

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických vied

**Hodnotenie cytotoxicity novo syntetizovaných derivátov fenoxytakrinu
ako potencionálnych terapeutík Alzheimerovej choroby**

Diplomová práca

Vedúci práce: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Erika Koperová

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne (pod vedením konzultanta). Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

Podpis: _____

Pod'akovanie

Chcela by som týmto poďakovať za čas, ochotu a pomocnú ruku každému, kto mi pomohol s akýmkoľvek aspektom diplomovej práce a celého štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Erika Koperová

Školitel: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Tereza Koblíková, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Hodnotenie cytotoxicity novo syntetizovaných derivátov fenoxytakrínu ako potencionálnych terapeutík Alzheimerovej choroby.

Zvyšujúca sa prevalencia Alzheimerovej choroby a dostupnosť najmä symptomatickej liečby oproti kauzálnej terapii, vyžaduje vývoj nových liekov ovplyvňujúcich zložitú patogenézu tohto ochorenia. V poslednej dobe, prevládajúca snaha vytvoriť látky s multimodálnym účinkom a nižšou toxicitou oproti Takrínu, viedla k syntéze fenoxytakrínu a jeho derivátov. Tieto látky sa vďaka svojmu zameraniu na viac cieľov súčasne, javia ako vhodný kandidáti pre liečbu Alzheimerovej choroby.

Predmetom tejto diplomovej práce je stanovenie cytotoxicity derivátov fenoxytakrínu a zhodnotenie jej vzťahu voči štruktúre testovaných látok. Štúdium cytotoxicity je dôležitý aspekt vývoja liečiv, ktorý určuje účinok konkrétnej chemickej látky na živé bunky. Tento typ štúdie je kľúčový pre porozumenie potenciálnej toxicity nových chemických zlúčenín a získanie informácií o ich bezpečnosti pre použitie u živočíchov alebo u ľudí.

Cytotoxicita nových derivátov fenoxytakrínu je v tejto práci testovaná pomocou *in vitro* bunčného modelu s využitím CHO-K1 bunčnej línie a prevedením MTT testu. Výsledky sú reprezentované príslušnými hodnotami toxikologických indexov IC₅₀. Tieto hodnoty určujú koncentráciu, pri ktorej daná látka alebo liečivo dosahuje polovicu maximálneho inhibičného účinku na testované bunky alebo organizmy.

U väčšiny testovaných látok bola zistená značná toxicita. Avšak 9 látok z celkovo 30 testovaných, sa vyznačuje toxicitou porovnateľnou so štandardnými látkami ako 7-metoxytakrín (7-MEOTA) a Imipramin.

Potenciál najmenej toxických látok je potrebné preskúmať ďalším testovaním.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Erika Koperová

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, Ph.D.

Supervisor-consultant: RNDr. Tereza Kobrlová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Evaluation of cytotoxicity of newly synthesized phenoxytacrine derivatives as potential therapeutics of Alzheimer's dementia.

The increasing prevalence of Alzheimer's disease and the availability of mainly symptomatic treatment as opposed to causal therapy require the development of new drugs that affect the complex pathogenesis of this condition. Recently, the prevailing effort to create compounds with a multimodal effect and lower toxicity compared to Tacrine has led to the synthesis of phenoxytacrine and its derivatives. These substances, due to their targeting of multiple targets simultaneously, appear to be suitable candidates for the treatment of Alzheimer's disease.

The subject of this thesis is the determination of the cytotoxicity of phenoxytacrine derivatives and the evaluation of its relationship to the structure of the studied compounds. Cytotoxicity studies are an important aspect of drug development, determining the effect of a specific chemical compound on living cells. This type of study is crucial for understanding the potential toxicity of new chemical compounds and obtaining information about their safety for use in veterinary or human medicine.

The cytotoxicity of new phenoxytacrine derivatives was tested in this work using an *in vitro* cellular model utilizing the CHO-K1 cell line and the MTT assay. The results are represented by the corresponding IC₅₀ toxicological index values. These values determine the concentration at which a given compound or drug achieves half of the maximum inhibitory effect on the tested cells or organisms.

Significant toxicity was observed for most of the studied compounds. However, 9 out of a total of 30 studied compounds exhibited toxicity comparable to standard compounds such as 7-methoxytacrine (7-MEOTA) and Imipramine.

The potential of the least toxic compounds requires further investigation through additional testing.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Alzheimerova choroba.....	10
2.1	Genetické mutácie pri Alzheimerovej chorobe	12
2.1.1	Apolipoproteín E a jeho úloha v patológii Alzheimerovej choroby	13
2.2	Cholinergná hypotéza	14
2.3	Hypotéza amyloidnej kaskády	14
2.3.1	Enzymatické cesty spracovania amyloidového prekurzorového proteínu	16
2.4	Amyloid	18
2.4.1	Amyloid- β a jeho toxické formy	19
2.4.2	A β -podmienená patológia u Alzheimerovej choroby	23
2.5	Tau proteín.....	25
2.5.1	Štruktúra, regulácia a funkcie	25
2.5.2	Tau-podmienená patológia u Alzheimerovy choroby.....	26
2.6	Patologické mechanizmy A β a Tau	28
2.6.1	Akumulácia A β a Tau	28
2.6.2	Šírenie Tau a A β patológie.....	31
2.6.3	Interakcie medzi A β a Tau	33
2.7	Hypotéza kovových iónov	35
2.8	Oxidačný stres.....	37
2.9	Metabolizmus glukózy.....	37
2.10	Vaskulárna hypotéza.....	38
2.11	Ďalšie rizikové faktory.....	39
3	Farmakoterapia Alzheimerovej choroby/demencie	41
3.1	Modulátory neurotransmisie	41
3.1.1	Inhibítory cholinesteráz.....	42
3.1.2	Nová generácia inhibítorov cholinesteráz.....	44

3.1.3	NMDA antagonisti	47
3.2	Terapeutické stratégie zamerané na A β	48
3.2.1	Modulátory a inhibítory sekretáz	48
3.2.2	Redukcia A β -plakov zásahom do agregácie	49
3.2.3	Obmedzenie tvorby, podpora odstraňovania A β plakov	50
3.3	Terapeutické stratégie zamerané na Tau proteín	53
3.3.1	Zásah do mediátorov posttranslačných modifikácií Tau	54
3.3.2	Inhibítory Tau agregácie	55
3.3.3	Pasívna imunoterapia zameraná na Tau	55
3.4	Aktívna imunoterapia u AD.....	58
4	Metódy hodnotenia cytotoxicity/životaschopnosti buniek <i>in vitro</i>	59
4.1	Metódy založené na vylúčení farbiva	59
4.2	Kolorimetrické testy	60
4.3	Fluorimetrické testy	63
4.4	Luminometrické testy	64
4.5	Prietoková cytometria	65
5	Bunečné modely pre stanovenie cytotoxicity/životaschopnosti <i>in vitro</i>	67
5.1	Dvojmerné modely bunečných kultúr	67
5.2	Trojmerné modely bunečných kultúr.....	68
5.3	Inovatívne organotypové <i>in vitro</i> modely.....	68
6	Ciele diplomovej práce	70
7	Experimentálna časť	71
7.1	Materiál	71
7.1.1	Bunečná línia	71
7.1.2	Testované látky	71
7.1.3	Použité chemikálie	77
7.1.4	Prístroje, pomôcky a software.....	78

7.2	Metodika	79
7.2.1	Kultivácia bunečnej línie.....	79
7.2.2	Pasážovanie bunečnej línie	79
7.2.3	Počítanie buniek	79
7.2.4	Nasadenie buniek na doštičku.....	80
7.2.5	Inkubácia s roztokmi skúšaných látok	80
7.2.6	Prevedenie MTT testu	81
7.2.7	Výpočet toxikologických indexov	81
8	Výsledky	82
8.1	Toxikologické indexy IC_{50} štandardných látok	82
8.2	Toxikologické indexy IC_{50} derivátov 7-fenoxytakrínu s dihydrocyklopenta[b]chinolinovým zoskupením v štruktúre	82
8.2.1	Dávkovo-závislé krivky	83
8.3	Toxikologické indexy IC_{50} derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydroakridínovým zoskupením v štruktúre	88
8.3.1	Dávkovo-závislé krivky	89
8.4	Toxikologické indexy IC_{50} derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínových zoskupením v štruktúre	93
8.4.1	Dávkovo-závislé krivky	94
9	Diskusia	99
11	Zoznam skratiek.....	105
12	Zoznam literatúry.....	107

1 Úvod

Alzheimerova choroba (AD) má významný vplyv na spoločnosť a ekonomiku. V roku 2022 trpí touto chorobou a súvisiacimi demenciami viac ako 55 miliónov ľudí celosvetovo. S ohľadom na demografické zmeny a starnutie svetovej populácie sa predpokladá, že tento počet sa do roku 2030 zvýši na 78 miliónov a do roku 2050 dokonca na 139 miliónov, pokiaľ sa neobjavia zásadné liečebné alebo preventívne riešenia [131].

Diplomová práca je zameraná na stanovenie a zhodnotenie cytotoxicity testovaných látok, ktoré predstavujú novo syntetizované deriváty vychádzajúce zo štruktúry 7-fenoxytakrinu. Tieto látky sa javia ako duálne modulátory u AD so schopnosťou inhibície enzýmu acetylcholinesterázy (AChE) a *N*-metyl-D-aspartát receptorov (NMDARs).

Členenie vyhotovenej diplomovej práce predstavuje teoretickú, experimentálnu a výsledkovú časť.

Teoretická časť práce zahŕňa aktuálny prehľad poznatkov so snahou objasniť rozvoj a patogenézu AD. Popisuje príslušné hypotézy a patologické mechanizmy, ktoré sú s daným ochorením asociované.

Experimentálna časť je zameraná na stanovenie cytotoxicity testovaných látok s využitím bunecnej línie CHO-K1. Testované látky sú rozdelené do troch skupín: deriváty 7-fenoxytakrinu s dihydrocyklopenta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre, deriváty 7-fenoxytakrinu s tetrahydroakridínovým zoskupením a deriváty 7-fenoxytakrinu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre. Zároveň táto časť popisuje procesy manipulácie s bunecnou líniou (ako je kultivácia, pasážovanie, počítanie buniek) a testovanými látkami až po samotné stanovenie viability/cytotoxicity prevedením zvoleného MTT testu.

Výsledková časť poskytuje prehľad nameraných a vypočítaných toxikologických indexov stanovovaných látok spolu s uvedenými dávkovo-závislými krivkami. Získané údaje v tejto časti práce poskytujú základ pre vedenie diskusie a uskutočnenie záverov.

2 Alzheimerova choroba

Multifaktoriálne progresívne neurodegeneratívne ochorenie. So zastúpením 60 – 80 % všetkých prípadov, sa jedná o najčastejšiu príčinu demencie, ktorá je charakterizovaná ako klinický syndróm prejavujúci sa najmä symptómami poruchy kognitívnych funkcií a behaviorálnymi zmenami [1-4].

Priebeh ochorenia zodpovedá kontinuu, ktoré zahŕňa 3 fázy: predklinickú fázu, charakterizovanú absenciou príznakov, ale prejavujúcou skoré zmeny AD biomarkerov; prodromálnu fázu, tiež známu ako mierna kognitívna porucha (MCI) a charakterizovanú poklesom kognitívnych schopností, ktorý nemá alebo má malý vplyv na každodenné činnosti; a nakoniec demenciu, konečnú fázu ochorenia, v ktorej jednotlivci nie sú schopní fungovať nezávisle v dôsledku stredne ťažkého až vážneho kognitívneho postihnutia. Dochádza k degenerácii určitých neuronálnych populácií, najmä v oblasti kortexu a hipokampu. Prítomné sú poruchy v spánkovom cykle, výkyvy nálad, strata telesných funkcií a nakoniec smrť. Tento klinický obraz nie je špecifický len pre AD. Môže sa vyskytnúť u stavov, ktoré ovplyvňujú mediálne temporálne laloky: vaskulárne kognitívne poškodenie, primárna vekovo-podmienená tauopatia, hipokampálna vekovo-podmienená skleróza a *Argyrophilic grain disease* [14].

Z *postmortem* vyšetrení mozgu pacientov, sú hlavnými patologickými znakmi AD početné lézie tzv. amyloidných plakov, ktoré vznikajú extracelulárnou depozíciou amyloidného peptidu (A β) a neurofibrilárnych spleť (NFTs), vznikajúcich intracelulárne zo špirálovitých vlákien tzv. Tau proteínu. Ich prítomnosť bola zaznamenaná najmä v oblasti bazálneho predného mozgu, čelnom laloku, hipokampe a mozgovej kôre. Medzi kognitívnym poklesom a počtom kortikálnych plakov neexistuje striktná korelácia, z čoho sa vyvodzuje účasť ďalších možných faktorov na progresii ochorenia. Avšak *post mortem* vyšetrenia poukazujú na súvislosť medzi hustotou neokortikálnych NFTs a závažnosťou demencie u pacientov s AD [3,30]. U pacientov s AD boli taktiež z *postmortem* vyšetrení zistené vážne nedostatky niekoľkých neurotransmiterov: acetylcholín, serotonin a noradrenalin [3].

AD má silnú koreláciu s 3 génmi: amyloidný prekursorový proteín (APP), gény pre presenilín 1 (PSEN1) a presenilín 2 (PSEN2) proteíny. Zmeny v týchto génoch priamo súvisia s tvorbou plakov. Prípady AD zaznamenané v spojitosti s týmito génmi sa označujú ako autozomálne dominantná familiárna AD. Zvyčajne sa tento typ rozvinie do 60. roku veku, kdežto v niektorých prípadoch už v 30. roku veku. Z tohto dôvodu sa často

označuje ako AD so včasným nástupom tzv. *early-onset Alzheimer's disease* (EOAD) [38, 44].

EOAD je definovaná klinickým nástupom u pacientov mladších než 65 rokov. Približne 5 – 6 % všetkých pacientov s AD trpí EOAD, ktorá zahŕňa značné percento fenotypových variant líšiacich sa od bežného amnestického prejavu AD. U EOAD jej významná genetická predispozícia zahŕňa všeobecnú polygénnu náchylnosť a priamy autozomálne dominantný prenos. Prípady s autozomálne dominantnou familiárnou formou EOAD majú zvýšené riziko vzniku AD u príbuzných. Môžu disponovať atypickými klinickými príznakmi ako sú bolesti hlavy, myoklony, abnormality chôdze, záchvaty, pseudobulbárna obrna alebo hyperreflexia. Dochádza k rýchlejšej deteriorácii s potencionálne agresívnejším klinickým priebehom [13,42].

Najväčšia časť prípadov, čo predstavuje približne 95 % prípadov AD, sa prejavuje ako sporadická manifestácia medzi 60. – 65. rokom života. Označuje sa ako tzv. *late-onset Alzheimer's disease* (LOAD). Genetické pozadie tejto formy je omnoho viac nejasné. Prejavuje sa ako progresívna amnestická porucha charakterizovaná skorým výrazným deficitom epizodickej pamäte s rôznym stupňom exekutívnej, jazykovej a vizuálne-priestorovej poruchy. Pacienti vykazujú gradientné poruchy pamäte s najväčšími problémami vybaviť si nedávne udalosti, prejavujú sa relatívne nedostatky dlhodobej pamäte a zhoršené učenie ,čo sú znaky charakteristické pre dysfunkciu hipokampálneho okruhu [14].

V porovnaní s pacientmi s LOAD, je u prípadov s EOAD pravdepodobnejší výskyt traumatického poranenia mozgu ako rizikového faktoru v anamnéze, menej častá prítomnosť cerebrovaskulárnych rizikových faktorov, obehových porúch, *diabetes mellitus* a obezity. EOAD však oproti LOAD predstavuje veľký počet predčasných úmrtí osôb vo veku 40 – 64 rokov. Dôležitú odlišnosť EOAD od profilu obvyklých amnestických porúch LOAD, predstavujú u veľkej časti pacientov skôr fenotypy s jazykovými, vizuálne-priestorovými alebo exekučnými poruchami [42].

2.1 Genetické mutácie pri Alzheimerovej chorobe

AD je komplexné a multigénové ochorenie. Hodnota dedičnosti je vysoká, odhaduje sa medzi 60 % a 80 %. Geneticky sa dá kategorizovať ako sporadická AD alebo familiárna AD na základe rodinnej histórie [123].

Familiárna AD súvisí s génovými sekvenciami, ktoré kódujú PSEN1, PSEN2 a APP, ktoré zasahujú do fyziologického spracovania peptidu A β . Bolo identifikovaných viac než 300 mutácií génu PSEN1 (221 patogénnych) a 80 mutácií génu PSEN2 (19 patogénnych). Mutácie v géne PSEN1 spôsobujú najzávažnejšie formy AD s úplnou penetráciou a nástup ochorenia sa môže prejaviť už v 25. roku veku. Missense mutácie v géne PSEN2 môžu vykazovať neúplnú penetráciu a u nositeľov dochádza k neskoršiemu nástupu oproti nositeľom mutácií v géne PSEN1. Mutácie v géne APP spôsobujú zvýšenie pomeru toxických druhov A β (A β ₄₂/A β ₄₀) a zvýšenie hladín celkového Tau, ako aj fosforylovaného Tau v neurónoch. Väčšina pacientov s trizómiou 21 preukazuje skoré patologické zmeny podobné tým pri AD, avšak k rozvoju ochorenia nedochádza u všetkých. To naznačuje, že zvýšenie genetického zaťaženia génom APP, pozorovaného aj pri prípadoch familiárnej AD, nevedie ku vzniku ochorenia vo všetkých prípadoch. Hoci niekoľko stoviek rodín nesie jednu z týchto mutácií, predstavujú menej ako 1 % všetkých prípadov [122,124].

Hlavným génom, ktorého spojenie so sporadickou AD je veľmi dobre zdokumentované, predstavuje apolipoprotein (ApoE), ktorý zvyšuje riziko vzniku AD. Avšak viac ako 60 % všetkých sporadických prípadov nie je spojených s ApoE, čo naznačuje, že ďalšie genetické a environmentálne faktory môžu prispievať k určeniu tohto ochorenia [122,124].

DNA metylácia, ako jedna z epigenetických úprav, reguluje gény v rôznych ochoreniach a procesoch. Štúdia na Mexicko-Amerických jedincoch s MCI odhalila zmeny metylácie spojené s neurónovou smrťou, metabolickými poruchami a zápalovými procesmi. Metylácia sa dedí medzigeneračne a je ovplyvnená prostredím, čo môže vysvetliť spojenie genetiky a prostredia s ochorením. V rámci *Genome-wide association study* boli objavené gény (ABCA7, BIN1, SORL1, SLC24A4), ktorých metylácia je spojená so spracovaním Tau a A β peptidu.

Prospešné účinky pri AD majú inhibítory histónovej acetyltransferázy a deacetylázy: zlepšujú pamäťové gény, bránia kognitívnemu úpadku, obmedzujú ukladanie A β a predchádzajú tvorbe NFTs. Identifikácia polymorfizmov spojených s prostredím môže podporiť diagnostiku a vývoj terapeutických stratégií [122].

2.1.1 Apolipoproteín E a jeho úloha v patológii Alzheimerovej choroby

ApoE reguluje lipidový metabolizmus, cholesterol, bunecnú signalizáciu a obnovu. Ďalšie procesy, ktoré sú sprostredkované ApoE zahŕňajú formovanie synapsí, moduláciu rastu neurónov, synaptickú plasticitu, destabilizáciu mikrotubulov a odstraňovanie A β . ApoE metabolizmus cholesterolu sprostredkováva v závislosti na type jeho izoformy. Je spojený s hyperlipidémiou a hypercholesterolémiou, čo vedie k následným kardiovaskulárnym ochoreniam. V mozgu je produkovaný hlavne astrocytmi a transportuje cholesterol do neurónov cez ApoE receptory patriace do rodiny receptorov pre lipoproteíny s nízkou hustotou (LDLR) [33,34].

Ľudský ApoE gén disponuje tromi hlavnými alelami, ktoré produkujú apolipoproteín E: ϵ 2 (ApoE2), ϵ 3 (ApoE3), ϵ 4 (ApoE4). ApoE sa skladá z 299 aminokyselín, ktorých rôzne zloženie v polohách 112 a 158 ovplyvňuje štruktúru jeho izoform a ich schopnosť viazať lipidy, receptory a A β . Isoformy ApoE sa odlišujú prítomnosťou cysteínu (Cys) alebo arginínu (Arg): ApoE2 (Cys112, Cys158), ApoE3 (Cys112,Arg158), ApoE4 (Arg112, Arg158). ApoE ϵ 4 alela poskytujúca ApoE4 sa pokladá za najsilnejší genetický rizikový faktor pre AD. Jedna kópia alely ϵ 4 zvyšuje riziko vzniku AD o dva až šesťkrát (urýchľuje nástup AD o 2 – 5 rokov), prítomnosť oboch kópií zvyšuje riziko až 7,2 až 21,8-krát (skracaie nástup o 5 – 10 rokov) [33,34,123].

Podľa pitevných zistení, že ApoE je obsiahnuté v A β plakoch, bola podporená myšlienka jeho interakcie s A β , podpora A β agregácie a jeho ukladania do nerozpustných fibrilárných depozít. V myších modeloch mozgovej β -amyloidózy, bolo preukázané, že genetická delécia a haploinsuficiencia ApoE, znižuje záťaž denzných jadier A β plakov [35]. ApoE sa kompetitívne viaže na receptory A β na povrchu astrocytov, čím blokuje vstrebávanie A β , ovplyvňuje jeho odstraňovanie a podporuje počiatkové ukladanie vláknitých A β depozitov. Narastajúce dôkazy naznačujú, že ApoE taktiež ovplyvňuje Tau-mediovanú neurodegeneráciu a mikrogliálnu odpoveď u AD. Porucha regulácie lipidov koreluje so zvýšenou produkciou A β v mozgu. A β následne môže ovplyvniť ApoE tým, že moduluje jeho internalizáciu. V prítomnosti A β sa ApoE3 a ApoE4 viažu na LDLR, čo spôsobuje ich konformačné zmeny a následnú intenzívnu internalizáciu. Tento proces vedie k zvýšenej afinitnej väzbe na hipokampálne neuróny a celkovému zvýšeniu zachytávania A β vo vnútri neurónov, najmä prostredníctvom ApoE4. Zvýšená internalizácia a intenzifikovaná interakcia domén ApoE4 s LDLR môže ovplyvniť procesy spojené s APP, čím prispieva k zvýšenej tvorbe A β [34,122].

2.2 Cholinergná hypotéza

Ako prvá navrhnutá teória bola založená na frekventných pozorovaniach straty cholinergnej aktivity v mozgu pacientov s AD a experimentálne štúdie na ľuďoch a primátoch, podporili rolu acetylcholínu v učení a pamäti. V štúdiu z roku 1978 bola prevedená u ľudí a primátov blokácia centrálnej cholinergnej aktivity administráciou nízkych dávok skopolamínu. Mladí jedinci vykazovali podobné deficity pamäte ako pozorovaný starší účastníci. Vyvolané poruchy sa pokúsili zvrátiť použitím inhibítora acetylcholinesterázy (AChEi) fysostigmínu a systémového stimulantia metylfenidátu. Fysostigmín podstatne znížil skopolamínom indukovanú amnéziu oproti metylfenidátu, čím štúdia poskytla dôkazy pre priame zapojenie cholinergného systému u AD [29,32].

Degenerácia cholinergných vlákien a neurónov, redukcia cholinergných receptorov, zníženie aktivity cholinacetyltransferázy a syntézy acetylcholínu sa považuje za jednu z hlavných charakteristík AD ako aj za skorý patologický jav, ktorý koreluje so stupňom kognitívneho postihnutia u pacientov [31,70].

Pôvodne navrhnutá teória od Bartusa a kol. z roku 1982, ktorý videli cholinergnú depléciu ako príčinu AD samu osebe, sa začína prehodnocovať a cholinergná deplécia sa považuje za výsledok hromadenia A β , čím spúšťa nepriaznivý spätno-väzbový cyklus vedúci k pozorovanému kognitívnemu postihnutiu [29].

2.3 Hypotéza amyloidnej kaskády

Dôkazy podporujúce túto hypotézu sú založené na objave genetických mutácií v APP, PSEN1 a PSEN2 v komplexe γ -sekretázy s nasledujúcimi prípadmi:

Jedinci s Downovým syndrómom (DS) disponujú tromi kópiami génu APP následkom trizómie na chromozóme 21. Typicky sa u nich vyvíja neuropatológia AD do 40. až 50. roku života. U zriedkavých prípadov jedincov s duplikáciou tohoto génu dôjde k vývoju AD, bez prítomnosti DS. Zatiaľ čo u translokačného DS, kde získaná tretia kópia chromozómu 21 neobsahuje APP gén, nevedie k rozvoju AD. Z týchto zistení vyplýva, že nadmerná expresia APP vedie k AD pravdepodobne zvýšenou produkciou A β .

V Islandskej populácii missense mutácia v APP géne, ktorou dôjde k substitúcii alanínu za threonín v polohe 673 (A673T), vedie k redukcii produkcie A β a až k štvornásobne nižšiemu riziku AD [38,39].

Neuróny odvodené od ľudských kmeňových buniek získaných kultiváciou z biopsie kože pacientov s AD vykazovali akumuláciu A β nasledovanú zvýšením hladín

hyperfosforylovaného Tau proteínu. Kultúry, ktoré však boli ošetrované špecifickými A β protilátkami na odstránenie A β peptidov, zostali chránené proti nárastu hladín hyperfosforylovaného Tau. V kultivovaných neurónoch dokážu A β oligoméry, izolované z kôry AD pacientov, priamo vyvolať hyperfosforyláciu Tau typickú pre AD a neuritickú dystrofiu. Samotné mutácie Tau nevedú k amyloidnej patológii alebo demencii asociovej s AD [38].

Amyloidný prekurzorový proteín je vysoko konzervovaný transmembránový proteín typu 1. Skladá sa z veľkej extracelulárnej tzv. *single-pass* domény a krátkeho cytoplazmatického chvostu. Patrí do rodiny proteínov, ktorá zahŕňa jeho homológy, *APP-like protein 1* a *2*. Expresia APP a *APP-like protein 2* je v tele všadeprítomná, ale vyššie hladiny boli zaznamenané v nervovom systéme a na neuromuskulárnych spojeniach. Zatiaľ čo *APP-like protein 1* sa špecificky vyskytuje len v nervovom systéme. APP proteín je kódovaný jediným génom lokalizovaným na chromozóme 21. Následne štiepenie proteínu udáva vznik troch izoform s rôznou dĺžkou aminokyselinových reťazcov: APP695 (dominantná v mozgu), APP751, APP770.

Proteíny tejto rodiny majú pravdepodobne spoločné funkcie, ktoré sa navzájom prekrývajú a vyradením, tzv. *knockout* jedného z nich nedochádza k významnej zmene fenotypu. Avšak dvojité alebo trojité vyradenie APP a *APP-like protein*, bolo pozorované ako letálne pri narodení u myších modeloch, pravdepodobne z dôvodu závažných defektov v neuromuskulárnych synapsách. APP proteíny sú dôležité k základným fyziologickým funkciám v rôznych štádiách vývoja neurónov [38]. APP je exprimovaný zväčša v neurónoch, astrocytoch a vaskulárnych endotelových bunkách [5]. Plní úlohu receptora na bunkovom povrchu. Vykonáva tak fyziologické funkcie na povrchu neurónov, ktoré sú relevantné pre rast neuritov, adhéziu neurónov a axonogenézu. Interakcia medzi APP molekulami na susedných bunkách podporuje synaptogenézu. Pôsobí ako membránový receptor kinezínu I, čím zohráva rolu v axonálnom anterográdnom transporte nákladu smerom k synapsám. Ovplyvňuje dráhu zahŕňajúcu mitogénom-aktivované proteín kinázy (MAPKs), čo vyúsťuje v internalizáciu A β peptidu a mitochondriálnu dysfunkciu preukázanú v kultúrach kortikálnych neurónov. Proteínovými interakciami sa zúčastňuje na bunčnej mobilite a regulácii transkripcie. Môže podporovať aktiváciu transkripcie väzbou na komplex *amyloid- β precursor*

binding protein 1 s histone lysine-acetyltransferase 5, a inhibovať NOTCH¹ signalizáciu prostredníctvom NUMB² [15].

K zvýšenej expresii APP dochádza za fyziologických podmienok pri dozrievaní a diferenciacii neurónov. Taktiež pri patologických stavoch ako je AD, DS a traumatické poranenia mozgu. APP podlieha enzymatickému štiepeniu viacerými cestami, ktoré podľa podmienok spracovania poskytujú rôzne produkty a APP deriváty [5,6]

2.3.1 Enzymatické cesty spracovania amyloidového prekurzorového proteínu

Non-amyloidogénna cesta. APP je štiepený α -sekretázou (ADAM10) v rámci A β domény, čím nedochádza k produkcii A β peptidu, ale k podpore uvoľnenia rozpustného APP α proteínu a C-terminálneho fragmentu (CTF- α). Tento fragment štiepi γ -sekretáza za uvoľnenia netoxického peptidu zloženého z A β ₁₇₋₄₀/A β ₁₇₋₄₂ a APP-intracelulárnej domény (AICD). Ide o hlavnú enzymatickú cestu [7].

ADAM9, ADAM10 a ADAM17 sú považované za hlavných kandidátov alfa-sekretáz v nervových bunkách. Podľa dôkazov sa však ADAM10 javí ako jedinou konštitutívnou aj regulovateľnou α -sekretázou. V mozgu dospelého človeka je ADAM10 exprimovaný v astrocytoch, mikroglíach a neurónoch. Hladiny ADAM10 sú znížené v krvných doštičkách sporadických prípadov AD. Táto dráha teda nevedie k tvorbe A β a považuje sa za ochrannú voči vývoju AD [38,45,58].

V ranných štádiách vývoja centrálného nervového systému (CNS) je rozpustný APP α proteín zainteresovaný v regulácii proliferácie neuronálnych kmeňových buniek. V zrelom mozgu má neurotrofické, neuroprotektívne vlastnosti a účastní sa na formovaní pamäti. Má potenciál ako nootropikum proti starnutiu súvisiacemu s kognitívnym úpadkom. Bolo napríklad preukázané, že rozpustný APP α proteín narušuje toxické diméry A β [38,66,94].

Amyloidogénna cesta. β -sekretáza (BACE1) štiepi APP na N-konci v rámci extracelulárnej β -domény, za odlúčenia rozpustného APP β proteínu. C-terminálny fragment (CTF- β) následne štiepi γ -sekretáza a uvoľní AICD s neporušeným A β peptidom. γ -sekretáza štiepi CTF- β na viacerých miestach, čím vznikajú A β peptidy rôznej dĺžky (A β ₃₇₋₄₉). Najprv sa uvoľnia fragmenty o dĺžke 48 alebo 49 aminokyselín

¹ Notch dráha je vysoko konzervovaný bunecný signalizačný systém. Reguluje bunecnú proliferáciu, diferenciaciu a bunecnú smrť vo všetkých živočíchoch. Notch samotný je receptor na bunecnom povrchu, ktorý interakciou s transmembránovými ligandmi transdukuje signály krátkeho dosahu [17].

² Numb proteín alebo jemu podobné proteíny (*Numb-like proteins*) viažu membránový APP a jeho intracelulárnu doménu. Regulujú transport a spracovanie APP. Inhibujú funkciu Notch signalizácie [18].

(A β ₄₈, A β ₄₉). Následne podliehajú ďalším tripeptidovým štiepeniam za vzniku dvoch hlavných druhov A β , ktorými sú A β ₄₀ a A β ₄₂. Profil vzniknutých amyloidov je pravdepodobne závislý na rôznorodosti izoforiem γ -sekretázového komplexu a topologickej orientácii CTF- β [7].

BACE1 dokáže štiepiť APP na sekundárnom mieste β' . Toto štiepenie je však menej efektívne. Vytvára sa ním C-terminálny fragment. Po štiepení γ -sekretázou sa uvoľní peptid A β ₁₁₋₄₀.

Alternatívna selekcia APP sekundárneho miesta sa pravdepodobne vyskytuje prevažne u ochrannej Islandskej mutácie A673T. Zatiaľ, čo iné zaznamenané mutácie ako A673V a Švédska mutácia, vykazujú zvýšené amyloidogénne β -štiepenie [38].

Pomer A β ₄₂/A β ₄₀ je validovaným bio markerom pre Alzheimerovu chorobu. Percento degradácie APP cez amyloidogénnu alebo neamyloidogénnu dráhu zostáva variabilné a závisí od stavu pacienta. Za fyziologických podmienok môže byť APP spracovaná cez amyloidogénnu dráhu a vedie k prevládajúcej produkcii (90%) A β ₄₀, čo je viac rozpustná forma A β , ktorá preukázala ochranné účinky. V prípade Alzheimerovej choroby prevláda produkcia A β ₄₂, pričom táto izoforma je náchylnejšia k samovoľnej agregácii a tvorbe amyloidných plakov [66].

