY CHARACTERIZED AGED CATS. *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. 5., ROČ. 26, Č. 5, S. 749–763. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.06.015
- HESTON, LL, AR MASTRI, VE ANDERSON A J WHITE, 1981. DEMENTIA OF THE ALZHEIMER TYPE - CLINICAL GENETICS, NATURAL-HISTORY, AND ASSOCIATED CONDITIONS. *ARCHIVES OF GENERAL PSYCHIATRY*. ROČ. 38, Č. 10, S. 1085–1090. ISSN 0003-990X.
- HESTRIN, S, 1949. THE REACTION OF ACETYLCHOLINE AND OTHER CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES WITH HYDROXYLAMINE, AND ITS ANALYTICAL APPLICATION. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. ROČ. 180, Č. 1, S. 249–261. ISSN 0021-9258.
- HOOLI, B. V., G. MOHAPATRA, M. MATTHEISEN, A. R. PARRADO, J. T. ROEHR, Y. SHEN, J. F. GUSELLA, R. MOIR, A. J. SAUNDERS, C. LANGE, R. E. TANZI A L. BERTRAM, 2012. ROLE OF COMMON AND RARE APP DNA SEQUENCE VARIANTS IN ALZHEIMER DISEASE. *NEUROLOGY* [ONLINE]. 4., ROČ. 78, Č. 16, S. 1250–1257. ISSN 0028-3878. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1212/WNL.0B013E3182515972
- HUBACEK, JA, J PITHA, Z SKODOVA, V ADAMKOVA, V LANSKA A R POLEDNE, 2001. A POSSIBLE ROLE OF APOLIPOPROTEIN E POLYMORPHISM IN PREDISPOSITION TO HIGHER EDUCATION. *NEUROPSYCHOBIOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 43, Č. 3, S. 200–203. ISSN 0302-282X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1159/000054890
- HULME, EC, NJM BIRDSALL A NJ BUCKLEY, 1990. MUSCARINIC RECEPTOR SUBTYPES. *ANNUAL REVIEW OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 30, S. 633–673. ISSN 0362-1642. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1146/ANNUREV.PA.30.040190.003221
- HUTTON, M, CL LENDON, P RIZZU, M BAKER, S FROELICH, ET AL., 1998. ASSOCIATION OF MISSENSE AND 5'-SPLICE-SITE MUTATIONS IN TAU WITH THE INHERITED DEMENTIA FTDP-17. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 393, Č. 6686, S. 702–705. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/31508
- CHUI, HC, EL TENG, VW HENDERSON A AC MOY, 1985. CLINICAL SUBTYPES OF DEMENTIA OF THE ALZHEIMER TYPE. *NEUROLOGY*. ROČ. 35, Č. 11, S. 1544–1550. ISSN 0028-3878.
- CHUN, WANJOO A GAIL V. W. JOHNSON, 2007. THE ROLE OF TAU PHOSPHORYLATION AND CLEAVAGE IN NEURONAL CELL DEATH. *FRONTIERS IN BIOSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 12, S. 733–756. ISSN 1093-9946. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.2741/2097
- IQBAL, K, ADC ALONSO, S CHEN, MO CHOCHAN, E EL-AKKAD, CX GONG, S KHATOON, B LI, F LIU, A RAHMAN, H TANIMUKAI A I GRUNDKE-IQBAL, 2005. TAU PATHOLOGY IN ALZHEIMER DISEASE AND OTHER TAUOPATHIES. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE* [ONLINE]. ROČ. 1739, Č. 2-3, S. 198–210. ISSN 0925-4439. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BBADIS.2004.09.008
- ITZHAKI, RUTH F. A MATTHEW A. WOZNIAK, 2008. HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN ALZHEIMER'S DISEASE: THE ENEMY WITHIN. *JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE*. 5., ROČ. 13, Č. 4, S. 393–405. ISSN 1387-2877.
- JANSSSEN, R. A J.J. JANSSSEN, 1996. *GETTING OLD IN ANCIENT EGYPT* [ONLINE]. B.M.: RUBICON PRESS. ISBN 9780948695476. DOSTUPNÉ Z: HTTP://BOOKS.GOOGLE.CZ/BOOKS?ID=PRXXXAAAMAAJ
- JELLINGER, K. A., 2006. ALZHEIMER 100 – HIGHLIGHTS IN THE HISTORY OF ALZHEIMER RESEARCH. *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION* [ONLINE]. ROČ. 113, Č. 11, S. 1603–1623 [VID. 8. SRPEN 2013]. ISSN 0300-9564, 1435-1463. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S00702-006-0578-3
- JELLINGER, K. A. A J. ATTEMS, 2007. NEUROPATHOLOGICAL EVALUATION OF MIXED DEMENTIA. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 257, Č. 1-2, S. 80–87. ISSN 0022-510X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.JNS.2007.01.045
- JIN, KL, AL PEEL, XO MAO, L XIE, BA COTTRELL, DC HENSHALL A DA GREENBERG, 2004. INCREASED HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 101, Č. 1, S. 343–347. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.2634794100

JONSSON, THORLAKUR, JASVINDER K. ATWAL, STACY STEINBERG, JON SNAEDAL, PALMI V. JONSSON, SIGURBJORN BJORNSSON, HREINN STEFANSSON, PATRICK SULEM, DANIEL GUDBJARTSSON, JANICE MALONEY, KWAME HOYTE, AMY GUSTAFSON, YICHIN LIU, YANMEI LU, TUSHAR BHANGALE, ROBERT R. GRAHAM, JOHANNA HUTTENLOCHER, GYDA BJORNSDOTTIR, OLE A. ANDREASSEN, ERIK G. JONSSON, AARNO PALOTIE, TIMOTHY W. BEHRENS, OLAFUR T. MAGNUSSON, AUGUSTINE KONG, UNNUR THORSTEINSDOTTIR, RYAN J. WATTS A KARI STEFANSSON. A MUTATION IN APP PROTECTS AGAINST ALZHEIMER'S DISEASE AND AGE-RELATED COGNITIVE DECLINE. *NATURE*. 2012-7-11, VOL. 488, ISSUE 7409, S. 96-99. DOI: 10.1038/NATURE11283. DOSTUPNÉ Z: [HTTP://WWW.NATURE.COM/DOIFINDER/10.1038/NATURE11283](http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/NATURE11283)

JOSEPHS, KEITH, JENNIFER WHITWELL, DAVID KNOPMAN, WILLIAM HU, ALEX STROH, MATTHEW BAKER, ROSA RADEMAKERS, BRADLEY BOEVE, JOSEPH PARISI, GLENN SMITH, ROBERT IVNIK, RONALD PETERSEN, CLIFFORD JACK A DENNIS DICKSON, 2008. ABNORMAL TDP-43 IMMUNOREACTIVITY IN AD MODIFIES CLINICOPATHOLOGIC AND RADIOLOGIC PHENOTYPE. *NEUROLOGY*. ROČ. 70, Č. 19, S. 1850–1857. ISSN 0028-3878.

JUN, GYUNGAH, ADAM C. NAJ, GARY W. BEECHAM, LI-SAN WANG, JACQUELINE BUROS, PAUL J. GALLINS, JOSEPH D. BUXBAUM, NILUFER ERTEKIN-TANER, DANIELE FALLIN, ROBERT FRIEDLAND, RIVKA INZELBERG, PATRICIA KRAMER, EKATERINA ROGAEVA, PETER ST. GEORGE-HYSLOP, LAURA B. CANTWELL, BETH A. DOMBROSKI, ANDREW J. SAYKIN, ERIC M. REIMAN, DAVID A. BENNETT, JOHN C. MORRIS, KATHRYN L. LUNETTA, EDEN R. MARTIN, THOMAS J. MONTINE, ALISON M. GOATE, DEBORAH BLACKER, DEBBY W. TSUANG, DUANE BEEKLY, L. ADRIENNE CUPPLES, HAKON HAKONARSON, WALTER KUKULL, TATIANA M. FOROUD, JONATHAN HAINES, RICHARD MAYEUX, LINDSAY A. FARRER, MARGARET A. PERICAK-VANCE, GERARD D. SCHELLENBERG A ALZHEIMERS DIS GENETICS CONSORTIUM, 2010. META-ANALYSIS CONFIRMS CR1, CLU, AND PICALM AS ALZHEIMER DISEASE RISK LOCI AND REVEALS INTERACTIONS WITH APOE GENOTYPES. *ARCHIVES OF NEUROLOGY* [ONLINE]. 12., ROČ. 67, Č. 12, S. 1473–1484. ISSN 0003-9942. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1001/ARCHNEURO1.2010.201

KAMBOH, MI, 2004. MOLECULAR GENETICS OF LATE-ONSET ALZHEIMER'S DISEASE. *ANNALS OF HUMAN GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 68, Č. 4, S. 381–404. ISSN 0003-4800. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1046/J.1529-8817.2004.00110.X

KAO, PN A A KARLIN, 1986. ACETYLCHOLINE-RECEPTOR BINDING-SITE CONTAINS A DISULFIDE CROSS-LINK BETWEEN ADJACENT HALF-CYSTINYL RESIDUES. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. ROČ. 261, Č. 18, S. 8085–8088. ISSN 0021-9258.

