

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ**

KATEDRA ORGANICKÉ A BIORGANICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Syntéza a hodnocení duálně působících potenciálních léčiv
neurodegenerativních chorob**

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

Hradec Králové 2023

Dominik Miffek

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením doc. PharmDr. Mgr. Martina Krátkého, Ph.D. 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

Poděkování

Tímto odstavcem bych chtěl poděkovat mému vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za jeho ochotu, cenné rady, pomoc a chladnou hlavu při spolupráci na vytváření této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu katedry organické a bioorganické chemie za velmi kladný přístup a vytvoření přátelských podmínek pro syntetizování sloučenin. Taktéž děkuji Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D., z Univerzity Pardubice za testování enzymatické aktivity

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Autor práce: Dominik Miffek

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

Název diplomové práce: Syntéza a hodnocení duálně působících potenciálních léčiv neurodegenerativních chorob

Alzheimerova (AD) a Parkinsonova choroba (PD) jsou neurodegenerativní onemocnění, postihující zejména populaci vyššího věku. Incidence těchto onemocnění stále roste po celém světě a ani jedna z těchto nemocí nemá v současné době léčbu, která by byla schopná pacienty trvale vyléčit.

Dosavadní léčiva cílí převážně na zpomalení progresu těchto onemocnění. Cílem je u těchto neurodegenerativních onemocnění zlepšit dostupnost léčby, zamezit progresi nebo úplně vyléčit pacienty trpící AD a PD.

Tímto směrem se i vyvíjí nová potenciální léčiva, která by mohla vykazovat uspokojujivý účinek v inhibici cholinesteráz. Acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BuChE) hrají totiž významnou roli v patogenezi těchto onemocnění. Zejména u AD dochází k poklesu acetylcholinu coby neuromediátoru zajišťujícího homeostázu a správný chod centrální nervové soustavy (CNS).

V léčbě AD se používají inhibitory (AChE), které zvyšují hladinu acetylcholinu (ACh) v mozku. Mezi využívané zástupce patří, rivastigmin, galanthamin a donepezil. Další skupinou léčiv, které pomáhají v léčbě AD, jsou inhibitory *N*-methyl-D-aspartát (NMDA) receptorů. Ty ovlivňují hladinu glutamátu v mozku a pomáhají tak zpomalit příznaky AD.

U léčby PD se využívají léčiva zvyšující hladinu dopaminu. Ten hraje důležitou roli v regulaci pohybu těla a správné koordinaci pohybů. I proto cílí léčba PD na doplnění dopaminu do mozku. Prvním léčivem využívaným v léčbě PD je levodopa. Levodopa je prekurzorem dopaminu. Ke zlepšení přechodu levodopy do CNS se využívají inhibitory

periferní DOPA dekarboxylázy (benserazid, karbidopa) a inhibitory katechol-*O*-methyltransferázy. (COMT) entakapon a tolkapon. Dalšími využívanými léčivy jsou agonisté dopaminu (pramipexol, ropinirol) a inhibitory MAO-B (rasagilin, selegilin).

Jak již bylo zmíněno, v dnešní době se vývoj nové léčby snaží ubírat směrem k multi-target-directed ligands (MTDLs) léčivům. Ta mají za úkol fungovat jako hybridní molekuly a eliminovat co nejvíce příznaků choroby. Předpokládá se, že oxidační stres, nedostatek ACh a nadměrná degradace katecholaminů (při nichž vznikají škodlivé aldehydy a peroxidy vodíku) mají za příčinu rozvoj AD.

Na základě těchto poznatků byly v této práci připraveny série sloučenin, které vycházely ze tří sloučenin používaných v terapii neuropsychiatrických onemocnění. Prvním byl isoniazid (sloučenina používaná převážně k terapii tuberkulózy), resp. jeho derivát iproniazid, fenelzin (léčivo používané v USA u terapie deprese) a 5-methylisoxazol-3-karbohydrazid jako součást léčiva isokarboxazidu. Všechny tyto výchozí sloučeniny mají schopnost inhibice monoaminoxidasy (MAO), i proto byly dále modifikovány za účelem získání nových a lepších duálních inhibitorů AChE, BuChE či monoaminoxidáz (IMAO-A a IMAO-B).

V této práci se podařilo nasyntetizovat celkem 15 sloučenin. Ve většině případů se jednalo o reakci hydrazinu s karbonylovými sloučeninami za vzniku hydrazidů a hydrazonů v prostředí methanolu jako rozpouštědla. Tyto sloučeniny byly poslány na biologické hodnocení *in vitro* inhibice cholinesteráz.

Vyhodnocení účinnosti proběhlo na základě hodnoty IC_{50} . Některé ze sloučenin vykazovaly velmi dobrou inhibici AChE. Nejlepší afinitu k AChE měly sloučeniny připravené z 3-nitroderivátů, následované sloučeninami 4-nitroderivátů. Rozsah IC_{50} se pohyboval od 16,49 μM (nejlepší aktivita) až po 159,57 μM (nejhorší aktivita). Pro porovnání, standard rivastigminu má $IC_{50} = 56,10 \mu\text{M}$.

Sloučeniny v inhibici BuChE nevykazovaly dobrou aktivitu v porovnání se standardy. Nejlepší sloučenina měla $IC_{50} = 53,03 \mu\text{M}$. Standard rivastigminu má inhibici BuChE $IC_{50} = 38,40 \mu\text{M}$. Rozsah IC_{50} se pohyboval od 53,03 μM až po hodnoty 407,49 μM .

Klíčová slova: acetylcholin, acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, butyrylcholinesteráza, fenelzin, inhibitory monoaminoxidáz, inhibitory cholinesteráz, isoniazid, 5-methylisoxazol-3-karbohydrazid, Parkinsonova choroba

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Dominik Miffek

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

Title of diploma thesis: Synthesis and evaluation of dual acting potential drugs for neurodegenerative diseases

Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD) are neurodegenerative diseases that mainly affect the elderly population. The incidence of these diseases is still increasing worldwide, and currently, there is no cure that can permanently treat patients.

Current medications mainly aim to slow the progression of these diseases. The goal is to improve the accessibility of treatment, prevent progression, or completely cure patients suffering from AD and PD.

New potential drugs are also developing in this direction, which could exhibit a satisfactory effect in inhibiting cholinesterases. Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) play a significant role in the pathogenesis of these diseases. Particularly in Alzheimer's disease (AD), there is a decrease in acetylcholine as a neurotransmitter that ensures the homeostasis and proper functioning of the central nervous system (CNS).

In AD treatment, acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs) such as rivastigmine, galantamine, and donepezil are used to increase acetylcholine levels in the brain. Another group of drugs that helps in the treatment of AD are N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor inhibitors, which affect the level of glutamate in the brain and help slow down the development of AD.

In PD treatment, drugs that increase dopamine levels are used. Dopamine plays an important role in regulating body movement and proper coordination of movements. Therefore, PD treatment aims to replenish dopamine in the brain. The first drug used in PD

treatment is levodopa, a dopamine precursor. Peripheral DOPA decarboxylase inhibitors (benserazide, carbidopa), and catechol-O-methyltransferase inhibitors (COMT) entacapone and tolcapone are used to improve the transition of levodopa into the central nervous system (CNS). Other drugs used include dopamine agonists (pramipexole, ropinirole) and MAO-B inhibitors (rasagiline, selegiline).

As mentioned, the development of new treatment aims to move towards multi-target-directed ligands (MTDLs) drugs, which function as hybrid molecules and eliminate as many disease symptoms as possible. It is believed that oxidative stress, lack of ACh, and excessive degradation of catecholamines (which produce harmful aldehydes and hydrogen peroxides) are the causes of AD.

Based on these findings, a series of compounds were prepared in this study, which were based on three compounds used in the therapy of neuropsychiatric diseases. The first was isoniazid (a compound mainly used to treat tuberculosis) or its derivative iproniazid, phenelzine (a drug used in the US for depression therapy), and 5-methylisoxazole-3-carbohydrazide as part of the isocarboxazid drug. All of these starting compounds have the ability to inhibit monoamine oxidase (MAO), which is why they were further modified.

In this work, a total of 15 compounds were successfully synthesized. In most cases, hydrazine reacted with carbonyl compounds to form hydrazides and hydrazones in methanol as a solvent. These compounds were sent for *in vitro* biological evaluation of cholinesterase inhibition.

The efficacy evaluation was based on the IC₅₀ value. Some of the compounds showed very good inhibition of AChE. The compounds prepared from 3-nitro derivatives had the best affinity for AChE, followed by compounds prepared from 4-nitro derivatives. The range of IC₅₀ values ranged from 16.49 μM (best activity) to 159.57 μM (worst activity). For comparison, the standard rivastigmine has an IC₅₀ of 56.10 μM.

The compounds did not show good activity in BuChE inhibition compared to standards. The best compound had an IC₅₀ of 53.03 μM. The standard rivastigmine has a BuChE inhibition IC₅₀ of 38.40 μM. The range of IC₅₀ values ranged from 53.03 μM to 407.49 μM.

Keywords: acetylcholine, acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, butyrylcholinesterase, isoniazid, 5-methylisoxazole-3-carbohydrazide, monoamine oxidases inhibitors, Parkinson's disease, phenelzine

Obsah

1	Úvod	15
2	Teoretická část	16
2.1	Acetylcholin a jeho úloha v těle	16
2.1.1	Mechanismus účinku acetylcholinu a jeho syntéza	17
2.1.2	Parasympatikus	18
2.1.3	Receptory parasympatiku.....	19
2.2	Cholinomimetika (parasympatomimetika).....	20
2.2.1	Přímá parasympatomimetika	20
2.2.2	Nepřímá parasympatomimetika (inhibitory acetylcholinesterázy).....	21
2.2.3	Reverzibilní a ireverzibilní inhibitory	22
2.3	Cholinolytika (parasympatolytika).....	24
2.3.1	Parasympatolytika s terciálním dusíkem.....	24
2.3.2	Parasympatolytika s kvarterním dusíkem	26
2.4	Inhibitory monoaminoxidasy (IMAO).....	26
2.4.1	Molekulární degradace katecholaminů.....	27
2.4.2	Degradace katecholaminů (oxidativní deaminace)	28
2.4.3	Typy MAO a IMAO	29
2.5	Alzheimerova choroba	32
2.5.1	Úvod a vznik Alzheimerovy choroby	32
2.5.2	Léčba Alzheimerovy choroby	33
2.5.3	Inhibitory acetylcholinesterázy	34
2.5.4	Další léčiva využívané v léčbě Alzheimerovy choroby.....	36
2.6	Parkinsonova choroba.....	37
2.6.1	Úvod a patogeneze Parkinsonovy choroby	37
2.6.2	Léčba Parkinsonovy choroby.....	39
2.6.3	Další sloučeniny v léčbě Parkinsonovy choroby	41
3	Cíl práce	43
4	Experimentální část	44
4.1	Obecná metodika – syntéza	44
4.2	Chemická část.....	45
4.2.1	Syntéza hydrazidů a hydrazonů.....	45
4.3	Biologická aktivita.....	61
4.3.1	Stanovení inhibiční aktivity u cholinesteráz	61

4.3.2	Výsledky stanovení inhibiční aktivity AChE a BuChE	61
5	Diskuze.....	63
5.1	Chemická část.....	63
5.2	Biologie.....	65
5.2.1	Inhibice a IC ₅₀	65
5.2.2	Inhibice AChE.....	66
5.2.3	Inhibice BuChE.....	67
6	Závěr.....	69
7	Použitá literatura.....	71
8	Seznam zkratk.....	75
9	Seznam obrázků a schémat.....	78
10	Seznam tabulek	79

1 Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je onemocnění postihující primárně centrální nervový systém. Projevuje se úbytkem neuronů a důležitého neuromediátoru acetylcholinu (ACh), zodpovědného za přenos vzruchu mezi buňkami. Tímto přenosem ACh ovlivňuje základní funkce, jako je paměť, učení a další kognitivní funkce. Toto onemocnění patří mezi nejčastější příčiny demence u starších osob a zasahuje tak do každodenního života pacientů i jejich rodin.

Parkinsonova nemoc (PD) je neurodegenerativní onemocnění, které postihuje centrální nervový systém a projevuje se různými motorickými a neuropsychiatrickými příznaky. PD je způsobena úbytkem dopaminergních neuronů v substantia nigra. Dalším důležitým faktorem v rozvoji PD je zhoršený energetický metabolismus v mozku.

Doposud neexistuje léčba, která by zamezila progresi těchto onemocnění. Současné léčebné postupy se zaměřují především na zpomalení progresu onemocnění a zmírnění příznaků.

Mezi základní léčiva využívající se u terapie AD patří inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), které svým mechanismem účinku zvyšují hladinu ACh v synapsi neuronů, a tím zlepšují přenos informací mezi buňkami. Dále jsou k dispozici léčiva, která ovlivňují hladinu glutamátu v mozku, kdy jeho přílišná aktivita vede k poškození mozku. Při léčbě PD se nejčastěji používají léky, které zvyšují hladinu dopaminu v mozku a tím zlepšují motoriku. Tyto léky mohou být podávány samostatně nebo v kombinaci s dalšími léky.

Nadějná léčiva, která by mohla pomoci v zpomalení progresu AD jsou multi-target directed ligands (MTDL). Jedná se o léčiva, která interagují s více než jedním buněčným cílem a vykazují tak lepší terapeutické účinky. Jelikož se zaměřují na více cílů zároveň přinášejí tak vyšší účinnost a nižší nežádoucí účinky.

Je důležité zdůraznit, že dosažení úspěchu v této oblasti by mohlo mít významný dopad na kvalitu života lidí trpících AD, PD a na celkové zdraví populace. Zatímco terapeutické možnosti jsou stále omezené, nové látky vyvinuté v této práci by mohly přinést nový nadějný přístup v léčbě těchto složitých nemocí.

2 Teoretická část

2.1 Acetylcholin a jeho úloha v těle

Acetylcholin (ACh) je ester kyseliny octové a cholinu (obr. 1). Je velmi důležitým neuromediátorem¹ v periferním nervovém systému včetně motorických nervů, v autonomní nervové soustavě a také v centrální nervové soustavě (CNS). [1]

Nervový systém můžeme anatomicky rozdělit na **centrální nervový systém** (CNS) a **periferní nervový systém** (somatický a vegetativní nervový systém). Vegetativní nervový systém rozdělujeme na dva celky: sympatikus a parasympatikus. [2]

Úkolem ACh je zprostředkovávat přenos vzruchu (excitace) z buňky na buňku a tím předávat informace do všech částí těla. Vegetativní nervový systém je část nervového systému, která nepodléhá přímé volní kontrole, proto se také jinak nazývá autonomní nervový systém (ANS), ten ovlivňuje podvědomé funkce. [2] Mezi ně patří paměť, dýchání, trávení, kontrola srdečního tepu, krevního tlaku, a mnoha dalších. [3]

V CNS je ACh důležitou součástí regulace uvolňování jiných aktivačních i inhibičních neuromediátorů, jako je glutamát², glycin³ nebo dopamin⁴. I proto může výpadek cholinergních drah a jader v předních lalocích mozku způsobit rozpad osobnosti, ztrátu kognitivních funkcí a tím vést k rozvoji neurodegenerativních onemocnění – Alzheimerově chorobě nebo se podílet na rozvoji demence u Parkinsonovy choroby (PD). [4]

ACh coby neuromediátor má ale i negativní dopady na organismus, zejména při vystupňované transmisi. Jako lokální hormon může být velmi nebezpečný u karcinomu tlustého střeva, u kterého dochází k expresi muskarinových receptorů typu M3R. Tyto receptory jsou startéry k rychlejší proliferaci buněk, což může spustit rychlejší dělení rakovinotvorných buněk. [4] K dalším negativním dopadům ACh může vést jeho nadměrný výskyt v synaptické štěrbině. Ten může být způsobený inhibicí **acetylcholinesterázy** (AChE; ta způsobuje rozklad ACh po neurotransmisi), masivním uvolněním z presynaptického neuronu, případně analogické účinky mohou být vyvolány aktivací ACh receptorů sloučeninami stejného účinku jako má acetylcholin (parasymptomimetika). Pro účinek ACh

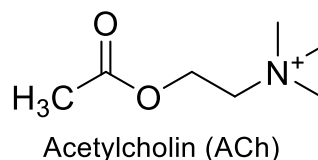
¹ Neuromediátor (neurotransmitter) je molekula, která umožňuje přenos signálu z buňky do buňky.

² Glutamát je neesenciální aminokyselina, působící jako excitační neurotransmitter v mozku.

³ Glycin je neesenciální aminokyselina, působící jako inhibiční neurotransmitter v CNS.

⁴ Dopamin je sloučenina ze skupiny katecholaminů. Jedná se o velmi důležitý neurotransmitter, který působí na pěti základních dopaminových receptorech (D1-D5).

je důležitá kvarterní amoniová a esterová skupina, Modifikací esterové skupiny je možno dosáhnout snížení citlivosti molekuly k hydrolyze pomocí AChE a tím i modifikace afinity k M-receptorům a N-receptorům. [5]



Obrázek 1 - struktura ACh

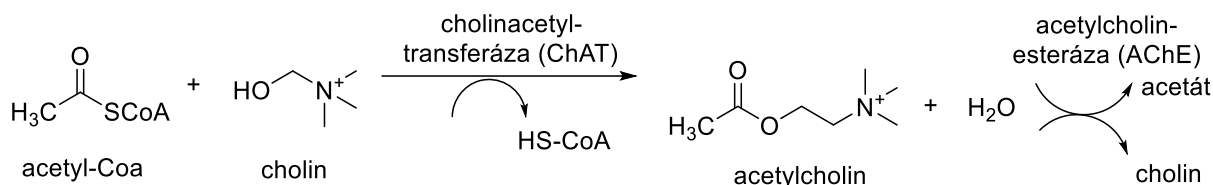
2.1.1 Mechanismus účinku acetylcholinu a jeho syntéza

ACh působí v těle jak v parasympatiku, tak i v sympatiku. ACh se mimo postgangliových synapsí parasympatiku, kde stimuluje muskarinové receptory, uvolňuje také v gangliích parasympatiku, sympatiku a na neuromuskulární ploténce. Účinkuje na dvou typech receptorů pojmenovaných podle přírodních látek, které jsou jejich agonisty. [4]

Prvním z nich je **muskarinový** receptor (aktivovaný alkaloidem muskarinem z muchomůrek), zprostředkovává především funkce parasympatiku, tj. podpora sekrece žláz, kontrola srdečního tepu aj. Druhým je nikotinový receptor (aktivovaný nikotinem) zodpovědný mimo jiné za přenos vzruchu mezi motorickým vláknem a svalovým vláknem (neboli přenos vzruchu nervosvalovou ploténkou). [4]

Nikotinové receptory se vyskytují na pregangliových synapsích. Bez tohoto vzruchu se nepřenesou impulzy z nervu na sval. [4] Další výskyt nikotinových receptorů je v sekrečních vláknech dřeně nadledvin a v CNS. Tyto receptory se dále dělí na jednotlivé podtypy o těch bude pojednááno v kapitole 2.1.3.