η -Sekretázová cesta. Alternatívna enzymatická cesta za fyziologických podmienok. U AD a DS môže byť ovplyvnená. V tomto prípade je APP štiepený η -sekretázou v extracelulárnej doméne, čím sa uvoľní rozpustná APP ektodoména. Terminálny fragment (CTF- η) podlieha ďalšiemu spracovaniu ako substrát β -sekretázy. Do extracelulárneho priestoru sa uvoľní peptid A η - α / A η - β za ponechania fragmentov CTF- α /CTF- β v bunecnej membráne. Funkcie týchto produktov nie sú známe, avšak experimentálne bolo zistené, že za fyziologických podmienok môže A η - α peptid inhibovať neuronálnu aktivitu hippokampu u myší. Fragment CTF- η taktiež podlieha štiepeniu prostredníctvom γ -sekretázy, čím podporuje vznik A β ₄₀ peptidu [6,28].

2.4 Amyloid

Rudolph Virchow na preskúmanie cerebrálnych *corpora amylacea*, ktoré mali abnormálny makroskopický vzhľad, využíval jód ako farbiace činidlo. Keď zistil, že jódom ošetrené štruktúry vykazujú svetlo-modré sfarbenie a po prídavku kyseliny sírovej prechádza na fialové, došiel k záveru, že ide o celulózu/škrob. Nazval preto pozorovanú látku ako amyloid z názvu pre škrob z lat. "*amylum*" a Gréckeho "*amylon*". Neskôr prevedené štúdie Friedrichom a Kekuléem preukázali prítomnosť proteínu, podporenú výraznou absenciou sacharidov a vysokým obsahom dusíku. Čo viedlo k výskumu amyloidu ako proteínu a následne ako triedy proteínov s tendenciou podstúpiť konformačné zmeny, ktoré vedú ku vzniku fibríl. Dnes je amyloid patologický termín pre prevažne extracelulárne tkanivové depozity proteínových fibríl, ktoré sa použitím červene Kongo farbja oranžovo-červene, a prejavujú sa zelenou polarizáciou pod polarizačným mikroskopom [57,58,65].

Amyloid je popisovaný ako nerozvetvené bielkovinové vlákno s opakujúcou sa subštruktúrou, ktorá pozostáva z β^3 -reťazcov. Tieto reťazce prebiehajú kolmo k osi hlavného vlákna a vytvárajú tzv. priečny β -list (*z angl. cross- β sheet*) s neurčitou dĺžkou. Amyloid sa skladá z usporiadanej zostavy mnohých (zvyčajne až tisíc) kópií peptidov alebo proteínov o dĺžke 6 – 12 nm [41].

Viac ako 50 ľudských ochorení je charakterizovaných depozitmi fibrilárnych proteínových agregátov. Zahŕňajú neurodegeneratívne ochorenia ako AD, Parkinsonova a Huntingtonova choroba. Amyloid môže vzniknúť z viac než 30 rôznych proteínov v rôznych častiach tela. Proteínové agregáty sa tvoria aj v iných orgánoch než v mozgu, napr. u systémovej amyloidózy a *diabetes mellitus* typu II. Rôzne proteíny, ktoré agregujú u týchto ochorení sú vo všeobecnosti nepríbuzné, čo sa týka sekvencie alebo prirodzenej štruktúry. Ich spoločným znakom je zostavovanie fibrilárnej štruktúry s β -konformáciou.

A β bol identifikovaný ako hlavná zložka amyloidu biochemickou analýzou cerebrálnej amyloidnej angiopatie (CAA) a amyloidných plakov [55,58,65].

³ Termíny označované s využitím písmena β gréckej abecedy (β -reťazce, β -list, A β a iné) odkazujú na sekundárnu štruktúru bielkovín: β -konformáciu. V bielkovinách sekundárna štruktúra predstavuje miestne priestorové usporiadanie polypeptidového reťazca. β -konformácia je jedným z dvoch bežných typov sekundárnych štruktúr v bielkovín, pričom druhým je α -hélix.

2.4.1 Amyloid- β a jeho toxické formy

A β termín sa výhradne odkazuje na proteín schopný samovoľnej/spontánnej agregácie do charakteristických fibríl tvoriaci špecifický typ amyloidu. Prítomnosť A β v mozgu zdravých jedincov, vzbudila otázky ohľadom jeho fyziologických funkcií za normálnych podmienok [65,66].

Monoméry. Na základe prítomnosti A β peptidu počas embryogenézy, sa predpokladá, že hrá úlohu pri normálnom vývoji mozgu. Za fyziologických podmienok sa monoméry A β podieľajú na intracelulárnej signalizácii, synaptických funkciách a neurónových cytoprotektívnych dráhach. To naznačuje, že v nízkych koncentráciách a vo forme monomérov nejde vždy o toxický produkt. U AD sú hlavnými reprezentatívnymi variantami A β_{40} a A β_{42} [8,46,49].

A β monomér patrí medzi vnútorne neusporiadané proteíny. Tieto proteíny nemajú štruktúru počas úplnej solvatácie, ale za určitých podmienok môžu podstúpiť konformačné zmeny k usporiadaným stavom. Je metastabilný vo vodných roztokoch a stabilitu získava vytvorením sekundárnej štruktúry v prostredí podobnom membráne. A β_{40} a A β_{42} majú rôznorodé sady sekundárnych štruktúr, líšia sa typom β -*hairpins* a β -*strands*, ktoré vytvárajú. V monoméroch boli tiež identifikované oblasti, ktoré by mohli zohrávať rolu v dynamike agregácie: centrálna hydrofóbna jadro zložené zo 17 – 20 aminokyselín a oblasť β -otočky zložená z 23 – 28 aminokyselín. Oblasť β -otočky je schopná vytvoriť iónový most, u ktorého bolo pozorované urýchlenie procesu agregácie [49,59].

Napriek tomu, že sa A β_{40} a A β_{42} odlišujú v dĺžke len o dve aminokyseliny, ich agregáčnne tendencie sú výrazne rozdielne. A β_{40} je v mozgovo-miechovom moku (CSF) prítomný v pomere 10:1 oproti A β_{42} . V amyloidných plakoch/plátoch je pomer A β_{40} a A β_{42} 1:3, čo zodpovedá experimentálnym výsledkom pozorovania rýchlosti rastu jadra A β_{42} , ktorá je omnoho vyššia. Rýchlosť agregácie A β_{42} koreluje s obsahom β -reťazcov nájdených v jeho monomérovej forme [6,9,49,56,58,59]. Ich odlišné chovanie je zrejmé už na začiatku agregácie, behom tvorby malých oligomérov. A β_{40} tvorí tetraméry ako terminálne oligoméry, zatiaľ čo A β_{42} tvorí dodekaméry ako koncový oligomér [51,56].

A β monomér sa skladá do konformácie vlákno-slučka-vlákno, ktoré je stabilizované intramolekulárnymi interakciami β -reťazca. Takto zložená konformácia uľahčuje vytváranie predĺžených β -listov, ktoré tvoria zrelé amyloidné fibrily [56].

Dlhší A β ₄₂ je náchylnejší k agregácii a prevláda v parenchýmových plakoch. Kratší A β ₄₀ je sekretovaný bunkami v vyšších množstvách a je hlavnou izoformou A β ukladanou v mozgových cievach, čo je známe ako CAA [49,67].

Rozpustné oligoméry (A β O_s). Druh A β , ktorý prechádza štruktúrnou transformáciou aspoň do tvorby dimérov alebo multimérov, čím sa mení jeho trojrozmerná štruktúra na rozpustné druhy A β . Sú vnímané ako medziprodukty na ceste k tvorbe patogénnych amyloidných plakov. Postupom času dochádza k formulácii tzv. A β O hypotézy, v ktorej sú považované za najtoxickjšiu a najpatogénnejšiu formu A β . Predpokladá sa, že práve rozpustné oligoméry sú zodpovedné za indukciu synaptickej dysfunkcie, narušenie neuronálnych spojení až nakoniec neurónovú smrť. Hladiny/úrovne rozpustných A β O v ľudskom mozgu, či v zvieracích modeloch, lepšie korelujú so závažnosťou ochorenia než amyloidné plaky. K ich hromadeniu dochádza pred vznikom plakov, čo je potvrdené imunochemicky aj imunohistochemicky [9,49, 60, 61].

Formovanie A β O začína zmenami v konformácii monomérneho A β , čo vedie k vzniku dimérov a trimérov s nízkou molekulovou hmotnosťou (LMW). Následne dochádza k agregácii a vznikajú rozpustné sférické oligoméry pozostávajúce z 12 až 24 monomérov. LMW sa predlžujú na oligoméry s vysokou molekulovou hmotnosťou (HMW) s krivočiarymi reťazcami alebo fibrilárnymi predformami (PFs), z ktorých sa nakoniec stávajú nerozpustné fibrily [60].

Rozpustné A β oligoméry derivované z ľudských mozgov majú distribúcie molekulových hmotností zodpovedajúce zmesi dimérov až dodekamérov. Z oligomérnych foriem sa na vytváraní fibríl zúčastňujú A β diméry, zatiaľ čo triméry alebo globuloméry A β sa zhromažďujú ako stabilné nefibrilárne oligoméry. Štúdie hmotnostnej spektrometrie ukázali, že bioaktívne druhy A β s hmotnosťou 7 kDa, sa skladajú z heterogénnej zmesi kovalentne prepojených dimérov rôznych fragmentov A β , ktoré by mohli predstavovať najmenšie synaptotoxické štruktúry. Rôzne druhy A β , vrátane A β O_s, môžu inhibovať *long-term potentiation*⁴, potencovať *long-term depression*⁵ a viesť k stratám synapsí, čo sa prejavuje znížením hustoty dendritických výbežkov [46,62].

⁴ Ide o proces, pri ktorom sa opakovane stimulovaná synapsa stáva citlivejšou na vzruchy a zvyšuje svoju efektivitu v prenose signálov.

⁵ Proces, pri ktorom sa opakovane stimulovaná synapsa stáva menej efektívnou v prenose signálov [158].

Podľa niektorých zdrojov je štruktúra β -listu prítomná v amyloidných oligoméroch preferovanou štruktúrnou zložkou, avšak nie je dôležitým predpokladom toxicity. Štruktúrne determinanty, ktorými tieto oligoméry spôsobujú poškodenie buniek, môžu súvisieť s expozíciou hydrofóbných skupín, s malou veľkosťou oligomérov a s vysokým difúznym koeficientom, ich vnútorne nesprávne zloženou povahou a sklону k agregácii. Takéto štruktúrne vlastnosti majú schopnosť sa zapájať do množstva abnormálnych interakcií s celou radou bunkových zložiek, ako sú fosfolipidové dvojvrstvy, rozpustné peptidy a proteíny, proteínové receptory, RNA a bunkové metabolity, kde niektoré alebo všetky majú potenciál spôsobiť poškodenie buniek a v konečnom dôsledku ich smrť. V skutočnosti je známe, že viaceré amyloidné neurodegeneratívne ochorenia sa vyznačujú dôležitou zápalovou zložkou, ktorá môže byť výsledkom prirodzenej reakcie proti "neznámym" molekulárnym druhom, ktoré sa tvoria počas amyloidogénnej kaskády alebo proti vedľajším produktom ich pôsobenia [50].

A β O, ktoré sú najlepšie rozpustné vo vode, účinne spôsobujú narušenie štruktúry neurónov (integritu neuritov), tak funkcie (synaptická plasticita), čo naznačuje, že len malá časť toxických A β oligomérov vykazuje biologickú aktivitu. Bolo identifikovaných niekoľko hlavných typov A β O, ktoré vykazujú neurotoxickú aktivitu: diméry, A β *56, amylosféroidy, A β -derivované difúzne agregáty [46,62].

Protofibrily (PFs). Sú definované ako nodulárne štruktúry s hmotnosťou viac ako 100 kDa, s priemerom okolo 5 nm a dĺžkou 200 nm. V sekundárnej štruktúre sú hlavne zložené z β -listov a čiastočne z náhodných α -helixov. Biologické štúdie preukázali, že PFs vykazujú ako toxické, tak zápalové účinky. PFs sú podmnožinou rozpustných oligomérov, sú považované za medzistupeň v agregáčnej dráhe k zrelým A β fibrilám. Tvorba fibríl z PFs je náročnejšia než z nízko-molekulárných A β . Zrelé fibrily A β ₁₋₄₂ sa vytvárajú hlavne z nízko-molekulárných A β ₁₋₄₂ [63,64].

Dôležitým modelom pre štúdium PFs je Arktická APP mutácia (APP E693G), ktorá spôsobuje rozvoj EOAD a špecificky zvyšuje rýchlosť tvorby tohto druhu A β (46). Model nesúci mutáciu Švédsku, ako aj Arktickú (transgénne myši ArcSwea) vykazoval zvýšenú úroveň tvorby protofibril, U tohto modelu bolo preukázané, že dochádza ku kognitívnym deficitom bez hromadenia plakov a súčasne bola detegovaná raná a rozsiahla tvorba intraneurálnych A β -imunoreaktívnych škvŕn. Je hypotetizované, že tieto intraneuronálne peptidy zodpovedajú intracelulárnym ne-fibrilárnym agregátom A β (PFs, vzhľadom k prítomnosti mutácie Arctic). Intraneuronálne peptidy sa objavili skôr než nahromadenie plakov v parenchýme [46].

PFs narušujú integritu membrán tým, že indukujú tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a lipidovej peroxidácie, čo má za následok zníženú fluiditu membrán, poruchu intracelulárneho vápnika, depolarizáciu a narušenie *long-term potentiation*. PFs A β ₁₋₄₂ taktiež výrazne znížili fluiditu neurónových membrán v porovnaní s LMW-A β ₁₋₄₂. Preto sa predpokladá, že účinky na fluiditu membrán a následné poškodenie neurónov závisia od špecifickej konformácie A β [63].

Fibrily a plaký. Fibrily sú polymorfne s molekulárnymi štruktúrami, ktoré závisia na podmienkach agregácie. Štruktúrne odlišné fibrily môžu mať rôznu úroveň rozpustnosti, rýchlosti akumulácie a toxicity v kultúrach neuronálnych buniek. Spolu s plakmi sú spojované so synaptickou dysfunkciou v AD zvieracích modeloch a pacientoch. A β fibrily sú tiež pozorované v blízkosti porušených neuritov, v oblastiach so zníženou hustotou neurónových synaptických výbežkov a v oblastiach neuronálneho úbytku. Modely na primátoch s AD preukázali, že mikroinjekcie fibrilárných agregátov do mozgovej kôry, spôsobili neurodegeneráciu, neurofibrilárnu patológiu a neuroinflamáciu. Povrch A β fibril taktiež môže katalyzovať formovanie A β oligomérov, pričom bolo pozorované, že A β oligoméry obklopujú fibrily [46].

Plaky A β sa môžu všeobecne kategorizovať na samotné amyloidové plaký (s hustými, kongofilnými jadrami) a škálu voľnejšie organizovaných usadenín s rôznymi veľkosťami, tvarmi, hustotami a umiestnením [65]. Bolo popísaných niekoľko rôznych typov na základe ich prepojenia s klinickými príznakmi. Prvý krok kategorizácie A β plakov je založený na obsahu fibrilov. Fibrilárny typ je lepšie asociovaný s klinickou demenciou ako nefibrilárny. Fibrilárne plaký môžu mať veľkosť od 30 do 100 μ m a obsahujú A β vo forme β -skladaného listu ako sekundárnu konformáciu. Nefibrilárne tzv. difúzne plaký môžu dosahovať veľkosti od 10 až > 100 μ m a ich morfológia je veľmi variabilná. Difúzne plaký sú často prítomné u prípadov bez kognitívneho postihnutia.

Ďalším krokom kategorizácie je prítomnosť neuritického komponentu. Plak sa považuje za neuritický, ak obsahuje degenerujúce axóny a dendrity (tzv. dystrofické neurity). Čím viac neuritických plakov je prítomných v neokortexe mozgu, tým vážnejšie sú klinické príznaky choroby.

Okrem bežných sú popísané aj vzácne typy plakov ako napr. bavlnové plaký. Hoci sú popísané len u niekoľkých sporadických prípadov (konkrétne mutácie v géne PSEN1), sú klinicky relevantné. V prípade cievnych depozitov A β , sa CAA kategorizuje ako CAA-typ I: zahŕňa kortikálne kapiláry, leptomeningeálne a koritkálne artérie a arterioly. CAA-typ II nezahŕňa kortikálne kapiláry [67].

Experimentálne štúdie naznačujú, že A β plaky obsahujú objemný počet oligomérov a niektoré uvoľňujú toxické oligoméry do okolitého parenchýmu [65].

2.4.2 A β -podmienená patológia u Alzheimerovej choroby

Hypotéza chronickej neuroinflamácie. Považuje sa za kľúčovú patogénnu udalosť pri AD etiológii. Predpokladom pre zápalovú odpoveď je aktivácia mikroglií A β plakmi. Javí sa ako spúšťač exacerbácie A β záťaže a hyperfosforylácie Tau proteínu. A β dokážu interagovať s receptormi PRR (z angl. *pattern recognition receptors*) mikroglií a astrocytov, ktoré iniciujú vrodenu imunitu. Akumulácia A β v mozgu narušuje mikroprostredie, vyvoláva trvalé zmeny a môže viesť k tzv. primingu mikroglií. Priming mikroglií je po ich aktivácii ďalším porušením prostredia, ktoré indukuje prehnajú a zvýšenú mikrogliálnu odpoveď v porovnaní s aktiváciou. Tieto mikroglie sú citlivejšie na menšie podnety [12,46,48].

Výsledkom je zmena ich proliferácie, morfológie, fyziológie a biochemických marker. Dlhodobá aktivácia imunitnej odpovede vyústila v akumuláciu A β a trvalú prozápalovú cytokínovú signalizáciu, čím začala deštrukcia neurónov. U perzistentne aktivovaných mikroglií sa zníži efektivita a schopnosť štiepiť A β plaky, kým ich kapacita produkovať prozápalové cytokíny zostáva zachovaná. Postupne sú na miesta A β plakov rekrutované ďalšie mikroglie a periférne makrofágy, čo ešte viac podnieti prebiehajúci zápal [12,48].

Ukázalo sa, že astrocyty pohlcujú veľké množstvá nahromadených, nerozložených PFs A β_{1-42} . Toto intracelulárne ukládanie A β_{1-42} vedie k vážnym defektom astrocytických endolysozomálnych štruktúr a rozvoju zápalového procesu aktiváciou mikroglií. PFs A β_{1-42} majú viacnásobný vplyv na reguláciu prozápalového cytokínu interleukín-1 beta, ktorý sa podieľa na udržiavaní imunitných reakcií a prispieva k závažnosti rôznych ochorení CNS, od roztrúsenej sklerózy a neurodegeneratívnych ochorení, traumatických poranení mozgu až po diabetickú retinopatiu [63,144].

Mitochondriálna toxicita a ovplyvnenie Ca²⁺ homeostázy. A β sa akumuluje v lysozómoch a endozómoch intraneuronálne, kde narúša proteínovú degradáciu. Včasne v procese ochorenia dochádza v postihnutých neurónoch AD k porušeniu energetickej rovnováhy, zníženiu mitochondriálneho membránového potenciálu, redukcii enzýmovej aktivity mitochondrií, produkcii ROS a vápnikovej dysregulácii. Oxidačný stres, ktorý sa vyskytuje v prítomnosti fyziologickej nerovnováhy medzi produkciou ROS a kapacitou antioxidantov, je kritickým patogénnym mechanizmom pri progresii AD [7,63,66].

Extracelulárne oligoméry, najmä typu A β ₄₂, zvyšujú vstup Ca²⁺ do neurónov. AICD sa taktiež pravdepodobne podieľa na zvýšených hladinách Ca²⁺ a ovplyvnenej senzitivite iónových kanálov. Reakciou na vysoké hladiny Ca²⁺ môže dôjsť k porušeniu mitochondriálnej membrány, čo vedie k úniku dôležitých mitochondriálnych komponentov (Cytochróm C, cyklofilín D), s následnou aktiváciou apoptózy a vo výsledku k redukcii synapsí. Rovnaký proces nastáva pri A β interakcií s komponentmi mitochondrií za vzniku mitochondriálneho póru [7].

Interakcie s proteínmi a regulačnými dráhami. Peptid A β má schopnosť viazať širokú škálu proteínov, a tak zasahovať do ich expresie a funkcie. Amyloid- β alkohol dehydrogenáza (ABAD) je jedným z protektívnych enzýmov. Avšak v prítomnosti A β je schopný spustiť/uľahčiť apoptózu. Naviazanie A β peptidu na ABAD inhibuje jeho aktivitu voči všetkým jeho substrátom. Iniciálna molekula A β by pravdepodobne aktivitu ABAD neovplyvnila, zatiaľ čo formácia A β oligomérov narúša samotný enzým a mení jeho funkciu [7,10].

Podľa testov na hipokampálnych bunčných kultúrach, A β peptid inhibíciou zasahuje do dráhy *cAMP response element binding protein*, ktorá je dôležitá pre formovanie pamäte. Znižuje tým zároveň prostredníctvom expresiu neurotrofického mozgového faktoru, čím pravdepodobne prispieva k strate synapsí a k dysfunkcii pamäte [7,11].

Akumulácia toxických účinkov A β peptidu v rámci dlhého časového obdobia môže nakoniec spôsobiť dostatočné neuronálne poškodenie konzistentné so symptómami AD. Dôkazom toxického mikroprostredia patologicky agregovaného A β je vysoká úroveň poškodenia pozorovaná v jeho okolí [7,66].

2.5 Tau proteín

Tau je prirodzene nezložený proteín, ktorý sa zúčastňuje zostavovania mikrotubulov a udržiavania stability ich štruktúry. Dominantne je zastúpený v mozgu, primárne v axónoch neurónov. Jeho prítomnosť sa tiež zaznamenáva v oligodendrocytoch, somatodendritickom kompartmente neurónov, periférnych nervoch a niektorých ne-neuronálnych tkanivách ako slinné žľazy, prsné tkanivo, kardiomyocyty, kostrové svalstvo, pankreas a obličky [19-21].

2.5.1 Štruktúra, regulácia a funkcie

Tau sa skladá z N-terminálnej projekčnej domény, regiónov bohatých na prolin tzv. *proline rich regions* (ProRR), *microtubule binding repeat regions* a C-terminálnej domény. Existuje niekoľko izoformiem Tau proteínu: 3R0N, 3R1N, 3R2N, 4R0N, 4R1N, a 4R2N. Všetkých šesť izoformiem je vysoko hydrofilných, a preto sú rozpustné a tepelne stabilné. Mozog ľudského plodu pozostáva z najkratšej izoformy 3R0N. Zatiaľ čo mozog dospelého človeka obsahuje všetkých šesť izoformiem, ktoré sú produktom alternatívneho zostrihu jedného génu. Tau izoformy sa od seba odlišujú na základe kolísania počtu opakovaných tubulín-viažucich regiónov [19,20,25].

Niektoré sa skladajú z troch alebo štyroch tubulín-viažucich opakovaní. Všeobecne musí byť v mozgu dospelého človeka pomer izoformy s tromi alebo štyrmi týmito opakovaniami 1:1. Narušenie tohto pomeru sa považuje za charakteristický znak u tauopatií ako je frontotemporálna demencia či AD [19].

Regulácia a funkcie. Tau je vysoko regulovaný fosfoproteín s rozsiahlymi funkčnými aktivitami. Bežnými a zásadnými procesmi sú fosforylácia a defosforylácia. Tieto procesy sú ovplyvnené špecifickými proteín kinázami a fosfatázami C. Biologická aktivita Tau je regulovaná stupňom jeho fosforylácie. Za Tau fosforyláciu zodpovedajú proteín kinázy z triedy *Proline-Directed Protein Kinase*, *Non-Proline-Directed Protein Kinase* a *Tyrosin Protein Kinases*. Tau fosforylácia, ktorá je vyžadovaná pre reguláciu jeho fyziologických funkcií, môže zvýšiť alebo znížiť jeho stabilitu [19,24,25].

Na najdlhšej izoforme Tau bolo identifikovaných 85 potenciálnych fosforylačných miest. Viac ako 20 kináz preukázalo schopnosť fosforylovať Tau *in vitro*. Avšak stále existuje neistota, ktoré skutočne fosforylujú Tau *in vivo*. Mnohé fosforylačné miesta Tau asociované s jeho dysfunkciou a neurodegeneráciou predstavujú C-terminálne sa opakujúce oblasti, ktoré sú definované ako oblasti viazania mikrotubulov [26].

Podľa stavu fosforylácie a rozpustnosti môže byť Tau v mozgu postihnutom AD rozdelený do troch skupín: nefosforylovaný funkčný Tau, abnormálne silne fosforylovaný Tau a Tau agregovaný do nerozpustných NFTs. Odstránením fosforylácie z abnormálne fosforylovaného Tau pomocou proteínových fosfatáz sa *in vitro* obnovuje jeho biologická aktivita voči zostavovaniu mikrotubúl a zároveň sa znižuje patológia Tau *in vivo*. Čo naznačuje, že hyperfosforylácia je kľúčová pre patológiu Tau. Okrem vplyvu na stabilitu mikrotubúl, môže ovplyvniť triedenie proteínov, degradáciu, skrátenie a agregáciu [69].

Môže byť taktiež regulovaný post-translačnými modifikáciami zahŕňajúcimi proces fosforylácie, defosforylácie, acetylácie, nitrácie, glykácie, sumoylácie, ubikvitinácie a proteolytické štiepenie na serínových, treonínových a tyrosínových zbytkoch. Funkčné charakteristiky Tau sú priamo závislé a regulované post-translačnými modifikáciami [19].

Rôzne štúdie a pozorovania navrhujú, že viazanie mikrotubulov a regulácia ich štruktúry nie je jedinou funkciou Tau. Môže sa podieľať na regulácii dynamiky mikrotubulov, regulácii tvaru buniek, pohyblivosti buniek, interakcii mikrotubulov a plazmatickej membrány, axonálnom raste, axonálnom transporte, polarite neurónov či ochrane mikrotubulov pred štiepením. Zohráva pravdepodobne dôležitú úlohu v *long-term potentiation* ako aj *long-term depression* [20-24].

Akékoľvek nezvyčajné zmeny v štruktúre Tau alebo procese fosforylácie Tau, ovplyvňujú jeho afinitu a schopnosť viazať mikrotubuly, čo vo výsledku vedie k jeho toxickej agregácii [7,26].

2.5.2 Tau-podmienená patológia u Alzheimerovy choroby

NFTs sú jedna z charakteristík AD. Skladajú sa z PHFs abnormálne hyperfosforylovaného Tau. Na rozdiel od A β plakov, akumulácia NFTs u AD koreluje so stratou neurónov a kognitívnym postihnutím. Progresívna hyperfosforylácia monoméneho Tau moduluje konformáciu a náboj proteínu, čím dochádza k odkrytiu oblasti pre viazanie mikrotubulov. Tento proces vedie k spontánnej tvorbe patologických oligomérov a agregácii Tau, zmene dynamiky cytoskeletu, narušeniu axonálneho transportu a vyúsťuje v dysfunkciu synapsí sprevádzanú astrogliózou (patologický stav v mozgu, ktorý je charakterizovaný nadmerným rastom astrocytov)F, spolu s aktiváciou mikroglíi [19,26,68,71].

Oligoméry Tau tvoria dynamické štruktúry, ktoré majú guľovitý tvar a pozostávajú z dvoch alebo troch molekúl, ktoré sa môžu premeniť na β -bohaté štruktúry so škodlivými dôsledkami. Oligomerizované Tau proteíny sa postupne premienia na PHFs, až nakoniec na NFTs. Predpokladá sa, že neurotoxické sú práve rozpustné, najmä monoméne a malé oligoméne druhy Tau [19, 68,70].

Internalizácia Tau v astrocytoch môže zmeniť sekréciu astrocytárnych cytokínov a zároveň je akumulácia Tau podporovaná prítomnosťou prozápalových cytokínov. Tým je naznačený mechanizmus pozitívnej spätnej väzby, ktorým Tau a zápalový proces môžu viesť k trvalej astroglióze a poháňať patológiu AD. Perzistentná astroglióza môže znížiť metabolickú, trofickú, synaptickú a imunitnú podporu poskytnutú neurónom prostredníctvom astrocytov. Zdravé astrocyty vykazujú veľmi nízku endogénnu expresiu Tau, ktorú neovplyvňuje ani stimulácia $A\beta$. Napriek tomu je v astrocytoch u AD pozorovaný hyperfosforylovaný Tau a jeho nález sa pokladá za následok internalizácie exogénneho Tau [71].

Prídavok extracelulárnych oligomérov Tau oslabuje dlhodobú potenciáciu pamäte u myši. Okrem toho aplikácia LMW oligomérov Tau ku kultúre hipokampálnych neurónov ovplyvňuje morfológiu a hustotu dendritických výbežkov. Tento pozorovaný účinok bol sprevádzaný zvýšenou produkciou ROS a zmenami v intracelulárnej homeostáze vápnika.

S cieľom objasniť, vplyv druhov Tau proteínu, a ktorý sa najviac zúčastňuje na synaptickej dysfunkcii, boli vytvorené rôzne indukovateľné transgénne myši s exprimovanou formou Tau o plnej alebo skrátenej dĺžke. Tau o plnej dĺžke je pokladaný za výsledok normálneho spracovania Tau génu, zatiaľ čo skrátené formy Tau proteínu môžu vzniknúť v dôsledku neobvyklých post-translačných modifikácií alebo alternatívneho spracovania génu Tau. Týmto skráteným formám často chýbajú konkrétne funkčné domény alebo opakovania, ktoré sú prítomné v Tau plnej dĺžky.

Obe formy sa vo výsledku podieľali na vyvolaní znakov AD, vrátane straty synapsí. Forma o plnej dĺžke však spôsobovala patológiu pozorovanú pred vytvorením NFTs. Zatiaľ čo skrátená forma vyvolala masívnu tvorbu NFTs, stratu neurónov v hipokampe a celkový závažnejší priebeh AD patológie. Vypnutím expresie Tau v týchto modeloch sa zlepšil stav pamäte ako aj synaptických porúch.

Afinita muskarínových M_1/M_3 receptorov k Tau proteínu je 10-krát vyššia než k acetylcholínu. Po dlhodobej stimulácii acetylcholínom dochádza u týchto receptorov k desenzitizácii, ktorú stimulácia prostredníctvom Tau nevyvoláva. Naopak Tau ich

stimuláciou môže spôsobovať dlhotrvajúci nárast intracelulárnej hladiny Ca^{2+} , čo môže viesť k apoptóze [70].

Dopady spojené s hyperfosforyláciou Tau pri neurodegenerácii zahŕňajú narušený axonálny transport, presun Tau vnútri bunky do somatodendritického oddielu a stratu synapsí. Dysfunkcia na synapsách môže nastať presynapticky, kde fosforylovaný tau zasahuje do synaptických vezikúl, ako aj postsynapticky prostredníctvom redukcie receptorov AMPA⁶ [76].

2.6 Patologické mechanizmy A β a Tau

Premena proteínových molekúl z funkčných natívnych stavov na agregované formy závisí od faktorov, ktoré ovplyvňujú ich termodynamickú stabilitu a kinetickú dostupnosť agregovaného stavu. Faktorom, ktorý určuje termodynamickú stabilitu je rozdiel voľnej energie natívneho a agregovaného stavu. Ďalším faktorom, ktorý ovplyvňuje kinetickú dostupnosť, je bariéra voľnej energie medzi natívnym a agregovaným stavom proteínu. Koncentrácia proteínu taktiež zohráva kľúčovú úlohu pri prechode proteínu z rozpustného stavu na agregovaný, v tvorbe intermolekulárnych väzieb a v určení termodynamickej stability agregovaného stavu. So zvyšujúcou sa koncentráciou, narastá pravdepodobnosť formovania intermolekulárnych interakcií a agregovaný stav je preferovaný. Keď je nakoniec dosiahnutá kritická koncentrácia proteínu prekročená, dôjde k presýteniu a voľná energia agregovaného stavu klesne pod hodnotu voľnej energie. Prirodzený/natívny stav je metastabilný a môže dôjsť k spontánnej agregácii, pričom vysoká bariéra voľnej energie môže kinetiku procesu veľmi spomaliť.

Na základe mnohých *in vitro* experimentov bolo navrhnutých niekoľko modelov, so snahou popísať procesy vedúce k vzniknutým proteínovým depozitom v mozgu pacientov, ktoré sú charakteristické pre viaceré ochorenia, vrátane AD [47].

2.6.1 Akumulácia A β a Tau

Vznik A β fibríl len z čisto monomérych proteínov závisí na počiatočnej konformačnej zmene, nazývanej **primárna nukleácia**. Predstavuje formovanie amyloidogénnych jadier, bez príspevku pred-vytvorených oligomérov. Počas fáze nukleácie dôjde k vytvoreniu prechodných, kritických jadier, ktoré pôsobia ako

⁶ AMPA receptory, známe aj ako α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové receptory, sú jedným z typov ionotropných glutamátových receptorov v nervovom systéme. Tieto receptory sú dôležité pre prenos excitácie medzi nervovými bunkami a sú kľúčovými pre normálnu funkciu centrálnej nervovej sústavy [159].

medziprodukty pre prichytenie ďalších monomérnych jednotiek a poháňajú zostavovanie oligomérov prekríženej β -štruktúry. Priebeh elongácie predstavuje pokračovanie interakcií medzi monomérmi, jadrom a oligomérmi. Zostavujú sa do pre-fibrilárnej štruktúry, ktorá rýchlo rastie do usporiadanej formy stabilnejších protofibríl [55].

