

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**FARMAKOLOGICKÉ HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH
LÉČIV ALZHEIMEROVY CHOROBY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Konzultant diplomové práce: PharmDr. Vendula Šepsová, Ph.D.

Hradec Králové 2016

Lenka Matoušková

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

.....

Podpis autora diplomové práce

Velmi ráda bych zde poděkovala PharmDr. Vendule Šepsové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a její ochotu při vypracovávání této diplomové práce.

Za možnost realizace této práce děkuji všem zaměstnancům Katedry toxikologie a vojenské farmacie v Hradci Králové a zaměstnancům Centra biomedicínského výzkumu při Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Zároveň děkuji PharmDr. Marii Vopršalové, CSc.

Poděkování patří také mým drahým nejbližším, díky kterým jsem se dostala k psaní těchto řádek.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lenka Matoušková

Vedoucí práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Konzultant práce: PharmDr. Vendula Šepsová, Ph.D.

Název diplomové práce: Farmakologické hodnocení potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) je neurodegenerativní onemocnění charakterizované shluky beta-amyloidu, neurofibrilárními klubky tau proteinu a ztrátou cholinergních neuronů v oblasti bazálního telencefala a hipokampu. Příčina AD je stále neznámá a dostupná je pouze symptomatická léčba pomocí inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE) a memantinu, inhibitoru glutamátových receptorů. Pozitivní alosterické modulátory (PAM) M₁ podtypu muskarinových receptorů představují další možnost léčby, která může zlepšit cholinergní transmissi. Díky své selektivitě jsou schopny mírnit nežádoucí účinky.

Cílem této práce bylo stanovit u testovaných látek schopnost inhibovat AChE, butyrylcholinesterasu (BChE) a zároveň vystupovat jako PAM M₁ receptorů. Inhibice enzymů byla měřena dle Ellmanovy metody se stanovením hodnot IC₅₀. Pro fluorescenční měření interakce testovaných sloučenin s muskarinovými receptory byla použita buněčná linie stabilně exprimující lidské M₁ receptory. Výsledky všech měření byly vyhodnoceny ve statistickém programu GraphPad Prism5.

Žádná z testovaných sloučenin nebyla PAM M₁ receptorů. Všechny nové sloučeniny vykazovaly dobré inhibiční vlastnosti obou typů cholinesteras. Schopnost inhibovat AChE a BChE byla srovnatelná se standardy.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lenka Matoušková

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Consultant: PharmDr. Vendula Šepsová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Pharmacological evaluation of potential drugs for Alzheimer's disease treatment

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by aggregates of beta-amyloid, neurofibrillary tangles of tau protein and by the loss of cholinergic neurons in the basal forebrain and hippocampus. Cause of AD is still unknown and only symptomatic treatment is available thanks to inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and memantine, inhibitor of glutamate receptors. M₁ muscarinic positive allosteric modulators (PAM) represent another variant of treatment that can improve cholinergic transmission. Thanks to their selectivity, they are able to decrease side effects.

The aim of the study was to measure novel compounds' abilities to inhibit AChE and BChE and simultaneously act as PAM of M₁ receptors. Enzymes inhibition was measured according to Ellman's method and IC₅₀ values were determined. For fluorescent measurement of compounds interaction with muscarinic receptor the CHO cell line stably expressing the M₁ receptor subtype was used. Statistical analysis of results was performed in GraphPad Prism 5.

None of the tested compounds acted as a PAM of M₁ receptors. All novel compounds acted as M₁ inhibitors. Moreover, AChE and BChE inhibition was comparable with standards.

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK.....	8
2 ÚVOD.....	11
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1 Alzheimerova choroba.....	12
3.1.1 Patofyziologie a diagnostika Alzheimerovy choroby.....	14
3.1.1.1 Amyloidní hypotéza.....	15
3.1.1.2 Cholinergní hypotéza.....	18
3.1.2 Terapie.....	19
3.1.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy.....	20
3.1.2.2 Antagonista NMDA receptorů.....	22
3.2 Fyziologie.....	23
3.2.2 Cholinesterasy.....	26
3.2.2.1 Acetylcholinesterasa.....	26
3.2.2.2 Butyrylcholinesterasa.....	28
3.2.3 Cholinergní receptory.....	29
3.2.3.1 Nikotinové receptory.....	29
3.2.3.2 Muskarinové receptory.....	31
3.2.4 Agonisté M ₁ muskarinových receptorů.....	36
3.2.5 Alosterické modulátory.....	37
3.2.5.1 Benzylchinolon karboxylová kyselina.....	37
4 CÍL PRÁCE.....	39
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
5.1 Stanovení IC ₅₀ testovaných látek.....	40

5.1.1 Princip metody	40
5.1.2 Chemikálie a příprava základních roztoků	42
5.1.3 Postup stanovení IC ₅₀ inhibitorů.....	44
5.2 Fluorimetrické měření modulace muskarinových receptorů.....	45
5.2.1 Princip metody	45
5.2.2 Chemikálie a příprava základních roztoků	47
5.2.3 Postup stanovení agonistické aktivity.....	48
6 VÝSLEDKY	50
6.1 Inhibice acetylcholinesterasy	52
6.2 Inhibice butyrylcholinesterasy	55
6.3 Modulace M ₁ muskarinových receptorů.....	58
7 DISKUZE.....	61
8 ZÁVĚR	66
9 SEZNAM OBRÁZKŮ	67
10 ZDROJE.....	68

1 SEZNAM ZKRATEK

6-Cl THA	6-chlortakrin
7-MEOTA	7-methoxytakrin
Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChE _H	hydrofobní acetylcholinesterasa
AChEI	inhibitor acetylcholinesterasy
AChE _S	hadí, rozpustná acetylcholinesterasa
AChE _T	ocasatá acetylcholinesterasa
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATChJ	acetylthiocholin jodid
A β	beta-amyloid
BCh	butyrylcholin
BChE	butyrylcholinesterasa
BChEI	inhibitor butyrylcholinesterasy
BQCA	benzylchinolon karboxylová kyselina
BTChJ	butyrylthiocholin jodid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
CSF	cerebrospinální tekutina
ČR	Česká republika

DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitro) benzoová kyselina
EC ₂₀	koncentrace, která vyvolá odpověď z dvaceti procent
EC ₅₀	polovina maximální efektivní koncentrace
EC ₈₀	koncentrace, která vyvolá odpověď z osmdesáti procent
ER	endoplazmatické retikulum
EryAChE	erytrocytární acetylcholinesterasa
FBS	fetální bovinní sérum
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GPI	glykofosfatidylinositol
ChAT	cholinacetyltransferasa
ChE	cholinesterasa
CHO-M ₁	buněčná linie z ovarí křečka čínského exprimující M ₁ podtyp muskarinového receptoru
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která vyvolá padesáti procentní odpověď
IP ₃	inositoltrifosfát
KTVF	Katedra toxikologie a vojenské farmacie
LBD	demence s Lewyho tělísky
mAChRs	muskarinové cholinergní receptory
MRI	magnetická rezonance
MTDLs	multi-target-directed ligands, molekuly vážící se na více cílů
nAChRs	nikotinové cholinergní receptory
NAM	negativní alosterický modulátor

NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
Oxo-M	oxotremorin
PAM	pozitivní alosterický modulátor
PBS	fosfátový pufr
PET	pozitronová emisní tomografie
PHF	párové helikální struktury
PHY	fyzostigmin
PLC	fosfolipasa C
SNAPs	proteiny neuronální plazmatické membrány
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
THA	takrin
VACht	vezikulární acetylcholinový transportér
VAMPs	membránové proteiny vezikul
VAT	vezikulární transportér

2 ÚVOD

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD) patří mezi nejčastější formu demence (1) a její výskyt úměrně roste spolu se stárnoucí populací. Věk je hlavním rizikovým faktorem nemoci. U osob ve věku 60-65 let je prevalence nemoci 0,7 %, zatímco u osob starších 90let je přibližně 40 % postižených (2). Tento typ demence má nepříznivé dopady nejen na pacienta samotného, podstatný je také socioekonomický dopad na společnost.

AD se bohužel řadí mezi nevyléčitelná onemocnění. V současnosti je tedy dostupná pouze dlouhodobá symptomatická léčba. K mírnění příznaků nemoci jsou v České republice dostupná pouze čtyři léčiva, která jsou schválena Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL). Jsou jimi inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) donepezil, rivastigmin, galantamin a antagonist N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů - memantin. K dispozici je také extrakt z jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*) (1,3).

AD je onemocněním multifaktoriálním, kdy jsou současně poškozeny nejen anatomické struktury v centrální nervové soustavě (CNS), ale také biochemické procesy v mozku. V současnosti je pozornost zaměřena na vývoj a syntézu takových léčiv, která by díky své molekule byla schopná pozitivně ovlivnit více patologických procesů současně. Takováto léčiva označujeme jako multi-targeted-ligands (MTDLs) (2).

MTDLs jsou i látky popsané v této práci. Na Katedře toxikologie a vojenské farmacie v Hradci Králové (KTVF) byly syntetizovány za účelem duálního účinku na cholinergní systém, který je při AD postižen na několika úrovních. Strukturně testované látky odpovídají AChEI a zároveň alosterickému modulátoru M₁ podtypu muskarinových cholinergních receptorů (mAChRs). Ideální sloučenina by tedy měla zvyšovat koncentraci neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v nervových synapsích a díky působení na mAChRs podpořit jeho následnou aktivitu. Předpokládaným efektem by poté bylo zlepšení kognitivních funkcí u postižených pacientů.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Alzheimerova choroba

AD patří mezi nejčastější formy demence (zahrnuje 50-75 % případů). V roce 2013 trpělo demencí celosvětově 44,4 milionů pacientů, přičemž se odhaduje, že do roku 2050 se jejich počet zvýší na 135 milionů (4). Co se týče České republiky (ČR), AD zahrnuje 56 % případů demence. Z vypracovaných světových a evropských studií se odhaduje, že v ČR trpí AD 143 tisíc pacientů, přičemž dvě třetiny počtu tvoří ženy. Prevalence onemocnění stoupá s věkem. Nad 65 let věku je v ČR každá třináctá osoba postižena touto formou demence. Nad 80 let věku každá pátá a nad 90 let dokonce každá druhá. Dle současných dat se odhaduje, že v roce 2036 bude v tuzemsku 300 tisíc pacientů s AD (5).

Spolu s nárůstem počtu pacientů se zvyšují také náklady spojené s léčbou tohoto onemocnění. Jen největší zdravotní pojišťovna v ČR, Všeobecná zdravotní pojišťovna, uveřejnila náklady spojené s léčbou AD v hodnotě 600 milionů korun a je zřejmé, že se tato částka bude v budoucnu zvyšovat (6).

Pro všechny typy demence je společná dysfunkce na neuronální úrovni, což může vyústit v odumírání neuronů (7). Probíhající patologické změny v mozku pacientů mají za následek zhoršování kognitivních funkcí, jako jsou paměť, myšlení či koncentrace (1,4).

Demence s Lewyho tělísky (Lewy body dementia, LBD) je druhou nejčastěji se vyskytující formou demence po AD. Pro patologii LBD je charakteristické abnormální ukládání proteinu α -synukleinu v nervových synapsích (7,8).

Parkinsonova choroba je formou demence s typickým poškozením motorických funkcí, které souvisí s úbytkem neuronů v *substantia nigra* a striatu. Zároveň jsou v poškozené mozkové tkáni přítomna Lewyho tělíčka (9).

Vaskulární forma demence, jež postihuje mozkové cévy s následným nedostatečným vyživováním mozkových neuronů, často koexistuje s AD. Hypoperfúze a hypoxie tkáně vede k tvorbě ischemických ložisek, zvláště v bílé hmotě, v níž poté odumírají neurony. (10)

Kromě toho mozková hypoxie podporuje patologické děje typicky probíhající u AD (ukládání senilních plaků a formace neurofibrilárních klubek) (10).

Můžeme tedy říci, že u všech forem demence probíhá souběžně několik patologických procesů, které se navzájem ovlivňují a vznikají mezi nimi další souvislosti. Častá je proto koexistence patologických projevů, typických pro více druhů neurodegenerativních onemocnění (7).

Osoba postižená AD se s progredující nemocí stává nesoběstačnou a závislou na pomoci druhých. Péče o takovouto osobu je náročná zejména ze socioekonomického hlediska. Stoupající incidence AD je stále větší zátěží pro zdravotnické systémy. Náklady na léčbu AD a ostatních typů demencí v roce 2015 dosáhly hodnoty 226 bilionů amerických dolarů (11). Roste také potřeba zařízení, jakými jsou například hospice, kde se pacientům dostává plnohodnotné péče. Na druhé straně stojí rodiny postižených, pro které je péče o postiženého náročná především fyzicky a psychicky (4).

3.1.1 Patofyziologie a diagnostika Alzheimerovy choroby

Při AD jsou v hipokampu a mozkové kůře prokazatelné senilní plaky β -amyloidního proteinu ($A\beta$) a neurofibrilární klubka hyperfosforylovaného tau proteinu (12,13). S těmito patologickými změnami souvisí úbytek neuronů, nervových synapsí, časté amyloidní angiopatie a postižení cholinergního systému. Atrofie neuronů je spojena s úbytkem nervové hmoty, což je prokazatelné při vyšetření magnetickou rezonancí (MRI) (13,14). U MRI vyšetření mozku sice pozorujeme redukci mozkové tkáně, nicméně je problém rozlišit od sebe navzájem složité anatomické struktury hipokampu, bílou a šedou hmotu mozkovou.

U zdánlivě zdravých jedinců nemusí být během života přítomny symptomy onemocnění. Změny v mozkové tkáni, jež vedou k AD, mohou totiž probíhat i více než dvacet let před dostavením se prvních příznaků nemoci (14,15). Diagnózu AD lze s plnou určitostí prokázat až u zemřelých pacientů, kdy je možné provést určitou kombinaci vyšetření. Jsou jimi MRI a histopatologický průkaz výskytu plaků a klubek (13,16). Díky dnešním vyspělým fyzikálním, laboratorním či psychologickým vyšetřením je přesto možné stanovení diagnózy s více než 90% jistotou.

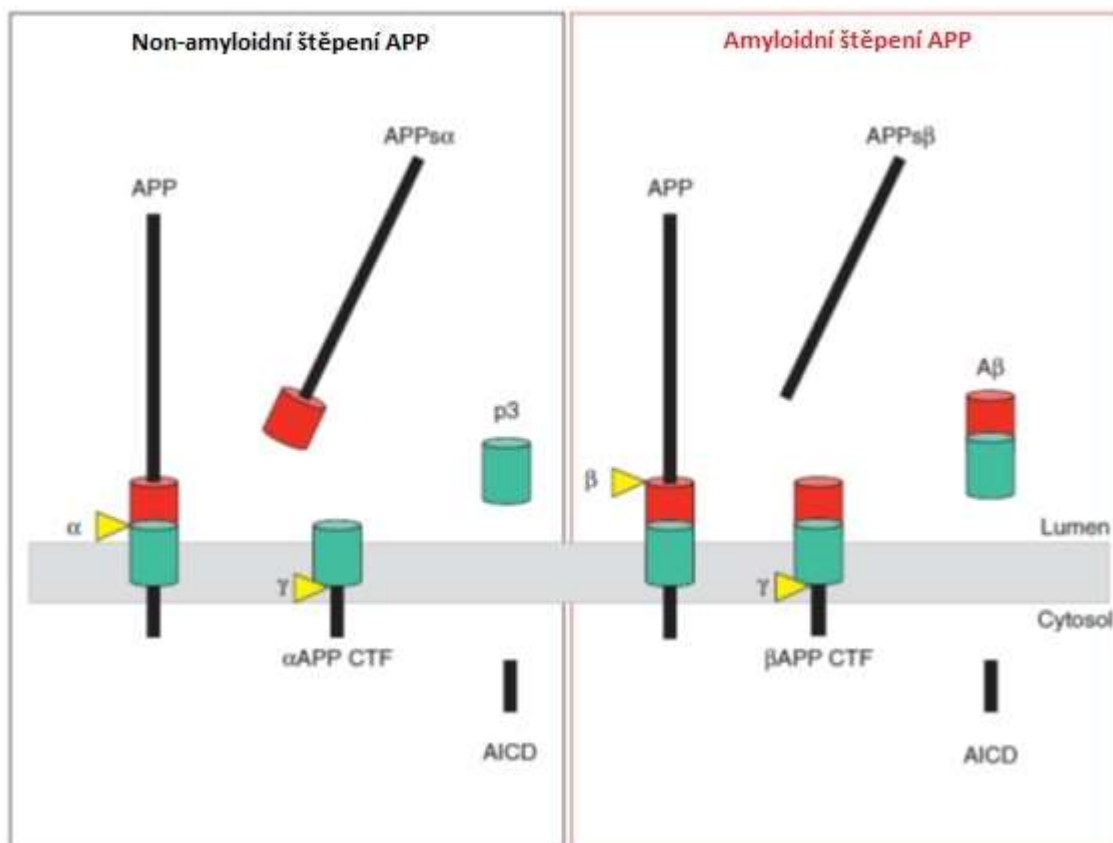
Důležitou roli hraje stanovení patofyziologických biomarkerů z cerebrospinální tekutiny (cerebrospinal fluid, CSF). Výsledné hodnoty totiž korespondují s probíhajícími neurodegenerativními procesy v mozku. Imunochemickou metodou ELISA je v CSF stanovován $A\beta$ (počet aminokyselin 1-42), celkový tau protein a fosforylovaný tau protein. Vyšetření pomocí této metody se vyznačuje vysokou citlivostí a specificitou (14,16).

Pro diagnostiku jsou dále podstatné topografické markery, které jsou sice méně specifické, ale též je zde korelace s probíhající patologií. Patří sem již zmiňovaná MRI, kdy je zobrazovaným markerem temporální lalok a jeho atrofované oblasti. Další využívanou zobrazovací metodou je pozitronová emisní tomografie (PET) s použitím fluorodeoxyglukózy jako radiofarmaka. Vyhodnocuje se zobrazení temporo-parietálních oblastí mozku (14).

3.1.1.1 Amyloidní hypotéza

Více než dvacet let byla „amyloidní hypotéza“ vysvětlením vzniku AD (17). Tato hypotéza je založena na patologických dějích probíhajících v mozku postiženého. V mozkové tkáni dochází k tvorbě extracelulárních neuronálních plaků, které tvoří shluky $A\beta$ a intracelulárních neurofibrilárních klubek složených z hyperfosforylovaného tau proteinu (18,19).

Proteolytickým štěpením transmembránového amyloidního prekurzorového proteinu (APP) vzniká $A\beta$ (viz Obr. 1). APP je štěpen třemi typy proteas, které označujeme jako α -, β - a γ -sekretasu (19). Po rozštěpení APP β -sekretasou pokračuje v aktivitě γ -sekretasa a vzniká „dlouhý“ $A\beta_{42}$ a $A\beta_{40}$, každý z příslušného počtu aminokyselin. $A\beta_{42}$ a $A\beta_{40}$ úzce souvisí s patogenezí AD, jelikož jsou hlavními složkami neuronálních plaků. Bylo prokázáno, že mutací na chromosomu 14 nebo chromosomu 1 dochází ke změně struktury enzymu presenilinu, který je součástí komplexu γ -sekretas. Tyto mutace byly přítomny u pacientů trpících AD a souvisely se zvýšeným množstvím $A\beta_{42}$ (17,19).



Obr. 1 Proteolytické štěpení amyloidního prekursorového proteinu.

Zkratky: α – α -sekretasa, β – β -sekretasa, γ - γ -sekretasa, APP – amyloidní prekursorový protein, APPs α – α ektodoména APP, α APP CTF – C-terminální fragment APP vzniklý po štěpení α -sekretasou, p3 – zkrácený amyloid β , AICD – intracelulární doména amyloidního prekursorového proteinu, APPs β – β ektodoména APP, β APP CTF – C-terminální fragment APP vzniklý po štěpení β -sekretasou, A β – amyloid β

Modifikováno dle: Haass et al. (2012)

Tau protein se v mozku vyskytuje v šesti různých izoformách a váže se na mikrotubuly, které tímto udržuje ve stabilizované formě. Fyziologicky dochází v průběhu života k fosforylaci tau proteinu kinasami a také k defosforylaci fosfatasami. Tento děj je regulovaný a rovnovážný. V důsledku patologických procesů nastává nerovnováha mezi aktivitami těchto enzymů a vzniká hyperfosforylovaný tau protein. Ten není schopný vázat mikrotubuly, které proto depolymerují, a v cytoplasmě neuronů agreguje do párových helikálních struktur (PHF) a z nich vznikajících neurofibrilárních klubek (20–22).