KARENBERG, AXEL A HANS FRÖSTL, 2006. DEMENTIA IN THE GRECO-ROMAN WORLD. *JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES*. Č. 244, S. 5–9. ISSN 0022-510X.

KAUFER, D, A FRIEDMAN, S SEIDMAN A H SOREQ, 1998. ACUTE STRESS FACILITATES LONG-LASTING CHANGES IN CHOLINERGIC GENE EXPRESSION. *NATURE*. ROČ. 393, Č. 6683, S. 373–377. ISSN 0028-0836.

KELLY, BL, R VASSAR A A FERREIRA, 2005. BETA-AMYLOID-INDUCED DYNAMIN 1 DEPLETION IN HIPPOCAMPAL NEURONS - A POTENTIAL MECHANISM FOR EARLY COGNITIVE DECLINE IN ALZHEIMER DISEASE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 280, Č. 36, S. 31746–31753. ISSN 0021-9258. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1074/JBC.M503259200

KIM, JUNGSU, JACOB M. BASAK A DAVID M. HOLTZMAN, 2009. THE ROLE OF APOLIPOPROTEIN E IN ALZHEIMER'S DISEASE. *NEURON* [ONLINE]. ROČ. 63, Č. 3, S. 287–303. ISSN 0896-6273. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NEURON.2009.06.026

KIMBERLY, WT, MJ LAVOIE, BL OSTASZEWSKI, WJ YE, MS WOLFE A DJ SELKOE, 2003. GAMMA-SECRETASE IS A MEMBRANE PROTEIN COMPLEX COMPRISED OF PRESENILIN, NICAISTRIN, APH-1, AND PEN-2. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 100, Č. 11, S. 6382–6387. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.1037392100

KOBAYASHI, Y A T ISA, 2002. SENSORY-MOTOR GATING AND COGNITIVE CONTROL BY THE BRAINSTEM CHOLINERGIC SYSTEM. *NEURAL NETWORKS* [ONLINE]. ROČ. 15, Č. 4-6, S. 731–741. ISSN 0893-6080. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0893-6080(02)00059-X

KORABECNY, JAN, KAMIL MUSILEK, ONDREJ HOLAS, JIRI BINDER, FILIP ZEMEK, JAN MAREK, MIROSLAV POHANKA, VERONIKA OPLETALOVA, VLASTIMIL DOHNAL A KAMIL KUČA, 2010. SYNTHESIS AND IN VITRO EVALUATION OF N-ALKYL-7-METHOXYTACRINE HYDROCHLORIDES AS POTENTIAL CHOLINESTERASE INHIBITORS IN ALZHEIMER DISEASE. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS* [ONLINE]. ROČ. 20, Č. 20, S. 6093–6095. ISSN 0960-894X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BMCL.2010.08.044

LAMBERT, JEAN-CHARLES, SIMON HEATH, GAEL EVEN, DOMINIQUE CAMPION, KRISTEL SLEEGERS, ET AL., 2009. GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY IDENTIFIES VARIANTS AT CLU AND CR1 ASSOCIATED WITH ALZHEIMER'S DISEASE. *NATURE GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 41, Č. 10, S. 1094–U68. ISSN 1061-4036. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NG.439

LAMBERT, MP, AK BARLOW, BA CHROMY, C EDWARDS, R FREED, M LIOSATOS, TE MORGAN, I ROZOVSKY, B TROMMER, KL VIOLA, P WALLS, C ZHANG, CE FINCH, GA KRAFFT A WL KLEIN, 1998. DIFFUSIBLE, NONFIBRILLAR LIGANDS DERIVED FROM A BETA(1-42) ARE POTENT CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEUROTOXINS. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 95, Č. 11, S. 6448–6453. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.95.11.6448

LANDES, AM, SD SPERRY, ME STRAUSS A DS GELDMACHER, 2001. APATHY IN ALZHEIMER'S DISEASE. *JOURNAL OF THE AMERICAN GERIATRICS SOCIETY* [ONLINE]. 12., ROČ. 49, Č. 12, S. 1700–1707. ISSN 0002-8614. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1046/J.1532-5415.2001.49282.X

LANDSBERG, G A JA ARAUJO, 2005. BEHAVIOR PROBLEMS IN GERIATRIC PETS. *VETERINARY CLINICS OF NORTH AMERICA-SMALL ANIMAL PRACTICE* [ONLINE]. 5., ROČ. 35, Č. 3, S. 675+. ISSN 0195-5616. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.EVSM.2004.1

LEVEY, AI, CA KITT, WF SIMONDS, DL PRICE A MR BRANN, 1991. IDENTIFICATION AND LOCALIZATION OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTOR PROTEINS IN BRAIN WITH SUBTYPE-SPECIFIC ANTIBODIES. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 11, Č. 10, S. 3218–3226. ISSN 0270-6474.

LEVY-LAHAD, E, EM WIJSMAN, E NEMENS, L ANDERSON, KAB GODDARD, JL WEBER, TD BIRD A GD SCHELLENBERG, 1995. A FAMILIAL ALZHEIMERS-DISEASE LOCUS ON CHROMOSOME-1. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 269, Č. 5226, S. 970–973. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.7638621

LI, BIN, HIDENAGA YAMAMORI, YOSHITAKA TATEBAYASHI, BRIDGET SHAFIT-ZAGARDO, HITOSHI TANIMUKAI, SHE CHEN, KHALID IQBAL A INGE GRUNDKE-IQBAL, 2008. FAILURE OF NEURONAL MATURATION IN ALZHEIMER DISEASE DENTATE GYRUS. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY* [ONLINE]. 1., ROČ. 67, Č. 1, S. 78–84. ISSN 0022-3069. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1097/NEN.0B013E318160C5DB

LI, FEI A JOE Z. TSIEN, 2009. MEMORY AND THE NMDA RECEPTORS. *NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE* [ONLINE]. ROČ. 361, Č. 3, S. 302–303. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1056/NEJMCI0902052

LI, Y, S CAMP, TL RACHINSKY, D GETMAN A P TAYLOR, 1991. GENE STRUCTURE OF MAMMALIAN ACETYLCHOLINESTERASE - ALTERNATIVE EXONS DICTATE TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. ROČ. 266, Č. 34, S. 23083–23090. ISSN 0021-9258.

