

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**SYNTÉZA A HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH INHIBITORŮ
CHOLINESTERÁZ**

Vedoucí práce: PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2019

Neto-Honorius Hougbedji

Poděkování

Srdečně děkuji vedoucímu práce PharmDr. Mgr. Martinu Krátkému, Ph.D., za odborné vedení práce, poskytování cenných rad, vstřícnost a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za podporu poskytnutou při řešení této diplomové práce. Také bych rád poděkoval Katedře organické a bioorganické chemie za poskytnutí pracovního prostředí a možnost vypracování této práce, kolegům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy a dr. Šárce Štěpánkové z Univerzity Pardubice za spolupráci během vypracování této práce.

Tato práce je součástí projektu „Peptidové drug delivery systémy směřované do makrofágů pro antimykobakteriálně aktivní sloučeniny“ a byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (projekt č. 17-27514Y).

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

V Hradci Králové dne 02.05.2018

Neto-Honorius Hougbedji

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Řešitel práce: Neto-Honorius HOUNGBEDJI

Vedoucí práce: PharmDr. Mgr. Martin KRÁTKÝ, Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů cholinesteráz

Počet pacientů trpících Alzheimerovou chorobou v posledních letech neustále narůstá. Tato choroba, zatěžující jak pacienta, tak jeho okolí, vyžaduje nákladnou léčbu, která t.č. spočívá především v používání inhibitorů acetylcholinesterázy. Teoretická část práce shrnuje aktuální poznatky o patologii, epidemiologii a terapii Alzheimerovy choroby. Prezentuje také výsledky předešlého výzkumu v oblasti salicylanilidových inhibitorů cholinesteráz.

Používání inhibitorů acetylcholinesterázy v terapii Alzheimerovy choroby vedlo k návržení osmi nových látek na bázi esterů kyselin fosforu a salicylanilidů s inhibiční aktivitou vůči cholinesterázám. Náplň praktické části diplomové práce tak spočívá v syntéze, charakterizaci a biologickém hodnocení nových inhibitorů cholinesteráz. Ve výsledku se podařilo syntetizovat a vyhodnotit tři nové sloučeniny, jejichž inhibiční aktivita (IC_{50}) se pohybovala v rozmezí 48,13-66,13 μM vůči acetylcholinesteráze a 2,37-170,10 μM vůči butyrylcholinesteráze. U neaktivnějšího inhibitoru 5-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl] karbamoyl]fenyl-diethyl-fosfitu byl dále studován typ inhibice (smíšená) a její mechanismus (pseudo-ireversibilní).

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Neto-Honorius Hougbedji

Supervisor: PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.

Title of diploma thesis: Synthesis and evaluation of potential inhibitors of cholinesterases

During the last years, the number of patients affected by Alzheimer's disease has been constantly increasing. This disease, which burdens the patients as well as their milieu, requires a costly treatment, based on the use of acetylcholinesterase inhibitors currently. The theoretical part summarizes the contemporary knowledge about the pathology, epidemiology and therapy of Alzheimer's disease. This part also presents the results of previous research of salicylanilide-based cholinesterase inhibitors.

The use of acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease led to the design of eight novel compounds (esters of salicylanilides and phosphorus acids) with inhibitory activity against cholinesterases. Thus, the experimental part of this diploma thesis consists in the synthesis, characterization and biological evaluation of the novel inhibitors. Finally, three new compounds were synthesized and evaluated successfully. Their inhibitory activities (IC_{50}) were within the range of 48.13-66.13 μ M against acetylcholinesterase and 2.37-170.10 μ M against butyrylcholinesterase. We determined also type (mixed) and mechanism of the inhibition (pseudo-irreversible) of the most active inhibitor 5-chloro-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)carbonyl)phenyl diethyl phosphite.

Seznam použitých zkratek

A β	Beta-amyloid
A β P	Beta-amyloidní peptid
Acetyl-CoA	Acetylkoenzym A
AChE	Acetylcholinesteráza
ACh	Acetylcholin
AD	Alzheimerova choroba
ADAS-cog	Alzheimer Disease Assessing Test – kognitivní složka
ADI	Alzheimer's Disease International
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionát
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidní prekurzorový protein
ATR	Attenuated Total Reflectance
BCh	Butyrylcholin
BuChE	Butyrylcholinesteráza
ChAT	Cholin acetyltransferáza
ChE	Cholinesteráza
CNS	Centrální nervová soustava
CT	Výpočetní tomografie
ČR	Česká republika
DCM	Dichlormethan
DM	Diabetes mellitus
EtOAc	Ethyl-acetát
HEB	Hematoencefalická bariera
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
IACHe	Inbitory acetylcholinesterázy
MKN	Mezinárodní klasifikace nemoci
MMSE	Mini Mental State Examination
MRI	Magnetická rezonance
NFT	Neurofibrilární klubka

N _M	Nikotinové svalové receptory
N _N	Nikotinové nervové receptory
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-asparagová kyselina
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP	Neurofibrilární plaky
PET	Pozitronová emisní tomografie
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TP	Tau protein
VAcHT	Vezikulární acetylcholinový transportér
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

Obsah

Seznam použitých zkratek	6
1. Úvod.....	8
2. Teoretická část.....	9
2.1. Alzheimerova choroba	9
2.2. Patofyziologie a etiologie AD	12
2.3. Cholinergní teorie.....	17
2.4. Inhibitory ChE	21
2.5. Farmakoterapie AD	24
2.6. Deriváty salicylanilidu jako inhibitory AChE a BuChE.....	28
3. Praktická část	31
3.1. Použité chemikálie, přístroje a analytické metody	31
3.2. Výchozí sloučeniny	32
3.3. Připravované sloučeniny	34
3.4. Biologické testování	47
4. Diskuze.....	51
5. Závěr	54
6. Seznam tabulek	55
7. Seznam obrázků.....	56
8. Použitá literatura	57

1. Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je závažné neurodegenerativní onemocnění, které vyúsťuje v předčasnou úmrtí. Symptomy, které tato nemoc vykazuje, velmi omezují pacienta v denních aktivitách. Pacient je odkázán na nezbytnou pomoc svého okolí, což vede ke snížení kvality života nejen pacienta samotného, ale i pečujících rodinných příslušníků. Vzhledem k prodloužení celkové délky lidského života lze v budoucnu očekávat velký nárůst případů této choroby, což, bereme-li v potaz náklady spojené s léčbou, znamená závažný zdravotnický a socio-ekonomický problém, kterým je vhodné se zabývat.

Přes mnohé teorie vysvětlující její vznik není etiologie této nemoci dodnes dostatečně známá pro umožnění kauzální léčby. Důležité místo však má takzvaná cholinergní teorie, podle které je významným faktorem v patologii AD úbytek acetylcholinu (ACh). Díky této teorii je možná alespoň symptomatická léčba, která je soustředěna na užívání inhibitorů cholinesteráz. Jejím cílem je navýšit koncentraci ACh na synapsích a tímto zmírnit průběh nemoci.

Cílem diplomové práce je syntéza a hodnocení potenciálních inhibitorů cholinesteráz jakožto potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby.

Teoretická část práce pojednává o Alzheimerově chorobě a její léčbě, dále jsou prezentovány výsledky rešeršní práce na téma dříve připravených derivátů salicylanilidu jakožto inhibitorů cholinesteráz.

Praktická část práce přináší syntézu nových potenciálních inhibitorů cholinesteráz a jejich biologické hodnocení. Na závěr jsou prodiskutovány dosažené výsledky.

2. Teoretická část

2.1. Alzheimerova choroba

2.1.1. Objev

Po léta neznámá, resp. nepojmenovaná choroba; toto neurodegenerativní onemocnění bylo uvedeno do povědomí vědecké obce v roce 1906 Aloisem Alzheimerem. Vše odstartoval případ padesátileté pacientky Augusty D.¹ Případ, který Alzheimera zaujal rychlou degenerací Augustiných kognitivních funkcí od jejího přijetí do psychiatrické léčebny ve Frankfurtu v roce 1901 až po její smrt 8. dubna 1906. Za tuto dobu se u Augustiny vystřídaly symptomy počínající neléčitelnou paranoiou a končící velmi intenzivními poruchami spánku, poruchami paměti, agresivitou a celkovou zmateností. Následná autopsie odhalila rozsáhlé morfologické změny v cerebrálním kortexu, později známé jako neurofibrilární klubka a senilní plaky.¹ Tímto byly položeny určité základy o patologii nemoci, od té doby známé jako Alzheimerova choroba.

2.1.2. Charakteristika demence, klinický obraz

Alzheimerova choroba a demence jsou dva pojmy, které k sobě bezpochyby patří. Nicméně pro adekvátní charakterizaci Alzheimerovy choroby je nejdříve nutné objasnit pojem demence. Oba (AD a demence) jsou nezdůvodněně používané jako synonyma, avšak přes jejich úzkou spjatost se jedná o dva odlišné koncepty.

Pojem „demence“ pochází z latinského slova „demens“, které původně znamenalo „šílenství“. Demence nereprezentuje jistou konkrétní poruchu či onemocnění, ale představuje obecný syndrom spojený s progresivní ztrátou paměti a degradací jiných kognitivních a intelektuálních funkcí.²

Mezinárodní klasifikace nemocí (česká verze MKN-10) a přidružených zdravotních problémů přesněji definuje demenci jakožto „syndrom způsobený chorobou mozku, obvykle chronické nebo progresivní povahy, kde dochází k porušení mnoha vyšších nervových kortikálních funkcí, k nimž patří paměť, myšlení, orientace, chápání, počítání, schopnost učení, jazyk a úsudek, v takové míře, která omezuje soběstačnost a trvá minimálně šest měsíců“.³

Za demencí se může skrývat mnoho příčin a lze ji rozdělit na dva typy: primární demence a sekundární demence. Primární demence zahrnuje Alzheimerovu chorobu, vaskulární demenci, demenci s Lewyho tělísky a frontotemporální demenci. Jsou to typy

demence, kde demence sama o sobě představuje hlavní příznak organické mozkové choroby a není způsobena nějakým přidruženým onemocněním. Sekundární demence jsou tedy demence způsobené jiným onemocněním, jako např. HIV, roztroušená skleróza, alkoholismus a Parkinsonova choroba.⁴

Nástup demence, nehledě na její příčinu, lze u pacienta vyzorovat nejčastěji díky zhoršující se krátkodobé paměti. Do raných stadií demence lze také zařadit ztrátu vnímání času či nepoznávání známých míst.⁵ Některé aktivity v domácnosti mohou náhle představovat potíže. S progresí se pro nemocného stává vyjadřování, rozhodování či dokončení myšlenek čím dál tím více obtížnější.³ Pacient si již nevybavuje recentní události či jména známých lidí. Je dezorientovaný, může se ztrácet i ve své domácnosti.⁵ Pacientova osobnost se mění, může být vystupňovaná agresivita.⁶ Poslední stádia nemoci představují pro postiženého kompletní neschopnost postarání se o sama sebe. Problémy s motorikou, dýcháním či dokonce polykáním jsou na denním pořádku a nepředstavitelně snižují kvalitu života.⁷

Alzheimerova choroba, jak již napovídá název, je na rozdíl od demence, onemocnění samo o sobě. Obecně je definováno jako neurodegenerativní onemocnění,⁸ což v praxi znamená, že u pacientů dochází k postupnému úbytku neuronů v centrální nervové soustavě (CNS).⁹ Odhaduje se, že AD zastupuje až 75 % případů demence,¹⁰ výše zmíněné symptomy tohoto syndromu je tím pádem možné zařadit mezi příznaky manifestace AD. Lze dodat, že u pacientů s pokročilou AD se vyskytuje také pneumonie, která u většiny z nich představuje bezprostřední příčinu úmrtí.^{11,12}

2.1.3. Epidemiologie

ADI (Alzheimer's Disease International) uvádí v roce 2015 50 milionů evidovaných celosvětových případů.¹³ Každé tři sekundy se objeví nový případ, což může do roku 2030 zvýšit světový počet pacientů až na 75,6 milionů.³

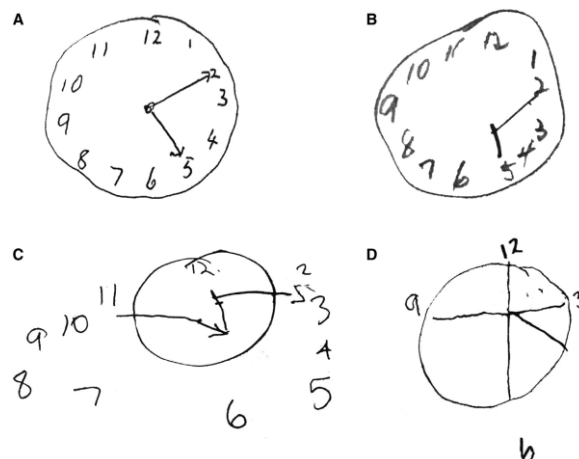
Česká republika se řadí mezi země, jejichž počet pacientů je nižší než světový průměr. Statistiky tří největších pojišťoven v ČR (Veřejná zdravotní pojišťovna, Česká průmyslová zdravotní pojišťovna, Zdravotní pojišťovna ministerstva vnitra) ukazují, že v roce 2016 bylo v ČR evidováno 45 749 případů AD. Náklady na tuto nemoc činily jen v ČR za rok 2016 přibližně 1 bilion korun. Nejen tato enormní částka vydaná na léčbu AD, ale také impakt, který tato nemoc má na pacienta a jeho okolí, jen potvrzuje to, že AD představuje vážný socio-ekonomický problém.^{5,14}

2.1.4. Diagnostika

Diagnóza AD je zřídka jednoduchý proces. Časně symptomy AD bývají často zaměňovány za přirozené projevy stáří^{15,16} a nemoc je tím pádem rozpoznána až v pokročilých stádiích, jejichž nástup by mohl být adekvátní včasnou léčbou oddálen.¹⁷

Diagnózu AD však předstihuje diagnóza demence. Je nutné odstranit jiné možné příčiny demence (viz kap. 2.1.2. Charakteristika demence, klinický obraz). K diagnóze slouží klinická vyšetření, anamnestické údaje a testy. Nejčastější, avšak ne zcela přesný screeningový test je Mini-Mental State Examination (MMSE). Tento test může poskytovat falešně negativní výsledky – člověk s poměrně vysokým skóre v tomto testu může přesto trpět Alzheimerovou chorobou. Test kreslení hodin (Clock-Drawing Test, viz obr. 1) je pro Alzheimerovou demenci specifitější.^{16,18} Užitečné jsou složitější testy kognitivních funkcí, především ADAS-cog (Alzheimer Disease Assessing Test – kognitivní složka). Dle doporučených postupů České lékařské společnosti by mělo být zavedeno vyšetření kognitivních funkcí jako součást pravidelné všeobecné preventivní prohlídky u pacientů starších 65 let či u nemocných, kteří mají podezření na problémy s pamětí nebo se u nich vyskytují spouštěče či průvodní znaky kognitivních poruch (deprese, změna osobnosti, zhoršení chronických chorob, nevysvětlené pády, závratě).¹⁹ Diagnosticky důležitý je průběh a klinický obraz demence – pomalá progresse, lineární progresse deteriorace, poruchy epizodické paměti a postupně i dalších složek paměti, časný úpadek osobnosti.¹⁶

Diferenciální diagnózu lze potvrdit zobrazovacími metodami (CT, MRI, PET).^{16,20,21} Dále k tomuto účelu slouží stanovení takzvaných biomarkerů (hladiny tau a fosforylovaného tau-proteinu a hladina beta-amyloidového peptidu 1-42; A β) v cerebrospinálním likvoru.^{16,20} Nejedná se však o rutinní přístup.