A β a tau protein se v postižené mozkové tkáni vyskytuje nezávisle na sobě. Naopak, v mozku člověka se zachovalými kognitivními funkcemi se může nacházet A β a tau protein nikoliv (18). Skutečností je, že se při různých typech neuronálních onemocnění (amyloidní laterální skleróza, Downův syndrom, *dementia pugilistica* a další) objevují klubka tau proteinu, zároveň však A β přítomný není (20).

Můžeme tedy předpokládat, že u etiologicky rozdílných neuronálních nemocí je zvýšení tvorby tau proteinu sekundární proces. Zároveň ale přibývá důkazů, že tvorba tau proteinu u AD je jednou z reakcí neuronů na hromadění A β ve tkáni (18).

3.1.1.2 Cholinergní hypotéza

Cholinergní hypotéza byla první teorií vysvětlující AD. Je založena na skutečnosti, že v mozcích pacientů s AD dochází ke snížení cholinergní aktivity. Experimentální studie zároveň objasňují roli ACh v procesu učení a paměti. V rámci studií se mladým zdravým jedincům podal skopolamin, který blokuje cholinergní transmisi centrálního nervového systému. Ve výsledku docházelo ke stejným poruchám paměti jako u stárnoucích lidí postižených AD (23). Po těchto studiích se následně prokázalo, že ztráta paměti stárnoucích opic spojená s věkem může být farmakologicky zmírněna. Tohoto se docílilo podáním inhibitoru acetylcholinesterasy – fyzostigminu (PHY) (24).

ACh je široce rozšířen v nervovém systému a hraje důležitou roli nejen ve vývoji mozkové kůry, ale zasahuje také do procesů paměti, myšlení, cirkadiálních rytmů nebo správné krevní cirkulace v mozku (25). Cholinergní systém během stárnutí a AD podléhá rozsáhlým změnám. Postiženy jsou nervové buňky, mezibuněčná signalizace, enzymy syntézy a enzymy degradace ACh - cholinacetyltransferasa (ChAT) a acetylcholinesterasa (AChE), vezikulární acetylcholinový transportér (VACHT). Patologické procesy ovlivňují také mAChRs a nikotinové cholinergní receptory (nAChRs) (26).

Mnoho vědců však nevěří, že změny v cholinergním systému jsou signifikantním začátkem v etiologii AD. Bylo provedeno stanovení cholinergních markerů u osob s mírným kognitivním poškozením a u osob s těžkým rozvinutým stádiem AD. Při porovnání výsledků se ukázalo snížení cholinergní funkce v pozdních stádiích nemoci, ne však v jejím počátečním rozvoji. Problémem je také detekce úbytku cholinergních neuronů v časném stádiu nemoci, protože jedinci jsou do jednotlivých skupin rozdělení dle věku. To znamená, že nelze jednoznačně rozlišit, do jaké míry souvisí úbytek neuronů s věkem a do jaké míry souvisí s AD (23).

3.1.2 Terapie

Terapie AD je v současnosti pouze symptomatická, kdy se zpomaluje průběh nemoci a mírní se její příznaky. Dostupná léčiva ovlivňují postižený cholinergní systém a jedná se především o AChEI. Svým působením na enzym AChE zabraňují hydrolytickému štěpení ACh a zvyšují tím jeho koncentraci v nervové synapsi. ACh poté aktivuje postsynaptické a presynaptické cholinergní receptory v CNS (27). Takovýto mechanismus účinku mají reversibilní AChEI rivastigmin, donepezil a galantamin, kteří jsou zároveň dostupnými léčivy AD (28).

Pokus o vývoj léčiv AD probíhal ve velkém měřítku několik let. V úvodních studiích probíhalo testování PHY, jež je AChEI. Po podání zdravým jedincům došlo k prokazatelnému zlepšení dlouhodobé paměti a lepšímu vybavování informací (29). Stejného efektu se později dosáhlo při podání PHY pacientům s AD. Tyto úvodní klinické studie se dále zaměřovaly na zlepšení cholinergní aktivity, která je ovlivněna také u nemocí jako schizofrenie nebo deprese (30).

Zásadní molekulou ve vývoji léčiv byl AChEI takrin (THA, tetrahydroaminoakridin). Tento tricyklický derivát akridinu dobře prochází skrze hematoencefalickou bariéru a inhibuje AChE v CNS. Původně byl THA využíván jako intravenózní antiseptikum během druhé světové války. Následně probíhaly farmakologické studie, které se zabývaly jeho uplatněním v léčbě AD (31). Na základě těchto dat byl THA testován na skupině třidvaceti pacientů s AD. Látka byla podávána perorálně a podobně jako PHY měla za následek zlepšení kognitivních funkcí pacientů. Dle výsledků této studie z roku 1986 se THA jevil jako vhodné léčivo pro paliativní léčbu (32). V roce 1993 byl THA prvním schváleným léčivem pro indikaci AD. Po podání jak PHY, tak THA se sice dosáhlo zlepšení kognitivních funkcí (pozornost, koncentrace, paměť), účinek byl však krátkodobý. Navíc byly přítomny vážné vedlejší účinky. Postižen byl zejména gastrointestinální systém, objevovala se únava. Problémem samotného THA, byla jeho jaterní toxicita. Ačkoli se brzy ukázalo, že obě látky nejsou vhodnými léčivy, ve vývoji léčby AD byly velkým milníkem (33).

Samotný THA má vlastnosti AChEI a inhibitoru butyrylcholinesterasy (BChEI), přičemž vykazuje lepší selektivitu vůči butyrylcholinesterase (BChE) (31). Při farmakologickém testování se projevila také jeho schopnost vazát se do alosterického místa metabotropního receptoru (34).

3.1.2.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

Donepezil

Donepezil, jehož chemická struktura je odvozena od piperidinu, byl uveden na trh v roce 1996, jako náhrada nevhodného PHY a THA. Je to selektivní reversibilní AChEI. Využívá se u pacientů s mírnou a rozvinutou formou AD. Toto léčivo je bezpečné a pacienty dobře tolerované, ačkoli se mohou objevit typické nežádoucí účinky v souvislosti s působením na cholinergní systém. Pacienti trpí nejčastěji nauzeou, zvracením, zácpou, průjmem, bolestí hlavy nebo poruchami spánku (35).

Obecně se u pacientů s AD léčba zahajuje AChEI a to v dávkách, které se postupně navyšují. Platí závislost mezi dávkou a účinkem, kde vyšší dávka je většinou účinnější než dávka nižší, ačkoli může být pacientem méně tolerována. Terapie donepezilem se zahajuje úvodní dávkou 5 mg/den a po několika týdnech je navýšena až na 10 mg/den (36). Pacientům bylo také podáváno jednou denně 23 mg léčiva v tabletě s postupným uvolňováním. Rozdíl ve zlepšení stavu pacienta vzhledem k dávce 10 mg/den byl však malý. Pacienti navíc vyšší dávku snášeli hůře, kvůli nežádoucím účinkům (37,38).

Galantamin

Rostlinný alkaloid galantamin se strukturou fenanthrenu je kompetitivní reverzibilní AChEI. Kvůli jeho časově a finančně náročné izolaci z rostlinných drog je v současnosti uměle chemicky syntetizován. Vyznačuje se vysokou selektivitou vůči AChE v porovnání s BChE (poměr AChE k BChE je 54:1). Jeho selektivita je vyšší než u rivastigminu, zároveň však nižší než u donepezilu. Vzhledem k oběma sloučeninám je ale slabším AChEI.

Kromě inhibice AChE je galantamin schopen také alosterické modulace nAChRs. (35,39) Vzhledem k tomu, že při postižení AD ubývají nAChRs v CNS, je tento fakt při léčbě benefitem (27). Galantamin svým alosterickým působením ovlivňuje také další neurotransmiterové systémy (glutamátový, monoaminový, GABA). Tímto se stává využitelným i u dalších onemocnění nervového systému jako schizofrenie, maniodepresivní psychóza nebo při abusu alkoholu (40).

Zahajovací dávka při terapii galantaminem je 8 mg ve dvou denních dávkách, kdy se postupně dávka zvyšuje až na 24 mg/den (37). Vedlejší účinky spojené s terapií nejčastěji souvisí s jeho mechanismem účinku. Nejčastěji se u pacientů objevuje nauzea, zvracení, průjem, anorexie a ztráta hmotnosti. Vzhledem k tomu, že má galantamin také cholinomimetický účinek, zvyšuje sekreci žaludeční kyseliny. Z toho vyplývá riziko ulcerací a gastrointestinálního krvácení. Přesto mají všechny nežádoucí účinky četnost výskytu pod 5% a dostavují se nejčastěji ve stádiu navyšování dávky léčiva (35).

Rivastigmin

Rivastigmin je derivátem karbamátu a vykazuje strukturní podobnost s PHY. Klinické testování tohoto reversibilního inhibitoru bylo zahájeno v roce 1998 a v roce 2000 byl schválen FDA jako léčivo AD. Inhibuje oba typy cholinesteras (AChE, BChE), má výraznou selektivitu vůči mozkové tkáni a dlouhé trvání účinku (41). Tato selektivita je vítaná z toho důvodu, že v placích a neurofibrilárních klubkách se cholinesterasy vyskytují s výrazně zvýšenou aktivitou. AChE navíc tvoří s A β stabilní komplex (42,43). Velkou výhodou rivastigminu v terapii AD je tedy inhibice cholinesteras a zmírnění tvorby a akumulace amyloidu v mozku (35,44).

Podávání léčiva rivastigminu ve formě orálních tablet je doprovázeno nežádoucími účinky. Problematická je také postupná titrace na požadovanou dávku. Její navyšování trvá obvykle několik týdnů. Z hlediska tolerance pacienty, se jako jeví vhodná transdermální aplikace skrze náplasti a také testovaná aplikace intranazální (35). Rivastigmin ve formě náplasti byl první transdermální léčbou AD. (45)

Klinická studie IDEAL testovala účinnost, bezpečnost a toleranci transdermální aplikace oproti orálnímu podání. Studie probíhající půl roku na 1195 pacientech s AD byla dvojitě zaslepená, dvojitě matoucí a placebem kontrolovaná. Ve všech skupinách, kde byl pacientům podáván rivastigmin, se prokázalo zlepšení oproti podávání placebo. Náplastí s dávkou látky 9,5 mg/24 h byl dosažený efekt stejný jako u nejvyšší orálně podávané dávky rivastigminu (45).

3.1.2.2 Antagonista NMDA receptorů

Memantin

Memantin je antagonistou NMDA receptorů. NMDA receptory jsou napěťově řízené heterotetramerní iontové kanály (46). Pro aktivaci těchto receptorů je zapotřebí navázání excitačního neurotransmiteru glutamátu a glycinu, který je modulátorem. Každá z molekul se váže do odlišného vazebného místa, ale pro otevření receptoru je nezbytné, aby na receptoru působily současně. V klidovém stavu je iontový kanál uzavřen hořčnatým kationtem. Při depolarizaci membrány a navázání dvou zmíněných ligandů se blokace hořčíkem ruší a kanál se stává propustným pro ionty vápníku, které proudí do buňky (47,48).

Při AD dlouhodobě probíhá nadměrná stimulace NMDA receptorů. Hladina intracelulárního vápníku je zvýšená a způsobuje v nervových buňkách excitační toxicitu. Takováto stimulace NMDA vede k odumírání neuronů. K odvrácení tohoto děje se proto používá antagonistu memantin (49). Častá je kombinace memantinu s AChEI. Důvodem je mimo jiné propojení glutamátového a cholinergního systému v patologii AD. Cholinergní neurony v mediálním septu a částech bazálního telencefala, které inervují hipokampus a mozkovou kůru jsou propojeny i s neurony glutamátovými. Ty jsou v oblastech mozkové kůry, hipokampu, amygdaly a retikulární formace (47,50).

3.2 Fyziologie

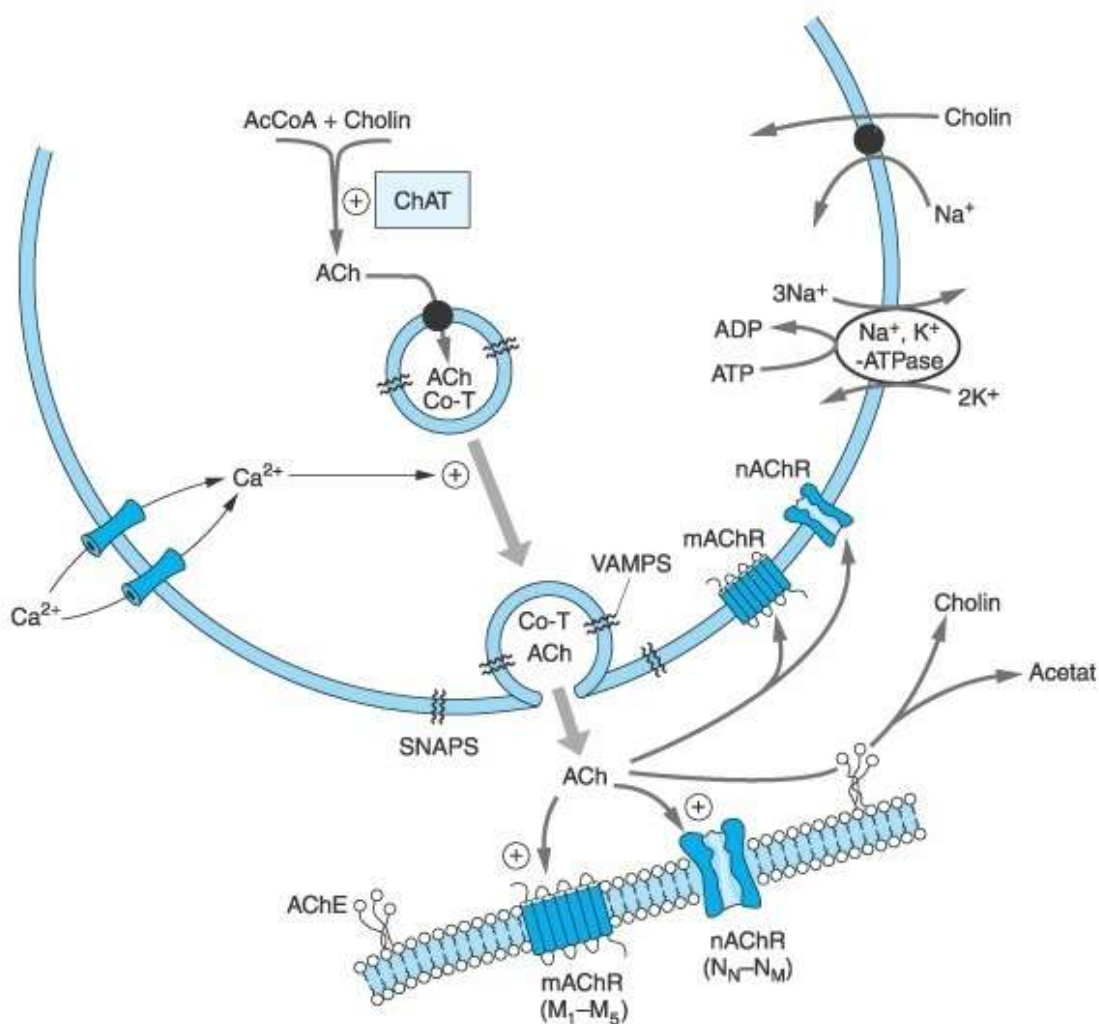
3.2.1 Acetylcholin

Acetylcholin je neuromediátor, který se vyskytuje především v autonomním nervovém systému. Působí na pregangliových synapsích sympatiku i parasympatiku a na postgangliových synapsích parasympatiku. Tyto synapse označujeme jako cholinergní (51). Popis neurotransmise v této synapsi je graficky znázorněn níže (viz Obr. 2).

Syntéza ACh je lokalizována v cytoplazmě nervových zakončení. Cholin je acetylován acetylkoenzymem A (acetyl-CoA) a tato reakce je katalyzovaná enzymem cholinacetyltransferasou (ChAT). Vzniklý ACh je následně díky vezikulárnímu transportéru (vesicle-associated transporter, VAT) skladován ve vezikulách. Tyto malé vezikuly se vyskytují ve velkých množstvích především v terminálních částech neuronů (52).

Cholin v nervových buňkách pochází z několika zdrojů. Je přijímán ze stravy (ryby, ořechy, luštěniny) a v malé míře vzniká syntézou *de novo* v cholinergních buňkách. Určité množství ACh je do cytoplazmy transportováno z extracelulárního prostoru cholinovým kanálem spolu s Na^+ ionty. Acetyl-CoA je syntetizován v mitochondriích, které se hojně vyskytují v nervových zakončeních (51).

Uvolnění mediátoru do synaptické štěrbiny souvisí s otevřením napěťově řízených Ca^{2+} kanálů. Při depolarizaci membrány se kanály otevírají, probíhá influx Ca^{2+} iontů a zvyšuje se jejich cytoplazmatická koncentrace. Dochází k depolarizaci plazmatické membrány, což umožňuje interakci specifických proteinů na povrchu vezikul (vesicle-associated membrane proteins, VAMPs) spolu s proteiny na vnitřní straně plazmatické membrány neuronu (synaptomal nerve-associated proteins, SNAPs) (52). Výsledná exocytóza je důvodem vylití ACh do synaptické štěrbiny. Následně ACh reaguje s cholinergními receptory umístěnými postsynapticky, ale i presynapticky. Působení neuromediátoru ACh na receptory je ukončeno aktivitou AChE, která hydrolyzuje ACh na cholin a acetyl. Takto vzniklý cholin je následně zpětně vychytáván do nervových zakončení (uptake 1) a využit k další syntéze ACh (viz výše) (51).



Obr. 2 Princip cholinergní neurotransmise

Zkratky: AcCoA – acetylkoenzym A, ACh – acetylcholin, ChAT – cholineacetyltransferasa, ACh Co-T – kotransportér acetylcholinu, SNAPS – proteiny neuronální plazmatické membrány, VAMPS – membránové proteiny vezikul, mAChR – muskarinový cholinergní receptor, nAChR – nikotinový cholinergní receptor, M₁–M₅ – podtypy muskarinových receptorů, N_N – neuronální podtyp nikotinového receptoru, N_M – muskulární podtyp nikotinového receptoru, ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát

Modifikováno dle:

<http://pharmacology-notes-free.blogspot.cz/2012/03/acetylcholine.html>

ACh je v mozku člověka široce zastoupeným neuromediátorem. Nervové dráhy z mozkového kmene a bazálního telecefala vysílají projekce do dalších anatomických struktur mozku. Z hlediska AD je podstatnou strukturou *nucleus basalis Meynerti* (oblast bazálního telenfacala), ze kterého vedou cholinergní neurony hlavně do mozkové kůry. Obecně jsou funkce cholinergních drah spojovány především s učením, pamětí a motorikou. U několika neurodegenerativních postižení (demence, Parkinsonova choroba) byla prokázána souvislost s abnormalitami spojenými s cholinergním systémem (48). Jedním z příkladů je úbytek neuronů v *substantia nigra*, striatu a přítomnost Lewyho tělísek u již zmíněné Parkinsonovy choroby (9).

3.2.2 Cholinesterasy

Enzymy cholinesterasy (ChE) jsou serinové hydrolasy, které řadíme do rodiny esterových hydrolas. Jejich funkcí je hydrolytické štěpení ACh na acetylový zbytek a cholin, čímž se ukončuje působení ACh na cholinergních receptorech a přenos nervového vzruchu (53). Existují dva typy ChE vyskytujících se v lidském těle – acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa.