Acetylcholin je syntetizován cholinacetyltransferázou (ChAT) z acetyl-CoA a cholinu v presynaptické části neuronu (obr. 2). Vzniklý ACh je vypuštěn z nervových zakončení do synaptické štěrbině, kde nasedá agonisticky na jeho specifické receptory (nikotinové a muskarinové) a vzniká buněčná reakce. Po excitaci neuronů je ACh velmi rychle rozkládán AChE na cholin a acetát (obr. 2). Vzniklý cholin je zpětně vychytáván do presynaptického neuronu a je z něj resyntetizován acetylcholin. [1]



Obrázek 2 - syntéza acetylcholinu a jeho rozklad pomocí AChE

2.1.2 Parasympatikus

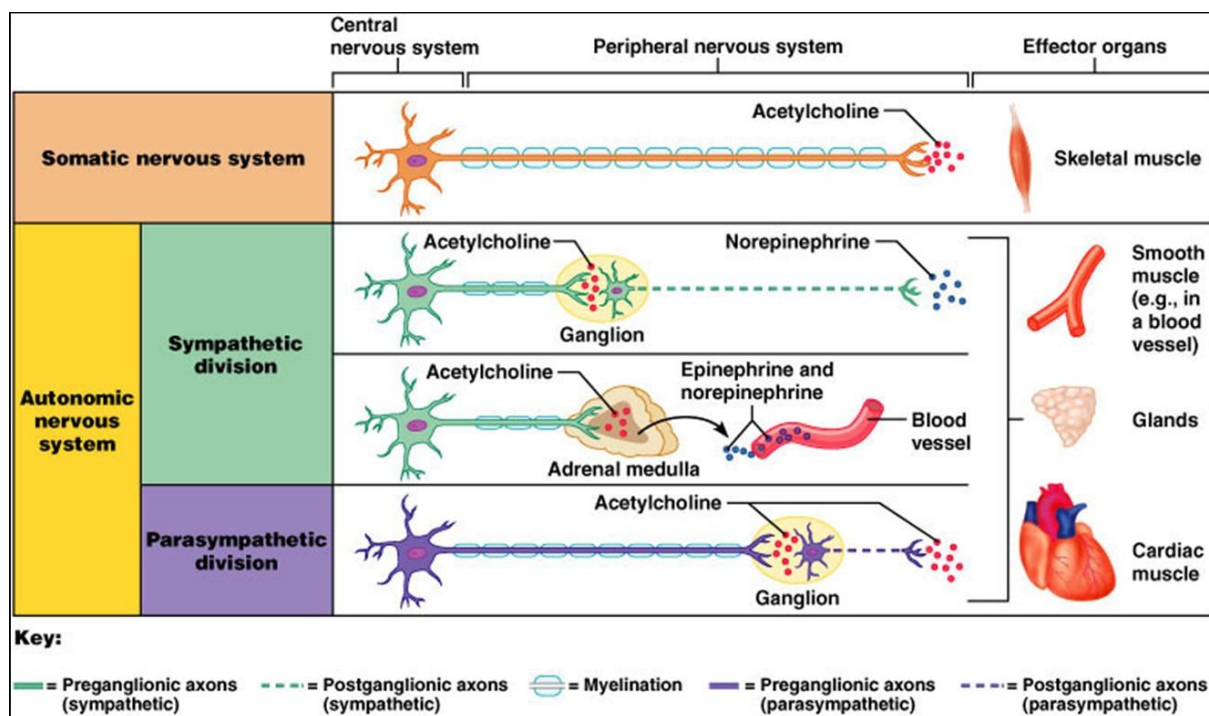
Parasympatikus je systém, který převládá v klidných podmínkách neboli při „odpočinku a trávení“. Zatímco sympatikus má za úkol řídit reakci „boj, nebo útěk“. Hlavním posláním parasympatiku je šetřit energii pro regulaci tělesných funkcí (močení, trávení aj.) [6]

Hlavním neuromediátorem na nervové synapsi pregangliové i postgangliové úrovni je již zmiňovaný ACh.

Pokud podáme sloučeninu, která stimuluje nikotinové receptory bude účinek záviset na převládající inervaci daného orgánu. Např. cévy jsou více inervovány pomocí **sympatiku**, proto stimulace nikotinových receptorů bude mít za následek zvýšení přenosu vzruchu postgangliovým neuronem sympatiku a následnou aktivací sympatických receptorů (α_1) na příslušné efektorové buňce. To bude mít za následek kontrakci stěn cév. Dojde tedy ke zvýšení krevního tlaku (TK). [7]

Naopak v srdci a v gastrointestinálním traktu (GIT) převládá tonus **parasympatiku**, proto stimulace nikotinových receptorů ganglií bude mít za následek zvýšený přenos vzruchu postgangliovým neuronem parasympatiku a následnou aktivací muskarinových receptorů. Dojde tedy ke zvýšené motilitě GIT. [7]

Aktivací nikotinových receptorů na neuromuskulární ploténce pomocí farmak dochází ke spasmu příčně pruhovaného svalstva, což může při otravě látek působících na neuromuskulární ploténce způsobit smrt vlivem spasmu bronchů (udušením). [7]



Obrázek 3 - popis neuromediátorů v autonomním a somatickém nervovém systému [5]

2.1.3 Receptory parasympatiky

Muskarinové receptory se rozdělují do 5 základních skupin s označením M₁-M₅. M₁ receptory se nachází v CNS, periferních neuronech a parietálních buňkách žaludku, působí excitačně. M₂ receptory jsou „srdeční“, nachází se zejména v srdci a ovlivňují i nervus vagus. Jejich výskyt je i presynapticky na nervových zakončeních, působí inhibičně. M₃ jsou receptory žlázy, ovlivňují hladké svalstvo – GIT, oka, průdušek a exokrinních žláz, působí excitačně. M₄ se nachází v CNS (kortex, striatum), působí inhibičně. M₅ receptory jsou také přítomny v CNS (substantia nigra) a ovlivňují i corpus ciliare (způsobují akomodaci oka na blízko). [7]

Muskarinové receptory se dále rozdělují podle účinku druhého posla. To znamená, že pokud ACh coby neuromediátor agonisticky „nasedne“ na muskarinový receptor typu M₁-M₅, další způsobená kaskáda záleží na účinku druhého posla. U muskarinových receptorů rozdělujeme tři typy druhých poslů: spřažené s G-proteiny, působící přes inositol-fosfátový systém a působící na adenylátcykláze. [5]

Do prvního typu (spřažené s G-proteiny) se řadí receptory M₁, M₃ a M₅. Dochází při nich ke zvyšování inositoltrifosfátu (IP₃) a diacylglycerolu (DAG) a k předání signálu do buňky. M₂ a M₄ receptory působí přes inositol-fosfátový systém (snížením cAMP). [5]

2.2 Cholinomimetika (parasympatomimetika)

Cholinomimetika jsou skupinou léčiv napodobující účinky jako při podráždění parasympatiku. Působí podobně na receptorech jako ACh včetně nežádoucích účinků. Předávkování cholinomimetiky vede ke specifickým nežádoucím účinkům – **nadměrnému slinění** (stimulace exokrinních žláz), zvracení, **samovlnnému úniku moči** (relaxace svěrače měchýře), **mióze** (kontrakce musculus ciliaris), **hypotenzi** a **bronchokonstrikci** následované respiračním selháním. Ve vysokých dávkách i k bradykardii. [8]

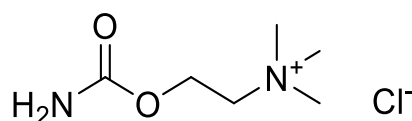
2.2.1 Přímá parasympatomimetika

Působí podobně jako ACh. ACh se však v klinické praxi nevyužívá, protože jeho degradace po podání nitrožilně je pomocí AChE okamžitá. Proto se využívají spíše syntetické estery cholinu a alkaloidy. Ty jsou odolnější proti AChE. Od ACh se tato léčiva liší kinetikou (odolnost proti AChE) i farmakodynamickými vlastnostmi (afinita k M- a N- receptorům). [7]

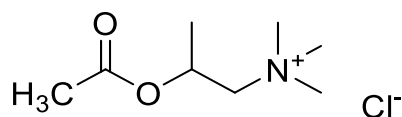
Z esterů cholinu se využívá především **karbachol** (obr. 4). V praxi se využívá hlavně k navození miózy při operacích oka. Účinkuje agonisticky na N-receptorech a M-receptorech a dokonce vykazuje schopnost slabě blokovat AChE. Další látkou je alkaloid **pilocarpin**. Snižuje nitrooční tlak odtokem komorové tekutiny. Využíván je při léčbě glaukomu. Dalším zajímavým léčivem je **metacholin** (obr. 5). Ten se využívá k posouzení hyperreaktivity dýchacích cest v klinické diagnóze astmatu. [9]

Vareniklin je látka používána při léčbě odvykání kouření. Má vysokou afinitu k nikotinovým receptorům, působí jako parciální agonista (tzn. že není schopný vyvolat maximální efekt po vazbě na receptor). Při této vazbě dojde k úlevě od symptomů způsobených vysazením nikotinu (agonistická aktivita) a zároveň zabraňuje navázání nikotinu na nikotinové receptory (antagonistická aktivita), čímž redukuje příjemné pocity související s kouřením. [7]

Intoxikace parasymptomimetiky je výsledkem cholinergního nadbytku. V případě předávkování parasymptomimetiky se podává **atropin**. [9] Pokud budeme způsobovat nadměrnou stimulací M-receptorů, dojde k zvýšené excitaci v CNS, k průjmu (hypersekrece v GIT), mióze, bradykardii a hypotenzi (vasodilatace). Excitace N-receptorů vede ke svalovým záškubům ke křečím a k zvýšení krevního tlaku (stimulace N-receptorů v nadledvinách). [7]



Obrázek 4 - struktura karcholu



Obrázek 5 - struktura metacholinu

2.2.2 Nepřímá parasymptomimetika (inhibitory acetylcholinesterázy)

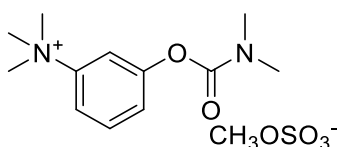
Nepřímá parasymptomimetika a jejich mechanismus účinku je odlišný od účinku přímých parasymptomimetik. Dochází k navázání farmak na AChE, čímž znemožňují její správnou funkci. [7]

Jsou důležitou třídou cholinomimetik. Kromě jejich terapeutického účinku jsou využívány v zemědělství jako pesticidy a ty nejtoxičtější se využívají jako bojové látky (jedy). Inhibitory AChE se klasifikují dle jejich chemické struktury a dle jejich interakce s enzymem. [10]

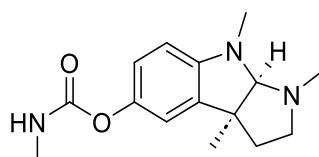
Rozlišujeme chemicky tři hlavní skupiny inhibitorů AChE. **Karbamáty**, mezi jejich zástupce patří **fyzostigmin**, neostigmin, pyridostigmin. **Kvarterní aminy**, k nimž patří zástupci edrofonium, ambenonium a demekarium. A poslední skupinou jsou **organofosfáty**. K nim se řadí isofluorofát, echothiofát a v neposlední řadě také bojové chemické látky jako soman. Další rozdělení je dle inhibice enzymu AChE, kdy je klasifikujeme dle způsobu, kterým inhibují AChE, na reverzibilní a ireverzibilní. [10]

2.2.3 Reverzibilní a ireverzibilní inhibitory

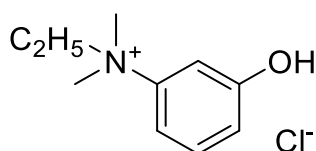
Reverzibilní inhibitory vytváří komplex s enzymem, stejně jako ho vytváří ACh. Tyto sloučeniny kompetují s ACh o navázání na aktivní místo enzymu AChE. Chemická struktura klasických inhibitorů (karbamátů), jako je fyzostigmin a neostigmin, je podobná acetylcholinu. Od ACh se liší pouze tak, že po vazbě na enzym není vzniklý adukt tak rychle hydrolyzován, jako je tomu u ACh. Proto vazba na enzym přetrvává déle než u ACh, je ale reverzibilní. Edrofonium (obr. 8) (kvarterní amin) se řadí také mezi reverzibilní inhibitory, nicméně nemá schopnost se kovalentně navázat na enzym. [10]



Obrázek 6 - struktura neostigminu (jako methylsulfát)



Obrázek 7 - struktura fyzostigminu



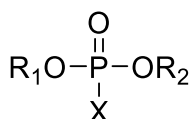
Obrázek 8 - struktura edrofonia

Mezi nepoužívanější **reverzibilní** parasympatomimetika patří neostigmin (obr. 6), fyzostigmin (obr. 7) a pyridostygmín. Jsou využívány hlavně u myasthenia gravis (autoimunitní onemocnění spočívající v destrukci nikotinových receptorů), u retence moči či atonií (ztráta svalového napětí) v GIT. Fyzostigmin se využívá především při otravě anticholinergně působícími látkami, TCA (tricyklická antidepresiva), neuroleptiky, spasmolytiky a antiparkinsoniky. [7]

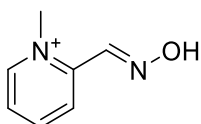
Ireverzibilní inhibitory (organofosfáty) již svoje uplatnění ve farmacii nemají. V minulosti se využívaly k léčbě svrabu (malathion), glaukomu (paraoxon) či parazitóz (metrifonát). Dnes se používají jako insekticidy, ale svůj význam mají také v oblasti bojových látek, např. sarin, soman, tabun. Chemické vzorce organofosfátů jsou na obr. 9. [7] Ne vždy se jedná o organofosfáty z chemického hlediska. Může se jednat o syntetické amidy, estery nebo thiolové deriváty kyseliny fosforečné nebo fosfonové. [11]

Mechanismus účinku organofosfátů je takový, že vytváří kovalentní vazbu s hydroxylovou skupinou serinu na enzymu AChE. Na rozdíl od rychlé hydrolyzy acetylcholinového komplexu a o něco pomalejší hydrolyzy karbamátových komplexů reagují organofosfátové komplexy velmi pomalou hydrolyzou, což vede většinou k ireverzibilní inhibici enzymu. I přes to, že se tato aktivita nazývá nevratná, je možné obnovit vitální funkce enzymu, a to pomocí látek nazývajících se reaktivátory, chemicky typicky **oximy**. Nejvíce známým je zástupce pralidoxim. [10]

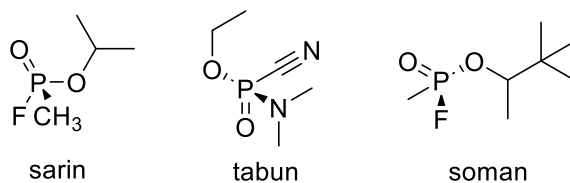
Ani oximy nejsou vždy účinné, protože fosforylované enzymy mohou podléhat změnám, během kterého organofosfát ztrácí alkylovou skupinu a vytváří stabilnější, nevratnou vazbu s enzymem. To se děje například u bojových plynů jako je sarin, soman nebo tabun (obr. 11). Jsou považovány za nejvíce toxické organofosfáty, proto otrava těmito sloučeninami končí převážně smrtí. [10]



Obrázek 9 – struktura organofosfátů ($X = \text{halogen, kyanid, ester}$)



Obrázek 10 - struktura oximu (pralidoxim)



Obrázek 11 - struktura bojových plynů

2.3 Cholinolytika (parasymptolytika)

Parasymptolytika jsou látky, které mají antagonistický účinek oproti parasymptomimetickému nervovému systému skrze anticholinergní aktivitu. Brání působení ACh jako neurotransmiteru na muskarinových receptorech. Antagonisté muskarinových receptorů kompletně blokují navázání ACh na muskarinový receptor a mají zanedbatelný vliv na nikotinové receptory. [8]

Nežádoucí účinky (v některých případech i žádoucí účinky) parasymptolytik jsou opačné v porovnání s parasymptomimetiky. Jedná se o **bronchodilataci**, sedaci, agitovanost, depresi (účinek na CNS), **sníženou produkci slin**, **mydriázu** (rozšíření zornic), sníženou produkci potních žláz (zamezení pocení) a **retenci moči** (vlivem kontrakce svěrače uretry). [12]

Nikotinové receptory ovlivňují periferní myorelaxancia. Parasymptolytika rozdělujeme na parasymptolytika s terciálním dusíkem a parasymptolytika s kvarterním dusíkem. [7]

2.3.1 Parasymptolytika s terciálním dusíkem

Mezi parasymptolytika s terciálním dusíkem řadíme **atropin**, **skopolamin** a léčiva používaná u syndromu hyperaktivního měchýře – **oxybutynin**, **tolterodin**, **darifenacin**, **solifenacin**, **fesoteridin**. [7]

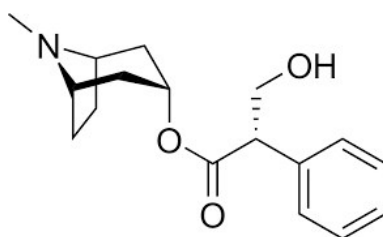
Atropin (obr. 12) je alkaloid nacházející se v několika rostlinách, mezi než patří např. *Atropa belladonna* (rulík zlomocný) a *Datura stramonium* (durman obecný). Rulík se využíval již v antice jako dilatátor zorniček pro ženy, zvyšoval tak jejich atraktivitu. Durman je dekorativní, ale velice jedovatá rostlina. Původem pochází z Asie, kde byla využívána jako náplň dýmek ke kouření a léčbě astmatu. [8]

I proto atropin, stejně jako **tropikamid** (derivát kyseliny tropové), nachází svoje hlavní využití v očním lékařství k navození mydriázy a cykloplegie⁵ před očním vyšetřením. [7]

⁵ Cykloplegie je krátkodobé ochrnutí svalů řasnatého tělíška. Projevuje se rozšířenou zornicí.