Obrázek 1 Test kreslení hodin²²

2.2. Patofyziologie a etiologie AD

AD je charakterizovaná destrukcí neuronů v cerebrálním kortexu, amygdale, frontálním laloku, limbickém systému a hippocampu. Jedná se o části mozku, které jsou asociovány s pamětí, učením, emocemi a chováním. Vývoj nemoci nejvíce postihuje cholinergní systém.⁹ Pro důležitost tohoto systému v léčbě AD a vzhledem k cíli diplomové práce budou jeho charakteristiky podrobněji probrány v kapitole 2.3. Cholinergní teorie.

Většina pacientů (90 %) trpí takzvanou sporadickou formou AD, jejíž hlavní rizikové faktory jsou věk, diabetes mellitus typu 2 (DM2) a zvýšená hladina apolipoproteinu E4. Zbývajících deset procent trpí genetickou formou AD způsobenou mutací genů pro A β PP (beta amiloidní prekursorový protein), presenilin 1 a presenilin 2²³ (viz kapitola 2.2.4. Rizikové faktory a prevence).

Patologické změny v CNS vyskytující se během AD jsou vysvětlovány formací neuritických plaků (NP) a neurofibrilárních klubek (NFT). Histologické proměny takto postižené CNS jsou pro lepší představu ilustrovány na obr. 2. Za vznik těchto útvarů jsou zodpovědné nefyziologické změny beta-amyloidního peptidu a tau proteinu (TP).⁹ Kromě těchto dvou patologických útvarů hrají významnou roli v patogenezi AD také oxidativní stres, mitochondriální dysfunkce, zánětlivé procesy a neenzymová glykace proteinů a nukleových kyselin.^{9,23} V neposlední řadě lze také vzpomenout glutamát a jeho neurotoxický vliv.²⁴ V praxi se pak jistě všechny tyto procesy kombinují.

2.2.1. Amyloidní β peptid a neuritické plaky

A β peptid je přirozený produkt metabolismu amyloidního prekursorového proteinu (APP), což je transmembránový protein nervových buněk.^{9,16} Po zabudování do buněčných membrán je APP zpracován přes tři kompetitivní cesty – dvě amyloidní cesty a jednu neamyloidní.²³

Během neamyloidního procesu je APP fyziologicky štěpen enzymem alfa-sekretázou na krátké a rozpustné fragmenty (beta-peptid 1-40). Tento peptid hraje roli při tvorbě nových neuronálních synapsí.¹⁶ Má neuroprotektivní a paměť potencující efekt.²³ Nízké koncentrace amyloidních beta-peptidů přítomné v CNS nedementních pacientů mohou představovat negativní zpětnou vazbu v regulaci synaptické plasticity a přežití neuronů. Například

neuroprotektivní role A β (1-42) monomeru je mediovaná aktivací fosfatidylinositol-3-kinázové cesty a stimulací receptoru inzulinové skupiny.²³

Za nefyziologických podmínek Alzheimerovy choroby je v rámci amyloidních procesů APP štěpen enzymy beta- a gama-sekretázou, což vede k přímé extracelulární (v menší míře i intracelulární) produkci beta-amyloidních peptidů (A β P).^{16,23} Nashromáždění těchto peptidů v intra- a extracelulárních prostorech, potažmo v mozku a stěně cerebrálních cév, vede k formaci NP. Vzniklé NP následně způsobují neurotoxicitu.^{9,23} Nadměrná exprese APP nebo snížená clearance jsou potenciálními vysvětleními vzniku amyloidního procesu. Tyto situace vznikají také díky mutaci genu kódujícího APP (chromozom 21) a genu kódujícího presenilin 1 a 2 (chromozomy 14 a 1).²³

Vedle formace neuritických plaků interferují A β P (1-42) také se synaptickou transmisí různými mechanismy, např. vystupňováním neuronální smrti v důsledku nadměrné intracelulární akumulace Ca²⁺ či snížením glutamátového reuptake.²³

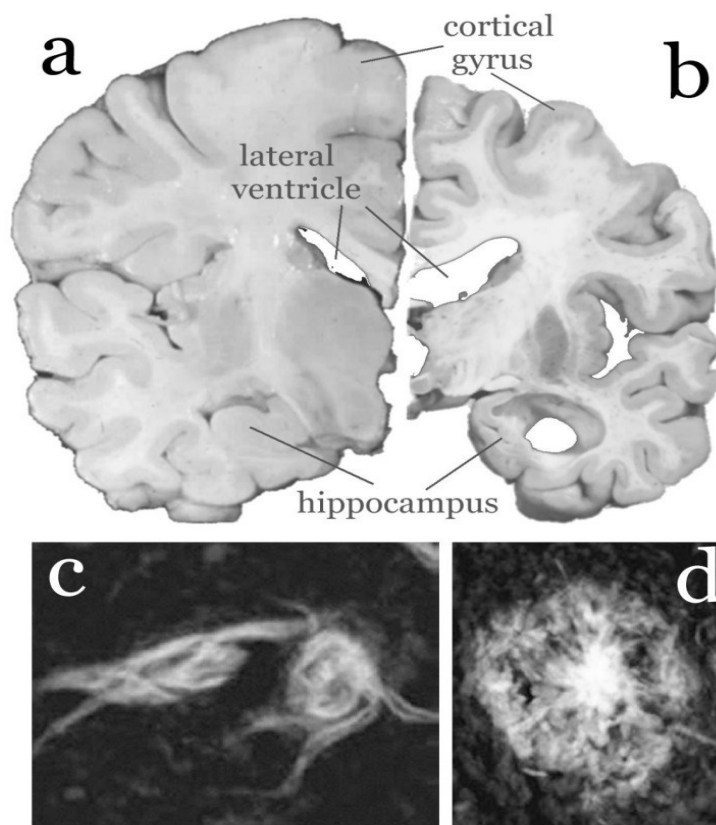
2.2.2. Tau protein a NFT

Formace NFT může být vysvětlena hyperfosforylací tau proteinu. Tau protein podněcuje organizování tubulinu do mikrotubulu. Je tak důležitý pro formaci neuronálního cytoskeletu a jeho stabilitu.^{16,23} Stabilita a růst mikrotubulů jsou nadále podporovány fosfatázami, které katalyzují defosforylaci tau proteinu. Na druhé straně je tento proces narušovaný aktivitou kináz a kaspáz, které fosforylují TP.^{16,23} Hyperfosforylovaný tau protein je neschopný se navázat na mikrotubuly, což má za následek denaturaci mikrotubulů a potažmo cytoskeletu. Volný TP následně agreguje do velkých klubek filamentů, a tímto tvoří útvary označované jako neurofibrilární klubka.^{23,25} Intracelulární transportní procesy jsou tím pádem narušeny, mimo jiné dochází k akumulaci A β v buňkách, což vyúsťuje v úmrtí neuronálních buněk (přes apoptózu)¹⁶ a posléze v celkové neurodegeneraci.⁹ Dochází ke snížení synaptické plasticity, ke snížení tvorby některých růstových faktorů mozku a k dalším degenerativním změnám. Apoptóza u Alzheimerovy choroby se progresivně stupňuje a dochází tak k atrofii mozku.¹⁶

Stupeň tau fosforylace se zvětšuje s věkem a je urychlován vysokou koncentrací glukózy v krvi. Poměrně často se u lidí trpících AD vyskytují příznaky metabolického syndromu – diabetes mellitus, hypertenze, abdominální obezita.¹⁶

2.2.3. Glutamátová neurotoxická

Glutamát je neurotransmitter zajišťující více než 90 % synaptických transmisí v lidském mozku. Jako receptory pro glutamát slouží AMPA, NMDA a metabotropní glutamátové receptory. Z hlediska AD mají významnou roli ionotropní NMDA receptory, které se zapojují do influxu Ca^{2+} a zodpovídají za procesy učení a paměti. Jakákoliv mutace v glutamátových transportérech má za následek větší akumulaci glutamátu v krvi než mozku, což ve výsledku vede ke zvýšenému přechodu glutamátu z krevního řečiště do neuronu. Větší koncentrace glutamátu v mozku vede následně k nadměrné aktivaci NMDA receptorů a akumulaci Ca^{2+} iontů. Tato dysbalance v koncentraci vápenatých iontů vede k produkci kyslíkových radikálů mitochondriemi. Ve finále dochází k úmrtí neuronů. Tyto procesy se významně podílejí také na toxicitě $\text{A}\beta$ plaku.²⁴ Poznatky o glutamátové neurotoxické představují jeden ze základů léčby AD.



Obrázek 2 *Atrofie lidského mozku při Alzheimerově chorobě [b] v porovnání s fyziologickým mozkiem [a]. Snímek [d] prezentuje amyloidní plaky, zatímco snímek [c] zobrazuje neurofibrilární klubka.*²⁶

2.2.4. Rizikové faktory a prevence

Vedle věku se mezi nejnámější rizikové faktory řadí výskyt demence v rodině, poranění hlavy, genetické faktory, ženské pohlaví, nízká úroveň vzdělání, vaskulární onemocnění a vlivy prostředí.¹¹ Rizikové faktory je tedy možné rozdělit na dvě kategorie, a to faktory genetické a negenetické.²⁷

2.2.4.1. Genetické faktory

Familiární AD představuje zhruba 5 % procent případů AD.²⁸ Jako příčina byly identifikovány mutace genů na čtyřech chromozomech, mezi něž se řadí chromozom 21, chromozom 19 a chromozomy 14 a 1.^{11,28}

Chromozom 21: Lokalizace genu pro A β PP poukazuje na vztah mezi patologií pozorovanou u pacientů s Downovým syndromem (trizomie 21) a pacientů s AD. Nadměrná exprese A β PP má toxické následky v CNS. Dále nadměrná exprese mutovaného A β PP vyzorovaná u transgenních myší vedla k formaci senilních plaků.¹¹

Chromozom 19: ϵ 4 alela apolipoproteinu E (ApoE) je jedním z největších rizik rozvoje AD. Mechanismus, kterým ApoE ovlivňuje patogenezi AD, není zcela znám, nicméně ApoE jakožto sérový transportní protein cholesterolu je komponentou senilních plaků a NFT.¹¹

Chromozom 14/Chromozom 1: Většina (přibližně 70 %) časných familiárních případů AD je asociovaná s mutací genů pro presenilin 1 (chromozom 14) a presenilin 2 (chromozom 1). Bylo identifikováno více než 30 různých patogenních mutací těchto dvou genů. Preseniliny jsou součástí γ -sekretázového komplexu důležitého pro syntézu A β peptidu. Mutace pak vede ke zvýšené syntéze a ukládání A β vedoucí následně k formaci plaku.^{11,28}

2.2.4.2. Negenetické faktory

Negenetické faktory mají na svědomí sporadické formy AD, které představují 95 % případů.

Diabetes mellitus (DM): Diabetes byl podle několika studií spojen se zvýšeným rizikem AD a demencí.²⁹ Přesněji řečeno, DM je zodpovědný za onemocnění cév vedoucí k poškození bílé hmoty mozkové a narušení hematoencefalické bariéry (HEB). Toto ve výsledku vede k degeneraci a zánětu neuronu. Nízké hladiny inzulínu vedou ke snížení inzulín-degradujícího enzymu, což přispívá k akumulaci A β a hyperinzulinemii. Hyperinzulinemie poté aktivuje glykogen syntázu kinázu 3 beta, což má jako následek fosforylaci tau proteinu. Vysoká

koncentrace glukózy v plasmě vede k atrofii hippocampu. Špatně kompenzovaný DM je asociován s úpadkem kognitivních funkcí a poukazuje takto na vztah mezi stupněm onemocnění a rychlostí kognitivní deteriorace.³⁰

Hypertenze: Hypertenze byla několika studiemi prokázána jako rizikový faktor, avšak tato spojitost je závislá na věku pacienta. Vysoký krevní tlak zejména ve středním věku významně zvyšuje riziko AD.^{29,30} Na zvýšení rizika AD se podílí přes stimulaci neurodegenerativních procesů a přímého cerebrovaskulárního poškození (cerebrální mikrokrvácení a mikroinfarkty).^{30,31}

Obezita: Obezita (body-mass index ≥ 30 kg/m²) představuje zvýšené riziko pro všechny typy demence.²⁹ Podobně jako v případě hypertenze je tento rizikový faktor závislý na věku pacienta a je významnější ve středních letech.²⁹ Velký rozvoj tukové tkáně vede k inzulinové rezistenci, glykosylaci nejrůznějších biomolekul a zvýšeným hodnotám adipokinů a cytokinů, což jsou faktory spojované s AD, resp. jakýmkoli typem demence.³⁰

Cholesterol: Vysoké hodnoty cholesterolu ve středním věku mohou vést k rozvoji AD přes dva mechanismy: na jedné straně vyúsťuje vysoká hladina cholesterolu v aterosklerózu, která sama o sobě reprezentuje vysoké riziko pro vaskulární a cerebrovaskulární onemocnění; na druhé straně byla vysoká hladina cholesterolu spojena s větším ukládáním amyloidu v mozku.^{30,31}

Fyzická (in)aktivita: Fyzická aktivita ve středním věku zmenšuje riziko demence včetně AD, což může být vysvětleno snížením rizika kardiovaskulárních onemocnění a redukcí ztráty mozkové tkáně.²⁹⁻³¹ Vysoká a průměrná fyzická aktivita snižují riziko kognitivní degenerace u zdravých jedinců o 38 %, resp. 35 %. Z tohoto benefitu těží o něco více jedinci s ApoE $\epsilon 4$ alelou.³⁰ Aerobní cvičení také přispívá ke snížení rozvoje demence přes přímý neurotrofický efekt a zlepšení cerebrovaskulárního a kardiovaskulárního profilu.^{27,30} Středomořská strava spojená s vyšší fyzickou aktivitou se zdá být protektivní vůči AD. Na zachování kognitivních funkcí mají však větší vliv intelektuální koníčky.³⁰

Kouření a alkohol: Studie prokazující riziko kouření a alkoholu na rozvoj demence a AD nedošly ke konzistentním výsledkům. V rámci kouření představují rizikový faktor (více než nikotin) substance (více než 4000) vznikající během kouření. Tyto sloučeniny spouštějí oxidativní stres, neuronální degradaci a formaci senilních plaků. Údaje ohledně vlivu alkoholu naznačují, že mírná konzumace alkoholu má protektivní účinek, zatímco abúzus alkoholu riziko demence a kognitivního úpadku potencuje.^{29,30}

Sociální charakteristiky: Vysoká sociální úroveň, vysokoškolské vzdělání nebo pravidelné zapojování se do kognitivních aktivit (učení se, čtení, hraní her) a harmonický vztah jsou prokázanými protektivními faktory. Jedinci s nižším vzděláním či inteligenčním kvocientem nebo malými intelektuálními výkony mohou tedy být vystaveni většímu riziku AD.^{29,30} Zpoždění v růstu a vývoji organismu vycházející z nekvalitní výživy (především u sociálně slabých rodin) v dětství a adolescenci výrazně zvyšují riziko AD v pozdních stádiích života, a to kvůli ne zcela využitému potenciálu mozkových buněk před jejich maturací a během ní.³²

2.3. Cholinergní teorie

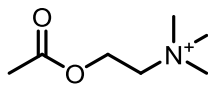
Cholinergní systém je prvním a zároveň nejvíce postiženým neurotransmitterovým systémem zasaženým u Alzheimerovy choroby.^{8,9} Bývá přítomen deficit enzymu cholin acetyltransferázy (ChAT), který syntetizuje acetylcholin z cholinu a z acetylkoenzymu A. Omezeno je také zpětné vychytávání cholinu ze synaptické štěrbin. Dalším mechanismem, který přispívá k acetylcholinergnímu deficitu, je zvýšená tvorba butyrylcholinesterázy, enzymu rovněž odbourávajícího acetylcholin.