Saturačná fáza. Koncentrácia monomérov je nízka a konštantná, protofibrily sa usporiadávajú vo vyzreté amyloidné fibrily s rôznou morfológickou štruktúrou a úrovňou polymorfizmu. Môže prebiehať homogénnym alebo heterogénnym mechanizmom. Pri homogénnej nukleácii sa jadrá tvoria len z monomérov pri presýtenej koncentrácii. V heterogénnej nukleácii slúži molekula iného typu ako povrch pre adíciu kryštalizačných alebo fibrilizačných molekúl. Napojené molekuly sa orientáciou prispôbia tak, aby rast kryštálu alebo fibrily pokračoval [51,52].

Nukleácia spolu s elongáciou predstavuje najjednoduchší mechanizmus tvorby amyloidu z monomérov a je charakterizovaná sigmoidálnou krivkou. Silnejšia sigmoidálna krivka s dlhou fázou oneskorenia a rýchlym nárastom s dosiahnutím stavu rovnováhy (plató fáza) naznačuje účasť sekundárnych procesov. Tieto procesy urýchľujú agregáciu v závislosti na predom prítomnej hmoty fibríl. Sekundárne procesy zahŕňajú fragmentáciu fibríl vedúcich ku vzniku nových predĺženia schopných koncov fibríl a sekundárnu nukleáciu [55].

Sekundárna nukleácia. Akonáhle sa nahromadí malá, ale kritická koncentrácia fibríl $A\beta$, vytvoria sa nové jadrá. Jadrá vznikajú z rovnakého typu monomérov na povrchu existujúcich agregátov, ktorými je tento proces katalyzovaný. Dochádza priamo k rastovej fáze a od polymerizácie sa očakáva, že bude nasledovať jednoduchú exponenciálnu funkciu. Tento proces spája rast fibríl a tvorbu difúzných oligomérnych agregátov, ktoré sa uplatňujú ako neurotoxické u AD [49 – 53].

Sekundárna nukleácia dominuje ako proces tvorby fibríl pre mnoho *in vitro* asociovaných peptidov a proteínov, vrátane $A\beta$ a Tau. Sekundárne procesy môžu vysvetliť šírenie agregátov po tkanivách tým, že dôjde k prenosu zárodka fibrilu a môžu tiež prispievať k fáze oneskorenia agregácie, ktorú je možné skrátiť pridaním predpripravených fibrilových zárodokov, čím sa obíde potreba primárnej nukleácie.

Biologické prostredie ovplyvňuje rýchlosti rôznych krokov agregácie v rôznej miere, čím môže presunúť mechanizmus k inému dominantnému procesu. *In vitro* podmienky výrazne ovplyvňujú mechanizmus agregácie. Napriek tomu sa zdá, že kľúčové aspekty chovania proteínov náchylných k agregáciám, ktoré boli stanovené *in vitro*, sú zachované *in vivo*.

Genetické formy ochorení spojené s agregáciou proteínov sú často sprevádzané vyššími hladinami proteínov alebo s produkciou variant viacej náchylných k agregácii. Ukazuje sa trend, že proteíny náchylné k samovoľnej agregácii *in vitro*, spôsobujú robustnejšiu patológiu *in vivo* [55].

Kinetika agregácie amyloidogénnych proteínov je veľmi závislá od ich koncentrácie a môže sa odrážať na procesoch, ktoré s nimi súvisia. A β ₄₂ je tak náchylný k agregácii, že je namáhavé s ním manipulovať v laboratórnych podmienkach. Amyloidné plaky sa objavujú o desaťročie skôr pred nástupom príznakov AD a nachádzajú sa aj u kognitívne normálnych jedincov vo vyššom veku. Preto sa na základe *in vitro* pozorovaní, predpokladá taktiež jeho spontánna agregácia *in vivo*, akonáhle sú dosiahnuté dostatočné koncentrácie [50,55].

Okrem agregácie bol objavený proces fragmentácie A β – dynamický proces so štrukturálnou zmenou A β [72]. **Fragmentácia fibríl** je nezávislá na koncentrácii monomérov, preto môže byť významnejšia v porovnaní so sekundárnou nukleáciou, pri očakávaných nízkych koncentráciách proteínov *in vivo*. Rozpad fibríl sa javí ako kľúčový proces ovplyvňujúci kinetiku formovania amyloidu [55].

Pri podmienkach, za ktorých dochádza k tvorbe amyloidu počas ochorenia a priebeh nukleácie je pomalý, môže byť rast fibríl dramaticky zrýchlený prostredníctvom fragmentácie. Fibrily sa lámu a vytvárajú rozširiteľné povrchy na ich koncoch. Proces redukuje dĺžku fibril, čím sa upravuje ich schopnosť interagovať s povrchmi ďalších fibrilových častíc vznikajúcich v dôsledku rozpadu a s povrchmi biologických membrán. Tieto kombinované účinky môžu spoločne prispievať k zvýšeniu cytotoxického potenciálu fibrilárneho materiálu. Zmenšenie celkovej veľkosti fibril môže taktiež viesť k ich zvýšenej internalizácii bunkami, zvýšenému prenikaniu extracelulárnych fibril cez membrány k potenciálne zraniteľnejším vnútorným membránam a posilneniu fibrilárnej cytotoxicity [73].

Akumulácia/agregácia Tau. Hladiny Tau proteínu v mozgu postihnutom AD sú zvýšené 7 – 10 krát v porovnaní s mozgom zdravých jedincov. Spontánna agregácia Tau proteínu je regulované fosforyláciou, a preto toto zvýšenie pravdepodobne vychádza z hyperfosforylácie a agregácie proteínu do zhlukov, a znižuje tak jeho náchylnosť k degradácii [75]. Tau je fyziologicky neustále fosforylovaný a defosforylovaný, aby bola zaistená regulácia jeho správnych funkcií. Keď sa však rovnováha posunie smerom k fosforylácii, afinita proteínu k mikrotubulom klesá. To má za následok zvýšenie množstva cytosolického Tau so sklonom k agregácii. Navyše abnormálne fosforylovaný

Tau dokáže viazať ďalšie mikrotubulovo-asociované proteíny, čo vo výsledku ešte viac podnecuje destabilizáciu mikrotubulov, spontánnu agregáciu Tau do oligomérov a vyšších agregátov [76].

Domény Tau pre viazanie mikrotubulov sa polymerizujú do vlákien. Zvlášť dva hexapeptidy (VQIVYK a VQIINK) prítomné v týchto doménach sú zásadné pre agregáciu a tvorbu vlákien, čím poukazujú na to, že úsek Tau zapojený do Tau-Tau interakcie je pravdepodobne zakódovaný v jeho vlastnej sekvencii. Jeden z hexapeptidov (VQIVYK) je prítomný vo všetkých izoformách Tau, zatiaľ čo druhý (VQIINK), je prítomný len v izoformách 4R. To čiastočne vysvetľuje vyššiu tendenciu izoform 4R k agregácii. Lokálne štrukturálne zmeny v Tau doménach pre viazanie mikrotubulov prostredníctvom vystavenia motívov týchto hexapeptidov, môžu určiť premenu neaktívneho Tau monoméru na patologicky agregovanú formu. Dimerizácia Tau môže nastať prostredníctvom akejkoľvek kombinácie týchto motívov, ktoré tvoria jadro pre nukleáciu, kde následne majú schopnosť rekrutovať ďalšie dvojice Tau proteínu a Tau monoméry, čo postupne vedie k vytváraniu oligomérov. Následne predĺžené oligoméry získavajú viac usporiadanú β -štruktúru a nakoniec tvoria PHFs, ktoré predstavujú stavebné bloky NFTs. Istú dôležitosť má taktiež dvojica cysteinových zbytkov, ktoré vytvárajú disulfidické mostíky behom dimerizácie Tau proteínu, a ktorých prítomnosť sa javí ako kľúčová pri tvorbe fibríl [75,76].

Tau oligoméry môžu taktiež pôsobiť ako zárodok pre vytváranie ďalšieho nesprávne endogénne zloženého Tau a vyvolávajú jeho redistribúciu do somatodendritického oddielu bunky. Oligoméry v tomto agregáčnom procese sú výrazne neurotoxickou formou Tau a môžu byť prenášané medzi neuronálnymi bunkami [80].

2.6.2 Šírenie Tau a A β patológie

Zvýšené hladiny Tau proteínu v mozgovo-miechovom moku (CSF) sú spojené s rýchlejšim poklesom kognitívnych schopností a celkovo horším klinickým výsledkom pri AD. Narastajúce dôkazy naznačujú, že vo väčšine neurodegeneratívnych ochorení sa vývojové zmeny a patologické proteíny šíria pozdĺž neuroanatomicky spojených oblastí mozgu spôsobom, ktorý pripomína šírenie patologického prionového proteínu. Tento model zahŕňa abnormálne proteíny so schopnosťou transformovať fyziologické proteíny do patologickej formy [76,78].

Vývoj NFTs sa odohráva v mozgu podľa predvídateľného a hierarchického distribučného vzoru, ktorý začína v druhej vrstve entorhinálneho kortexu⁷, šíri sa cez limbické a asociačné oblasti a nakoniec dosahuje hipokampus a neokortex. Tento veľmi špecifický vzor viedol k domnienke, že samotný patologický Tau proteín alebo patologický proces, ktorý zahŕňa hyperfosforyláciu Tau a toxicitu, sa môže šíriť priamo z bunky na bunku prostredníctvom anatomických spojení [77,78]. Sekrécia tau je opakovane pozorovaná v rôznych neurónových aj ne-neurónových bunkových liniách [125].

Mechanizmy bunkovej sekrécie proteínov sa delia na konvenčné a nekonvenčné. Konvenčné sekrečné mechanizmy zahŕňajú klasickú sekrečnú cestu, známu aj ako dráha endoplazmatické retikulum-Golgiho aparát. Nekonenčná sekrečná cesta prostredníctvom ubikvitín-proteazómového systému (UPS), zahŕňa všetky ostatné trasy, od vytvárania pórov na plazmatickej membráne (nekonvenčná sekrečná cesta typu I - UPS I), cez vnášanie sa do organel a sekréciu exozómov (nekonvenčná sekrečná cesta typu III - UPS III) až po obchádzanie Golgiho aparátu (nekonvenčná sekrečná cesta typu IV - UPS IV). Nekonenčné cesty sekrécie proteínov sa väčšinou indukujú bunkovým stresom a sú tak dôležitou bunkovou stratégiou pre prežitie v podmienkach proteostatického stresu [76,125].

Tau pravdepodobne využíva UPS typ I pre priamy prenos cez plazmatickú membránu, ktorá by mohla byť riadená posttranslačnými modifikáciami za patologických podmienok. Tau o plnej dĺžke interaguje s komponentmi vnútornej plochy plazmatickej membrány a dochádza priamo k jeho translokácii do extracelulárneho priestoru. Tento mechanizmus je podporovaný hyperfosforyláciou Tau a vyžaduje prítomnosť sulfátovaných proteoglykánov na povrchu bunky, ktoré uľahčujú jeho export. Uvoľnenie rozpustných foriem Tau je postačujúce na iniciovanie transcelulárneho šírenia Tau a vedie k indukcii agregácie Tau v susedných bunkách. Sekrécia rôznych druhov tau môže byť hnacím faktorom pre agregáciu a následné šírenie medzi bunkami [79,125].

UPS Typu III zodpovedá sekrečnému mechanizmu prostredníctvom vezikulárnych teliesok. Dochádza k sekrécii Tau uzavretého v membránových štruktúrach, ako sú exozómy alebo ektozómy. U exozómov bolo zistené, že obsahujú monoméry Tau, jeho

⁷ Entorhinálny kortex je hlavnou súčasťou pamäťového systému, mediálneho temporálneho laloku. Predstavuje hlavnú bránu medzi hipokampom a neokortexom. Je zapojený do vyššieho kognitívneho spracovania, obzvlášť do procesov pamäte. Entorhinálna oblasť prejavuje patologické a patofyziologické zmeny v niekoľkých ochoreniach, vrátane AD, epilepsie a schizofrénie [111].

fosforylované agregáčn  formy a taktiež bolo dok zan , že dochádza k ich synaptick mu prenosu medzi neurónmi. Okrem neurónov obsahujú exozómy aj d alšie bunky centrálného nervového systému, ako sú mikrogliov  bunky, astrocyty a oligodendrocyty [79].

 irenie A β patológie predstavujú amyloidov  plaky, ktor  sa najprv zvyčajne objavia v neokortexe, odkial' sa  iria do alokortexu a subkortikálnych oblastí. A β peptidy sú zhroma dov n  vo vnútri intralumin lnych vezikul. Po zl uen  týchto intralumin lnych vezikul s plazmatickou membránou, sa uvoľn j  do extracelulárneho priestoru vo forme exozómov. Exoz my bohat  na A β , izolovan  z pacientov s AD, môžu sl  it' ako vehikul  pre prenos toxických l tiek medzi bunkami v prijímajúcich kultivovaných neurónoch. Napriek tomu, že prenos A β z bunky na bunku predstavuje zmyslupn  hypotézu, ktor  podporuje skutočnosť jeho lokalizácie vnútri neurónov, neexistujú definitívne dôkazy o aktívnom transporte A β pozdl  neurónov.

A β_{40} a A β_{42} cirkulujú v telesných tekutinách, ako je plazma a CSF. Preto d alším potenciálnym spôsobom difúzie A β z periférie do mozgu, môže byť cesta cez cievny systém. Intraperitone lna alebo intravenózna aplikácia extraktov bohatých na A β podporila v myšom modeli výskyt mozgovej amyloidovej angiopatie, čo poukazuje na  cast' cirkulujúcich imunitných buniek pri  iren  A β zárodkov [78].

2.6.3 Interakcie medzi A β a Tau

Odstránenie samotného A β alebo Tau úplne neukon uje interak n  dráhu, ktor  stále zohráva úlohu pri zr chl'ovan  progresie ochorenia. Patologick  proces pravdepodobne zahr na tieto možnosti:

A) A β poh na patológiu Tau t m, že vyvoláva hyperfosforyláciu Tau a hyperfosforylovan  Tau zabezpečuje toxicitu v neurónoch. A β a Tau sa môžu vzájomne interagovať prostredníctvom kináz. Predpokladá sa, že hlavne tieto kinázy prispievajú k hyperfosforyl cii Tau proteínu, čo následne vedie k odpojeniu Tau proteínu od mikrotubulov a k tvorbe NFTs: A-kináza, C-kináza, cykl n-dependentn  kináza-5 (CDK-5), Calmodulin-dependentn  proteín kináza II, glykogén synt za kináza-3 β (GSK-3 β) a MAPKs. A β ur chl'uje hyperfosforyláciu tau prostredníctvom aktivácie CDK-5 a GSK-3 β . Taktiež zasahuje do oligomeriz cie a agregácie Tau , ktor  je rovnako umo nen  A β aktiváciou CDK-5 a GSK-3 β . Porucha funkcie kinázy Fyn je taktiež asociovan  s patologickými procesmi pozorovanými u viacerých neurodegeneratívnych ochorení (roztr sen  skleróza, Parkinsonova choroba) vrátane AD. Zv yšen  hladiny

kinázy boli pozorované v hipokampe a neocortex pacientov s AD. Fyn je nереceptorová tyrosinová kináza spojovaná s niekoľkými zásadnými funkciami v CNS, vrátane myelinizácie a synaptického prenosu. Fyn pravdepodobne podporuje tvorbu A β ovplyvnením fosforylácie APP. Zvýšená fosforylácia poškodzuje endocytózu APP, následne sa hromadí v endozómoch a lysozómoch, v ktorých je aktivita BACE-1 optimálna a dochádza k tvorbe A β . Tau môže interakciou prostredníctvom svojej aminoterminálnej projekčnej domény s Fyn sprostredkovať A β toxicitu [80,81,84].

B) Tau zabezpečuje toxicitu A β a toxicita A β závisí na prítomnosti Tau. Súčasné modely ochorenia naznačujú, že A β iniciuje patofyziologickú kaskádu vedúcu k zmenám v štruktúre a akumulácii Tau. Predpokladá sa existenciu fáz ochorenia, ktoré sú „závislé od A β “ (ovplyvňujúce začiatok ochorenia) a „nezávislé od A β “ (ovplyvňujúce rýchlosť progresie). Experimentálna podpora tohto modelu pochádza z ľudských neurálnych kmeňových buniek 3D kultivačného systému, kde nadmerná expresia mutovaného APP a PSEN1 (bez tau mutácie) vyvolala agregáciu A β a tau, pričom patológia tau nasledovala po A β . Blokovanie produkcie A β v kultúrach (pomocou inhibitorov β - alebo γ -sekretázy) zabránilo vzniku Tau patológie. Podobné zistenia boli hlásené v organoidných mozgových kultúrach vytvorených z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek získaných od pacientov s AD. V myšom modeli, ktorý vykazoval vývoj patológie A β aj Tau, sa plaky vytvorili pred NFTs a protilátky zamerané proti A β znížili zmeny Tau v počiatočnom štádiu ochorenia, ale nie v pokročilom štádiu [80,82].

C) A β a Tau spolupracujú pri zasahovaní do bunkových procesov alebo organel a môžu zosilniť toxické účinky jeden druhého. Nadmerná expresia APP a prítomnosť A β -derivovaných difúzných agregátov spôsobuje fragmentáciu mitochondrií a ich neobvyklé rozloženie bez apoptózy. A β spôsobuje opuch axónov a dendritov, znižuje axonálny transport v hipokampálnych neurónoch, čím prispieva k zmenenej distribúcii mitochondrií. Nadmerný rozpad mitochondrií koreluje s vyššou produkciou ROS, čo vedie k vývoju rozsiahleho makromolekulárneho oxidačného poškodenia a amyloidových lézií spôsobených ROS [80].

D) A β a Tau sa môžu spolu vyskytovať na patologických léziách. **Mikroglie:** Aktivácia mikroglíí je kľúčovou neuropatologickou charakteristikou AD a klinické štúdie zistili znížené úrovne aktivity gliálnych buniek v miernejších prípadoch AD. Rozpustný A β a následné plaky spúšťajú aktiváciu mikroglíí a uvoľňovanie prozápalových cytokínov, ako sú interleukín-1 β a tumor nekrotizujúci faktor (TNF- α), ROS a reaktívne dusíkové zlúčeniny. **Astrocyty:** Jednou z prvých neuropatologických

zmien pri AD je hromadenie astrocytov na miestach A β depozitov. Aktivované astrocyty obklopujú amyloidové plaky a NFTs. Ukladanie A β a NFTs podporuje aktiváciu a hromadenie astrocytov, ktoré exprimujú gény zainteresované do fagocytózy, čím môže zmierniť patológiu, prostredníctvom zachytávania a odstraňovania bielkovinových zhlukov. Táto fagocytárna kapacita bola preukázaná pre A β , ktorý je zachytávaný a transportovaný do lyzozómov pre degradáciu v astrocytoch. Narušenie funkcie lyzozómov v priebehu starnutia alebo strata presenilínu pravdepodobne predstavuje základný mechanizmus pre hromadenie A β a fagocytovaného amyloidového materiálu vnútri astrocytov, čo môže byť kľúčom k podporovaniu progresie amyloidových plakov.

Transkripčný faktor EB (TFEB⁸) hrá taktiež dôležitú úlohu v tomto procese. Expresia astrocytického TFEB oslabuje hromadenie amyloidových plakov tým, že zvyšuje zachytávanie A β z medzibunkového prostredia a uľahčuje jeho odstraňovanie prostredníctvom lyzozomálneho rozkladu v mozgu. TFEB priamo stimuluje astrocyty k rozkladu A β , čo znižuje patogenézu amyloidových plakov. V myšom modeli tauopatie stimuloval transkripčný faktor TFEB v astrocytoch záchyt a odstraňovanie abnormálneho extracelulárneho Tau, čo zabránilo neurónovému šíreniu Tau patológie.

Hromadenie abnormálne fosforylovaného Tau v astrocytoch sa nazýva *ageing-related Tau astroglipathy*, ktoré môže zohrávať úlohu v sprostredkovaní tvorby patologických inklúzií Tau v astrocytoch alebo indikovať zapojenie astrocytov v raných štádiách transsynaptického šírenia Tau [80].

2.7 Hypotéza kovových iónov

Narušená homeostáza kovov je spojená s neurodegeneráciou, zahŕňa rôzne patogénne cesty vrátane oxidačného stresu, aktivácie mikroglíi a zápalu. Kovové ióny, ako je železo, meď a zinok, zohrávajú dôležité úlohy pri udržiavaní funkcií mozgu. Stopové množstvá kovov udržiavajú fyziologickú rovnováhu mikroprostredia kovových iónov v neurónoch. V prípade AD sú kovové ióny priamo aj nepriamo zapojené do spracovania A β a Tau, pričom ovplyvňujú ich fyziologické funkcie. Nesprávne usadenie alebo distribúcia kovov v rôznych oblastiach mozgu môže narušiť túto rovnováhu a viesť k výskytu neurodegeneratívnych chorôb. Porucha rovnováhy Fe²⁺, Cu²⁺ a Zn²⁺ je úzko spojená s výskytom AD [120,121].

⁸ Transkripčný faktor EB (TFEB) slúži ako hlavný regulátor biogenézy autofágie a lyzozómov, je zapojený do rôznych signálnych dráh. Porucha funkcií autofágie a lyzozómov v dôsledku chybného TFEB je spojovaná s radou ochorení, ako sú lyzozomálne ukladanie, neurodegeneratívne choroby, nádory a metabolické ochorenia [83].

Tvorba A β je riadená enzýmami závislými od zinku (α -sekretáza) a medi (β -sekretáza). Neobvykle vysoké koncentrácie zinku napríklad zvyšujú odolnosť A β peptidov voči štiepeniu α -sekretázou, čo vedie k nárastu obsahu A β . Zinok môže tiež inhibovať aktivitu α -sekretázy voči štiepeniu APP, čo má za následok zvýšené spracovanie APP enzýmami β - a γ -sekretázy, tým pádom zvýšenie tvorby extracelulárnych plakov A β .

V porovnaní s normálnymi osobami, bol u pacientov s AD zistený výskyt abnormálnych usadenín železa v mozgovej kôre a hipokampe. Usadeniny sú kolokalizované s A β plakmi. Železo je koncentrované v centrálnej časti plakov, ako aj rozptýlené v ich okolí. Zároveň sa šíri tkanivom vo forme ohniskových depozitov hemosiderínu alebo magnetitu. Preťaženie železom môže inhibovať aktivitu α -sekretázy a zvýšiť aktivity β -sekretázy a γ -sekretázy na podporu produkcie A β .

Fe²⁺ sa viaže na N-terminálnu časť A β a inhibuje jeho helikálnu štruktúru a zvyšuje úroveň β -listu, čo následne podporuje agregáciu A β tým, že zlepšuje interakciu medzi peptidmi. A β s vysokou koncentráciou železa rýchlo vyvoláva redoxné reakcie, zatiaľ čo v oblastiach s A β bez železa nie sú známky oxidatívneho stresu alebo závažnej apoptózy.

Ióny kovov prispievajú k tvorbe Tau intracelulárnych PHFs a špecifických NFTs. Dôkazy naznačujú, že železo reguluje fosforyláciu tau prostredníctvom nezvyčajnej aktivácie tau kináz, ako sú GSK3 β , CDK-5, MAPKs a potlačením proteázomového systému.

Zinok sa viaže na Tau a urýchľuje jeho tendenciu agregovať sa do stabilných vlákien a oligomérov, čím sa nakoniec zvyšuje počet NFTs a obsah zinkových iónov v neurónoch s NFTs je významne zvýšený. Meďnaté katióny majú taktiež vysokú afinitu k Tau proteínu. Nedávna štúdia ukázala, že Cu²⁺ sa viaže na Tau opakovaniami pre viazanie mikrotubúl a uľahčuje agregáciu Tau. Okrem toho majú fragmenty Tau schopnosť redukovať meď a spúšťajú na nej závislú generáciu peroxidu vodíka. Preto viazanie medi na Tau slúži ako jeden zo zdrojov ROS v neurónoch, čo zhoršuje neurotoxicitu [120,121].

2.8 Oxidačný stres

Vytvára sa nová predstava, že A β a fosforylovaný Tau predstavujú bunkovú adaptívnu stratégiu voči oxidačnému stresu. Voľné radikály majú významný podiel na procese starnutia, ako aj na ochoreniach spojených s pokročilým vekom, ako je AD [85,115].

Zvýšený oxidačný stres v mozgu pacientov s AD je úzko spojený s rôznymi patologickými prejavmi, a hlavné príčiny sú v troch základných aspektoch: a) nerovnováha homeostázy prechodných kovov v mozgu a zvýšené spojenie týchto kovov s A β , čím vznikajú špecifické zlúčeniny; b) aktivácia a nadmerná expresia súvisiacich oxidáz (enzýmy NADPH či MAO-B), c) dysfunkcia mitochondrií. Oxidačný stres je spojený s patogenézou každej z hypotéz.

Aplikácia antioxidantov na znižovanie úrovni ROS poskytuje potenciálnu stratégiu pre objavovanie liekov proti AD. V súčasnosti sa dosiahol významný pokrok v modeloch zvierat, kde sa používajú iba antioxidanty na reguláciu ROS [116].

2.9 Metabolizmus glukózy

A β proteíny v amyloidných depozitoch sú často glykované, čo naznačuje priamu súvislosť medzi glykáciou a amyloidózou ako aj prepojenie s diabetom. Konečné produkty pokročilej glykácie A β môže spôsobiť zrýchlenú agregáciu rozpustného peptidu A β v porovnaní s neupraveným počiatočným materiálom. Štúdie s využitím zobrazovacej metódy PET ukázali drastické zníženie signálu glukózy v postihnutých oblastiach u pacientov trpiacich AD, Parkinsonovou chorobou, amyotrofickou laterálnou sklerózou alebo Huntingtonovou chorobou. Konkrétne pacienti s MCI predchádzajúcim AD, preukázali významné zníženie získavania glukózy v entorhinálnom kortexe a parietálnych lalokoch. Tieto deficity sa stávajú výraznejšími a anatomicky rozšírenejšími počas postupu AD patológie. Anatomická distribúcia deficitného metabolizmu glukózy v mozgu slúži ako klinický nástroj na rozlišovanie Alzheimerovej choroby od demencie frontotemporálneho typu, Parkinsonovej choroby, choroby Lewyho teliesok a iných typov demencie [46,117].

Epidemiologické štúdie preukázali vyššiu incidenciu AD u pacientov s *diabetes mellitus typu II*, v porovnaní s tými bez sprievodných ochorení. Táto epidemiologická asociácia viedla k rôznym hypotetickým patofyziologickým spojeniam medzi oboma ochoreniami. Inzulínová rezistencia je kľúčovou zmenou signalizácie tohto hormónu a je patogénnym základom *diabetes mellitus typu II*, kde podporuje chronický stav

hyperinzulinémie a hyperglykémie. Spája sa s poruchou metabolizmu amyloidových bielkovín v mozgu, fosforyláciou tau a tvorbou reaktívnych ROS v mitochondriách. Tieto podmienky môžu teda prispievať k patogenéze a vývoju AD [118].

Konečné produkty pokročilej glykosylácie (AGE) zohrávajú významnú úlohu vo vývoji AD. Sú to proteínové molekuly alebo peptidy, ktoré vznikajú v dôsledku Maillardovej reakcie, stávajú sa glykovanými v dôsledku ich vystavenia cukrom. AGE sa hromadia v rôznych bunkách ako produkty normálneho procesu starnutia, ale ich rýchlosť hromadenia je zvýšená u pacientov s DM. AGE interagujú so svojimi receptormi a aktivujú niekoľko signalizačných mechanizmov, ktoré spôsobujú zvýšený oxidačný stres a poškodenie orgánov s následnými komplikáciami. AGE podporujú agregáciu A β oligomérov, prispievajúc tak k neurotoxickým účinkom pozorovaným pri AD. Ďalej sa zdá, že glykácia Tau proteínu môže podporovať tvorbu PHFs. Taktiež sa ukázalo, že AGE môžu produkovať voľné radikály iniciáciou aktivity NADPH oxidázy, čo je hlavným zdrojom ROS v gliálnych bunkách a neurónoch [119].

Rôzne štúdie predpokladajú zapojenie inzulínu-podobného rastového faktoru a enzýmu degradujúceho inzulín v patológii A β , Tau, neuroinflamácie a oxidačného stresu [118,119].

2.10 Vaskulárna hypotéza

Táto hypotéza bola postulovaná už v roku 1993. Jej autori de la Torre a Mussivand pozorovali redukciiu v cerebrálnom prietoku krvi, glukózovom metabolizme a spotrebe kyslíka u pacientov s AD, ktorá bola proporcionálna k závažnosti ochorenia. A β plaky a NFTs môžu byť následkom, nie príčinou neurodegenerácie. Okrem toho sa zdá, že stupeň ukladania A β nie je korelovaný s úrovňou závažnosti kognitívnej dysfunkcie u pacientov s AD. V skutočnosti bolo ukladanie amyloidu zistené aj v mozgoch kognitívne zdravých jedincov [132].

Vaskulárna hypotéza predpokladá, že medzi AD a kardiovaskulárnymi ochoreniami existuje vzťah na systémových úrovniach. Bolo uskutočnených množstvo štúdií so snahou objasniť povahu tohto vzťahu, pretože existuje dôležité prekrytie medzi AD a kardiovaskulárnymi ochoreniami u starších pacientov [131].

Experimentálne indukované dlhodobých kardiovaskulárných rizikových faktorov, či narušenie cerebrálnej hemodynamiky urýchľuje alebo zhoršuje AD podobnú patológiu mozgu a kognitívny úpadok u AD modelov transgénnych myší, charakterizovaný

zmenami v 5 doménach: patológia A β a Tau, neuroinflamácia, neurodegenerácia a kognitívny úpadok (podporuje konverziu z MCI na demenciu).

Vaskulárne rizikové faktory ako hypertenzia, diabetes a hyperhomocysteinémia významne zvyšujú riziko vzniku AD, naznačujú aditívny alebo dokonca synergický účinok. Napriek tomu, mechanizmy týchto súvislostí nie sú známe a stále nie je jasné, či kardiovaskulárne ochorenia vyvolávajú, podnecujú alebo jednoducho koincidujú s AD [131,133].

2.11 Ďalšie rizikové faktory

AD je charakterizovaná vysokou heterogenitou v prejave ochorenia, jej priebehu a rizikových faktorov (Tab. č. 1). Vysoká fenotypická variabilita je v súčasnosti považovaná za jedno z najväčších prekážok pri skorom diagnostikovaní a pri návrhu klinických skúšok. Preto je veľký záujem o identifikáciu faktorov ovplyvňujúcich variabilitu, ktoré možno využiť na kategorizáciu pacientov [141].

Mnohé epidemiologické štúdie súhlasia s tým, že zo všetkých demografických faktorov, ako sú vek, pohlavie, rasa a sociálna trieda, je vek jedným z najdôležitejších rizikových faktorov pre kognitívny úpadok a AD. S postupujúcim vekom sa prevalencia AD zvyšuje na odhadovaných 19 % u jednotlivcov vo veku 75 – 84 rokov na 30 – 35 %, prípadne až na 50 % pre tých, ktorí sú starší ako 85 rokov. To, že AD by mohla byť urýchlenou formou normálneho starnutia, je z veľkej časti založené na pozorovaní podobnosti patologických zmien identifikovaných pri AD a pri normálnom starnutí, avšak s výnimkou ich závažnosti. Aj v kognitívne normálnom mozgu dochádza k vekom súvisiacemu znižovaniu objemu a hmotnosti mozgu, zväčšovaniu komôr a strate synapsií a dendritov v určitých oblastiach, ktoré sú sprevádzané A β a NFTs [142].

Okrem genetických a životných faktorov sa individualita pohlavia a genderu stávajú kľúčovými faktormi ovplyvňujúcimi fenotypickú variabilitu. Existuje dôkaz o rozdieloch medzi pohlaviami a gendermi v rýchlosti kognitívneho zhoršenia a atrofii mozgu, v účinku rizikových faktorov, ako aj v vzoroch diagnostických biomarkerov [141].

Odhadované riziko, v priebehu života pre AD vo veku 45 rokov, je približne je 20 % pre ženy a 10 % pre mužov. Dôležitým faktorom v tomto rozdiel, vo frekvencii a riziku v priebehu života je skutočnosť, že ženy žijú dlhšie ako muži. Vek je najvýznamnejším rizikovým faktorom pre sporadickú AD a vo vyšších vekových skupinách je viac žien, kedy je pravdepodobnosť vývoja AD najväčšia. Avšak dlhovekosť kompletne nevysvetľuje vyššiu frekvenciu a riziko v priebehu života u žien [140]. Všeobecne platí,

že dospelé ženy majú silnejšie prirodzené a adaptívne imunitné reakcie než muži. To vedie k rýchlejšiemu očisteniu patogénov a väčšej účinnosti očkovania, než u mužov, ale tiež prispieva k ich zvýšenej náchylnosti k zápalovým a autoimunitným ochoreniam. To platí aj pre rezidentné imunitné bunky CNS, mikrogliaálne bunky. Viaceré publikácie preukázali významné pohlavné rozdiely vo výraze génov a regulácii mikrogliaálnych buniek.