- LI, Y, S CAMP A P TAYLOR, 1993. TISSUE-SPECIFIC EXPRESSION AND ALTERNATIVE MESSENGER-RNA PROCESSING OF THE MAMMALIAN ACETYLCHOLINESTERASE GENE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. ROČ. 268, Č. 8, S. 5790–5797. ISSN 0021-9258.
- LINDSTROM, J, 1997. NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN HEALTH AND DISEASE. *MOLECULAR NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 15, Č. 2, S. 193–222. ISSN 0893-7648. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/BF02740634
- LINEWEAVER, HANS A DEAN BURK, 1934. THE DETERMINATION OF ENZYME DISSOCIATION CONSTANTS. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*. ROČ. 56, Č. 3, S. 658–666. ISSN 0002-7863.
- LIU, JK A T KATO, 1994. EFFECT OF PHYSOSTIGMINE ON RELATIVE ACETYLCHOLINE OUTPUT INDUCED BY SYSTEMIC TREATMENT WITH SCOPOLAMINE IN IN-VIVO MICRODIALYSIS OF RAT FRONTAL-CORTEX. *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL* [ONLINE]. ROČ. 24, Č. 6, S. 589–596. ISSN 0197-0186. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0197-0186(94)90012-4
- LOCKRIDGE, O A P MASSON, 2000. PESTICIDES AND SUSCEPTIBLE POPULATIONS: PEOPLE WITH BUTYRYLCHOLINESTERASE GENETIC VARIANTS MAY BE AT RISK. *NEUROTOXICOLOGY*. ROČ. 21, Č. 1-2, S. 113–126. ISSN 0161-813X.
- LUCAS-MEUNIER, E, P FOSSIER, G BAUX A M AMAR, 2003. CHOLINERGIC MODULATION OF THE CORTICAL NEURONAL NETWORK. *PFLUGERS ARCHIV-EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY* [ONLINE]. 4., ROČ. 446, Č. 1, S. 17–29. ISSN 0031-6768. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S00424-002-0999-2
- LUE, LF, YM KUO, AE ROHER, L BRACHOVA, Y SHEN, L SUE, T BEACH, JH KURTH, RE RYDEL A J ROGERS, 1999. SOLUBLE AMYLOID BETA PEPTIDE CONCENTRATION AS A PREDICTOR OF SYNAPTIC CHANGE IN ALZHEIMER'S DISEASE. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY* [ONLINE]. 9., ROČ. 155, Č. 3, S. 853–862. ISSN 0002-9440. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0002-9440(10)65184-X
- LUETJE, CW, K WADA, S ROGERS, SN ABRAMSON, K TSUJI, S HEINEMANN A J PATRICK, 1990. NEUROTOXINS DISTINGUISH BETWEEN DIFFERENT NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTOR SUBUNIT COMBINATIONS. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* [ONLINE]. 8., ROČ. 55, Č. 2, S. 632–640. ISSN 0022-3042. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1471-4159.1990.TB04180.X
- MACE, S, E COUSIN, S RICARD, E GENIN, E SPANAKIS, C LAFARGUE-SOUBIGOU, B GENIN, R FOURNEL, S ROCHE, G HAUSSY, F MASSEY, S SOUBIGOU, G BREFORT, P BENOIT, A BRICE, D CAMPION, M HOLLIS, L PRADIER, K BENAVIDES A JF DELEUZE, 2005. ABCA2 IS A STRONG GENETIC RISK FACTOR FOR EARLY-ONSET ALZHEIMER'S DISEASE. *NEUROBIOLOGY OF DISEASE* [ONLINE]. ROČ. 18, Č. 1, S. 119–125. ISSN 0969-9961. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NBD.2004.09.011
- MADISON, DV, B LANCASTER A RA NICOLL, 1987. VOLTAGE CLAMP ANALYSIS OF CHOLINERGIC ACTION IN THE HIPPOCAMPUS. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. 3., ROČ. 7, Č. 3, S. 733–741. ISSN 0270-6474.
- MAHLEY, RW, 1988. APOLIPOPROTEIN-E - CHOLESTEROL TRANSPORT PROTEIN WITH EXPANDING ROLE IN CELL BIOLOGY. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 240, Č. 4852, S. 622–630. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.3283935
- MAHLEY, RW A SC RALL, 2000. APOLIPOPROTEIN E: FAR MORE THAN A LIPID TRANSPORT PROTEIN. *ANNUAL REVIEW OF GENOMICS AND HUMAN GENETICS* [ONLINE]. ROČ. 1, S. 507–537. ISSN 1527-8204. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1146/ANNUREV.GENOM.1.1.507
- MALLENDER, WD, T SZEGLETES A TL ROSENBERY, 2000. ACETYLTIOCHOLINE BINDS TO ASP74 AT THE PERIPHERAL SITE OF HUMAN ACETYLCHOLINESTERASE AS THE FIRST STEP IN THE CATALYTIC PATHWAY. *BIOCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 39, Č. 26, S. 7753–7763. ISSN 0006-2960. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1021/BI0002100
- MANGIALASCHE, FRANCESCA, ALINA SOLOMON, BENGT WINBLAD, PATRIZIA MECOCCHI A MIIA KIVIPELTO, 2010. ALZHEIMER'S DISEASE: CLINICAL TRIALS AND DRUG DEVELOPMENT. *LANCET NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 9, Č. 7, S. 702–716. ISSN 1474-4422. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S1474-4422(10)70119-8
- MANOLIO, TERI A., 2010. GENOMEWIDE ASSOCIATION STUDIES AND ASSESSMENT OF THE RISK OF DISEASE. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*. ROČ. 363, S. 166–76. ISSN 00284793.
- MASSOULIÉ, J, 2002. THE ORIGIN OF THE MOLECULAR DIVERSITY AND FUNCTIONAL ANCHORING OF CHOLINESTERASES. *NEURO SIGNALS* [ONLINE]. ROČ. 11, Č. 3, S. 130–143. ISSN 1424-862X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1159/000065054
- MASSOULIÉ, J, A ANSELMET, S BON, E KREJCI, C LEGAY, N MOREL A S SIMON, 1998. ACETYLCHOLINESTERASE: C-TERMINAL DOMAINS, MOLECULAR FORMS AND FUNCTIONAL LOCALIZATION. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-PARIS* [ONLINE]. ROČ. 92, Č. 3-4, S. 183–190. ISSN 0928-4257. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0928-4257(98)80007-7
- MASSOULIÉ, J A S BON, 1982. THE MOLECULAR-FORMS OF CHOLINESTERASE AND ACETYLCHOLINESTERASE IN VERTEBRATES. *ANNUAL REVIEW OF NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 5, S. 57–106. ISSN 0147-006X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1146/ANNUREV.NE.05.030182.000421
- MASSOULIÉ, J, L PEZZEMENTI, S BON, E KREJCI A FM VALLETTE, 1993. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF CHOLINESTERASES. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 41, Č. 1, S. 31–91. ISSN 0301-0082. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0301-0082(93)90040-Y
- MAYEUX, R, Y STERN A S SPANTON, 1985. HETEROGENEITY IN DEMENTIA OF THE ALZHEIMER TYPE - EVIDENCE OF SUBGROUPS. *NEUROLOGY*. ROČ. 35, Č. 4, S. 453–461. ISSN 0028-3878.
- MCALONAN, GM, GR DAWSON, LO WILKINSON, TW ROBBINS A BJ EVERITT, 1995. THE EFFECTS OF AMPA-INDUCED LESIONS OF THE MEDIAL SEPTUM AND VERTICAL LIMB NUCLEUS OF THE DIAGONAL BAND OF BROCA ON SPATIAL DELAYED-NONMATCHING-TO-SAMPLE AND SPATIAL-LEARNING IN THE WATER MAZE. *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 7, Č. 5, S. 1034–1049. ISSN 0953-816X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1460-9568.1995.TB01091.X
- MCCORMICK, DA A DA PRINCE, 1986. MECHANISMS OF ACTION OF ACETYLCHOLINE IN THE GUINEA-PIG CEREBRAL-CORTEX INVITRO. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON*. ROČ. 375, S. 169–194. ISSN 0022-3751.
- MCGEHEE, DS, 2002. NICOTINIC RECEPTORS AND HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY... IT'S ALL IN THE TIMING. *TRENDS IN NEUROSCIENCES* [ONLINE]. 4., ROČ. 25, Č. 4, S. 171–172. ISSN 0166-2236. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0166-2236(00)02127-5
- MCKEITH, IG, DW DICKSON, J LOWE, M EMRE, JT O'BRIEN, H FELDMAN, J CUMMINGS, JE DUDA, C LIPPA, EK PERRY, D AARSLAND, H ARAI, CG BALLARD, B BOEVE, DJ BURN, D COSTA, T DEL SER, B DUBOIS, D GALASKO, S GAUTHIER, CG GOETZ, E GOMEZ-TORTOSA, G HALLIDAY, LA HANSEN, J HARDY, T IWATSUBO, RN KALARIA, D KAUFER, RA KENNY, A KORCZYN, K KOSAKA, VMY LEE, A LEES, I LITVAN, E LONDOS, OL LOPEZ, S MINOSHIMA, Y MIZUNO, JA MOLINA, EB MUKAETOVA-LADINSKA, F PASQUIER, RH PERRY, JB SCHULZ, JQ TROJANOWSKI, M YAMADA A CONSORTIUM DLB, 2005. DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF DEMENTIA WITH LEWY BODIES - THIRD REPORT OF THE DLB CONSORTIUM. *NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 65, Č. 12, S. 1863–1872. ISSN 0028-3878. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1212/01.WNL.0000187889.17253.B1

MESULAM, MARSEL, ALISSA WICKLUND, NANCY JOHNSON, EMILY ROGALSKI, GABRIEL C. LEGER, ALFRED RADEMAKER, SANDRA WEINTRAUB A EILEEN H. BIGIO, 2008. ALZHEIMER AND FRONTOTEMPORAL PATHOLOGY IN SUBSETS OF PRIMARY PROGRESSIVE APHASIA. *ANNALS OF NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 63, Č. 6, S. 709–719. ISSN 0364-5134. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/ANA.21388

MESULAM, MM, EJ MUFSON, BH WAINER A AI LEVEY, 1983. CENTRAL CHOLINERGIC PATHWAYS IN THE RAT - AN OVERVIEW BASED ON AN ALTERNATIVE NOMENCLATURE (CH1-CH6). *NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 10, Č. 4, S. 1185–1201. ISSN 0306-4522. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0306-4522(83)90108-2

MICHAELIS, L. A MAUD L. MENTEN, 1913. DIE KINETIK DER INVERTINWIRKUNG. *BIOCHEMISCHE ZEITSCHRIFT*. ROČ. 49, S. 333–369. ISSN 0366-0753.