Acetylcholin hraje důležitou roli v kognitivních procesech: je nezbytný pro paměťové mechanismy, zejména pro krátkodobou paměť, vstřípivost nových informací a konsolidaci paměťových stop.⁸ Rozvoj AD vede k redukci počtu cholinergních neuronů, což implikuje ztrátu nikotinových receptorů v hipokampu a kortexu.⁹ Následné deficity v cholinergní transmissi mohou tedy ovlivnit všechny aspekty kognice, ale i chování; disrupce cholinergní projekce do kortexu může tudíž také poškodit pozornost a rozhodovací procesy.³³ Kromě kognitivní alterace jsou často pozorovány u pacientů s AD přidružené psychiatrické symptomy včetně apatie a deprese. Panuje všeobecný konsensus, že ztráta cholinergních neuronů a následovné poškození dopaminergní neurotransmise i dalších neuromediátorových systémů včetně glutamátových by mohly být faktory vedoucí k dalším psychiatrickým symptomům AD.^{9,33}

Cholinergní teorie byla mimo jiné podpořena studii zahrnujícími aplikaci centrálních anticholinergních léčiv, např. skopolaminu. Ve výsledku vedlo jeho podávání ke zhoršení kognitivních funkcí, převážně pak alteraci paměti.³⁴

2.3.1. Acetylcholin

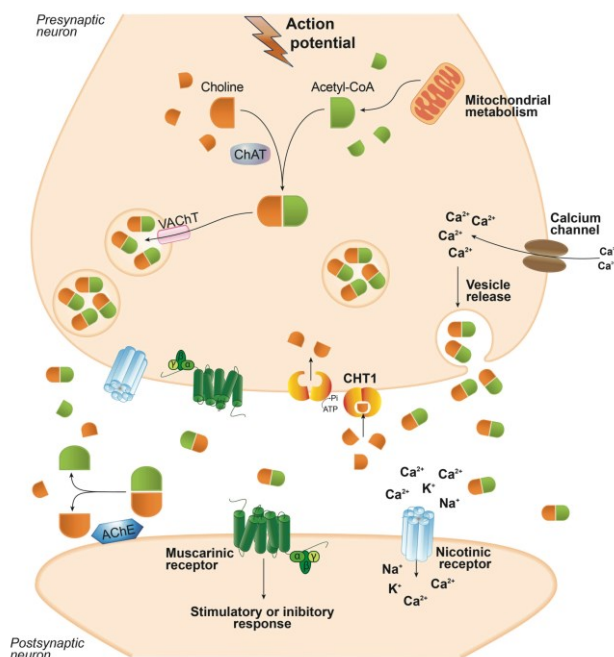
Acetylcholin (ACh) (viz obr. 3) byl prvním identifikovaným neurotransmiterem, který hraje důležitou roli v periferní a centrální nervové soustavě. Mezi receptory s afinitou pro ACh se řadí nikotinové a muskarinové. Muskarinové receptory se nacházejí převážně v efektorových orgánech na postgangliovém zakončení parasymptiku a lze je rozdělit na pět základních typů (M1, M2, M3, M4, M5). Nikotinové receptory se dělí na svalové (N_M), tj. přítomné hlavně na nervosvalové ploténce, a neuronální (N_N), nacházející se na postsynaptické membráně vegetativních ganglií a v mozku.³⁵



Obrázek 3 Acetylcholin

Syntéza ACh se odehrává v cytoplasmě cholinergních neuronů enzymem cholin acetyltransferázou z cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA). Po syntéze je ACh transportován vezikulárním acetylcholinovým transportérem (VAcHT) z cytosolu do synaptických vezikul.³³

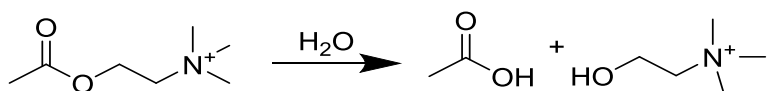
Aktivita ChAT je regulovaná depolarizací neuronu, influxem Ca²⁺ a fosforylací enzymu. Po depolarizaci neuronu je ACh exocytózou vypuštěn do synaptické štěrbině, kde aktivuje jak muskarinové, tak nikotinové receptory. V synaptické štěrbině je rychle deaktivován enzymem acetylcholinesterázou (AChE) za vzniku cholinu a acetátu (viz obr. 4).³³



Obrázek 4 Schematické znázornění účinku ACh³³

2.3.2. Cholinesterázy

Cholinesterázy jsou skupina enzymů katalyzujících hydrolýzu ACh na cholin a kyselinu octovou (viz obr. 5). Existují dva takovéto enzymy, a to acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE).^{36,37}



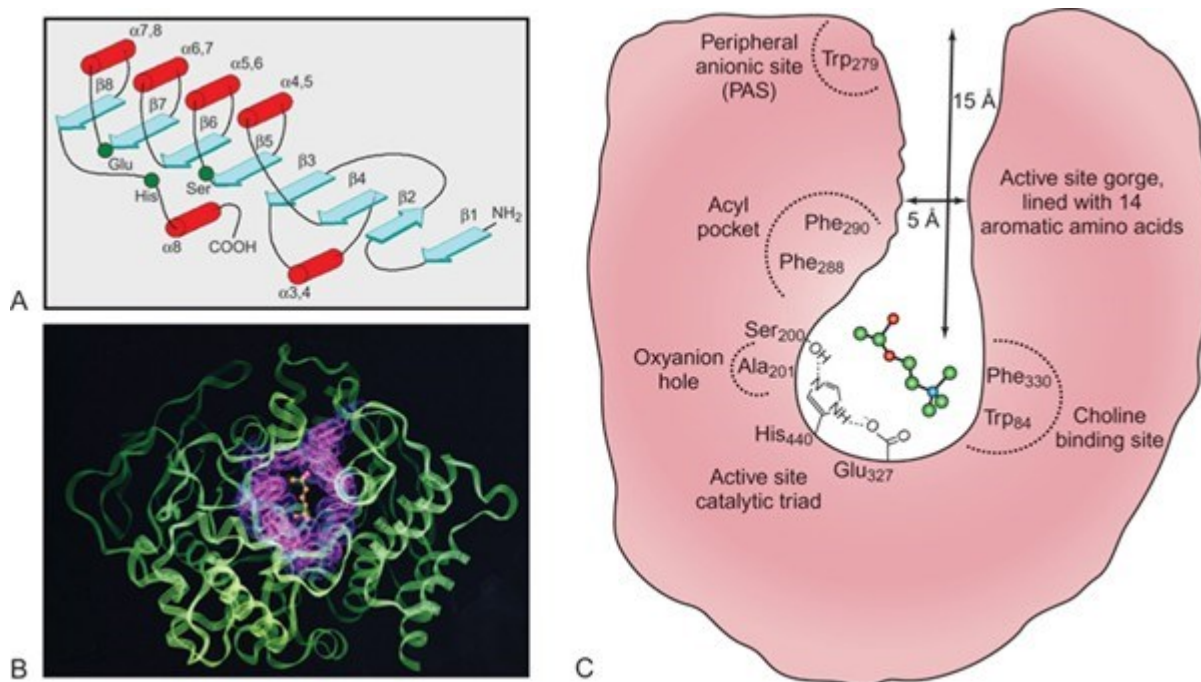
Obrázek 5 Hydrolýza acetylcholinu na kyselinu octovou a cholin

AChE není schopna hydrolyzovat molekuly s vyšší molekulární hmotností, ale má vysokou afinitu k acetylcholinu, zatímco BuChE má větší afinitu pro butyrylcholin, syntetický analog ACh. Rozdíl v těchto afinitách může být dán rozdíly v aromatických šterbinách obou enzymů.³⁷

Acetylcholinesteráza se nachází ve většině typů tkání: nervech a svalech, centrálních a periferních tkáních, motorických a senzorických vláknech atd.³⁶

Struktura AChE byla detailně zkoumána už od 30. let 20. století.³⁸ První experimenty byly provedeny na AChE parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*). Aktivní místo jeho

AChE leží na dně dlouhé a úzké kavity hluboké 20 Å. Aktivní místo obsahuje katalytickou triádu, esteratické místo tvořené těmito aminokyselinami: Ser200, His440 a Glu327. Anionické místo (α -anionické místo) je další částí aktivního místa a je blízko esteratického místa. Zatímco esteratické místo po navázání substrátu hydrolyzuje esterové vazby, anionické místo reaguje s kvartérním amoniovým dusíkem acetylcholinu a je zodpovědné za jeho správnou orientaci (viz obr. 6). Vstup substrátu do aktivního místa přes štěrbinu složenou z aromatických aminokyselin umožňuje větší selektivitu ve prospěch ACh vůči butyrylcholinu. Mezi specifická místa se dále řadí tzv. periferní anionické místo, označované také jako β -anionické místo. Nachází se na povrchu AChE v blízkosti vstupu k jejímu aktivnímu místu.³⁹ Periferní anionické místo hraje pravděpodobně důležitou roli ve vývoji AD. Přesněji řečeno, amyloidní β peptid interaguje s periferním anionickým místem, což ve výsledku vede k formaci amyloidních plaků,³⁷ jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2. Patofyziologie a etiologie AD.



Obrázek 6 Molekulární struktura AChE rejnoka kalifornského (*Torpedo californica*). (A) Schematická reprezentace sekundární struktury AChE. Katalytická triáda je znázorněna zelenými body. (B) Krystalická struktura AChE s ACh v aktivním místě. (C) Řez AChE s ACh v aktivním místě⁴⁰

BuChE, známá také jako pseudocholinesteráza nebo plasmatická cholinesteráza, se nachází primárně v játrech, kde je produkována, vysoce aktivní je také v plicích a plazmě. BuChE hydrolyzuje butyrylcholin (BCh) rychleji než ACh. Její fyziologický substrát není znám,

podobně jako její hlavní fyziologická funkce. Podílí se mj. na metabolizaci některých xenobiotik obsahujících esterovou vazbu.³⁶

V pokročilých stádiích AD může být aktivita AChE snížena až na 55-67 % fyziologických hodnot, zatímco aktivita BuChE se zvětšuje. Poměr BuChE vůči AChE se dramaticky mění v postižených kortikálních oblastech. Tato alterace v poměru AChE/BuChE během průběhu onemocnění mění roli BuChE z podpůrného enzymu na důležitý regulační enzym. Vyskytují se důkazy o tom, že BuChE může hrát roli v agregaci A β , která probíhá v raných stádiích formace senilních plaků. Jak AChE, tak BuChE se akumulují v amyloidních placích a jsou nalézány v neurofibrilárních klubkách. Zvyšující se hladina i aktivita BuChE jsou nadále spojovány s rozvojem kortikálních a neokortikálních neuritických plaků. Přídavek BuChE k A β v tkáňových kulturách zvyšuje toxicitu A β , což poukazuje na potenciální terapeutické využití inhibice BuChE v léčbě AD.^{41,42}

2.4. Inhibitory ChE

Inhibitory cholinesteráz (léčiva, přírodní toxiny, pesticidy, bojové látky) jsou širokou skupinou chemických sloučenin s rozdílnými strukturami, a tudíž i fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Sloučeniny inhibující AChE mohou být rozděleny podle místa působení na ChE, mechanismu inhibice nebo také podle jejich chemické struktury. Z biochemického pohledu je lze také rozlišovat podle typu inhibice.

Dělení podle místa působení:³⁷

1. Sloučeniny vázající se na aktivní centrum a reagující s esteratickým (např. nervově paralytické látky) nebo anionickým místem (např. takrin),
2. Sloučeniny interagující s aromatickou štěrbinou (např. dekamethonium),
3. Sloučeniny vázající se na periferní (β) anionické místo (např. huperzin).³⁷

Podle mechanismu inhibice:³⁶

1. Reverzibilní inhibice kompetitivní (např. edrofonium, viz obr. 7) nebo nekompetitivní,
2. Ireverzibilní inhibice (organofosfátové sloučeniny, viz obr. 8),
3. Pseudo-ireverzibilní (typicky karbamáty).

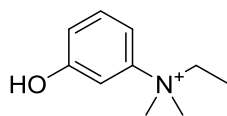
Podle jejich chemické struktury:⁴³

1. Jednoduché alkoholy s kvartérním dusíkem (např. edrofonium),

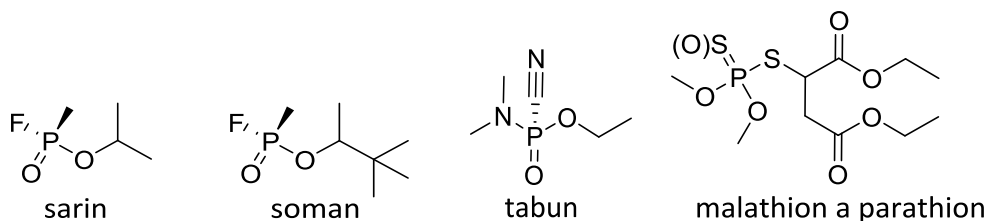
2. Estery kyseliny karbamové (karbamáty),
3. Organické sloučeniny kyseliny fosforečné (organofosfáty),
4. Inhibitory různých struktur.

2.4.1. Inhibitory reagující s esteratickým místem

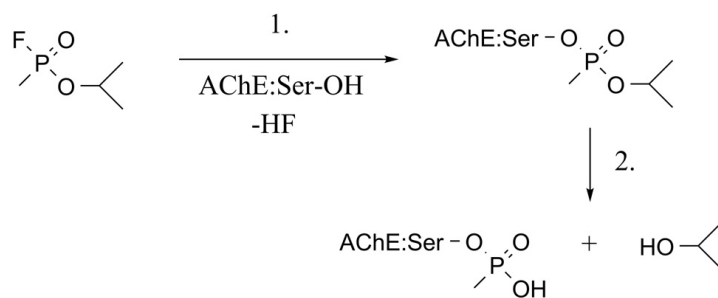
Jedná se o inhibitory se strukturou organofosfátových nebo karbamátových derivátů. Inhibitory esteratického místa jsou převážně toxiny, chemické bojové látky nebo pesticidy.³⁷ Tyto sloučeniny reagují se serinem v katalytické triádě aktivního centra, což vede ke vzniku esteru. Organofosfátové sloučeniny tvoří stabilní kovalentní vazbu s hydroxylovou skupinou serinu (viz obr. 9). Po určité časové prodlevě tato vazba podléhá „stárnutí“, vzniklou vazbu již není možné rozštěpit a enzym zůstává neaktivní. Některé molekuly podané včas mohou však tuto (ještě „nezestárlou“) vazbu narušit, hovoří se o takzvaných reaktivátorech, chemicky nejčastěji oximech (pralidoxim, trimedoxim, obidoxim).³⁷ Struktura těchto látek je ilustrována na obr. 10. Karbamátové sloučeniny vstupují do aktivního místa a ovlivňují esteratické místo vytvořením kovalentní vazby (karbamoylací) s hydroxylovou skupinou serinu.⁴⁴ Karbamoylovaná skupina hydrolyzuje pomaleji než acetylovaná (30-60 min dle typu látky) a tímto je snížena dostupnost AChE pro rozklad ACh.^{35,36} Hlavní rozdíl mezi organofosfáty a karbamáty tedy spočívá ve stabilitě tvořených komplexů enzym-inhibitor. Fosforylace organofosfáty je ireverzibilní, zatímco méně stabilní karbamátová vazba je po určitém čase kompletně hydrolyzována a takováto inhibice je označována jako pseudo-ireverzibilní.⁴⁴



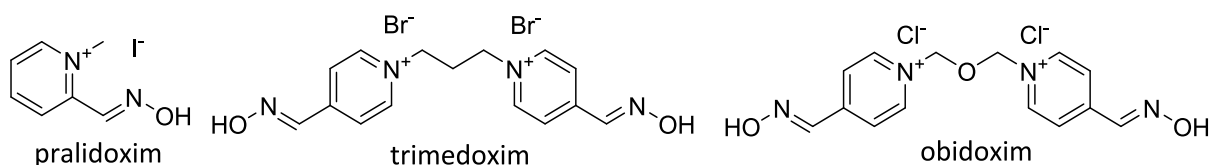
Obrázek 7 Edrofonium



Obrázek 8 Organofosfátové sloučeniny



Obrázek 9 *Inhibice AChE nervovou bojovou látkou sarinem (reakce 1) a následné stárnutí vazby (reakce 2)*³⁷



Obrázek 10 *Oximy*

2.4.2. Inhibitory vázající se na aromatickou štěrbinu

Aromatická štěrbinu není typickým primárním cílem inhibitorů cholinesteráz. Na druhé straně inhibitory reagující s α -aniontovým místem mohou reagovat také s aromatickou štěrbinou. Jako příklad takto působící molekuly lze uvést galantamin.³⁷

2.4.3. Inhibitory periferního anionického místa

Periferní anionické místo je hlavním cílem mnoha farmakologicky důležitých látek. Ukládání amyloidních plaků může být urychleno nebo spuštno interakcí $A\beta$ s periferním anionickým místem. Inhibice tohoto periferního aniontového místa nemá díky zvýšení dostupnosti acetylcholinu jen symptomatické účinky, ale, jak vyplývá z výše uvedeného, může také zpomalit ukládání amyloidních plaků.³⁷

2.5. Farmakoterapie AD

Do farmakoterapie AD založené na důkazech (Evidence-Based Medicine) se aktuálně řadí takzvaná kognitiva.⁸ Jak již bylo zmíněno, cholinergní systém je zásadním prvkem v patologii AD a pro ovlivnění příznaků spojených s dysfunkcí tohoto systému se používají inhibitory cholinesteráz. Do druhé skupiny kognitiv ovlivňujících neméně důležitou glutamátovou toxicitu spadají antagonisté NMDA receptoru. Obě kategorie léčiv představují primárně symptomatickou léčbu.