Účinky atropinu jsou také využívány v premedikaci před celkovou anestezií. Jeho účinkem se snižuje sekrece slin (antisalivační účinek) a hlenu v oblasti horních a dolních dýchacích cest. Další využití atropinu je při akutním selhání myokardu a bradykardii vzniklou zvýšeným tonem vagu. [13]

Sinoatriální uzel je citlivý na inhibici muskarinových receptorů, protože síně jsou silně inervovány parasymptomimetickými vlákny nervus vagus. Reakce začíná bradykardií (stimulace nervus vagus v míše) a poté dochází k tachykardii ze začínající blokací vagu na srdce (antimuskarinový účinek) bez snížení TK. [7]

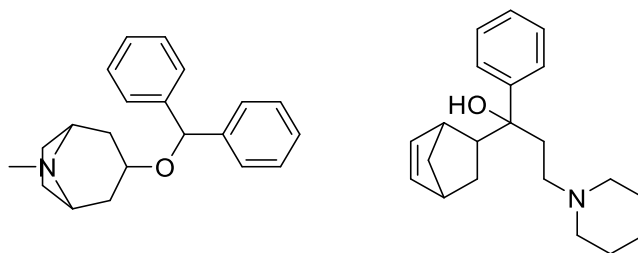


Obrázek 12 - struktura atropinu (terciální amin)

Při léčbě OAB (syndrom hyperaktivního měchýře) se využívají terciální a kvartérní aminy. Terciální aminy mají vyšší lipofilitu a nejsou nabitě, takže mají lepší průchod hematoencefalitickou bariérou (HEB). [14]

Darifenacin je selektivní k M_3 receptoru, což je jeden z hlavních receptorů pro kontrakci destrusoru. Tím snižuje nežádoucí účinky způsobené antagonismem dalších subtypů muskarinových receptorů. **Fesoterodin** je neselektivní antagonist muskarinových receptorů. [14]

Dalšími zajímavými látkami terciální struktury cholinolytik jsou **benzatropin** (syntetická sloučenina obsahující tropinovou bázi a část benzohydrylu difenylhydraminu), **procyklidin** a **biperiden** užívané k léčbě PD (obr. 13). Podáním těchto sloučenin dochází k vyrovnání cholinergního a dopaminového systému u PD. Tyto tři sloučeniny jsou také účinné v léčbě extrapyramidových nežádoucích účinků antidopaminergních léčiv. Extrapyramidové účinky způsobuje například metoklopramid. [7]



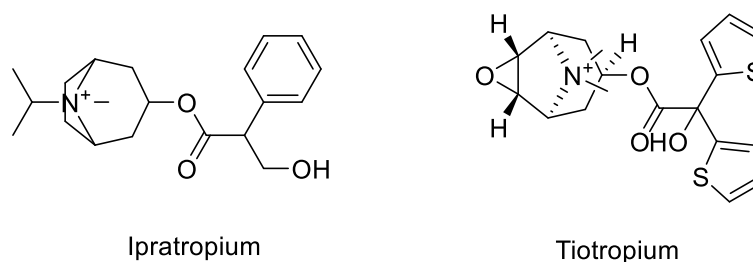
Obrázek 13 – struktura biperidenu (vlevo) a benzatropinu (vpravo)

2.3.2 Parasympatolytika s kvarterním dusíkem

Kvarterní aminy se využívají převážně v léčbě astmatu a u chronické obstrukční plicní nemoci CHOPN. Mezi zástupce patří **ipratropium**, **tiotropium**, **glykopyronium** a **aklidinium**. Díky kladně nabitému dusíku se nedostávají do CNS. [7]

Dále se rozdělují dle doby účinku sloučenin na SAMA (short-acting-muscarinic-antagonist) a LAMA (long-acting-muscarinic-antagonist), tedy na krátkodobě účinkující a dlouhodobě účinkující muskarinové antagonisty. Mezi SAMA patří **ipratropium**. To má ve srovnání s β_2 -mimetiky nižší bronchodilatační účinek a využívá se jak u astma bronchiale, tak převážně u CHOPN. [7]

Tiotropium jako zástupce LAMA je převážně indikováno u CHOPN (ale i u asthma bronchiale). Má delší biologický poločas, a tedy i delší působení na M_3 receptorech, brání tedy bronchokonstričnímu účinku ACh na receptorech. [7]



Obrázek 14 - struktura antagonistů muskarinových receptorů

2.4 Inhibitory monoaminoxidasy (IMAO)

Monoaminoxidázy (MAO) jsou mitochondriální enzymy katalyzující oxidativní deaminaci několika biogenních aminů (katecholaminů). Podílí se na jejich inaktivaci a hrají zásadní roli v homeostáze několika neurotransmiterů a tím i na homeostázi celého organismu. [16]

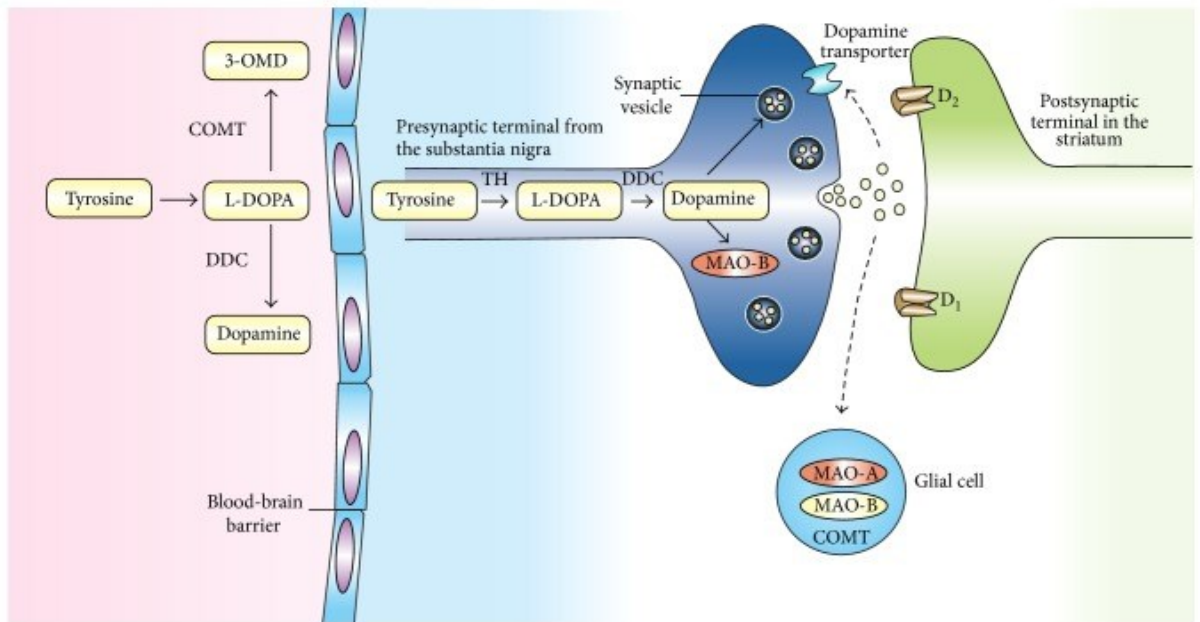
Katecholaminy jsou sloučeniny fungující jako neurotransmitery a hormony v různých fyziologických procesech. Mezi endogenní katecholaminy patří **adrenalin**, **noradrenalin**, **dopamin** a **serotonin**. Tyto molekuly hrají klíčovou roli při přenosu signálu z buňky na buňku v **sympatiku** a v řadě mozkových drah. Pokud tedy dojde k odchýlení od rovnováhy, a to nadbytkem nebo nedostatkem katecholaminů v organismu, dochází k rozvoji několika různých psychiatrických a dalších zdravotních problémů. [17]

2.4.1 Molekulární degradace katecholaminů

Dopamin je produkován několika typy buněk, dopaminergními neurony, v určitých částech mozku, jako je substantia nigra, ventrální tegmentální oblasti a v hypothalamu. Prekurzorem dopaminu je L-tyrosin. Dopamin může být prekurzorem adrenalinu a noradrenalinu, kdy je následně přeměněn dopamin β -hydroxylasou, která zavádí hydroxylovou skupinu na ethylaminový skelet do polohy 2. [18]

Adrenalin a **noradrenalin** se syntetizují hlavně v dřeni nadledvin a sympatických neuronech. V sympatických neuronech jsou produkovány v zásobních vezikulách a jsou uvolněny při neuronální aktivitě. [17]

Během skladování mohou však katecholaminy samovolně uniknout do neuronální cytoplasmy a podléhat deaminaci již v intracelulárním prostředí pomocí MAO. Jelikož v intracelulárním prostředí není přítomna COMT (katechol-*O*-methyl-transferáza), dochází k přeměně na VMA (vanilylmandlovou kyselinu) až v extracelulárním prostoru (v synapsi). [17]



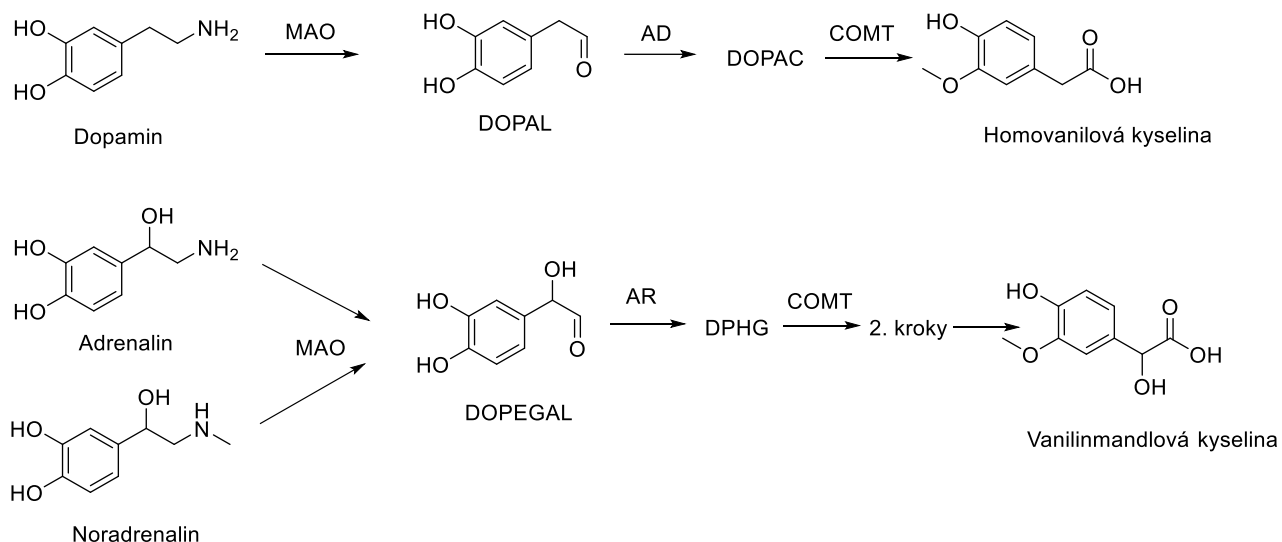
Obrázek 15 - metabolismus dopaminu (Olguín H, 2016)

2.4.2 Degradace katecholaminů (oxidativní deaminace)

Oxidativní deaminace je proces, při kterém se katecholaminy degradují na **HMA** (homovanilovou kyselinu) a **VMA**. Ty již nevykazují funkci neurotransmiterů. Dopamin se přeměňuje na HMA, adrenalin a noradrenalin se přeměňují na VMA. [17]

Mechanismus účinku oxidativní deaminace je popsán na obr. 16. V prvním kroku dochází k deaminaci katecholaminů na aldehyd pomocí MAO. V druhém kroku je zprostředkována tvorba alkoholu nebo kyseliny, a to pomocí AD (aldehyddehydrogenázou) a AR (aldehydreduktázou) na DOPAC (kyselina) a DPHG (glykol). Dalším krokem je *O*-methylace pomocí **COMT** a přeměna na HMA a VMA jako konečných produktů deaminace. [17]

Při deaminaci se uvolňuje peroxid vodíku, který hraje roli ve tvorbě hydroxylových radikálů. Inhibice tvorby těchto radikálů je užitečná u onemocnění spojených nebo způsobených oxidačním stresem. [16]



Obrázek 16 - degradace endogenních katecholaminů

2.4.3 Typy MAO a IMAO

MAO rozdělujeme na dva podtypy: MAO-A se exprimuje přednostně v CNS, následováno GIT, a dokonce můžeme najít zvýšenou hladinu i v srdci. Blokace MAO-A je užitečná v léčbě deprese a úzkostných poruch, protože její inhibitory zvyšují koncentraci serotoninu, dopaminu i noradrenalinu v organismu. MAO-B se exprimuje v ledvinách, granulocytech, lymfocytech a krevních destičkách, dále v CNS, plicích, slezině a játrech. Inhibice MAO-B je prospěšná při léčbě neurodegenerativních poruch, protože se při její inhibici snižuje degradace dopaminu a zlepšují se motorické funkce u pacientů s Parkinsonovou chorobou. [16]

Zástupci IMAO se rozlišují dle účinku inhibice buď na selektivní IMAO-A, selektivní IMAO-B, nebo neselektivní MAO inhibitory, které inhibují jak MAO-A, tak MAO-B. [19]

Neselektivní IMAO se rozdělují na **hydraziny** a **non-hydraziny**. Mezi zástupce a nejpoužívanější neselektivní IMAO hydrazinového typu patří **fenelzin**, hydralazin, **iproniazid**, isoniazid, **isokarboxazid**, feniprazin, benmoxin a safrazin. Mezi non-hydraziny se řadí karoxazon, **tranlycypromin**, linezolid a furazolidon. [19]

Fenelzin, iproniazid a isokarboxazid (obr. 17) byly prvními využívanými látkami ze skupiny hydrazinů. Tyto molekuly způsobují ireverzibilní inhibici kovalentní vazbou

s flavinovým koenzymem v obou izoformách. Mají tedy silné nežádoucí účinky a nejsou tak vhodné k terapii depresí (inhibice MAO-A). [20]



Obrázek 17 - struktura neselektivních hydrazinových inhibitorů MAO

Potenciál pro inhibici MAO enzymů pomocí hydrazinů vychází z jejich podobné chemické struktury, jako mají MAO substráty (adrenalin, noradrenalin, serotonin). Tyto inhibitory hrají zásadní roli v orientaci a tvorbě komplexu s aktivním místem enzymu. **Hydrazony** jsou analoga hydrazinů obsahující skupinu -NH-N=CH-. [20]

Právě dvojná vazba C=N a terminální dusík hrají důležitou roli v jejich fyzikálních i chemických vlastnostech. C-atom v hydrazonu má jak elektrofilní, tak nukleofilní vlastnosti. Oba dusíky hydrazinové skupiny mají nukleofilní charakter, ale aminový dusík je více reaktivnější. Proto jsou hydrazony obecně považovány za potenciální inhibitory MAO. [20]

Fenelzin (PLZ) patří mezi nejznámější a nejvyužívanější léčiva s neselektivní inhibiční aktivitou na MAO. Využívá se jako antidepresivum s anxiolytickými účinky. Tato multifunkční sloučenina má mnoho farmakologických i neurochemických efektů, a to jako mateřská molekula, tak také její metabolit β -fenylethylidenhydrazin (PEH). Zároveň obě sloučeniny ovlivňují koncentraci γ -aminomáselné kyseliny (GABA) v mozku a inhibují primární aminooxidázu⁶. [22]

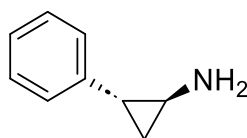
PLZ je metabolizován okamžitě, při čemž vznikají metabolity jako je PEH, fenylactová kyselina a β -fenylethylamin. Inhibicí MAO zvyšují PLZ a PEH koncentraci serotoninu (5-HT), adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu. [22]

⁶ Primární aminooxidáza (PrAO) je transmembránový glykoprotein obsahující měď, podílející se na patologii AD 21. Shanahan, P., et al., *Theobromine and related methylxanthines as inhibitors of Primary Amine Oxidase*. J Food Biochem, 2019. **43**(2): p. e12697.

Nicméně inhibice MAO vede k neuroprotektivním účinkům PLZ, protože katalytický cyklus oxidativní deaminace vede ke vzniku NH_3 (v případě primárních aminů), H_2O_2 a aldehydů (z iminů). Tyto látky jsou potenciálně neurotoxické, podobně jako produkty deaminace (DOPAL, DOPEGAL), a mohou hrát důležitou roli v rozvoji ADA Parkinsonovy choroby. [22]

Zatímco PEH má nižší aktivitu v inhibici MAO, má vyšší aktivitu v inhibici GABA-transaminázy (GABA-T). GABAergní léky snižují ztrátu neuronálních buněk u cévní mozkové příhody, a to snížením neurotoxického efektu glutamátu. PLZ tedy může hrát významnou roli i v ochraně před následky cévní mozkové příhody, roztroušenou sklerózou a mrtvicí. [22]

Mezi non-hydraziny se řadí **tranlycypromin** (obr. 18). Byl to první syntetizovaný a distribuovaný nehydrazinový MAO inhibitor. Strukturně se podobá amfetaminu. Zatímco u hydrazinových derivátů trvá obnova aktivity MAO několik týdnů, u tranlycyprominu je to kratší doba. To je způsobeno jeho slabší vazbou s enzymem MAO, i když se jedná o ireverzibilní inhibici. [19]



Tranlycypromin

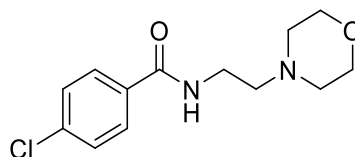
Obrázek 18 - struktura tranlycyprominu

Selektivní inhibitory MAO-A se rozdělují na ireverzibilní – klogylin a reverzibilní (reversible inhibitors monoaminoxidase – RIMA), kam se řadí **moklobemid** a brofaromin. [23]

Ireverzibilní inhibitory MAO-A zvyšují svojí inhibicí koncentraci všech katecholaminů, což vede ke vzniku hypertenzní krize či srdeční arytmie. I proto se v dnešní době již nevyužívají. Jako jediný je v ČR registrován moklobemid. [7]

Taktéž díky ireverzibilní inhibici docházelo při užívání IMAO-A k „sýrovému efektu“. Jedná se o hypertenzní krizi způsobenou vzájemnou interakcí tyraminu (metabolit tyrosinu, je metabolizován MAO) a katecholaminů. I proto byly IMAO-A nahrazeny sloučeninami působícími selektivněji na serotonin. [24]

Moklobemid (obr. 19) je široce využíván v terapii depresivních poruch a méně využíván v léčbě anxiety. Je stejně účinný při léčbě akutní deprese jako tricyklická (a některá heterocyklická) antidepresiva nebo selective serotonin reuptake inhibitors. [25]



Moklobemid

Obrázek 19 - struktura moklobemidu

Mezi selektivní inhibitory MAO-B se řadí selegilin a rasagilin, o kterých je pojednáno v kapitole 2.6, léčba PD.