3.2.2.1 Acetylcholinesterasa

AChE (EC 3.1.1.7), též pojmenovávaná jako pravá nebo specifická, je jedním ze dvou typů ChE. Vyskytuje se ve všech částech mozku, v nervových zakončeních sympatiku a parasympatiku, erythrocytech, ale také v játrech a slezině (54). Velice účinně katalyzuje hydrolýzu ACh. Štěpení tohoto neurotransmiteru probíhá rychlostí 10^8 s^{-1} (55).

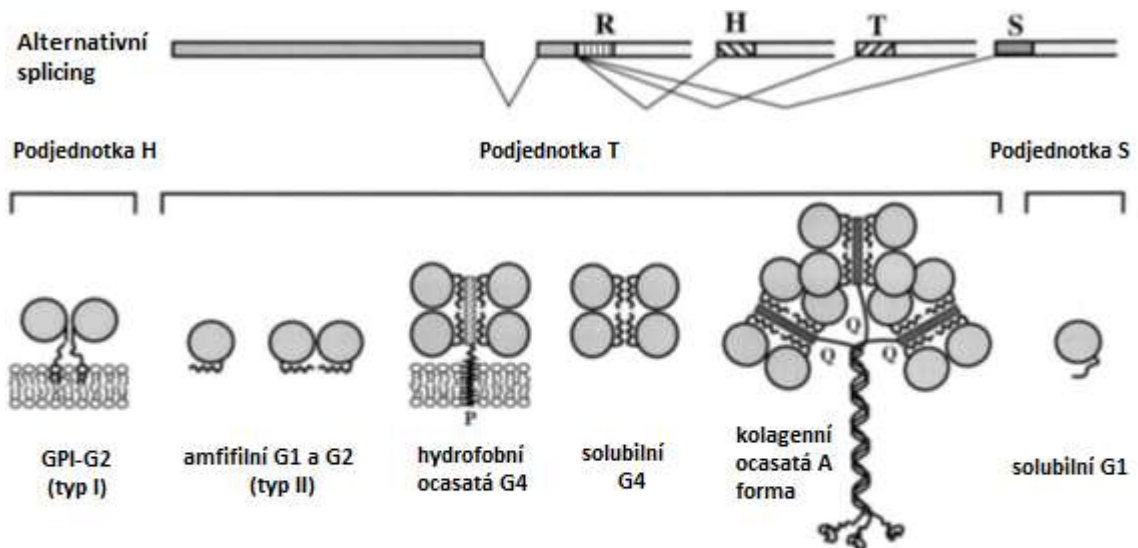
Kvarterní strukturu enzymu tvoří několik molekulárních forem (viz Obr. 3). Posttranslačními úpravami peptidu vznikají řetězce, jež se vzájemně liší sekvencí aminokyselin na svém C-konci. Tyto peptidy tvoří katalytická místa enzymu a tím vzniká několik jeho strukturních podjednotek (56).

AChE_H (hydrophobic – hydrofobní) se vyskytuje v podobě dimerů. Ve svém řetězci totiž obsahuje molekuly cysteinu, mezi kterými vznikají disulfidové vazby. Tyto dimery jsou ukotveny k plazmatické membráně a to pomocí řetězce glykofosfatidylinositolu (GPI). Tato glomerulární forma AChE se označuje také jako GPI-G₂ (54,56). Vyskytuje se na povrchu erytrocytů, lymfocytů, ve svalech a také v elektrickém orgánu rejnoka druhu *Torpedo californica*, díky kterému byla prozkoumána trojrozměrná struktura AChE (54,57).

AChE_T (tailed-ocasatá) je hlavní podjednotkou vyskytující se ve svalech a především mozkové tkáni. Formuje se do amfifilních monomerů (G₁) a dimerů (G₂). Pomocí disulfidických vazeb vznikají tetramery (G₄), které mohou být navázány na hydrofobní nebo kolagenní ocas a být jím ukotveny k buněčné membráně. Specifický kolagen Q obsahuje ve svém řetězci úsek bohatý na molekuly prolinu (56,58).

Tato část kolagenového řetězce zajišťuje formaci a navázání tetramerů z monomerních a dimerních podjednotek. K helikálnímu kolagenovému ocasu jsou zpravidla připojeny tři tetramery. Vzniká asymetrická hetero-oligomerní AChE_T (A₁₂) (56,58). Tetramery nenavázané na žádný řetězec jsou solubilní homo-oligomerní formy enzymu (56).

AChE_s (snake/soluble – hadí, rozpustná) se vyskytuje pouze v jedových žlázách hadů z čeledi *Elapidae* (56).



Obr. 3 Molekulární formy acetylcholinesterasy

Modifikováno dle: Massoulié et al. (1999)

3.2.2.2 Butyrylcholinesterasa

BChE (EC 3.1.1.8) je označovaná také jako pseudocholinesterasa nebo nespecifická cholinesterasa. Nachází se v játrech, hladkém svalstvu, srdci, slinivce břišní a bílé hmotě mozkové. Především se však BChE vyskytuje v plazmě (54). Její funkce není zcela objasněna, i když se předpokládá, že by mohla být zapojena do lipoproteinového metabolismu, neurogeneze nebo mít roli jako scavenger toxických molekul (53).

Co se týká selektivity vůči enzymům, substrát butyrylcholin (BCh) BChE hydrolyzuje čtyřikrát rychleji než ACh (59). Kromě těchto hydrolyzuje také molekuly lokálních anestetik. Jsou jimi například prokain, bupivakain nebo suxamethonium. Hydrolyzuje také samotný kokain, přičemž tato schopnost může být užitečná při intoxikaci kokainem nebo při závislosti na něm (53).

Stejně jako AChE má i BChE několik molekulárních struktur. Peptidické řetězce tohoto enzymu se formují do monomerů, dimerů nebo tetramerů. 95 % BChE v plazmě má strukturu tetrameru, vzniklého spojením dimerů disulfidickou vazbou (58).

Některé neurony v thalamu syntetizují výlučně BChE, ostatní neurony však produkují oba typy esteras. Za normálních podmínek není funkce BChE v hydrolýze ACh signifikantní. Jiná situace však nastala u myši s nulovými hodnotami AChE. V tomto případě hrála BChE v neurotransmisi hlavní roli (60).

Z výše uvedeného vyplývá, že BChE je enzym úzce spjatý s AChE, jehož rolí je regulace neurotransmise při procesu hydrolýzy ACh. Několik studií se zaměřilo na aktivitu BChE v rozvinutém stádiu AD. V nejvíce postižených oblastech mozku (kůra a hipokampus), byla aktivita toho enzymu snížena na 40-90 % (39). Při pokusech na geneticky modifikovaných myších se prokázala přítomnost BChE spolu s výskytem A β v mozku. U těchto zvířat se amyloidní plaky vyskytovaly v mozkové kůře, hipokampu, amygdale, mozečku a olfaktorických strukturách. Podobně v lidském mozku postiženém AD jsou plaky nejčastěji v kůře, hipokampu a amygdale. Nicméně, role BChE při formování amyloidních plaků je stále nejasná. Uvažuje se o možné interakci s proteiny, které tvoří plaky nebo s ionty kovů, které do agregace A β zasahují také (61).

3.2.3 Cholinergní receptory

Cholinergní receptory, jejichž endogenním agonistou je ACh, rozdělujeme na nikotinové receptory a muskarinové receptory. Účinky tohoto agonisty na cholinergní receptor sledoval Reid Hunt již na začátku 20. století. Konkrétně byly tyto dva podtypy pojmenovány Dalem roku 1914. Vedl ho k tomu fakt, že při působení alkaloidu muskarinu z houby *Amanita muscaria* a nikotinu na cholinergních receptorech, pozoroval takové účinky, jež odpovídaly aktivaci parasympatiku (zvýšená salivace, zúžení očních zornic, bronchokonstrikce, hypotenze atd.). Úloha tohoto neurotransmiteru byla o několik let později objasněna Loewim, Dalem a jejich kolegy (48).

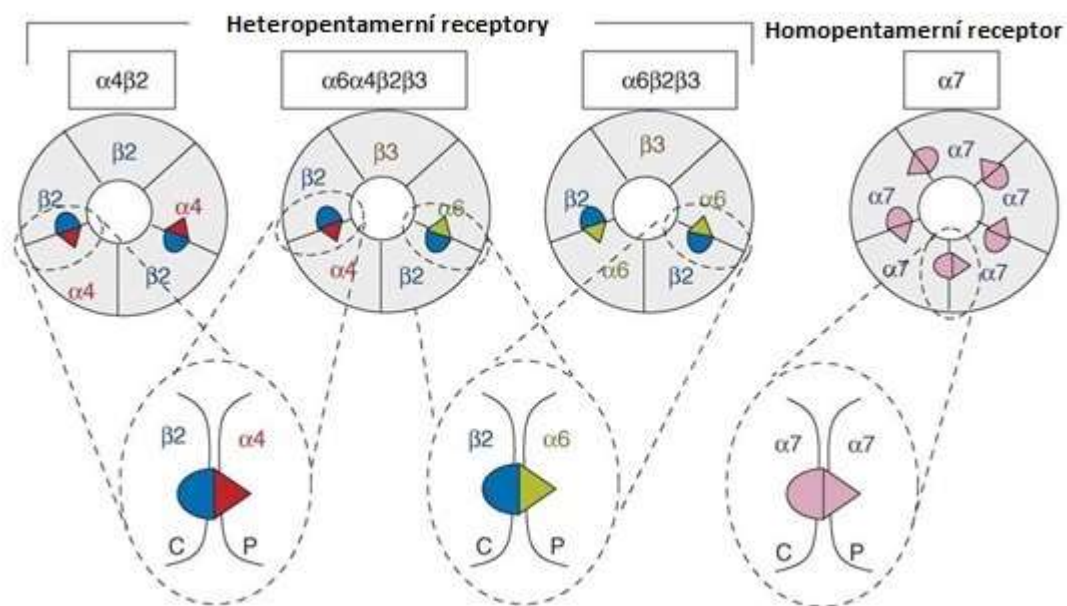
3.2.3.1 Nikotinové receptory

Nikotinové cholinergní receptory se spolu se serotoninovými, gabaerními a glycinovými receptory řadí do rodiny receptorů, jež jsou ligandem řízené iontové kanály (62). Podle lokalizace dělíme nAChRs na muskulární (zprostředkovávají nervový přenos na nervosvalové ploténce) a neuronální nAChRs, které se vyskytují především v CNS, méně na periférii (51).

Receptor tvoří pět kruhovitě uspořádaných transmembránových podjednotek, obklopujících pór v buněčné membráně. Podjednotky receptoru rozlišujeme na α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) a β ($\beta 2$ - $\beta 4$), které v různém zastoupení tvoří jednotlivé podtypy nAChRs (63,64).

Receptor složený z jednoho typu podjednotek označujeme jako homopentamerní. Konkrétním příkladem je podtyp $\alpha 7$ nAChRs, který má pět identických vazebných míst pro ligand ACh (65,66).

Heteropentamerní nAChRs neobsahují identické podjednotky. Jsou to kombinace podtypů α a β a k dispozici mají dvě vazebná místa pro ligand. Vždy na rozhraní α a β podjednotky (65,66). Zástupci heteropentamerních receptorů jsou: $\alpha 4\beta 2$ receptor se dvěma identickými vazebnými místy, $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ se dvěma různými vazebnými místy a podtyp $\alpha 6\beta 2\beta 3$, který má dvě stejná vazebná místa (viz Obr. 4) (67).



Obr. 4 Struktura nikotinových receptorů.

Modifikováno dle: Gotti et al. (2006)

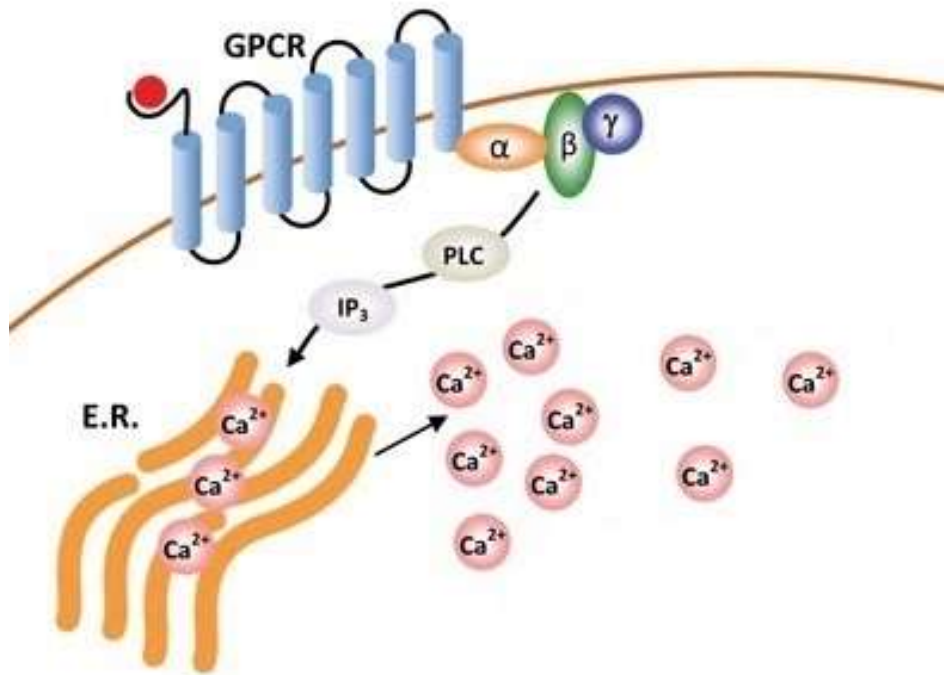
nAChRs se nachází v několika oblastech CNS. *Nucleus basalis* obsahuje především $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$ podtypy, které jsou jak presynaptické, tak postsynaptické. Cholinergní dráhy dále vedou do oblastí mozkové kůry, *bulbus olfactorius* nebo hipokampu. V hipokampu jsou receptory lokalizovány presynapticky a ovlivňují procesy paměti, myšlení a kognitivní funkce (68).

V uvedených oblastech CNS probíhají při AD patofyziologické procesy, které se týkají také úbytku nAChRs. Zejména počet $\alpha 4\beta 2$ v mozkové kůře a hipokampu je u pacientů s AD snížen o 20-50 % (69). $\alpha 4\beta 2$ nAChRs jsou důležité také v souvislosti s A β . Totiž působením nikotinu a dalších agonistů na $\alpha 4\beta 2$ receptory mělo za následek snížení toxicity A β na nervové buňky (70).

V několika preklinických a klinických studiích proběhlo testování agonistů a parciálních agonistů nAChRs, kvůli jejich protektivnímu působení na cholinergní tkáň a zlepšení kognitivních funkcí. Probíhají také syntézy a hledání nových sloučenin, jakožto potenciálních léčiv na onemocnění souvisejících s postižením nAChRs (71–73). Úbytek nAChRs v mozku se totiž netýká pouze AD, ale také dalších onemocnění. Jsou jimi Parkinsonova choroba, LBD, progresivní supranukleární obrna (Steele-Richardson-Olszewski syndrom) nebo Downův syndrom (74).

3.2.3.2 Muskarinové receptory

Muskarinové cholinergní receptory jsou receptory metabotropní, čili spřažené s G-proteinem (G-protein coupled receptor, GPCR). Strukturně se jedná o řetězec, který sedmkrát prochází skrze membránu (proto také označení 7-transmembránové). Rozlišujeme pět jejich podtypů, konkrétně M₁-M₅ (52). Aktivace mAChRs znamená spuštění signalizační kaskády a převedení signálu do podoby, která vyvolá požadovanou buněčnou odpověď. Aktivací podtypů M₁, M₃ a M₅ dochází prostřednictvím G_{q/11} k aktivaci fosfolipasy C (PLC), což vede ke zvýšení obsahu intracelulárního Ca²⁺ (viz Obr. 5). Naopak aktivace M₂ a M₄ vede skrze G_{i/o} k inhibici adenylátcyklasy, poklesu koncentrace cyklického adenosinmonofostátu (cAMP) a koncentrace Ca²⁺ (75).



Obr. 5 Aktivace G-proteinového receptoru cestou fosfolipasy C

Zkratky: GPCR - receptor spřažený s G-proteinem, PLC - fosfolipasa C, IP_3 - inositol trifosfát, ER - endoplazmatické retikulum; α , β , γ - podjednotky receptoru

Modifikováno dle:

<http://www.enzolifesciences.com/ENZ-51016/fluoforte-calcium-assay-kit/>

V CNS se mAChRs hojně vyskytují a hrají roli v procesech jako je učení, paměť, kognitivní nebo motorické funkce (76,77).

V největší míře je v CNS zastoupen M₁ podtyp receptoru (50-60 % mAChRs). Vyskytuje se převážně v mozkové kůře, hipokampu a striatu (76,78). Aktivita tohoto receptoru souvisí s kognitivními funkcemi, pozorností a smysly (79). Mimo CNS můžeme tento podtyp receptorů nalézt také ve žlázách slzných, slinných nebo žaludečních. Parietálních buněk žaludku se týká antagonist M₁ mAChRs, pirenzepin. Při jeho použití se omezila kyselá žaludeční sekrece, což mělo pozitivní vliv na vznik a léčbu vředové choroby žaludku. Jako další látku, která vykazuje selektivitu k tomuto receptoru, můžeme uvést oxotremorin (oxo-M), jež má agonistické působení (48). Z hlediska patofyziologie AD je M₁ podtyp receptorů klíčový v oblasti farmakoterapie tohoto onemocnění. Spojitost M₁ mAChRs s AD bude podrobněji popsána dále.

M₂ mAChRs se v CNS nacházejí ve striatu, bazálním telencefalu, tegmentu Varolova mostu a v motorických jádrech hlavových nervů (76). V CNS jsou lokalizovány presynapticky, zatímco na periférii se řadí mezi heteroreceptory a vyskytují se zejména v srdci. Zde ovlivňují především převodní systém síní (negativně chronotropní a dromotropní účinek) a myokard síní (negativně bathotropní účinek). Negativně inotropní účinek na myokard komor je jen málo významný (51). Jako autoreceptory v CNS M₂ mAChRs inhibují uvolňování ACh do synapse. Použití vhodného antagonisty by tedy mohlo vést ke zvýšení koncentrace ACh v synapsi, což je, vzhledem k problematice AD, požadovaný efekt (80). Daná sloučenina by však musela být vysoce selektivní vůči M₂ mAChRs, kvůli vyvarování se nežádoucím účinkům. Rizikem plynoucím z blokace samotného M₂ mAChRs mimo CNS je tachykardie a ovlivnění krevního tlaku. Při interakci antagonisty s M₁ mAChRs by došlo k blokaci cholinergní transmise a interakce s M₃ receptory by vedla ke gastrointestinálním obtížím. Pokud si uvědomíme, že při AD klesá v CNS hladina ACh a počet M₁ mAChRs, nabízí se otázka, zda by tato skutečnost neměla vliv na účinnost antagonistů M₂ mAChRs (12,80).

M₃ podtyp mAChRs se v CNS vyskytuje převážně v mozkové kůře a hipokampu. Mimo CNS se účastní inervace hladkého svalstva, najdeme jej v srdci a ovlivňuje sekreci bronchiálních, žaludečních nebo slinných žláz. Stejně jako M₁ podtyp receptorů, probíhá jeho aktivace cestou aktivované PLC. Aktivace těchto receptorů má za následek kontrakci hladkého svalstva nebo zvýšenou salivaci. Při použití nedostatečně selektivních agonistů mAChRs jsou tyto projevy aktivace častými nežádoucími účinky podaných látek (48,51). Úmyslně se M₃ mAChRs cílí při terapii chronické obstrukční plicní nemoci. Jako léčiva se používají antagonisté těchto receptorů (například tiotropium), kteří zabraňují konstrikci hladké svaloviny bronchů (81). Prostřednictvím těchto receptorů se řeší také problémy s inkontinencí, kdy při použití antagonisty darifenacinu dochází k uvolnění svaloviny močového měchýře (48).