MICHEL, HO, 1949. AN ELECTROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF RED BLOOD CELL AND PLASMA CHOLINESTERASE ACTIVITY. *JOURNAL OF LABORATORY AND CLINICAL MEDICINE*. ROČ. 34, Č. 11, S. 1564–1568. ISSN 0022-2143.

MOREL, N, S BON, HM GREENBLATT, D VAN BELLE, SJ WODAK, JL SUSSMAN, J MASSOULIE A I SILMAN, 1999. EFFECT OF MUTATIONS WITHIN THE PERIPHERAL ANIONIC SITE ON THE STABILITY OF ACETYLCHOLINESTERASE. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. ROČ. 55, Č. 6, S. 982–992. ISSN 0026-895X.

MORIEARTY, PL A RE BECKER, 1992. INHIBITION OF HUMAN BRAIN AND RBC ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE) BY HEPTYLPHYSOSTIGMINE (HPTL). *METHODS AND FINDINGS IN EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHARMACOLOGY*. ROČ. 14, Č. 8, S. 615–621. ISSN 0379-0355.

MRZLJAK, L, AI LEVEY, S BELCHER A PS GOLDMAN-RAKIC, 1998. LOCALIZATION OF THE M2 MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR PROTEIN AND MRNA IN CORTICAL NEURONS OF THE NORMAL AND CHOLINERGICALLY DEAFFERENTED RHESUS MONKEY. *JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 390, Č. 1, S. 112–132. ISSN 0021-9967. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/(SICI)1096-9861(19980105)390:1<112::AID-CNE10>3.3.CO;2-Y

MUDHER, A A S LOVESTONE, 2002. ALZHEIMER'S DISEASE - DO TAUISTS AND BAPTISTS FINALLY SHAKE HANDS? *TRENDS IN NEUROSCIENCES* [ONLINE]. 1., ROČ. 25, Č. 1, S. 22–26. ISSN 0166-2236. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0166-2236(00)02031-2

MUIR, JL, TJ BUSSEY, BJ EVERITT A TW ROBBINS, 1996. DISSOCIABLE EFFECTS OF AMPA-INDUCED LESIONS OF THE VERTICAL LIMB DIAGONAL BAND OF BROCA ON PERFORMANCE OF THE 5-CHOICE SERIAL REACTION TIME TASK AND ON ACQUISITION OF A CONDITIONAL VISUAL DISCRIMINATION. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. 12., ROČ. 82, Č. 1, S. 31–44. ISSN 0166-4328. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0166-4328(97)81106-0

MULLE, C, D CHOQUET, H KORN A JP CHANGEUX, 1992. CALCIUM INFLUX THROUGH NICOTINIC RECEPTOR IN RAT CENTRAL NEURONS - ITS RELEVANCE TO CELLULAR-REGULATION. *NEURON* [ONLINE]. 1., ROČ. 8, Č. 1, S. 135–143. ISSN 0896-6273. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0896-6273(92)90115-T

MUNSHI, ANJANA A Y. R. AHUJA, 2010. GENES ASSOCIATED WITH ALZHEIMER DISEASE. *NEUROLOGY ASIA*. 8., ROČ. 15, Č. 2, S. 109–118. ISSN 1823-6138.

NATHANSON, NM, 2000. A MULTIPLICITY OF MUSCARINIC MECHANISMS: ENOUGH SIGNALING PATHWAYS TO TAKE YOUR BREATH AWAY. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 97, Č. 12, S. 6245–6247. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.97.12.6245

NEE, LE, RJ POLINSKY, R ELDRIDGE, H WEINGARTNER, S SMALLBERG A M EBERT, 1983. A FAMILY WITH HISTOLOGICALLY CONFIRMED ALZHEIMER'S-DISEASE. *ARCHIVES OF NEUROLOGY*. ROČ. 40, Č. 4, S. 203–208. ISSN 0003-9942.

NENNER, M, 1970. SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY OF WHOLE BLOOD, PLASMA AND ERYTHROCYTES WITH AUTOMATIC TITRATOR. *ZEITSCHRIFT FUR KLINISCHE CHEMIE UND KLINISCHE BIOCHEMIE*. ROČ. 8, Č. 5, S. 537–40. ISSN 0044-2933.

NEVILLE, LF, A GNATT, Y LOEWENSTEIN A H SOREQ, 1990. ASPARTATE-70 TO GLYCINE SUBSTITUTION CONFERS RESISTANCE TO NATURALLY-OCCURRING AND SYNTHETIC ANIONIC-SITE LIGANDS ON IN-OVO PRODUCED HUMAN BUTYRYLCHOLINESTERASE. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH* [ONLINE]. 12., ROČ. 27, Č. 4, S. 452–460. ISSN 0360-4012. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/JNR.490270404

NOCHI, S, N ASAKAWA A T SATO, 1995. KINETIC-STUDY ON THE INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE BY 1-BENZYL-4-[(5,6-DIMETHOXY-L-INDANON)-2-YL]METHYLPIPERIDINE HYDROCHLORIDE (E2020). *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*. 8., ROČ. 18, Č. 8, S. 1145–1147. ISSN 0918-6158.

NYAKAS, CSABA, IVICA GRANIC, LASZLO G. HALMY, PRADEEP BANERJEE A PAUL G. M. LUITEN, 2011. THE BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC SYSTEM IN AGING AND DEMENTIA. RESCUING CHOLINERGIC NEURONS FROM NEUROTOXIC AMYLOID-BETA 42 WITH MEMANTINE. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 221, Č. 2, SI, S. 594–603. ISSN 0166-4328. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BBR.2010.05.033

ODA, Y, 1999. CHOLINE ACETYLTRANSFERASE: THE STRUCTURE, DISTRIBUTION AND PATHOLOGIC CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *PATHOLOGY INTERNATIONAL* [ONLINE]. 11., ROČ. 49, Č. 11, S. 921–937. ISSN 1320-5463. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1046/J.1440-1827.1999.00977.X

OLLIS, DL, E CHEAH, M CYGLER, B DIJKSTRA, F FROLOW, SM FRANKEN, M HAREL, SJ REMINGTON, I SILMAN, J SCHRAG, JL SUSSMAN, KHG VERSCHUEREN A A GOLDMAN, 1992. THE ALPHA/BETA-HYDROLASE FOLD. *PROTEIN ENGINEERING* [ONLINE]. 4., ROČ. 5, Č. 3, S. 197–211. ISSN 0269-2139. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1093/PROTEIN/5.3.197

PANG, K, MJ WILLIAMS, H EGETH A DS OLTON, 1993. NUCLEUS BASALIS MAGNOCELLULARIS AND ATTENTION - EFFECTS OF MUSCIMOL INFUSIONS. *BEHAVIORAL NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 12., ROČ. 107, Č. 6, S. 1031–1038. ISSN 0735-7044. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1037//0735-7044.107.6.1031

PATERSON, D A A NORDBERG, 2000. NEURONAL NICOTINIC RECEPTORS IN THE HUMAN BRAIN. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. 5., ROČ. 61, Č. 1, S. 75–111. ISSN 0301-0082. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0301-0082(99)00045-3

PENNISI, ELIZABETH, 2013. MORE GENOMES FROM DENISOVA CAVE SHOW MIXING OF EARLY HUMAN GROUPS. *SCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 340, Č. 6134, S. 799 [VID. 26. ČERVENEC 2013]. ISSN 0036-8075. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1126/SCIENCE.340.6134.799

PEREIRA, EFR, S REINHARDTMAELICKE, A SCHRATTENHOLZ, A MAELICKE A EX ALBUQUERQUE, 1993. IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL-CHARACTERIZATION OF A NEW AGONIST SITE ON NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS OF CULTURED HIPPOCAMPAL-NEURONS. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS*. ROČ. 265, Č. 3, S. 1474–1491. ISSN 0022-3565.