Kaskáda mitochondriálnej dysfunkcie prispieva k AD prostredníctvom zložitých interakcií, vrátane tých s A β a Tau, čo vedie k zvýšenému oxidačnému stresu, poruchám bunkového metabolizmu a indukcii apoptózy. V modeloch na zvieratách sa ukázalo, že obe pohlavia reagujú na účinok pohlavných hormónov, ale samice hlodavcov sa zdali byť náchylnejšie na toxicitu A β . To je podobné ľudským štúdiám, kde ženy ukázali vyššiu zraniteľnosť voči oxidačnému stresu. Genetická štruktúra mitochondrií tiež preukázala rôzne účinky na riziko AD u mužov a žien. Ďalším z možných vysvetlení je oxidatívny stres, ktorý sa zvyšuje so stratou estrogénnej aktivity, predpokladá sa teda, že pokles funkcie mitochondrií u žien po menopauze, by mohol byť jedným z dôvodov pozorovaných pohlavných rozdielov. Keďže funkcia mitochondrií je čoraz viac cieľom klinických skúšok, pohlavné rozdiely v funkcii mitochondrií po menopauze by mali byť ďalej preskúmané [141].

Tab. č. 1: Zhrnutie rizikových faktorov asociovaných s Alzheimerovou chorobou [142].

Rizikové faktory asociované s AD	
Demografický	Vek, vzdelanie, pohlavie, rasa, sociálna trieda
Genetický	APP, PSEN1/PSEN2, APOE, VDR, ESR, epigenetika, ...
Životný štýl	Alkohol, nedostatok pohybu a kognitívnych aktivít, fajčenie, podvýživa, nevhodná strava
Zdravotný	Rakovina, CVD, imunitné dysfunkcie, infarkt, traumatické poranenia mozgu, obezita, narušená homeostáza cholesterolu ...
Psychiatrický	Depresia, stres
Enviromentálny	Znečistenie vzduchu, deficit vápnika, geografická poloha, kovy, vojenská služba, organické rozpúšťadlá, deficit vitamínov
Infekcie	<i>Chlamydophila pneumonia</i> , <i>Treponema sp.</i> , Huby, vírusy, dentálne infekcie

3 Farmakoterapia Alzheimerovej choroby/demencie

K dňu 1.1. 2023, bolo uskutočnených 187 klinických skúšok hodnotiacich 141 jedinečných liečebných prístupov pre Alzheimerovu chorobu. Fáza III zahŕňala 36 liečiv v 55 skúškach; 87 liečiv v 99 skúškach fázy II; a vo fáze I bolo zahrnutých 31 liečiv v 33 skúškach. Vývoji terapie zameranej na modifikáciu priebehu ochorenia zodpovedalo až 79 % liečiv v skúškach [86].

3.1 Modulátory neurotransmisie

Skupina cholinergných neurónov je hlavným neurotransmitterovým systémom zapojeným do AD a strata bazálnych cholinergných neurónov je dobre rozpoznanou patológiou. Tieto neuróny udržujú kortikálnu aktivitu, cerebrálny krvný tok, modulujú kogníciu, učenie, úlohy a pamäťové aktivity, vývoj mozgovej kôry a regulácie spánkového cyklu. Dysfunkcie cholinergného systému pri AD sa vyskytuje na rôznych úrovniach, vrátane zníženej aktivity cholinacetyltransferázy, zníženého reuptaku cholínu, úbytku acetylcholinovej syntézy a zmenách hladín acetylcholinových receptorov.

Glutamát je hlavným excitačným neurotransmitterom v hipokampálnych a neokortikálnych oblastiach mozgu. Zohráva významnú úlohu v kognícii, učení a procese pamäti. Postsynaptická membrána má vysokú hustotu jeho *N*-metyl--*D*-aspartátového (NMDARs) receptoru. Pri AD je pozorované nadmerné množstvo extracelulárneho glutamátu, ku ktorému prispieva presynaptické zvýšené uvoľňovanie glutamátu a znížené spätné vychytávanie, čo vedie k tonickému aktivovaniu NMDARs.

Mezi pre- a postsynaptickými neurónmi a astrocytmi prebieha „glutamátový cyklus“, ktorý určuje synaptickú koncentráciu glutamátu dostupného pre receptory. Poruchy tohoto cyklu sa vyskytujú v rôznych úrovniach u AD a vedú k stavu akumulácie extracelulárneho glutamátu, zvýšenej aktivácii NMDARs a excitotoxicite. Množstvo dôkazov poukazuje na vzájomnú interakciu medzi NMDARs a A β . Aktivácia NMDARs pravdepodobne vedie k produkcii A β a naopak. Oligoméry A β sa viažu na NMDARs a aktivujú ich, čím ďalej podporujú dôležitosť glutámového systému v rámci AD.

K AD vedú tiež poruchy v ďalších neurotransmitterových systémoch, γ -aminomáslovej kyseliny, histamínu a serotonínu [85].

3.1.1 Inhibítory cholinesteráz

Takrín, derivát tetrahydroakridínu (THA). Pre Takrín existujú viaceré spôsoby pôsobenia. Jeho hlavný mechanizmus účinku v neurologických poruchách je ako inhibítor acetylcholinesterázy, ktorý pôsobí nekompetitívne, ale selektívne na CNS. Okrem toho, nezrovnalosti CNS siahajú za hranice cholinergného systému a zahŕňajú deficit serotonínových neurotransmiterov, deficit noradrenalínových neurotransmiterov a znížený prietok krvi v cievach. Takrín má určitú selektivitu voči butyrylcholinesteráze (BuChE) v porovnaní s AChE. Okrem inhibície enzýmu existuje niekoľko ďalších účinkov na cholinergný systém: zvýšená produkcia a sekrécia acetylcholínu, aktivácia muskarínových receptorov podtypu M₁, potlačenie muskarínových receptorov podtypu M₂ a zvýšenie nikotínových receptorov v mozgu, ich potenciácia pri nízkych koncentráciách a inhibícia pri vysokých koncentráciách, ako aj celková potenciácia neuromuskulárnej komunikácie.

Dôležitým prospechom Takrínu pre ľudí s neurologickými poruchami je, že výrazne zvyšuje prietok krvi v mozgu. Takrín bráni uvoľňovaniu β -prekursorovému proteínu z tráviaceho traktu [88,134]. Preukázal pozitívne účinky na funkciu pamäte u mladých a starších normálnych jedincov. Bol prvou molekulou, ktorá vstúpila do klinických skúšok pre liečbu AD. V roku 1993 bol schválený Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) v USA na symptómy AD a súvisiace demencie. V roku 2013 došlo k jeho stiahnutiu z trhu z dôvodu hepatotoxicity. Takrín je nešpecifickým inhibítorom cholinesteráz (ChEi) s premenným vstrebávaním, rozsiahlou distribúciou v tele a prenikaním do CNS. Napriek potenciálnemu záujmu o Takrín, ostáva jeho účinnosť pri symptómoch demencie kontroverzná. Pozitívne účinky Takrínu a silné viazanie AChE boli oslabované jeho toxicitou. Po jeho stiahnutí z trhu bolo vyvinuté úsilie na zníženie jeho vedľajších účinkov a syntézu nových derivátov. Táto stratégia viedla k vývoju Takrínových derivátov/analógou a hybridov (homodimérov, heterodimérov) [88,89].

Derivát takrínu, **7-methoxytakrín (7-MEOTA)** je centrálny účinným inhibítorom AChE. V porovnaní s Takrínom prejavuje vyššiu afinitu k muskarínovým receptorom a nižšiu toxicitu. Avšak jej biologická dostupnosť v CNS je niekoľkonásobne nižšia než u takrínu. Výsledky u 7-MEOTA naznačili, že aj malé zmeny v štruktúre takrínu môžu viesť k nižšiemu vstrebávaniu, a tým k nižšej biologickej dostupnosti. 7-MEOTA slúži ako predloha pre ďalšie deriváty takrínu s malým štrukturálnym rozdielom, ktoré majú podobnú nízku hepatotoxicitu, no zároveň zlepšenú schopnosť prenikania cez biologické bariéry [134].

Druhá generácia inhibítorov AChE, ktoré sa v súčasnosti široko používajú, zahŕňa donepezil, rivastigmin a galantamín. Majú menej vedľajších účinkov, vyššiu centrálnu selektivitu a zlepšujú úroveň kognície u pacientov s miernou až stredne ťažkou AD [90].

Donepezil. Bol v roku 1996 schválený na liečbu miernych až stredne ťažkých prejavov AD. Prejavuje vysokú inhibičnú aktivitu voči AChE a selektívnu afinitu, ktorá je 1250-krát väčšia k AChE než k BuChE. Donepezil má niekoľko farmakologických vlastností, ktoré zasahujú do rôznych neurotransmitterových systémov, ako sú $\alpha 1$ adrenergne receptory, zlepšenie neuronálnej plasticity, zníženie prozápalového cytokínu a zlepšenie prietoku krvi v mozgu. Navyše znižuje úroveň expície APP a excitotoxického poškodenia, moduluje cholinergické účinky a oxidatívny stres, ovplyvňuje expresiu izozforiem AChE a interaguje s reguláciou nikotínových receptorov v mozgovom kortexe [88,89].

Okrem blokovania AChE sa o donepezile uviedlo, že má aj ďalšie biologické funkcie. Donepezil môže chrániť neuróny prostredníctvom priameho a nepriameho stimulovania nikotínových receptorov pre acetylcholín proti glutamátom indukovanej neurotoxicite [91]. Bolo syntetizovaných mnoho derivátov donepezilu spojením jeho štruktúry s funkčnými zložkami ako je benzofenón, indanon, kumarín, 5,6-dimethoxy benzofuranon, benzylpyridínium-chalkonoidy. Niektoré z týchto derivátov sú vynikajúcimi inhibítormi AChE. Medzi derivátmi donepezilu bola vyvinutá séria derivátov 2-fenoxy-indán-1-onu s bočným reťazcom alkylamínu, ktoré sú schopné zasahovať do AChE/ BuChE a zároveň majú antioxidačnú aktivitu. Niektoré z týchto derivátov preukázali dobrú anti-AChE aktivitu a inhibovali agregáciu A β podobne ako donepezil.

Rivastigmin. Pseudo-ireverzibilný karbamátový nekompetitívny inhibítor AChE a BuChE. Bol schválený na liečbu miernych až stredne ťažkých prejavov Alzheimerovej choroby v roku 2000.

Galantamin. Bol schválený pre terapiu AD v roku 2001. Terciárny alkaloid so selektívnym reverzibilným, kompetitívnym inhibičným profilom prevažne voči AChE než voči BuChE. Pôsobí allostericky na nikotínové receptory pre acetylcholín s cieľom zosilniť účinok agonistov týchto receptorov. Tento zosilňujúci účinok môže prispieť k klinickej účinnosti galantamínu, pretože závažnosť kognitívneho postihnutia pri AD súvisí so stratou nikotínových receptorov. Cholinergná stimulácia podporuje proliferáciu a prežitie neurálnych prekursorových buniek [88,89].

Niektoré štúdie ukázali, že galantamín stimuluje v hipokampe proliferáciu neurálnych prekursorových buniek v subgranulárnej zóne prostredníctvom aktivácie muskarínového receptora M_1 a prežitie novo rozdelených buniek vo vrstve granulárnych buniek prostredníctvom aktivácie $\alpha 7$ nikotínového receptora [88].

3.1.2 Nová generácia inhibítorov cholinesteráz

Fysostigminové deriváty. Fenserín, u ktorého predpokladaný mechanizmus účinku zahŕňa potlačenie produkcie interleukínu 1β ; zníženie glutamátom vyvolanej excitotoxicity; ochrana pred oxidačným stresom; zníženie hladín $A\beta$; zvýšená produkcia mozgového neurotrofického faktoru; inhibícia syntézy APP a α -synukleínu; a anti-apoptotický účinok na predurčenú dráhu bunkovej smrti.

Liečba fenserínom ukázala zlepšenie pamäti a učenia u starších psov a potkanov. Niekoľko predklinických štúdií ukázalo, že fenserín znižuje hladiny APP v kultivovaných bunkách a v mozgu zvieracích modelov. Bol klinicky testovaný proti AD, avšak ukázal iba mierne úspechy v úvodných klinických skúškach fázy II. Štúdie fázy II s preukázali dobrú toleranciu a ukázali určitý (ale len mierny) znak kognitívneho zlepšenia, hoci štúdia nemala dostatočnú veľkosť na riadne preskúmanie kognitívnych funkcií. Fenserín bol pozorovaný ako sľubný prostriedok pre vývoj nových stratégií na liečbu AD vzhľadom na jeho duálne anti- $A\beta$ a anti-AChE účinky. Avšak v roku 2005 biofarmaceutická spoločnosť Axonyx, Inc. oznámila, že fenserín bol neúčinný v dvoch skrátených klinických skúškach fázy III. V roku 2010 štúdia preukázala, že vysoké dávky fenserínu môžu zlepšiť symptómy pacientov s miernym až stredne ťažkým štádiom AD. V roku 2016 sa ukázalo, že disponuje taktiež necholinergickými účinkami s klinickým potenciálom. Je zaradený do zoznamu prioritných kandidátov s vyjadrením nutnosti ďalších štúdií na overenie jeho potenciálneho mechanizmu účinku u ľudí v štúdiách s adekvátnou schopnosťou pre meranie kognitívnych benefitov [89,137].

Tolserín. Štruktúra sa mierne líši od štruktúry fenserínu. V roku 2000 záver predklinických štúdií uviedol, že je 200-krát selektívnejší voči ľudskej AChE v porovnaní s BuChE. Účinnosť tolserínu voči AChE je vyššia v porovnaní s fenserínom alebo fysostigminom. Avšak jeho vedľajšie účinky alebo prínosy v predklinických a klinických modeloch sú nejasné [89].

Látky odvodené od THA. Od jeho stiahnutia z trhu bol Takrín použitý ako vedúca zlúčenina a kombinoval sa s množstvom ligandov na vytvorenie látok so zameraním na

viacero cieľov (MTDLs) alebo liečiv na boj proti viacnásobným aspektom AD. Vzniklo mnoho významných štruktúr, z ktorých si predstavíme len niekoľko.

Úspešné pokusy o syntézu potenciálnych inhibítorov AChE viedli k vývoju série analógov bistakrínu spojených alkylénovým reťazcom. Niektoré dimerické molekuly z tejto série preukázali väčšiu účinnosť a selektivitu voči AChE ako takrín. Medzi týmito molekulami sa vynikajúco osvedčil **bis(7)takrín**, u ktorého sa zdá, že má schopnosť potláčať BACE-1, znižuje množstvo intracelulárneho aj sekretovaného A β bez ovplyvnenia expície APP v neuronálnych bunčných kultúrach, znižuje agregáciu A β indukovanú AChE a je antagonistu γ -aminomáslovej kyseliny typu A [88, 134].

Heptylénom spojený bis-(6-chlóro)-takrín, ktorý dosiahol účinnosť 3000-krát väčšiu než takrín pri inhibícii AChE u potkanov. Je 3-krát silnejší ako bis(7)takrín pri inhibícii AChE u potkanov. Vloženie halogénu na 6-pozíciu výrazne zvýšilo účinnosť inhibície AChE s AChE/BuChE selektivitou .

Ďalšia skupina zahŕňala **hybridy takrín-benzoátov** (alebo fenylacetátov alebo kyselín cinnamových). Najúčinnějšía zlúčenina z tejto série nielen preukázala vynikajúcu inhibičnú aktivitu voči AChE, ale aj zaujímavú schopnosť zabraňovať agregácii A β .

Hybridy takrínu s benzofuranovými derivátmi preukázali výbornú aktivitu pri inhibícii AChE v submikromolárnom rozpätí a schopnosť inhibovať agregáciu A β . Účinnosť týchto zlúčenín závisela od veľkosti spojovacieho článku a substitučných skupín v každej hlavnej štruktúre [88,134].

Homodiméry takrínu predstavujú potenciálne zlúčeniny s MTDLs účinky. Heptametylenové spojenie zlúčeniny 17 bolo nahradené štruktúrou cystaminu, čím vznikla zlúčenina X18. Tento dimér vykazoval nižšiu toxicitu a vyššiu schopnosť pôsobiť ako inhibítor cholinesteráz, a to ako proti AChE , tak proti BuChE. Taktiež je schopný inhibovať agregáciu A β a prejavuje neuroprotektívne účinky proti oxidatívne mu poškodeniu.

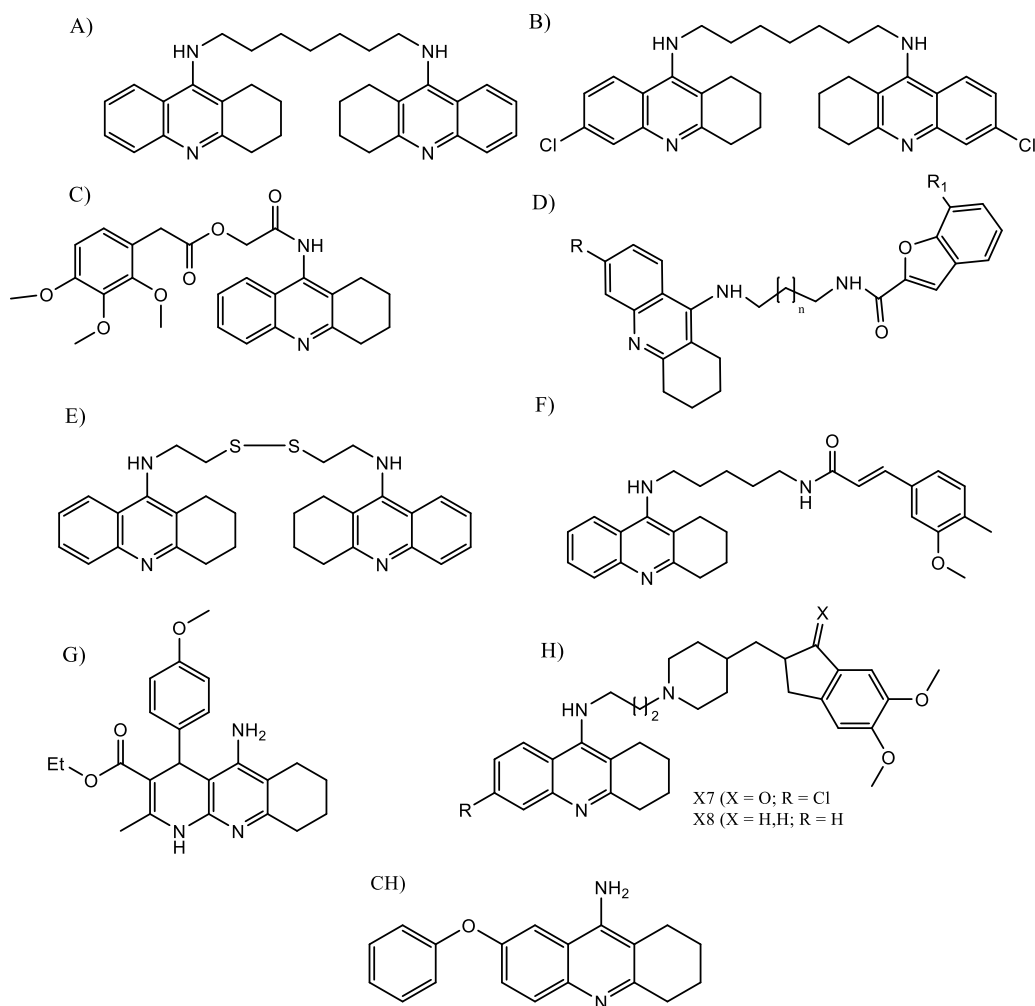
Heterodiméry takrín-ferulovej kyseliny sa vytvárajú spojením týchto dvoch samostatných štruktúr pomocou polymetylén-diamínu. Antioxidačné vlastnosti ferulovej kyseliny a jej schopnosť poskytovať neuroprotekciiu proti toxicite A β 42 v *in vitro* a *in vivo* experimentoch viedli k výberu tejto zlúčeniny. Táto zlúčenina je nekompetitívnym reverzibilným inhibítorom AChE.

Takripyríny boli vyvinuté kombinovaním vápnikového antagonistu 1,4-dihydropyridín s Takrínom, s cieľom potlačiť AChE a zároveň zastaviť L-ty p Ca²⁺ kanály. Bunečná smrť nastáva v dôsledku nadmerného prúdu Ca²⁺ cez L-ty p Ca²⁺ kanály.

Pri AD narušenie hladiny Ca^{2+} podporuje hyperfosforyláciu Tau a produkciu $\text{A}\beta$. Inhibujú AChE-indukovanú agregáciu $\text{A}\beta$ a môže preniknúť cez hematoencefalickú bariéru a predstavujú látky silnejšie ako donepezil [134].

Heterodiméry takrín-donepezil boli vytvorené nahradením benzénovej časti donepezilu takrínom spojeným polymetylénom. S hodnotou $\text{IC}_{50} = 0,27 \text{ nM}$ bol zistený X7 ako najmocnejší AChEi. AChE-indukovaná agregácia $\text{A}\beta$ bola potlačená zlúčeninami X7 a X8, pričom pri koncentrácii $100 \mu\text{M}$ dosiahli potlačenie o 46,1 % a 65,9 % [134]. V modernom vývoji liekov, najmä so zameraním na viacero aspektov patológie ochorenia, je hlavným aspektom zabezpečenie vyváženej afinity liečiva k jeho cieľovým molekulám. Často diskutovaná stratégia zahŕňa súčasné inhibovanie enzýmu AChE a NMDARs. Zlúčeniny označované ako "hybridné zlúčeniny", často nemajú požadované vlastnosti liečiv. Ich nedostatky predstavujú zlú rozpustnosť vo vode, nežiaduce účinky mimo cieľového miesta a obmedzenú schopnosť prechodu cez hematoencefalickú bariéru. Preto sľubnejším prístupom je zmenšenie veľkosti molekuly, pričom sa zachováva ich schopnosť zasahovať do viacerých dráh.

Inšpirácia pozitívnymi účinkami 7-MEOTA viedla k vytvoreniu derivátu THA s lepšími farmakologickými vlastnosťami: **7-fenoxytakrín** (7-PhO-THA). Preukázal strednú a neselektívnu účinnosť voči AChE a BuChE. Hoci jeho účinnosť je takmer o 3 rády menšia než účinnosť donepezilu, afinita bola vyššia než v prípade 7-MEOTA. Vyvážená a stredná aktivita je výhodná v prípade žiadaného účinku na viacero cieľov. Údaje ukázali, že THA a 7-MEOTA sú "*foot-in-the-door*" blokátory otvorených kanálov NMDARs. V tejto súvislosti sa študoval mechanizmus inhibície 7-PhO-THA na NMDARs podjednotky (GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B). Po prevedení viacerých testov sa dospelo k záveru, že 7-PhO-THA má silný inhibičný účinok na podjednotky GluN1/GluN2B, ktorý je nezávislý na napätí a prejavuje sa aj u GluN1/GluN2A a GluN1/GluN2B. Podľa prevedených štúdií molekulárneho dokovania je inhibičný účinok sprostredkovaný jadrom 1,2,3,4-tetrahydroakridínu 7-PhO-THA upevnené pomocou niekoľkých odlišných hydrofóbných interakcií a hlavne 7-phenoxy časť 7-PhO-THA sa viaže do toho istého miesta ako látka ifenprodil. Ifenprodil je silný negatívny alosterický modulátor, ktorý selektívne inhibuje GluN2B podjednotku NMDARs. Dostupnosť 7-PhO-THA v CNS a celkový behaviorálny profil sú sľubné pre ďalšie preskúmanie terapeutických účinkov po systémovom podaní [138,139].



Obr. 1: Prehľad vybraných štruktúr odvodených od Takrínu. A) štruktúra bis(7)takrínu, B) bis-(6-chlóro)-takrín [88]; C) štruktúra zastupuje skupinu hybridov takrín-benzoátov [136]; D) štruktúra zastupuje skupinu hybridov takrínu s benzofuranovými derivátmi [88]; E) štruktúra zastupuje skupinu homodimérov takrínu , F) štruktúra zastupuje skupinu heterodimérov takrín-ferulovej kyseliny, G) štruktúra zastupuje skupinu Takripyrínov, H) látky X7,X8 predstavujú štruktúru heterodimérov takrín-donepezil [134]; CH) štruktúra 7-fenoxytakrínu [135].

3.1.3 NMDA antagonisti

Memantin. Nekompetitívny antagonista NMDARs, ktorý pôsobí proti negatívnym účinkom vysokých koncentrácií glutamátu v mozgu. Je schválený pre liečbu stredne ťažkej až ťažkej AD. Bolo u neho preukázané zlepšenie kognitívnych schopností a liek pro liečbu stredne ťažké až ťažké Alzheimerovy choroby, bola preukázané zlepšení kognitívnych schopností [92].

3.2 Terapeutické stratégie zamerané na A β

Antiamyloidné liečivá modifikujúce priebeh ochorenia sú zamerané na tri hlavné mechanizmy účinku [87,93]:

1. redukciu produkcie A β ₄₂ (inhibítory sekretázy: inhibítory sekretáz
2. redukciu záťaže A β -plakov prostredníctvom inhibítorov agregácie
3. podporu očistenia/odstránenia A β pomocou aktívnej alebo pasívnej imunoterapie.

3.2.1 Modulátory a inhibítory sekretáz

Aktivácia α -sekretázy je sprostredkovaná fosfatidylinostol 3-kináza PI3K/Akt⁹ dráhy cez/ prostredníctvom signalizácie receptormi GABA.

Etazolate (EHT0202). Je zaradený medzi modulátory α -sekretázy, ktoré pôsobia ako selektívny modulátor receptorov GABA. Bol testovaný vo fáze II klinického skúšania, pričom preukázal svoju bezpečnosť a dobrú toleranciu u pacientov s miernou až stredne ťažkou AD. Napriek tomu stále čaká na vykonanie fázy III klinického skúšania.

APH-1105 a ID1201 sú liečivá, ktoré aktivujú PI3K/Akt dráhu. V súčasnosti sú vo fáze II klinických skúšok [92,95].

Z dôvodu nepredvídateľných výziev boli nedávno zastavené klinické štúdie s inhibítormi BACE ako sú **lanabecestat**, **verubecestat** a **atabecestat**. Fáza III šetrenia s lanabecestatom bola zastavená kvôli nedostatku účinnosti. Štúdie s verubecestatom a atabecestatom boli zastavené tiež kvôli neúčinnosti a obavám o bezpečnosť. U verubecestatu šlo o nedostatočnú účinnosť u ľahkej a stredne ťažkej demencie spôsobenej AD, liečba bola spojená s vyrážkami, pádmi a neuropsychiatrickými symptómami.

Všetky tieto látky redukovali hladinu A β ₄₂ v CSF v dávkovo závislom spôsobe, ale neposkytli žiadne kognitívne alebo funkčné výhody. Niektoré z nich boli zle tolerované a neúčinné u osôb s prodromálnou formou AD. Tieto zistenia podporujú myšlienku, že zastavenie tvorby A β nemusí byť dostatočné na zabránenie progresie ochorenia. Mechanizmus spôsobujúci relatívne akútne zhoršovanie účinkov (mierny až stredný vplyv na kogníciu) pre niektoré z týchto látok je neznámy, návrhy vysvetľujúce tento jav

⁹ Fosfoinositid-3-kináza (PI3K) a proteínová kináza B (PKB), známa ako Akt, sú kinázy, ktoré sú súčasťou mnohých signálnych dráh. Narušenie ich funkcie sa považuje za kľúčovú charakteristiku rôznych ochorení. Predpokladá sa, že participujú pri vývoji AD. Kľúčovým krokom v patogenéze AD je fosforylácia, ktorá je stále plne nepochopená. Výsledky niekoľkých *in vitro* experimentov a pokusov na modeloch zvierat podporujú predstavu, že zvýšená aktivácia dráhy PI3K/Akt sa môže javiť ako preventívna voči patogénnym mechanizmom AD [96].

zahŕňajú príliš rýchle potlačenie produkcie a hladín $A\beta_{42}$, nežiaduce účinky mimo cieľného pôsobenia, vrátane inhibície BACE-2.

Testovanie **elenbecestatu** (CNP520) sa tiež nedávno stretlo s vážnymi ťažkosťami, ktoré viedli k ukončeniu niekoľkých klinických skúšok s látkami tejto triedy.

Fáza III klinického skúšania ukázala, že Semagacestat (LY-450139) nezlepšil kognitívne schopnosti a v prípade pacientov užívajúcich vyššiu dávku spôsobil zhoršenie funkčnej kapacity, ako aj zvýšené riziko rakoviny kože a infekcií, čím bolo jeho klinické testovanie v tejto fáze zastavené.

V prípade **avagacestatu** (BMS-708163) sa pozorovalo zhoršenie príznakov ochorenia a atrofia mozgu v porovnaní s kontrolnou skupinou, ako aj množstvo vedľajších účinkov vrátane rakoviny kože a poruchy funkcie obličiek. Vývoj bol zastavený vo fáze II.

Ďalšou terapeutickou alternatívou v tejto skupine je **tarenflurbil** (r-flurbiprofen, flurizan), enantiomérom nesteroidového protizápalového lieku flurbiprofen. Fáza III klinickej skúšky založenej na tomto lieku bola zastavená kvôli nedostatočnej účinnosti a nízkej penetrácii do mozgu.

Vzhľadom na vedľajšie účinky inhibitorov γ -sekretázy je ich úloha v farmakologickom prístupe k AD momentálne spochybňovaná. **Inhibítory γ -sekretázy** už nie sú považované za vhodný cieľ pre liečbu AD kvôli vážnym bezpečnostným obavám. Tento enzým pôsobí aj na iných úrovniach. Interferuje s proteínom NOTCH, ktorý tvorí dôležitú zložku pre komunikáciu a diferenciáciu buniek. To by mohlo vysvetliť zlyhanie liečby založenej na tejto dráhe v rôznych klinických skúškach [92,93,95].

3.2.2 Redukcia $A\beta$ -plakov zásahom do agregácie

Scyllo-inositol (ELND005) orálna antiagregačná látka proti $A\beta$. V predklinických štúdiách spomalil postup patológie AD tým, že neutralizoval $A\beta_{42}$ oligoméry, inhiboval toxické účinky na synaptický prenos, zabránil tvorbe a rozkladu vlákien $A\beta_{42}$. Fázy II klinického testovania u pacientov s miernou a stredne ťažkou AD nepreukázala jeho účinnosť a naznačila toxicitu vyšších testovaných dávok (vrátane úmrtí a infekcií). Ďalší vývoj lieku s najnižšou dávkou (250 mg) sa za posledných niekoľko rokov neposunul. Scyllo-inositol bol posledným inhibítorom agregácie testovaným na ľuďoch vo fáze II a štúdia bola zastavená kvôli obmedzeným dôkazom podporujúcich jeho prínos a vážnym obavám o toxicitu.

V súčasnosti sa výskum zameriava na využitie peptidomimetík, ktoré inhibujú alebo zvrátia agregáciu A β ₄₂ [92,93,95].

Peptidomimetiká. Tieto peptidy sú založené na štruktúre C-terminálnych fragmentov a sekvenciách centrálného hydrofóbného jadra peptidu A β . Viazu sa na špecifické miesta A β peptidu a zabraňujú jeho zostavovaniu do amyloidných fibríl. Široká škála peptidových inhibítorov bola hodnotená v bunečných a zvieracích modeloch ako nové terapeutické zlúčeniny na inhibíciu agregácie A β . Hoci experimentálne štúdie ukázali sľubné výsledky, len málo z týchto inhibičných peptidov sa ukázalo ako dostatočne úspešné na vstup do klinických skúšok. Mnohé vykazovali proteolytickú nestabilitu, nízku priepustnosť cez hematoencefalickú bariéru a vysokú cytotoxicitu kvôli samoagregačným vlastnostiam.

16KLVFF20, peptidová sekvencia podobná hydrofóbnej jadrovej časti A β , ktorú postupne nahrádza. Sekvencia je odolná voči proteolytickej degradácii. Účinok nie je obmedzený len na prevenciu agregácie, môže taktiež rozkladať oligoméry do obmedzeného/určitého stupňa. Sekvencia vyvolávala dávkovo-závislú inhibíciu fibrilácie A β ₄₂, avšak bola cytotoxická vzhľadom na vysokú schopnosť samoagregácie. Z tohto dôvodu sa začali vytvárať konjugáty (napr. s kopolymérom mliečnej a glykolovej kyseliny, β -cyklodextrínom), ktoré dokázali zredukovať samoagregačné schopnosti.

Nová trieda peptidomimetík, ktorá je predmetom výskumu predstavuje γ -peptidy, ktoré môžu byť až 100-krát účinnejšie než KLVFF ako inhibítory agregácie. Musia však ešte podstúpiť testovanie *in vivo* [92,95,143].

3.2.3 Obmedzenie tvorby, podpora odstraňovania A β plakov

Pasívna imunoterapia zahŕňa výrobu monoklonálnych protilátok proti A β *in vitro* a následné priame infúzie týchto protilátok do subjektov. Mechanizmus je naznačený prostredníctvom narušenia terciárnej štruktúry plaku a jeho následného rozkladu, ktoré vyplývajú z interakcie medzi protilátkou a A β agregátom. Hlavnými nevýhodami tejto triedy liekov sú mozgové mikrohemorágie a vazogénny edém [92,100].