M₄ mAChRs jsou autoreceptory a vyskytují se zejména v CNS (na periférii minimálně). Podobně jako M₁ mAChRs jsou lokalizovány především v mozkové kůře, hipokampu a částečně ve striatu. V malých množstvích se vyskytují v thalamu, mozečku a mozkovém kmeni (82). Spolu s dopaminergními receptory v CNS se M₄ mAChRs podílejí na regulaci kognitivních a motorických funkcí. Vliv M₄ mAChRs na uvolňování dopaminu v CNS se prokázal v pokusu na myších, které postrádaly tento podtyp receptorů. Absence M₄ mAChRs v CNS měla za následek hyperaktivitu dopaminového systému (83). Tato disbalance má negativní vliv na psychické i motorické funkce, čehož jsou důkazem onemocnění jako schizofrenie nebo Parkinsonova choroba (82). Látkou s prokazatelným antipsychotickým působením je xanomelin – selektivní agonista M₁ a M₄ mAChRs. Tato látka nejenže pozitivně ovlivňuje psychický stav u schizofrenie, ale zlepšuje také poruchy chování spojené s onemocněním AD (84). Souvislost xanomelinu s AD byla zohledněna i při syntéze potenciálních léčiv této choroby. Jako příklad lze uvést spojení molekuly xanomelinu s THA, jakožto AChEI, a vytvoření struktury s předpokládaným duálním účinkem (34).

M₅ mAChRs se v CNS vyskytují nejvíce v neuronech oblasti *substantia nigra* a *area tegmentalis ventralis*. Stejně jako M₄ také M₅ mAChRs ovlivňují dopaminergní systém – konkrétně uvolňování dopaminu. Z toho důvodu jsou také tyto receptory farmakologickým cílem při léčbě nemocí CNS jako Parkinsonova choroba nebo schizofrenie (51).

Tyto oblasti CNS jsou spojeny také s problematikou závislosti na návykových látkách. Vypnutí genu pro M₅ mAChRs u myší znamenalo, že byla zvířata méně náchylná k vytvoření závislosti na morfinu a kokainu (85). Vhodnými léčivy by v tomto případě mohli být antagonisté selektivní k tomuto podtypu mAChRs (86).

Jak již bylo zmíněno, pro AD je klíčový podtyp M₁ mAChRs a ve vývoji nových léčiv je mu věnována velká pozornost. Vědci stále syntetizují a testují nové molekuly, které cílí různé struktury související s problematikou onemocnění. Potenciální léčiva jsou zaměřena na ovlivnění neurotransmise, cholinergního systému, ukládání a vznik A β a tau proteinu, redukci oxidativního stresu, zánět, mitochondriální a další složky nervového systému (87). Od roku 2003 se však nenašla žádná sloučenina, která by vykazovala vlastnosti vhodného léčiva na AD (39).

3.2.4 Agonisté M₁ muskarinových receptorů

„Látky, které se váží na fyziologické receptory a jsou schopny vyvolat odpověď podobnou odpovědi endogenního ligandu, označujeme jako agonisty“ (51).

Jak již bylo uvedeno, muskarinových receptorů existuje několik podtypů. Neuromediátor ACh je endogenním agonistou mAChRs. Orthosterické vazebné místo receptoru je však tvořeno specifickým pořadím aminokyselin, u všech podtypů velmi podobným. Právě toto je jeden z problémů při syntéze nových agonistů. Je totiž obtížné vytvořit sloučeninu s takovou strukturou, která by zajišťovala specifitu k jednomu konkrétnímu podtypu mAChRs (75). Výsledkem je často vazba sloučeniny i na další podtypy receptorů. Z toho vyplývají nežádoucí účinky, které se nejčastěji týkají gastrointestinálního traktu. Orthosterický agonista bez dostatečné selektivity vůči M₁ mAChRs interaguje také s M₂ a M₃ mAChRs mimo CNS. Přítomné jsou nežádoucí účinky spojené s aktivací těchto receptorů - pocení, bradykardie, zvýšená salivace, gastrointestinální problémy (88). Problémy s těmito nežádoucími účinky doprovázely také klinické testování agonistů M₁ mAChRs, kterými jsou látky talsaclidin, AF-102B a AF-267B (89).

V současné době dochází k propojování cholinergní a amyloidní teorie. Jedním z pojitků jsou právě M₁ mAChRs, prostřednictvím kterých jsou patofyziologické děje při onemocnění navzájem propojeny. Díky působení enzymu β -sekretasy vzniká z APP nesolubilní A β – hlavní složka neuronálních plaků. Aktivované M₁ mAChRs interagují s β -sekretasou, čímž dochází k její proteozomální degradaci (90,91). Tím se omezuje tvorba A β a jeho patologické ukládání v mozku. Skrze M₁ mAChRs lze tedy ovlivnit AD nejen symptomaticky, ale může se mírnit také progresse tohoto onemocnění (90). Takovýto efekt se prokázal u zmíněných klinicky testovaných agonistů. Tyto látky snižovaly koncentraci A β v CSF (89).

3.2.5 Alosterické modulátory

G-proteinové receptory mají kromě orthosterického vazebného místa také místa alosterická, která jsou v receptoru topograficky odlišná (92). Je známo, že oproti orthosterickému je alosterické místo svým pořadím aminokyselin méně specifické (93).

Z toho důvodu se pozornost zaměřuje na ligandy, které by po navázání na alosterické místo mohly, díky svým vlastnostem, ovlivňovat buněčnou odpověď. Takovéto látky označujeme jako alosterické modulátory (94). Po obsazení alosterického místa ligandem je ovlivněna struktura místa orthosterického. Takovýto modulátor může aktivitu orthosterického ligandu potencovat např. brucin (pozitivní alosterický modulátor, PAM), inhibovat např. látka SIB-1757 (negativní alosterický modulátor, NAM) nebo vůbec neměnit (93,94). Alosterický ligand po navázání na receptor může také sám o sobě vykazovat agonistické nebo antagonistické vlastnosti a to bez obsazení orthosterického místa ligandem. Alosterickým agonistou je například sloučenina AC 42 (95), alosterickým antagonistou látka fenobam (93). Z uvedeného vyplývá, že molekula alosterického ligandu může být agonistou a PAM mAChRs zároveň.

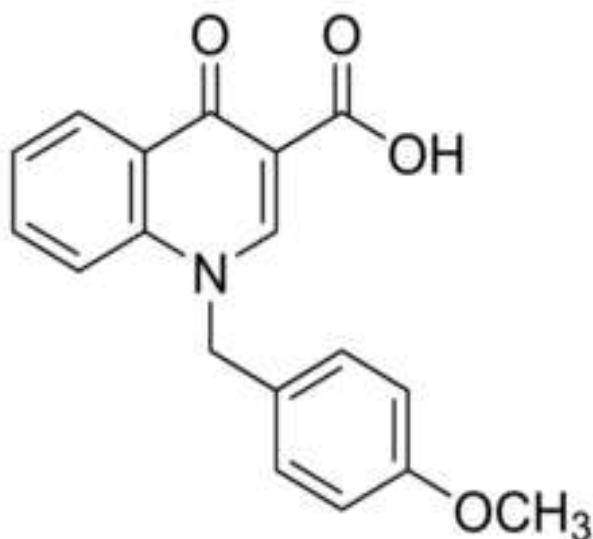
3.2.5.1 Benzylchinolon karboxylová kyselina

Sloučenina BQCA (1,4-dihydro-1-[(4-methoxyfenyl)methyl]-4-oxo-3-chinolin karboxylová kyselina) (viz Obr. 6) je díky svým vlastnostem zajímavou sloučeninou pro další vývoj v oblasti chemické syntézy. Poprvé sloučeninu syntetizoval Ma spolu s kolegy v roce 2009 (96). Nové deriváty jsou syntetizovány a testovány jako potenciální léčiva AD. BQCA je totiž alosterickým modulátorem mAChRs a vykazuje vysokou selektivitu vůči podtypu M₁. Po obsazení alosterického místa receptoru má BQCA vlastnosti jednak alosterického agonisty a zároveň PAM. Do dávky 100 μM sloučenina neinteraguje s jiným podtypy mAChRs (96).

Při použití BQCA se mnohonásobně snižuje hodnota koncentrace ACh potřebná pro aktivaci M₁ mAChRs. Chování této sloučeniny bylo testováno na buněčné linii stabilně exprimující rekombinantní M₁ mAChRs (91).

ACh sám o sobě aktivoval receptor s hodnotou $EC_{50} = 2,42 \pm 0,34$ nM. S rostoucí koncentrací přidávaného BQCA ($0,3-3$ μ M) klesala hodnota EC_{50} ($0,76 \pm 0,56 - 0,12 \pm 0,03$ nM) (91). BQCA jako PAM prokazuje kooperativitu kromě ACh také s dalším orthosterickým agonistou – karbacholem (97).

BQCA prostřednictvím M_1 mAChRs v CNS pozitivně ovlivňuje mozkové funkce a postiženou paměť. Její působení podporuje non-amyloidní štěpení APP a to zřejmě díky aktivaci α -sekretasy a současné inhibici γ -sekretasy (12,91). Při *in vivo* použití anticholinergika skopolaminu na myších nastává indukované negativní ovlivnění kognitivních funkcí. Po aplikaci dávky 15 mg/kg nebo 20 mg/kg BQCA u myši nebyl přítomný původně indukovaný skopolaminový deficit (96,97).



Obr 6. Struktura molekuly benzylocholon karboxylové kyseliny

Převzato z:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sml0497?lang=en®ion=CZ>

4 CÍL PRÁCE

Látky testované v této práci byly syntetizovány na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity obrany v Brně. Při vývoji látek byla pozornost zaměřena na ovlivnění cholinergního systému a to dvojím způsobem. Snahou bylo snížit odbourávání neurotransmiteru ACh a zároveň podpořit jeho působení na M₁ mAChRs. Výsledná struktura tedy vždy obsahovala molekulu AChEI spojenou s molekulou PAM M₁ mAChRs.

Jako AChEI byly zvoleny tři látky - THA, 6-chlortakrin (6-Cl THA) a 7-methoxytakrin (7-MEOTA). Molekula každého inhibitoru byla spojena pomocí různě dlouhého uhlíkatého řetězce s molekulou BQCA, která zaujímala roli PAM M₁ mAChRs. Takto vzniklo dvacet jedna derivátů BQCA, u kterých se testovala schopnost inhibovat AChE a BChE a jejich působení na M₁ mAChRs. Inhibiční vlastnosti látek byly měřeny spektrofotometricky metodou dle Ellmana. Chování látek vůči M₁ mAChRs bylo testováno na buněčné linii stabilně exprimující tento podtyp receptorů. Měření probíhalo na principu fluorimetrie za použití vápníkového testu.

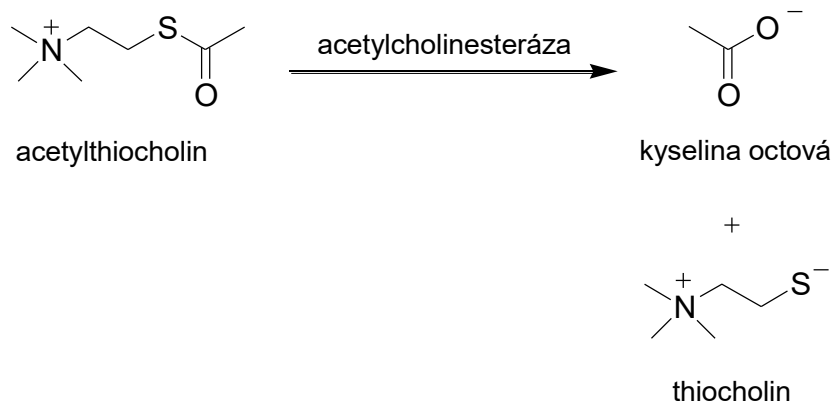
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Stanovení IC_{50} testovaných látek

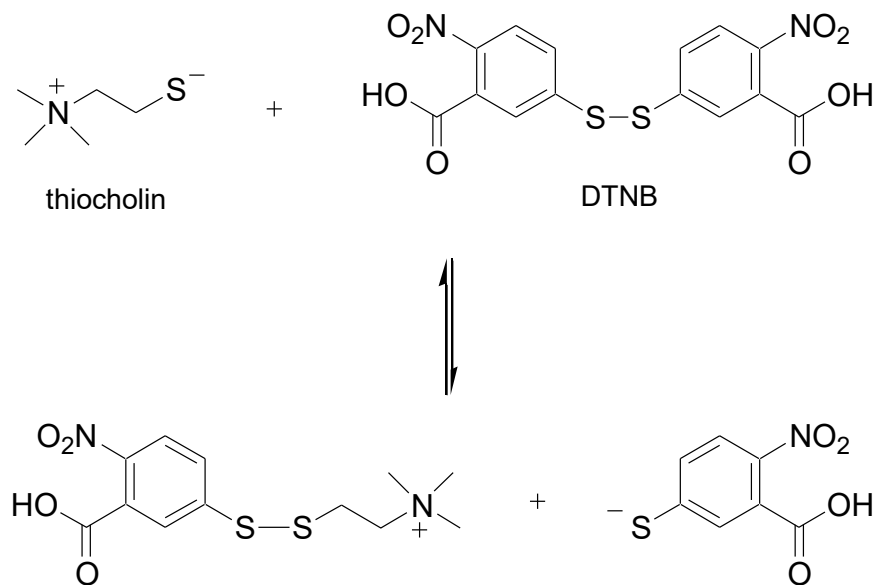
5.1.1 Princip metody

IC_{50} je taková koncentrace inhibitoru, která sníží aktivitu enzymu na polovinu. Pro stanovení hodnot IC_{50} byla využita modifikovaná metoda dle Ellmana (1961). Jedná se o kolorimetrickou metodu se spektrofotometrickou detekcí, jež je aplikovatelná při stanovení aktivity cholinesteras. V pokusu je použit substrát acetylthiocholinjodid (ATChJ) nebo butyrylthiocholinjodid (BTChJ), který je hydrolyzován příslušným enzymem. Vzniká kyselina octová a thiocholinjodid, který po reakci s 5,5'-dithiobis-(2-nitro) benzoovou kyselinou (DTNB) uvolňuje anion. Tento anion je chromoforem, který je spektrofotometricky detekován. Výhodou této metody je její rychlost a relativně snadné provedení (98,99). Ellmanovu metodu popisují níže uvedené chemické reakce (viz Obr. 7).

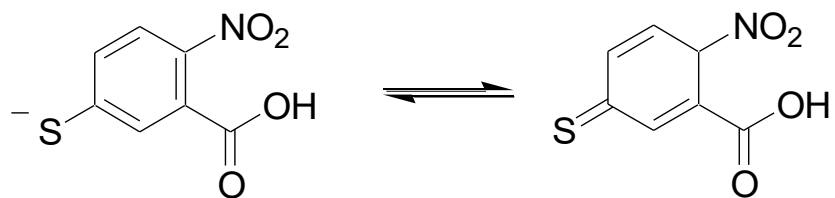
- Rozštěpení acetylthiocholinu acetylcholinesterasou



- Rozštěpení S-S můstku a vazba thiocholinu na DTNB



- Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5-merkapto-2-nitrobenzoové



Obr 7. Chemické reakce Ellmanovy metody

5.1.2 Chemikálie a příprava základních roztoků

a) Fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, ČR)

11,49 g Na_2HPO_4 ($M_r = 141,96 \text{ g/mol}$) bylo rozpuštěno v 810 ml destilované vody.

3,4 g KH_2PO_4 ($M_r = 136,08 \text{ g/mol}$) bylo rozpuštěno v 250 ml destilované vody.

K roztoku Na_2HPO_4 byl postupně přidáván roztok KH_2PO_4 do té doby, než hodnota pH dosáhla 7,4.

b) 5,5'-dithiobis-(2-nitro) benzoová kyselina (DTNB) (Sigma-Aldrich, ČR)

0,05 g DTNB bylo rozpuštěno v 50 ml fosfátového pufru

c) Acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, ČR)

0,29 g ATChJ bylo rozpuštěno v 10 ml vody. 1 ml výsledného roztoku byl doplněn destilovanou vodou do objemu 10 ml.

d) Butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, ČR)

0,32 g BTChJ bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody. 1 ml výsledného roztoku byl doplněn destilovanou vodou do objemu 10 ml.

e) Fosfátový pufr s albuminem (Sigma-Aldrich, ČR)

K fosfátovému pufru byl přidán lidský albumin v koncentraci 1 mg/ml.

f) Butyrylcholinesterasa (Sigma-Aldrich, ČR)

Enzym se připravil za stálého míchání na drceném ledu. Enzym byl po vyjmutí z mrazáku ponechán temperovat se na pokojovou teplotu. Po otevření byla odebrána část lyofilizovaného enzymu, ke které bylo přidáno 100 μl fosfátového pufru s albuminem. Každých pět minut bylo přidáno 100 μl pufru a roztok byl ředěn do té doby, než dosáhla výsledná aktivita enzymu rozmezí hodnot 0,25-0,35.

g) Erytrocytární acetylcholinesterasa (eryAChE)

Za stálého míchání na drceném ledu byla ředěna eryAChE fosfátovým pufrům na požadovanou aktivitu v rozmezí hodnot 0,25-0,35. EryAChE byla získána z odebraných vzorků krve zaměstnanců KTVF.

h) Testované sloučeniny 1a-1h, 2a-2h, 3a-3h

Roztoky testovaných látek byly připravovány v den měření následujícím způsobem:

K dispozici byly známy tyto hodnoty: koncentrace (c) zásobního roztoku 10^{-2} M, požadovaný objem (V) 2 ml a molární hmotnost (Mr) testované látky. Potřebná navážka byla vypočtena dle vzorce $m = c \cdot Mr \cdot V$. Tato hmotnost byla rozpuštěna v příslušném objemu dimethylsulfoxidu (DMSO) z důvodu špatné rozpustnosti látek. 100 μ l 10^{-2} M zásobního roztoku bylo přidáno do 900 μ l DMSO, čímž se získala koncentrace o jeden řád nižší tedy 10^{-3} M. Dále ředění pokračovalo s tím rozdílem, že koncentrace 10^{-4} M již byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru. Koncentrační řady všech testovaných látek byly 10^{-4} , $10^{-4,5}$, 10^{-5} , $10^{-5,25}$, $10^{-5,5}$, $10^{-5,75}$, 10^{-6} , $10^{-6,25}$, $10^{-6,5}$, $10^{-6,75}$, 10^{-7} a 10^{-8} M. V případě potřeby byly naředěny další mezikoncentrace.

5.1.3 Postup stanovení IC₅₀ inhibitorů

Ke spektrofotometrickému stanovení aktivity enzymu byl použit přístroj Synergy Multi-Mode Reader (Biotek, USA). Kolorimetrická reakce byla detekována při vlnové délce 412 nm a 37 °C. Pokus se měřil na 96jamkové mikrotitrační destičce (Biotech, ČR).

V úvodu pokusu bylo třeba stanovit aktivitu enzymu AChE nebo BChE (dále jen „enzym“). Do dvou kontrolních jamek byly pipetovány následující roztoky v těchto objemech a pořadí: 10 µl enzymu, 50 µl fosfátového pufru, 20 µl DTNB a 20 µl substrátu ATChJ nebo BTChJ (dále jen „substrát“). Po promíchání obsahu jamek třepačkou (IKA, Německo) byla destička vložena do spektrofotometru a bylo spuštěno měření.

Pokud aktivita enzymu dosahovala přijatelných hodnot, bylo možné jej použít k měření s testovanými látkami. V opačném případě se hodnota aktivity upravila jeho ředěním.

Při testování konkrétní látky bylo do jamky pipetováno 10 µl enzymu, 40 µl fosfátového pufru, 20 µl DTNB a 10 µl inhibitoru. Po protřepání se destička v přístroji 5 minut inkubovala při 37 °C. Během této doby probíhala předpokládaná inhibice enzymu testovanou látkou. Po uplynutí potřebné doby bylo přidáno 20 µl substrátu odpovídajícího použitému enzymu. Tímto krokem byla zahájena barevná reakce, kde byla přímá úměra mezi intenzitou zbarvení a aktivitou inhibovaného enzymu.

Koncentrační řada každé testované látky byla měřena v triplicátu. Při měření byl první řádek destičky vždy kontrolní, tzn. bez testované sloučeniny. Hodnoty aktivity odpovídaly aktivitě samotného enzymu. Jejich aritmetický průměr byl vyhodnocen jako 100 % odpovědi, ze které se procentuálně vyjadřovala inhibiční schopnost testovaných látek.