- PERICAK-VANCE, MA A JL HAINES, 1995. GENETIC SUSCEPTIBILITY TO ALZHEIMER-DISEASE. *TRENDS IN GENETICS* [ONLINE]. 12., ROČ. 11, Č. 12, S. 504–508. ISSN 0168-9525. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0168-9525(00)89161-1
- PLANEL, E, K YASUTAKE, SC FUJITA A K ISHIGURO, 2001. INHIBITION OF PROTEIN PHOSPHATASE 2A OVERRIDES TAU PROTEIN KINASE 1/GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 BETA AND CYCLIN-DEPENDENT KINASE 5 INHIBITION AND RESULTS IN TAU HYPERPHOSPHORYLATION IN THE HIPPOCAMPUS OF STARVED MOUSE. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 276, Č. 36, S. 34298–34306. ISSN 0021-9258. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1074/JBC.M102780200
- PLANEL, EMMANUEL, YOSHITAKA TATEBAYASHI, TOMOHIRO MIYASAKA, LI LIU, LILI WANG, MATHIEU HERMAN, W. HAUNG YU, JOSE A. LUCHSINGER, BRIAN WADZINSKI, KAREN E. DUFF A AKIHIKO TAKASHIMA, 2007. INSULIN DYSFUNCTION INDUCES IN VIVO TAU HYPERPHOSPHORYLATION THROUGH DISTINCT MECHANISMS. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 27, Č. 50, S. 13635–13648. ISSN 0270-6474. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1523/JNEUROSCI.3949-07.2007
- POHANKA, MIROSLAV, DANIEL JUN A KAMIL KUČA, 2008. IMPROVEMENT OF ACETYLCHOLINESTERASE-BASED ASSAY FOR ORGANOPHOSPHATES IN WAY OF IDENTIFICATION BY REACTIVATORS. *TALANTA* [ONLINE]. ROČ. 77, Č. 1, S. 451–454. ISSN 0039-9140. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.TALANTA.2008.06.007
- POTTER, ALEXANDRA S., PAUL A. NEWHOUSE A DAVID J. BUCCI, 2006. CENTRAL NICOTINIC CHOLINERGIC SYSTEMS: A ROLE IN THE COGNITIVE DYSFUNCTION IN ATTENTION-DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER? *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 175, Č. 2, S. 201–211. ISSN 0166-4328. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BBR.2006.09.015
- PRATICO, C, D QUATTRONE, T LUCANTO, A AMATO, O PENNA, C ROSCITANO A V FODALE, 2005. DRUGS OF ANESTHESIA ACTING ON CENTRAL CHOLINERGIC SYSTEM MAY CAUSE POST-OPERATIVE COGNITIVE DYSFUNCTION AND DELIRIUM. *MEDICAL HYPOTHESES* [ONLINE]. ROČ. 65, Č. 5, S. 972–982. ISSN 0306-9877. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.MEHY.2005.05.037
- PROBST, A, V BASLER, B BRON A J ULRICH, 1983. NEURITIC PLAQUES IN SENILE DEMENTIA OF ALZHEIMER TYPE - A GOLGI ANALYSIS IN THE HIPPOCAMPAL REGION. *BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 268, Č. 2, S. 249–254. ISSN 0006-8993. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0006-8993(83)90490-0
- REED, KE, 1997. EARLY HOMINID EVOLUTION AND ECOLOGICAL CHANGE THROUGH THE AFRICAN PLIO-PLEISTOCENE. *JOURNAL OF HUMAN EVOLUTION* [ONLINE]. ROČ. 32, Č. 2-3, S. 289–322. ISSN 0047-2484. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1006/JHEV.1996.0106
- REEVER, CM, G FERRARIDILEO A DD FLYNN, 1997. THE M5 (M5) RECEPTOR SUBTYPE: FACT OR FICTION? *LIFE SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 60, Č. 13-14, S. 1105–1112. ISSN 0024-3205. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0024-3205(97)00054-4
- RESER, JARED EDWARD, 2009. ALZHEIMER'S DISEASE AND NATURAL COGNITIVE AGING MAY REPRESENT ADAPTIVE METABOLISM REDUCTION PROGRAMS. *BEHAVIORAL AND BRAIN FUNCTIONS* [ONLINE]. ROČ. 5. ISSN 1744-9081. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1186/1744-9081-5-13
- RIDLEY, RM, JA BAKER, HF BAKER A CJ MACLEAN, 1994. RESTORATION OF COGNITIVE-ABILITIES BY CHOLINERGIC GRAFTS IN CORTEX OF MONKEYS WITH LESIONS OF THE BASAL NUCLEUS OF MEYNERT. *NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 12., ROČ. 63, Č. 3, S. 653–666. ISSN 0306-4522. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0306-4522(94)90512-6
- RINGMAN, JM A JL CUMMINGS, 1999. METRIFONATE: UPDATE ON A NEW ANTIDEMENTIA AGENT. *JOURNAL OF CLINICAL PSYCHIATRY*. 11., ROČ. 60, Č. 11, S. 776–782. ISSN 0160-6689.
- RIPOLL, DR, CH FAERMAN, PH AXELSEN, I SILMAN A JL SUSSMAN, 1993. AN ELECTROSTATIC MECHANISM FOR SUBSTRATE GUIDANCE DOWN THE AROMATIC GORGE OF ACETYLCHOLINESTERASE. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* [ONLINE]. ROČ. 90, Č. 11, S. 5128–5132. ISSN 0027-8424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1073/PNAS.90.11.5128
- ROERIG, B, DA NELSON A LC KATZ, 1997. FAST SYNAPTIC SIGNALING BY NICOTINIC ACETYLCHOLINE AND SEROTONIN 5-HT3 RECEPTORS IN DEVELOPING VISUAL CORTEX. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 17, Č. 21, S. 8353–8362. ISSN 0270-6474.
- ROGAEV, EI, R SHERRINGTON, EA ROGAEVA, G LEVESQUE, M IKEDA, Y LIANG, H CHI, C LIN, K HOLMAN, T TSUDA, L MAR, S SORBI, B NACMIAS, S PIACENTINI, L AMADUCCI, I CHUMAKOV, D COHEN, L LANNFELT, PE FRASER, JM ROMMENS A PH STGEORGEHYSLOP, 1995. FAMILIAL ALZHEIMERS-DISEASE IN KINDREDS WITH MISSENSE MUTATIONS IN A GENE ON CHROMOSOME-1 RELATED TO THE ALZHEIMERS-DISEASE TYPE-3 GENE. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 376, Č. 6543, S. 775–778. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/376775A0
- ROGERS, SL, LT FRIEDHOFF, JT APTER, RW RICHTER, JT HARTFORD, TM WALSHE, B BAUMEL, RD LINDEN, FC KINNEY, RS DOODY, RL BORISON A GL AHM, 1996. THE EFFICACY AND SAFETY OF DONEPEZIL IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE: RESULTS OF A US MULTICENTRE, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED TRIAL. *DEMENCIA* [ONLINE]. ROČ. 7, Č. 6, S. 293–303. ISSN 1013-7424. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1159/000106895
- ROSES, AD, 1996. APOLIPOPROTEIN E AND ALZHEIMER'S DISEASE - A RAPIDLY EXPANDING FIELD WITH MEDICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CONSEQUENCES. IN: NR RELKIN, Z KHACHATURIAN A S GANDY, ED. *APOLIPOPROTEIN E GENOTYPING IN ALZHEIMER'S DISEASE* [ONLINE]. S. 50–57. ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES. ISBN 1-57331-048-4. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1749-6632.1996.TB32598.X
- ROSSOR, MN, NC FOX, J BECK, TC CAMPBELL A J COLLINGE, 1996. INCOMPLETE PENETRANCE OF FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE IN A PEDIGREE WITH A NOVEL PRESENILIN-1 GENE MUTATION. *LANCET* [ONLINE]. ROČ. 347, Č. 9014, S. 1560. ISSN 0140-6736. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0140-6736(96)90715-1
- ŘÍČNÝ, JAN, 2013. OVERLOOKED ALZHEIMER'S SMOKING GUN? *NEUROCHEMICAL RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 38, Č. 9, S. 1774–1776. ISSN 1573-6903. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S11064-013-1086-0
- SAHAKIAN, BJ A JT COULL, 1994. NICOTINE AND TETRAHYDROAMINOACRIDINE - EVIDENCE FOR IMPROVED ATTENTION IN PATIENTS WITH DEMENTIA OF THE ALZHEIMER-TYPE. *DRUG DEVELOPMENT RESEARCH* [ONLINE]. 1., ROČ. 31, Č. 1, S. 80–88. ISSN 0272-4391. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/DDR.430310112
- SAITO, TAKASHI, TAKAHIRO SUEMOTO, NATHALIE BROUWERS, KRISTEL SLEEGERS, SATORU FUNAMOTO, NAOMI MIHARA, YUKIO MATSUBA, KAZUYUKI YAMADA, PER NILSSON, JIRO TAKANO, MASAKI NISHIMURA, NOBUHISA IWATA, CHRISTINE VAN BROECKHOVEN, YASUO IHARA A TAKAOMI C. SAIDO, 2011. POTENT AMYLOIDOGENICITY AND PATHOGENICITY OF A BETA 43. *NATURE NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 8., ROČ. 14, Č. 8, S. 1023–1032. ISSN 1097-6256. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NN.2858
- SANDHOLZER, C, R DELPORT, H VERMAAK A G UTERMANN, 1995. HIGH-FREQUENCY OF THE APO EPSILON-4 ALLELE IN KHOI-SAN FROM SOUTH-AFRICA. *HUMAN GENETICS*. 1., ROČ. 95, Č. 1, S. 46–48. ISSN 0340-6717.
- SARGENT, PB, 1993. THE DIVERSITY OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS. *ANNUAL REVIEW OF NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 16, S. 403–443. ISSN 0147-006X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1146/ANNUREV.NE.16.030193.002155