I. generácia: Bapineuzumab. Je humanizovaná myšia protilátka proti reziduám 1–5 na N-terminálnom konci proteínu A β . Vo fáze III štúdie s 1331 osobami s miernou alebo strednou formou AD nepreukázal bapineuzumab rozdiel v primárnom kognitívnom výsledku v porovnaní s placebom, avšak vyvolal redukcie hromadenia A β . Tento negatívny výsledok môže byť spojený s tým, že snímanie mozgu pomocou PET nebolo v tej dobe široko dostupnou zobrazovacou technikou. Status amyloidového stavu mozgu

pomocou PET zobrazenia nebol pri použití na zaradenie účastníkov do tejto štúdie. To mohlo prispieť k zaradeniu účastníkov s demenciou, ktorá nie je spojená s hromadením amyloidov v mozgu, čo by mohlo zavádzať výsledky a brániť určeniu účinnosti bapineuzumabu ako proti-amyloidnej terapie [100].

II. generácia: Solanezumab je humanizovaná monoklonálna protilátka typu IgG1 proti A β , ktorá vychádza z myšieho prekursora vyšetrovaného voči strednej časti A β . Rozpoznáva lineárny epitop strednej domény (zvyšky 16–26) molekuly A β , ktorá je ukotvená v oligoméroch a fibrilách. Zasahuje preto iba do rozpustných monomerných A β . Solanezumab uľahčuje periférny záchytný efekt (peripheral sink) pričom z mozgu smeruje tok A β do plazmy a znižuje synaptickú toxicitu. Vo fáze III klinických skúšok EXPEDITION a EXPEDITION 2 pre mierne a stredné štádia AD, bol dobre tolerovaný. Pričom prakticky nedošlo k výskytu ARIA zavinených liekom, hoci liek nemal vplyv na pokles kognície alebo funkcie v porovnaní s placebom. Síce boli hotové štyri z fáz III klinických skúšok v roku 2012 a ukončené v roku 2017, jedno z testovania vo fáze III klinických skúšok, ktoré hodnotí účinnosť spomalenia tvorby plakov a kognitívneho postihnutia, bude ukončené v roku 2023. 9. marca 2023 vydalo National Institute of Aging (NIA) stanovisko, že nespomalil kognitívny úpadok u kognitívne zdravých ľudí, ktorí sú ohrození stratou pamäti a problémami s myslením v dôsledku Alzheimerovej choroby. Výsledky tiež naznačujú, že liek nezabránil hromadeniu mozgového A β , charakteristického znaku AD [99,100].

Gantenerumab. Vytvorený zo syntetickej *human antibody phage display library* a *in vitro* zrenia na A β fibrilách. Redukuje fibrilárne A β aktiváciou gliových buniek a indukciou fagocytózy. Zameriava sa na nerozpustné fibrilárne A β a rozpoznáva konformačne špecifickú N-terminálnu až strednú doménu.

13. novembra 2022 boli oznámené výsledky skúšok GRADUATE I a II, kde sa podkožne podával gantenerumab účastníkom s ľahkým postihnutím kognitívnych schopností (MCI) a miernym AD počas 27 mesiacov, nedosiahli primárny cieľ spomaliť klinický pokles na stupnici *Clinical Dementia Rating – Sum of Boxes (CDR-SB)*¹⁰. To predstavuje relatívne zníženie klinického úpadku o 8 % v GRADUATE I a o 6 % v GRADUATE II v porovnaní

¹⁰ CDR-SB je nástroj používaný na meranie závažnosti demencie a kognitívneho postihnutia u pacientov s Alzheimerovou chorobou a inými typmi demencie. Skóre CDR-SB sa získava sčítaním hodnotení pacientov v rôznych oblastiach, ako sú kognitívne schopnosti, funkčný stav, správanie a schopnosť vykonávať bežné denné činnosti. Vyššie skóre CDR-SB naznačuje závažnejšie postihnutie. Tento nástroj sa používa v klinických skúškach na sledovanie priebehu ochorenia a účinnosti liečby u pacientov s demenciou [162].

s placebom. Symptomatická ARIA-E¹¹ bola zistená u 5% účastníkov na gantenerumab, zatiaľ čo ARIA-H¹² sa vyskytla vo 22,9% prípadov [98 – 101].

Crenezumab plne humanizovaná monoklonálna protilátka, ktorá sa viaže na rôzne formy A β – monoméne, oligoméne aj fibrilárne. Má však desaťkrát väčšiu afinitu k oligomérom než k monomérom. Bol navrhnutý s kosťou IgG4 triedy pre zníženie uvoľňovania zápalových cytokínov z aktivácie mikroglíí a komplementu, za súčasného zachovania fagocytózy. Tri testovania vo fáze III klinických skúšok s názvom CREAD, boli v roku 2019 ukončené, pretože analýza naznačovala, že liečba pravdepodobne nespĺní klinické ciele. Súčasné úsilie o preskúmanie terapeutického potenciálu Crenezumabu sa presunulo na pacientov s familiárnou AD a fáza II klinickej skúšky, ktorá hodnotí bezpečnosť a účinnosť Crenezumabu u týchto pacientov začala v roku 2013 a očakávalo sa, že sa ukončí v roku 2022. Bohužiaľ, NIA vydalo stanovisko zo 16. júna 2022 k výsledkom z klinických testov, že Crenezumab neukázal štatisticky významný klinický prospech u ľudí s dedičnou formou Alzheimerovej choroby [99,100,102,145].

III. generácia: Aducanumab. Ľudská IgG1 monoklonálna protilátka zameraná na aminokyseliny 3 – 7 A β peptidu, špecifické pre A β plaky. FDA formálne prijala štandardný postup schvaľovania pre preskúmanie v auguste 2020. V tom istom roku, nezávislý poradný výbor FDA hlasoval proti schváleniu so zdôvodnením, že údaje prezentované v dostupných štúdiách nedostatočne podporujú jeho klinickú účinnosť. Aducanumab vykazoval malé účinky na kognitívne postihnutie a vyvolával vedľajšie účinky u veľkého percenta pacientov (ARIA, zmätenosť, závraty, nevoľnosť a bolesti hlavy). Napriek tomu, sa FDA rozhodla schváliť liek na základe údajov o redukcii A β plakov zaznamenaných PET zobrazovacou technikou. Z tohto dôvodu bolo rozhodnuté o urýchlennom schválení. Táto zrýchlená schválená cesta zvolená pre aducanumab, je určená pre lieky zamerané na závažné ochorenia, ktoré majú očakávanú významnú pridanú hodnotu oproti dostupnej terapii, aj keď existuje reziduálna neistota o konečnom klinickom prospechu. Schválenie je podmienené vykonaním potvrdzujúcej fázy IV klinického skúšania, ktorá by mala poskytnúť ďalšie dáta o účinnosti a bezpečnosti lieku. 7. júna 2021 bol Aducanumab schválený FDA ako prvý liek z triedy DMTs.. Toto rozhodnutie nenasledovala Európska lieková agentúra (EMA) [98,99].

Donanemab (LY3372993,N3pG). Je humanizovaná IgG1 protilátka, ktorá sa zameriava na pyroglutamyl E3 A β peptid (A β p₃₋₄₂) – forma N-terminálne skráteneho A β

¹¹ ARIA-E = amyloid-related imaging abnormality - edema

¹² ARIA-H = amyloid-related imaging abnormality - hemorrhage

prítomná iba v stabilných A β plakoch. Bol vyvinutý ako protilátka špecifická pre plaky a aby prekonal problém s rozpustnými formami A β , ktoré by mohli blokovat' rozpoznanie usadených agregátnych foriem. Odstránenie plakov donanemabom je sprostredkované aktiváciou mikroglií. V jednej zo štúdií žiaden z účastníkov neprejavil ARIA. Avšak donanemab bol veľmi imunogénny a indukoval tvorbu anti-donanemab protilátok u 90 % účastníkov. Donanemab splnil svoj primárny parameter, pričom liečba spomalila kognitívny pokles v priemere o 35 % v porovnaní s placebom [97,100]. Pre donanemab bolo pôvodné zrýchlené schválenie FDA na základe výsledkov fázy II klinickej skúšky, zamietnuté v januári 2023. Bola vyžiadaná potvrdzujúca fáza III skúšky TRAILBLAZER-ALZ 2. Výsledky budú následne slúžiť ako základ pre podanie žiadosti o tradičné schválenie donanemabu. Eli Lilly and Company predstavila 17. júla 2023 výsledky štúdie TRAILBLAZER-ALZ 2 z fázy III, ktoré ukazujú, že donanemab významne spomalil kognitívny a funkčný úpadok u ľudí s ranými symptómami AD [108,146].

Lecanemab (BAN2401) je humanizovanou verziou myšieho mAb158, vytvoreného proti A β protofibrilom nesúcim mutáciu strednej-A β -domény arktickej mutácie APP. 27. septembra 2022 boli oznámené výsledky z klinickej štúdie CLARITY, že lecanemab dosiahol štatisticky významné spomalenie klinického priebehu ochorenia v klinickom hodnotiacom nástroji CDR-SB. Nálezy podporujú pozitívny vzťah medzi mierou zníženia A β a stupňom klinického zlepšenia. Všetky biomarkery Tau patológie a neurodegenerácie v CSF a plazme tiež favorizovali lecanemab pred placebom, čo výrazne podporuje predpoklad modifikácie ochorenia. Lecanemab bol 6. januára 2023 schválený FDA prostredníctvom rýchleho schvaľovacieho postupu ako druhý liek vôbec na liečbu AD. Tradičné schválenie prebehlo v júli 2023. Žiadosti o povolenie na uvádzanie na trh boli podané u EMA a agentúry pre liečivá a zdravotnícke výrobky vo Veľkej Británii [98,108].

3.3 Terapeutické stratégie zamerané na Tau proteín

Zatiaľ nie sú schválené žiadne látky na liečbu tauopatií. V súčasnosti zahŕňajú terapie zamerané na Tau hlavne mediátory posttranslačných modifikácií Tau, imunoterapiu proti Tau (aktívnu a pasívnu), inhibítory agregácie Tau, stabilizátory mikrotubulov a génovú terapiu, látky modifikujúce priebeh choroby, ktoré sú vyvinuté pre AD alebo iné tauopatie [103].

3.3.1 Zásah do mediátorov posttranslačných modifikácií Tau

Rôzne kinázy sú známe tým, že spôsobujú hyperfosforyláciu Tau, napríklad GSK-3 β , ktorá je hlavnou kinázou pre Tau. Tieto kinázy sú nadmerne aktivované počas priebehu Alzheimerovej choroby a iných tauopatií.

Lithium primárne schválené ako stabilizátor nálady u bipolárnej poruchy. Zistilo sa, že redukuje hyperfosforyláciu a agregáciu Tau u transgénnych myší prostredníctvom mechanizmu, ktorý závisí od inhibície GSK3 β . Podľa štúdie s identifikátorom NCT01055392, dlhodobá liečba Lithiom v subterapeutických dávkach, zmierni kognitívny a funkčný úpadok pri amnestickom MCI. Pre hodnotenie jeho bezpečnosti a účinnosti nižšej dávky Lithia u pacientov s miernym až ťažkým štádiom AD, prebieha testovanie, ktoré začalo v roku 2022 a jeho ukončenie sa očakáva v júni 2024 (NCT05423522) [103,104].

Tideglusib (NP031112, Nypta, Zentylor, NP12). Derivát thiadiazolidinonu, pôsobí ako nekompetitívny inhibítor GSK-3 β , ktorý nezasahuje do ATP. Uvádza sa, že redukuje fosforyláciu Tau a má protizápalové účinky v zvieracích modeloch. Klinické štúdie u pacientov s miernym až stredným štádiom AD mali negatívne klinické výsledky. Bol novou malou molekulou špeciálne navrhnutou ako inhibítor GSK3 β . V myšom/myšacom modeli redukoval hyperfosforyláciu a agregáciu tau, chránil pred stratou neurónov a zabránil deficitom pamäte .

V prevedených klinických skúškach ARGO a TAUROS bola liečba tideglusibom síce dobre znášaná, ale chýbala účinnosť. Už sa ďalej nevyvíja pre neurodegeneratívne ochorenia, aj keď stále prebiehajú skúšky hodnotiace jeho účinnosť u myotonickej dystrofie (NCT02858908) a poruchy autistického spektra (NCT02586935) [103,104].

MK-8719. Podporujúc hypotézu, že zameranie sa na *O*-GlcNAcasu (OGA) môže znížiť hyperfosforyláciu Tau proteínu, bola zistená účinnosť inhibítora OGA (Thiamet-G) v znížení množstva patologických agregátov Tau proteínu u transgénnych myší. Následne bola vyvinutá malá molekula s názvom MK-8719 spoločnosťou Alectos Therapeutics v spolupráci s firmou Merck, ktorá preukázala podobné účinky na transgénnych myších modeloch. Vo fáze I testovania bola MK-8719 dobre tolerovaná a preukázala schopnosť zasiahnuť cieľový proteín. V roku 2016 oznámila spoločnosť Alectos, že MK-8719 bude podrobená klinickým skúškam na pacientoch s progresívnou supranukleárnou paralýzou. Avšak táto klinická skúška nikdy nezačala a spoločnosť Merck odvtedy ukončila vývoj tohto lieku [104].

3.3.2 Inhibítory Tau agregácie

LMTM. Spoločnosť TauRx Therapeutics vyvíja perorálne podávaný liek proti agregácii Tau, hydrometyltionín mesylát (medzinárodný nechránený názov pre leukometyltionium bis(hydrometánsulfonátu), LMTM).

Klinický vývoj začal s látkou metyltinionium chlorid (bežne známym ako metylenová modrá). V klinickej štúdií fázy II, pre ľudí s ľahkou až stredne ťažkou AD, sa ukázalo, že metyltinionium chlorid znížil kognitívny a funkčný metabolický úpadok mozgu. Neskôr bol vyvinutý hydrometyltionín mesylát, aby sa predišlo obmedzeniam absorpcie závislým od dávky, ktoré sa vyskytovali pri metyltinionium chlorid. Vývoj tejto látky stále prebieha vo fáze III klinickej skúšky s názvom LUCIDITY [105,106].

Masitinib je perorálny inhibítor tyrozínkinázy, ktorý preukázal neuroprotektívne účinky pri neurodegeneratívnych ochoreniach, prostredníctvom inhibície aktivity mastocytov a mikroglíí/makrofágov. Má schopnosť hromadiť sa v CNS v terapeuticky relevantnej koncentrácii. Bolo preukázané, že dokáže obnoviť výkonnosť priestorového učenia a podporiť obnovu synaptických markerov v myšom modeli AD, pričom jeho protektívny účinok na synapsie je priamo spojený s inhibíciou mastocytov.

V klinickej štúdií AB09004 (NCT01872598) bol Masitinib (4,5 mg/kg/den) podávaný ako doplnková terapia k štandardnej starostlivosti u pacientov s miernou až stredne ťažkou demenciou spôsobenou pravdepodobnou AD. Liečba výrazne spomalila kognitívne zhoršenie merané primárnym ukazovateľom ADAS-cog s akceptovateľnou bezpečnosťou [107].

Saracatinib (AZD0530) je perorálny inhibítor kináz rodiny rodinu Src, vrátane Fyn. Oligomérny A β peptid sa viaže na bunkový prionový proteín na povrchu neurónových buniek, aktivuje intracelulárnu kinázu Fyn na mediáciu synaptotoxicity a tauopatie. AZD0530 bolo pôvodne vyvinutý s cieľom zasiahnuť patogénne signálne dráhy prítomné u kancerogénnych ochorení. Oproti placebo nevykazoval štatisticky významné liečebné účinky, ale boli zaznamenané jeho tendencie k spomaleniu poklesu objemu hipokampu a hrúbky entorhinálneho kortexu [109,110].

3.3.3 Pasívna imunoterapia zameraná na Tau

Semorinemab (spoločnosti AC Immune SA, Genentech a Roche) je humanizovaná IgG4 protilátka namierená proti extracelulárnemu Tau, ktorá bola navrhnutá na zníženie mikrogliami sprostredkovanvej mozgovej zápalovej reakcie. V klinických skúškach vo fáze II z roku 2017 sa zistilo, že 0,3 % Semorinemabu vstúpilo do CSF, a koncentrácia

N-terminálneho Tau v CSF sa zvýšila, čo naznačovalo, že protilátka sa zameriava na Tau proteín. Napriek tomu neznížil markery neurodegenerácie a zápalu. Spustenie fázy III závisí od výsledkov fázy II z roku 2019, ktoré sa má ukončiť v roku 2023 [99].

Podľa záznamov je štúdia o hodnotení účinnosti a bezpečnosti Semorinemabu u pacientov s predromálnou až miernou formou AD (identifikátor NCT03289143), ukončená. Ako dôvod ukončenia sa uvádza, že analýzy tejto štúdie nepreukázali žiadne dôkazy o klinickej účinnosti alebo modulácii akumulácie Tau pri žiadnych z testovaných dávok [147].

JNJ-63733657 (spoločnosť Janssen) je humanizovaná IgG1 monoklonálna protilátka, ktorá bola selektovaná pre ciele oblasti viazania mikrotubulov Tau a na narušenie šírenia agregovaného Tau medzi bunkami. Prvá klinická skúška fázy I z roku 2017 uviedla, že monoklonálna protilátka je bezpečná a dobre tolerovaná. Ďalšia klinická skúška fázy I z roku 2019 uviedla, že do CSF vstúpilo približne 0,2 % tejto protilátky a došlo k dávkovo závislému zníženiu Tau s fosforyláciou na pozícii S217. Klinická skúška fázy II začala v januári 2021 a očakáva sa, že potrvá do roku 2025 [99].

E2814 (spoločnosť Eisai) je humanizovaná IgG1 monoklonálna protilátka, ktorá bola taktiež selektovaná pre ciele oblasti viazania mikrotubulov Tau, schopná prezentovať špecifické kľúčové epitopy pre minimalizovanie ďalšej agregácie Tau.

V decembri 2019 bola Eisai spustená fáza I klinického skúšania. V roku 2021 pridali do štúdie fáza viacnásobného postupného zvyšovania dávok. V marci 2021 bol E2814 zvolený na hodnotenie v DIAN-TU štúdiu ako prevencia u ľudí s patogénnymi mutáciami APP a presenilínových génov, dominantne dedičná AD. Dizajn štúdie DIAN-TU bol v novembri 2021 upravený na umožnenie použitia anti-amyloidovej protilátky lecanemab. Účastníci s normálnou kogníciou začnú s E2814 alebo placebo počas jedného roka. Následne bude pridané podávanie lecanemabu. Primárnym cieľom štúdie je šírenie Tau počas liečby E2814, merané pomocou Tau PET. Sekundárne výsledky v tejto skupine zahŕňajú zmenu v kognitívnej kompozite, amyloidnom PET atď. Spoločnosť Eisai oznámila prvú registráciu pacienta v januári 2022 a štúdia by mala trvať až do roku 2027 [99,148].

Bepranemab (spoločnosť UCB Biopharma SRL) je humanizovaná monoklonálna protilátka triedy IgG4, vybraná pre svoju účinnosť v blokovaní ľudských Tau jadier *in vitro*. Bol pôvodne testovaný v klinických skúškach fázy I zameraných na bezpečnosť, tolerovateľnosť a účinnosť voči progresívnej supranukleárnej paralýze (PSP). V

súčasnosti sa testuje v klinickej skúške fázy II na AD, ktorej ukončenie sa očakáva v roku 2025 [99].

Gosuranemab je humanizovaná monoklonálna protilátka triedy IgG4, zameraná proti Tau, viaže sa na extracelulárnu N-terminálnu časť. Bolo zistené, že extracelulárne fragmenty Tau spôsobujú medzibunkové šírenie zhlukov Tau. Fáza I štúdií splnila ciele týkajúce sa bezpečnosti a tolerovateľnosti v zmysle interakcie protilátky s cieľovými fragmentmi Tau. Štúdia TANGO (NCT03352557) bola ukončená vo fáze II, z dôvodu nedostatočnej účinnosti [112,149].

Tilavonemab (ABBV-8E12, C2N 8E12, HJ8.5) je humanizovaná monoklonálna protilátka triedy IgG4, navrhnutá pre blokovanie šírenia Tau patológie z vonkajších zdrojov a blokovanie prijímania patologického Tau neurónmi .

Vo fáze II klinickej štúdie AbbVie (NCT02880956) u pacientov s včasnou formou AD bol síce zásah do cieľového miesta potvrdený poklesom voľného Tau v CSF a vyšším celkovým Tau v plazme, ale protilátka nepreukázala žiadnu terapeutickú účinnosť. V júli 2021 oznámila spoločnosť AbbVie, že zastaví vývoj tilavonemabu a stiahne ho zo svojho vývojového programu [112,113,150].

Zagotenemab je humanizovaná protilátka proti Tau proteínu, ktorá znižuje hladiny hyperfosforylovaných zhlukov Tau v myších modeloch.

Do klinického testovania (NCT03518073), boli zapojení pacienti s včasnou symptomatickou AD a progresívnym úpadkom pamäte. V októbri 2021 spoločnosť Lilly vo svojom telefonickom stretnutí so investormi oznámila, že klinická skúška nespĺnila svoj primárny cieľový bod a spoločnosť ukončuje vývoj lieku zagotenemab [112,151].

3.4 Aktívna imunoterapia u AD

Aktívna imunoterapia, predstavuje účasť imunitného systému subjektu na produkcii protilátok proti A β , ktoré zabezpečujú odstránenie A β alebo prevenciu jeho ukladania. Aktívna imunizácia proti A β bola zvolená ako stratégia v klinických skúškach ľudskej AD, na základe štúdií na transgénnych myších modeloch, ktoré naznačovali, že aktívna imunizácia redukuje ukladanie A β a kognitívny úpadok. AN-1792, prvá ľudská očkovacia látka u AD zložená z peptidu A β ₄₂ a formulovaná s adjuvans QS21¹³. Roku 2002, vo fáze II, bolo jej klinické skúšanie zastavené z dôvodu meningoencefalitídy aktivovanej T-lymfocytmi, ktorá sa vyskytla u 6 % očkovaných pacientov [93,99,100].

V tejto oblasti sa pozoruje šesť látok vo fázach I, II a III klinických skúšok. U látok s označením CAD106 a CNP520 boli v roku 2020 štúdie zastavené, kvôli pozorovaným zmenám v kognitívnych funkciách, strate objemu mozgu a hmotnosti tela. Okrem toho boli vyvinuté vakcíny na vytvorenie protilátok proti A β ₄₀, medzi nimi ABvac40, GV1001, ACC-001, UB-311 a AF20513. Vakcíny, s výnimkou AF20513, sú stále vo fáze II klinických skúšok. Dosiahli celkovo sľubné výsledky. Liečba ABvac40 viedla k tvorbe protilátok proti A β ₄₀ u 92% pacientov, ktorým bol liek podaný. V prípade ACC-001, podaného osobám s miernym až stredným stupňom AD, sa zistili vyššie hladiny IgG a protilátok proti A β ₄₀ než u iných skupín. UB-311 vyvolal imunitnú odpoveď u 100 % vzorky a spomalil kognitívny úpadok. Navyše, pozorované boli len mierne vedľajšie účinky, ako napr. opuch v mieste vpichu a agitáciu [95].

Druhá generácia vakcín sa stále vyvíja a zahŕňa ACC-001, ktorá prešla testovaním vo fáze II. Vakcínu CAD106, ktorá je testovaná v iniciatíve prevencie AD (*Generation 1 prevention trial*) u nesymptomatických jedincov (homozygoti pre ApoE4) a Lu AF20513112, vo fáze II testovania v predklinických a prodromálnych štádiách AD [93].

¹³ QS21 je prírodné adjuvans typu saponínu, získavaný z kôry stromu *Quillaja saponaria*. Adjuvancia sú látky pridané do vakcín na zvýšenie imunitnej odpovede organizmu voči cieľovému antigénu. V kontexte vývoja vakcín je QS21 používaný na podporu silnejšej a dlhšie trvajúcej imunitnej reakcie, čo môže zvýšiť účinnosť vakcíny. Pomáha aktivovať imunitný systém a zvýšiť produkciu protilátok voči konkrétnym antigénom prítomným vo vakcíne. QS21 bol skúmaný a používaný v rôznych formuláciách vakcín, vrátane tých na infekčné choroby a imunoterapie rakoviny [152].

4 Metódy hodnotenia cytotoxicity/životaschopnosti buniek *in vitro*

4.1 Metódy založené na vylúčení farbiva

Trypánová modrá. Táto metóda sa používa na určenie počtu životaschopných a/alebo mŕtvych buniek v suspenzii buniek. Živé bunky majú nedotknutú bunkovú membránu, ktorá toto farbivo vylučuje, zatiaľ čo mŕtve bunky farbivo vylúčiť nedokážu. V tejto metóde sa adherentné alebo neadherentné bunky inkubujú s rôznymi dilúciami testovaných látok počas rôznych časových intervalov. Po ošetrovaní testovanou látkou sú bunky premyté a vytvorí sa suspenzia. Bunková suspenzia je zmiešaná s farbivom a vizuálne skontrolovaná, či bunky absorbovali alebo vylúčili farbivo. Životaschopné bunky budú mať priehľadnú cytoplazmu, zatiaľ čo cytoplazma mŕtvych buniek sa zafarbí na modro. Počet životaschopných a/alebo mŕtvych buniek na jednotkový objem sa určuje pomocou svetelnej mikroskopie ako percento neošetrených kontrolných buniek.

Výhody. Metóda je jednoduchá a lacná. Taktiež je dobrým ukazovateľom integrity membrány, pričom mŕtve bunky sa sfarbia do niekoľkých sekúnd od vystavenia farbivu.

Nevýhody. Počítanie buniek sa zvyčajne vykonáva pomocou hematocytometra, preto by sa mohli vyskytnúť chyby pri počítaní (~10%). Tieto chyby boli pripísané nedostatočnej homogenizácii buniek, strate buniek pri homogenizácii, nepresnému zriedeniu buniek, nesprávnemu naplneniu komory a prítomnosti vzduchových bublín v komore.

Hoci postup farbenia je pomerne jednoduchý, je ťažké spracovať veľké množstvo vzoriek súčasne, zvlášť tam, kde je potrebný presný časový sled progresívnych cytotoxických účinkov. Nedá sa použiť na rozlíšenie medzi zdravými bunkami a bunkami, ktoré sú nažive, ale strácajú bunkové funkcie. Preto táto metóda nie je dostatočne citlivá na použitie pri testovaní cytotoxicity *in vitro*. Ďalšou nevýhodou je toxický vedľajší účinok tohto farbiva na cicavčie bunky [126].

4.2 Kolorimetrické testy

Princíp spočíva v meraní biochemického ukazovateľa na hodnotenie metabolickej aktivity buniek. Reagenty v týchto metódach vyvíjajú farebnú odpoveď ako reakciu na životaschopnosť buniek, ktorú je možné zmerať využitím spektrofotometra. Testy sú použiteľné pre adherentné alebo suspendované bunkové línie, jednoduché na vykonanie a pomerne ekonomické.

MTT. (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid) Je jedným z najčastejšie používaných testov na hodnotenie cytotoxicity alebo životaschopnosti buniek. Tento test hlavne určuje životaschopnosť buniek prostredníctvom stanovenia mitochondriálnej funkcie buniek meraním aktivity mitochondriálnych enzýmov, ako je sukcinátdehydrogenáza. MTT je v tomto procese redukovaný na fialový formazán pomocou NADH, ktorý je možné kvantifikovať meraním absorpcie pri špecifickej/konkrétnej vlnovej dĺžke.

Výhody. Metóda je jednoduchá na použitie, bezpečná s vysokou reprodukovateľnosťou a široko používaná na určenie životaschopnosti buniek a testov cytotoxicity.

Nevýhody. MTT formazán je nerozpustný vo vode a v bunkách tvorí fialové ihličkovité kryštály. Preto je pred meraním absorpcie potrebné rozpustiť tieto kryštály organickým rozpúšťadlom, ako je dimetylsulfoxid (DMSO) alebo izopropanol. Navyše, cytotoxicita MTT formazánu spôsobuje problémy pri odstraňovaní kultivačného média z jamiek, z dôvodu plávajúcich buniek s kryštálmi MTT formazánu, čo vedie k značným chybám medzi jamkami [126].

MTS. (5-(3-karboxymetoxifenyl)-2-(4,5-dimetyl-tiazol)-3-(4-sulfofenyl) tetrazólium. Test je založený na premene tetrazóliovej soli na farebný formazán pomocou mitochondriálnej aktivity živých buniek. Množstvo vytvoreného formazánu závisí od počtu životaschopných buniek v kultúre a dá sa zmerať spektrofotometrom pri 492 nm.

Výhody. Štúdie naznačujú, že MTS kombinuje všetky vlastnosti dobrej meracej metódy z hľadiska jednoduchosti použitia, dostupnosti, presnosti a rýchlosti indikácie toxicity.

Nevýhody. Úroveň absorpcie meranej pri 492 nm je ovplyvnená inkubačným časom, typom buniek a ich počtom. Taktiež pomer medzi detekčnými reagentmi MTS a bunkami v kultúre ovplyvňuje nameranú úroveň absorpcie. Predchádzajúce štúdie naznačovali lineárny vzťah medzi inkubačným časom a absorpciou pre krátke

inkubačné časy do 5 hodín. Preto sú inkubačné časy vhodné pre tento test v rozmedzí 1–3 hodín [126].

XTT(2,3-bis(2-metoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-karboxanilid-2H-tetrazólium, monosodná soľ). Test je založený na schopnosti redukcie tetrazóliovej soli XTT na oranžovo zafarbené formazánové deriváty metabolicky aktívnymi bunkami. Oranžový produkt je rozpustný vo vode a jeho intenzita sa dá zmerať spektrofotometrom. Existuje lineárny vzťah medzi intenzitou zafarbenia a počtom životaschopných buniek. Použitie 96-jamkových doštičiek a spektrofotometra (alebo ELISA čítačky) umožňuje štúdium s veľkým počtom vzoriek, a získavanie výsledkov jednoducho a rýchlo. Procedúra tohto testu zahŕňa kultiváciu buniek v 96-jamkovej doštičke, prídanie reagensia XTT a inkubáciu po dobu 2–24 hodín.

Výhody. XTT je rýchla, citlivá, jednoduchá a bezpečná metóda. Má vysokú citlivosť a presnosť.

Nevýhody. Výkon testu XTT závisí od redukčnej kapacity životaschopných buniek s aktivitou mitochondriálnej dehydrogenázy. Zmeny redukčnej kapacity životaschopných buniek, ktoré sú výsledkom enzýmovej regulácie, pH, koncentrácie bunecných iónov (napr. sodíka, vápnika, draslíka), variácie bunkového cyklu alebo iných environmentálnych faktorov, môžu ovplyvniť hodnoty absorbancie [126].

LDH (laktátdehydrogenáza) môže byť použitá s rôznymi typmi buniek nielen na testovanie cytotoxicity sprostredkovannej bunkami, ale aj na hodnotenie cytotoxicity sprostredkovannej toxickými chemikáliami a inými testovanými zlúčeninami. Test kvantitatívne meria stabilnú, cytosolickú LDH. LDH je enzým, ktorý je normálne prítomný v cytoplazme bunky. Pri zníženej životaschopnosti buniek sa zvyšuje priepustnosť plazmatickej membrány a LDH sa uvoľňuje do kultivačného média buniek. Uvoľnená LDH sa meria pomocou spárovanej enzymatickej reakcie, ktorá vedie k premene tetrazóliovej soli (iodonitrotetrazólium) na červené farbivo formazán prostredníctvom diaphorázy. Aktivita LDH sa určuje ako oxidácia NADH alebo redukcia INT (iodonitrotetrazólium) počas definovaného časového obdobia. Vzniknutý červený formazán absorbuje maximálne pri 492 nm a môže byť kvantitatívne meraný pri 490 nm.

Výhody. Spoľahlivosť, rýchlosť a jednoduché hodnotenie. Strata intracelulárnej LDH a jej uvoľnenie do kultivačného média je indikátorom nezvratnej bunkovej smrti v dôsledku poškodenia bunkovej membrány.

Nevýhody. Hlavným obmedzením tohto testu je, že sérum a niektoré ďalšie zlúčeniny majú vrodenu aktivitu LDH. Preto je tento test obmedzený na podmienky bez séra alebo s nízkym obsahom séra, čo obmedzuje obdobie kultivácie pre testu a zúženie oblasti pôsobenia testu, pretože už nemožno určiť bunkovú smrť spôsobenú za normálnych podmienok rastu [126].

SRB (Sulforhodamine B) metóda na meranie cytotoxicity indukovanej liečivami u buniek kultivovaných v adherentnom aj suspenznom prostredí. SRB je svetloružové aminoxantánové farbivo s dvoma sulfónovými skupinami. V mierne kyslých podmienkach sa SRB viaže na základné aminokyselinové zvyšky proteínov v bunkách fixovaných TCA (kyselina trichloroctová), čo poskytuje citlivý ukazovateľ bunkového proteínu. SRB test sa tiež používa na hodnotenie tvorby a zániku kolónií.

Výhody. Test SRB je jednoduchý, rýchly a citlivý. Poskytuje dobrú lineárnosť s počtom buniek, umožňuje použitie saturačných koncentrácií farbiva, je menej citlivý na environmentálne fluktuácie, nezávisí na intermediálnom metabolizme a poskytuje pevný konečný bod, pre ktorý nie je potrebné meranie časovo citlivých počiatkových reakčných rýchlostí. Reprodukovateľnosť tohto testu je vysoká.