Naměřené hodnoty byly skrze program Microsoft Excel importovány do statistického programu GraphPad Prism 5 (San Diego, USA). Pomocí tohoto programu byly vytvořeny křivky inhibice a stanoveny hodnoty IC₅₀ jednotlivých látek.

5.2 Fluorimetrické měření modulace muskarinových receptorů

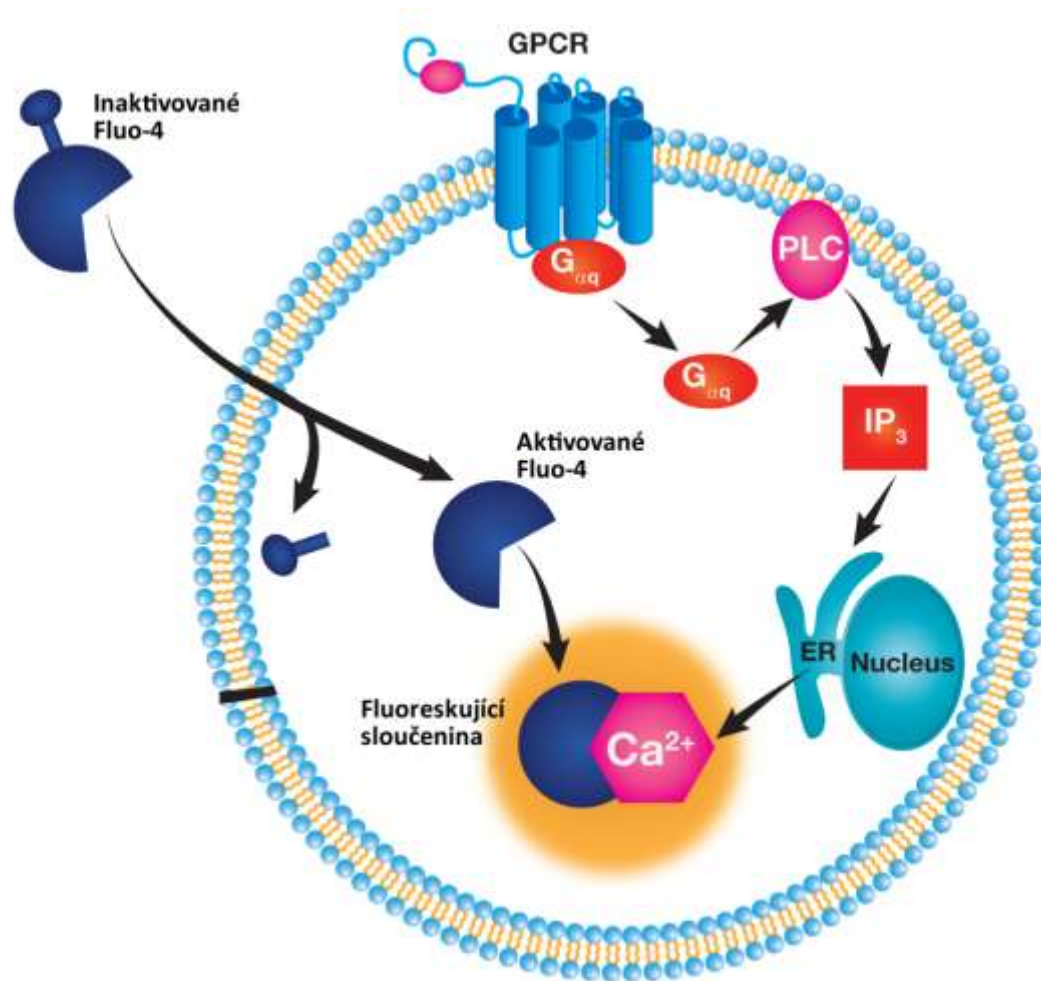
5.2.1 Princip metody

Testování syntetizovaných látek, jakožto PAM M_1 mAChRs, probíhalo s využitím vápníkového testu (viz Obr. 8).

Aktivací M_1 receptoru spřaženého s G proteinem dochází ke kaskádě dějů, na jejímž konci aktivovaný IP3 interaguje s receptory endoplazmatického retikula (ER) a dochází k uvolnění intracelulárních vápenatých iontů. Na takto uvolněné ionty vápníku se poté navazuje námi aplikovaný fluorescenční indikátor a dochází k emisi záření. Následně je záření spektrofluorometricky detekováno.

Při testování jednotlivých látek byl využit orthosterický agonista M_1 mAChRs oxo-M. Testované sloučeniny zastupovaly roli PAM M_1 mAChRs a vyhodnocovala se jejich schopnost pozitivně modulovat odpověď orthosterického ligandu po jejich navázání do alosterického místa receptoru.

Pro fluorescenční značení intracelulárních vápenatých iontů byl využit Fluo-4NW Calcium Assay Kit. Fluorescenční barvivo Fluo-4 NW se váže na vápenaté ionty a využívá se pro testování agonistů a antagonistů GPCR. NW v názvu znamená, že během metodiky je možné vypustit krok promývání. Tímto je celý proces zjednodušen. Fluo-4 NW oproti svému předchůdci Fluo-3 značí ionty více jasně a má větší emisní intenzitu (100).



Obr. 8 Princip vápníkového testu

Zkratky: GPCR - receptor spřažený s G-proteinem, PLC - fosfolipasa C, IP $_3$ - inositol trifosfát, ER – endoplazmatické retikulum

Modifikováno dle:

<http://www.enzolifesciences.com/ENZ-51016/fluoforte-calcium-assay-kit/>

5.2.2 Chemikálie a příprava základních roztoků

a) Buněčná linie CHO-M₁ (ATCC, USA)

b) F-12 médium (Nutrient Mixture F-12 Ham, Sigma-Aldrich, ČR)

c) G 418 - Geneticin (Sigma-Aldrich, ČR)

Doplněno do F-12 média na výslednou koncentraci 1%.

d) Fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, ČR)

Doplněno do F-12 média na výslednou koncentraci 10%.

e) 0,25% Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, ČR)

f) Fosfátový pufr (Dulbeco's Phosphate Buffered Saline, PBS, Sigma-Aldrich, ČR)

g) Fluo-4 NW Calcium Assay Kit (Molecular Probes, Oregon, USA)

Chemikálie byly připraveny dle pokynů výrobce.

h) Oxotremorin (Sigma-Aldrich, ČR)

Navážené množství oxo-M bylo rozpuštěno v destilované vodě. Výsledná koncentrace roztoku 1 $\mu\text{mol/l}$ odpovídá hodnotě EC₈₀.

ch) Testované sloučeniny 1a-1h, 2a-2h, 3a-3h

Roztoky testovaných látek byly připravovány v den měření následujícím způsobem:

K dispozici byly známy tyto hodnoty: koncentrace (c) zásobního roztoku 10^{-2} M, požadovaný objem (V) 2 ml a molární hmotnost (Mr) testované látky. Potřebná navážka byla vypočtena dle vzorce $m = c \cdot Mr \cdot V$. Tato hmotnost byla rozpuštěna v příslušném objemu DMSO, z důvodu špatné rozpustnosti látek. 100 μl 10^{-2} M roztoku bylo přidáno do 900 μl DMSO, čímž se získala koncentrace o jeden řád vyšší, tedy 10^{-3} M. Dále ředění pokračovalo s tím rozdílem, že koncentrace 10^{-4} M již byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru. Koncentrační řady všech testovaných látek byly 10^{-4} , $10^{-4,5}$, 10^{-5} , $10^{-5,5}$, 10^{-6} a 10^{-7} M. V případě potřeby byly naředěny další mezikoncentrace.

5.2.3 Postup stanovení agonistické aktivity

Pro tento pokus byla použita buněčná linie z ovariálních buněk křečka čínského, stabilně exprimující rekombinantní lidské mAChRs podtypu M₁ (CHO-M₁). Buňky byly kultivovány v upraveném F-12 médiu při 37 °C v 5% atmosféře CO₂.

Před každým měřením bylo třeba buňky nasadit do 96jamkové mikrotitrační destičky pro měření fluorescence, která brání průniku světla (Biotech, ČR).

Z kultivační láhve s buněčnou linií bylo nejprve odsáto kultivační médium a poté přidáno přibližně 5 ml fosfátového pufru. Po jemném promytí dna nádoby s adherovanými buňkami se pufr z láhve odsál. Následně byl přidán 1 ml roztoku trypsinu. Láhev byla vložena do inkubátoru s teplotou 37 °C a atmosférou 5% CO₂ na dobu 5 minut. Při inkubaci došlo k uvolnění buněk ze dna láhve do trypsinu. Během inkubace byla připravena zkumavka se 1,8 ml živného média. Po uplynutí 5 minut bylo do láhve přidáno 5 ml živného média a následně bylo vše důkladně promícháno i s trypsinem tak, aby se buňky oddělily ode dna. Poté bylo z láhve odebráno 0,2 ml média s trypsinem a s uvolněnými buňkami. Toto množství bylo přidáno do zkumavky se 1,8 ml média a řádně promícháno. Z této zkumavky bylo odebráno 10 µl a přeneseno do Bürkerovy počítací komůrky.

Požadovaný počet buněk na jednu jamku byl 70 000 buněk v médiu o objemu 100 µl. Vždy byly připravovány dvě destičky s napipetovanými šesti sloupci. Takto připravené destičky byly přes noc inkubovány opět za podmínek 37 °C/5% CO₂. V následující den pokusu bylo odsáno živné médium a přidáno 100 µl Fluo-4 NW do každé jamky. Destička se poté inkubovala 30 minut při podmínkách 37 °C/5% CO₂ a 30 minut při laboratorní teplotě.

K měření agonistické aktivity byl použit přístroj Synergy HTX Multi-Mode Reader (Biotek, USA). Fluorescence značených vápenatých iontů byla detekována při excitační vlnové délce 482/20 nm, emisní vlnové délce 528/20 nm a laboratorní teplotě.

Každá jednotlivá koncentrace dané látky o objemu 10 µl byla pipetována na destičku tak, aby při spuštění měření uběhla 10minutová inkubace sloučeniny v jamce. Každá koncentrační řada byla měřena v triplicátu.

Automatickým injekčním mechanismem bylo poté do každé jamky aplikováno 10 μ l oxo-M v koncentraci odpovídající hodnotě EC_{80} (EC_{20}). Do prvního a posledního řádku destičky byl aplikován pouze oxo-M. Tyto hodnoty byly kontrolní a jejich aritmetický průměr byl považován za 100% odpověď, čímž se zajistila minimalizace chyb během měření.

Hodnoty emitované fluorescence byly procentuálně vyjádřeny v programu Microsoft Excel a následně vyhodnoceny ve statistickém programu GraphPad Prism 5 (San Diego, USA).

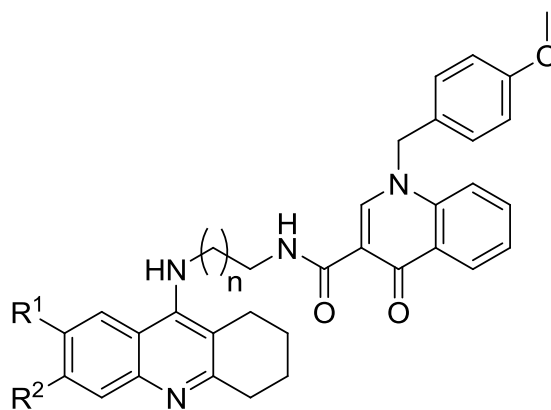
6 VÝSLEDKY

V této práci bylo testováno celkem dvacet jedna sloučenin, které můžeme dle struktury rozdělit do tří skupin o sedmi látkách. Pro všechny sloučeniny je společné spojení molekuly AChEI s molekulou BQCA, jakožto PAM M₁ mAChRs. Tyto dvě molekuly jsou spojeny uhlíkatým řetězcem o délce dvou až osmi uhlíků (viz Obr. 9).

První skupina zahrnuje sloučeniny 1a-1g. U těchto látek se jedná o spojení molekuly 7-MEOTA jako AChEI a molekuly BQCA. Sloučeniny se mezi sebou liší délkou spojovacího řetězce.

Druhou skupinu tvoří sloučeniny 2a-2g. Molekulou AChEI je v tomto případě THA, spojený s molekulou BQCA. Mezi sloučeninami je rozdíl v délce spojovacího řetězce.

Třetí skupina obsahuje sloučeniny 3a-3g. Zde je v roli AChEI molekula 6-Cl THA (6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amin) spojená s molekulou BQCA. Jako u předchozích skupin se sloučeniny mezi sebou liší počtem uhlíků ve spojovacím řetězci.



- | | | |
|--|---|---|
| 1a: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 2 | 2a: R ¹ , R ² = H; n = 2 | 3a: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 2 |
| 1b: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 3 | 2b: R ¹ , R ² = H; n = 3 | 3b: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 3 |
| 1c: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 4 | 2c: R ¹ , R ² = H; n = 4 | 3c: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 4 |
| 1d: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 5 | 2d: R ¹ , R ² = H; n = 5 | 3d: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 5 |
| 1e: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 6 | 2e: R ¹ , R ² = H; n = 6 | 3e: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 6 |
| 1f: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 7 | 2f: R ¹ , R ² = H; n = 7 | 3f: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 7 |
| 1g: R ¹ = OCH ₃ ; R ² = H; n = 8 | 2g: R ¹ , R ² = H; n = 8 | 3g: R ¹ = H; R ² = Cl; n = 8 |

Obr. 9 Obecná struktura testovaných sloučenin

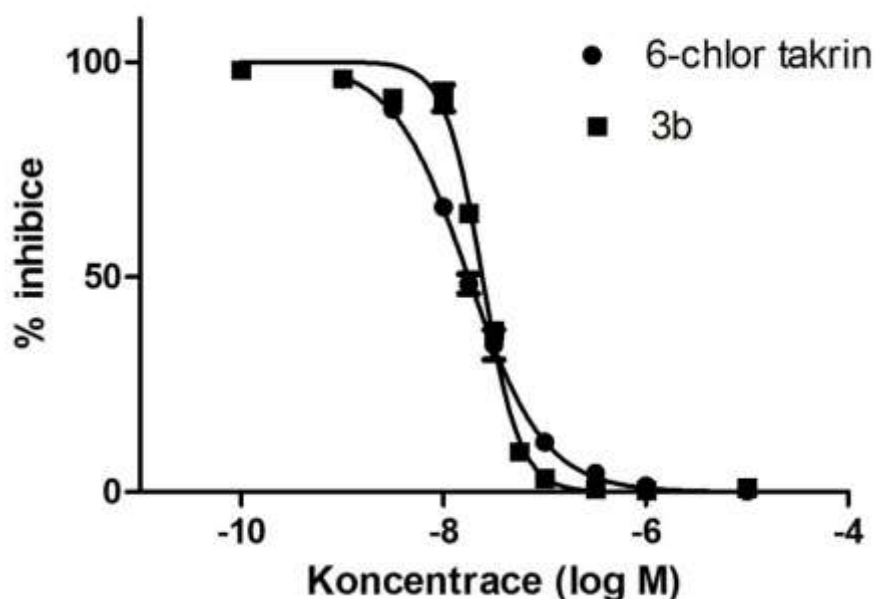
U všech uvedených sloučenin byla testována jejich schopnost inhibovat enzymy AChE a BChE a jejich působení na M₁ mAChRs.

6.1 Inhibice acetylcholinesterasy

Ve skupině derivátů 7-MEOTA byla jako nejlepší inhibitor AChE vyhodnocena sloučenina 1f ($IC_{50} = 1,53 \pm 0,16 \mu\text{M}$). Její schopnost inhibovat daný enzym byla však slabší než u samotného standardu 7-MEOTA (viz Obr. 11).

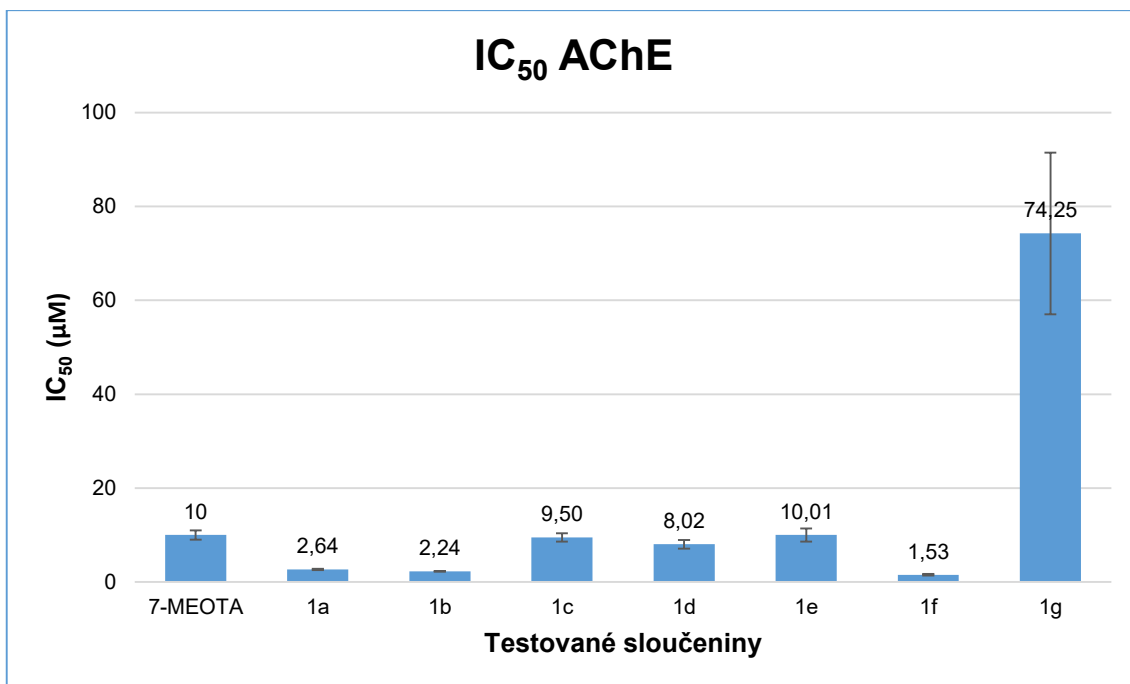
Nejlepším inhibitorem AChE mezi deriváty THA byla stanovena sloučenina 2b ($IC_{50} = 0,13 \pm 0,01 \mu\text{M}$). Spojovací řetězec této v molekule má čtyři uhlíky. V porovnání se standardem THA je látka účinnějším inhibitorem AChE a to téměř dvaapůlkrát (viz Obr. 12).

Dle naměřených hodnot bylo vyhodnoceno, že nejlepším AChEI je sloučenina 3b ($IC_{50} = 0,042 \pm 0,003 \mu\text{M}$) (viz Obr. 10). Strukturně se jedná o derivát 6-Cl THA se spojovacím řetězcem o dvou uhlících. Oproti standardu 6-Cl THA však inhibuje tato látka AChE více než dvakrát hůře (viz Obr. 13).