- SEGUELA, P, J WADICHE, K DINELEYMILLER, JA DANI A JW PATRICK, 1993. MOLECULAR-CLONING, FUNCTIONAL-PROPERTIES, AND DISTRIBUTION OF RAT BRAIN-ALPHA-7 - A NICOTINIC CATION CHANNEL HIGHLY PERMEABLE TO CALCIUM. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 13, Č. 2, S. 596–604. ISSN 0270-6474.
- SELDEN, NRW, BJ EVERITT, LE JARRARD A TW ROBBINS, 1991. COMPLEMENTARY ROLES FOR THE AMYGDALA AND HIPPOCAMPUS IN AVERSIVE-CONDITIONING TO EXPLICIT AND CONTEXTUAL CUES. *NEUROSCIENCE* [ONLINE]. ROČ. 42, Č. 2, S. 335–350. ISSN 0306-4522. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0306-4522(91)90379-3
- SEMBA, K, 1993. AMINERGIC AND CHOLINERGIC AFFERENTS TO REM-SLEEP INDUCTION REGIONS OF THE PONTINE RETICULAR-FORMATION IN THE RAT. *JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 330, Č. 4, S. 543–556. ISSN 0021-9967. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/CNE.903300410
- SEMINO, O, AS SANTACHIARA-BENERECETTI, F FALASCHI, LLC SFORZA A PA UNDERHILL, 2002. ETHIOPIANS AND KHOISAN SHARE THE DEEPEST CLADES OF THE HUMAN Y-CHROMOSOME PHYLOGENY. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS* [ONLINE]. 1., ROČ. 70, Č. 1, S. 265–268. ISSN 0002-9297. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1086/338306
- SHAFFERMAN, A, A ORDENTLICH, D BARAK, C KRONMAN, R BER, T BINO, N ARIEL, R OSMAN A B VELAN, 1994. ELECTROSTATIC ATTRACTION BY SURFACE-CHARGE DOES NOT CONTRIBUTE TO THE CATALYTIC EFFICIENCY OF ACETYLCHOLINESTERASE. *EMBO JOURNAL*. ROČ. 13, Č. 15, S. 3448–3455. ISSN 0261-4189.
- SHAW, PHILIP, JASON P. LERCH, JENS C. PRUESSNER, KRISTIN N. TAYLOR, A. BLYTHE ROSE, DEANNA GREENSTEIN, LIV CLASEN, ALAN EVANS, JUDITH L. RAPOPORT A JAY N. GIEDD, 2007. CORTICAL MORPHOLOGY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DIFFERENT APOLIPOPROTEIN E GENE POLYMORPHISMS: AN OBSERVATIONAL STUDY. *LANCET NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 6, Č. 6, S. 494–500. ISSN 1474-4422. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S1471-4422(07)70106-0
- SCHILLING, STEPHAN, ULRIKE ZEITSCHEL, TORSTEN HOFFMANN, ULRICH HEISER, MIKE FRANCKE, ASTRID KEHLEN, MAX HOLZER, BIRGIT HUTTER-PAIER, MANUELA PROKESCH, MANFRED WINDISCH, WOLFGANG JAGLA, DAGMAR SCHLENZIG, CHRISTIANE LINDNER, THOMAS RUDOLPH, GUNTER REUTER, HOLGER CYNIS, DIRK MONTAG, HANS-ULRICH DEMUTH A STEFFEN ROSSNER, 2008. GLUTAMINYL CYCLASE INHIBITION ATTENUATES PYROGLUTAMATE A BETA AND ALZHEIMER'S DISEASE-LIKE PATHOLOGY. *NATURE MEDICINE* [ONLINE]. ROČ. 14, Č. 10, S. 1106–1111. ISSN 1078-8956. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/NM.1872
- SCHLIEBS, REINHARD A THOMAS ARENDT, 2011. THE CHOLINERGIC SYSTEM IN AGING AND NEURONAL DEGENERATION. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 221, Č. 2, SI, S. 555–563. ISSN 0166-4328. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BBR.2010.11.058
- SCHNEIDER, LS, 1993. CLINICAL-PHARMACOLOGY OF AMINOACRIDINES IN ALZHEIMERS-DISEASE. *NEUROLOGY*. 8., ROČ. 43, Č. 8, 4, S. S64–S79. ISSN 0028-3878.
- SCHULTZ, C, GB HUBBARD, U RUB, E BRAAK A H BRAAK, 2000. AGE-RELATED PROGRESSION OF TAU PATHOLOGY IN BRAINS OF BABOONS. *NEUROBIOLOGY OF AGING* [ONLINE]. ROČ. 21, Č. 6, S. 905–912. ISSN 0197-4580. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0197-4580(00)00176-7
- SIMON, JR, S ATWEH A MJ KUJAR, 1976. SODIUM-DEPENDENT HIGH AFFINITY CHOLINE UPTAKE - REGULATORY STEP IN SYNTHESIS OF ACETYLCHOLINE. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 26, Č. 5, S. 909–922. ISSN 0022-3042. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1471-4159.1976.TB06472.X
- SJÖGREN, TORSTEN, HAKON SJÖGREN A A. G. H. LINDGREN, 1953. MORBUS ALZHEIMER AND MORBUS PICK: A GENETIC, CLINICAL AND PATHO-ANATOMICAL STUDY. *A.M.A. ARCHIVES OF INTERNAL MEDICINE* [ONLINE]. ROČ. 91, Č. 6, S. 818–819. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1001/ARCHINTNE.1953.00240180127021
- SNAPE, MF, SMP ANDERSON, A MISRA, PJ PACCAGNINI, TK MURRAY, AJ CROSS A AR GREEN, 1996. A COMPARISON OF THE CHOLINESTERASE INHIBITORS TACRINE AND E-2020. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*. 4., ROČ. 117, Č. S, S. P163. ISSN 0007-1188.
- STERIADE, M, RC DOSSI A A NUNEZ, 1991. NETWORK MODULATION OF A SLOW INTRINSIC OSCILLATION OF CAT THALAMOCORTICAL NEURONS IMPLICATED IN SLEEP DELTA-WAVES - CORTICALLY INDUCED SYNCHRONIZATION AND BRAIN-STEM CHOLINERGIC SUPPRESSION. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 11, Č. 10, S. 3200–3217. ISSN 0270-6474.
- STOEGER, REINHARD, 2008. THE THRIFTY EPIGENOTYPE: AN ACQUIRED AND HERITABLE PREDISPOSITION FOR OBESITY AND DIABETES? *BIOESSAYS* [ONLINE]. ROČ. 30, Č. 2, S. 156–166. ISSN 0265-9247. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/BIES.20700
- SU, B., X. WANG, A. NUNOMURA, P. I. MOREIRA, H. -GON LEE, G. PERRY, M. A. SMITH A X. ZHU, 2008. OXIDATIVE STRESS SIGNALING IN ALZHEIMER'S DISEASE. *CURRENT ALZHEIMER RESEARCH*. 12., ROČ. 5, Č. 6, S. 525–532. ISSN 1567-2050.
- SUSZKIW, JB A G PILAR, 1976. SELECTIVE LOCALIZATION OF A HIGH AFFINITY CHOLINE UPTAKE SYSTEM AND ITS ROLE IN ACH FORMATION IN CHOLINERGIC NERVE-TERMINALS. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 26, Č. 6, S. 1133–1138. ISSN 0022-3042. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1471-4159.1976.TB06996.X
- SZEGLETES, T, WD MALLENDER, PJ THOMAS A TL ROSENBERY, 1999. SUBSTRATE BINDING TO THE PERIPHERAL SITE OF ACETYLCHOLINESTERASE INITIATES ENZYMATIC CATALYSIS. SUBSTRATE INHIBITION ARISES AS A SECONDARY EFFECT. *BIOCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 38, Č. 1, S. 122–133. ISSN 0006-2960. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1021/BI9813577
- SZUTOWICZ, ANDRZEJ, HANNA BIELARCZYK, AGNIESZKA JANKOWSKA-KULAWY, TADEUSZ PAWELCZYK A ANNA RONOWSKA, 2013. ACETYL-COA THE KEY FACTOR FOR SURVIVAL OR DEATH OF CHOLINERGIC NEURONS IN COURSE OF NEURODEGENERATIVE DISEASES. *NEUROCHEMICAL RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 38, Č. 8, S. 1523–1542 [VID. 8. SRPEN 2013]. ISSN 0364-3190, 1573-6903. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S11064-013-1060-X
- TANDON, A, E ROGAEVA, M MULLAN A PH ST GEORGE-HYSLOP, 2000. MOLECULAR GENETICS OF ALZHEIMER'S DISEASE: THE ROLE OF BETA-AMYLOID AND THE PRESENILINS. *CURRENT OPINION IN NEUROLOGY*. ROČ. 13, Č. 4, S. 377–84. ISSN 1473-6551.
- TARIOT, PN, MR FARLOW, GT GROSSBERG, SM GRAHAM, S MCDONALD, I GERGEL A MEMANTINE STUDY GRP, 2004. MEMANTINE TREATMENT IN PATIENTS WITH MODERATE TO SEVERE ALZHEIMER DISEASE ALREADY RECEIVING DONEPEZIL - A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. *JAMA-JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION* [ONLINE]. ROČ. 291, Č. 3, S. 317–324. ISSN 0098-7484. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1001/JAMA.291.3.317
- TAYLOR, ROY, 2013. TYPE 2 DIABETES ETIOLOGY AND REVERSIBILITY. *DIABETES CARE* [ONLINE]. 4., ROČ. 36, Č. 4, S. 1047–1055. ISSN 0149-5992. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.2337/DC12-1805
- THAL, DR, E GHEBREMEDHIN, U RUB, H YAMAGUCHI, K DEL TREDICI A H BRAAK, 2002A. TWO TYPES OF SPORADIC CEREBRAL AMYLOID ANGIOPATHY. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY*. 3., ROČ. 61, Č. 3, S. 282–293. ISSN 0022-3069.