Vedle kognitiv lze ve farmakoterapii AD identifikovat také léčiva bez schválené indikace AD, jejich účinnost není klinicky dostatečně podložena či důkazy o jejich účinnosti zcela chybí.⁸ Řadí se mezi ně nootropní farmaka, antioxidanty, chelátory, hormonální substituční terapie, statiny, protizánětlivá léčiva a jiné. Extrakt z *Ginkgo biloba* (Egb 761) byl pro léčbu AD po mnoha klinických studiích schválen.

Poznatky o struktuře a genezi A β a NT představují základ pro výzkum nových perspektivních léčiv.^{8,45}

2.5.1. Kognitiva používaná v léčbě AD

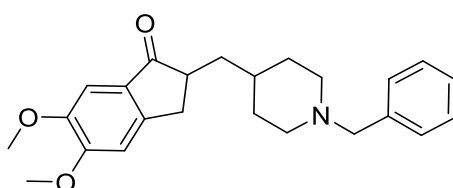
2.5.1.1. Inhibitory ChE v léčbě AD

V kontextu výše zmíněné cholinergní teorie hrají největší roli v terapii AD inhibitory AChE (IAChE), mezi které se řadí rivastigmin, galantamin a donepezil.⁴⁶

IAChE byly nasazeny v léčbě AD v 90. letech minulého století a dodnes hrají klíčovou roli.⁴⁷ Jsou indikovány pro mírná až středně pokročilá stadia AD.⁴⁸ Inhibicí AChE zvyšují koncentraci ACh a tímto zmírňují symptomy asociované s progresivní ztrátou cholinergní funkce – pozitivně ovlivňují kognitivní funkce pacienta, snižují tvorbu a toxicitu beta-amyloidu. Oddálením nástupu těžších stadií nemoci zlepšují kvalitu života pacienta a do jisté míry i prodlužují jeho soběstačnost. IAChE vykazují také určitou účinnost při mírných poruchách chování.⁴⁶

IAChE jsou celkově dobře tolerovány. Eventuální nežádoucí účinky vyplývají z jejich cholinergní aktivity a lze mezi ně zařadit gastrointestinální potíže (průjem, nauzea, zvracení), bradykardii, svalové křeče, bronchospasmus, bolesti hlavy nebo také halucinace. Nežádoucí účinky se objevují většinou na počátku léčby a lze jim předejít postupnou titrací dávky.^{15,46}

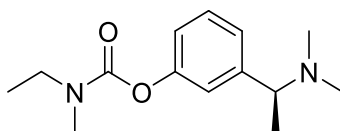
Donepezil (viz obr. 11) je centrálně působící piperidinový derivát, který reverzibilně a nekompetitivně inhibuje AChE. Je vysoce selektivní, tudíž nepůsobí na BuChE.^{46,49} Léčba donepezilem vede ke zlepšení v kognitivních testech, avšak jeho dopad na denní aktivity pacienta je méně významný. Z používaných IChE má nejdelší biologický poločas (70 hodin). Je metabolizován v játrech cytochromem P450. Donepezil je dobře snášen, kromě typických nežádoucích cholinergních účinků byl velmi vzácně diagnostikován neuroleptický maligní syndrom, avšak zejména při současném podávání s antipsychotiky. Podává se typicky jednou denně v dávce 10 mg, v současné době existují studie prokazující vyšší účinnost (při zachované toleranci) dávky až 23 mg/den.⁴⁶



Obrázek 11 Donepezil

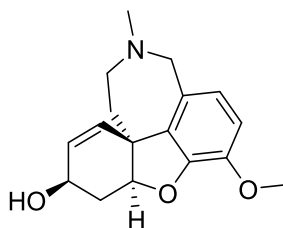
Lipofilní karbamát rivastigmin (obr. 12) dobře proniká přes hematoencefalickou bariéru, což je ovšem vlastnost společná všem léčivům demence. Rivastigmin působí jako pseudo-ireverzibilní duální inhibitor AChE a zároveň BuChE. Rivastigmin má i další výhody spojené s jeho farmakokinetickými/dynamickými vlastnostmi. Je metabolizován přímo AChE, vykazuje tedy minimum lékových interakcí, čehož lze využít u polymedikovaných pacientů (polypragmázie není u AD vzácný jev).^{46,49} Nezávislost na jaterním metabolismu umožňuje podávání u pacientů s jaterní insuficiencí. Zavedení transdermální lékové formy (patch, náplast) umožnilo podávat rivastigmin v jedné denní dávce, ale také omezilo nežádoucí účinky.^{8,46} Při používání perorální lékové formy (maximální dávka je 2x6 mg) lze omezit GIT nežádoucí účinky podáváním při jídle. Rivastigmin celkově vykazuje malou incidenci nežádoucích účinků, pro jejich omezení je však nutná dlouhá titrační doba (až 12 týdnů).

Zlepšení kognitivních funkcí je dosaženo až při vyšších dávkách rivastigminu. Ovlivnění chování a kvality života však nebylo signifikantně prokázáno.⁴⁶ Kromě AD je rivastigmin indikován jako jediný IChE také u demence u Parkinsonovy choroby.⁸



Obrázek 12 Rivastigmin

Galantamin (obr. 13) je terciární amin-alkaloid s duálním účinkem. Působí jako reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE a alosterický modulátor nikotinových receptorů, usnadňuje tak cholinergní transmissi. Metabolizován je v játrech cytochromem P450. Má pozitivní účinek na kognitivní funkce, některými studii byl také uváděn pozitivní vliv na chování a kvalitu života.^{8,46} Galantamin je obvykle dobře snášen s minimem nežádoucích účinků.¹⁶ Podává se v maximální dávce 1x24 mg.

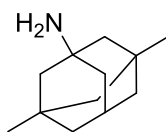


Obrázek 13 Galantamin

2.5.1.2. Antagonisté NMDA receptoru

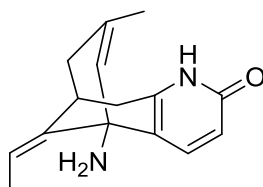
V klinické praxi je v dnešní době používána pouze jedna léčivá látka, memantin. Mezi další známé molekuly se stejným mechanismem účinku se řadí huperzin A, tato přírodní látka však nebyla v Evropě ani v USA schválena pro léčbu AD a je stále ve fázi klinického testování.

Memantin (obr. 14) je nekompetitivní antagonist NMDA receptoru. Metabolizuje se pouze z 20 %, zbylých nezměněných 80 % podléhá renální exkreci. Mezi nežádoucí účinky lze zařadit závratě, cefaleu, únavnost a halucinace. Podávání memantinu vede ke zlepšení kognitivních funkcí a kombinace s donepezilem významně zmírňovala poruchy chování. Memantin s tímto IChE představují bezpečnou a efektivní kombinační léčbu.^{8,24,46,48}



Obrázek 14 Memantin

Huperzin A (obr. 15) je alkaloid z rostliny *Huperzia serrata*. Dobře prostupuje přes HEB a reverzibilně inhibuje AChE. Působí zároveň jako antagonist na NMDA receptorech a tím poskytuje i neuroprotektivní účinky. Je uváděn jako lepší a selektivnější inhibitor než takrin a galantamin.^{24,46,50} Své zastoupení má převážně v „tradiční“ čínské medicíně, ve které je indikován při potížích s pamětí a zánětlivých onemocněních.^{24,46} Aktuálně je v USA ve třetí fázi klinického testování.⁵⁰



Obrázek 15 Huperzin A

2.5.2. Jiná léčiva používaná v terapii AD

Klinický efekt a bezpečnost extraktu z *Ginkgo biloba* Egb 761 v terapii demence byly prokázány sérií klinických studií. Výsledky plynoucí z podávání Egb 761 v terapii kognitivních symptomů u pacientů starších 80 let byly podobné jako u donepezilu. Extrakt Egb 761 mimo jiné vykazoval větší bezpečnost než toto léčivo.^{51,52} *Ginkgo biloba* lze tedy využít jako přídatnou léčbu k inhibitorům cholinesteráz a potažmo memantinu.⁸

Nootropní farmaka (piracetam, pyritinol) nevykazují v léčbě Alzheimerovy choroby očekávanou efektivitu a podávání těchto látek bylo zhodnoceno jako iracionální.⁸ Vyšší prevalence žen u onemocnění AD vedla k profylaktickému podávání estrogenů v postklimakteriu jako jeho prevenci. Přes pozitivní vliv estrogenů na mozkovou tkáň a zlepšení prokrvení nebyl klinický terapeutický efekt dostatečně prokázán a preventivní podávání je tedy sporné.^{8,9} Antioxidanty mohou zabránit degeneraci nervových buněk díky eliminaci kyslíkových radikálů. Nejvíce používaným antioxidantem je lipofilní vitamin E. Snižuje buněčné úmrtí způsobené A β .⁵⁰ Mezi jiné zkoušené lipofilní antioxidanty lze zařadit také β -karoten a kyselinu lipoovou. Navzdory předpokládané efektivitě však antioxidanty nevykazují dostatečnou klinickou účinnost.⁸ Chelatační látky vykazují efektivitu odstraňováním nadbytku Fe²⁺ a Fe³⁺ a jiných iontů (měďnaté, hlinité, zinečnaté), které jsou uváděny ve vztahu k neurotoxicitě mechanismem vzniku volných radikálů vázajících se na A β peptidy a způsobujících peroxidaci lipidů membrán.^{9,11}

2.6. Deriváty salicylanilidu jako inhibitory AChE a BuChE

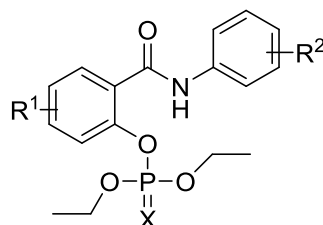
V rámci výzkumu vedeným na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy byly v dřívějších letech připraveny strukturně odlišné deriváty salicylanilidu. Tyto sloučeniny byly navrženy jakožto potenciální inhibitory AChE a BuChE; jejich inhibiční aktivita byla následně prokázána.⁵³⁻⁵⁵ Strukturně je možné tyto sloučeniny rozdělit na tři velké skupiny:

1. (thio)fosfáty,
2. *N,N*-disubstituované (thio)karbamáty,
3. *N*-alkyl karbamáty.

Přehled nejúčinnějších derivátů je uveden v tabulce 1.

2.6.1. (Thio)fosfáty

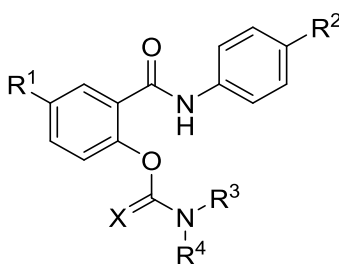
Série dvaceti sedmi diethyl-fosfátových salicylanilidových derivátů (viz obr. 16, X = O) jakožto zástupců organofosfátových sloučenin byla zhodnocena proti AChE a BuChE. Všechny látky vykazovaly značnou inhibici obou enzymů s nízkými mikromolárními hodnotami IC₅₀. Hodnota IC₅₀ je koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu (nebo také pokles aktivity enzymu na 50 %). Inhibice BuChE byla výraznější než AChE. Všechny deriváty měly aktivitu vyšší než rivastigmin vůči AChE a šest z nich mělo lepší inhibiční aktivitu vůči BuChE než rivastigmin a galantamin. Deriváty 4-chlorsalicylové kyseliny vykazovaly nejlepší výsledky. Mechanismus účinku těchto sloučenin byl experimentálně identifikován jako pseudo-ireverzibilní inhibice. Analogicky byla připravena série sedmadvaceti derivátů obsahujících diethyl-thiofosfátovou skupinu (obr. 16, X = S). I tyto deriváty účinně inhibovaly AChE a BuChE. Podobně jako v předchozím případě všechny testované sloučeniny vykazovaly větší nebo srovnatelnou aktivitu jako rivastigmin a mírně menší než galantamin.^{54,56}



Obrázek 16 Obecný vzorec diethyl-fosfátů a thiofosfátů ($R^1 = 4\text{-Cl}, 4\text{-Br}, 5\text{-Cl}$; $R^2 = 3\text{-Cl}, 4\text{-Cl}, 3,4\text{-diCl}, 3\text{-Br}, 4\text{-Br}, 3\text{-F}, 4\text{-F}, 3\text{-CF}_3, 4\text{-CF}_3$; X = O, S)^{54,56}

2.6.2. Disubstituované (thio)karbamáty

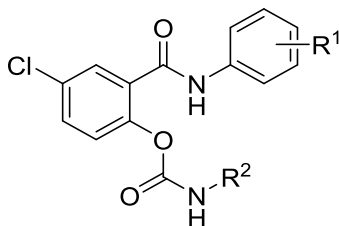
Patnáct *N,N*-disubstituovaných a pět *N,N*-dimethylthiokarbamatových derivátů (viz obr. 17) bylo testováno jako potenciální inhibitory AChE a BuChE. Všechny deriváty vykazovaly inhibici obou cholinesteráz. Víceru derivátů vykazovalo slibnou aktivitu zejména vůči BuChE. (Thio)karbamátové deriváty měly vyšší účinnost vůči AChE než rivastigmin (hodnoty $IC_{50} \leq 89,7$, resp. $501 \mu\text{M}$ u standardu) a sedm z nich také vůči BuChE (IC_{50} nižší než $19,95 \mu\text{M}$). *N*-Fenyl-*N*-methyl karbamáty a deriváty 5-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamidů byly identifikovány jako optimální inhibitory obou enzymů. Deriváty byly na základě molekulového dockingu identifikovány jako nekovalentní inhibitory.⁵³



Obrázek 17 Obecný vzorec *N,N*-disubstituovaných (thio)karbamátů ($R^1 = \text{H, Cl}$; $R^2 = \text{H, Cl, Br, F, CF}_3$; R^3 a $R^4 = \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5$; $X = \text{O, S}$)⁵³