2.5 Alzheimerova choroba

2.5.1 Úvod a vznik Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba (AD) je onemocnění spojené s degenerací mozkových buněk a je hlavní příčinou demence. Ta se projevuje poklesem kognitivních schopností, postupným rozpadem osobnosti, ztrátou samostatnosti, paměti a schopnosti učení. AD je považováno za multifaktoriální onemocnění včetně řady rizikových faktorů, což je např. zvyšující se věk, genetické predispozice, poranění hlavy, infekce a cévní onemocnění. Ke vzniku AD byly navrženy dvě nejčastěji uvažované hypotézy – cholinerní a amyloidní. [26]

Cholinerní hypotéza

Dle cholinerní hypotézy vzniká AD postupným snižováním syntézy ACh v mozku. [27]

Vzhledem k tomu, že ACh hraje velmi důležitou roli v kognitivních funkcích, byla pojmenována tato teorie cholinerní. V CNS se ACh podílí na řadě fyziologických procesů, tj. ovlivňuje paměť, pozornost, učení a další. Významnou roli v tomto případě hraje i β -amyloid. Ten ovlivňuje cholinerní neurotransmisi a zapříčiňuje snižování reuptake cholinu

a uvolňování ACh. Dalším faktorem ovlivňující progresi AD je snižování muskarinových a nikotinových receptorů v presynapsi. [26]

I proto je potenciální strategie léčby AD založená na této teorii zaměřena na zvyšování ACh v synapsi, a to pomocí inhibice AChE, která koncentraci ACh v synapsi snižuje. [27]

Amyloidní hypotéza

Při této hypotéze dochází k ukládání oligomerního nebo fibrilárního β -amyloidního peptidu ($A\beta$) do neuronů. Z těch se postupně vyvinou senilní plaky, což způsobuje neurotoxicitu a indukci tau proteinu. To vede ke smrti neuronových buněk a neurodegeneraci. [28]

U zdravého jedince je amyloidní peptid (AP) vytvořen z APP (prekurzor amyloidního proteinu) pomocí β a γ -sekretázy a uvolněn mimo buňku, kde dochází k jeho okamžité degradaci. Ovšem u starších jedinců za patologických podmínek může docházet k snížení metabolické schopnosti odstranit AP. AP se tak může kumulovat v místě neuronu a vzniká senilní plak. [28]

Na základě těchto hypotéz byly syntetizovány inhibitory takrinu a deriváty donepezilu, které fungují jako inhibitory AChE a zároveň brání ukládání β -amyloidu. [27]

Tau hypotéza

Dalším důležitým aspektem při rozvoji AD je taupatie, označována jako τ hypotéza. Podle tau-hypotézy dochází k hyperfosforylaci τ -proteinu a k jeho ukládání v intracelulárním prostoru buněk. [27]

Jelikož je hyperfosforylovaný protein nerozpustný, znemožňuje tento komplex axonální přenos a přenos živin, které jsou potřebné pro funkci mozkových buněk, což zapříčiňuje jejich smrt. [29]

2.5.2 Léčba Alzheimerovy choroby

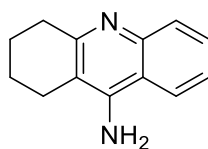
Protože je AD multifaktoriální onemocnění, snaží se vědci zaměřit na vývoj sloučenin, které fungují jako „multi-targeting“ sloučeniny. Ty mohou inhibovat několik patogenetických cest vedoucích ke vzniku AD, včetně $A\beta$ agregace, agregace fosforylovaného τ -proteinu, oxidačního stresu a snížené hladiny ACh. [27]

V dnešní době bohužel neexistuje žádné léčivo, které by bylo schopné pacienta s AD vyléčit. Existují pouze léčiva, která vedou ke klinickému zlepšení symptomů a nanejvýše zpomalují progresi AD. Mezi skupiny léčiv zabraňující progresi AD se řadí inhibitory acetylcholinesterázy, antagonisté NMDA⁷ receptorů – **memantin** a další potenciálně slibné molekuly. V nedávné době schválený **adukanumab** je monoklonální protilátka zaměřující se na A β agregaci. [30]

2.5.3 Inhibitory acetylcholinesterázy

Jako první skupinou využívanou a vyvinutou v boji proti AD je skupina inhibitorů acetylcholinesterázy. Fungují na principu inhibice AChE a některé také BuChE⁸. Jediným schváleným léčivem, inhibujícím jak AChE tak i BuChE, je karbamát **rivastigmin**. Dalšími zástupci jsou **donepezil**, **galantamin** a **takrin** (již nepoužívaný). [30]

Takrin (obr. 20) byl využíván a schválen FDA na léčbu AD. Mimo jiné zpomaluje degradaci cholinergních neuronů v cerebrálním kortexu a hippocampu. Je efektivním inhibitorem obou cholinesteráz. Nicméně i když má pozitivní terapeutický efekt, zvyšuje hladinu ALT (alanin-aminotransferáza). V játrech indukuje smrt buněk a oxidační stres. Ve zvrácení hepatotoxicity může figurovat účinný flavonoid z *Glycyrrhizae radix* – liquiritigenin. [31]



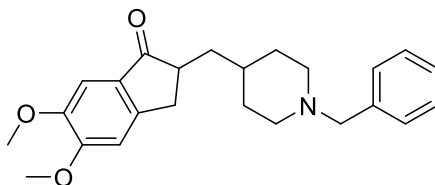
Obrázek 20 - struktura takrinu

Donepezil (obr. 21) je určen k léčbě střední až pokročilé AD. Toto léčivo má podobně jako takrin nežádoucí účinky, které se zvětšují s podanou dávkou. Při vyšších dávkách nastupují problémy s dýcháním, bradykardie a slabost svalů. Mimo inhibici AChE vykazuje donepezil další pozitivní účinky, díky kterým zpomaluje progresi AD. Neúčinkuje pouze

⁷ NMDA receptory – N-methyl-D-aspartat jsou receptory, které váží glutamát, čímž vpouští vápník do nervových buněk

⁸ BuChE – butyrylcholinesteráza je druh esterázy vyskytující se především v krevní plazmě a je tvořena v játrech. Hydrolyzuje různé deriváty cholinu.

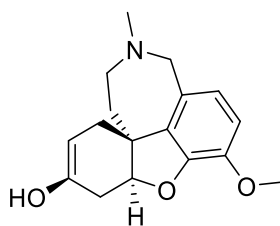
na úrovni neurotransmiterů, ale také na molekulární a buněčné úrovni. Redukuje expresi zánětlivých cytokinů a efekty způsobené oxidačním stresem. [27]



Obrázek 21 - struktura donepezilu

Galantamin (obr. 22) je terciární alkaloid vyskytující se v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Byl využíván k léčbě demence, sclerosis multiplex, myasthenia gravis nebo některých myopatií. V nedávné době byl využíván jako oneirogen⁹ a induktor pro lucidní snění. Galantamin prodlužuje trvání REM spánku (snový spánek), čímž zvyšuje vybavování si snů po probuzení. Dávkování pro tento účinek se pohybuje v rozmezí 4-12 mg. [32]

Vykazuje také schopnost navázat se na nikotinové cholinergní receptory (nAChR), čímž podporuje a zlepšuje kognitivní funkce, kdežto antagonisté nAChR zhoršují kognitivní funkce. [32] Postupné zvyšování dávkování galantaminu může zvýšit toleranci vůči tomuto léku, podobně jako je tomu u rivastigminu. [27]

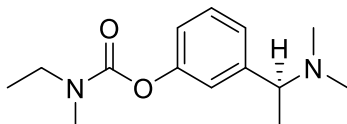


Obrázek 22 - struktura galantaminu

Rivastigmin (obr. 23) je využíván v léčbě AD a v některých případech i v léčbě demence u PD. U léčby pacientů s PD vykazuje zlepšení v chůzi a její stabilitě. Napomáhá tak snížit riziko pádů. Má pozitivní vlivy také u pacientů s roztroušenou sklerózou. [33] Zvýšené

⁹ Oneirogen – oneiros = sen a gen= tvořit, látka využívaná k vytvoření či prohloubení snových stavů

dávky rivastigminu vedou k postupné toleranci, ale též k nežádoucím účinkům, zahrnujícím nepravidelné dýchání, bolest na hrudníku či nepravidelný srdeční rytmus. [27]



Obrázek 23 - struktura rivastigminu

2.5.4 Další léčiva využívané v léčbě Alzheimerovy choroby

Jelikož je AD velmi často diagnostikována u pacientů s vyšším věkem a čím dál více se dostává toto onemocnění do popředí, je nutné pokračovat ve vývoji nových potenciálních léčiv, která jsou schopna alespoň zpomalit progresi AD. Tyto skupiny léčiv jsou **monoklonální protilátky, nová generace inhibitorů AChE** anebo **ladostigil**.

Monoklonální protilátky používané na léčbu AD se rozdělují podle jejich účinku. Působí na A β agregaci (zpomalují ji) anebo přes tau protein, kde je vývoj protilátek pomalejší.

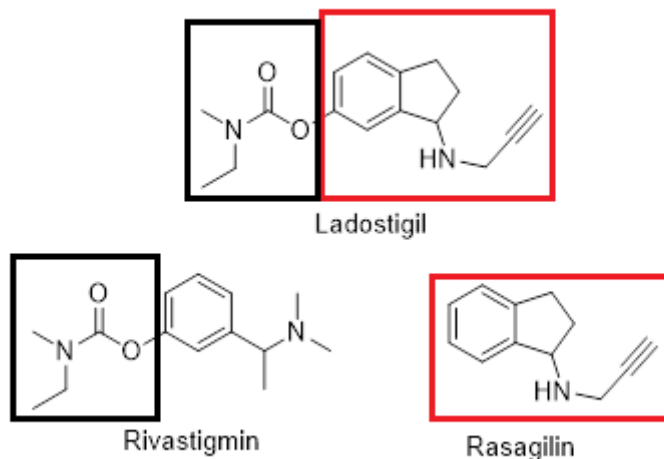
První skupina působící na agregaci β -amyloidu je na velmi dobré cestě. Řadí se sem již zmiňovaný **adukanumab** (schválený FDA). Adukanumab se váže na shluklé A β . **Lekanemab**, který má mechanismus účinku rozdílný od adukanumabu, neboť se přednostně váže na rozpustné agregované A β oligomery, které následně eliminuje. **Donanemab** a **gantenerumab** jsou v klinických studiích zkoumány pro léčbu ranného stádia AD. [34]

U druhé skupiny působící přes tau protein se do 2. fáze klinického testování dostaly monoklonální protilátky – **semorinemab** a **bepranemab**. [34]

Fenserin, tolserin a **eserolin** (opioidní agonista) jsou molekuly patřící mezi nové inhibitory AChE. Fenserin je inhibitor pouze u AChE, navíc má ještě schopnost snižovat produkci APP. Avšak všichni tito zástupci nevykázali tak zajímavé účinky, aby se dostaly do klinického využití. [27]

Ladostigil (obr. 24) je nový typ dualistického léčiva, kombinující inhibici AChE, BuChE a irreverzibilní inhibici MAO-B. Ukázalo se, že má neuroprotektivní, antioxidační a také antidepresivní účinky, proto jej lze označit za MTDL. Chemická struktura ladostigilu

je vlastně hybridem dvou již využívaných léčiv v terapii AD a PD, a to z karbamátové části rivastigminu a propargylaminové části rasagilinu. [35]



Obrázek 24 - struktura ladostigilu jakožto hybridního léčiva

2.6 Parkinsonova choroba

2.6.1 Úvod a patogeneze Parkinsonovy choroby

Parkinsonova choroba (PD) je nejrozšířenější neurodegenerativní pohybové onemocnění. Je způsobena úbytkem dopaminergních neuronů v substantia nigra, pars compacta (SNpc) a nefyziologickým hromaděním α -synukleinu¹⁰, který se nachází v Lewyho tělískách¹¹ v CNS. Při prvotní diagnóze pacientů trpících PD jsou již dopaminergní neurony v SNpc zničeny a degenerace neuronů se již rozšířila do dalších částí CNS. [36]

Dalším klíčovým rysem, který způsobuje PD, je zhoršený energetický metabolismus v mozku. To je podpořeno několika fakty. Stárnutí zhoršuje metabolismus glukózy v mozku a je hlavním rizikovým faktorem PD. Predispozicí k PD jsou i mutace, které zhoršují mitochondriální funkce, a tím narušují bioenergetické hladiny v mozku. [37]

Incidence pacientů trpících PD je úměrná vyššímu věku. Pouze 10% případů má genetickou příčinu a tito pacienti trpí PD již v mladém věku. Viníkem v rozvoji PD může být

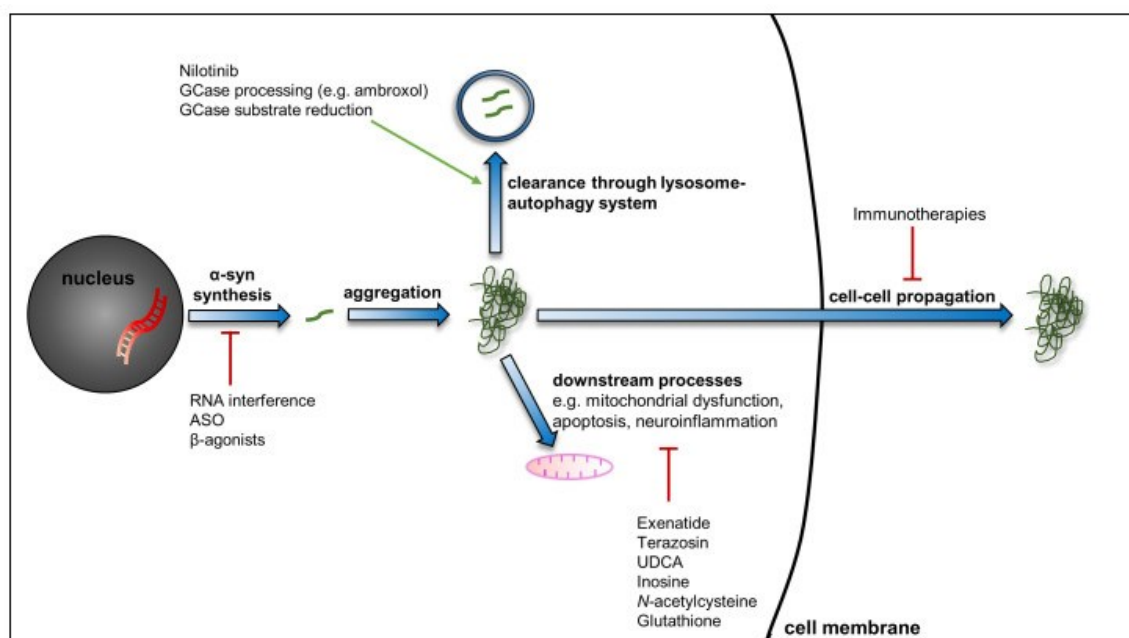
¹⁰ Alfa-synukleín – protein vytvářející při nerozpustnosti Lewyho tělíska

¹¹ Lewyho tělíska – jsou drobné útvary tvořené shluky bílkovin, které je možné nalézt uvnitř neuronů

také nadměrné používání pesticidů a herbicidů nebo lokalita v blízkosti průmyslových závodů. [38]

PD je onemocnění, které nastupuje skrytě, ale progreduje s každým přibývajícím dnem. Je nemožné jeho postup zastavit a tak se v dnešní době snažíme tento postup zpomalit. [39]

Jedna z hlavních skupin léčiv vyvíjených a slibných v klinickém testování se zaměřuje právě na hromadění α -synukleinu a jeho produkci. [39] Jak lze vidět na obr. 25, cest modifikace PD je více. Většinou se inhibuje syntéza α -synukleinu pomocí techniky interference RNA nebo omezením agregace α -synukleinu, a to přes lysozóm-autofágový systém, mitochondriální funkce či neurozánět. [40]



Obrázek 25 - možnosti modifikace patogeneze PD [40]

Dopamin jakožto jeden z neurotransmiterů hraje zásadní roli v PN, protože se tvoří v SNpc, kde dochází při PD k degeneraci neuronů. To má za následek nedostatek dopaminu důležitého pro neurotransmisi v corpus striatum. Tato biochemická nerovnováha se projevuje poruchou koordinace a pohybu. [41]

Hlavními motorickými příznaky parkinsonismu jsou, **třes**, zpomalení pohybů (**bradykineze**), hypokineze, ztížený start pohybu (**akineze**), svalová ztuhlost (**rigidita**) a poruchy stoje a chůze (posturální nestabilita). [36]

I přesto, že je PD definována převážně jako nemoc postihující motoriku, nemotorické symptomy hrají důležitou roli v klinickém obraze. Začínají od zhoršené výkonnosti, zácpy až po poruchy spánku, lhostejnost, depresivní nálady, podráženosť, poruchy čichu a chuti, halucinace a může dojít i k rozvoji psychózy. [36]

2.6.2 Léčba Parkinsonovy choroby

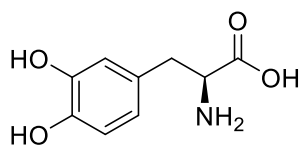
V současné době neexistuje léčba, která by modifikovala PD, i proto je léčba PD symptomatická a zaměřuje se hlavně na zpomalení progresu v degeneraci dopaminergních drah a hlavním cílem je „doplnění“ dopaminu v chybějících částech CNS. [36]

Levodopa (obr. 26) je zlatým standardem v léčbě PD a také nejefektivnějším pro eliminaci motorických symptomů. Prochází HEB a přeměňuje se na dopamin ve zbývajících dopaminergních neuronech v SNpc. [36]

Jelikož se MAO-B nachází i mimo CNS, je část levodopy metabolizována již v periferních částech organismu, kde způsobuje hypotenzi a nevolnost. Těmto vedlejším účinkům se dá předejít podáním periferních inhibitorů DOPA dekarboxylázy (karbidopa nebo benserazid). Ty zabrání metabolizaci levodopy a neprostupují skrz HEB. [36]

Dalšími možnostmi, jak se levodopa při administraci do organismu vyhne metabolizaci, je jinou cestou aplikace než orálně, respektive pouze skrz GIT. Existují přípravky kombinace karbidopa-levodopa gel nebo možnost podání skrz pumpu přímo do duodena. [36]

Dlouhodobá léčba levodopou však bohužel způsobuje nevyhnutelné extrapyramidové vedlejší účinky, které se objevují po několika letech léčby. Proto jsou u dlouhodobé léčby mladších pacientů doporučovány agonisté dopaminu. [42]



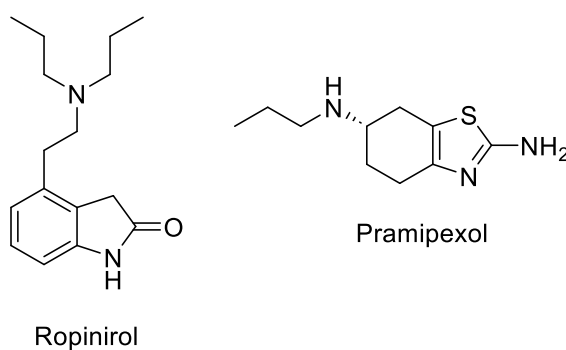
Obrázek 26 - struktura levodopy

Agonisté dopaminu se váží na postsynaptické dopaminové receptory D₁-D₃ ve striatu. Nejsou tak efektivní ve zvrácení motorických symptomů jako levodopa. [36] Zahrnují

námelové alkaloidy a neergotové alkaloidy. Starší námelové alkaloidy jako jsou bromokriptin, pergolid a lisurid se v dnešní době již nevyužívají kvůli riziku rozvoje fibrózy chlopní a plic. [42]

Novější neergotové sloučeniny – **pramipexol**, **ropirinol**, **rotigotin**, apomorfin a piribedil jsou využívány v léčbě PD. Transdermální rotigotin je využíván u pacientů, kteří nemají adhezenci k léčbě. Apomorfin podávaný parenterálně je vyhrazen pro pacienty, u kterých se objevuje epizoda „off“, tedy že jsou rezistentní na jinou léčbu. [42]

Agonisté dopaminu se využívají i při léčbě vedlejších účinků antipsychotických látek, hyperprolaktinemii a jsou první volbou při další motorické poruše, a to syndromu neklidných nohou. [42]

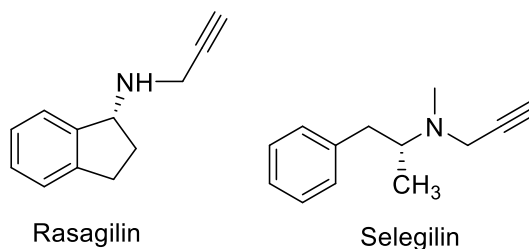


Obrázek 27 - struktura agonistů dopaminu

Inhibitory MAO-B jsou další skupinou léčiv využívaných u PD, jelikož zvyšují hladinu dopaminu v mozku. Řadí se sem ireverzibilní inhibitory MAO-B – **rasagilin** a **selegilin** a reverzibilní inhibitor **safinamid**, který má vlastnost inhibovat i uvolňování glutamátu. Rasagilin a selegilin vykazují neuroprotektivní účinky, což souvisí s jejich propargylaminovou strukturou. [43]

MAO-B dokonce dle studií *in vitro* mají pozitivní účinek na α -synuklein, podporují tvorbu rozpustných shluků a díky tomu by mohly mít modifikující účinky na průběh PD. [43]

Podávání **selegilinu** může oddálit progresi onemocnění u pacientů s časnou PD, a tím i oddálit potřebu levodopy. Selegilin se metabolizuje na amfetaminové deriváty, proto ho díky stimulačním účinkům lze využít u nadměrné spavosti. Je doporučováno ho užívat ráno či odpoledne. **Rasagilin** naopak může zlepšit kvalitu spánku. [43]



Obrázek 28 - struktura IMAO-B

Inhibitory COMT jsou léčiva prodlužující biologický poločas levodopy. V přítomnosti inhibitoru dekarboxylázy je metabolismus levodopy zprostředkován skrz COMT. Inhibice těchto enzymů se používá ke zmírnění motorických fluktuací. Mezi zástupce se řadí **tolkapon** (nežádoucí účinek je fatální selhání jater), **entakapon** a **opikapon**. [43]

2.6.3 Další sloučeniny v léčbě Parkinsonovy choroby

V léčbě PD se využívají také anticholinergní léčiva jako je biperiden, benztropin a procyklidin. Zlepšují motorické symptomy, ale snižují kognitivní funkce. Amantadin, NMDA antagonist glutamátových receptorů s anticholinergní aktivitou, snižuje motorické symptomy a komplikace při PD. [7]

Vyjma inhibitorů MAO-B, většina z uvedených sloučenin pouze napomáhá k obnovení dopaminergního tonusu ve striatu. Do popředí výzkumu se dostávají sloučeniny, které mají schopnost modifikovat a zabránit postupu PD.