Nevýhody. Je dôležité dosiahnuť a udržiavať homogénnu suspenziu buniek. Bunkové zhluky/agregáty môžu narušiť výkonnosť testu [126].

NRU test je založený na schopnosti živých buniek prijímať supravitalné neutrálne červené farbivo. Toto slabé kationové farbivo preniká cez bunkové membrány neiónovou pasívnou difúziou a koncentruje sa v lysozómoch. Potom je extrahované zo živých buniek pomocou okysleného etanolového roztoku a absorpcia farbiva je meraná pomocou spektrofotometra. Test je tiež jedným z najviac používaných testov využívaný pre cytotoxicitu/bunkovú životaschopnosť.

Výhody. Je dobrým ukazovateľom poškodenia lysozómov. Okrem toho, rýchlosť a jednoduché hodnotenie.

Nevýhody. Minimálne alebo vôbec nie je ovplyvnený prirodzenými faktormi, ako sú teplota a slanosť. Ovplyvnený je hlavne znečisťujúcimi látkami [126].

Kryštálová violet'/fialová. Môže byť využitá na nepriame posúdenie bunečnej smrti a na určenie rozdielov v miere proliferácie po podnete cytotoxickými činidlami. V tejto metóde sa farbivo viaže na proteíny a DNA životaschopných buniek. Bunky strácajú

svoju adhéziu počas bunečnej smrti a následne sú odlúčené z populácie buniek, čo znižuje množstvo farbenia kryštálovou fialou v kultúre. Je to rýchla a spoľahlivá screeningová metóda, ktorá je vhodná na skúmanie vplyvu chemoterapeutík alebo iných zlúčenín na prežívanie buniek a inhibíciu rastu.

Výhody. Rýchla a všestranná analýza na sledovanie životaschopnosti buniek pri rôznych podmienkach stimulácie. Môže byť potenciálne ovplyvnená proliferatívnymi reakciami, ktoré sa vyskytujú súčasne s odpoveďami na bunečnú smrť.

Nevýhody. Nie je citlivá na zmeny v metabolických aktivitách buniek, z tohto dôvodu nie je táto metóda vhodná pre štúdie zamerané na látky ovplyvňujúce bunkový metabolizmus. Vhodná pre skúmanie vplyvu chemoterapeutík alebo iných látok na prežívanie buniek a inhibíciu rastu, nie je schopná merať mieru proliferácie buniek [126].

4.3 Fluorimetrické testy

Resazurin (AlamarBlue) test je založený na premenení modrého nefluorescenčného farbiva resazurin na ružové vysoko fluorescenčné farbivo resorufín, pomocou mitochondriálnych a iných enzýmov (ako diaphoráza). Množstvo produkovaného resorufínu je spojené s počtom životaschopných buniek. Pomer životaschopných buniek sa dá kvantifikovať pomocou fluorometra pri excitácii 560 nm a emisii pri 590 nm. Inkubačná doba potrebná na vytvorenie dostatočného fluorescenčného signálu nad pozadím je zvyčajne 1-4 hodiny a závisí od metabolickej aktivity buniek, hustoty buniek v jamke a ďalších podmienok, ako je typ kultivačného média.

Výhody. Je relatívne lacná a citlivejšia než tetrazóliové testy. Taktiež ju je možné spájať s inými metódami, ako je meranie aktivity kaspáz, aby sa získalo viac informácií o mechanizme cytotoxicity.

Nevýhody. Možné fluorescenčné rušenie spôsobené testovanými látkami a často prehliadané priame toxické účinky na bunky [126].

CFDA-AM. (5-karboxyfluoresceín diacetát, acetoxymetylový ester) Fluorescenčné farbivo pre stanovenie cytotoxicity. Je indikátorom integrity plazmatickej membrány a neškodný substrát esterázy, ktorý môžu životaschopné bunky premieňať pomocou nešpecifických esteráz na permeabilnú, nepolárnu, nefluoreskujúcu látku na polarizované, fluoreskujúce farbivo, karboxyfluoresceín. Len nedotknutá membrána môže udržať cytoplazmatické prostredie, ktoré je potrebné na podporu esterázovej aktivity.

Výhody. Testy CFDA-AM a alamarBlue sa ukázali ako aplikovateľné paralelne na rovnakom súbore buniek, pretože obe nie sú toxické pre bunky, vyžadujú podobné časy inkubácie a môžu byť zaznamenané pri rôznych vlnových dĺžkach bez interferencií

Nevýhody. Možné je fluorescenčné rušenie testovanými látkami [126].

4.4 Luminometrické testy

ATP predstavuje najdôležitejší chemický energetický zásobník v bunkách a je používaný na biologickú syntézu, signalizáciu, transport a pohybové procesy. Preto je bunkový ATP jedným z najcitlivejších ukazovateľov pri meraní životaschopnosti buniek. Keď sú bunky vážne poškodené a strácajú integritu membrány, stratia schopnosť syntetizovať ATP a jeho hladina v bunkách dramaticky klesne. Test ATP je založený na reakcii luciferínu na oxyluciferín. Enzým luciferáza katalyzuje túto reakciu za prítomnosti iónov Mg^{2+} a ATP, čo vedie k luminiscenčnému signálu. Existuje lineárny vzťah medzi intenzitou luminiscenčného signálu a koncentráciou ATP alebo počtom buniek. Zvyčajne dokáže detekovať menej ako 10 buniek na jamku, a preto sa často používa vo formáte doštičiek s 1536 jamkami.

Výhody. Test ATP je najrýchlejší, najcitlivejším a menej náchylným na artefakty než iné testy. Luminescenčný signál dosahuje ustáleného stavu a stabilizuje sa do 10 minút po pridaní reagentia. Nemá inkubačný krok pre konverziu substrátu na farebnú zlúčeninu. Tým sa taktiež eliminuje manipulácia s doskami.

Nevýhody. Citlivosť testu ATP je obvykle obmedzená reprodukovateľnosťou pipetovania opakovaných vzoriek do jamiek [126].

Real-time. Bola vyvinutá nová metóda na meranie počtu životaschopných buniek v reálnom čase. V tomto teste sa používa geneticky upravená luciferáza získaná z morských kreviet a malá molekula presubstrátu. Presubstrát a luciferáza sa pridávajú priamo do kultivačného média buniek ako aj pri konvenčných testoch s luciferázou. Dôležitým rozdielom je však to, že v tomto teste nie sú bunky lyzované na uvoľnenie ich vnútrobunkového obsahu. Namiesto toho životaschopné bunky absorbujú presubstrát a premenia ho na "substrát", ktorý sa difunduje do kultivačného média. Potom luciferázový enzým využíva tento substrát a generuje luminiscenčný signál., ktorý koreluje so životaschopnosťou buniek. Týmto je umožnené v reálnom čase pozorovať zmeny v životaschopnosti buniek bez narušenia vnútrobunkového prostredia. Test môže byť realizovaný v dvoch formátoch: kontinuálna analýza a meranie na koncovom bode. V

kontinuálnom sledovacom formáte je luminiscenčný signál opakovane zaznamenávaný zo vzoriek v jamkách počas dlhšieho časového úseku na meranie počtu buniek v "reálnom čase".

Výhody. Rýchly pokles luminiscenčného signálu po smrti buniek umožňuje kombinovať tento test s ďalšími luminiscenčnými testami, ktoré obsahujú krok lyzovania, ktorý zabije bunky.

Nevýhody. Obmedzením testu v reálnom čase je postupná spotreba presubstrátu metabolicky aktívnymi bunkami. Vo všeobecnosti, generovaný luminiscenčný signál koreluje s počtom metabolicky aktívnych buniek. Avšak dĺžka času, po ktorý bude luminiscenčný signál lineárny s počtom buniek, bude závisieť od počtu buniek v každej jamke a ich metabolickej aktivity. Preto sa odporúča, aby maximálny inkubačný čas na udržanie linearitu bol empiricky stanovený pre každý typ buniek a hustotu výsevu [126,130].

4.5 Prietoková cytometria

Princíp spočíva v charakterizácii alebo fenotypizácii buniek v kvapalnom prúde prostredníctvom laserov. Je to kvantitatívna analýza jednotlivých buniek. Bunky môžu byť charakterizované na základe veľkosti, zrnitosťou a tým, či nesú konkrétnu fluorescenčnú molekulu alebo nie. Metóda bola široko uplatňovaná v štúdiách toxicity a životaschopnosti buniek. Predovšetkým možno analyzovať zmeny v rozptyle dopredu (*Forward Scatter*; FCs) a do strán (*Side Scatter*; SSc) bez použitia fluorescenčných farbív. Umierajúce bunky sú zvyčajne menšie ako životaschopné bunky a vykazujú zvýšený SSc. Fluorescenčné farbenie, ktoré sa zameriava na rôzne vlastnosti živých a zdravých buniek, sa vykonáva pre presnejšiu fenotypickú analýzu životaschopnosti buniek. V prietokovej cytometrii je možné analýzu životaschopnosti buniek a ich toxicitu ľahko spojiť s inými fenotypickými farbeniami na určenie stavu diferenciácie bunkového typu, na analýzu konkrétneho bunkového typu z miešanej kultúry, na určenie stavu imunitnej aktivácie a podobne [130].

Testy asymetrie membrány. V skorých fázach bunečnej smrti, hlavne pri apoptóze, sa priepustnosť a integrita membrány zachovávajú, ale zloženie povrchu membrány sa mení. Fosfolipidy sa uvoľňujú a na vonkajšom povrchu membrány sa začína objavovať fosfatidylserín. Tieto fosfatidylseríny môžu byť fluorescenčne detegované, značením annexínom V, ktorý viaže na fosfatidylserín závislý na Ca^{2+} .

Zložitejšou metódou na zistenie zmien v membráne je vlnová /fluorescenčná ratiometria. Používa sa sonda F2N12S, ktorá má dvojfarebnú fluorescenčnú emisiu, vďaka čomu je sonda samoreferenčná. Pomer farieb je nezávislý na veľkosti bunky alebo koncentrácii sondy. Sonda F2N12S sa viaže na membránové fosfolipidy a emituje zelené svetlo. Keď bunky prechádzajú do apoptózy, zmeny nábojov na membráne posúvajú emisiu zeleného svetla ku oranžovému. Pomer týchto farieb sa používa na meranie životaschopnosti buniek. Sonda F2N12S nie je citlivá na proteázy, trvá len 5 minút a jej viazanie nie je závislé na Ca^{2+} .

Annexín V a F2N12S sa viažu na povrch bunky, takže nie je potrebná priepustnosť membrány. Obe metódy možno kombinovať s inými značeniami pre analýzu povrchu buniek alebo ich vnútorných funkcií [130].

Testy permeability membrány. Umierajúce bunky strácajú integritu membrány, zatiaľ čo životaschopné bunky sú veľmi striktné v kontrole priepustnosti svojej membrány. Analyzovať integritu bunecnej membrány má veľký význam nielen pre štúdie kultúr cicavčích buniek pre určenie ich životaschopnosti, ale aj pre výskum potravinárskej výroby, ako napr. pri analýze stresu spôsobeného etanolom počas výroby vína, pre laboratória zaoberajúce sa plodnosťou na monitorovanie integrity membrán spermii atď. Testy priepustnosti membrány zvyčajne spočívajú v kombinácii dvoch typov farbív: jedno farbív mŕtve bunky a druhé životaschopné bunky. Farbivá na určovanie priepustnosti membrány sa môžu kategorizovať ako farbivá pre exklúziu, farbivá pre inklúziu a farbivá monoméne kyanínové farbivá nukleových kyselín [130].

Mitochondriálne testy. Mitochondrie sú energetickými centrami buniek. Membránový potenciál mitochondrií je veľmi dôležitý pre syntézu energie a je dobre regulovaný. Populácia mitochondrií v živej bunke je udržiavaná procesom biogenéza, ktorý zahŕňa vyváženú kombináciu štiepenia a zlučovania ako dynamický mechanizmus regulovaný podľa stavu bunky.

Bunky je možné označiť farbivami zameranými na mitochondrie, aby sme pochopili stav buniek, ako je apoptóza, vysoká energia alebo strata membránového potenciálu mitochondrií (MMP) a podobne. Existuje niekoľko komerčne dostupných testov, ktoré sa zameriavajú na rôzne aspekty mitochondrií:

Kity JC-10 MMP, kde sa farbivo JC-10 hromadí v matrici mitochondrií zdravých buniek a emituje červený signál pri 570–590 nm. Keď sú bunky apoptotické alebo nekrotické, JC-10 sa ľahko šíri do cytoplazmy a mení sa na monoméne JC-10, ktorý emituje zelený signál pri 520–540 nm.

Farbivá MitoTracker možno použiť na meranie celkového objemu mitochondrií alebo na štúdium zmien v ich objeme po požadovaných ošetreniach. Farbí mitochondrie živých buniek, ale nie je závislé od MMP. MitoTracker Green nie je kompatibilné s fixáciou a signál možno získať pri excitačných a emisných vlnových dĺžkach 490 a 516 nm.

Priepustnosť mitochondriálnej membrány s využitím calceinu AM a zhašovača CoCl_2 . Po svojom štiepení je calcein AM zhasnutý/potlačený CoCl_2 v cytoplazme, ale v mitochondriách živých a zdravých buniek je ponechaný. Keď majú bunky poškodené mitochondrie alebo prebieha apoptóza, obsah mitochondrií uniká a signál sa stráca [130].

5 Bunečné modely pre stanovenie cytotoxicity/životaschopnosti *in vitro*

Bunková kultúra je jedným z najlepších modelov pre *in vitro* štúdium toxicity chemických látok v porovnaní s modelom na zvieratách. Voľba vhodného *in vitro* modelu má rozhodujúcu úlohu pri získavaní dostatočných informácií, ktoré sú potrebné na predpovedanie účinnosti lieku a bezpečnosti v prípade jeho vývoja. Výber typu buniek je ovplyvnený druhom testovanej látky. Pre všeobecné skríniny toxicity voči referenčnej zlúčenine sa často používajú rýchlo rastúce a odolné fibroblastické alebo epiteliálne línie, ako napr. LLC-PK1, MDCK, CHO, V79 alebo HeLa bunky. Genetická nestabilita buniek tohto typu môže ohroziť výsledky vo výskumoch s dlhším trvaním. Pre štúdie toxicity sa často využívajú bunkové línie, ktoré sú komerčne dostupné [127,128].

5.1 Dvojrozmerné modely bunečných kultúr

Tento model predstavuje tradičný systém, kde sa bunky pestujú na plochých platformách optimalizovaných pre ich príľnutie a rast. Obmedzenie tohto modelu spočíva v tom, že bunky v monovrstve neprejavujú prirodzenú kinetiku rastu a príľnutia, pretože tvrdé ploché platformy nespĺňajú úplne charakteristiky prirodzeného prostredia. Pre každý typ bunky sa prostredie kultivačného systému líši. Pre správny rast buniek je potrebné vhodné kultivačné médium, okrem toho sa médiá dodávajú s príslušnými antibiotikami na zabránenie kontaminácie.

Kultivácia v monovrstve je široko používaným modelom v testoch cytotoxicity. Táto metóda poskytuje najväčšiu flexibilitu pokiaľ ide o expozíciu, recovery a kvantifikáciu účinku lieku. Expozičné časy medzi 1 a 24 hodinami s alebo bez obdobia recovery sa bežne používajú. Koncovým bodom je počet buniek ako indikácia prežitia alebo

metabolickej kapacity. Kultivácia v monovrstve vyžaduje málo buniek v porovnaní s inými technikami, a preto ju možno ľahko použiť pre mikrotitračné testy. Testy na mikrotitračných platničkách umožňujú testovať široké koncentračné rozpätia. Akékoľvek toxické účinky možno ľahko kvantifikovať spektrofotometricky s relatívne jednoduchou možnosťou proces automatizovať [127,128].

5.2 Trojrozmerné modely bunečných kultúr

3D modely sú stredobodom záujmu vďaka ich napodobňovaniu *in vivo* podmienok, napr. pre vzory exprimácie proteínov a intracelulárne spojenia. Jednou z najväčších výhod modelov 3D je to, že spolu so zárodočnými bunkami alebo modelmi primárnych buniek dokážu predpovedať účinnosť a toxicitu terapeutických kandidátov u ľudí ešte predtým, než lieky prejdú klinickými skúškami. Preto majú významný prínos pri znížení miery zlyhávania v procese objavovania a vývoja liekov (130). Okrem toho je tento systém vyvinutý na zlepšenie bunkových štruktúr a fyziologickej vyrovnanosti *in vitro* modelov. Kultivácia buniek vo vzore 3D umožňuje pokročilú interakciu medzi bunkami a intracelulárnymi signálnymi systémami. Okrem napodobňovania štruktúry, aktivity tkaniva a orgánov, taktiež podporuje komplexnejší vzor diferenciaciu buniek.

Tento model je rozdelený do dvoch techník – s a bez nosiča. Väčšina 3D modelov sú sféroidy, kde sa bunky vyvíjajú vo forme zoskupených štruktúr/zhlukov bez použitia nosiča a slúžia ako účinný nástroj pri skríningu toxicity nových liekov (tumorové sféroidy, embryonálne telesá, mammosféry, neurosféry a hepatosféry). Organoidy sú taktiež modely bez použitia nosiča, odvodené z kmeňových buniek alebo tkanív so schopnosťou samoobnovy, samoregulácie a prejavom funkcionality orgánov. Sféroidy aj organoidy sa zúčastňujú na rôznych fázach vývoja liekov, vrátane modelovania ochorení, identifikácie cieľov, profilovania cieľov, skríningu a hodnotenia toxicity.

Okrem toho k 3D modelom využívaným pri vývoji liekov k testovaniu potencionálnych látok patria: Hydrogély, model visiacej kvapky a magnetická levitácia pre formovanie sféroidov, mikrofluidná technológia a 3D-bioprinting techniky [128,129].

5.3 Inovatívne organotypové *in vitro* modely

Organotypické *in vitro* modely sú úspešné techniky 3D bunkovej kultúry, ktoré sa široko venujú skúmaniu biológie a funkcie orgánov u cicavcov.

Organoidy môžu byť odvodené z kmeňových buniek, celých orgánov alebo častí orgánu na štúdium ich rastu a vývoja. Táto technika je tiež relevantná na meranie životaschopnosti a toxicity pre iné nesféroidné 3D kultivačné modely.

Pri praktickom experimente s organoidnou kultúrou sa využívajú bioreaktory na zvýšenie hustoty kmeňových buniek pre skríning toxicity liekov. Okrem toho je adhézia buniek na maticu a jej tuhosť nevyhnutným faktorom pre navrhovanie vhodnej platformy pre organotypický model, ktorý účinne posudzuje toxický potenciál liekov so zreteľným výsledkom, ktorý napodobňuje odpoveď buniek *in vivo*.

Vloženie buniek do gélu extracelulárnej matrice im umožňuje samoorganizáciu do funkčných tkanivových modelov pre vývoj orgánov. Napríklad tkanivové organoidy vložené do 3D extracelulárnej matrice boli skúmané s cieľom pochopiť aktivitu morfológie vetvenia prsných žliaz, slinných žliaz, obličiek a pľúc so zmeneným zložením a mechanizmom prostredia extracelulárnej matrice [128,129]

6 Ciele diplomovej práce

- Stanovenie cytotoxicity nových derivátov fenoxytakrínu
- Porovnanie cytotoxicity testovaných látok s ich štruktúrou
- Zhodnotenie potenciálu testovaných látok

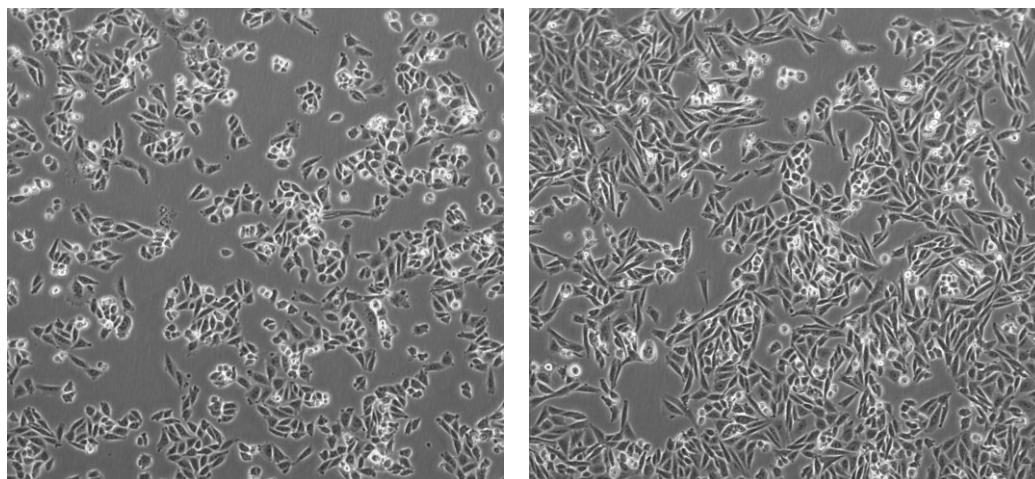
7 Experimentálna časť

7.1 Materiál

7.1.1 Bunečná línia

CHO-K1 bunečná línia CHO (*Chinese hamster ovary cells*), ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures; Porton Down, Wiltshire, Anglicko).

Kvôli ich podobnosti s ľudským bunkovým systémom sa bunky CHO používajú v biologickom a lekárskom výskume, hlavne v oblasti genómov a chromozómov, testov toxicity, výskumu výživy a analýzy exprese génov. Sú to adherentné bunky známe svojou schopnosťou ľahkej kultivácie a rýchleho rastu [153]. Na pracovisku Centra biomedicínskeho výskumu vo Fakultnej nemocnici v Hradci Králové (kde bola realizovaná experimentálna časť tejto diplomovej práce) sa využívajú štandardne.



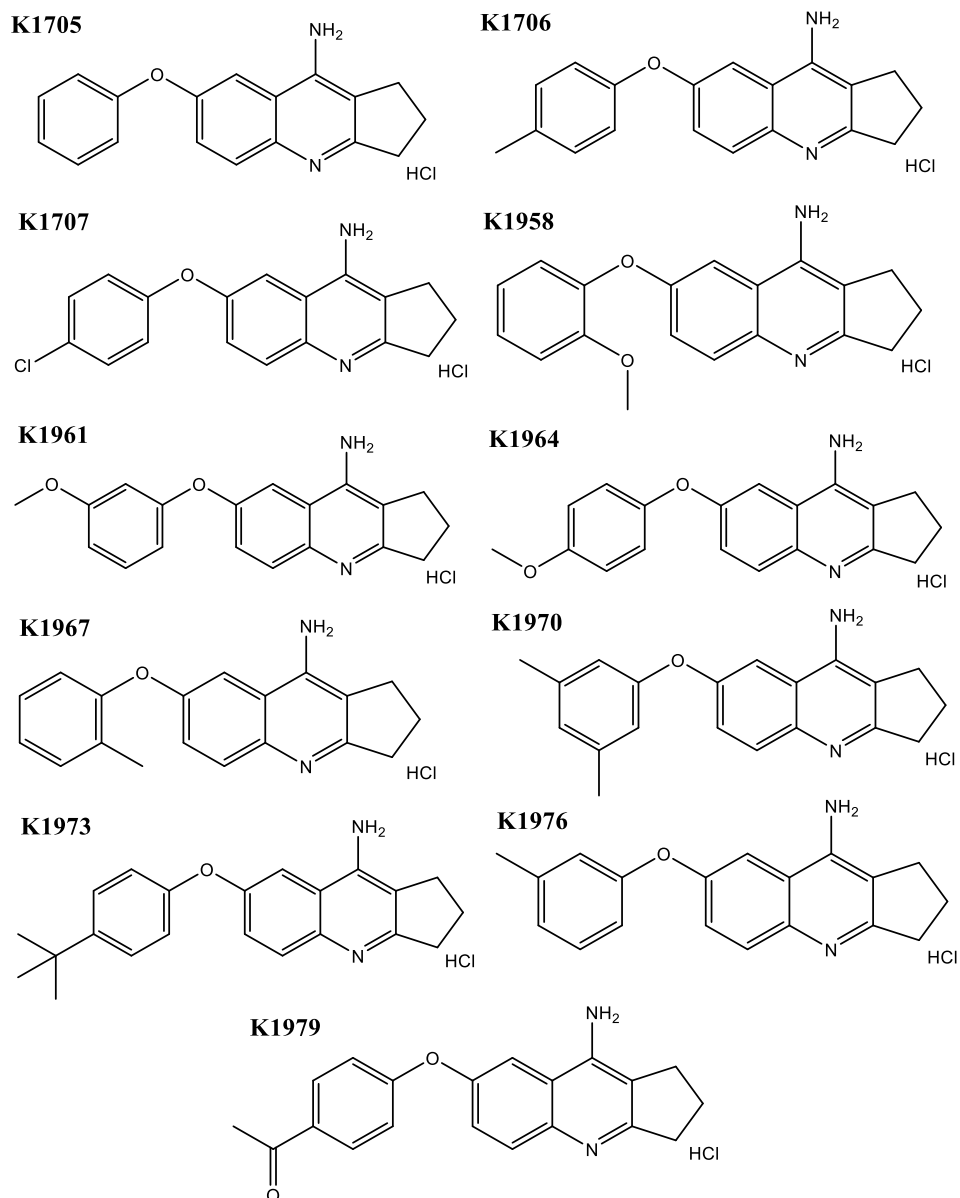
Obr. 2: Bunečná línia CHO-K1. Fotografie buniek tejto línie boli prevzaté z *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC). Fotografia vľavo predstavuje CHO-K1 líniu po 6 hodinách od nasadenia do kultivačnej nádoby a fotografia vpravo predstavuje CHO-K1 líniu po 15 hodinách od nasadenia do kultivačnej nádoby [154].

7.1.2 Testované látky

Všetky testované látky uvedené s príslušným označením a systematickým názvom v Tab. 2–4, boli syntetizované na Katedre toxikológie a vojenskej farmácie, Fakulty vojenského zdravotníctva v Hradci Králové (Univerzita obrany).

Tab. 2: Deriváty 7-fenoxytakrinu s dihydrocyklopenta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre

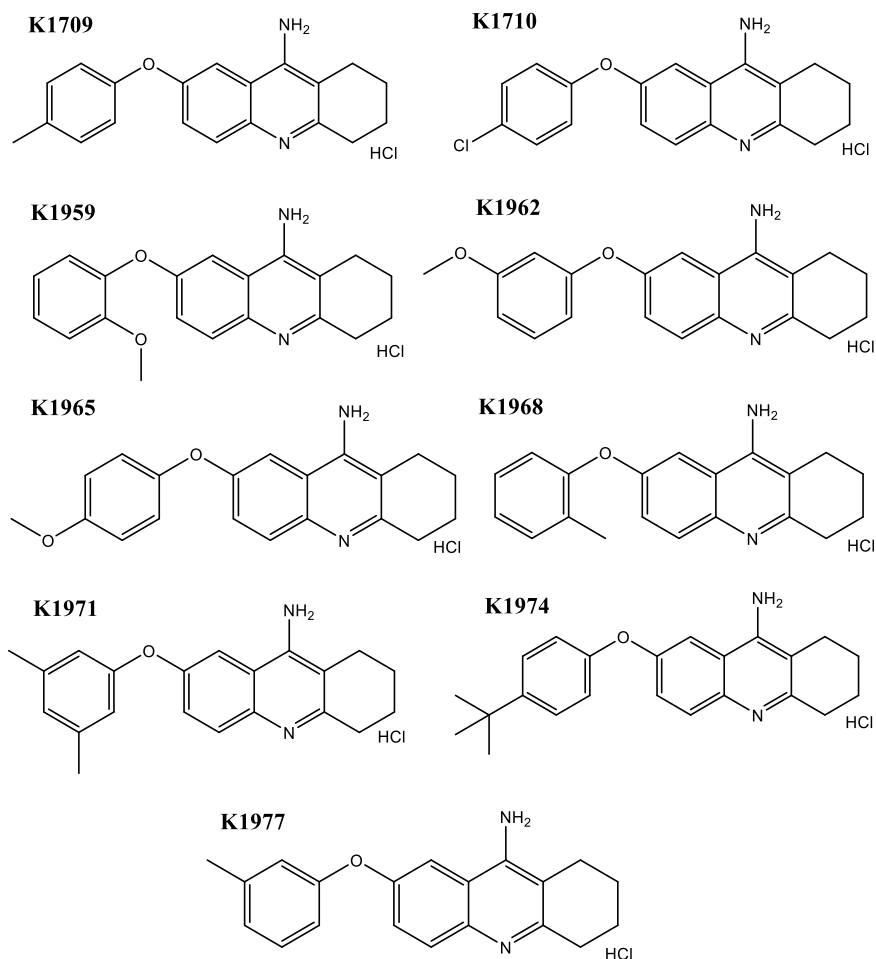
Označenie	Názov
K1705	7-fenoxy-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1706	7-(<i>p</i> -tolyloxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1707	7-(4-chlorfenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1958	7-(2-metoxyfenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1961	7-(3-metoxyfenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1964	7-(4-metoxyfenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1967	7-(<i>o</i> -tolyloxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1970	7-(3,5-dimetylfenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1973	7-(4-(<i>tert</i> -butyl)fenoxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1976	7-(<i>m</i> -tolyloxy)-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-9-amín; hydrochlorid
K1979	1-(4-((9-amino-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolín-7-yl)oxy)fenyl)etan-1-on; hydrochlorid



Obr. 3: Štruktúra derivátov 7-fenoxytakrinu s dihydrocyklopenta[b]chinolínovým zoskupením

Tab. 3: Deriváty 7-fenoxytakrinu s tetrahydroakridínovým zoskupením

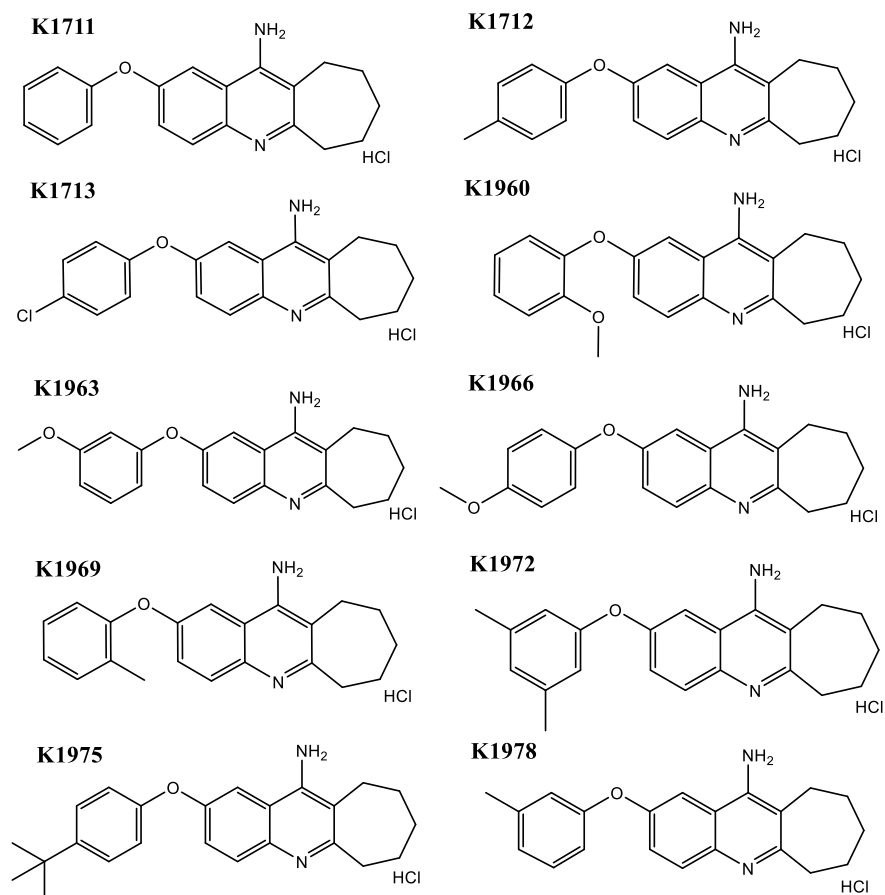
Označenie	Názov
K1709	7-(<i>p</i> -tolyloxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1710	7-(4-chlorofenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1959	7-(2-metoxyfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1962	7-(3-metoxyfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1965	7-(4-metoxyfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1968	7-(<i>o</i> -tolyloxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1971	7-(3,5-dimetylfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1974	7-(4-(<i>terc</i> -butyl)fenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid
K1977	7-(<i>m</i> -tolyloxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín; hydrochlorid



Obr. 4: Štruktúra derivátov 7-fenoxytakrinu s tetrahydroakridínovým zoskupení

Tab. 4: Deriváty 7-fenoxytakrinu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre

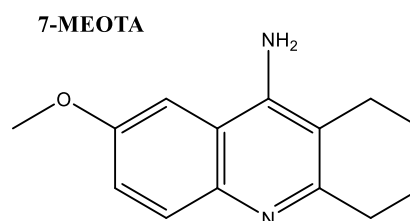
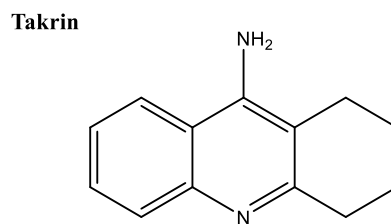
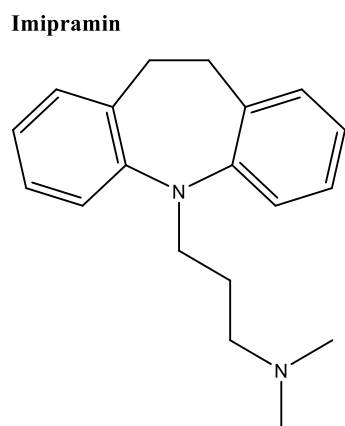
Označenie	Názov
K1711	2-fenoxy-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1712	2-(<i>p</i> -tolyloxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1713	2-(4-chlorfenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1960	2-(2-metoxyfenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1963	2-(3-metoxyfenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1966	2-(4-metoxyfenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1969	2-(<i>o</i> -tolyloxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1972	2-(3,5-dimetylfenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1975	2-(4-(<i>tert</i> -butyl)fenoxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid
K1978	2-(<i>m</i> -tolyloxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolín-11-amín; hydrochlorid



Obr. 5: Štruktúra derivátov 7-fenoxytakrinu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínovým zoskupením

Tab. 5: Systematické názvy štandardných látok

Imipramin	3-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)- <i>N,N</i> -dimethylpropan-1-amín
Takrin	1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín
7-MEOTA	7-metoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín-9-amín



Obr. 6: Štruktúry štandardných látok

7.1.3 Použité chemikálie

- Fosfátový pufr (dPBS; *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*; Sigma Aldrich; Darmstadt, Nemecko)
- Trypsin-EDTA (0, 25 %; Sigma-Aldrich)
- *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT) 98 % (Sigma-Aldrich)
- Dimetylsulfoxid (DMSO) pre molekulárnu biológiu (Sigma Aldrich)
- Fetálne bovinné sérum (FBS) (Sigma-Aldrich)
- Penicilín-Streptomycín (Sigma Aldrich)
- Hmsova nutričná zmes F-12 (Sigma Aldrich)
- Etanol 70% (Sigma Aldrich)
- Mediacarín dezinfekčné tablety (Ecolab, Saint Paul, MN, USA)
- Sterilium (Hartmann)

7.1.4 Prístroje, pomôcky a software

- Analytické váhy CPA225D-0CE (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Nemecko)
- Elektrický pipetovací nástavec Accu-Jet Pro (BrandTech Scientific, Essex, CT, USA)
- Automatické manuálne pipety, Eppendorf Research plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- Bürkerova komôrka (Marienfeld, Lauda-Königshofen)
- Centrifuga Universal 320/320 R (Hettich Zentrufigen, Tuttlingen, Nemecko)
- ChemDraw Professional 21.0.0 (PerkinElmer, Inc, Waltham, MA, USA)
- CO₂ inkubátor FORMA™ Direct Heat 311 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Elektrický pipetovací nástavec Accu-Jet Pro (BrandTech Scientific, Essex, CT, USA)
- Laminárny box, BioAir safeflow 1.2 (EuroClone, Pero – Milán, Taliansko)
- Mikrozukmavky (Eppendorf)
- Multidetekčný modulárny reader Synergy™ HT (BioTek, Winooski, VT, USA)
- GraphPad Prism 8.3.0 Portable (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)
- Rezervoár pre reagentia , Multi Well High Profile Reagent Reservoir (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Rezervoár pre multikanálovú pipetu nedelený (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Sérologické pipety (BrandTech Scientific, Essex, CT, USA)
- Kultivačné nádoby T75 (TPP, Švajčiarsko)
- UV permeabilné titračné dosky MAIPN 4550 (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko)
- Vodná lázeň (PolyScience, Niles, IL, USA)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic P30H (Elma, Singen, Nemecko)
- Vortex Mixer Wizard X (micr8titer) (Velp Scientifica, Usmate Velate, Taliansko)
- Mikroskop, inverzný (OPTIKA Microscopes, Ponteranica, Taliansko)

7.2 Metodika

7.2.1 Kultivácia bunečnej línie

Buněčná línia CHO-K1 využitá pre účely experimentu bola kultivovaná v médiu, ktoré sa skladá z: Hmsovej nutričnej zmesi F-12, fetálneho bovinného séra (FBS 10 % celkového objemu) a kombinácie antibiotík Penicilín-Streptomycín (1 % celkového objemu). Pre kultiváciu boli využité kultivačné nádoby s povrchom 75 cm² umožňujúce výmenu plynov medzi bunkami a inkubátorom v závislosti na polohe závitú, ktorým sú vybavené. Prostredie v inkubátore bolo temperované na 37 °C s obsahom 5 % CO₂ v každom kroku experimentu. Maximálna konfluencia pre pasážovanie vybranej bunečnej línie je 90 %.