THAL, DR, U RUB, M ORANTES A H BRAAK, 2002B. PHASES OF A BETA-DEPOSITION IN THE HUMAN BRAIN AND ITS RELEVANCE FOR THE DEVELOPMENT OF AD. *NEUROLOGY*. ROČ. 58, Č. 12, S. 1791–1800. ISSN 0028-3878.

TIRABOSCHI, P, MN SABBAGH, LA HANSEN, DP SALMON, A MERDES, A GAMST, E MASLIAH, M ALFORD, LJ THAL A J COREY-BLOOM, 2004. ALZHEIMER DISEASE WITHOUT NEOCORTICAL NEUROFIBRILLARY TANGLES - “A SECOND LOOK”. *NEUROLOGY*. ROČ. 62, Č. 7, S. 1141–1147. ISSN 0028-3878.

TOMIYAMA, TAKAMI, TETSU NAGATA, HIROYUKI SHIMADA, RIE TERAOKA, AKIKO FUKUSHIMA, HYOUE KANEMITSU, HIROSHI TAKUMA, RYOZO KUWANO, MASAKI IMAGAWA, SUZUKA ATAKA, YASUHIRO WADA, EITO YOSHIOKA, TOMOYUKI NISHIZAKI, YASUYOSHI WATANABE A HIROSHI MORI, 2008. A NEW AMYLOID MU VARIANT FAVORING OLIGOMERIZATION IN ALZHEIMER’S-TYPE DEMENTIA. *ANNALS OF NEUROLOGY* [ONLINE]. 3., ROČ. 63, Č. 3, S. 377–387. ISSN 0364-5134. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/ANA.21321

TORRAO, AS A LRG BRITTO, 2002. NEUROTRANSMITTER REGULATION OF NEURAL DEVELOPMENT: ACETYLCHOLINE AND NICOTINIC RECEPTORS. *ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS*. 9., ROČ. 74, Č. 3, S. 453–461. ISSN 0001-3765.

TREANOR, JJS, C SCHMELZER, B KNUSEL, JW WINSLOW, DL SHELTON, F HEFTI, K NIKOLICS A LE BURTON, 1995. HETERODIMERIC NEUROTROPHINS INDUCE PHOSPHORYLATION OF TRK RECEPTORS AND PROMOTE NEURONAL DIFFERENTIATION IN PC12 CELLS. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. ROČ. 270, Č. 39, S. 23104–23110. ISSN 0021-9258.

UHL, GR, M MCKINNEY, JC HEDREEN, CL WHITE, JT COYLE, PJ WHITEHOUSE A DL PRICE, 1982. DEMENTIA PUGILISTICA - LOSS OF BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC NEURONS AND CORTICAL CHOLINERGIC MARKERS. *ANNALS OF NEUROLOGY*. ROČ. 12, Č. 1, S. 99. ISSN 0364-5134.

UCHIKADO, HIROTAKE, WEN-LANG LIN, MICHAEL W. DELUCIA A DENNIS W. DICKSON, 2006. ALZHEIMER DISEASE WITH AMYGDALA LEWY BODIES: A DISTINCT FORM OF ALPHA-SYNUCLEINOPATHY. *JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 65, Č. 7, S. 685–697. ISSN 0022-3069. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1097/01.JNEN.0000225908.90052.07

VAN DER ZEE, E. A., B. PLATT A G. RIEDEL, 2011. ACETYLCHOLINE: FUTURE RESEARCH AND PERSPECTIVES. *BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH* [ONLINE]. ROČ. 221, Č. 2, SI, S. 583–586. ISSN 0166-4328. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.BBR.2011.01.050

VAN DER ZEE, EA A PGM LUITEN, 1999. MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN THE HIPPOCAMPUS, NEOCORTEX AND AMYGDALA: A REVIEW OF IMMUNOCYTOCHEMICAL LOCALIZATION IN RELATION TO LEARNING AND MEMORY. *PROGRESS IN NEUROBIOLOGY* [ONLINE]. 8., ROČ. 58, Č. 5, S. 409–471. ISSN 0301-0082. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0301-0082(98)00092-6

VELLOM, DC, Z RADIC, Y LI, NA PICKERING, S CAMP A P TAYLOR, 1993. AMINO-ACID-RESIDUES CONTROLLING ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYLCHOLINESTERASE SPECIFICITY. *BIOCHEMISTRY* [ONLINE]. ROČ. 32, Č. 1, S. 12–17. ISSN 0006-2960. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1021/B100052A003

VERNINO, S, M ROGERS, KA RADCLIFFE A JA DANI, 1994. QUANTITATIVE MEASUREMENT OF CALCIUM FLUX THROUGH MUSCLE AND NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. 9., ROČ. 14, Č. 9, S. 5514–5524. ISSN 0270-6474.

VIDAL, C A JP CHANGEUX, 1993. NICOTINIC AND MUSCARINIC MODULATIONS OF EXCITATORY SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE RAT PREFRONTAL CORTEX IN-VITRO. *NEUROSCIENCE* [ONLINE]. 9., ROČ. 56, Č. 1, S. 23–32. ISSN 0306-4522. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0306-4522(93)90558-W

VILATELA, ALONSO MARIA ELISA, MARISOL LOPEZ-LOPEZ A PETRA YESEAS-GOMEZ, 2012. GENETICS OF ALZHEIMER’S DISEASE. *ARCHIVES OF MEDICAL RESEARCH* [ONLINE]. 11., ROČ. 43, Č. 8, SI, S. 622–631. ISSN 0188-4409. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.ARCMED.2012.10.017

VLÁDA ČESKÉ REPUBLIKY, 2010. *NÁVRH STÁTNÍHO ZÁVĚREČNÉHO ÚČTU ČESKÉ REPUBLIKY ZA ROK 2009*. 2010. B.M.: MINISTERSTVO FINANČÍ ČR.