Snížení hladiny α -synukleinu vykazují již zavedená léčiva, jako jsou **β -agonisté** (užívané v terapii obstrukce dýchacích cest), **nilotinib** či **terazosin**, **ambroxol**. β -agonisté snižují transkripci α -synukleinu prostřednictvím acetylace promotorů a zesilovačů genu SNCA. SNCA je gen, na základě kterého vzniká právě α -synuklein. [40]

Nilotinib je inhibitor tyrosinkinázy používaný při léčbě leukémie. Mechanismus účinku nilotinibu spočívá ve zvýšené podpoře autofagické aktivity, což snižuje akumulaci agregátů α -synukleinu. [40]

Terazosin α_1 -adrenergní antagonist je využíván v indikaci BHP (benigní hyperplazie prostaty) a hypertenze. Bylo prokázáno, že se terazosin váže na fosfoglycerát kinázu 1

(PGK1)¹² a stimuluje její aktivitu. To znamená, že zvyšuje glykolýzu a hladinu ATP v mozku a vykazuje tak neuroprotektivní účinky. [37]

Dalším léčivem přinášejícím pozitivní výsledky v modifikaci PD je dle studie kyselina ursodeoxycholová (UCDA), léčivo biliární cirhózy. Obnovuje mitochondriální funkce podobně jako *N*-acetylcystein či glutathion. [37]

¹² Fosfoglycerát kináza 1 (PGK1) – je enzym, který katalizuje reverzibilní přenos fosfátové skupiny z 1,3-bisfosfoglycerátu na 3-fosfoglycerát. Vzniká při tom ATP a tento proces je zahrnut v glykolýze.

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je syntéza nových potencionálních duálně působících léčiv, inhibujících AChE, BuChE a MAO. Tyto nové sloučeniny by se mohly využít v terapii AD či PD nebo dalších neurodegenerativních poruch CNS (jako je deprese komorbidní u AD a PD, jiných demencí aj.).

Chemicky se vychází ze tří základních reaktantů, které vykazují již účinky v klinické praxi a jejich deriváty by mohly být potencionálně využitelné. Jedná se o molekuly isoniazidu, fenelzinu a isokarboxazidu.

Tyto základní reaktanty budou reagovat s karbonylovými sloučeninami za vzniku hydrazidů a hydrazonů, konkrétně 3- a 4-nitrobenzaldehyd, fenylacetaldehyd, 5-methoxy-*1H*-indol-3-karbaldehyd, 2-(chlorkarbonyl)fenyl-acetát, 3,5-dibrom-2-hydroxybenzaldehyd, acetofenon, 3-brom-5-chlor-2-hydroxybenzaldehyd. Takto získané sloučeniny budou charakterizovány fyzikálně-chemickými metodami (teplota tání, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie, IČ spektroskopie a TLC analýzy).

Tyto nově vzniklé molekuly budou porovnány v IC_{50} (polovina maximální inhibiční koncentrace) inhibicí buď AChE, BuChE nebo inhibicí obou dvou enzymů a zhodnoceny se standardy používanými v terapii AD. Následně budou vyhodnoceny vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou.

4 Experimentální část

4.1 Obecná metodika – syntéza

Všechny chemikálie, které byly použity pro syntézu, byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Sloupcová chromatografie se uskutečňovala na silikagelu 0,063–0,200 mm (Merck KGaA, Darmstadt, Německo). Všechny provedené reakce byly monitorovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) v mobilních fázích DCM:MeOH 97:3 V/V a DCM:MeOH 93:7 na hliníkových deskách potažených silikagelem 60 (Macherey Nagel, Oensingen, Švýcarsko) vizualizovány UV zářením F254 (CAMAG UV Lamp 4).

Strukturní analýza byla provedena pomocí ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie. NMR spektra (500 MHz nebo 600 MHz pro ^1H a 126 nebo 151 MHz pro ^{13}C) byla pořízena v DMSO- D_6 při laboratorní teplotě nebo při teplotě 60 °C (DM-4 a DM-6) na přístrojích Varian VNMR S500 (Varian Comp., Palo Alto, CA, USA) a JEOL JNMECZ 600R (JEOL, Akishima, Tokyo, Japonsko) – doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

Hodnoty chemických posunů (δ) jsou vyjádřeny v jednotkách ppm a spektra jsou vnitřně kalibrována na reziduální signál aprotického rozpouštědla vůči tetramethylsilanu (DMSO- D_6 : 2,50 pro ^1H , 39,70 pro ^{13}C). Hodnoty interakčních konstant (J) jsou vyjádřeny v Hz. Pro vyhodnocení NMR spekter byl použit program MestReNova 14.2.3 (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Španělsko). Měření jednotlivých teplot tání probíhalo v otevřené skleněné kapiláře za použití přístroje Büchi B-545 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švýcarsko), získané hodnoty jsou vyjádřeny jako interval a nebyly upravovány.

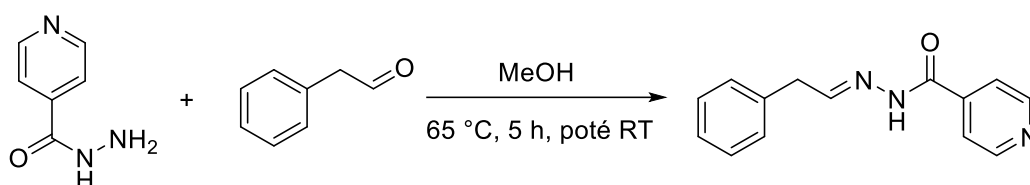
Elementární analýza byla provedena přístrojem Vario MICRO Cube Element Analyzer na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy (Elementar Analysensysteme, Hanau, Německo).

Všechny chemické struktury, reaktanty a reakční schémata byly nakresleny v programu ChemDraw Professional 22.0.0 32-bit (PerkinElmer Inc., MA, USA).

4.2 Chemická část

4.2.1 Syntéza hydrazidů a hydrazonů

Syntéza (*E*)-*N'*-(2-fenylethyliden)isonikotinohydrazidu [DM-1] [44]



2,5 mmol isoniazidu (343 mg) bylo rozpuštěno v 15 ml horkého MeOH a za stálého míchání bylo přidáno v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (2,75 mmol, 366 mg) fenylacetaldehydu. Reakční směs byla za stálého míchání přivedena k varu a takto zahřívána po dobu 5 hodin. Následně byla ponechána zchladnout na RT a přes noc za laboratorní teploty míchána. Reakční směs byla zfiltrována, pevná fáze promyta na filtru vodou a diethyletherem (DEE). Pevný podíl byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (EtOAc) a následně byl tento roztok extrahován 20 ml solanky. Organická fáze byla vysušena pomocí síranu sodného, sušidlo bylo odfiltrováno a rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce. Vznikla olejovitá kapalina, která byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze DCM:MeOH 99:1 až 98:2 V/V). Frakce ze sloupcové chromatografie byly spojeny a zbaveny mobilní fáze odpařením pomocí vakuové odparky. Následovala trituration s 7 ml DEE a do vzniku opalescence přikapáván EtOAc. Produkt ponechán krystalizovat při -20 °C po dobu jedné hodiny. Následně byl zfiltrován a vysušen. Výtěžek reakce byl 49%.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃N₃O

Relativní molekulová hmotnost: 239,11

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 140-142 °C

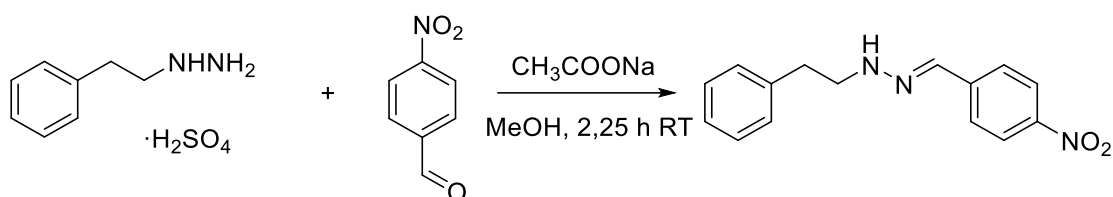
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 11.68 (s, 1H, CONH), 8.72 – 8.70 (m, 2H, H2, H6), 7.82 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH=N), 7.73 – 7.71 (m, 2H, H3, H5), 7.34 – 7.15 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H6'), 3.61 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 161.94, 152.62, 150.82, 141.09, 137.19, 129.43, 129.26, 127.23, 122.00, 38.89.

IR: 3204, 3064, 1651, 1622, 1548, 1365, 1301, 1045, 842, 752, 738, 696, 677, 661 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 70.28; H, 5.48; N, 17.56, nalezeno: C, 70.11; H, 5.69; N, 17.50.

Syntéza (*E*)-1-(4-nitrobenzyliden)-2-fenethylhydrazinu [DM-2]



1 mmol fenelzin-sulfátu (234 mg) byl rozpuštěn v 8 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno 2,2 mmol (180 mg) octanu sodného a poté v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (166 mg) 4-nitrobenzaldehydu. Reakční směs byla ponechána reagovat 2 hodiny za RT a stálého míchání. Po 2 hodinách začala vznikat bílá opalescence na dně baňky, následně za 15 min vznikly bílé krystaly. Pevný podíl byl ihned odfiltrován za sníženého tlaku a následně rozpuštěn v MeOH. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce za vzniku bílých krystalů. Výtěžek reakce 38 %.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₅N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 269,30

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 90–92 °C

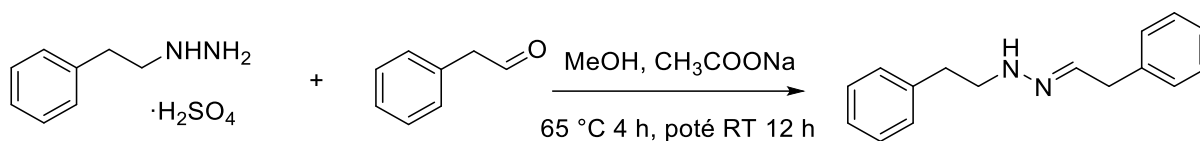
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 8.17 (t, *J* = 4.5 Hz, 1H, CH=N), 8.13 – 8.10 (m, 2H, H3', H5'), 7.66 – 7.62 (m, 2H, H2', H6'), 7.55 (s, 1H, NH), 7.29 – 7.23 (m, 4H, H2, H3, H5, H6), 7.19 – 7.15 (m, 1H, H4), 3.40 (td, *J* = 7.5, 4.6 Hz, 2H, CH₂N), 2.85 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ph-CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 145.75, 144.52, 140.05, 129.75, 129.27, 128.87, 126.64, 125.56, 124.55, 49.58, 34.45.

IR: 3298, 2927, 2330, 1570, 1510, 1331, 1156, 1131, 1106, 897, 845, 748, 699, 695, 675, 665, 657, 646, 640, 629, 624, 609 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 66.90; H, 5.61; N, 15.60, nalezeno: C, 66.94; H, 5.69; N, 15.52.

Syntéza (*E*)-1-fenethyl-2-(2-fenylethyliden)hydrazinu [DM-3]



1 mmol fenelzin-sulfátu (234 mg) byl rozpuštěn v 8 ml MeOH a za stálého míchání bylo přidáno 2,2 mmol octanu sodného (180 mg) a poté v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (132 mg) fenylacetaldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem. Reakční směs byla ponechána probíhat 4 hodiny. Po 4 hodinách byla teplota adjustována na RT a reakce byla ponechána reagovat následujících 12 hodin. Další den byly vzniklé krystaly odfiltrovány za sníženého tlaku, precipitát promyt vodou a MeOH. Výtěžek reakce byl 22 %.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₈N₂

Relativní molekulová hmotnost: 238,33

Popis: žluté krystaly

Výtěžek: 22 %

Teplota tání: >300 °C

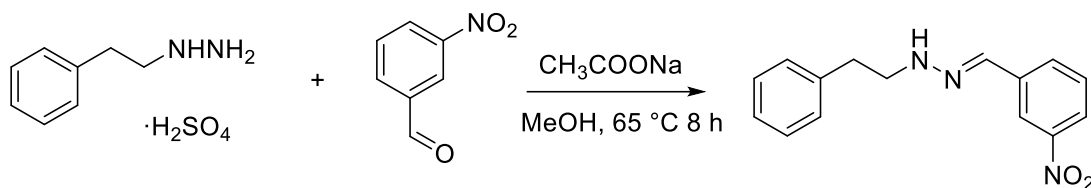
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 7.72 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, CH=N), 7.55 (s, 1H, NH), 7.34 – 7.14 (m, 10H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₂′, H₃′, H₄′, H₅′, H₆′), 3.56 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, =C-CH₂-Ph), 3.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂N), 2.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph-CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 150.38, 149.31, 141.61, 129.57, 128.75, 128.11, 126.74, 123.39, 121.47, 50.02, 38.97, 34.35

IR: nebylo změřeno z důvodu nedostatku produktu.

EA: vypočteno: C, 80.63; H, 7.61; N, 11.75, nalezeno: C, 80.56; H, 7.52; N, 11.77.

Syntéza (*E*)-1-(3-nitrobenzyliden)-2-fenethylhydrazinu [DM-4]



1 mmol fenelzin-sulfátu (234 mg) byl rozpuštěn v 8 ml MeOH a za stálého míchání přidáno 2,2 mmol octanu sodného (180 mg) a poté v jednom podílu 1,1 ekvivalentu (166 mg) 3-nitrobenzaldehydu. Reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem a míchána na magnetické míchače po dobu 8 hodin. Reakční směs byla zfiltrována a precipitát byl promyt tetrahydrofuranem (THF). Z filtrátu bylo odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce za vzniku nažloutlých krystalů. Tyto krystaly byly následně rekrystalizovány z 5 ml EtOAc a ponechány v ledničce (4 °C) po dobu 2 hodin, následně byl pevná podíl odfiltrován a vysušen. Výtěžek reakce byl 65 %.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₅N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 269,30

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: >300 °C

EA vypočteno: C, 66.90; H, 5.61; N, 15.60, nalezeno: C, 66.83; H, 5.60; N, 15.54.

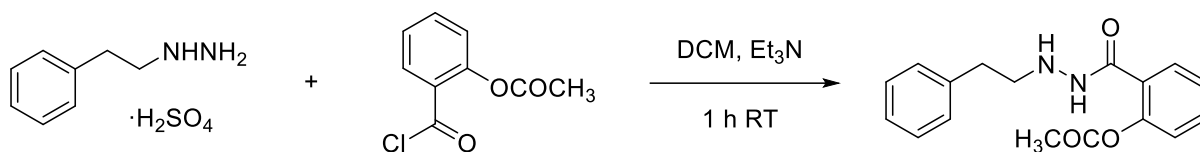
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆, 60 °C) δ 8.54 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H2'), 8.22 – 8.18 (m, 2H, CH=N, H4'), 8.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6'), 7.97 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H5'), 7.75 – 7.72 (1H, m, NH), 7.35 – 7.31 (m, 4H, H2, H3, H5, H6), 7.28 – 7.25 (m, 1H, H4), 3.49 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH₂N), 2.72 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ph-CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 148.81, 138.58, 135.19, 134.07, 130.16, 129.47, 129.07, 128.81, 126.88, 123.60, 52.60, 32.59.

IR: 1607, 1533, 1356, 1102, 1010, 857, 774, 747, 715, 704, 681, 641, 637, 610 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 66.90; H, 5.61; N, 15.60, nalezeno: C, 66.83; H, 5.60; N, 15.54

Syntéza 2-(2-fenethylhydrazin-1-karbonyl)fenyl-acetátu [DM-6]



1 mmol fenelzin-sulfátu (234 mg) byl rozpuštěn v 15 ml dichlormethanu (DCM) a za stálého míchání při RT bylo přidáno postupně 0,46 ml Et₃N. Následovalo pomalé přidávání 1,1 ekvivalentu (218 mg) chloridu kyseliny acetylsalicylové. Reakce byla ponechána reagovat 1 hodinu na magnetické míchačce. Na dně baňky vznikla bílá sraženina. Reakční směs byla extrahována pomocí 0,1 M HCl 50 ml, 50 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 50 ml nasyceného roztoku NaCl. Organická fáze byla vysušena pomocí síranu sodného, zfiltrována a pevný podíl byl promyt EtOAc. Z filtrátu bylo odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce za vzniku bílých krystalů. Produkt byl rekrystalizován z EtOAc. Výťažnost reakce byla 55 %.

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈N₂O₃

Relativní molekulová hmotnost: 298,34

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 169-170 °C

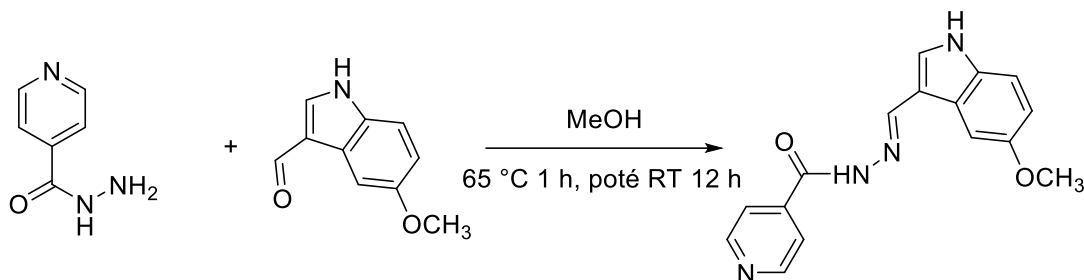
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆, 60 °C) δ 10.18 (s, 1H, CONH), 7.31 – 6.70 (m, 9H, H₃, H₄, H₅, H₆, H₂' , H₃' , H₄' , H₅' , H₆'), 2.86 – 2.79 (m, 4H, CH₂CH₂), 2.59 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 168.81, 154.70, 153.77, 130.85, 129.00, 128.89, 128.86, 128.17, 126.66, 123.52, 118.70, 115.94, 53.21, 33.09, 20.90.

IR: 3229, 3029, 1673, 1633, 1605, 1521, 1498, 1462, 1417, 1370, 1302, 1268, 1231, 1196, 1156, 1034, 1011, 844, 754, 729, 698, 670, 623, 604 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 68.44; H, 6.08; N, 9.39, nalezeno: C, 68.49; H, 6.00; N, 9.44.

Syntéza (*E*)-*N'*-[(5-methoxy-1*H*-indol-3-yl)methylen]isonikotinohydrazidu [DM-7]



2,5 mmol (340 mg) isoniazidu bylo odváženo a rozpuštěno v 15 ml MeOH. Směs byla míchána na magnetické míchačce, teplota adjustována na bod varu MeOH (65 °C) pod zpětným chladičem. Následoval přidavek 2,7 mmol (470 mg) 5-methoxy-1*H*-indol-3-karbaldehydu. Reakční směs ponechána reagovat 1 hodinu při teplotě 65 °C. Následovalo snížení teploty na RT a reakční směs byla ponechána reagovat dalších 12 hodin. Po 12 hodinách vznikla bílá sraženina. Tato sraženina byla promyta MeOH na nuči a vysušena. Výtěžek byl 88 %.

Sumární vzorec: C₁₆H₁₄N₄O₂

Relativní molekulová hmotnost: 294,31

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 252-253 °C (lit. 174-175 °C [45])

EA vypočteno: C, 65.30; H, 4.79; N, 19.04, nalezeno: C, 65.31; H, 4.72; N, 19.08.