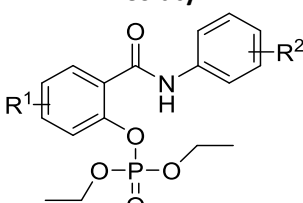
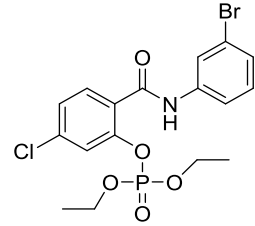
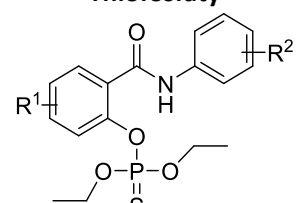
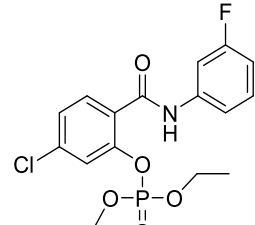
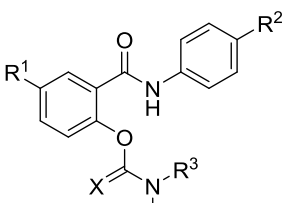
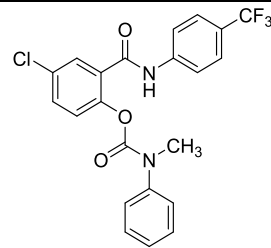
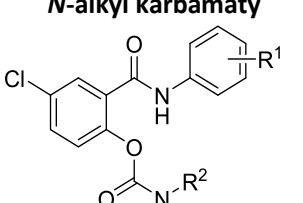
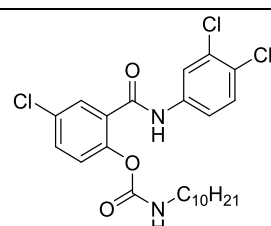
2.6.3. *N*-Alkylkarbamáty

V rámci alkylkarbamátových derivátů (viz obr. 18) byla připravena a testována série pětadvaceti sloučenin původně připravených jako antituberkulotika. Všechny sloučeniny vykazovaly značně větší inhibici AChE než rivastigmin a mírně slabší inhibiční aktivitu než galantamin. 3,4-Dichlor substituce anilinového kruhu a *N*-alkyl o optimální délce od hexylu po undecyl vedou ke sloučeninám s nejlepší účinností. Inhibiční aktivita rostla s lipofilitou sloučenin, tj. byla závislá především na délce *N*-alkylového řetězce. Na základě molekulového modelování lze usoudit, že tyto deriváty fungují jako sterické blokátory aktivního místa AChE (kompetitivní inhibice).⁵⁵ Vůči BuChE nebyla tato skupina karbamátů hodnocena.



Obrázek 18 Obecný vzorec *N*-alkyl karbamátových derivátů ($R^1 = \text{3-Cl, 4-Cl, 3,4-diCl}$; $R^2 = \text{alkyl C}_2, \text{C}_4\text{-C}_{11}$)⁵⁵

Tabulka 1 Přehled neúčinnějších salicylanilidových inhibitorů ChE

Skupina derivátů	Nejaktivnější derivát			Aktivita	
	Výhodná substituce	Systematický název	Strukturní vzorec	IC ₅₀ (AChE) [μM]	IC ₅₀ (BuChE) [μM]
<p>Fosfáty</p> 	R ¹ = 5-Cl R ² = 3-Br	2-[(3-bromfenyl)karbamoyl]-5-chlorfenyl-diethyl-fosfát		35,4	1,77
<p>Thiofosfáty</p> 	R ¹ = 5-Cl R ² = 3-F	O-[5-chlor-2-[(3-fluorfenyl)karbamoyl]fenyl]-O,O-diethyl-fosforothioát		8,04	8,68
<p>N,N-disubstituované (thio)karbamáty</p> 	R ¹ = Cl R ² = CF ₃ R ³ = CH ₃ R ⁴ = fenyl X = O	4-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-methyl(fenyl)karbamát		48,85	1,97
<p>N-alkyl karbamáty</p> 	R ¹ = 3,4 Cl R ² = C ₁₀ H ₂₁	4-chlor-2-[(3,4-dichlorfenyl)karbamoyl]fenyl-decykarbamát		21,8	-

3. Praktická část

3.1. Použité chemikálie, přístroje a analytické metody

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemikálie a rozpouštědla od firem Sigma-Aldrich, resp. Merck (Darmstadt, Německo), Lach-Ner (Neratovice, Česká republika) a Penta Chemicals (Praha, Česká republika), které byly dále použity bez dalšího čištění.

Průběh všech reakcí byl pravidelně monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze byly použity destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60 F254 od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze byla používána nejčastěji soustava toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 (v/v), detekce byla prováděna UV lampou (A. Krüss Optronic, Hamburk, Německo) při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teploty tání byly stanoveny v otevřené kapiláře v přístroji Melting Point Machine B-540 (Büchi, Flawil, Švýcarsko) a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla změřena technikou ATR (attenuated total reflectance) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) v rozmezí 650-4000 cm^{-1} . Měření probíhala na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (paní Iva Vencovská).

NMR spektra byla změřena na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Jiřího Kuneše, CSc. Měření probíhala při laboratorní teplotě na přístroji Varian VNMR S500 (500 MHz pro ^1H a 125 MHz pro ^{13}C ; Varian Comp., Palo Alto, USA). Jako rozpouštědlo byly použity deuterovaný dimethylsulfoxid ($\text{DMSO-}d_6$), aceton ($\text{aceton-}d_6$) a chloroform (CDCl_3). Hodnoty chemického posunu δ (v ppm) ve vodíkových spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu, uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla ($\text{DMSO-}d_6$ při $\delta = 39,5$ ppm). Interakční konstanta (J) je uvedena v Hz. NMR spektra byla vyhodnocena pomocí programu MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Automatic Microanalyser CHNS-O CE Instrument (FISONS EA 1110, Milán, Itálie) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.

Čištění některých sloučenin bylo provedeno pomocí preparativní flash chromatografie CombiFlash® Rf (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA) na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy. Při procesu byla zvolena

gradientová eluce za použití směsi hexanu jako mobilní fáze. Jako stacionární fáze byl zvolen silikagel (0,040-0,063 mm)

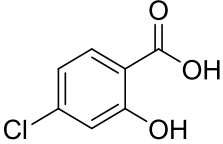
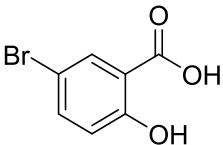
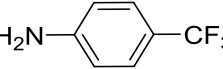
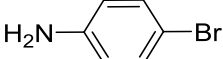
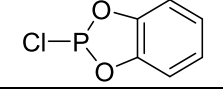
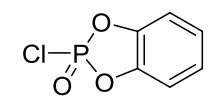
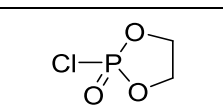
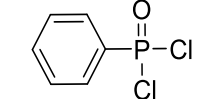
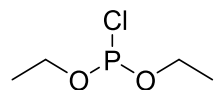
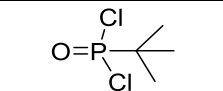
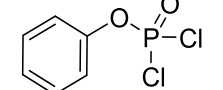
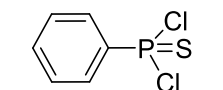
Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC, NMR spektroskopie, teploty tání a elementární analýzy.

Chemické vzorce a reakční schémata byly vytvořeny a chemické názvy byly zkontrolovány pomocí programu ChemDraw Ultra 16.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA). V tomto programu byly také vypočteny hodnoty $\log P$ připravených sloučenin, tj. hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu soustavy oktan-1-ol/voda.

3.2. Výchozí sloučeniny

Výchozí sloučeniny použité pro přípravu navržených sloučenin jsou prezentovány v tabulce 2.

Tabulka 2 Výchozí sloučeniny

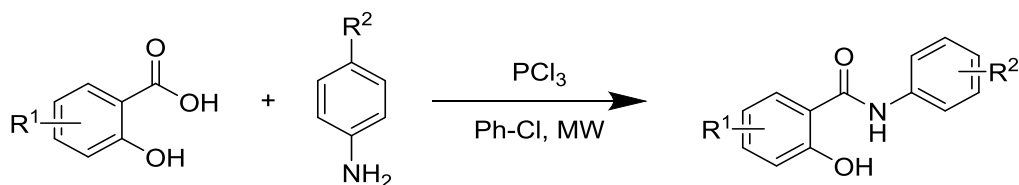
Výchozí sloučenina	Systematický název	Sumární vzorec	Molární hmotnost	LogP
	4-chlor-2-hydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₅ ClO ₃	172,56	1,76
	5-brom-2-hydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₅ BrO ₃	217,02	2,03
	4-(trifluormethyl)anilin	C ₇ H ₆ F ₃ N	161,13	2,15
	4-bromanilin	C ₆ H ₆ BrN	172,03	2,06
	2-chlorbenzo[d][1,3,2]dioxafosfol	C ₆ H ₄ ClO ₂ P	174,52	ND
	2-chlorbenzo[d][1,3,2]dioxafosfol 2-oxid	C ₆ H ₄ ClO ₃ P	190,52	2,31
	2-chlor-1,3,2-dioxafosfolan 2-oxid	C ₂ H ₄ ClO ₃ P	142,47	0,82
	Dichlorid kyseliny fenylfosfonové	C ₆ H ₅ Cl ₂ OP	194,98	2,54
	Diethyl-chlorfosfit	C ₄ H ₁₀ ClO ₂ P	156,55	ND
	dichlorid kyseliny <i>terc</i> -butylfosfonové	C ₄ H ₉ Cl ₂ OP	174,99	2,35
	fenylfosforyl dichlorid	C ₆ H ₅ Cl ₂ O ₂ P	210,98	3,12
	Dichlorid kyseliny fenylfosfotionové	C ₆ H ₅ Cl ₂ PS	211,04	3,28

3.3. Přípravované sloučeniny

3.3.1. Salicylanilidy

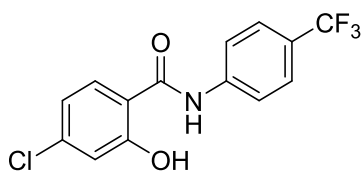
Postup přípravy

Ve 100 ml chlorbenzenu se za laboratorní teploty smísilo 3,45 g (0,02 mol) příslušného derivátu kyseliny salicylové s ekvimolárním množstvím substituovaného anilinu (0,02 mol). Poté se přidala polovina ekvimolárního množství PCl_3 , tj. 0,871 ml (0,01 mol) (viz obr. 19). Reakční směs se umístila do mikrovlnného reaktoru, kde se nechala při výkonu 530 W reagovat 25 minut. Směs byla za horka zfiltrována a ponechána krystalizovat 24 hod při $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Krystaly byly odsáty na Büchnerově nálevce. Filtrát se zahustil na vakuové odparce a opět se nechal krystalizovat. Oba podíly byly překrystalizovány z 96% ethanolu. Produkt byl odsán na Büchnerově nálevce, vysušen a charakterizován.



Obrázek 19 Reakční schéma přípravy salicylanilidů ($\text{R}^1 = 4\text{-Cl}$, 5-Br , $\text{R}^2 = \text{Br}$, CF_3)

4-Chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (CSA)



Sumární vzorec: C₁₄H₉ClF₃NO₂

Molární hmotnost: 315,68

Vzhled: bílá krystalická látka

Log*P*: 3,93

R_f: 0,8 (toluen:EtOAc 4:1)

Teplota tání: 216-217 °C (lit. 212-213,5 °C)⁵⁷

Výtěžek: 64 %

IR: 3317 (N-H), 3039 (C-H_{Ar}), 1626, 1602 (C=O), 1561, 1320, 1227, 1092, 923, 824 cm⁻¹.

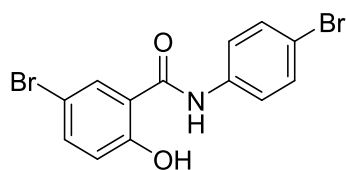
NMR

¹H NMR (500 MHz, aceton-*d*₆): δ 12.16 (1H, s, OH), 10.10 (1H, s, NH), 8.05 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H6), 8.01 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H3', H5'), 7.74 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H2', H6'), 7.05 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H3), 7.00 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, H5).

¹³C NMR (126 MHz, aceton): δ 168.85, 162.76, 142.29 (q, *J* = 1.4 Hz), 140.36, 130.18, 126.81 (q, *J* = 3.9 Hz), 126.53 (q, *J* = 32.4 Hz), 125.29 (q, *J* = 270.8 Hz), 122.00, 120.14, 118.55, 115.11.

Elementární analýza: vypočteno: C, 53.27; H, 2.87; N, 4.44, nalezeno: C, 53.42; H, 2.98; N, 4.29.

5-Brom-N-(4-bromfenyl)-2-hydroxybenzamid (BSA)



Sumární vzorec: C₁₄H₉Br₂NO₂

Molární hmotnost: 371,03

Vzhled: bílá krystalická látka

LogP: 4,11

R_f: 0,8 (toluen:EtOAc 4:1)

Teplota tání: 240-241 °C (lit. 240-241,5 °C)⁵⁷

Výtěžek: 60 %

IR: 3321 (N-H), 1669, 1652, 1628 (C=O), 1489, 1415, 1318, 1219, 1092, 846 cm⁻¹.

NMR

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 11.86 (1H, s, OH), 10.43 (1H, s, NH), 8.04 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H6), 7.75-7.72 (2H, m, H2', H6'), 7.59 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, H4), 7.52-7.49 (2H, m, H3', H5'), 6.96 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H3).

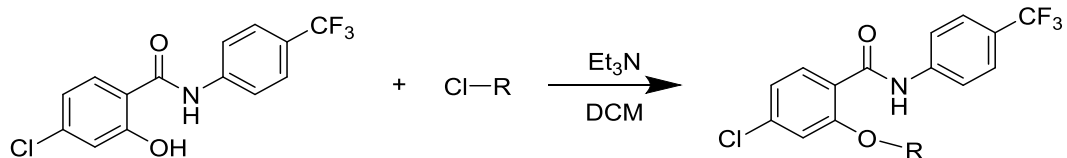
¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 165.08, 157.21, 137.65, 136.02, 131.74, 131.45, 122.81, 120.54, 119.64, 116.18, 110.32.

Elementární analýza: vypočteno: C, 42.08; H, 2.45; N, 3.78, nalezeno: C, 42.21; H, 2.56; N, 3.97.

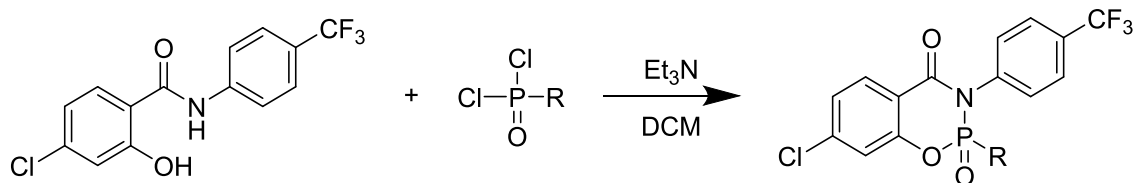
3.3.2. Estery salicylanilidů

Obecný postup přípravy

0,001 mol salicylanilidu bylo suspendováno v 10 ml dichlormethanu (DCM), za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,5 ekvivalentu triethylaminu (0,0015 mol, 210 μ L) (viz obr. 20), v případě cyklických derivátů byl přidán trojnásobek ekvivalentu triethylaminu (0,003 mol, 420 μ L) (viz obr. 21). Reakční směs byla míchána 5 min do vyčeření. Posléze bylo přidáno v jedné dávce 1,5 ekvivalentu chloridu příslušné kyseliny (viz tabulka 3). Reakční směs byla míchána po 24 h za laboratorní teploty. Po přeměně reaktantů na produkty (TLC indikace, vyvíjecí soustava toluen/EtOAc 4:1) byla směs odpařena na rotační vakuové odparce do sucha či vzniku viskózní olejové fáze, zbytek byl suspendován v EtOAc a nerozpustný podíl byl odfiltrován. Filtrát byl postupně vytřepán vždy dvakrát s vodným roztokem Na_2CO_3 (10%), HCl (0,1 M) a NaCl (nasycený roztok). Organický podíl byl vysušen stáním nad bezvodým síranem sodným, odfiltrován a přidavkem hexanu přiveden ke krystalizaci. Následně byla reakční směs ponechána přes noc při +4 °C a vzniklé krystaly byly odfiltrovány. Látky v kapalném skupenství byly purifikovány pomocí sloupcové chromatografie, případně flash chromatografie. Jako vyvíjecí soustava byla použita směs hexan:EtOAc 3:1.