7.2.2 Pasážovanie bunečnej línie

V laminárnom boxe sa z kultivačnej nádoby odobralo médium pomocou sérologickej pipety v elektrickom pipetovacom nástavci, tak aby neboli zasiahnuté bunky adherované na jej dne. Po odobratí média sa bunky opláchlí použitím 5 ml fosfátového pufru (PBS), ktoré sa šetrne odsalo do nádoby určenej pre odpadový materiál. Vzápätí bol pipetou pridaný a po celej nádobe rozprestretý 1 ml roztoku trypsinu/EDTA pre účel uvoľnenia buniek z dna nádoby. Kultivačná nádoba s pôsobiacim trypsinom, bola vložená do inkubátoru na dobu 5 minút. Po inkubácii sa odlepené bunky resuspendovali v laminárnom boxe prídavkom 5 ml nového média. V kultivačnej nádobe bol vypustením pipety ponechaný objem 0,5 ml bunečnej suspenzie z celkového zmeraného objemu. Do kultivačnej nádoby sa sérologickou pipetou doplnilo 9,5 ml nového média. Takto pripravená kultivačná nádoba sa umiestnila do inkubátoru pre ďalší rast buniek.

7.2.3 Počítanie buniek

Pre výpočet žiadaného množstva buniek (8000 buniek na jamku) pre nasadenie doštičky na experiment, sa pripravilo desaťnásobne zriedené množstvo bunečnej suspenzie zmiešaním 1,8 ml živného média a 0,2 ml bunečnej suspenzie. Po homogenizácii sa mikropipetou odobralo 10 μl zriedenej bunečnej suspenzie do Bürkerovej počítacej komôrky. Pod mikroskopom pri zväčšení 10× bolo vypočítané množstvo buniek podľa vzorca:

$$x = \frac{a * 10^3}{n * h} * r$$

kde x je počet buniek na ml bunečnej suspenzie, a vypočítaný počet buniek, n počet počítaných štvorcov v Bürkerovej počítacej komôrke, h hĺbka komôrky (0,1 mm), r riedenie a 10^3 pre prevod ml na μl .

Výsledné údaje boli použité pre krok nasadenia buniek na 96jamkovú mikrotitračnú doštičku.

7.2.4 Nasadenie buniek na doštičku

Z pasážovania buniek sa získala potrebná bunečná suspenzia pre tento krok. Po prevedení počítania buniek v Bürkerovej počítacej komôrke sa výpočtom zo zistených údajov upravil objem a hustota bunečnej suspenzie na požadované parametre. V laminárnom boxe sa do rezervoáru napipetoval objem živného média a bunečnej suspenzie zodpovedajúci množstvu pre nasadenie 96jamkovej doštičky. Táto zmes bola dôkladne homogenizovaná. Následne sa z rezervoáru mikrotitračnou 8-kanálovou pipetou prenieslo do jamiek doštičky (1 – 11) 100 μl bunečnej suspenzie o hustote 8×10^3 buniek. Posledný stĺpec (12) doštičky bol vyplnený čistým médiom bez buniek (slepá vzorka). V poslednom kroku bola nasadená 96jamková doštička inkubovaná po dobu 24 hodín.

7.2.5 Inkubácia s roztokmi skúšaných látok

Zo zásobných roztokov skúšaných látok rozpustených v DMSO boli prepočtom a pomocou mikrotitračných pipiet pripravené ich roztoky v živnom médiu, ktorých celkový objem zodpovedal 2 ml o koncentrácii 300 μM (s výnimkou látok K1712, K1713, K1966, K1978). Obsah DMSO v konečných roztokoch skúšaných látok tak neprekročil 0,5 % kvôli jeho toxicite a možnému ovplyvneniu výsledkov. Roztoky sa dôkladne premiešali a vložili do ultrazvukového kúpeľa vytemperovaného na teplotu 37 °C. K získaniu zostupnej koncentračnej rady boli následne v laminárnom boxe roztoky sériovo riedené v multikanálovom rezervoári pre reagencia. Do jamky A rezervoáru bolo prenesených mikrotitračnou pipetou 500 μl čistého roztoku testovanej látky o koncentrácii 300 μM . V jamke B s obsahom 500 μl živného média bola prídavkom 500 μl roztoku testovanej látky pripravená koncentrácia 150 μM . Z jamky B sa ďalej pipetou prenieslo 500 μl roztoku k 500 μl čistého živného média jamky C za vzniku roztoku o koncentrácii 75 μM . Tento postup sa opakoval u všetkých látok až po konečné jamky rezervoáru. Počas riedenia sa roztoky dôkladne homogenizovali. Pripravené doštičky s nasadenými bunkami sa z inkubátoru umiestnili do laminárneho boxu, kde sa

opatrne sérologickou pipetou z buniek odsalo živné médium. Vytvorená koncentračná rada každej látky sa v objeme 100 μ l preniesla mikrotitračnou 8 kanálovou pipetou do jamiek doštičky 1 – 9 v triplikátoch. Jamky 10, 11 a 12 (dve kontrolné a jedna slepá vzorka) sa doplnili čistým živným médiom. Doštička sa vložila do termostatu pre 24 hodinovú inkubáciu.

7.2.6 Prevedenie MTT testu

Pred prípravou roztoku potrebného na prevedenie testu, bolo živné médium a MTT vytemperované na vodnej lázni na 37 °C. Po zahriatí sa preniesli do laminárneho boxu. Zmiešaním 10 ml živného média a 1 ml MTT v rezervoári, bol pripravený roztok v zodpovedajúcej finálnej koncentrácii 0,5 mg/ml pre jednu doštičku. Z doštičiek po inkubácii s koncentračnými radami testovaných látok boli multikanálovou pipetou odsaté roztoky skúšaných látok. Do každej jamky doštičky bolo prenesených multikanálovou pipetou 100 μ l roztoku živného média s MTT. Doštička s aplikovaným roztokom MTT bola inkubovaná po dobu 3 hodín, pokým sa nevytvorili kryštály formazánu viditeľné pod mikroskopom. Po skončení inkubácie bol roztok MTT z doštičky odobraný multikanálovou pipetou a každá jamka bola zlyzovaná pridaním 100 μ l DMSO. Takto pripravená doštička bola dôkladne premiešaná vo vortexe po dobu 2 minút v špeciálnom doštičkovom nástavci. Následne bola zmeraná absorbancia využitím prístroja Multimode reader Synergy HTX pri λ 570/650 nm.

7.2.7 Výpočet toxikologických indexov

Namerané hodnoty absorbancie s príslušnou koncentračnou radou skúšaných látok boli vyhodnocované metódou 4-parametrickej nelineárnej regresie s využitím štatistického programu GraphPad Prism Portable verzia 8.3.0. Po analýze údajov boli získané priemerné hodnoty IC₅₀ testovaných látok s doplnenou smerodajnou odchýlkou.

8 Výsledky

8.1 Toxikologické indexy IC₅₀ štandardných látok

Tab. 6: Cytotoxicita štandardných látok vyjadrená pomocou toxikologického indexu IC₅₀, ktorý je priemerom z troch nezávislých experimentov zahŕňajúci smerodajnú odchýlku.

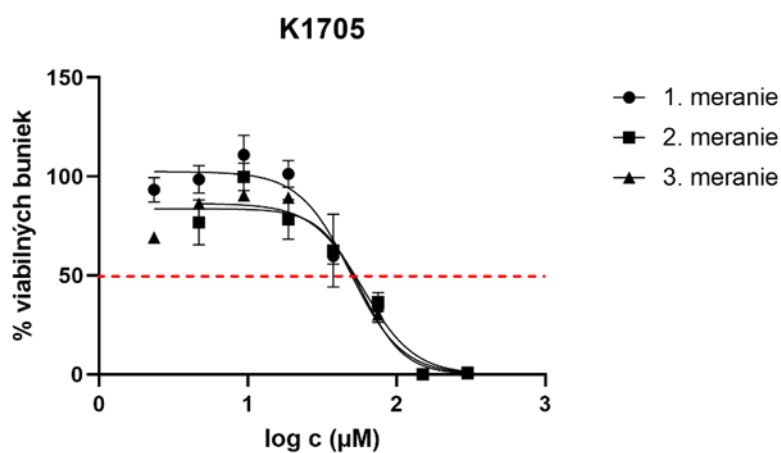
Látka	IC ₅₀ (μM)	Počet meraní
Imipramin	99,61 ± 2,73	3
Takrin	302,77 ± 38,41	3
7-MEOTA	69,84 ± 8,11	3

8.2 Toxikologické indexy IC₅₀ derivátov 7-fenoxytakrínu s dihydrocyklopenta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre

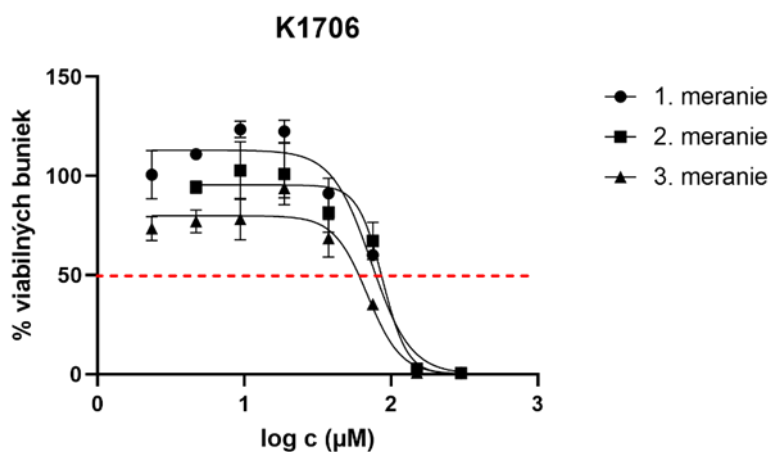
Tab. 7: Cytotoxicita derivátov 7-fenoxytakrínu s dihydrocyklopenta[b]chinolínovým zoskupením v štruktúre vyjadrená pomocou toxikologického indexu IC₅₀, ktorý je priemerom príslušného počtu nezávislých experimentov zahŕňajúci smerodajnú odchýlku.

Označenie	IC ₅₀ (μM)	Počet meraní
K1705	55,74 ± 3,36	3
K1706	76,60 ± 5,59	3
K1707	27,78 ± 1,21	3
K1958	43,74 ± 0,53	2
K1961	85,78 ± 2,23	2
K1964	80,48 ± 5,34	3
K1967	77,70 ± 15,31	3
K1970	39,56 ± 2,12	2
K1973	10,48 ± 0,77	2
K1976	34,31 ± 5,45	2
K1979	70,67 ± 5,42	2

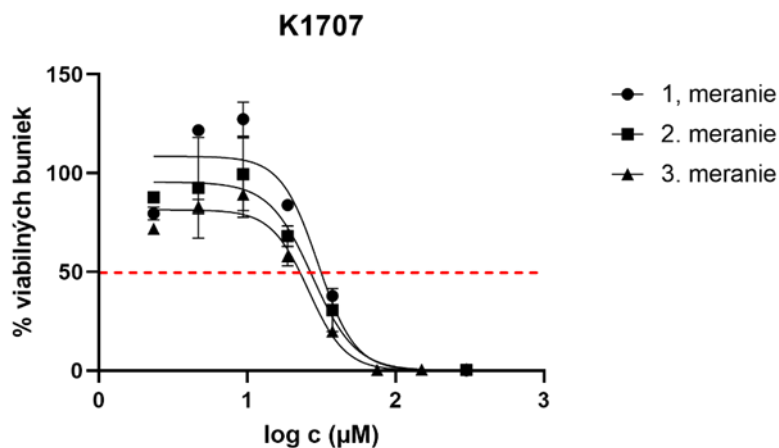
8.2.1 Dávково-závislé krivky



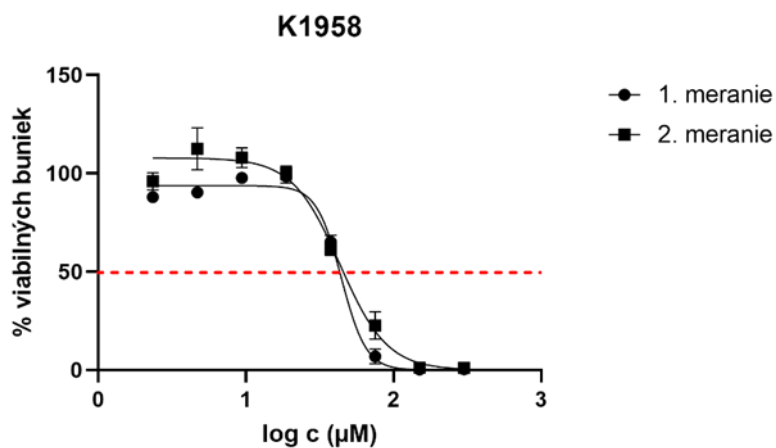
Obr. 7: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1705 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



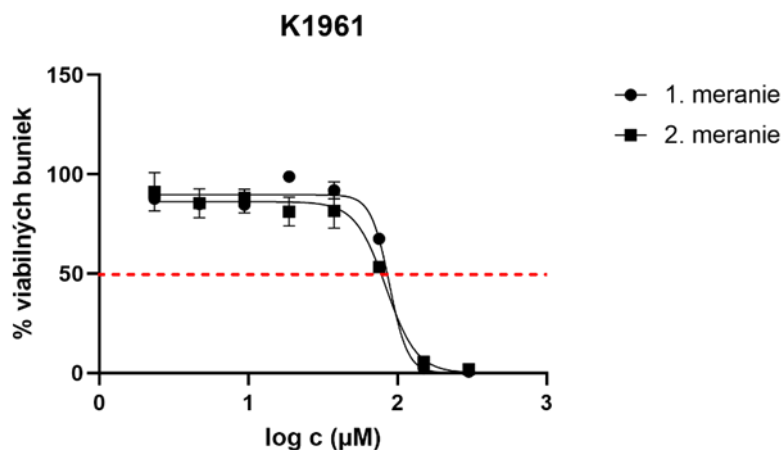
Obr. 8: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1706 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



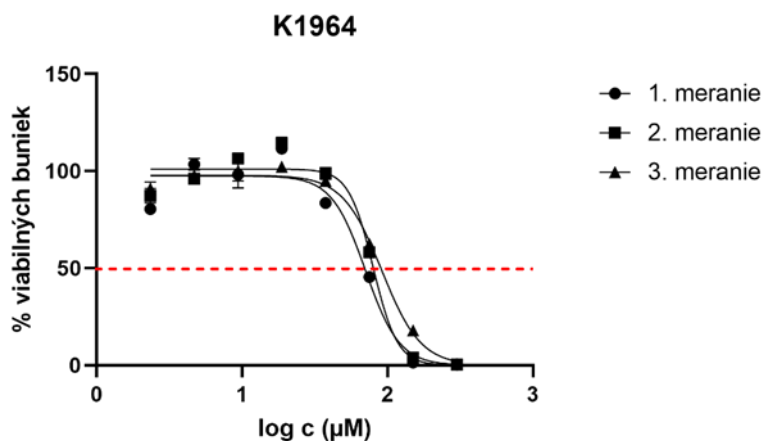
Obr. 9: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1707 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



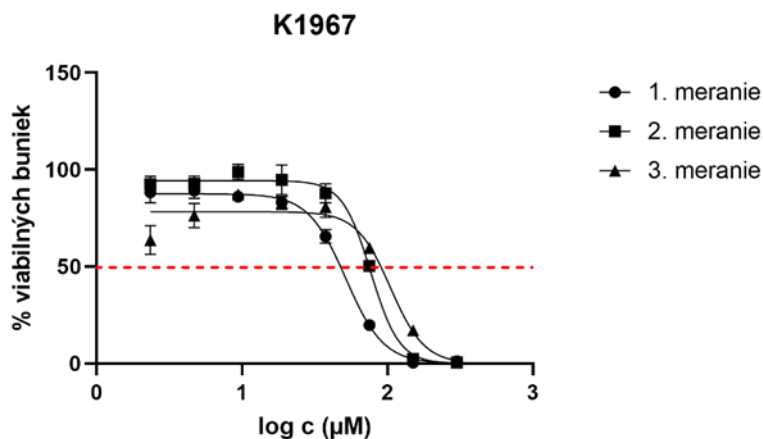
Obr. 10: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1958 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



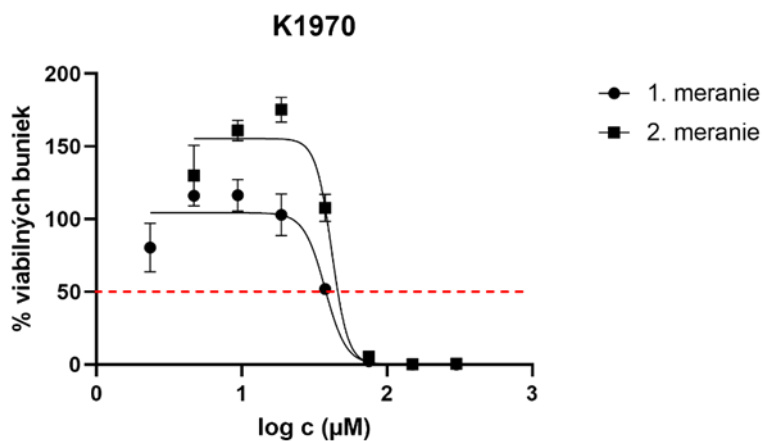
Obr. 11: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunecnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1961 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch



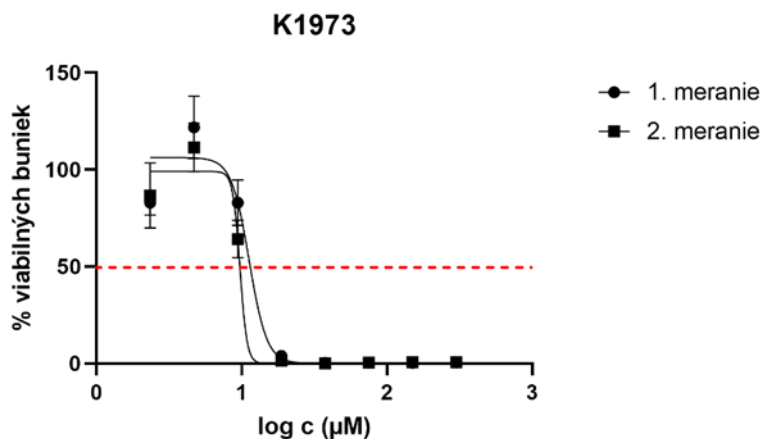
Obr. 12: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunecnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1964 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



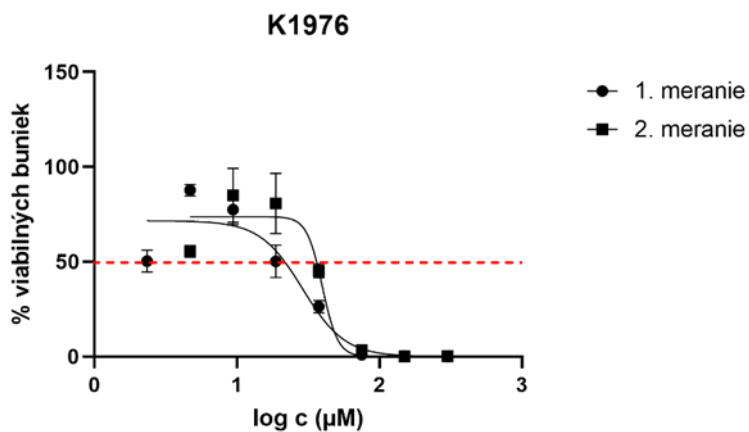
Obr. 13: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1967 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



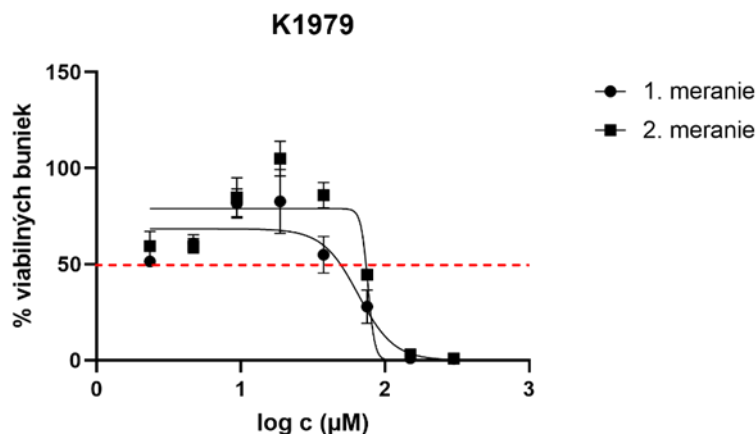
Obr. 14: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1970 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 15: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1973 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 16: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1976 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



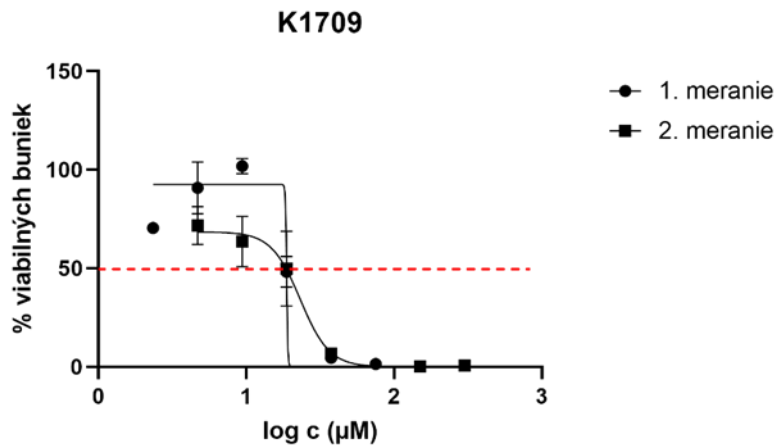
Obr. 17: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunecnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1979 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.

8.3 Toxikologické indexy IC₅₀ derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydroakridínovým zoskupením v štruktúre

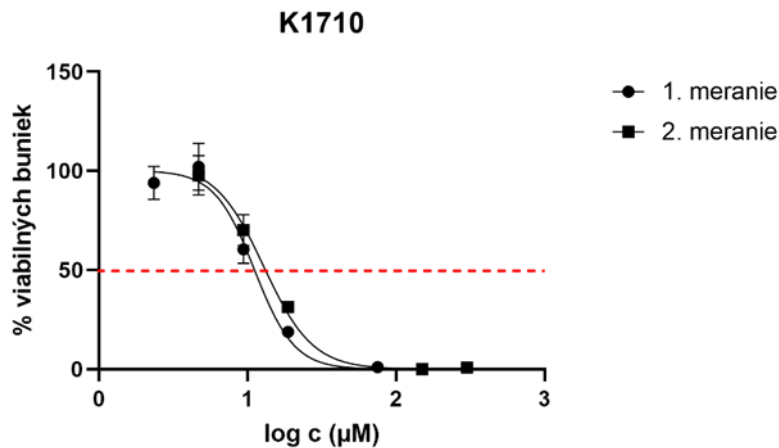
Tab. 8: Cytotoxicita derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydroakridínovým zoskupením v štruktúre vyjadrená pomocou toxikologického indexu IC₅₀, ktorý je priemerom príslušného počtu nezávislých experimentov zahŕňajúci smerodajnú odchýlku.

Označenie	IC ₅₀ (μM)	Počet meraní
K1709	20,98 ± 2,22	2
K1710	11,99 ± 0,85	2
K1959	69,08 ± 0,81	2
K1962	27,73 ± 6,15	2
K1965	25,86 ± 2,45	2
K1968	23,35 ± 0,90	2
K1971	13,16 ± 1,21	2
K1974	5,09 ± 0,33	2
K1977	20,25 ± 0,72	2

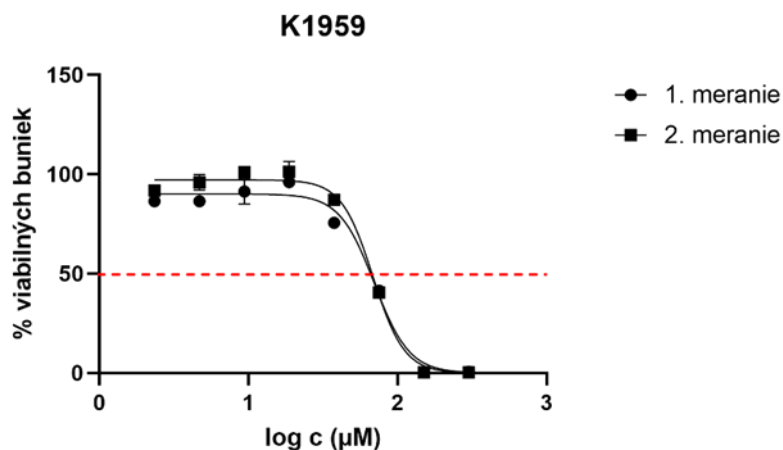
8.3.1 Dávково-závislé krivky



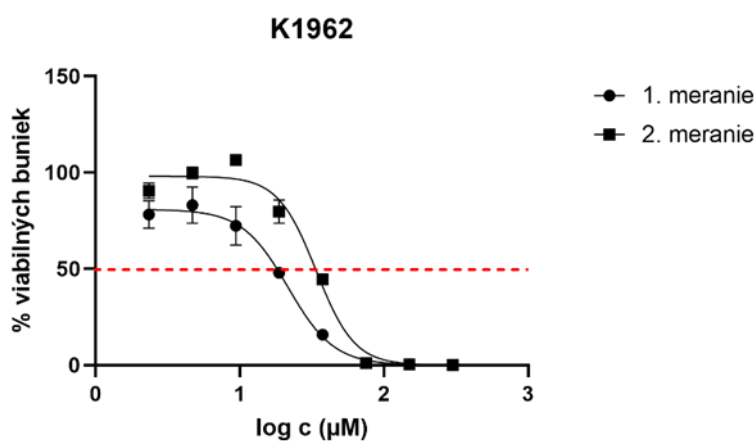
Obr. 18: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1709 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



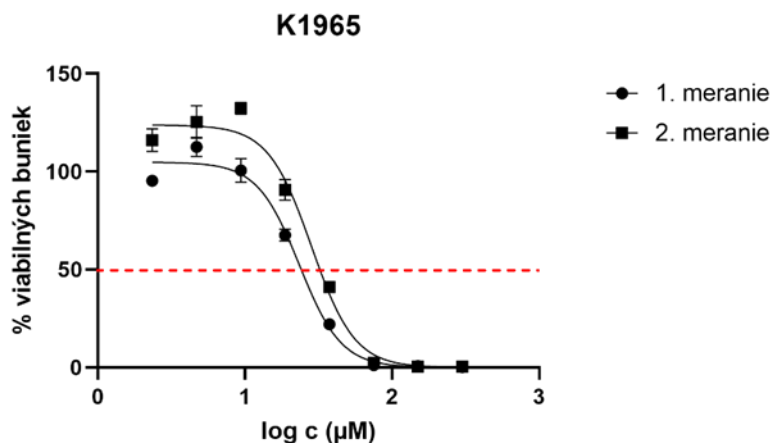
Obr. 19: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1710 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



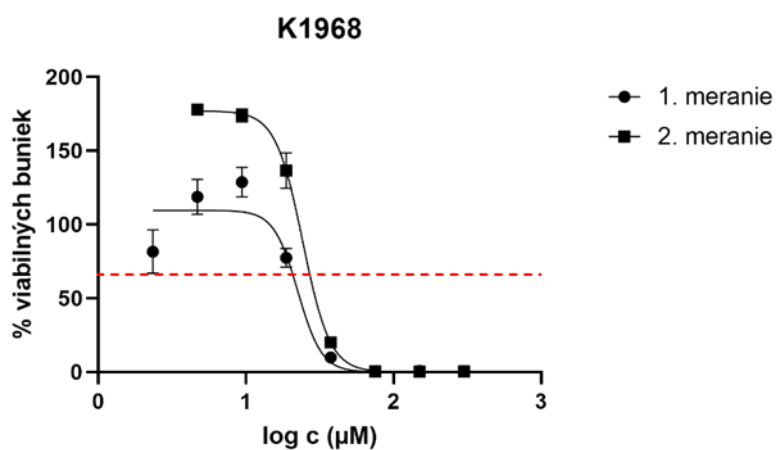
Obr. 20: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1959 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



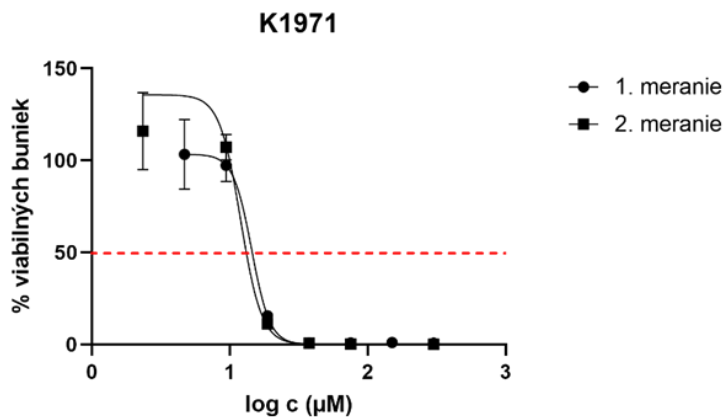
Obr. 21: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1962 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



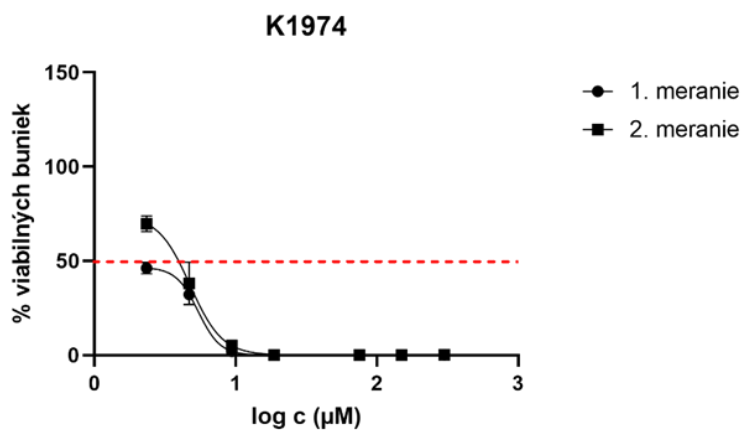
Obr. 22: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1965 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



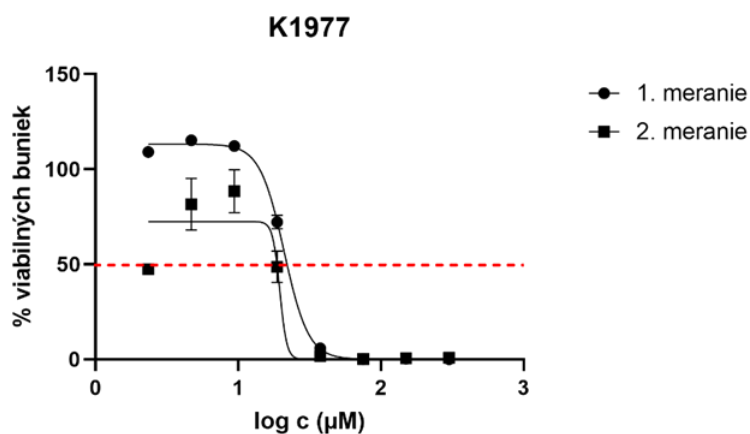
Obr. 23: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1968 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 24: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1971 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 25: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1974 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



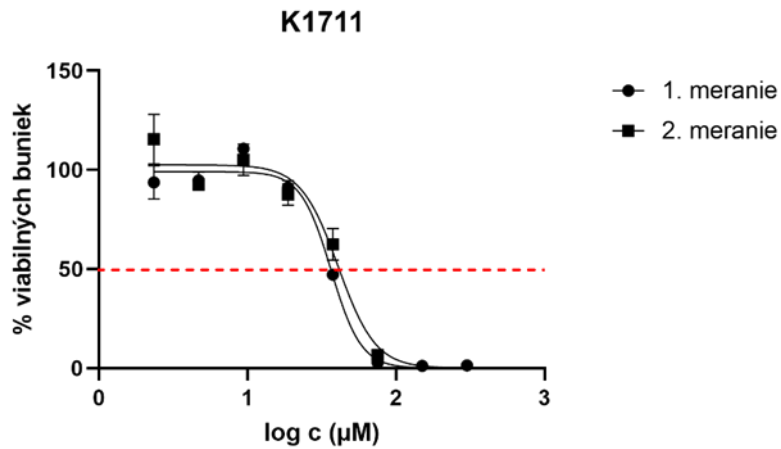
Obr. 26: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1977 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.