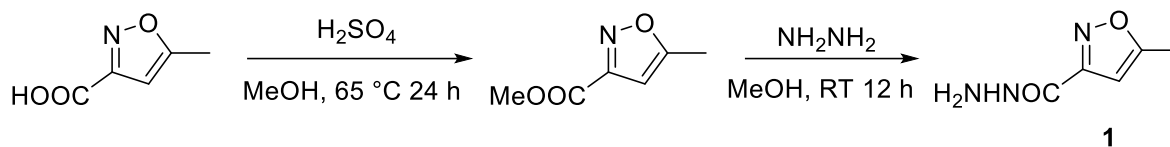
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 11.73 (s, 1H, indol NH), 11.52 (s, 1H, CONH), 8.78 – 8.76 (m, 2H, H₂, H₆), 8.61 (s, 1H, CH=N), 7.85 – 7.81 (m, 4H, H₃, H₅, H_{2'}, H_{4'}), 7.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H_{7'}), 6.86 (dd, *J* = 8.8, 2.6 Hz, 1H, H_{6'}), 3.79 (s, 3H, OCH₃) (majoritní *trans*-isomer; poměr *trans-cis* isomerů 7:2)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 160.96, 154.73, 150.45, 146.49, 141.31, 132.24, 131.45, 125.16, 121.68, 112.71, 112.53, 111.45, 104.36, 55.51.

IR: 3197, 3084, 2941, 2798, 1632, 1608, 1585, 1447, 1464, 1446, 1414, 1405, 1348, 1292, 1267, 1216, 1133, 1077, 1018, 1002, 846, 811, 797, 756, 724, 658, 639, 624 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 65.30; H, 4.79; N, 19.04, nalezeno: C, 65.31; H, 4.72; N, 19.08

Syntéza 5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu [DM-9]



Do baňky bylo odváženo 17 mmol (2,6 g) 5-methylisoxazol-3-karboxylové kyseliny. Následovalo přikapání 10 ml připraveného 1 % roztoku kyseliny sírové v MeOH. Reakční směs byla ponechána reagovat jeden den pod zpětným chladičem při teplotě 65 °C. Reakční směs byla adjustována na bazické pH (9) 63 mg Na₂CO₃ a extrahována pomocí 50 ml EtoAc. Organická fáze byla odpařena na vakuové odparce, získali jsme 2,4 g methylesteru. Methylester byl prokázán pomocí NMR spektroskopie (spektra byla v souladu s literaturou) [46] a celý výtěžek byl využit k přípravě hydrazidu v následujícím kroku. K methylesteru, bylo přidáno 0,9 ml hydrazinu monohydrátu. Reakční směs byla ponechána reagovat za stálého míchání za RT přes noc. Na dně baňky se vytvořila bílá sraženina. Ta byla zfiltrována na nuči a promyta MeOH. Produkt se nacházel ve filtrátu. Filtrát byl odpařen na vakuové odparce do sucha a v baňce po odpaření filtrátu vznikly bílé krystaly. Celkový výtěžek reakce byl 67 %.

Sumární vzorec: C₅H₇N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 141,13

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 142-143 °C (lit. 139-140 °C [47])

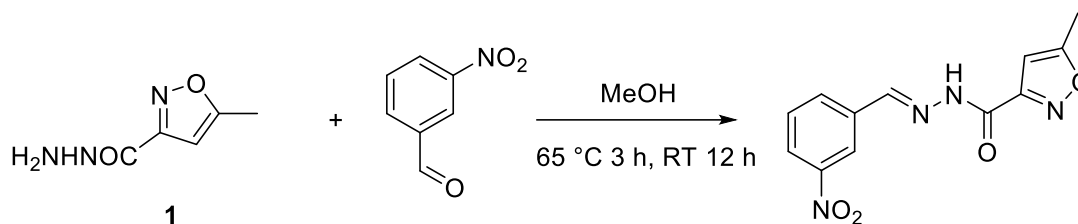
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.00 (s, 1H, indol NH), 8.56 (s, 1H, CH=N), 7.85 – 7.81 (m, 2H, H2', H4'), 7.37 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H7'), 7.24 – 7.11 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, H6), 6.85 (dd, *J* = 8.7, 2.6 Hz, 1H, H6'), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 3.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH₂N), 2.68 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ph-CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 154.64, 144.20, 141.54, 132.70, 132.16, 129.41, 129.06, 125.57, 122.77, 112.79, 112.50, 111.36, 104.41, 55.62, 53.47, 21.10.

IR: 3310 (N-H), 3239 (N-H), 1661 (C=O), 1650, 1609, 1592, 1554, 1458, 1431, 1325, 1284, 1235, 1159, 1098, 1004, 956, 918, 860, 850, 812, 715, 631, 618 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 42.55; H, 5.00; N, 29.77, nalezeno: C, 42.59; H, 4.96; N, 29.85.

Syntéza (*E*)-5-methyl-*N'*-(3-nitrobenzyliden)isoxazol-3-karbohydrazidu [DM-10]



Do 50 ml baňky bylo odváženo 1 mmol (141 mg) hydrazidu (**1**), který byl poté rozpuštěn v 20 ml MeOH. Následovalo přidání 1 mmol 3-nitrobenzaldehydu (151 mg) a reakční směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Reakční směs jsme ponechali reagovat za RT 12 hodin. Další den jsme provedli filtraci roztoku MeOH. Z filtrace provedené na nuči jsme získali 113 mg frakce A a následovanou filtrací filtrátu dalších 65 mg frakce B. Obě frakce byly prověřeny pomocí TLC analýzy, která prokazovala výskyt nečistot. Byla uskutečněna sloupcová chromatografie s použitím mobilní fáze DCM:MeOH v gradientu 97:3 V/V (1 litr) a 93:7 V/V (1 litr). Získané frakce s očekávaným produktem byly zbaveny rozpouštědla jeho odpařením, kde jsme následně izolovali nažloutlé krystaly. Výtěžek reakce byl 47 %.

Sumární vzorec: C₁₂H₁₀N₄O₄

Relativní molekulová hmotnost: 274,24

Popis: nažloutlé krystaly

Teplota tání: 195-196 °C

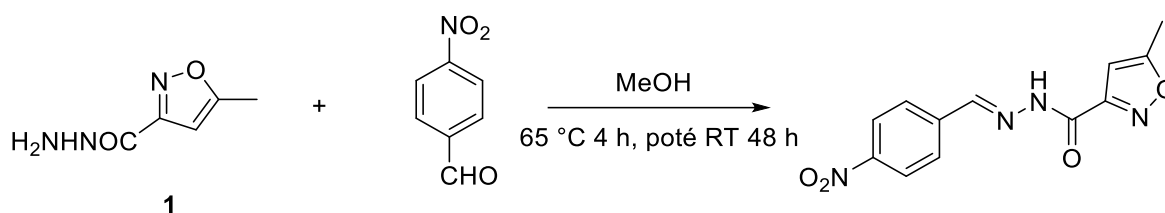
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.41 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, CH=N), 8.48 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H2), 8.24 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H, H4), 8.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 6.67 (s, 1H, -CH=), 2.47 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 172.14, 158.58, 156.13, 148.78, 147.68, 136.37, 134.09, 131.08, 125.14, 121.70, 102.32, 12.39.

IR: 3209, 3082, 1674, 1551, 1532, 1456, 1353, 1268, 1227, 1201, 1068, 953, 871, 866, 825, 816, 740, 736, 688, 673, 614 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 52.56; H, 3.68; N, 20.43, nalezeno: C, 52.50; H, 3.70; N, 20.49.

Syntéza (*E*)-5-methyl-*N'*-(4-nitrobenzyliden)isoxazol-3-karbohydrazidu [DM-11]



Bylo odváženo 2 mmol (282 mg) hydrazidu (**1**), který byl vnesen do baňky. Hydrazid (**1**) byl rozpuštěn v 20 ml MeOH a následně přidány 2 mmol (302 mg) 4-nitrobenzaldehydu. Obsah baňky byl přiveden pod zpětným chladičem k teplotě varu rozpouštědla (65 °C). Reakční směs byla promíchávána po dobu 4 hodin. Po vyhodnocení TLC analýzy byla směs ponechána reagovat dalších 48 hodin. Konverze byla úspěšná a reakce byla přerušena a zfiltrována 5 ml studeného MeOH. Zbytkové rozpouštědlo z filtrátu bylo odpařeno na vakuové odparce. Reakce poskytla výtěžek 38 %.

Sumární vzorec: C₅H₇N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 141,13

Popis: oranžové krystaly

Teplota tání: 241-243 °C (lit. 235-237 °C [47])

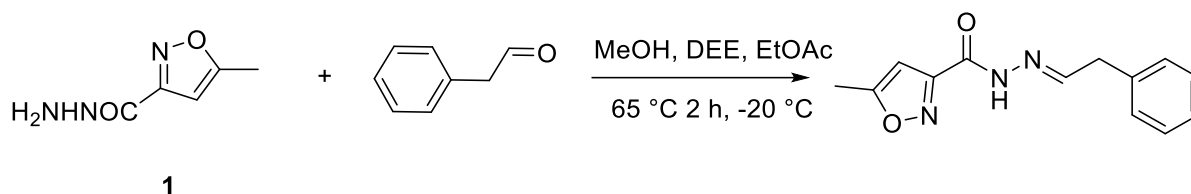
¹H NMR (500 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.45 (s, 1H, NH), 8.56 (s, 1H, CH=N), 8.27-8.24 (m, 2H, H3, H5), 7.95-7.92 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H6), 7.72 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H5), 6.67 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H, -CH=), 2.47 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*D*₆) δ 172.19, 158.54, 156.16, 148.63, 147.59, 140.76, 128.80, 124.62, 102.33, 12.38.

IR: 3239, 3029, 1674, 1638, 1597, 1543, 1514, 1456, 1342, 1313, 1268, 1232, 1204, 1071, 1010, 947, 897, 856, 826, 812, 771, 749, 696, 674, 633, 623 cm⁻¹

EA vypočteno: C, 42.55; H, 5.00; N, 29.77, nalezeno: C, 42.50; H, 5.02; N, 29.74.

Syntéza *N'*-(2-fenylethyliden)-5-methyl- isoxazol-3-karbohydrazidu [DM-12]



1 mmol (120 mg) fenylacetaldehydu byl navážen do 50 ml destilační baňky a rozpuštěn v horkém MeOH (15 ml). Následně byl přidán 1 mmol (141 mg) hydrazidu (1). Po dvou hodinách vykazovala reakce pouze částečnou konverzi na surový produkt dle analýzy TLC. Proto bylo do reakční směsi přidáno 5 ml DEE a EtOAc po kapkách do vzniku sraženiny. Následovalo ochlazení reakční směsi na -20 °C. Po 1 hodině vznikl bílý precipitát, který byl odfiltrován pomocí MeOH a sušen vzduchem. Výtěžek reakce byl 65 %.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₃N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 243,27

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 147-148 °C (lit. 157-158 °C [48])

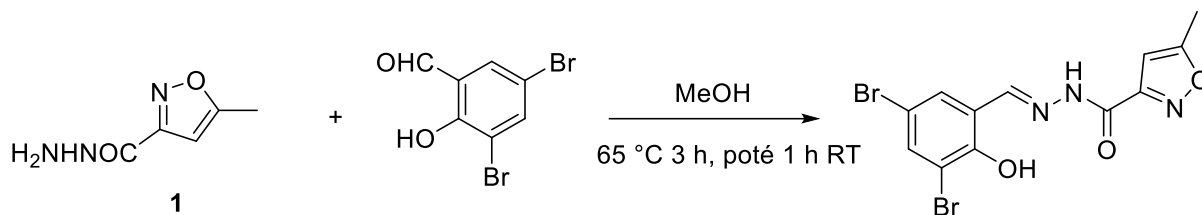
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 11.82 (s, 1H, NH), 7.85 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH=N), 7.33 – 7.29 (m, 2H, H3, H5), 7.25 – 7.20 (m, 3H, H2, H4, H6), 6.57 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, -CH=), 3.58 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH₂), 2.44 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 171.87, 158.75, 155.69, 152.92, 137.13, 129.40, 129.25, 127.22, 102.20, 38.86, 12.36.

IR: 3194, 3082, 1666, 1602, 1554, 1454, 1356, 1237, 1222, 912, 845, 738, 698 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 64.19; H, 5.39; N, 17.27, nalezeno: C, 64.22; H, 5.42; N, 17.21.

Syntéza (*E*)-*N'*-(3,5-dibromo-2-hydroxybenzyliden)-5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu
[DM-13]



1 mmol (141 mg) hydrazidu (**1**) byl rozpuštěn v 10 ml MeOH a poté bylo přidán 1 mmol (280 mg) 3,5-dibrom-2-hydroxybenzaldehydu. Zpracování reakce probíhalo podobně jako u reakce DM-11, lišily se pouze reakční časy. Výtěžek reakce 30 %.

Sumární vzorec: C₁₂H₉Br₂N₃O₃

Relativní molekulová hmotnost: 405,05

Popis: světle žluté krystaly

Teplota tání: 147-148 °C

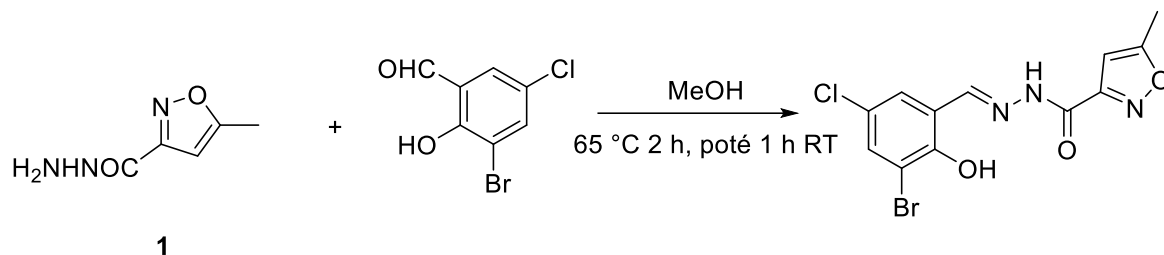
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.88 (s, 1H, OH), 12.35 (s, 1H, NH), 8.57 (s, 1H, CH=N), 7.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H4), 7.74 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H6), 6.67 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 2.47 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 172.34, 158.07, 155.95, 154.22, 149.37, 136.49, 132.76, 121.45, 111.92, 111.08, 102.35, 12.40.

IR: 3189, 3140, 3073, 1676, 1599, 1545, 1456, 1446, 1424, 1342, 1286, 1256, 1226, 1206, 1170, 1134, 1003, 965, 941, 925, 867, 832, 790, 771, 739, 700, 688, 612 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 35.76; H, 2.25; N, 10.43, nalezeno: C, 35.79; H, 2.27; N, 10.46

Syntéza (*E*)-*N'*-(3-brom-5-chlor-2-hydroxybenzyliden)-5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu [DM-14]



Do 100 ml destilační baňky byl odvážen 1 mmol (141 mg) hydrazidu (**1**). Ten byl rozpuštěn v 10 ml MeOH. Po rozpuštění byl přidán 1 mmol (235 mg) 5-chlor-3-brom-2-hydroxybenzaldehydu. Následoval stejný postup jako u reakce DM-11, lišily se pouze reakční časy. Výtěžek reakce byl 42 %.

Sumární vzorec: C₁₂H₉BrClN₃O₃

Relativní molekulová hmotnost: 360,59

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 249-250 °C

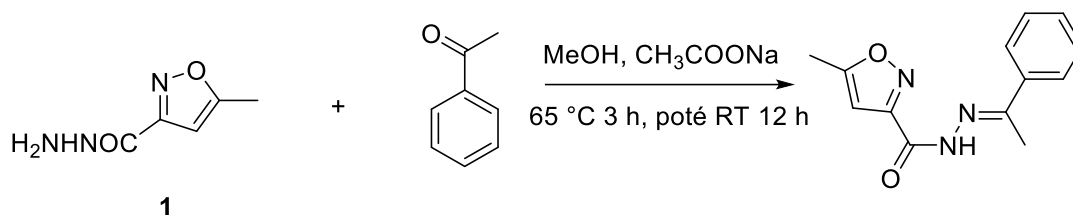
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 12.88 (s, 1H, OH), 12.32 (s, 1H, NH), 8.58 (s, 1H, CH=N), 7.71 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H6), 7.62 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H4), 6.67 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 2.47 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 172.35, 158.07, 155.95, 153.83, 149.45, 133.94, 129.91, 123.97, 120.85, 111.55, 102.35, 12.39.

IR: 3195, 3139, 3074, 1677, 1598, 1543, 1457, 1446, 1431, 1258, 1237, 1265, 1219, 1205, 1171, 1132, 1003, 964, 950, 924, 868, 832 788, 771, 739, 724, 698, 673, 610 cm⁻¹

EA vypočteno: C, 40.20; H, 2.53; N, 11.72, nalezeno: C, 40.40; H, 2.42; N, 11.89.

Syntéza (*E*)-*N'*-(1-fenylethyliden)-5-methyl-isoxazol-3-karbohydrazidu [DM-15]



1 mmol (141 mg) hydrazidu (**1**) byl odvážen do 100 ml destilační baňky a rozpuštěn v 20 ml MeOH. Následně byl přidán 1 mmol (0,116 ml) acetofenonu a reakční směs byla přivedena k bodu varu. Reakční směs byla ponechána reagovat 3 hodiny. Dle TLC probíhala konverze na výsledný produkt velmi pomalu. Do reakční směsi bylo přidáno 10 mg octanu sodného a směs ponechána reagovat přes noc za RT. Reakce byla zastavena a baňka byla ochlazená na -20 °C v mrazícím boxu, kde vznikly bílé krystaly. Ty byly zfiltrány pomocí nuče a promyty 15 ml MeOH. Výtěžek reakce činil 52 %.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₃N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 243,27

Popis: bílé krystaly

Teplota tání: 157-159 °C (lit. 154-155 °C [47])

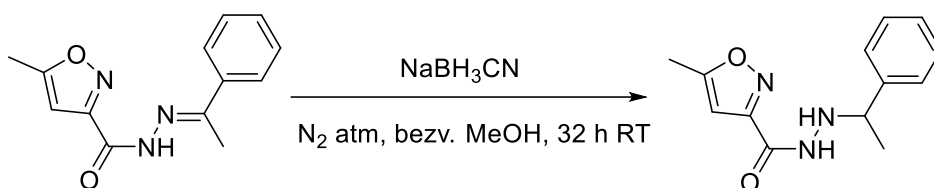
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 10.91 (s, 1H, NH), 7.83 – 7.80 (m, 2H, H₂, H₆), 7.43 – 7.40 (m, 3H, H₃, H₄, H₅), 6.63 (s, 1H, -CH=), 2.46 (s, 3H, isoxazol CH₃), 2.32 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 171.73, 158.91, 157.90, 156.29, 138.19, 130.40, 128.96, 127.13, 102.23, 15.17, 12.37.

IR: 3189, 3133, 3056, 2932, 1682, 1661, 1602, 1549, 1491, 1462, 1446, 1417, 1315, 1303, 1275, 1214, 1006, 1054, 1014, 970, 901, 870, 815, 757, 748, 687, 659, 645, 640, 625 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 64.19; H, 5.39; N, 17.27, nalezeno: C, 64.15; H, 5.36; N, 17.29.