VOLICER, L, DG HARPER, BC MANNING, R GOLDSTEIN A A SATLIN, 2001. SUNDOWNING AND CIRCADIAN RHYTHMS IN ALZHEIMER’S DISEASE. *AMERICAN JOURNAL OF PSYCHIATRY* [ONLINE]. 5., ROČ. 158, Č. 5, S. 704–711. ISSN 0002-953X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1176/APPL.AJP.158.5.704

VOSS, G A K SACHSSE, 1970. RED CELL AND PLASMA CHOLINESTERASE ACTIVITIES IN MICROSAMPLES OF HUMAN AND ANIMAL BLOOD DETERMINED SIMULTANEOUSLY BY A MODIFIED ACETYLTHIOCHOLINE/DTNB PROCEDURE. *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 16, Č. 3, S. 764–72. ISSN 0041-008X. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/0041-008X(70)90082-7

VOYTKO, ML, DS OLTON, RT RICHARDSON, LK GORMAN, JR TOBIN A DL PRICE, 1994. BASAL FOREBRAIN LESIONS IN MONKEYS DISRUPT ATTENTION BUT NOT LEARNING AND MEMORY. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. 1., ROČ. 14, Č. 1, S. 167–186. ISSN 0270-6474.

WANG, BAI-SONG, HAO WANG, ZHAO-HUI WEI, YAN-YAN SONG, LU ZHANG A HONG-ZHUAN CHEN, 2009. EFFICACY AND SAFETY OF NATURAL ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR HUPERZINE A IN THE TREATMENT OF ALZHEIMER’S DISEASE: AN UPDATED META-ANALYSIS. *JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION* [ONLINE]. 4., ROČ. 116, Č. 4, S. 457–465. ISSN 0300-9564. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1007/S00702-009-0189-X

WAVRANT-DE VRIEZE, FABIENNE, DANIELLE COMPTON, MERIDITH WOMICK, SAMPATH AREPALLI, OMANMA ADIGHIBE, LING LI, JORDI PEREZ-TUR A JOHN HARDY, 2007. ABCA1 POLYMORPHISMS AND ALZHEIMER’S DISEASE. *NEUROSCIENCE LETTERS* [ONLINE]. ROČ. 416, Č. 2, S. 180–183. ISSN 0304-3940. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.NEULET.2007.02.010

WHITEHOUSE, PJ, JC HEDREEN, CL WHITE, AW CLARK A DL PRICE, 1983. NEURONAL LOSS IN THE BASAL FOREBRAIN CHOLINERGIC SYSTEM IS MORE MARKED IN ALZHEIMERS-DISEASE THAN IN SENILE DEMENTIA OF THE ALZHEIMER TYPE. *ANNALS OF NEUROLOGY*. ROČ. 14, Č. 1, S. 149. ISSN 0364-5134.

WHITTAKER, VP, 1993. THE CHOLINESTERASES - A DISCUSSION OF SOME UNANSWERED QUESTIONS. *PROGRESS IN BRAIN RESEARCH*. ROČ. 98, S. 155–159. ISSN 0079-6123.

WILCOCK, GK, M SCOTT A T PEARSALL, 1994. LONG-TERM USE OF TACRINE. *LANCET* [ONLINE]. ROČ. 343, Č. 8892, S. 294. ISSN 0140-6736. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0140-6736(94)91140-1

WIMO, A. A M. PRINCE, 2010. *ALZHEIMER’S DISEASE INTERNATIONAL WORLD ALZHEIMER REPORT 2010: THE GLOBAL ECONOMIC IMPACT OF DEMENTIA*. 2010. B.M.: ALZHEIMER’S DISEASE INTERNATIONAL.

WINKLER, J, ST SUHR, FH GAGE, LJ THAL A LJ FISHER, 1995. ESSENTIAL ROLE OF NEOCORTICAL ACETYLCHOLINE IN SPATIAL MEMORY. *NATURE* [ONLINE]. ROČ. 375, Č. 6531, S. 484–487. ISSN 0028-0836. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1038/375484A0

WINTER, GD, 1960. CHOLINESTERASE ACTIVITY DETERMINATION IN AN AUTOMATED ANALYSIS SYSTEM. *ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 87, Č. 2, S. 629–635. ISSN 0077-8923. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1111/J.1749-6632.1960.TB23226.X

- WISNIEWSKI, KE, HM WISNIEWSKI A GY WEN, 1985. OCCURRENCE OF NEUROPATHOLOGICAL CHANGES AND DEMENTIA OF ALZHEIMERS-DISEASE IN DOWN SYNDROME. *ANNALS OF NEUROLOGY* [ONLINE]. ROČ. 17, Č. 3, S. 278–282. ISSN 0364-5134. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/ANA.410170310
- WONNACOTT, S, 1997. PRESYNAPTIC NICOTINIC ACH RECEPTORS. *TRENDS IN NEUROSCIENCES* [ONLINE]. ROČ. 20, Č. 2, S. 92–98. ISSN 0166-2236. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0166-2236(96)10073-4
- WOREK, F, U MAST, D KIDERLEN, C DIEPOLD A P EYER, 1999. IMPROVED DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN HUMAN WHOLE BLOOD. *CLINICA CHIMICA ACTA* [ONLINE]. ROČ. 288, Č. 1-2, S. 73–90. ISSN 0009-8981. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0009-8981(99)00144-8
- WYNN, JG, 2004. INFLUENCE OF PLIO-PLEISTOCENE ARIDIFICATION ON HUMAN EVOLUTION! EVIDENCE FROM PALEOSOLS OF THE TURKANA BASIN, KENYA. *AMERICAN JOURNAL OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY* [ONLINE]. ROČ. 123, Č. 2, S. 106–118. ISSN 0002-9483. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1002/AJPA.10317
- YANAGISAWA, M, E PLANEL, K ISHIGURO A SC FUJITA, 1999. STARVATION INDUCES TAU HYPERPHOSPHORYLATION IN MOUSE BRAIN: IMPLICATIONS FOR ALZHEIMER'S DISEASE. *FEBS LETTERS* [ONLINE]. ROČ. 461, Č. 3, S. 329–333. ISSN 0014-5793. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/S0014-5793(99)01480-5
- YATES, CM, J SIMPSON, AFJ MALONEY, A GORDON A AH REID, 1980. ALZHEIMER-LIKE CHOLINERGIC DEFICIENCY IN DOWN SYNDROME. *LANCET*. ROČ. 2, Č. 8201, S. 979. ISSN 0140-6736.
- ZEKANOWSKI, CEZARY A URSZULA WOJDA, 2009. ANEUPLOIDY, CHROMOSOMAL MISSEGREGATION, AND CELL CYCLE REENTRY IN ALZHEIMER'S DISEASE. *ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS*. ROČ. 69, Č. 2, S. 232–253. ISSN 0065-1400.
- ZEKRAOUI, L, JP LAGARDE, A RAISONNIER, N GERARD, A AOUIZERATE A G LUCOTTE, 1997. HIGH FREQUENCY OF THE APOLOPOPROTEIN E \*4 ALLELE IN AFRICAN PYGMIES AND MOST OF THE AFRICAN POPULATIONS IN SUB-SAHARAN AFRICA. *HUMAN BIOLOGY*. 8., ROČ. 69, Č. 4, S. 575–581. ISSN 0018-7143.
- ZHANG, L, JL WEINER A PL CARLEN, 1992. MUSCARINIC POTENTIATION OF IK IN HIPPOCAMPAL-NEURONS - ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. 11., ROČ. 12, Č. 11, S. 4510–4520. ISSN 0270-6474.
- ZHANG, WL, AS BASILE, J GOMEZA, LA VOLPICELLI, AI LEVEY A J WESS, 2002. CHARACTERIZATION OF CENTRAL INHIBITORY MUSCARINIC AUTORECEPTORS BY THE USE OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR KNOCK-OUT MICE. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 22, Č. 5, S. 1709–1717. ISSN 0270-6474.
- ZIMÁK, ALEXANDR, 2003. *JHOAFRICKÁ REPUBLIKA*. PRAHA: LIBRI. ISBN ISBN 80-7277-184-1.
- ZOLI, M, C LENA, MR PICCIOTTO A JP CHANGEUX, 1998. IDENTIFICATION OF FOUR CLASSES OF BRAIN NICOTINIC RECEPTORS USING BETA 2 MUTANT MICE. *JOURNAL OF NEUROSCIENCE*. ROČ. 18, Č. 12, S. 4461–4472. ISSN 0270-6474.
- ŽDÁROVÁ-KARASOVÁ, JANA, KAMIL KUČA, DANIEL JUN A JIŘÍ BAJGAR, 2010. UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLINESTERAS PŘI IN VIVO HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ. *CHEM. LISTY*. Č. 104, S. 46–50. ISSN 1213-7103.