Obrázek 20 Reakční schéma přípravy esterů salicylanilidů

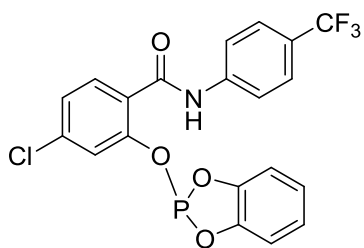


Obrázek 21 Reakční schéma přípravy cyklických esterů salicylanilidů

Tabulka 3 Chloridy použitých kyselin

R

2-(Benzo[d][1,3,2]dioxafosfol-2-yloxy)-4-chlor-N-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (EST-1)



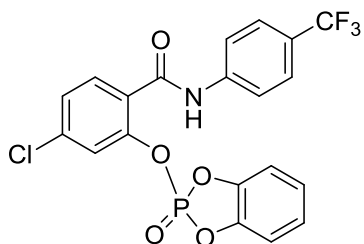
Sumární vzorec: C₂₀H₁₂ClCF₃NO₄P

Molární hmotnost: 453,74

LogP: 4,11

Derivát se nepodařilo připravit v dostatečném množství, resp. čistotě.

4-Chlor-2-[(2-oxidobenzo[d][1,3,2]dioxafosfol-2-yl)oxy]-N-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (EST-2)



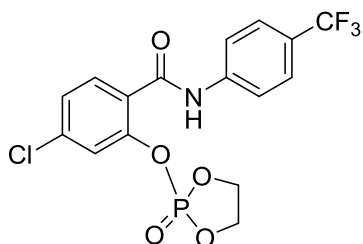
Sumární vzorec: C₂₀H₁₂ClCF₃NO₅P

Molární hmotnost: 469,74

LogP: 5,72

Derivát se nepodařilo připravit v dostatečném množství, resp. čistotě.

**4-Chlor-2-[(2-oxido-1,3,2-dioxafosfolan-2-yl)oxy]-N-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid
(EST- 3)**



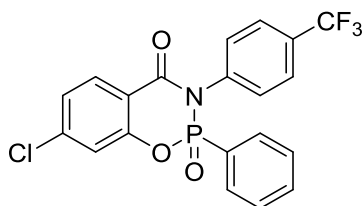
Sumární vzorec: C₁₆H₁₂ClCF₃NO₅P

Molekulární hmotnost: 469,74

LogP: 5,72

Derivát se nepodařilo připravit v dostatečném množství, resp. čistotě.

**7-Chlor-2-fenyl-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxid
(EST-4)**



Sumární vzorec: C₂₀H₁₂ClCF₃NO₃P

Molární hmotnost: 437,74

Vzhled: bílá krystalická látka

Log*P*: 5,64

Teplota tání: 185-186 °C

R_f: 0,44 (toluen:EtOAc 9:1)

Výtěžnost reakce: 6 %

IR: 3337, 1656 (C=O), 1575, 1564, 1330, 1219, 1181, 1118, 1070, 715 cm⁻¹.

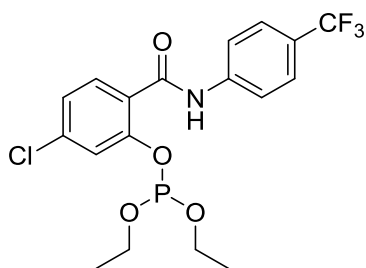
NMR

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.16 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H5), 7.77-7.72 (2H, m, H3', H5'), 7.66-7.56 (3H, m, H2', H6', H4''), 7.50-7.44 (2H, m, H3'', H5''), 7.39-7.28 (4H, m, H6, H8, H2'', H6'').

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.14 (d, *J* = 4.3 Hz), 151.31 (d, *J* = 7.9 Hz), 141.94, 136.59, 134.44 (d, *J* = 3.2 Hz), 132.27 (d, *J* = 11.2 Hz), 131.53, 130.96 (q, *J* = 32.7 Hz), 130.17 (d, *J* = 2.4 Hz), 129.01 (d, *J* = 16.1 Hz), 126.46 (q, *J* = 3.9 Hz), 125.89, 125.47 (d, *J* = 182.6 Hz), 123.51 (q, *J* = 272.6 Hz), 119.36 (d, *J* = 9.2 Hz), 115.79 (d, *J* = 2.0 Hz).

Elementární analýza: vypočteno: C, 54.88; H, 2.76; N, 3.20, nalezeno: C, 54.65; H, 2.69; N, 3.29.

5-Chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-diethyl-fosfit (EST-5)



Sumární vzorec: C₁₈H₁₈ClCF₃NO₄P

Molární hmotnost: 435,76

Vzhled: hnědá olejovitá látka

Log P: 5,64

R_f: 0,55 (toluen:EtOAc 4:1)

Výtěžek: 8 %

IR: 3310 (N-H), 1684 (C=O), 1601, 1323, 1292, 1165, 1118, 1066, 1033, 964, 845, 766, 689 cm⁻¹.

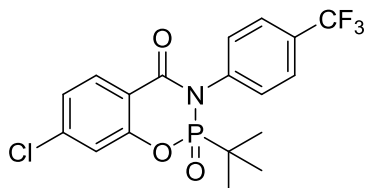
NMR

¹H NMR (500 MHz, aceton-*d*₆): δ 9.99 (1H, s, NH), 8.06-8.02 (2H, m, H3', H5'), 7.80 (1H, dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, H3), 7.76-7.72 (2H, m, H2', H6'), 7.52-7.51 (1H, m, H6), 7.44 (1H, ddd, *J* = 8.3, 2.0, 0.9 Hz, H4), 4.28-4.20 (4H, m, CH₂), 1.29 (6H, td, *J* = 7.1 Hz, *J* = 1.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.96, 147.45 (d, *J* = 7.1 Hz), 141.34, 138.06 (d, *J* = 2.1 Hz), 132.88 (d, *J* = 1.0 Hz), 126.19 (d, *J* = 1.5 Hz), 125.94 (d, *J* = 1.7 Hz), 126.22 (q, *J* = 3.8 Hz), 126.16 (q, *J* = 32.6 Hz), 124.10 (1C, q, *J* = 270.0 Hz), 121.68 (d, *J* = 3.0 Hz), 119.64, 64.12 (d, *J* = 6.0 Hz), 14.04 (d, *J* = 6.8 Hz).

Elementární analýza: vypočteno: C, 49.61; H, 4.16; N, 3.21, nalezeno: C, 49.68; H, 4.29; N, 3.09.

**2-(*Terc*-butyl)-7-chlor-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]-3-hydrobenzo[*e*][1,3,2]oxazafosfinin-4-on
2-oxid (EST-6)**



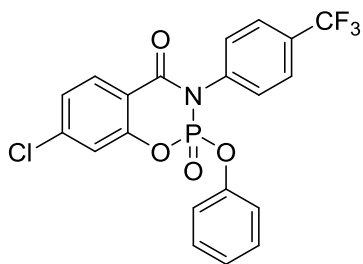
Sumární vzorec: C₁₈H₁₆ClCF₃NO₃P

Molární hmotnost: 417,75

Log*P*: 5,44

Derivát se nepodařilo připravit v dostatečném množství, resp. čistotě.

7-Chlor-2-fenoxy-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-oxid (EST-7)



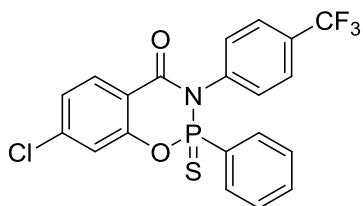
Sumární vzorec: $C_{20}H_{12}ClCF_3NO_4P$

Molární hmotnost: 453,74

LogP: 6,21

Derivát se nepodařilo připravit v dostatečném množství, resp. čistotě.

7-Chlor-2-fenyl-3-[4-(trifluormethyl)fenyl]-3-hydrobenzo[e][1,3,2]oxazafosfinin-4-on 2-sulfid (EST-8)



Sumární vzorec: C₂₀H₁₂ClCF₃NO₂PS

Molární hmotnost: 453,80

Vzhled: žlutá krystalická látka

LogP: 6,37

Teplota tání:

R_f: 0,66 (toluen:EtOAc 4:1)

Výtěžek: 22 %

IR: 3076 (C-H_{Ar}), 1675 (C=O), 1610, 1417, 1330, 1315, 1299, 1130, 1069, 949, 750, 692 cm⁻¹.

NMR

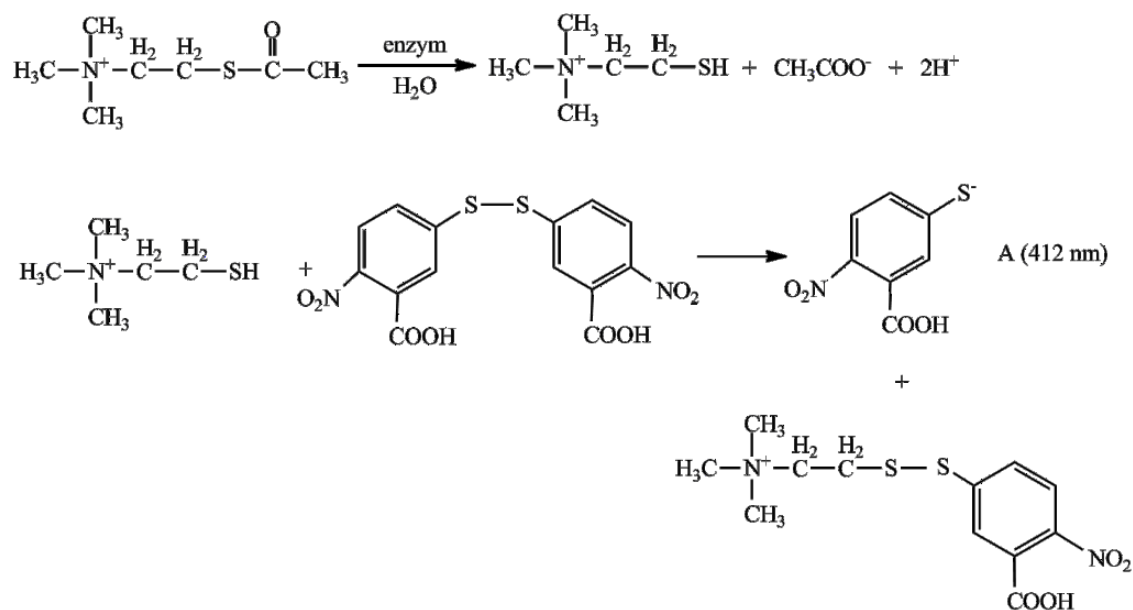
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.13 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H5), 7.94-7.88 (2H, m, H3', H5'), 7.64-7.59 (1H, m, H4''), 7.53 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H2', H6'), 7.50-7.44 (2H, m, H3'', H5''), 7.34 (1H, td, *J* = 8.5, 1.3 Hz, H6), 7.30-7.24 (3H, m, H8, H2'', H6'').

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 161.28 (d, *J* = 3.7 Hz), 151.48 (d, *J* = 8.7 Hz), 141.72, 134.44 (d, *J* = 3.3 Hz), 132.20 (d, *J* = 12.9 Hz), 131.42, 130.58 (d, *J* = 2.4 Hz), 130.84 (q, *J* = 32.6 Hz), 129.61 (d, *J* = 139.3 Hz), 128.71 (d, *J* = 15.8 Hz), 126.14 (q, *J* = 3.8 Hz), 125.79, 123.51 (q, *J* = 272.5 Hz), 120.88, 119.93 (d, *J* = 8.4 Hz), 116.61 (d, *J* = 3.3 Hz).

Elementární analýza: vypočteno: C, 52.94; H, 2.67; N, 3.09, nalezeno: C, 53.11; H, 2.77; N, 2.94.

3.4. Biologické testování

Pro stanovení aktivity (a také inhibice) cholinesteráz se nejčastěji používá spektrofotometrická Ellmanova metoda,⁵⁸ která je založená na kvantifikaci obsahu -SH nebo -S-S- skupin. Obecný princip je založený na rychlosti vzniku thiocholinu, který vzniká jako produkt hydrolýzy acetylthiocholinu cholinesterázou ve vodném prostředí a následně reaguje s tzv. Ellmanovým činidlem (5,5'-dithiobis-2-(nitrobenzoová kyselina)). Vzniká žlutý produkt, 5-thio-2-nitrobenzoát (viz obrázek 22), který je detekovatelný při vlnové délce 412 nm.



Obrázek 22 Reakční schéma Ellmanovy reakce⁵⁸

Účinnost inhibitoru popisuje hodnota IC₅₀, což je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu (nebo také pokles aktivity enzymu na 50 %). Řidčeji se vyjadřuje jako záporný dekadický logaritmus molární koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu, tj. pI₅₀ = -log IC₅₀.⁵⁸

3.4.1. Výsledky testování

Hodnoty IC₅₀ připravených potenciálních inhibitorů vůči oběma cholinesterázám byly stanoveny externě na Katedře biologických a biochemických věd Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice (Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D., a Mgr. Katarína Vorčáková, Ph.D.). Získané hodnoty IC₅₀ testovaných derivátů a použitých standardů jsou sumarizovány v tabulce 4.