Syntéza *N'*-(1-fenylethyl)-5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu [DM-16]



Postup reakce byl stejný jako u reakce DM-15. Meziprodukt reakce byl smíchán s 0,53 mmol (41 mg) NaBH₃CN pod N₂ atmosférou. Reakční směs ponechána reagovat za RT přes noc, beze změny. Další den bylo přidáno dalších 41 mg NaBH₃CN. Po 1 hodině se provedla TLC analýza. V mezidobí začala uvnitř baňky vznikat olejovitá kapalina. Následovala filtrace reakční směsi na nuči 10 ml MeOH. Filtrát byl zbaven zbytkového rozpouštědla pomocí vakuové odparky. Výtěžek reakce byl 29 %.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₅N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 245,28

Popis: nažloutlá olejovitá kapalina

Teplota tání: -

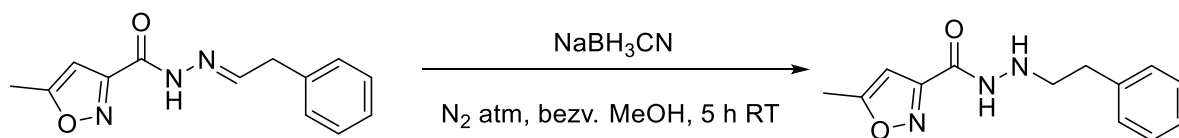
¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 10.12 (s, 1H, CONH), 7.29 – 7.25 (m, 2H, H3, H5), 7.23 – 7.20 (m, 1H, H4), 7.16 – 7.13 (m, 2H, H2, H6), 6.61 (s, 1H, -CH=), 4.78 (s, 1H, NH), 3.84 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH), 2.46 (s, 3H, isoxazol CH₃), 1.72 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH-CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 171.82, 157.01, 142.58, 129.78, 129.08, 128.94, 128.01, 126.56, 63.03, 23.63, 21.41.

IR: 2972, 2929, 2384, 2183, 1619, 1521, 1453, 1421, 1376, 1308, 1195, 1125, 1082, 1007, 964, 940, 833, 761, 701, 640, 656, 606 cm⁻¹

EA: vypočteno: C, 63.66; H, 6.16; N, 17.13, nalezeno: C, 63.63; H, 6.22; N, 17.10.

Syntéza *N*'-fenethyl-5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu [DM-17]



85 mg **DM-12** bylo naváženo do destilační baňky a rozpuštěno v 15 ml bezvodého MeOH. Bylo přidáno 40 mg NaBH_3CN . Reakce probíhala pod atmosférou N_2 a byla ponechána reagovat za stálého míchání 15 hodin. Zbytkové rozpouštědlo bylo odpařeno za vzniku lehce oranžové olejovité kapaliny. Do obsahu baňky bylo přidáno 15 ml MeOH a vzniklá směs byla zfiltrována na nuči. Filtrát byl zbaven rozpouštědla za vzniku oranžové olejovité kapaliny. Zisk reakce byl 18 %

Sumární vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$

Relativní molekulová hmotnost: 245,28

Popis: oranžová olejovitá kapalina

Teplota tání: -

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, ACETON- D_6) δ 9.32 (s, 1H, CONH), 7.27 – 7.19 (m, 5H, H2, H3, H4, H5, H6), 6.44 (s, 1H, -CH=), 3.15 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2N), 2.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Ph- CH_2), 2.44 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, ACETON- D_6) δ 171.24, 158.28, 140.30, 140.03, 128.77, 128.37, 126.04, 101.14, 53.01, 34.38, 11.24.

IR: 3027, 2929, 1661, 1596, 1533, 1496, 1454, 1361, 1273, 1130, 1031, 1002, 917, 849, 810, 748, 700, 640, 618 cm^{-1}

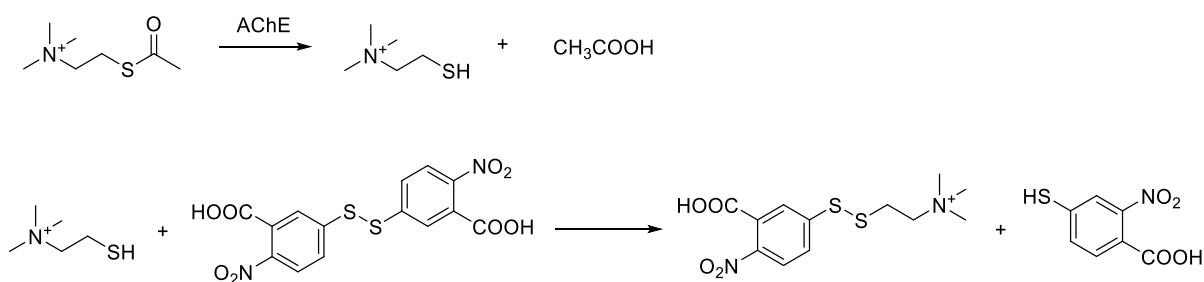
EA: vypočteno: C, 63.66; H, 6.16; N, 17.13, nalezeno: C, 63.81; H, 6.02; N, 17.10.

4.3 Biologická aktivita

4.3.1 Stanovení inhibiční aktivity u cholinesteráz

Nejpoužívanější metodou pro stanovení inhibiční aktivity cholinesteráz je spektrofotometrická Ellmanova metoda. Ta je založena na kvantifikaci obsahu -SH nebo -S-S- skupin.

Principiálně se jedná o rychlost vzniku thiocholinu, který vzniká jako produkt hydrolýzy acetylthiocholinu a butyrylthiocholinu cholinesterázou ve vodném prostředí. Ten reaguje s Ellmanovým činidlem (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) za vzniku žlutého produktu 5-thio-2-nitrobenzoátu, detekovatelného při vlnové délce 412 nm. (obr. 29) [49]



Obrázek 29 - Reakční schéma Ellmanovy reakce

4.3.2 Výsledky stanovení inhibiční aktivity AChE a BuChE

Po syntéze všech nových sloučenin **DM-1** až **DM-17** byly tyto sloučeniny podrobeny Ellmanově metodě. Tato metoda byla provedena na Univerzitě Pardubice. Konkrétně na Fakultě chemicko-technologické, katedra biochemických a biologických věd Mgr. Šárkou Štěpánkovou, Ph.D.

Výsledky inhibiční aktivity IC₅₀ pro AChE a BuChE lze vidět pro všechny syntetizované sloučeniny v Tab.1. Inhibiční aktivita se měřila proti standardům používaným v léčbě AD (galanthamin, rivastigmin, takrin a donepezil). Z tabulky se dá odvodit, že čím menší je číslo IC₅₀, tím větší účinek dané léčivo v inhibici vykazuje a tím úspěšnější může být v potencionální léčbě AD či PD.

Označení sloučeniny	IC ₅₀ (μM) AChE	IC ₅₀ (μM) BuChE	SI
DM-1	79,18±0,73	181,86±0,72	0,44
DM-2	60,39±3,03	53,03±1,47	1,14
DM-3	102,97±5,65	107,48±5,43	0,96
DM-4	16,49±0,78	160,38±5,51	0,10
DM-6	159,57±3,84	218,38±2,44	0,73
DM-7	47,60±2,12	255,82±5,83	0,19
DM-9	109,55±8,82	148,21±2,63	0,74
DM-10	21,78±0,53	148,22±0,99	0,15
DM-11	44,14±1,15	230,24±9,30	0,19
DM-12	42,68±0,12	253,42±9,55	0,17
DM-13	52,83±1,53	191,90±9,48	0,28
DM-14	58,31±2,27	407,49±9,41	0,14
DM-15	55,10±2,63	156,93±1,79	0,35
DM-16	50,83±0,24	390,15±13,35	0,13
DM-17	54,63±1,57	105,13±4,48	0,52
Rivastigmin	56,10±1,41	38,40±1,97	1,46
Galantamin	1,54±0,02	2,77±0,15	0,56
Takrin	0,038±0,002	0,004±0,00006	9,50
Donepezil	0,015±0,0001	0,0314±0,001	0,48

Tabulka 1 - inhibice AChE a BuChE s indexem selektivity

Nejvyšší schopnost inhibice AChE vykazují látky DM-4, DM-10, DM-11, DM-12. Další sloučeniny, které se pohybují v řádech podobných jako u rivastigminu, jsou molekuly DM-2, DM-7, DM-13, DM-14, DM-15, DM-16, DM-17.

Nejvyšší schopnost inhbyce BuChE vykazuje molekula s označením DM-2. Ta se s IC₅₀ nejvíce přibližuje hodnotě inhibiční aktivity rivastigminu. Ostatní molekuly mají velmi slabou afinitu k BuChE oproti standardům.

Dalším faktorem, který byl určován pro nově syntetizované sloučeniny, je index selektivity (SI), podle kterého je možno určit, zda je daná sloučenina selektivní inhibitor AChE nebo BuChE.

$$SI = \frac{IC_{50} AChE}{IC_{50} BuChE}$$

- Pokud vychází SI > 10 je sloučenina selektivní pro inhibici BuChE
- Pokud vychází SI < 0,1 je sloučenina selektivní pro inhibici AChE

Dle Tab. 1 se nejedná ani v jednom případě o úplnou selektivitu ani k jedné cholinesteráze. Pouze DM-4 vykazuje selektivitu k AChE. Naproti tomu DM-2 a DM-3 mají téměř srovnatelnou selektivitu k oběma esterázám, jinak je citlivějším enzymem AChE.

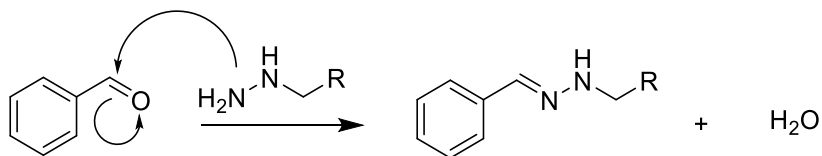
5 Diskuze

5.1 Chemická část

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, k návrhu série sloučenin sloužily jako výchozí sloučeniny isoniazid, fenelzin a isokarboxazid. Tyto sloučeniny reagovaly s karbonyly za vzniku hydrazonů a hydrazinů. Těmito syntézami bylo připraveno dohromady 15 prekurzorů a finálních látek (DM-1 až DM-17).

Při syntéze téměř všech sloučenin se nastavovaly podobné reakční podmínky a využívaly se opakující postupy. MeOH se ukázal jako nejlepší zvolené rozpouštědlo pro tento typ reakcí. MeOH se využil u každé z reakcí a vykazoval nejlepší vlastnosti v porovnání například s THF (bylo použito ve dvou reakcích DM-7 a DM-8 – neúspěšně).

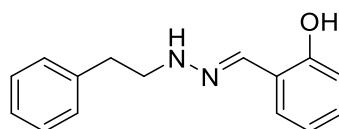
Metodika přípravy zkoušených sloučenin byla následující: reaktanty byly rozpuštěny v MeOH a reakční směs byla zahřívána za varu rozpouštědla (65 °C) pod zpětným chladičem. Konverze na produkt probíhala u každé sloučeniny jinak, a to jak přes reakční čas tak i přes následující zpracování reakce. Ve většině případů se jednalo o reakci hydrazinu s karbonylem, jak pojednává obr. 30.



Obrázek 30 - reakce aldehydu a hydrazinu za vzniku hydrazonu a vody

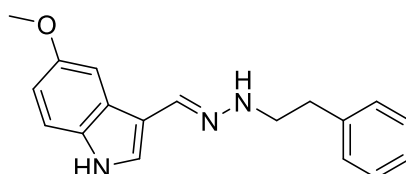
Některé sloučeniny (DM-5 a DM-8) se i přes řadu pokusů nepodařilo izolovat v přijatelné čistotě a v přijatelném množství na biologické testování. Jednalo se o reakci fenelzinu s 2-hydroxybenzaldehydem. Tato reakce byla označena v syntetizované sérii

pod kódem DM-5 a byla připravována analogicky k reakci DM-3. Při prvním pokusu syntézy DM-5 byly reaktanty uvedeny do vodného prostředí s NaOH. V dalším pokusu se použilo prostředí MeOH a octanu sodného. Ve třetím pokusu byl použit anhydrid kyseliny octové v prostředí pyridinu k chránění hydroxylové skupiny, následované vlastní kondenzací s aminovou skupinou. I přes změnu reakčního prostředí a chránění hydroxylové skupiny se výsledný produkt nepodařilo izolovat.



Obrázek 31 - struktura DM-5

Dalším neúspěšným pokusem o syntézu byla reakce DM-8 – reakce fenelzinu s 5-methoxy-1*H*-indol-3-karbaldehydem. Dle chronologické analýzy TLC (prováděné u každé reakce po 10, 15, 20 a 30 minutách) v mobilní fázi DCM:MeOH 97:3 V/V, docházelo z nevysvětlitelného důvodu ke konverzi produktu na sloučeninu s vyšším R_f . DM-8 se nepodařilo izolovat vlivem konverze sloučeniny na jiný produkt. Sloučeninu s vyšším R_f se také nepodařilo izolovat a identifikovat.



Obrázek 32 - struktura DM-8

V celé sérii se připravily dvě sloučeniny, které vznikly redukcí dvojně vazby. Jednalo se o molekulu DM-17, syntetizovanou z nenasyceného derivátu DM-12, pomocí redukčního činidla NaBH_3CN a inertní atmosféry, a DM-16 připravovanou pod inertní atmosférou N_2 z DM-15. U reakce DM-16 se muselo přidat dvojnásobné množství redukčního činidla, protože nedocházelo k dostatečné konverzi na produkt.

U DM-15 se rychlost přeměny na produkt zlepšila po přidání malého množství octanu sodného k reakční směsi. Při jeho nepřítomnosti probíhala přeměna na produkt velmi pomalu a neochotně.

Reakce s označením DM-6 probíhala za jiných podmínek než ostatní reakce. Probíhala v prostředí DCM a Et₃N jako reakční činidlo. Jednalo se o přípravu 2-(2-fenethylhydrazin-1-karbonyl)fenyl-acetátu.

Výtěžky reakcí nekorelovaly se strukturou sloučeniny nebo reaktantů. Nízké výtěžky byly u reakcí: DM-3, DM-11, DM-13, DM-14, DM-16 a DM-17. Důvodem nízkých výtěžků u reakcí DM-11, DM-13 a DM-14 byl zvolený postup přípravy a opakovaná purifikace produktu. U reakcí DM-16 a DM-17 vznikly ztráty z důvodu nedokonalé konverze reaktantů na produkt. Naopak největší výtěžek vykazovala reakce DM-7 a to vlivem rychlé konverze na produkt bez nutnosti dalších kroků a purifikace produktu. U reakce DM-7 s výtěžkem 88 % dle ¹H NMR spektroskopie vyšlo, že produktem je směs *trans* a *cis* izomerů v poměru 7:2.

5.2 Biologie

5.2.1 Inhibice a IC₅₀

Inhibice enzymů je proces, při kterém se sníží aktivita enzymu po navázání určitého ligandu. Tím dochází k nesprávnému či omezenému fungování enzymu a tedy i zablokování enzymatické reakce.

Sloučeniny, které takto účinkují na enzymech, se nazývají enzymatické inhibitory či negativní efekторы. Inhibice může být přirozená nebo nepřirozená. U přirozené inhibice dochází pomocí inhibitoru, který je organismu vlastní sloučeninou, k regulaci buněčných procesů a u nepřirozené jako inhibitory figurují jedy a nechtěné zplodiny metabolismu. [49]

Inhibici můžeme rozdělit na ireverzibilní a reverzibilní. Reverzibilní se dále dělí na kompetitivní (inhibitor soutěží s molekulou substrátu o aktivní místo enzymu), akompetitivní (inhibitor se váže pouze na komplex enzym-substrát) [50] a nekompetitivní (inhibitor se váže mimo vazebné místo určené pro substrát). Při nekompetitivní inhibici se váží inhibitory do alosterického místa a tím se snižuje rychlost přeměny substrátu na produkt. Inhibitor při této inhibici snižuje mezní rychlost (v_{\max}), ale Michaelisova konstanta¹³ zůstává

¹³ Michaelisova konstanta je taková koncentrace substrátu při níž je rychlost enzymové reakce (v) rovna polovině maximální rychlosti (v_{\max})

stejná. Speciálním typem nekompetitivní inhibice je inhibice smíšená, při které dochází ke změně Michaelisovy konstanty i mezní rychlosti. [51]

Z chemického hlediska může být inhibitorem téměř cokoliv. Ať už se jedná o ionty kovů, nízkomolekulární anorganické látky, ale jako inhibitory se mohou chovat i vysokomolekulární organické látky. [49]

Účinnost inhibitorů se posuzuje dle hodnoty IC_{50} . IC_{50} je kvantitativní mírou, která udává kolik inhibiční sloučeniny je potřeba k *in vitro* inhibici daného biologického procesu (např. inhibice enzymu) o 50 %, tj. taková koncentrace inhibitoru, která sníží účinnost enzymu o 50 %. Nejčastěji je udávána v molární koncentraci mol/l. ([52] [49])

Všechny připravené sloučeniny DM-1 až DM-17 byly podrobeny *in vitro* screeningu. Bylo nasyntetizováno celkem 15 sloučenin, u kterých byla stanovena jejich schopnost inhibovat AChE a BuChE pomocí Ellmanovy metody.

5.2.2 Inhibice AChE

Nejlepší schopnost pro inhibici AChE s $IC_{50} = 16,49 \mu\text{M}$ vykazuje sloučenina DM-4. Jedná se o sloučeninu (*E*)-1-(3-nitrobenzyliden)-2-fenethylhydrazin. Druhou velmi aktivní molekulou v inhibici AChE je DM-10 s $IC_{50} = 21,78 \mu\text{M}$. Jedná se o sloučeninu (*E*)-5-methyl-*N'*-(3-nitrobenzyliden)isoxazol-3-karbohydrazid. Lze tedy odvodit, že nejlepší výsledky v inhibici AChE vykazují **3-nitrobenzylidenové deriváty**.

Další molekuly, které mají afinitu v inhibici AChE, jsou DM-12, DM-11 a DM-7. DM-7 s inhibiční aktivitou $IC_{50} = 47,60 \mu\text{M}$ je (*E*)-*N'*-[(5-methoxy-*1H*-indol-3-yl)methylen]isonikotinohydrazid a z Tab. 1 je patrné, že indolový derivát je aktivnější než hydrazon odvozený od fenylacetaldehydu (DM-1, odvozený též od isoniazidu).

DM-11 s $IC_{50} = 44,14 \mu\text{M}$ vykazuje čtvrtou nejvyšší schopnost inhibice AChE. Jedná se o 4-nitroderivát. Ze naměřených hodnot tedy vyplývá, že 4-nitroderiváty jsou u inhibice AChE horšími inhibitory než 3-nitroderiváty.

Pro sérii sloučenin připravovaných z výchozí látky 5-methylisoxazol-3-karbohydrazidu DM-9 až DM-15 je typické, že jakýkoliv derivát odvozený od výchozí sloučeniny DM-9 ($IC_{50} = 109,55 \mu\text{M}$) je účinnějším inhibitorem než mateřská (výchozí)

sloučenina. DM-12 s inhibiční koncentrací $IC_{50} = 42,68 \mu\text{M}$ vykazuje 3. nejlepší schopnost inhibice AChE. Jedná se o derivát fenylacetaldehydu.

Fenylacetaldehyd reagoval se všemi výchozími látkami (konkrétně se jedná o produkty DM-1, DM-3 a DM-12) se ukázal jako nejvhodnější substituent pro 5-methylisoxazol-3-karbohydrazid.

U série připravované z **fenelzinu** se jako nejhorší substituent prokázal chlorid kyseliny acetylsalicylové (DM-6), a to jak v inhibici AChE, tak i BuChE.