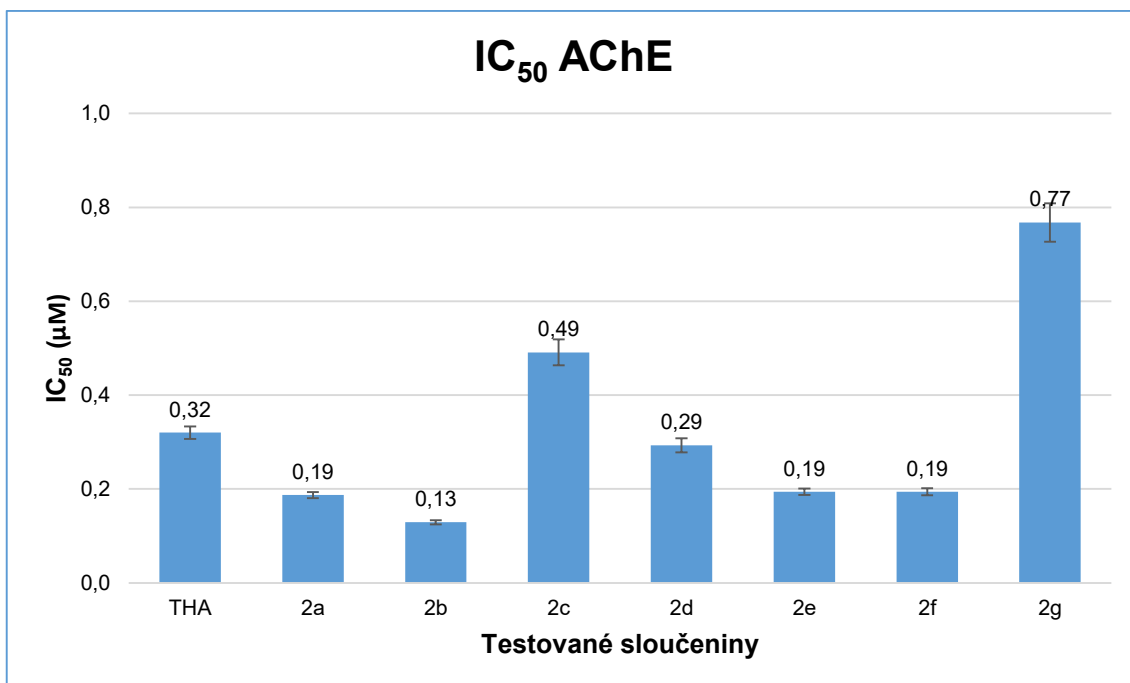


Obr. 10 Graf inhibice acetylcholinesterasy

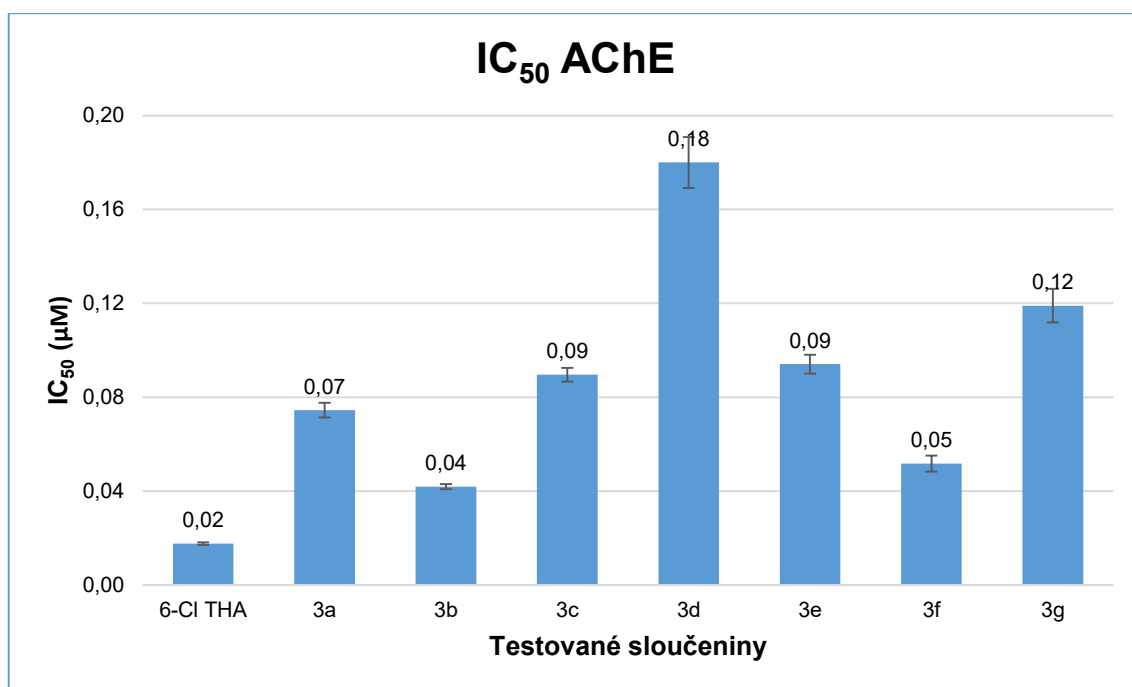
Graf znázorňuje inhibiční křivku 6-Cl THA a příslušného derivátu 3b, jež byl vyhodnocen jako nejlepší AChEI ze všech testovaných sloučenin.



Obr. 11 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 7-MEOTA vůči AChE



Obr. 12 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin THA vůči AChE



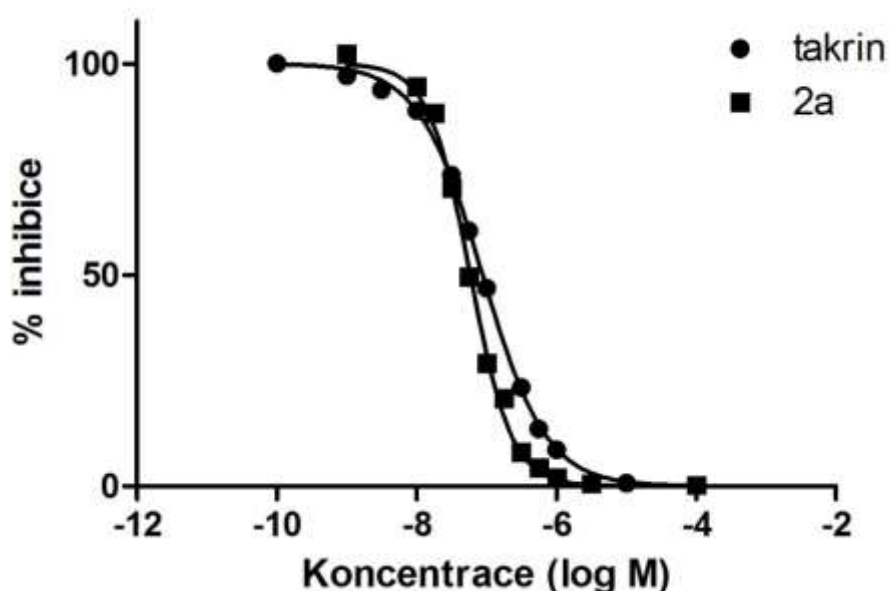
Obr. 13 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 6-Cl THA vůči AChE

6.2 Inhibice butyrylcholinesterasy

Mezi deriváty 7-MEOTA vystupovala jako nejúčinnější BChEI látka 1a ($IC_{50} = 0,41 \pm 0,02 \mu\text{M}$). Spojovací řetězec v této molekule obsahuje nejnižší možný počet uhlíků, dva. Zajímavostí je, že sloučenina je o dva řády lepším inhibitorem, než odpovídající standard 7-MEOTA (viz Obr. 15).

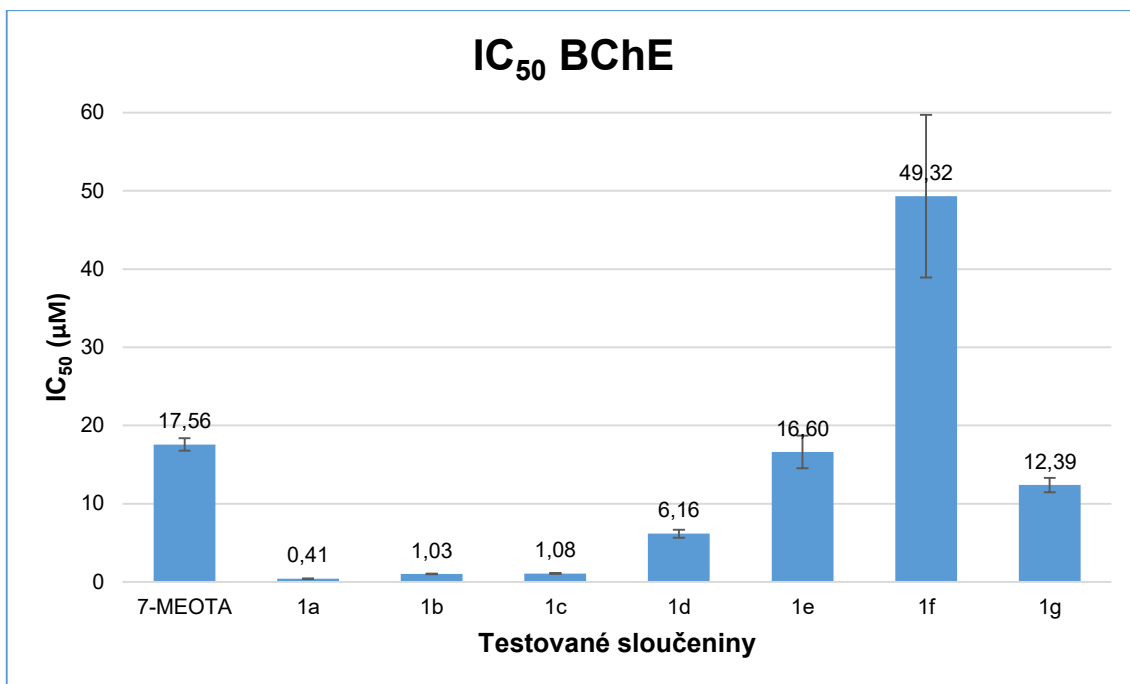
Nejlepším BChEI byl dle naměřených hodnot stanoven derivát THA, konkrétně sloučenina 2a ($IC_{50} = 0,059 \pm 0,001 \mu\text{M}$) (viz Obr. 14). Spojovací řetězec v této molekule má délku dvou uhlíků. Sloučenina 2a je jedenapůlkrát účinnějším inhibitorem, než příslušný standard THA (viz Obr. 16).

Nejlepší inhibice BChE ze skupiny derivátů 6-Cl THA dosahovala sloučenina 3a ($IC_{50} = 0,083 \pm 0,005 \mu\text{M}$), jejíž struktura obsahuje tříuhlíkatý spojovací řetězec. Vzhledem ke standardu 6-Cl THA je však tato látka slabším inhibitorem a to téměř pětkrát (viz Obr. 17).

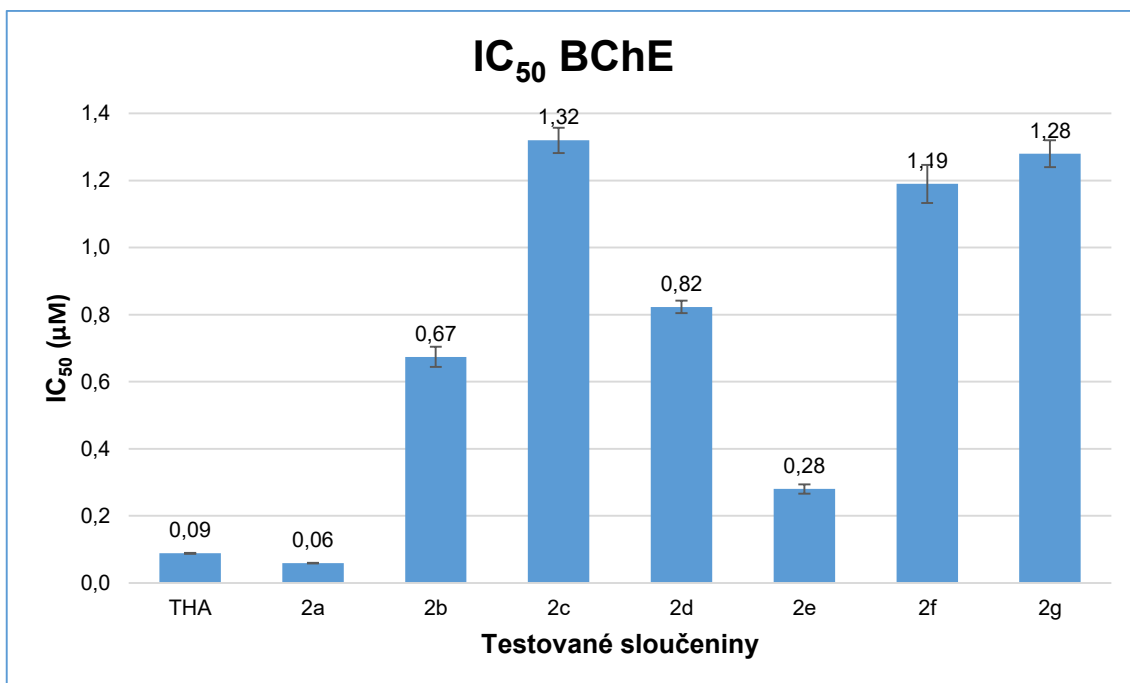


Obr. 14 Graf inhibice butyrylcholinesterasy

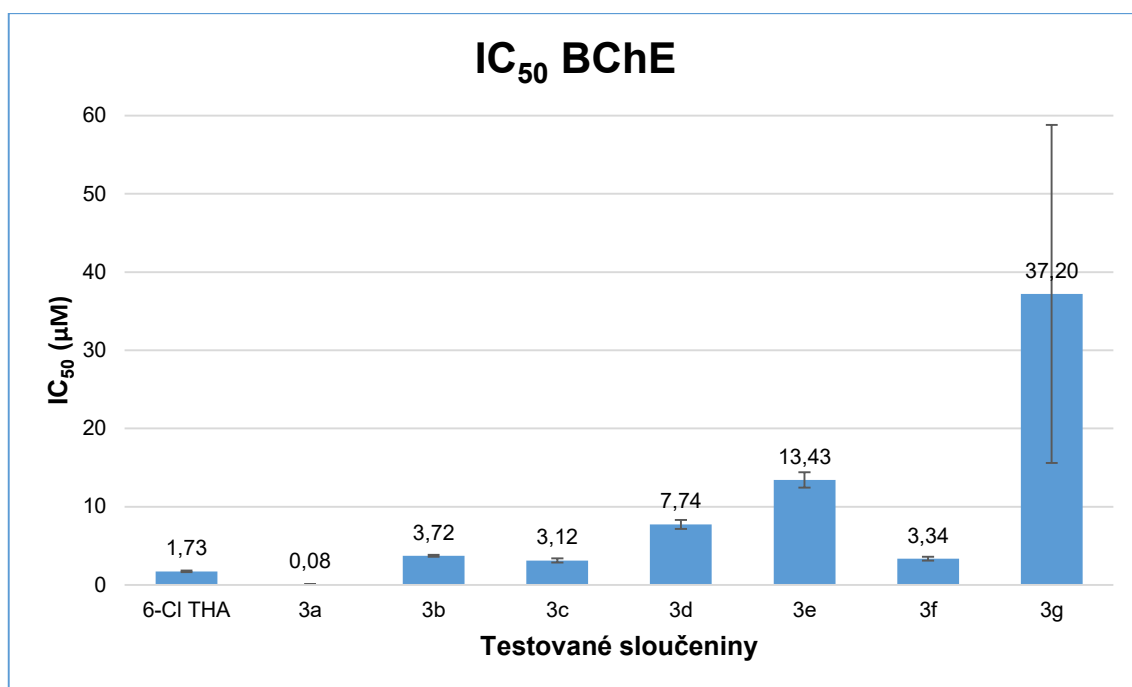
Graf znázorňuje inhibiční křivku THA a příslušného derivátu 2a, jež byl vyhodnocen jako nejlepší BChEI ze všech testovaných sloučenin.



Obr. 15 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 7-MEOTA vůči BChE



Obr. 16 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin THA vůči BChE



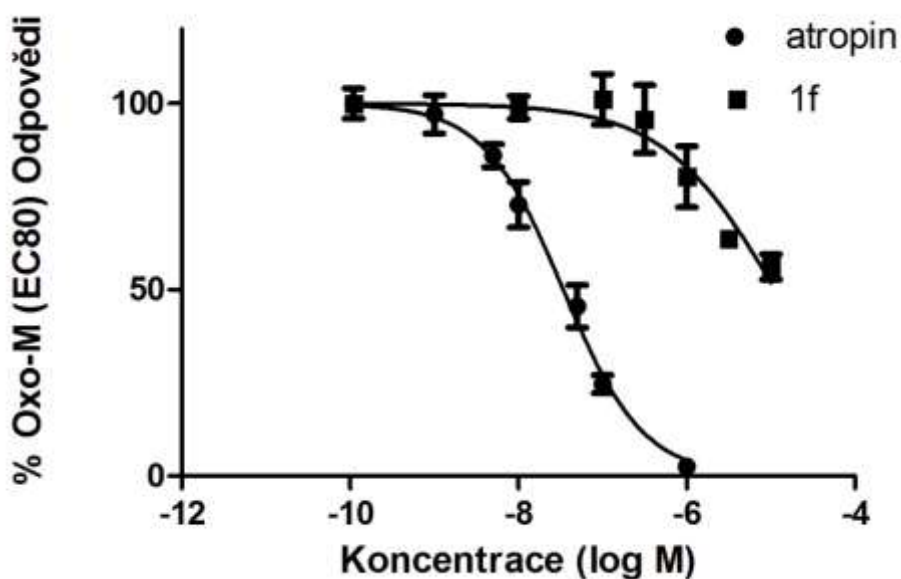
Obr. 17 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 6-Cl THA vůči BChE

6.3 Modulace M₁ muskarinových receptorů

Žádná z testovaných sloučenin nevystupovala jako PAM orthosterického agonisty oxo-M na M₁ mAChRs. Naopak, všechny látky působily na M₁ mAChRs inhibičně (viz Obr. 18).

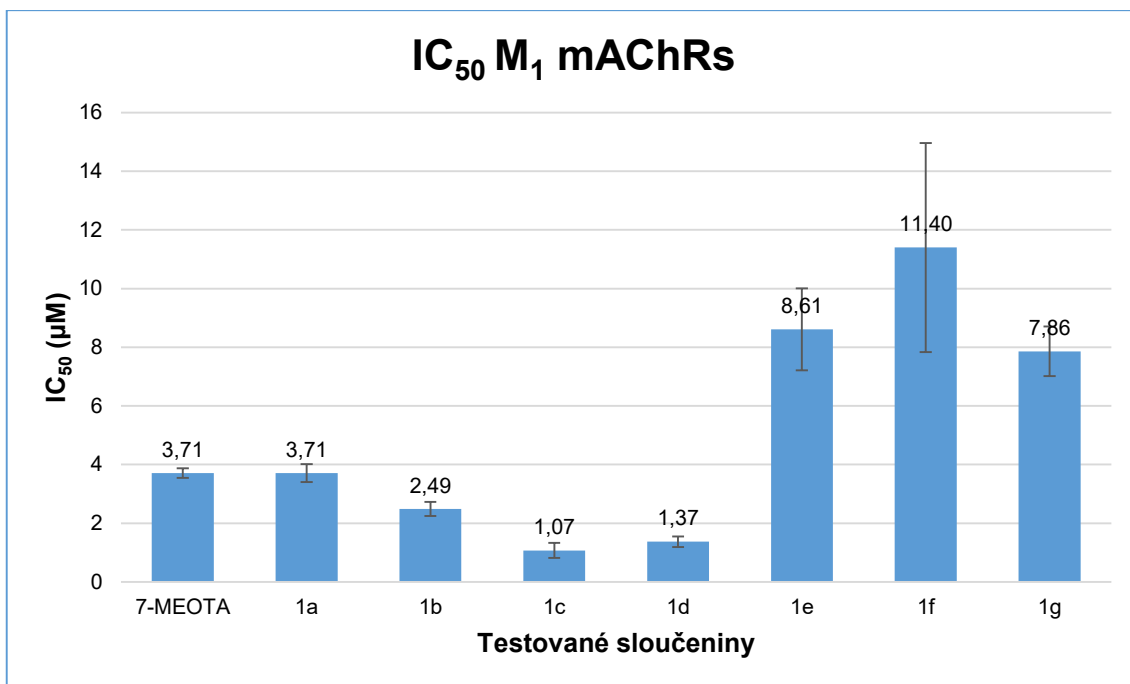
Ze všech testovaných látek tak můžeme alespoň určit sloučeninu, která agonistické působení orthosterického ligandu oxo-M inhibovala nejméně. Jednalo se o látku 1f (IC₅₀ = 11,40 ± 3,56 μM), jež je derivátem 7-MEOTA a ve struktuře obsahovala spojovací řetězec o délce sedmi uhlíků. Inhibiční působení této látky na M₁ mAChRs můžeme, v porovnání s ostatními deriváty, vyhodnotit jako nejméně nevhodné (viz Obr. 19).