Tabulka 4 Inhibice cholinesteráz připravenými sloučeninami

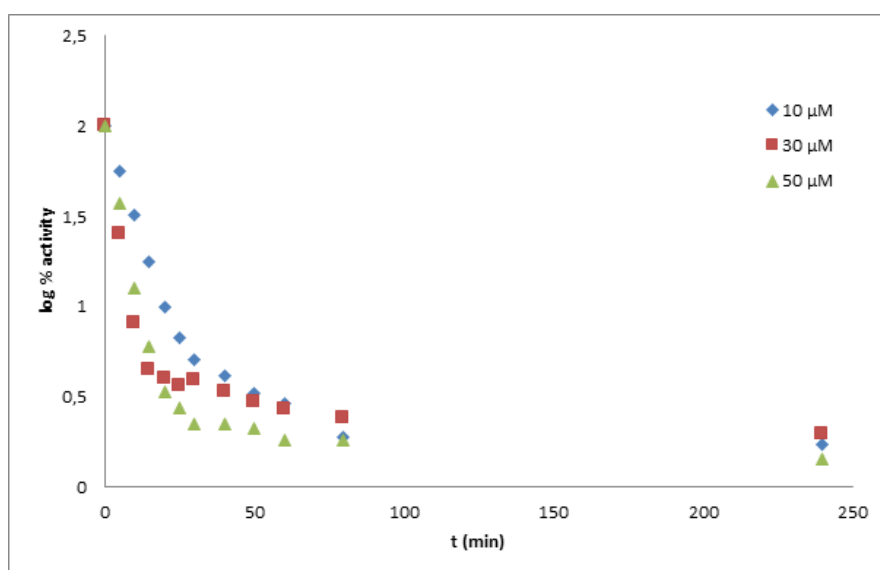
Testovaná sloučenina	IC ₅₀ (AChE) [μM]	IC ₅₀ (BuChE) [μM]
EST-4	48,13 ± 1,70	25,00 ± 0,30
EST-5	66,37 ± 1,14	2,37 ± 0,01
EST-8	63,48 ± 1,41	170,10 ± 13,58
CSA	60,29 ± 2,39	199,53 ± 2,02
BSA	70,30 ± 2,85	112,16 ± 1,79
Rivastigmin	56,10 ± 1,41	38,40 ± 1,97
Galantamin	1,54 ± 0,02	2,77 ± 0,15

AChE – acetylcholinesteráza, BuChE – butyrylcholinesteráza

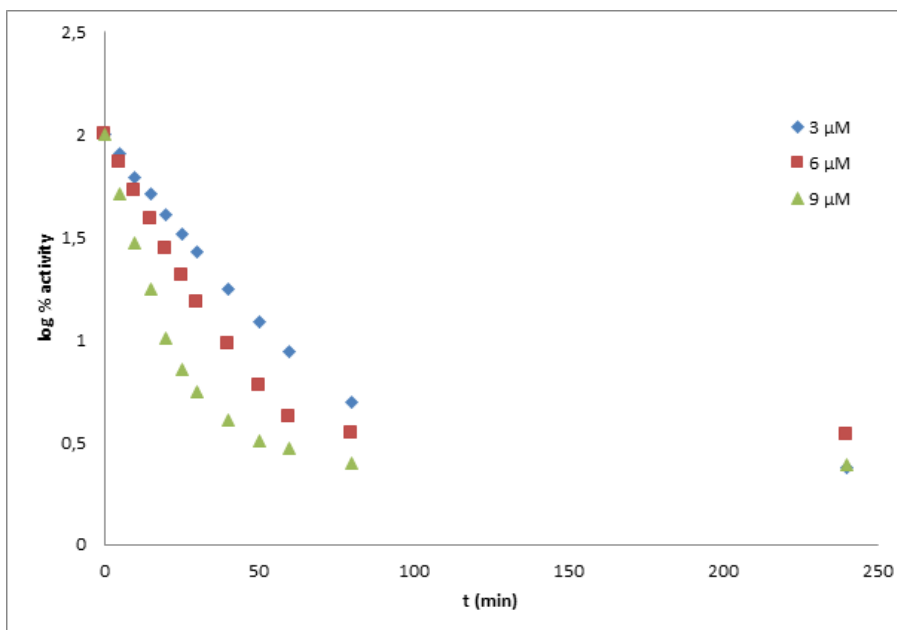
3.4.2. Mechanismus účinku a typ inhibice

Součástí biologického testování bylo také stanovení mechanismu a typu inhibice. Pro tento účel byl vybrán esterový derivát s nejlepší aktivitou vůči BuChE (EST-5). Vliv EST-5 v různých koncentracích na aktivitu obou enzymů je zobrazen na obrázku 23 (AChE) a 24 (BuChE).

Při stanovení mechanismu inhibice byly podle hodnot IC₅₀ vybrány tři různé testované koncentrace derivátu a byl zkoumán vliv inhibitoru EST-5 na enzymovou aktivitu v čase. Na základě změn v aktivitě enzymu je možné mechanismus účinku rozdělit na reverzibilní, ireverzibilní nebo pseudo-ireverzibilní.



Obrázek 23 Závislost log % aktivity EST-5 na čase (t). Enzym: acetylcholinesteráza

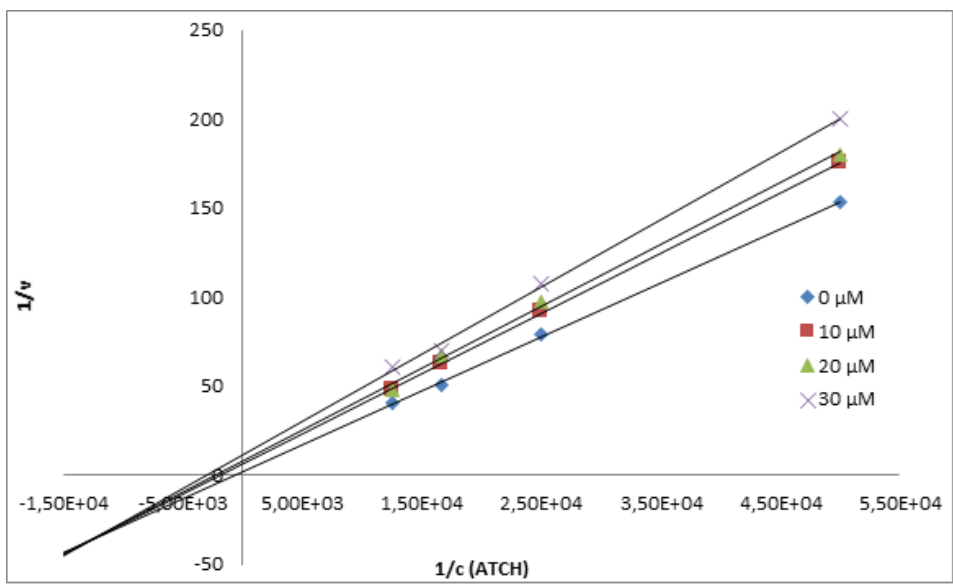


Obrázek 24 Závislost log % aktivity EST-5 na čase (t). Enzym: butyrylcholinesteráza

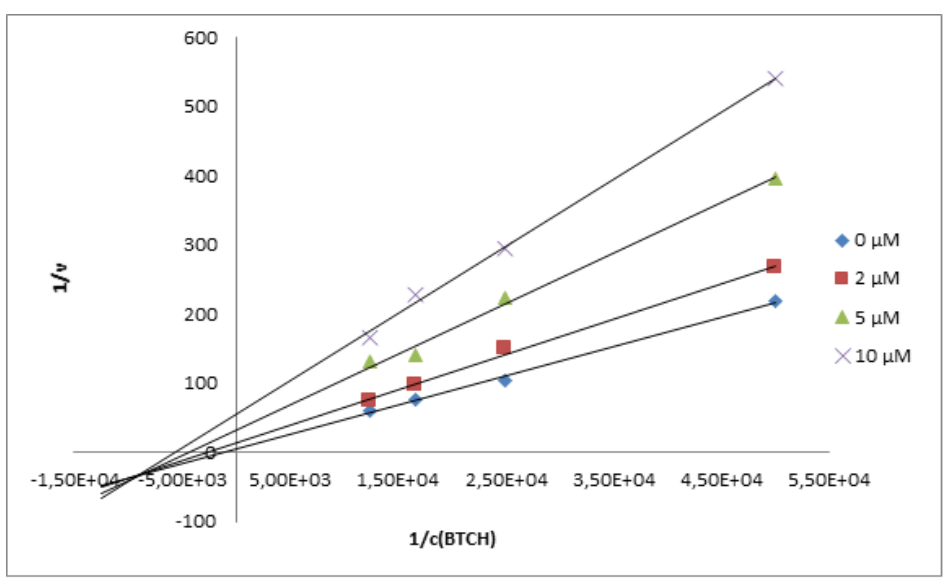
Získané závislosti log % aktivity na čase ukazují vůči oběma enzymům podobný průběh. Po přidání EST-5 v čase $t = 0$ min se aktivita enzymu rychle snižuje. Po čase $t = 50$ min je aktivita prakticky konstantní. K její změně dochází až po dlouhé době ($t = 220$ min), kdy se velmi mírně zvyšuje – zejména v případě BuChE.

Závislost log % aktivity na čase nevykazuje typický průběh ireverzibilní (lineární pokles) ani reverzibilní inhibice (k pozvolnému nárůstu aktivity dochází až po dlouhé době).⁵⁴ Na základě těchto údajů lze usoudit, že látka EST-5 působí jako pseudo-ireverzibilní inhibitor obou cholinesteráz.

Kinetické parametry umožňují reverzibilní inhibici enzymu rozdělit na několik typů, a sice kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšenou.⁵⁹ Na základě parametrů obdržených z aktivity EST-5 (viz obrázek 24 a 25) vůči ChE je možné jeho typ inhibice označit jako smíšený. Z toho vyplývá, že se u inhibované reakce mění jak Michaelisova konstanta K_m , tak mezní rychlost V_{max} a současně se v porovnání s neinhibovanou reakcí mění i jejich poměr.



Obrázek 25 Grafické znázornění inhibiční aktivity EST-5 vůči AChE podle Lineweavera a Burka



Obrázek 26 Grafické znázornění inhibiční aktivity EST-5 vůči BuChE podle Lineweavera a Burka

4. Diskuze

Cílem diplomové práce byla příprava osmi salicylanilidových esterů s organickými sloučeninami fosforu a vyhodnocení jejich inhibiční aktivity vůči vybraným enzymům, acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze. Práce navazuje na předchozí výzkum vedený na Katedře organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy.⁵³⁻⁵⁶

Z osmi navržených finálních derivátů se podařilo syntetizovat a biologicky vyhodnotit pouze tři sloučeniny, a sice EST-4, EST-5 a EST-8, dále pak dva výchozí salicylanilidy.

4.1.1. Chemie

Syntéza navržených sloučenin EST probíhala ve dvou stupních. První stupeň spočíval v syntéze výchozích salicylanilidů. Celkem byly syntetizovány dva výchozí salicylanilidy, 4-chlor-2-hydroxy-*N*-[4-(trifluormethyl)fenyl]benzamid (CSA; praktický výtěžek 64 %) a 5-brom-*N*-(4-bromfenyl)-2-hydroxybenzamid (BSA; praktický výtěžek 60 %). Salicylanilidy byly syntetizovány ze substituovaných derivátů kyseliny salicylové a anilinu jako výchozích látek. Po přidání PCl_3 se reakční směs umístila do mikrovlnného reaktoru. Použití mikrovln reakci oproti klasickým metodám jednak reakci podstatně urychlilo, jednak vede k vyšší výtěžkům.⁶⁰ Produkty byly následně vyčištěny pomocí krystalizace a charakterizovány (NMR, IČ, teplota tání).

Ve druhém stupni probíhala syntéza esterů předem připravených salicylanilidů. Obecně příprava probíhala následujícím postupem: salicylanilid byl suspendován v 10 ml dichlormethanu (DCM), přidavkem mírného nadbytku triethylaminu (1,5 ekvivalentu, v případě cyklických derivátů 3 ekvivalenty) byl převeden na sůl a posléze bylo přidáno v jedné dávce 1,5 ekvivalentu chloridu příslušné kyseliny. Reakční směs byla míchána po 24 h za laboratorní teploty, ev. zahřívána. Reakce byla monitorována pomocí TLC chromatografie. Produkt byl následně vyčištěn (krystalizace, sloupcová chromatografie či vytřepávání) a charakterizován (NMR, IČ, teplota tání). Praktické výtěžky připravených esterů se pohybovaly v rozmezí 6-22 %.

Sloučeniny nesoucí kódy EST-1, EST-2 a EST-3 bylo možné syntetizovat (TLC indikace), avšak jako velmi problematická se jevila následná separace a čištění těchto látek. Primárně byla jako čistící metoda zvolena krystalizace ze soustavy hexan/ethyl-acetát, která se však jevila jako nevhodná, což vedlo k navržení a ověření celé škály jiných soustav, a sice hexan/acetón, hexan/chloroform, diethylether/ethyl-acetát, diethylether/acetón,

diethylether/chloroform. Přes zvolené kombinace nebylo možné sloučeniny získat v dostatečném množství a čistotě. Jako další metoda byla navržena sloupcová chromatografie, kde stacionární fázi tvořil silikagel a mobilní fázi toluen/ethyl-acetát v poměru 4:1 (v/v). Po chromatografickém dělení se však zjistilo, že syntetizované sloučeniny jsou nestabilní během dělení na silikagelu, a to i pokud byl použit „neutralizovaný“ silikagel (pomocí triethylaminu) či komerčně dostupný silikagel s příměsí 0,1 % Ca(OH)₂. Opakované pokusy o separaci dopadly neúspěšně, deriváty tedy nebylo možné získat v dostatečném množství a odpovídající čistotě. Tato nestabilita esterů by pak navíc komplikovala případné biologické hodnocení.

Dalším zásadním problémem byla velmi malá míra konverze derivátů EST-1, EST-2 a EST-3, hodnocená orientačně pomocí TLC chromatografie. Tento problém byl řešen výměnou rozpouštědla, ve kterém reakce probíhala (místo dichlormethanu byl vyzkoušen diethylether, toluen aj.), přidávkem katalyzátoru (4-(dimethylamino)pyridin), což se však také ukázalo jako nevhodné, resp. nedostatečné řešení.

Také ester EST-6 nebylo možné nasyntetizovat. Produkt vznikající během reakce byl velmi nestabilní a rozkládal se již za průběhu reakce, v kontaktu s vodou okamžitě hydrolyzoval, byl citlivý i na vzdušnou vlhkost, což prakticky znemožňuje jeho biologické hodnocení a případné následné podání do živého organismu (vodné prostředí).

Derivát EST-7 představoval podobný problém jako sloučeniny EST-1, EST-2 a EST-3. Nebyla nalezena vhodná metoda čištění i po vyzkoušení celé škály krystalizačních soustav (hexan/ethyl-acetát, hexan/aceton, hexan/chloroform, diethylether/ethyl-acetát, diethylether/aceton, diethylether/chloroform) a sloupcové chromatografie.

Další obecnou komplikací bylo, že některé z připravených produktů byly kapalné, resp. v „semi-solid“ stavu.

4.1.2. Biologické hodnocení

Látky EST-4, EST-5 a EST-8 vykazovaly inhibiční aktivitu vůči enzymům AChE a BuChE. Inhibiční hodnoty IC₅₀ se pohybovaly v rozmezí 48,13-66,37 μM vůči AChE a 2,37-170,10 μM vůči BuChE. Neesterifikované výchozí salicylanilidy CSA a BSA mají hodnoty IC₅₀ v rozmezí 60,29-70,30 μM vůči AChE a 112,16-199,53 μM vůči BuChE. Nejlepší inhibiční aktivitu vůči AChE vykazovala sloučenina EST-4 (48,13 μM), zatímco nejlepší inhibitor BuChE byla sloučenina EST-5 (2,37 μM). Esterifikace diethyl-chlorfosfitem tedy výrazně zlepšuje inhibici

BuChE při zachování inhibiční aktivity vůči AChE, což platí i pro ostatní zbytky kyselin na bázi fosforu (viz tabulka 4, kapitola 3.3.1).

Biologické testování inhibiční aktivity bylo provedeno za použití rivastigminu a galantaminu jako standardů. Vůči AChE je inhibiční aktivita rivastigminu (56,10 μM) srovnatelná s připravenými estery (48,13-66,37 μM), vůči BuChE je však aktivita sloučeniny EST-5 zásadně lepší (2,37 μM vs. 38,40 μM), účinnější je i ester EST-4. Aktivita galantaminu je vůči AChE (1,54 μM) výrazně lepší než u všech připravených derivátů, oproti tomu je aktivita EST-5 a galantaminu srovnatelná u BuChE (2,37 μM vs. 2,77 μM) (viz kapitola 3.4.1).

Je patrné, že inhibiční aktivita neesterifikovaných salicylanilidů (CSA, BSA) vůči AChE je srovnatelná s esterovými deriváty (EST-4, EST-5, EST-8), ale v případě BuChE vykazují lepší inhibiční aktivitu než salicylanilidy (výchozí CSA, ale i BSA), z čehož lze usoudit, že esterifikace salicylanilidů je pro tuto aktivitu výhodná. Dříve námi připravené karbamáty, fosfáty a thiosfosfáty^{53,54,56} vykazují obecně lepší aktivitu než nové deriváty, zejména vůči AChE. Jejich aktivita vůči BuChE je však srovnatelná. Připravené sloučeniny jsou dostatečně lipofilní⁵³ (viz vypočítané hodnoty $\log P$) pro průnik HEB.