DM-13 ($IC_{50} = 52,83 \mu\text{M}$) a DM-14 ($IC_{50} = 58,31 \mu\text{M}$) připravované z reaktantů salicylaldehydů nevykazují po substituci bromu za chlor výrazné změny v inhibici.

Ani redukce dvojné vazby u produktů DM-16 a DM-17 nepřinesla výrazné posuny inhibiční aktivity. Nasycenost vazby tedy nekoreluje s inhibiční aktivitou u AChE.

Sloučeniny byly porovnávány s inhibičními koncentracemi léčiv používaných u AD. Těmi jsou rivastigmin, donepezil, galanthamin a takrin (již nevyužíván). Jak je uvedeno v Tab. 1, sloučeniny DM-4, DM-7, DM-10, DM-11 a DM-12 vykazují lepší inhibici než rivastigmin, ale nižší inhibici než galanthamin a donepezil.

V opačném spektru stojí sloučenina s označením DM-6. Ta vykazuje nejhorší inhibici AChE z celé série. DM-6 je molekula připravená z derivátu kyseliny acetylsalicylové s $IC_{50} = 159,57 \mu\text{M}$. Druhou nejslabší afinitu k AChE vykazuje sloučenina DM-9 s $IC_{50} = 109,55 \mu\text{M}$. A třetí nejhorší je sloučenina DM-3 s $IC_{50} = 102,97 \mu\text{M}$.

5.2.3 Inhibice BuChE

Dle Tab. 1 schopnost inhibice BuChE u celé série nasyntetizovaných sloučenin nevykazuje dobrou aktivitu vůči BuChE. Pouze jedna sloučenina má inhibiční schopnost, která se alespoň částečně přibližuje standardu rivastigminu. Jedná se o sloučeninu DM-2, u které je $IC_{50} = 53,03 \mu\text{M}$.

U sloučenin DM-13 a DM-14, což jsou molekuly, které se liší substitucí bromu za chlor, se inhibice po substituci chlorem snížila více než dvojnásobně ($156,93 \mu\text{M}$ a $407,49 \mu\text{M}$).

Rozdíl mezi 3-nitroderiváty a 4-nitroderiváty u inhibice AChE je prokazatelný ve prospěch 3-nitroderivátů. U inhibice BuChE nelze jednoznačně prokázat, které nitroderiváty jsou lepšími inhibitory.

Nasycenost vazeb v molekule nekoreluje s inhibiční aktivitou jak u AChE, tak u BuChE. Porovnávanými sloučeninami byly DM-12 (dvojná vazba) s DM-17 (jednoduchá vazba) a DM-15 (dvojná vazba) s DM-16 (jednoduchá vazba).

6 Závěr

V této diplomové práci se podařilo nasyntetizovat 15 sloučenin. Ty byly testovány na schopnost inhibice AChE a BuChE, vyjádřené pomocí IC_{50} v jednotkách μM . Vyhodnocení inhibice proběhlo na základě získaných dat změřených Ellmanovou metodou. Některé ze sloučenin (konkrétně DM-4, DM-10, DM-11, DM-12) se prokázaly stejně, dokonce lépe účinné v inhibici AChE než rivastigmin.

Z této diplomové práce bylo na základě získaných informací a dat vyhodnoceno:

1. Nejlepší biologickou aktivitu vykazovaly sloučeniny, které byly připraveny z 3-nitroderivátů. Konkrétně se jednalo o sloučeninu **DM-4** (*E*)-1-(3-nitrobenzyliden)-2-fenethylhydrazin. I proto by mohly sloučeniny připravované z **3-nitroderivátů** hrát významnou roli v dalších syntézách a hodnoceních v inhibici AChE.

2. Velmi dobré výsledky v inhibici AChE vykazovaly také deriváty připravené z **4-nitroderivátů** (DM-2 a DM-11).

3. 3-nitroderiváty měly lepší výsledky v inhibici AChE než 4-nitroderiváty. U BuChE se nedá jednoznačně prokázat, který z nitro derivátů má lepší inhibiční aktivitu.

4. Nasycenost vazeb **neměla** významný vliv na aktivitu v inhibici u obou enzymů. Tudíž se nejedná o korelaci mezi nasyceností a nenasyceností vazeb a jejich rozdílném účinku v inhibici cholinesteráz.

5. Substituce **chlorem** vykazovala **zhoršení** inhibiční aktivity u inhibice BuChE až dvojnásobně. U inhibice AChE vykazovala nepatrný rozdíl ve prospěch bromu. Tudíž substituce chlorem není výhodná v inhibici ani pro jednu z forem enzymu.

6. Pouze jedna sloučenina ze série měla podobnou schopnost inhibovat BuChE jako rivastigmin. Jednalo se o sloučeninu s označením DM-2. DM-2 také vykazovala stejnou efektivitu v inhibici obou enzymů, podle hodnoty SI. Nejvíce selektivní k AChE byla sloučenina DM-4.

7. Fenylacetaldehyd reagoval se všemi výchozími sloučeninami (isoniazid, fenelzin a 5-methylisoxazol-5karbohydrazid) se dle inhibiční aktivity IC_{50}

pro **AChE** ukázal jako nejvhodnější substituent pro **5-methylisoxazol-3-karbohydrazid**. U **BuChE** byl nejvhodnějším substituentem pro **fenelzin**.

8. U série připravované z **fenelzinu** se jako nejhorší substituent prokázal DM-6, a to jak pro inhibici AChE, tak i BuChE. Jedná se o sloučeninu 2-(2-fenethylhydrazin-1-karbonyl)fenyl-acetát.

Sloučeniny s nejlepšími výsledky budou dále poslány na testování dalších cílů ovlivňujících léčbu AD a PD, a to např. schopnost inhibice MAO-A a MAO-B.

7 Použitá literatura

1. Akaike, A. *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection*. 2018; Chapter 1:[Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543551/> doi: 10.1007/978-981-10-8488-1_1.
2. Hampl František, S.R., Jaroslav Paleček, *Farmakochemie 2*. 2007, Praha: Vydavatelství VŠCHT.
3. Tiwari, P., et al., *Basic and modern concepts on cholinergic receptor: A review*. Asian Pac J Trop Dis, 2013. **3**(5): p. 413-20.
4. Vyskočil, F., *Acetylcholin hodný a zlý*. Časopis Vesmír, 2009. **88**(3): p. 153.
5. Čečková, M., *Léčiva ovlivňující cholinergní systém*. 2020, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova.
6. Tindle, J. and P. Tadi. *Neuroanatomy, Parasympathetic Nervous System*. 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31985934>.
7. Slíva Jiří, *Farmakologie v kostce*. 2021, Praha: Triton.
8. Mets, B. and I. Redai, *Parasympathomimetic and parasympatholytic drugs*. Anesthetic Pharmacology, 2011: p. 666-6675.
9. Patel, N.M. and N. Dewaswala. *Parasympathomimetic Medications*. StatPearls 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32119421>.
10. Vardanyan, R.S. and V.J. Hruby, *13 - Cholinomimetics*, in *Synthesis of Essential Drugs*, R.S. Vardanyan and V.J. Hruby, Editors. 2006, Elsevier: Amsterdam. p. 179-193.
11. Mdeni, N.L., et al., *Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review*. Molecules, 2022. **27**(3): p. 618.
12. Sullivan, S.D., Rasouliyan, L., Russo, P. A., Kamath, T., & Chipps, B. E. , *Extent, patterns, and burden of uncontrolled disease in severe or difficult-to-treat asthma*. Allergy, 2007. **62**(2): p. 126-33.
13. Vojtíšek, P., *Premedikace u dětí*. Pediatr. praxi, 2015. **16**(6): p. 375-378.
14. Kreydin, E.I., C.M. Gomes, and F. Cruz, *Current pharmacotherapy of overactive bladder*. Int Braz J Urol, 2021. **47**(6): p. 1091-1107.
15. Anzueto, A. and M. Miravittles, *Tiotropium in chronic obstructive pulmonary disease - a review of clinical development*. Respir Res, 2020. **21**(1): p. 199.
16. Buda, O., et al., *Altered states, alkaloids, and catatonia: Monoaminoxidase inhibitors and their role in the history of psychopharmacology*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 1053534.
17. Kamal, S. and S.L. Lappin. *Biochemistry, Catecholamine Degradation*. StatPearls 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545235/>.

18. Juárez Olguín, H., et al., *The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress*. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. **2016**: p. 9730467.
19. Yáñez, M., et al., *History and therapeutic use of MAO-A inhibitors: a historical perspective of mao-a inhibitors as antidepressant drug*. *Curr Top Med Chem*, 2012. **12**(20): p. 2275-82.
20. Can, N., et al., *Synthesis of New Hydrazone Derivatives for MAO Enzymes Inhibitory Activity*. *Molecules*, 2017. **22**(8): p. 1381.
21. Shanahan, P., et al., *Theobromine and related methylxanthines as inhibitors of Primary Amine Oxidase*. *J Food Biochem*, 2019. **43**(2): p. e12697.
22. Matveychuk, D., et al., *Overview of the Neuroprotective Effects of the MAO-Inhibiting Antidepressant Phenelzine*. *Cell Mol Neurobiol*, 2022. **42**(1): p. 225-242.
23. Youdim, M.B. and M. Weinstock, *Therapeutic applications of selective and non-selective inhibitors of monoamine oxidase A and B that do not cause significant tyramine potentiation*. *Neurotoxicology*, 2004. **25**(1-2): p. 243-50.
24. Fowler, J.S., et al., *Reversible inhibitors of monoamine oxidase-A (RIMAs): robust, reversible inhibition of human brain MAO-A by CX157*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(3): p. 623-31.
25. Bonnet, U., *Moclobemide: therapeutic use and clinical studies*. *CNS Drug Rev*, 2003. **9**(1): p. 97-140.
26. Breijyeh, Z. and R. Karaman, *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*. *Molecules*, 2020. **25**(24): p. 5789.
27. Sharma, K., *Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review)*. *Mol Med Rep*, 2019. **20**(2): p. 1479-1487.
28. Kametani, F. and M. Hasegawa, *Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease*. *Front Neurosci*, 2018. **12**: p. 25.
29. Mohandas, E., V. Rajmohan, and B. Raghunath, *Neurobiology of Alzheimer's disease*. *Indian J Psychiatry*, 2009. **51**(1): p. 55-61.
30. Krátký, M., et al., *Novel propargylamine-based inhibitors of cholinesterases and monoamine oxidases: Synthesis, biological evaluation and docking study*. *Bioorg Chem*, 2021. **116**: p. 105301.
31. Park, S.M., et al., *Tacrine, an oral acetylcholinesterase inhibitor, induced hepatic oxidative damage, which was blocked by liquiritigenin through GSK3-beta inhibition*. *Biol Pharm Bull*, 2015. **38**(2): p. 184-92.
32. Kalola, U.K. and H. Nguyen. *Galantamine*. *StatPearls 2023*; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34662060>.
33. Patel, P.H. and V. Gupta. *Rivastigmine*. *StatPearls 2023*; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557438/>.

34. Kleinová L. et al., *Nové farmakologické možnosti v léčbě Alzheimerovy nemoci*. Cesk Slov Neurol N, 2022. **85**(6): p. 462-469.
35. Jiří Patočka, K.K., *Ladostigil - další snaha o dualistické kognitivum*. Psychiatrie, 2013. **17**(2): p. 71-73.
36. Balestrino, R. and A.H.V. Schapira, *Parkinson disease*. European Journal of Neurology, 2020. **27**(1): p. 27-42.
37. Schultz, J.L., et al., *A pilot to assess target engagement of terazosin in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2022. **94**: p. 79-83.
38. Zafar, S. and S.S. Yaddanapudi. *Parkinson Disease*. StatPearls 2023; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29261972/>.
39. Bloem, B.R., M.S. Okun, and C. Klein, *Parkinson's disease*. Lancet, 2021. **397**(10291): p. 2284-2303.
40. Stoker, T.B. and R.A. Barker, *Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease*. F1000Res, 2020. **9**: p. 862.
41. Triarhou, L.C. *Dopamine and Parkinson's Disease*. [In: Madame Curie Bioscience Database] 2000-2013; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6271/>.
42. Choi, J. and K.A. Horner. *Dopamine Agonists*. StatPearls 2023; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551686/>.
43. Tan, Y.Y., P. Jenner, and S.D. Chen, *Monoamine Oxidase-B Inhibitors for the Treatment of Parkinson's Disease: Past, Present, and Future*. J Parkinsons Dis, 2022. **12**(2): p. 477-493.
44. Acuña, A.A., Vania; Demarqui, Fernanda Manaia; Jara, Danilo H.; Klahn, A. Hugo; Lemus, Luis; Mallea, Mario; Pavan, Fernando Rogério; Toro, Patricia M.[Journal of Organometallic Chemistry, 2022. **964**(122299).
45. Mudzhoyan, e.a., *Armyanskii Khimicheskii Zhurnal*, 1966. **19**: p. 538,539-541.
46. Pasunooti, K.K.B., Biplab; Yap, Terence; Jiang, Yaojia; Liu, Chuan, *Auxiliary-Directed Pd-Catalyzed γ -C(sp³)-H Bond Activation of α -Aminobutanoic Acid Derivatives*. Organic Letters, 2015. **17**(24).
47. Hui, X.-P.C., Chang-Hu; Zhang, Zi-Yi; Wang, Qin; Zhang, Qi *Synthesis and antibacterial activities of 1,3,4-oxadiazole derivatives containing 5-methylisoxazole moiety*. Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry, 2002. **41**(10): p. 2176 - 2179.
48. LEE, G.W., *Monoamine oxidase inhibitors. I. 1-Alkyl and 1-aralkyl-2-(picolinoyl and 5-methyl-3-isoxazolyl-carbonyl)hydrazines*. 1960. **2**: p. 133-145.
49. Štěpánková, Š., *Inhibice enzymů*, 2023, UPCE: Fakulta chemicko-technologická.
50. Maňásková D. *Inhibitory enzymů*. 2018; Available from: <https://medicinman.cz/?p=leky-latky%2Fenzymy%2Finhibitory-enzymu&fbclid=IwAR0-lqgGfM9LmXKxICm4gfRvr57qe-N6lQv75TVFWhEhmVehorXLUYrizQ8>.

51. Vodrážka, Z., *Enzymologie*. Vol. 3. 1998, Praha: Vydavatelství VŠCHT. 171.
52. RM, H., *IC50 versus EC50, PK-PD relationships for anti-retroviral drugs*. 2017: Amsterdam: Slotervaart Hospital.
53. Abrams, P., et al., *Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder*. *Br J Pharmacol*, 2006. **148**(5): p. 565-78.
54. Fox, S.H., et al., *The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2011. **26 Suppl 3**: p. S2-41.
55. Hampl František, J.P., *Farmakochemie*. 2002, Praha: Vydavatelství VŠCHT.
56. Chahine, R., et al., *Norepinephrine and dihydroxyphenylglycol effluxes from sympathetic nerve endings during hypoxia and reoxygenation in the isolated rat heart*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1994. **72**(6): p. 595-601.
57. LC, T., *Dopamine and Parkinson's Disease*. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. 2000-2013, Austin (TX): Landes Bioscience.
58. McCorry, L.K., *Physiology of the autonomic nervous system*. *Am J Pharm Educ*, 2007. **71**(4): p. 78.
59. Seppi, K., et al., *The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's disease*. *Mov Disord*, 2011. **26 Suppl 3**(0 3): p. S42-80.

8 Seznam zkratek

A β	β -amyloidní peptid
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba
AD	aldehyddehydrogenáza
ALT	alanin-aminotransferáza
ANS	autonomní nervový systém
AP	amyloidní peptid
APP	prekurzor amyloidního peptidu
AR	aldehydreduktáza
ATP	adenosin-trifosfát
BHP	benigní hyperplazie prostaty
BuChE	butyrylcholinesteráza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
ChAT	cholinacetyltransferáza
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
CNS	centrální nervová soustava, centrální nervový systém
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferáza
DAG	diacylglycerol
DCM	dichlormethan
DEE	diethylether
DOPA	3,4-dihydrofenylalanin
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
DOPAL	3,4-dihydrofenylacetaldehyd
DOPEGAL	3,4-dihydrofenylglykolaldehyd
EtOAc	ethyl-acetát
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GABA-T	GABA-transamináza
GIT	gastrointestinální trakt
HEB	hematoencefalická bariéra
HMA	homovanilová kyselina

IC ₅₀	polovina maximální inhibiční koncentrace
IMAO	inhibitory monoaminoxidáz
IMAO-A	selektivní inhibitory monoaminoxidázy A
IMAO-B	selektivní inhibitory monoaminoxidázy B
IP ₃	inositol-trifosfát
LAMA	long-acting-muscarinic-antagonist
MAO	monoaminoxidáza
MTDLs	multi-targed-directed ligands
nAChR	nikotinové cholinergní receptory
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
OAB	syndrom hyperaktivního měchýře
PD	Parkinsonova choroba
PEH	β-fenylethylidenhydrazin
PGK1	fosfoglycerát kináza 1
PLZ	fenelzin
REM	rapid eye movement
RIMA	reversibilní inhibitory monoaminoxidázy
RNA	ribonukleová kyselina
R _f	retenční faktor
RT	pokožová teplota
SAMA	short-acting-muscarinic-antagonist
SI	index selektivity
SNCA	α-synuklein
SNpc	substantia nigra, pars compacta
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TCA	tricyklická antidepresiva
THF	tetrahydrofuran
TK	tlak krve
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UCDA	ursodeoxycholová kyselina
VMA	vanilylmandlová kyselina
V _{max}	mezní rychlost

9 Seznam obrázků a schémat

Obrázek 1 - struktura ACh	17
Obrázek 2 - syntéza acetylcholinu a jeho rozklad pomocí AChE	18
Obrázek 3 - popis neuromediátorů v autonomním a somatickém nervovém systému [5]	19
Obrázek 4 - struktura karbacholu	21
Obrázek 5 - struktura metacholinu	21
Obrázek 6 - struktura neostigminu (jako methylsulfát).....	22
Obrázek 7 - struktura fyzostigminu.....	22
Obrázek 8 - struktura edrofonie.....	22
Obrázek 9 - struktura organofosfátů.....	23
Obrázek 10 - struktura oximu (pralidoxim).....	23
Obrázek 11 - struktura bojových plynů.....	23
Obrázek 12 - struktura atropinu (terciální amin).....	25
Obrázek 13 – struktura biperidenu (vlevo) a benzatropinu (vpravo)	26
Obrázek 14 - struktura antagonistů muskarinových receptorů.....	26
Obrázek 15 - metabolismus dopaminu (Olguín H, 2016)	28
Obrázek 16 - degradace endogenních katecholaminů	29
Obrázek 17 - struktura neselektivních hydrazinových inhibitorů MAO	30
Obrázek 18 - struktura tranlycyprominu	31
Obrázek 19 - struktura moklobemidu.....	32
Obrázek 20 - struktura takrinu.....	34
Obrázek 21 - struktura donepezilu	35
Obrázek 22 - struktura galantaminu	35
Obrázek 23 - struktura rivastigminu.....	36
Obrázek 24 - struktura ladostigilu jakožto hybridního léčiva	37
Obrázek 25 - možnosti modifikace patogeneze PD [40].....	38
Obrázek 26 - struktura levodopy	39
Obrázek 27 - struktura agonistů dopaminu	40
Obrázek 28 - struktura IMAO-B	41
Obrázek 29 - Reakční schéma Ellmanovy reakce	61
Obrázek 30 - reakce aldehydu a hydrazinu za vzniku hydrazonu a vody	63
Obrázek 31 - struktura DM-5	64
Obrázek 32 - struktura DM-8	64

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 - inhibice AChE a BuChE s indexem selektivity	62
---	----