Obecně všechny deriváty řady 7-MEOTA vystupovaly jako slabší inhibitory oproti ostatním testovaným derivátům.

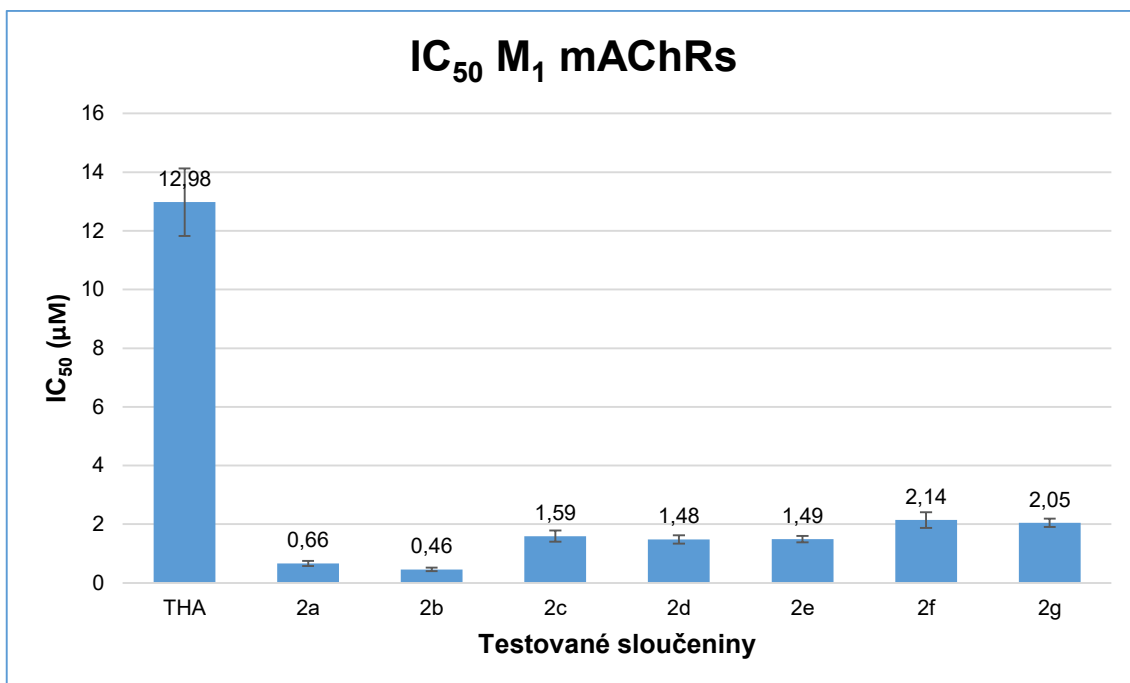


Obr. 18 Graf inhibice M₁ muskarinových receptorů

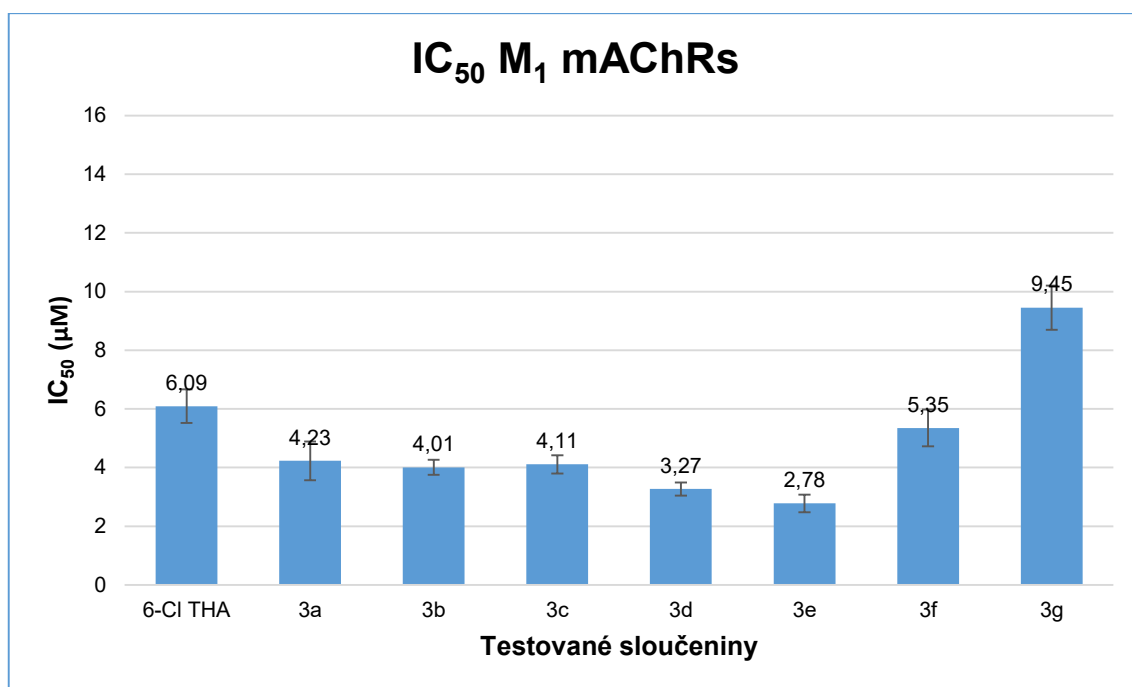
Graf znázorňuje inhibiční křivku sloučeniny 1f (derivát 7-MEOTA) v porovnání s antagonistou muskarinových receptorů - atropinem.



Obr. 19 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 7-MEOTA vůči M₁ mAChRs



Obr. 20 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin THA vůči M₁ mAChRs



Obr. 21 Graf hodnot IC₅₀ sloučenin 6-Cl THA vůči M₁ mAChRs

7 DISKUZE

AD je nejčastěji zastoupenou formou demence, jejíž incidence stále narůstá (1,2). Nejenže je tato nemoc nevléčitelná, ale není známa ani příčina jejího vzniku (1). Z hlediska patologie je klíčové štěpení APP cholinergní cestou, následný vznik A β a jeho akumulace v mozku v podobě plaků. Současně je přítomný hyperfosforylovaný tau protein tvořící neurofibrilární klubka (101).

AD je však onemocněním s multifaktoriální etiologií. Dalšími procesy, které v postiženém mozku probíhají, jsou oxidativní stres, lokální zánět, hromadění kationtů kovů, postižení mitotická a mitochondriální. Vyskytují se genetické mutace, hormonální změny a jsou narušeny fyziologické hladiny neurotransmiterů v CNS (87,102). V důsledku těchto dějů odumírají nervové buňky (především v *nucleus basalis Meynerti*), logicky se snižuje počet cholinergních receptorů a klesá koncentrace ACh. Klinickými příznaky nemoci u postižených pacientů jsou poruchy intelektu a paměti. (103,104)

Pozitivního ovlivnění kognitivních funkcí a kvality života skrze zlepšení cholinergní transmise bylo dosaženo díky AChEI. Použití těchto látek nicméně limitují nežádoucí účinky, které vyplývají z aktivace cholinergních receptorů nejen v CNS, ale i na periférii (77). V současnosti dostupná léčba je pouze symptomatická a to za použití AChEI (donepezil, galantamin, rivastigmin) a memantinu, jež je antagonistou NMDA receptorů (105).

Pro cholinergní procesy v mozku, které souvisí s kognitivními funkcemi, učením a pamětí jsou podstatné především mAChRs. Specifické fyziologické funkce jednotlivých podtypů mAChRs však nejsou zcela prozkoumány a to z důvodu absence specifických farmakologických ligandů pro tyto receptory (12,106).

Z farmakologického hlediska a z dosavadního testování jsou podtypy mAChRs vhodným cílem pro léčiva nejen AD, ale i dalších onemocnění, při kterých dochází k postižení kognitivních funkcí. Obecně se jedná o demence nebo léčbu psychóz, například schizofrenie (92). Překážkou ve vývoji takovýchto léčiv je specifické pořadí aminokyselin, které tvoří orthosterické vazebné místo mAChRs. Nově syntetizovaný ligand by proto musel vykazovat vůči danému podtypu receptoru vysokou specifitu. Tohoto se při vývoji nových molekul nedaří dosáhnout.

Respektive existují látky s agonistickou aktivitou vůči M_1 mAChRs, ale pouze při vystavení tomuto jednomu konkrétnímu podtypu receptoru v buněčné linii. V prostředí zvířecího nebo lidského organismu se sloučeniny váží i na ostatní podtypy receptorů (12,107). Látky syntetizované jako agonisté M_1 a M_4 mAChRs s cílem zlepšit CNS funkce ve výsledku interagují i s podtypy M_2 a M_3 mAChRs na periférii. Výsledkem jsou nežádoucí účinky související s jejich aktivací.

Příležitostí při hledání nových léčiv, je využití dalšího vazebného místa receptoru. Je jím místo alosterické, které je od místa orthosterického topograficky odlišné. Pořadí aminokyselin v alosterickém místě receptoru není tak vysoce konzervativní. Alosterické ligandy proto vůči němu nemusí vykazovat vysokou specifitu, která by byla potřebná k navázání na konkrétní podtyp receptoru. Alosterický ligand může mít vlastnosti alosterického agonisty a aktivovat receptor i v nepřítomnosti orthosterického agonisty. Může vystupovat jako PAM mAChRs, který pouze potencuje působení orthosterického ligandu a v jeho nepřítomnosti není aktivní. Jedna molekula také může mít oba účinky na receptor současně (93,108).

První objevenou molekulou, jež měla vlastnosti PAM M_1 mAChRs byl brucin. Jeho účinky se projevily při vysoké mikromolární koncentraci (109,110). Prvním alosterickým agonistou byla sloučenina AC 42, která aktivuje M_1 mAChRs a je pro tento podtyp receptoru vysoce selektivní (95). Nicméně tyto sloučeniny nebyly vhodné pro další testování zejména kvůli své špatné rozpustnosti ve fyziologických pufrch a relativně slabé potenciaci receptorů. (95,109,110)

Vzhledem ke komplikované etiologii AD je současným trendem vytvářet takové molekuly, které by byly díky své struktuře ligandem pro více než jednu farmakologickou strukturu. Takové sloučeniny, které mají širší spektrum účinku, označujeme jako MTDLs. Nejčastěji jsou syntetizovány látky s duálním účinkem, kdy se kombinuje molekula AChEI spolu s molekulou, která má přídavné vlastnosti. Jedná se například o antioxidant, antagonistu kalciových kanálů, antagonistu NMDA receptorů, inhibitor β -sekretasy a další (102,111).

Molekula AChEI byla použita i při syntéze MTDLs, jež byly testovány v této práci. Jak již bylo zmíněno, cílem této práce bylo farmakologické stanovení látek, které byly syntetizovány za účelem ovlivnění postiženého cholinergního systému.

Obecně k tomu byla použita molekula, jejíž struktura odpovídala spojení AChEI a PAM M₁ mAChRs. Zástupci AChEI byly sloučeniny 7-MEOTA, THA a 6-Cl THA. Roli PAM M₁ mAChRs zastupovala molekula BQCA. Molekula THA a její deriváty jsou obecně pro syntézu MTDLs často využívány. Farmakologické studie mají mimo jiné za cíl prokázat, že takto vzniklé sloučeniny nejsou, na rozdíl od samotného THA, toxické a zároveň jsou u nich zachovány vlastnosti AChEI. (112)

7-MEOTA je AChEI, který má s THA srovnatelnou farmakologickou aktivitu. Výhodou oproti THA je jeho menší toxicita, pravděpodobně díky odlišné metabolizaci v játrech. Syntéza tohoto THA derivátu probíhala v Hradci Králové v 80. letech dvacátého století a sloučenina byla původně používána jako antidotum psychoaktivních látek (BZ látka) (113,114). Dalším derivátem THA použitým při vývoji testovaných látek byl 6-Cl THA, který díky substituci chlorem v molekule vykazuje oproti THA lepší inhibiční vlastnosti vůči AChE.

Molekula BQCA ve struktuře MTDLs zastupovala roli PAM M₁ mAChRs. BQCA je vůči podtypu M₁ vysoce selektivní a neinteraguje s dalšími podtypy mAChRs. Tato selektivita je zaručena až do dávky 100 μM BQCA (91,96).

Po testování uvedených látek bylo vyhodnoceno, že všechny testované sloučeniny mají schopnost inhibovat enzymy AChE a BChE.

Nejlepším AChEI byla látka 3b ($IC_{50} = 0,042 \pm 0,003 \mu M$), která je derivátem 6-Cl THA. Samotná molekula 6-Cl THA však dosahovala mírně lepších hodnot inhibice ($IC_{50} = 0,018 \pm 0,001 \mu M$). Skupina derivátů 6-Cl THA zároveň patřila mezi nejlepší AChEI v porovnání s deriváty THA a 7-MEOTA. Tyto výsledky korespondují s literaturou, kde je struktura 6-Cl THA označována za účinnější než THA, kvůli substituci chlorem v molekule (115). Deriváty THA byly v průměru lepšími inhibitory než samotný THA. Hodnoty IC_{50} této skupiny dosahovaly řádově stejných hodnot. Deriváty 7-MEOTA byly v porovnání s ostatními deriváty nejslabšími AChEI tudíž i jejich toxicita by měla být nižší. Dle naměřených hodnot bylo zároveň vyhodnoceno, že deriváty 7-MEOTA vykazují schopnost inhibice AChE většinou o jeden řád lepší, než samotná 7-MEOTA ($IC_{50} = 10,00 \pm 0,98 \mu M$). Dle získaných výsledků není pozorovaná jednoznačná souvislost mezi délkou uhlíkatého spojovacího řetězce a účinností inhibitoru. Nejlepší AChEI, kterým je sloučenina 3b, má spojovací řetězec o délce dvou uhlíků.

Pouze u derivátů 7-MEOTA je viditelná souvislost mezi prodlužujícím se řetězcem a klesající schopností inhibice. Jediným faktem společným pro všechny tři skupiny derivátů je, že sloučeniny s nejdelším osmiuhlíkatým řetězcem mají jedny z nejnižších hodnot IC_{50} .

Nejúčinnějším BChEI byla látka 2a ($IC_{50} = 0,059 \pm 0,001 \mu M$). Jedná se o derivát THA, jež inhiboval BChE lépe než samotný THA ($IC_{50} = 0,088 \pm 0,001 \mu M$). V literatuře je však THA lepším BChEI, vzhledem k uváděným výsledkům $IC_{50} = 0,02 \pm 0,01 \mu M$ (116). Skupina derivátů THA dosahovala nejlepších hodnot IC_{50} pro BChE. Tímto se potvrdila již zmíněná lepší selektivita THA k BChE než k AChE (31). Dle naměřených hodnot můžeme odvodit, že s délkou spojovacího řetězce klesala schopnost inhibovat BChE. Tato skutečnost je nejevíce patrná u derivátů 7-MEOTA a 6-Cl THA. Ve skupině derivátů 6-Cl THA je zajímavá látka 3a ($IC_{50} = 0,083 \pm 0,005 \mu M$), která dosáhla hodnoty IC_{50} o dva řády lepší, než samotný standard 6-Cl THA ($IC_{50} = 1,7 \pm 0,1 \mu M$). Jako u AChEI i v tomto případě byly deriváty 7-MEOTA nejméně účinné BChEI. Ze skupiny těchto derivátů vykazovala nejlepší vlastnosti sloučenina 1a ($IC_{50} = 0,41 \pm 0,02 \mu M$). Z tohoto můžeme vyvodit, že ve všech skupinách derivátů byla neúčinnějším BChEI taková sloučenina, která měla pouze dva uhlíky ve spojovacím řetězci. Hodnota IC_{50} 7-MEOTA byla naměřena $17,56 \pm 0,80 \mu M$. Oproti výsledkům uváděným v literatuře ($IC_{50} = 21 \pm 3,4 \mu M$) (116) je tedy účinnějším inhibitorem.

Žádný testovaný derivát nebyl PAM M_1 mAChRs. Všechny testované deriváty inhibovaly působení agonisty oxo-M na muskarinovém receptoru. Proto můžeme pouze určit sloučeninu, která agonistu inhibovala nejméně. Jedná se o látku 1f, která je derivátem 7-MEOTA ($IC_{50} = 11,4 \pm 3,6 \mu M$). Tato sloučenina inhibovala receptor méně, než samotný standard 7-MEOTA ($IC_{50} = 3,7 \pm 0,2 \mu M$).

Z výsledků vyplývá, že všechny 7-MEOTA deriváty jsou slabé inhibitory. Pro inhibici AChE, BChE je to nevítané, vůči M_1 mAChRs se však toto jeví jako výhoda. Schopnost inhibovat ChE se u derivátů jednotlivých inhibitorů zachovala i v MTDLs molekule. Schopnost BQCA modulovat odpověď GPCR se však neprojevila. Pokud vezmeme v úvahu, že THA má schopnost vázat se do alosterického místa, je otázkou, zda testované deriváty THA neinteragovaly s alosterickým místem receptoru namísto molekuly BQCA.

V oblasti chemické syntézy proběhly obměny struktury BQCA a testování PAM aktivity vzniklých derivátů. Někdy totiž stačí malá změna v molekule k tomu, aby se z PAM stala molekula NAM. Například z již známých příkladů: obměnou chinolinového jádra se podařilo získat molekuly s lepšími vlastnostmi PAM, než má samotná molekula BQCA. Jako konkrétní příklad můžeme uvést záměnu benzenového kruhu chinolinu za cyklohexan. Spolu se substitucí v poloze 5 hydroxylovou skupinou byly získány aktivnější sloučeniny v porovnání s BQCA. Nejúčinnějším derivátem vyvinutým v Merck Research Laboratories je chinolizidinová kyselina, ve které byl chinolinový kruh nahrazen chinolizidinovým (94).

Námi testované deriváty nemají zachovanou karboxylovou skupinu. Skrze amidovou vazbu a uhlíkatý řetězec je spojena molekula BQCA a inhibitoru ChE. Je proto otázkou, zda je karboxylová skupina nezbytná pro účinek PAM.

Žádná z testovaných sloučenin nevykazovala vlastnosti potenciálního léčiva, které by bylo vhodné pro terapii AD. Syntetizované MTDLs struktury neměly takové vlastnosti, které se při jejich vývoji předpokládaly. Látky testované v této práci mají účinky pouze AChEI a BChEI. Požadovaný účinek na M₁ mAChRs nebyl prokázán. Naopak, antagonistická modulace daného receptoru je z hlediska terapie AD nežádoucí.

Z hlediska další syntézy potenciálních léčiv AD by bylo vhodné zaměřit pozornost na molekulu BQCA v MTDLs sloučeninách. Sama o sobě je totiž PAM M₁ mAChRs, čehož se při spojení s další molekulou inhibitoru ChE nepodařilo dosáhnout. Je možné, že při změnách v základní struktuře molekuly BQCA by se podařilo vyvinout účinný derivát se zachovanou aktivitou i v molekule MTDLs.

8 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo testování nově syntetizovaných látek jakožto potenciálních léčiv AD. Sloučeniny byly syntetizovány za účelem ovlivnění cholinergního systému, který je při onemocnění postižen. Snahou bylo vytvořit takovou látku, která by ovlivnila odbourávání ACh a zároveň podpořila jeho působení na M₁ mAChRs, pro které je ACh orthosterickým agonistou. Proto bylo potřebné vyvinout sloučeninu, která by byla schopná mít duální účinek.

Obecně struktura sloučenin odpovídala spojení dvou molekul. Molekula AChEI (THA, 6-Cl THA, 7-MEOTA) zabraňující hydrolytickému štěpení ACh v synapsi spolu s molekulou PAM M₁ mAChRs, BQCA, jež podporuje působení ACh na receptoru. Jednotlivé sloučeniny se mezi sebou lišily typem AChEI a délkou uhlíkatého spojovacího řetězce.

U sloučenin se testovala jejich schopnost inhibovat nejen AChE, ale i BChE. Pomocí buněčné linie exprimující M₁ mAChRs se měřila a vyhodnocovala jejich schopnost modulovat receptorovou odpověď v přítomnosti orthosterického agonisty oxo-M.