U sloučeniny EST-5 byl také zkoumán mechanismus účinku a typ inhibice. Na základě experimentálně zjištěných údajů lze konstatovat, že molekula EST-5 působí jako pseudo-ireverzibilní inhibitor (analogicky k předchozím diethyl-fosfátům⁵³) obou cholinesteráz. Typ inhibice byl identifikován jako smíšená. Z předchozích prací je dále známé, že hlavním nositelem účinku jsou fosfátové a thiofosfátové funkční skupiny. Salicylanilidová část, přestože vykazuje sama o sobě jistou inhibiční aktivitu, slouží především jako nosič těchto zmíněných skupin,^{53,56} zejména v případě BuChE.

5. Závěr

Teoretická část této práce shrnuje poznatky o Alzheimerově chorobě, zejména patofyziologické aspekty této nemoci a její aktuální léčbu spočívající převážně v používání inhibitorů acetylcholinesterázy.

Potřeba nových lipofilních inhibitorů AChE a BuChE vedla ke stanovení cílů praktické části, která spočívala v návrhu, syntéze, charakterizaci a biologickém hodnocení nových potenciálních inhibitorů AChE a BuChE. Strukturně se jedná o estery salicylanilidů s deriváty kyselin na bázi fosforu.

Navrženo bylo osm cílových derivátů, ze kterých se však podařilo dvoukrokovou syntézou připravit a otestovat pouze tři sloučeniny, a to EST-4, EST-5 a EST-8.

Sloučeniny, které se podařilo syntetizovat a dostatečně purifikovat, byly posléze biologicky hodnoceny. Biologické testy odhalily, že tyto deriváty mají určitou inhibiční aktivitu vůči AChE a BuChE. V případě 5-chlor-2-[[4-(trifluormethyl)fenyl]karbamoyl]fenyl-diethylfosfitu (EST-5) byly zjištěny hodnoty IC_{50} 66,37 μ M vůči AChE a 2,37 μ M vůči BuChE. Oproti ostatním esterům, kde se hodnoty IC_{50} vůči BuChE pohybovaly v rozmezí 25,00 μ M (EST-4) a 170,10 μ M (EST-8), je tedy EST-5 nejvíce aktivní. V případě AChE deriváty EST-4 a EST-8 vykazovaly hodnoty IC_{50} 48,13 μ M a 63,48 μ M, zásadně se tedy nelišily od derivátu EST-5 a byly srovnatelné s rivastigminem. Hodnoty IC_{50} derivátu EST-5 vůči BuChE byly lepší než u standardu rivastigminu a srovnatelné s galantaminem. Neesterifikované salicylanilidy také měly inhibiční aktivitu vůči zmíněným enzymům, zejména AChE, kde je jejich aktivita srovnatelná s esterifikovanými deriváty. Esterifikace těchto látek však významně zvýšila jejich aktivitu vůči BuChE. Mechanismus účinku derivátu EST-5 byl identifikován jako pseudo-ireverzibilní se smíšeným typem inhibice.

6. Seznam tabulek

Tabulka 1 Přehled nejúčinnějších salicylanilidových inhibitorů ChE.....	30
Tabulka 2 Výchozí látky	33
Tabulka 3 Chloridy použitých kyselin	38
Tabulka 4 Inhibice cholinesteráz připravenými sloučeninami	48

7. Seznam obrázků

Obrázek 1 Test kreslení hodin	11
Obrázek 2 Atrofie lidského mozku při Alzheimerově chorobě	14
Obrázek 3 Acetylcholin.....	18
Obrázek 4 Schematické znázornění účinku ACh	19
Obrázek 5 Hydrolyza acetylcholinu na kyselinu octovou a cholin	19
Obrázek 6 Molekulární struktura AChE rejnoka kalifornského (Torpedo californica).....	20
Obrázek 7 Edrofonium	22
Obrázek 8 Organofosfátové sloučeniny	22
Obrázek 9 Inhibice AChE nervovou bojovou látkou sarinem a následné stárnutí vazby.....	23
Obrázek 10 Oximy	23
Obrázek 11 Donepezil	25
Obrázek 12 Rivastigmin	26
Obrázek 13 Galantamin.....	26
Obrázek 14 Memantin.....	26
Obrázek 15 Huperzin A.....	27
Obrázek 16 Obecný vzorec diethyl-fosfátů a thiofosfátů	28
Obrázek 17 Obecný vzorec <i>N,N</i> -disubstituovaných (thio)karbamátů	29
Obrázek 18 Obecný vzorec <i>N</i> -alkyl karbamátových derivátů	29
Obrázek 19 Reakční schéma přípravy salicylanilidů.....	34
Obrázek 20 Reakční schéma přípravy esterů salicylanilidů	38
Obrázek 21 Reakční schéma přípravy cyklických esterů salicylanilidů	38
Obrázek 22 Reakční schéma Ellmanovy reakce	47
Obrázek 23 Závislost log % aktivity EST-5 na čase (t). Enzym: acetylcholinesteráza	48
Obrázek 24 Závislost log % aktivity EST-5 na čase (t). Enzym: butyrylcholinesteráza	49
Obrázek 25 Grafické znázornění inhibiční aktivity EST-5 vůči AChE	50
Obrázek 26 Grafické znázornění inhibiční aktivity EST-5 vůči BuChE	50

8. Použitá literatura

- (1) Hippus, H.; Neundörfer, G. The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **2003**, *5*, 101-108.
- (2) Jellinger, K. A. Should the word 'dementia' be forgotten? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **2010**, *14*, 2415-2416.
- (3) Ondřej, M.: Zpráva o stavu demence 2016. Martina Mátlová, I. H., Ed., 2016.
- (4) Cunningham, E. L.; McGuinness, B.; Herron, B.; Passmore, A. P. Dementia. *The Ulster Medical Journal* **2015**, *84*, 79-87.
- (5) Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (citováno 12. prosince 2018).
- (6) Jiráček, R. Poruchy chování u pacientů s Alzheimerovou chorobou. *Psychiatrie pro praxi* **2008**, *9*, 15-18.
- (7) Balin, B. J.; Hudson, A. P. Etiology and Pathogenesis of Late-Onset Alzheimer's Disease. *Current Allergy and Asthma Reports* **2014**, *14*, 417.
- (8) Jiráček, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* **2009**, *5*, 176-178.
- (9) Cazarim, M. d. S.; Moriguti, J. C.; Ogunjimi, A. T.; Pereira, L. R. L. Perspectives for treating Alzheimer's disease: a review on promising pharmacological substances. *Sao Paulo Medical Journal* **2016**, *134*, 342-354.
- (10) Holmerová, I.; Baumanová, M.; Juršková, B.; Vaňková, H.; Jiráček, R. Komplexní přístup v léčbě pacientů s Alzheimerovou nemocí. *Remedia* **2014**, *24*, 474-478.
- (11) Castellani, R. J.; Rolston, R. K.; Smith, M. A. Alzheimer Disease. *Disease-a-month: DM* **2010**, *56*, 484-546.
- (12) Foley, N. C.; Affoo, R. H.; Martin, R. E. A Systematic Review and Meta-Analysis Examining Pneumonia-Associated Mortality in Dementia. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **2015**, *39*, 52-67.
- (13) World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf> (citováno 12. prosince 2018)
- (14) Castro, D. M.; Dillon, C.; Machnicki, G.; Allegri, R. F. The economic cost of Alzheimer's disease: Family or public health burden? *Dementia & Neuropsychologia* **2010**, *4*, 262-267.
- (15) Franková, V. Optimalizace léčby Alzheimerovy choroby. *Praktické lékařství* **2016**, *12*, 79-82.
- (16) Jiráček, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi* **2008**, *9*, 240-244.
- (17) Sheardová, K. Alzheimerova nemoc a zapojení pečovatele do boje o kvalitu života. *Psychiatrie pro praxi* **2011**, *12*, 13-18.
- (18) Nair, A. K.; Gavett, B. E.; Damman, M.; Dekker, W.; Green, R. C.; Mandel, A.; Auerbach, S.; Steinberg, E.; Hubbard, E. J.; Jefferson, A.; Stern, R. A. Clock Drawing Test Ratings by Dementia Specialists: Interrater Reliability and Diagnostic Accuracy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **2010**, *22*, 85-92.
- (19) Matějovská-Kubešová, H.; Býma, S.: *Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře, Demence*; Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2018.

- (20) McKhann, G. M.; Knopman, D. S.; Chertkow, H.; Hyman, B. T.; Jack, C. R.; Kawas, C. H.; Klunk, W. E.; Koroshetz, W. J.; Manly, J. J.; Mayeux, R.; Mohs, R. C.; Morris, J. C.; Rossor, M. N.; Scheltens, P.; Carrillo, M. C.; Thies, B.; Weintraub, S.; Phelps, C. H. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* **2011**, *7*, 263-269.
- (21) Scheltens, P. Imaging in Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **2009**, *11*, 191-199.
- (22) Salimi, S.; Irish, M.; Foxe, D.; Hodges, J. R.; Piguet, O.; Burrell, J. R. Can visuospatial measures improve the diagnosis of Alzheimer's disease? *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* **2018**, *10*, 66-74.
- (23) Ribarič, S. Peptides as Potential Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Molecules* **2018**, *23*, 283.
- (24) Sahoo, A. K.; Dandapat, J.; Dash, U. C.; Kanhar, S. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *215*, 42-73.
- (25) Fettelschoss, A.; Zabel, F.; Bachmann, M. F. Vaccination against Alzheimer disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2014**, *10*, 847-851.
- (26) Allen, S. J.; Watson, J. J.; Dawbarn, D. The neurotrophins and their role in Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology* **2011**, *9*, 559-573.
- (27) Reitz, C.; Mayeux, R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88*, 640-651.
- (28) Panpalli Ates, M.; Karaman, Y.; Guntekin, S.; Ergun, M. A. Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience* **2016**, *325*, 124-131.
- (29) Barnes, D. E.; Yaffe, K. The Projected Impact of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence. *Lancet Neurology* **2011**, *10*, 819-828.
- (30) Imtiaz, B.; Tolppanen, A.-M.; Kivipelto, M.; Soininen, H. Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical Pharmacology* **2014**, *88*, 661-670.
- (31) Šerý, O.; Povová, J.; Míšek, I.; Pešák, L.; Janout, V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathologica* **2013**, *51*, 1-9.
- (32) Moceri, V. M.; Kukull, W. A.; Emanuel, I.; van Belle, G.; Starr, J. R.; Schellenberg, G. D.; McCormick, W. C.; Bowen, J. D.; Teri, L.; Larson, E. B. Using Census Data and Birth Certificates to Reconstruct the Early-Life Socioeconomic Environment and the Relation to the Development of Alzheimer's Disease. *Epidemiology* **2001**, *12*, 383-389.
- (33) Ferreira-Vieira, T. H.; Guimaraes, I. M.; Silva, F. R.; Ribeiro, F. M. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology* **2016**, *14*, 101-115.
- (34) Terry, A. V.; Buccafusco, J. J. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, *306*, 821-827.
- (35) Geršl, V.; Štěrba, M.: Farmakologie pro farmaceuty II., Praha, Karolinum, 2007.
- (36) Čolović, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vasić, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* **2013**, *11*, 315-335.

- (37) Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc* **2011**, *155*, 219-230.
- (38) Whittaker, V. P. How the cholinesterases got their modern names. *Chemico-Biological Interactions* **2010**, *187*, 23-26.
- (39) Bourne, Y.; Taylor, P.; Radić, Z.; Marchot, P. Structural insights into ligand interactions at the acetylcholinesterase peripheral anionic site. *The EMBO Journal* **2003**, *22*, 1-12.
- (40) Scott, B.; Siegel, G.; Albers, R. W.; Price, D.: Basic Neurochemistry: Principles of molecular, cellular and medical neurobiology. Academic Press, 2012; 265.
- (41) Greig, N. H.; Utsuki, T.; Yu, Q.-S.; Zhu, X.; Holloway, H. W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D. K.; Lahiri, D. K. A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion* **2001**, *17*, 159-165.
- (42) Hussein, W.; Saĝlık, B. N.; Levent, S.; Korkut, B.; Ilgin, S.; Özkay, Y.; Kaplancikli, Z. A. Synthesis and Biological Evaluation of New Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Molecules* **2018**, *23*, 2033.
- (43) Martínková, J. Chládek J., Mičuda S., Chládková J.: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*; Grada Publishing, a.s.: Praha, 2018.
- (44) Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules* **2016**, *21*, 191.
- (45) Hroudová, J. Výzkum nových léčiv u Alzheimerovy choroby. *Psychiatrie pro praxi* **2017**, *18*, 7-10.
- (46) Vališ, M.; Caisberger, F.; Šimůnek, L.; Linková, H. Farmakoterapie demencí - pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia* **2013**, *6*, 396-399.
- (47) Pepeu, G.; Giovannini, M. G. Cholinesterase Inhibitors and Beyond. *Current Alzheimer Research* **2009**, *6*, 86-96.
- (48) Parsons, C. G.; Danysz, W.; Dekundy, A.; Pulte, I. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research* **2013**, *24*, 358-369.
- (49) Campos, C.; Rocha, N.; Vieira, R. T.; Rocha, S. A.; Telles-Correia, D.; Paes, F.; Yuan, T.; Nardi, A.; Arias-Carrión, O.; Machado, S.; Caixeta, L. Treatment of cognitive deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatria Danubina* **2016**, *28*, 2-12.
- (50) Sun, X.; Jin, L.; Ling, P. Review of drugs for Alzheimer's disease. *Drug Discoveries & Therapeutics* **2012**, *6*, 285-290.
- (51) Rapp, M.; Burkart, M.; Kohlmann, T.; Bohlken, J. Similar treatment outcomes with Ginkgo biloba extract EGb 761 and donepezil in Alzheimer's dementia in very old age: A retrospective observational study. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2018**, *56*, 130-133.
- (52) Jiráček, R. Extractum Ginkgo biloba EGb761 a jeho využití v psychiatrii. *Neurologie pro praxi* **2018**, *19*, 15-18.
- (53) Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Švarcová, M.; Vinšová, J. Novel Cholinesterase Inhibitors Based on *O*-Aromatic *N,N*-Disubstituted Carbamates and Thiocarbamates. *Molecules* **2016**, *21*, 191.
- (54) Krátký, M.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Vinšová, J. Salicylanilide diethyl phosphates as cholinesterases inhibitors. *Bioorganic Chemistry* **2015**, *58*, 48-52.

(55) Imramovsky, A.; Stepankova, S.; Vanco, J.; Pauk, K.; Monreal-Ferriz, J.; Vinsova, J.; Jampilek, J. Acetylcholinesterase-Inhibiting Activity of Salicylanilide *N*-Alkylcarbamates and Their Molecular Docking. *Molecules* **2012**, *17*, 10142-10158.

(56) Vinšová, J.; Krátký, M.; Komlóová, M.; Dadapeer, E.; Štěpánková, Š.; Vorčáková, K.; Stolaříková, J. Diethyl 2-(Phenylcarbamoyl)phenyl Phosphorothioates: Synthesis, Antimycobacterial Activity and Cholinesterase Inhibition. *Molecules* **2014**, *19*, 7152-7168.

(57) Paraskevopoulos, G.; Monteiro, S.; Vosátka, R.; Krátký, M.; Navrátilová, L.; Trejtnar, F.; Stolaříková, J.; Vinšová, J. Novel salicylanilides from 4,5-dihalogenated salicylic acids: Synthesis, antimicrobial activity and cytotoxicity. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2017**, *25*, 1524-1532.

(58) Kovářová, M.; Komersa, K.; Štěpánková, Š.; Pařík, P.; Čegan, A. New method for the determination of the half inhibition concentration (IC₅₀) of cholinesterase inhibitors. *Zeitschrift für Naturforschung C* **2013**, *68*, 133-138.

(59) Cornish-Bowden, A.: *Principles of enzyme kinetics*; Butterworth-Heinemann **1976**, London.

(60) Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V.; Horvati, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J. New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 6106-6113.