Všechny testované sloučeniny vystupovaly jako AChEI a BChEI.

Nejlepším AChEI byla sloučenina 3b, která je derivátem 6-Cl THA. Celkově všechny deriváty 6-Cl THA vykazovaly ze všech testovaných látek nejlepší inhibiční působení. Deriváty 7-MEOTA patřily mezi inhibitory nejslabší. Nejlepším BChEI stanoven derivát THA, konkrétně sloučenina 2a. Tato sloučenina byla schopna inhibovat BChE lépe, než samotný THA. Deriváty odvozené od THA, inhibovaly BChE lépe než ostatní testované látky. I zde platí, že deriváty 7-MEOTA byly nejslabšími inhibitory.

Žádná z testovaných látek nevystupovala jako PAM M₁ mAChRs. Naopak, sloučeniny na receptor působily jako antagonisté a odpověď agonisty oxo-M inhibovaly. Můžeme alespoň určit, že sloučenina 1f, derivát 7-MEOTA, měla nejslabší inhibiční vlastnosti a měla tedy nejméně nevhodné vlastnosti. Všechny deriváty 7-MEOTA inhibovaly receptor slaběji než zbývající deriváty THA a 6-Cl THA.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Proteolytické štěpení amyloidního prekursorového proteinu	16
Obr. 2 Princip cholinergní neurotransmise	24
Obr. 3 Molekulární formy acetylcholinesterasy	27
Obr. 4 Struktura nikotinových receptorů	30
Obr. 5 Aktivace G-proteinového receptoru cestou fosfolipasy C	32
Obr. 6. Struktura molekuly benzylcholinolon karboxylové kyseliny	38
Obr. 7. Chemické reakce Ellmanovy metody	41
Obr. 8 Princip vápníkového testu	46
Obr. 9 Obecná struktura testovaných sloučenin	51
Obr. 10 Graf inhibice acetylcholinesterasy	52
Obr. 11 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 7-MEOTA vůči AChE	53
Obr. 12 Graf hodnot IC_{50} sloučenin THA vůči AChE	53
Obr. 13 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 6-Cl THA vůči AChE	54
Obr. 14 Graf inhibice butyrylcholinesterasy	55
Obr. 15 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 7-MEOTA vůči BChE	56
Obr. 16 Graf hodnot IC_{50} sloučenin THA vůči BChE	56
Obr. 17 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 6-Cl THA vůči BChE	57
Obr. 18 Graf inhibice M_1 muskarinových receptorů	58
Obr. 19 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 7-MEOTA vůči M_1 mAChRs	59
Obr. 20 Graf hodnot IC_{50} sloučenin THA vůči M_1 mAChRs	59
Obr. 21 Graf hodnot IC_{50} sloučenin 6-Cl THA vůči M_1 mAChRs	60

10 ZDROJE

1. Association A 's. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2014 Mar;10(2):e47–92.
2. Dias KST, Viegas, Jr C. Multi-Target Directed Drugs: A Modern Approach for Design of New Drugs for the treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2014 May;12(3):239–55.
3. SÚKL. ATC Skupiny [Internet]. Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2010 [cited 2016 Mar 9]. Available from: http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=N06DA#N06DA
4. Sugino H, Watanabe A, Amada N, Yamamoto M, Ohgi Y, Kostic D, et al. Global Trends in Alzheimer Disease Clinical Development: Increasing the Probability of Success. *Clin Ther*. 2015 Aug 1;37(8):1632–42.
5. Mátl O, Holmerová I, Mátlová M. Analytický doplněk ke Zprávě o stavu demence 2014 [Internet]. Česká alzheimerovská společnost, o.p.s.; 2014. Available from: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba-v-cr/zverejnena-zprava-o-stavu-demence-2014/>
6. Mohelska H, Maresova P. Economic and Managerial Aspects of Alzheimer's Disease in The Czech Republic. *Procedia Econ Finance*. 2015;23:521–4.
7. Cedazo-Minguez A, Winblad B. Biomarkers for Alzheimer's disease and other forms of dementia: Clinical needs, limitations and future aspects. *Exp Gerontol*. 2010 Jan;45(1):5–14.
8. McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, et al. Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol*. 2004 Jan;3(1):19–28.
9. Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2013 Sep;62:132–44.
10. Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia. *Neuron*. 2013 Nov 20;80(4):844–66.
11. Association* A 's. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2015 Mar;11(3):332–84.
12. Langmead CJ, Watson J, Reavill C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther*. 2008 Feb;117(2):232–43.
13. Bobinski M, de Leon MJ, Wegiel J, DeSanti S, Convit A, Saint Louis LA, et al. The histological validation of post mortem magnetic resonance imaging-determined hippocampal volume in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1999 Dec;95(3):721–5.

14. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, et al. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* 2010 Nov;9(11):1118–27.
15. Swerdlow RH. Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging.* 2007 Sep;2(3):347–59.
16. Humpel C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends Biotechnol.* 2011 Jan;29(1):26–32.
17. Drachman DA. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014 May;10(3):372–80.
18. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev.* 2001 Apr 1;81(2):741–66.
19. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS Lett.* 2000 Oct 13;483(1):6–10.
20. Buée L, Bussièrè T, Buée-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders1. *Brain Res Rev.* 2000 Aug;33(1):95–130.
21. Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993 Nov 1;16(11):460–5.
22. Duan Y, Dong S, Gu F, Hu Y, Zhao Z. Advances in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Focusing on Tau-Mediated Neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2012;1:24.
23. Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011 May;35(6):1397–409.
24. Bartus RT. On Neurodegenerative Diseases, Models, and Treatment Strategies: Lessons Learned and Lessons Forgotten a Generation Following the Cholinergic Hypothesis. *Exp Neurol.* 2000;163(2):495–529.
25. Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2006 Nov;113(11):1625–44.
26. Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10;221(2):555–63.
27. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol.* 2013 May;11(3):315–35.

28. Current Treatments, Alzheimer's & Dementia | Research Center [Internet]. Alzheimer's Association. [cited 2016 Mar 6]. Available from: http://www.alz.org/research/science/alzheimers_disease_treatments.asp
29. Davis KL, Mohs RC, Tinklenberg, Pfefferbaum A, Hollister LE, Kopell BS. Physostigmine: improvement of long-term memory processes in normal humans. *Science*. 1978 Jul 21;201(4352):272–4.
30. Davis KL, Mohs RC. Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple-dose intravenous physostigmine. *Am J Psychiatry*. 1982 Nov;139(11):1421–4.
31. Tumiatti V, Minarini A, Bolognesi ML, Milelli A, Rosini M, Melchiorre C. Tacrine Derivatives and Alzheimer's Disease. *Curr Med Chem*. 2010 Jun 1;17(17):1825–38.
32. Summers WK, Majovski LV, Marsh GM, Tachiki K, Kling A. Oral Tetrahydroaminoacridine in Long-Term Treatment of Senile Dementia, Alzheimer Type. *N Engl J Med*. 1986 Nov 13;315(20):1241–5.
33. Giacobini E. From Molecular Structure to Alzheimer Therapy. *Jpn J Pharmacol*. 1997;74(3):225–41.
34. Fang L, Jumpertz S, Zhang Y, Appenroth D, Fleck C, Mohr K, et al. Hybrid Molecules from Xanomeline and Tacrine: Enhanced Tacrine Actions on Cholinesterases and Muscarinic M1 Receptors. *J Med Chem*. 2010 Mar 11;53(5):2094–103.
35. Zemek F, Drtinova L, Nepovimova E, Sepsova V, Korabecny J, Klimes J, et al. Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. *Expert Opin Drug Saf*. 2014 Jun 1;13(6):759–74.
36. Cummings JL, Geldmacher D, Farlow M, Sabbagh M, Christensen D, Betz P, et al. High-Dose Donepezil (23 mg/day) for the Treatment of Moderate and Severe Alzheimer's Disease: Drug Profile and Clinical Guidelines. *CNS Neurosci Ther*. 2013 May 1;19(5):294–301.
37. Tayeb HO, Yang HD, Price BH, Tarazi FI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2012 Apr;134(1):8–25.
38. Sabbagh M, Cummings J, Christensen D, Doody R, Farlow M, Liu L, et al. Evaluating the cognitive effects of donepezil 23 mg/d in moderate and severe Alzheimer's disease: analysis of effects of baseline features on treatment response. *BMC Geriatr*. 2013;13:56.
39. Anand P, Singh B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2013 Feb 24;36(4):375–99.
40. Ago Y, Koda K, Takuma K, Matsuda T. Pharmacological Aspects of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galantamine. *J Pharmacol Sci*. 2011;116(1):6–17.

41. Müller T. Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2007 Apr;3(2):211–8.
42. Mesulam -Marsel, Geula C. Butyrylcholinesterase reactivity differentiates the amyloid plaques of aging from those of dementia. *Ann Neurol*. 1994 Nov 1;36(5):722–7.
43. Bartolini M, Bertucci C, Cavrini V, Andrisano V. β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol*. 2003 Feb 1;65(3):407–16.
44. Stefanova E, Blennow K, Almkvist O, Hellström-Lindahl E, Nordberg A. Cerebral glucose metabolism, cerebrospinal fluid- β -amyloid1–42 (CSF-A β 42), tau and apolipoprotein E genotype in long-term rivastigmine and tacrine treated Alzheimer disease (AD) patients. *Neurosci Lett*. 2003 Feb 27;338(2):159–63.
45. Winblad B, Grossberg G, Frölich L, Farlow M, Zechner S, Nagel J, et al. IDEAL A 6-month, double-blind, placebo-controlled study of the first skin patch for Alzheimer disease. *Neurology*. 2007 Jul 24;69(4 suppl 1):S14–22.
46. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol*. 2006 Feb;6(1):61–7.
47. Parsons CG, Danysz W, Dekundy A, Pulte I. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotox Res*. 2013 May 9;24(3):358–69.
48. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang a Dale's Pharmacology. 7th edition. Vol. 2012. Edinburgh: Elsevier/Churchill Livingstone; 2011. 792 p.
49. Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*. 2002 Oct 28;5:1039–42.
50. Bigl V, Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: A combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull*. 1982 Jun;8(6):727–49.
51. Goodman LS, Brunton LL, Chabner B, Knollmann BC. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. Vol. 2011. New York: McGraw-Hill; 2011. 1808 p.
52. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology. 12th edition. Vol. 2012. New York: McGraw-Hill Medical; 2012. 1248 p.
53. Patocka J, Kuca K, Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body. *Acta Medica Hradec Král Univ Carol Fac Medica Hradec Král*. 2004;47(4):215–28.

54. Massoulié J, Sussman J, Bon S, Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res.* 1993;98:139–46.
55. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev.* 1987 Oct 1;87(5):955–79.
56. Massoulié J, Anselmet A, Bon S, Krejci E, Legay C, Morel N, et al. The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem Biol Interact.* 1999 May 14;119–120:29–42.
57. Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 1991 Aug 23;253(5022):872–9.
58. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J.* 1989 Jun 15;260(3):625–34.
59. Main AR, Soucie WG, Buxton IL, Arinc E. The purification of cholinesterase from horse serum. *Biochem J.* 1974 Dec 1;143(3):733–44.
60. Masson P, Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch Biochem Biophys.* 2010 Feb 15;494(2):107–20.
61. Darvesh S, Cash MK, Reid GA, Martin E, Mitnitski A, Geula C. Butyrylcholinesterase Is Associated With β -Amyloid Plaques in the Transgenic APPSWE/PSEN1dE9 Mouse Model of Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012 Jan 1;71(1):2–14.
62. Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 1995 Mar;18(3):121–7.
63. Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004 Dec;74(6):363–96.
64. Hogg RC, Bertrand D. Nicotinic Acetylcholine Receptors as Drug Targets. *CNS Neurol Disord - Drug Targets Former Curr Drug Targets - CNS Neurol Disord.* 2004 Apr 1;3(2):123–30.
65. Le Novère N, Corringer P-J, Changeux J-P. The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol.* 2002 Dec 1;53(4):447–56.
66. Corringer P-J, Novère NL, Changeux J-P. Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40(1):431–58.
67. Gotti C, Zoli M, Clementi F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Sep;27(9):482–91.

68. Yakel JL. Nicotinic ACh Receptors in the Hippocampus: Role in Excitability and Plasticity. *Nicotine Tob Res.* 2012 Nov 1;14(11):1249–57.
69. Dineley KT. Nicotinic Acetylcholine Receptors in Alzheimer's and Parkinson's Disease. In: Lester RAJ, editor. *Nicotinic Receptors* [Internet]. Springer New York; 2014 [cited 2016 Mar 20]. p. 383–415. (The Receptors). Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-1167-7_19
70. Kihara T, Shimohama S, Urushitani M, Sawada H, Kimura J, Kume T, et al. Stimulation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors inhibits β -amyloid toxicity. *Brain Res.* 1998 May 11;792(2):331–4.
71. Zamani MR, Allen YS. Nicotine and its interaction with β -amyloid protein: a short review. *Biol Psychiatry.* 2001 Feb 1;49(3):221–32.
72. Mazurov AA, Miao L, Bhatti BS, Strachan J-P, Akireddy S, Murthy S, et al. Discovery of 3-(5-Chloro-2-furoyl)-3,7-diazabicyclo[3.3.0]octane (TC-6683, AZD1446), a Novel Highly Selective $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist for the Treatment of Cognitive Disorders. *J Med Chem.* 2012 Nov 8;55(21):9181–94.
73. Yenugonda VM, Xiao Y, Levin ED, Rezvani AH, Tran T, Al-Muhtasib N, et al. Design, Synthesis and Discovery of Picomolar Selective $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligands. *J Med Chem.* 2013 Nov 14;56(21):8404–21.
74. Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, et al. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol.* 2000 Mar 30;393(1–3):215–22.
75. Nickols HH, Conn PJ. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Dis.* 2014 Jan;61:55–71.
76. Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci.* 1991 Oct 1;11(10):3218–26.
77. Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Dec;16(6):710–5.
78. Ellis J, Pangalos MN, Davies CH. Muscarinic receptors. In: *Understanding G Protein-Coupled Receptors and their Role in the CNS.* New York: Oxford University Press; p. 349–71.
79. Robinson L, Platt B, Riedel G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10;221(2):443–65.
80. Clader JW, Wang Y. Muscarinic receptor agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2005;11(26):3353–61.

81. Moulton BC, Fryer AD. Muscarinic receptor antagonists, from folklore to pharmacology; finding drugs that actually work in asthma and COPD. *Br J Pharmacol*. 2011 May 1;163(1):44–52.
82. Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J. Use of M1–M5 Muscarinic Receptor Knockout Mice as Novel Tools to Delineate the Physiological Roles of the Muscarinic Cholinergic System. *Neurochem Res*. 2003 Apr;28(3-4):437–42.
83. Tzavara ET, Bymaster FP, Davis RJ, Wade MR, Perry KW, Wess J, et al. M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related central nervous system pathologies. *FASEB J [Internet]*. 2004 Jul 1 [cited 2016 Mar 22]; Available from: <http://www.fasebj.org/content/early/2004/08/28/fj.04-1575fje>
84. Melancon BJ, Tarr JC, Panarese JD, Wood MR, Lindsley CW. Allosteric modulation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: improving cognition and a potential treatment for schizophrenia and Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 2013 Dec;18(23–24):1185–99.
85. Fink-Jensen A, Fedorova I, Wörtwein G, Woldbye DPD, Rasmussen T, Thomsen M, et al. Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *J Neurosci Res*. 2003 Oct 1;74(1):91–6.
86. Jiang S, Li Y, Zhang C, Zhao Y, Bu G, Xu H, et al. M1 muscarinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull*. 2014 Mar 3;30(2):295–307.
87. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014 Jan;76, Part A:27–50.
88. Heinrich JN, Butera JA, Carrick T, Kramer A, Kowal D, Lock T, et al. Pharmacological comparison of muscarinic ligands: Historical versus more recent muscarinic M1-preferring receptor agonists. *Eur J Pharmacol*. 2009 Mar 1;605(1–3):53–6.
89. Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):702–16.
90. Jiang S, Wang Y, Ma Q, Zhou A, Zhang X, Zhang Y. M1 muscarinic acetylcholine receptor interacts with BACE1 and regulates its proteosomal degradation. *Neurosci Lett*. 2012 May 2;515(2):125–30.
91. Shirey JK, Brady AE, Jones PJ, Davis AA, Bridges TM, Kennedy JP, et al. A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Nov 11;29(45):14271–86.

92. Conn PJ, Jones CK, Lindsley CW. Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Mar;30(3):148–55.
93. Jeffrey Conn P, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2009 Jan;8(1):41–54.
94. Decker M, Holzgrabe U. M1 muscarinic acetylcholine receptor allosteric modulators as potential therapeutic opportunities for treating Alzheimer's disease. *MedChemComm.* 2012 Jul 1;3(7):752–62.
95. Spalding TA, Trotter C, Skjærbæk N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, et al. Discovery of an Ectopic Activation Site on the M1 Muscarinic Receptor. *Mol Pharmacol.* 2002 Jun 1;61(6):1297–302.
96. Ma L, Seager MA, Wittmann M, Jacobson M, Bickel D, Burno M, et al. Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Sep 15;106(37):15950–5.
97. Canals M, Lane JR, Wen A, Scammells PJ, Sexton PM, Christopoulos A. A Monod-Wyman-Changeux Mechanism Can Explain G Protein-coupled Receptor (GPCR) Allosteric Modulation. *J Biol Chem.* 2012 Jan 2;287(1):650–9.
98. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961 Jul 1;7(2):88–95.
99. Žďárová Karasová J, Kuča K, Jun D, Bajgar J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy.* 2010;(104):46–50.
100. Gee KR, Brown KA, Chen W-NU, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium.* 2000 Feb;27(2):97–106.
101. Karran E, Mercken M, Strooper BD. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Sep;10(9):698–712.
102. Carreiras MC, Mendes E, Perry MJ, Francisco AP, Marco-Contelles J. The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(15):1745–70.
103. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999 Feb;66(2):137–47.
104. Hosák L, Hrdlička M, Libiger J. Organické duševní poruchy. In: *Psychiatrie a pedopsychiatrie.* Praha: Karolinum; 2015. p. 117–41.

105. Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, Tomassoni D, Amenta F. Treatment of Alzheimer's disease: From pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mech Ageing Dev.* 2006 Feb;127(2):148–57.
106. Eglen RM. Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. In: Lawton FDK and G, editor. *Progress in Medicinal Chemistry* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2016 Apr 14]. p. 105–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079646805430040>
107. Wess J, Eglen RM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Sep;6(9):721–33.
108. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric Modulation of G Protein–Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47(1):1–51.
109. Jakubík J, Bačáková L, El-Fakahany EE, Tuček S. Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists with Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Mol Pharmacol.* 1997 Jul 1;52(1):172–9.
110. Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A, Birdsall NJM. Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions between Brucine Analogues and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Radioligand Binding Studies. *Mol Pharmacol.* 1998 Mar 1;53(3):573–89.
111. Bajda M, Guzior N, Ignasik M, Malawska B. Multi-Target-Directed Ligands in Alzheimer's Disease Treatment. *Curr Med Chem.* 2011 Nov 1;18(32):4949–75.
112. Romero A, Cacabelos R, Oset-Gasque MJ, Samadi A, Marco-Contelles J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Apr 1;23(7):1916–22.
113. Patočka J, Bajgar J, Bielavský J, Fusek J. Kinetics of inhibition of cholinesterase by 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine in vitro. *Collect Czechoslov Chem Commun.* 1976;41:816–24.
114. Patočka J. 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin, nová látka s nepřímým cholinomimetickým účinkem. *Českoslov Farm.* 1990 nor;39(1):29–32.
115. Recanatini M, Cavalli A, Belluti F, Piazzini L, Rampa A, Bisi A, et al. SAR of 9-Amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-Based Acetylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Enzyme Inhibitory Activity, QSAR, and Structure-Based CoMFA of Tacrine Analogues. *J Med Chem.* 2000 Květen;43(10):2007–18.
116. Soukup O, Jun D, Zdarova-Karasova J, Patočka J, Musilek K, Korabecny J, et al. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr Alzheimer Res.* 2013 Oct 1;10(8):893–906.