8.4 Toxikologické indexy IC_{50} derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínových zoskupením v štruktúre

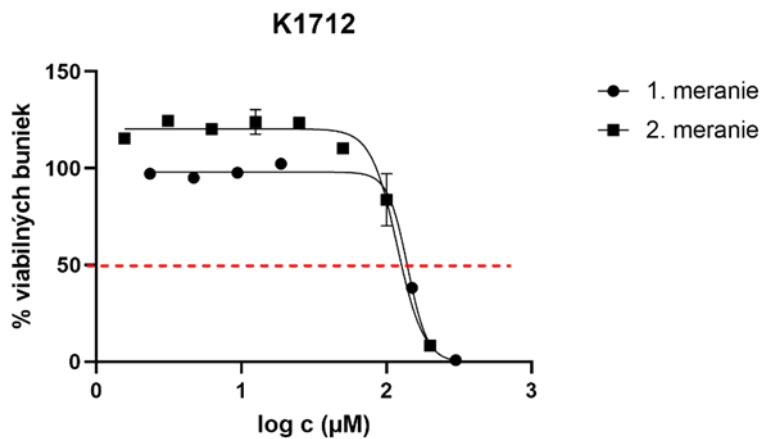
Tab. 9: Cytotoxicita derivátov 7-fenoxytakrínu s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínových zoskupením v štruktúre vyjadrená pomocou toxikologického indexu IC_{50} , ktorý je priemerom príslušného počtu nezávislých experimentov zahŕňajúci smerodajnú odchýlku.

Označenie	IC_{50} (μM)	Počet meraní
K1711	$38,62 \pm 2,14$	2
K1712	$129,05 \pm 10,75$	2
K1713	$93,02 \pm 3,81$	2
K1960	$73,45 \pm 4,81$	3
K1963	$19,94 \pm 0,85$	3
K1966	$23,23 \pm 2,56$	2
K1969	$26,77 \pm 2,94$	2
K1972	$32,34 \pm 1,58$	2
K1975	$9,24 \pm 1,18$	2
K1978	$14,71 \pm 0,67$	2

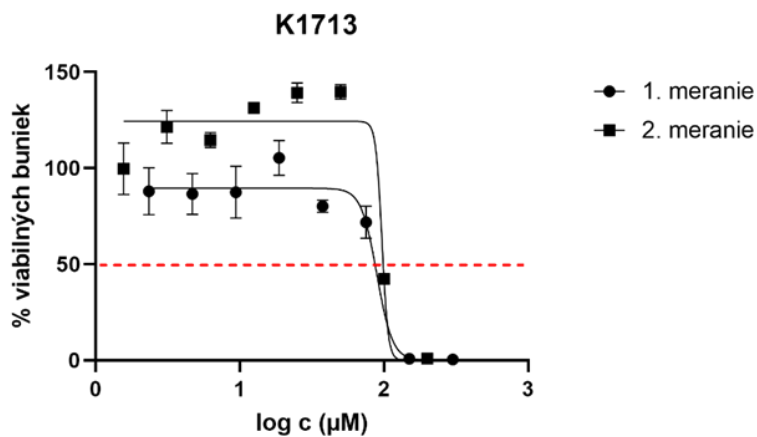
8.4.1 Dávково-závislé krivky



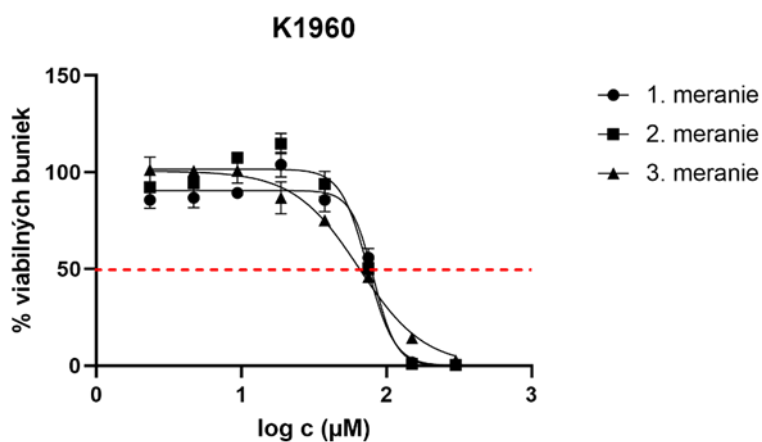
Obr. 27: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1711 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



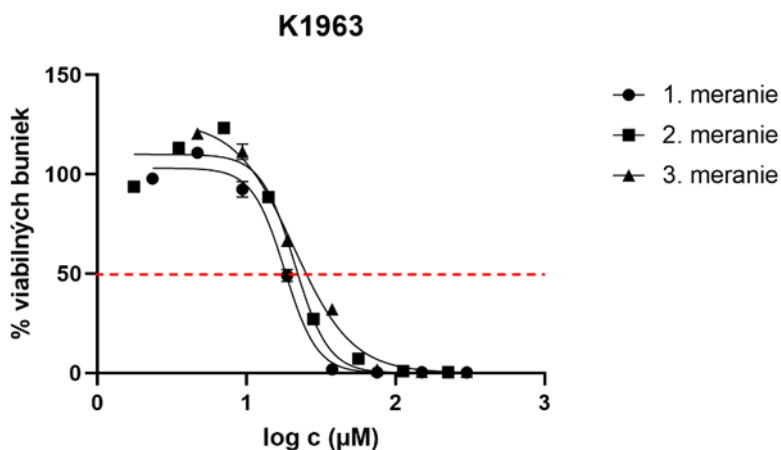
Obr. 28: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1712 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



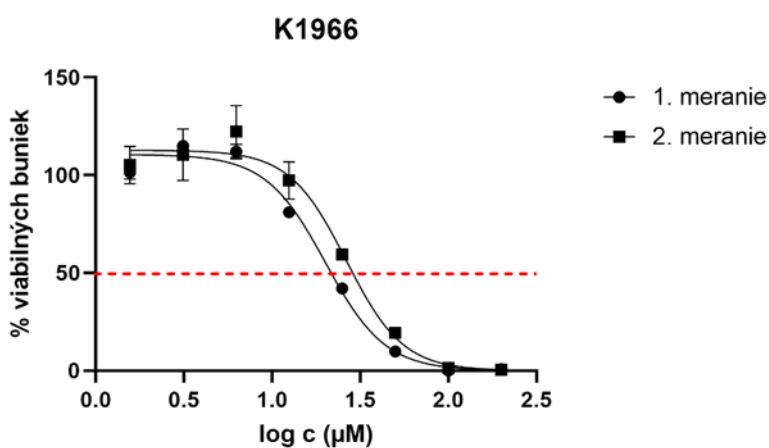
Obr. 29: Dávkovo závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1713 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



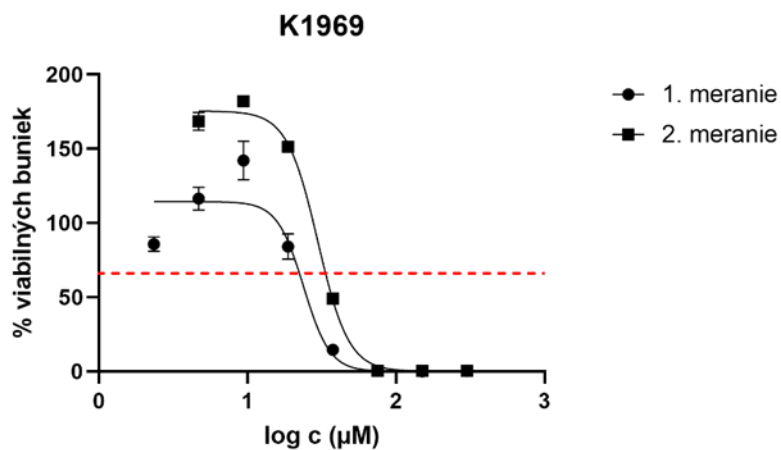
Obr. 30: Dávkovo závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1960 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



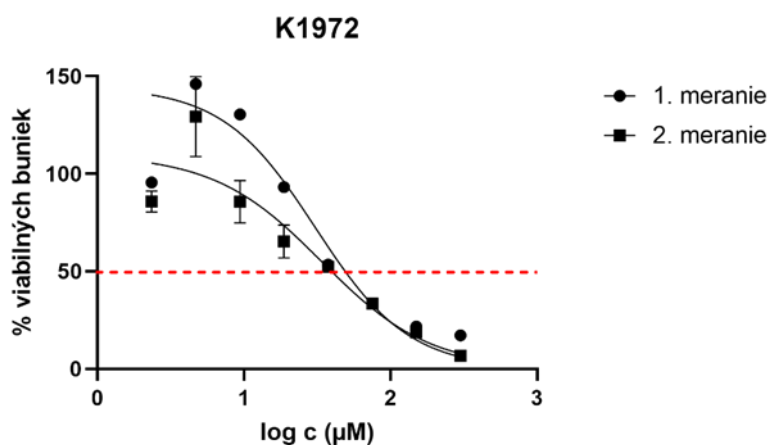
Obr. 31: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1963 z troch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



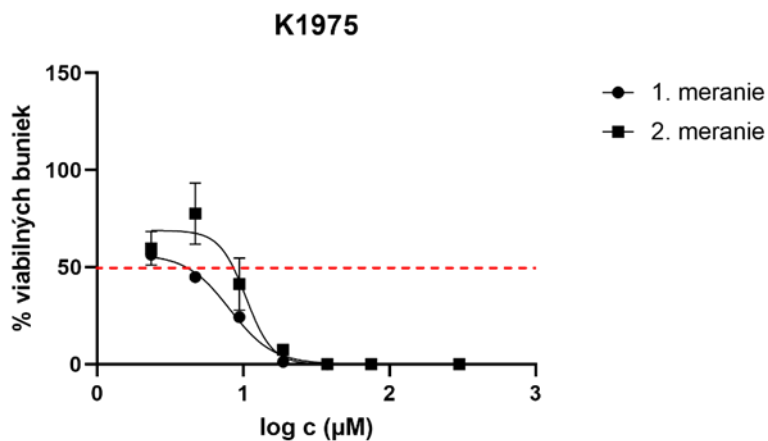
Obr. 32: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1966 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



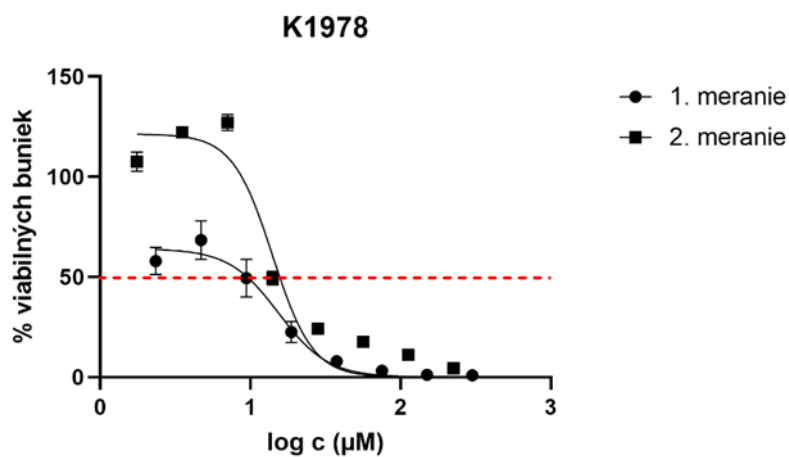
Obr. 33: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1969 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 34: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunečnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1972 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 35: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunecnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1975 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.



Obr. 36: Dávково závislé krivky po 24 hodinovej inkubácii bunecnej línie CHO-K1 s koncentračnou radou látky K1978 z dvoch nezávislých experimentov prevedených v triplikátoch.

9 Diskusia

Dostupná liečba neurodegeneratívnych ochorení, ktorá zahŕňa inhibítory AChE, či NMDA receptorov a motivácia prospešnými účinkami 7-MEOTA, viedla k zameraniu na vývoj derivátu THA s ešte lepšími farmakologickými vlastnosťami. Na základe toho bol syntetizovaný duálne pôsobiaci derivát 7-fenoxytakrín (7-PhO-THA) [134].

Táto diplomová práca sa zaoberá novo syntetizovanými derivátmi 7-PHO-THA a jej hlavným cieľom je stanoviť a následne zhodnotiť výsledky meraní ich cytotoxicity reprezentovanými toxikologickými indexmi IC_{50} . Tieto deriváty sa odlišujú primárne veľkosťou karbocyklického kruhu v ich základnej štruktúre. Modifikácia karbocyklického kruhu THA od päťčlenného po sedemčlenný, zvýšila aktivitu voči BuChE štvornásobne a účinnosť voči AChE dvojnásobne [134]. Ich sekundárne odlišnosti spočívajú v type a polohe substitúcií fenoxý- jadra, ktoré je dôležitým komponentom 7-PhO-THA, v štruktúre zodpovedá za aktivitu voči NMDARs [135].

Bolo syntetizovaných 30 derivátov, ktoré je možné rozdeliť do 3 skupín:

1. deriváty 7-PhO-THA s dihydrocyklopenta[b]chinolínovou základnou štruktúrou (obsahujú päťčlenný nasýtený kruh)
2. deriváty 7-PhO-THA s tetrahydroakridínovou základnou štruktúrou (obsahujú šesťčlenný nasýtený kruh)
3. deriváty 7-PhO-THA s tetrahydrocyklohepta[b]chinolínovou základnou štruktúrou (obsahujú sedemčlenný nasýtený kruh)

Najnižšiu cytotoxicitu zo všetkých testovaných látok vykazujú vybrané deriváty zoradené descendentne: K1712 ($IC_{50} = 129,05 \pm 10,75$), K1713, K1961, K1964, K1967, K1706, K1960, K1979, K1959 ($IC_{50} = 69,08 \pm 0,81$). Cytotoxicita týchto látok je reprezentovaná najvyššími nameranými hodnotami IC_{50} , ktoré zároveň korešpondujú s hodnotami IC_{50} štandardných látok, konkrétne 7-MEOTA ($69,84 \pm 8,11$) a Imipramin ($99,61 \pm 2,73$), a preto sa dané hodnoty javia ako akceptovateľné.

Primárna odlišnosť vo veľkosti karbocyklického kruhu ovplyvňuje cytotoxicitu bez prítomnej substitúcie fenoxý- jadra tak, že deriváty s päťčlenným karbocyklickým kruhom vykazujú najnižšiu cytotoxicitu ($IC_{50} = 55,74 \pm 3,36$), za nimi nasledujú deriváty so sedemčlenným karbocyklickým kruhom ($IC_{50} = 38,62 \pm 2,14$) a nakoniec deriváty so šesťčlenným kruhom ($IC_{50} = 20,98 \pm 2,22$) (v tomto prípade je využitý ako zástupca derivát s fenoxý- jadrom substitovaným metylom v polohe 4).

Deriváty prvej skupiny predstavujú najpočetnejšiu skupinu látok s najnižšou cytotoxicitou (K1706, K1967, K1961, K1964, K1979), z druhej skupiny je zastúpená len jedna látka (K1959) a z tretej skupiny tri látky (K1712, K1713, K1960). Tieto zistenia naznačujú, že veľkosť nasýteného kruhu významne ovplyvňuje celkovú cytotoxicitu testovaných látok.

Typ a poloha substituentu na fenoxi- jadre, taktiež prispieva k výslednej cytotoxicite derivátov, ktorých ovplyvnenie je v nasledujúcich popisoch porovnávané s cytotoxicitou testovaných látok s nesubstituovaným fenoxi- jadrom u prvej a tretej skupiny. V prípade druhej skupiny derivátov ide o porovnávanie ovplyvnenia oproti derivátu s metyl- substitúciou v polohe 4 fenoxi- jadra .

Metylácia je najčastejším typom substitúcie vo všetkých troch skupinách derivátov. V prvej skupine vedie metylácia v polohe 2 alebo 4 k výraznému zníženiu cytotoxicity. Zatiaľ čo metylácia v polohe 5 a dimetylácia (polohy 3 a 5) viedli k zvýšeniu cytotoxicity oproti nesubstituovanému jadru.

V druhej skupine derivátov, rovnaké substitúcie nevykazovali zlepšenie cytotoxicity týchto látok a hodnoty IC_{50} boli veľmi blízke bez ohľadu na polohu substituentu. U tretej skupiny derivátov, metylácia v polohe 4 spôsobila významné zníženie cytotoxicity v porovnaní s nesubstituovaným jadrom, kým dimetylácia v polohách 3 a 5 viedla k miernemu zvýšeniu, pričom metylácia v polohe 5 alebo 2 viedla k výraznému zvýšeniu cytotoxicity.

Druhý najčastejší typ substituentu u všetkých troch skupín, predstavuje metoxy- skupina. Pridaním metoxy- skupiny do polohy 4 alebo 5, došlo k značnému zníženiu cytotoxicity u prvej skupiny derivátov. V prípade druhej skupiny, metoxy- skupina v polohe 2 ako jediná preukázala zníženie cytotoxicity u týchto derivátov. Čo sa týka tretej skupiny, k výraznému zníženiu cytotoxicity prispela metoxy- skupina v polohe 2, zatiaľ čo v polohe 4 alebo 5 vo veľkej miere prispela k jej zvýšeniu.

U všetkých troch skupín derivátov sa vyskytuje substitúcia chlórom v polohe 4 fenoxi- jadra. Táto substitúcia viedla u látok prvej a druhej skupiny k zvýšeniu cytotoxicity, zatiaľ čo u tretej skupiny poskytuje látku s výhodnejším cytotoxickým profilom.

Spoločným znakom všetkých troch skupín derivátov je, že vykazujú najvyššiu cytotoxicitu pri substitúcii *tert*-butylom v polohe 4 fenoxi- jadra.

Jediným príkladom substitúcie s keto- skupinou v polohe 4 fenoxi- jadra je K1979 z prvej skupiny derivátov, ktorá pozitívne ovplyvnila cytotoxicitu danej látky.

Súčasne najčastejším typom prípravy MTDLs pre AD je spojenie dvoch heterogénnych farmakoforov uhlíkovým reťazcom. Tento prístup má však za následok zvýšenie molekulovej hmotnosti výsledných zlúčenín, zníženie ich rozpustnosti a ďalšie nevýhodné fyzikálne- chemické vlastnosti, a preto je vhodnejším prístupom hľadať kombináciu rôznych farmakoforov v rámci jednej molekuly. Testované deriváty fenoxytakrínu sú malé molekuly a môžu mať výhodu vo farmakokinetickom profile oproti svojim predchodcom, známym ako "hybridné zlúčeniny".

Výhody fenoxytakrínu a jeho derivátov spočívajú v ich schopnosti pôsobiť na viaceré ciele, konkrétne na AChE a súčasne na NMDARs. *In vivo* štúdie preukázali neuroprotektívny účinok fenoxytakrínu [135], ktorý sa očakáva aj u jeho derivátov.

Okrem toho 7-PhO-THA a jeho deriváty boli navrhnuté s cieľom znížiť toxicitu pozorovanú u pôvodného THA. Vzhľadom na to, že bol THA z trhu stiahnutý z dôvodu hepatotoxicity, vyvoláva to obavy týkajúce sa toxického profilu nových látok vychádzajúcich z jeho štruktúry. Hlavným faktorom spôsobujúcim hepatotoxicitu THA je jeho biotransformácia na hydroxylované metabolity. Za najnebezpečnejší z týchto hydroxylovaných metabolitov je pokladaný 7-hydroxytakrín (7-OH-takrín), ktorý tvorí približne 30 % z celkového množstva všetkých metabolitov v prípade THA a 7-MEOTA. Avšak, v prípade 7-PhO-THA je jej prítomnosť minimálna (1%). Zistená veľmi nízka incidencia metabolitu 7-OH-takrínu u 7-PhO-THA pravdepodobne súvisí s prítomnosťou fenoxyskupiny [156]. Preto by sa úspešnou substitúciou v aromatickej časti základného skeletu THA malo predísť tvorbe hepatotoxických metabolitov.

Je však dôležité poznamenať, že v niektorých prípadoch pri príprave základných roztokov testovaných látok so štandardnou koncentráciou 300 μM , nebolo možné jednoznačne určiť, či roztok obsahoval nečistoty pochádzajúce zo syntézy alebo či ide o nedostatočnú rozpustnosť samotnej látky. Po konzultácii, bolo z tohto dôvodu rozhodnuté znížiť koncentráciu látok K1712, K1713, K1966 na 200 μM a látky K1978 na 225 μM . Toto naznačuje potrebu ďalšieho testovania týchto látok, najmä pokiaľ ide o ich rozpustnosť.

Na základe pozorovania, že 7-fenoxytakrín preukázal dobrú schopnosť preniknúť cez hematoencefalickú bariéru (HEB) [135], boli vykonané testy na charakterizáciu penetrácie HEB jeho derivátov (K1705 – K1713). V prípade látok K1705 a K1706 bola vykonaná predikcia ich schopnosti preniknúť cez HEB, pričom derivát K1706 sa klasifikuje ako látka, ktorá HEB neprechádza. Derivát K1705 bol zaradený medzi látky s neistou penetráciou cez HEB. V tomto experimente sa len tieto dva deriváty

klasifikovali pre prevedenie tohto testu, dôvodom vylúčenia zvyšných derivátov bola ich vysoká toxicita [155].

Vývoj MTDLs sa okrem látok odvodených od THA, zameriava taktiež na prírodné látky. Jedným z príkladov je nedávna syntéza nových derivátov na báze kumarínov. Kumaríny sú rovnako ako deriváty fenoxytakrínu zaujímavými zlúčeninami pre vývoj v oblasti inhibície AChE. Ich štruktúra umožňuje početné substitúcie na rôznych miestach. Mnoho prírodných kumarínov sa vyznačuje anti-AD aktivitou, patrí k nim napr. eskuletín I, dekursinol II, skopoletín III a mesuagenín. *In vitro* testy preukázali potenciál kumarínového skeletu inhibovať cholinesterázové enzýmy. Oproti derivátom fenoxytakrínu sa im prisudzujú ďalšie biologické účinky na rôzne aspekty AD, ako je inhibícia β -sekretázy, antagonistický účinok na cyklooxygenázy/lipoxygenázy, antagonizácie kanabinoidného receptora 2, či taktiež inhibícia NMDARs. Boli však v porovnaní s referenčnými látkami (donepezil a kyselina askorbová) vyhodnotené najmä ako inhibítory AChE a antioxidanty. Testovaná zlúčenina s najväčším potenciálom (v citovanej publikácii označená ako 4c) z týchto nových derivátov, nevyvoláva významnú zmenu v hladinách krvných parametrov, či hladinách hepatických enzýmov. Farmakokinetický profil tejto látky ukázal, že zlúčenina 4c dodržiava Lipinského pravidlo, čím preukázala svoju dobrú perorálnu dostupnosť, vysokú absorpciu v črevnom trakte, nie je mutagénna, karcinogénna ani dráždivá, zároveň preukázala bezpečný toxický profil. Napriek početným výhodným vlastnostiam, predikovaný prienik tejto testovanej látky (4c) cez hematoencefalickú bariéru a dostupnosť v CNS je rovnako nedostatočná/problémová ako v prípade derivátov fenoxytakrínu (K1705 a K1706) [157].

Sľubnými multifunkčnými látkami sa javili 8-hydroxychinolínové deriváty (konkrétne cliochinol), ktoré boli skúmané pre ich neuroprotektívny účinok pri AD a vstúpili do klinických skúšok. Bohužiaľ, počas prípravy na klinickú skúšku fázy 2/3 oznámila spoločnosť Prana ukončenie vývoja lieku cliochinol, pretože výrobný proces vytváral toxický kontaminant [160]. Napriek tomu sa v skúmaní týchto štruktúr pokračovalo, pretože deriváty chinolínu preukázali inhibičnú účinnosť voči AChE/BuChE, antioxidačnú aktivitu, schopnosť viazať kovy, protizápalovú účinnosť a inhibičné účinky na agregáciu A β . Novým prístupom k týmto štruktúram je získanie chinolín-O-karbamátových derivátov ako potencionálnych MTDLs. Chinolín-5-yl dietylkarbamát vykazuje vlastnosti perspektívnej zlúčenina. *In vitro* testy preukázali jej reverzibilnú duálnu inhibíciu AChE/BuChE, dobrú protizápalovú aktivitu a významný

neuroprotektívny účinok. Rovnako ako u derivátov fenoxytakrínu je potreba ďalšieho testovania [161].

Spoločnými znakmi MTDLs vo vývoji je vo väčšine prípadov prítomnosť niekoľkých kondenzovaných cyklov v základnom skelete. Často má jeden alebo viacero cyklov aromatický charakter a poskytuje priestor pre variáciu možných substitúcií. Tieto látky *in vitro* vykazujú žiadané biologické účinky voči svojim cieľom, avšak častou prekážkou v dosiahnutí výhodných fyzikálne-chemických profiloch je práve samotná štruktúra týchto molekúl. U mnohých látok nie je zrejмый prienik cez hematoencefalickú bariéru, čo je dôležitý faktor pre ich uplatnenie.

Deriváty fenoxytakrínu, ako súčasť MTDLs, vykazujú mnohé podobnosti s vyššie uvedenými látkami. Najväčším limitujúcim faktorom týchto látok je ich značná toxicita. Napriek tomu sú zaujímavými molekulami s duálnym účinkom, ktorých ďalšie testovanie, poskytnú dodatočné informácie pre zhodnotenie ich celkového potenciálu v rámci MTDLs.

10 Závěry

- Bola stanovená cytotoxicita derivátov 7-fenoxytakrínu využitím MTT testu, reprezentovaná toxikologickými indexmi IC_{50} .
- Vybrané látky (K1712, K1713, K1961, K1964, K1967, K1706, K1960, K1979, K1959) majú najvyšší potenciál zo všetkých testovaných látok, vďaka ich nižšej alebo zrovnateľnej toxicite oproti štandardným látkam 7-MEOTA a Imipramin.
- Celkovú toxicitu výrazne ovplyvnila veľkosť nasýteného karbocyklického kruhu v štruktúre derivátov, z čoho päťčlenný kruh sa javí ako výhodný.
- Sú potrebné ďalšie štúdie pre zhodnotenie potenciálu týchto látok.

11 Zoznam skratiek

7-MEOTA	7-metoxytakrín
7-PhO-THA	7-fenoxytakrín
ABAD	Amyloid- β alkohol dehydrogenáza
AD	Alzheimerova choroba
ADAM	α -sekretáza
AGE	Produkty pokročilej glykosylácie
AChE	Acetylcholinesteráza
AChEi	Inhibítory acetylcholinesterázy
AICD	APP-intracelulárna doména
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloidný prekursorový proteín
ATP	Adenozín trifosfát
A β	Amyloid – β
A β _{40/42}	Toxické druhy A β o dĺžke 40 a 42 aminokyselín
A β Os	Rozpustné amyloid- β oligoméry
BACE1	β -sekretáza
BDNF	Neurotrofický mozgový faktor
BuChE	Butylcholinesteráza
CAA	Cerebrálna amyloidná angiopatia
CDK-5	Cyklín-dependentná kináza 5
CNS	Centrálny nervový systém
CSF	Mozgovo-miechový mok
CTF- $\alpha/\beta/\eta$	C-terminálny fragment
DS	Downov syndróm
EOAD	Včasná forma Alzheimerovej choroby
GSK-3 β	Glykogén syntáza kináza-3 β
HEB	Hematoencefalická bariéra
HMW	High-molecular weight
ChEi	Inhibítory cholinesteráz
LDLR	Low density lipoproteins receptors
LMW	Low-molecular weight

LOAD	Neskorá forma Alzheimerovej choroby
MAPKs	Mitogénom aktivované proteín kinázy
MCI	Mild Cognitive Impairment
MMP	Mitochondriálny membránový potenciál
MTDLs	Multi-Target Drug-Like Compounds
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-difenyltetrazólium bromid)
NFTs	Neurofibrilárne splete
NMDARs	N-metyl- d -aspartátové receptory
PFs	Protofibrily
PHFs	Paired helical filaments
ProRR	Proline rich regions
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSEN1	Presenilín 1
PSEN2	Presenilín 2
ROS	Reaktívne formy kyslíka
TFEB	Transkripčný faktor EB
THA	Takrín
UPS	Ubikvitin-proteázomový systém

12 Zoznam literatúry

- [1] Chengxuan Qiu, Miia Kivipelto & Eva von Strauss (2009) Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention, *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11:2, 111-128, DOI: [10.31887/DCNS.2009.11.2/cqju](https://doi.org/10.31887/DCNS.2009.11.2/cqju)
- [2] (2023), 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.*, 19: 1598-1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>
- [3] Greenstein B. a Greenstein A.(2000) The Higher Brain Centers. In: *Color Atlas of Neuroscience, Neuroanatomy and Neurophysiology*. Thieme Stuttgart, New York, str.376-378.
- [4] Castrillo IJ, Oliver GS. (eds.) (2015) *Systems Biology of Alzheimer's Disease*. Humana Press, New York, 581 strán.
- [5] Mumtaz I, Ayaz MO, Khan MS, Manzoor U, Ganayee MA, Bhat AQ, Dar GH, Alghamdi BS, Hashem AM, Dar MJ, Ashraf GM and Maqbool T (2022) Clinical relevance of biomarkers, new therapeutic approaches, and role of post-translational modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 14:977411. doi: 10.3389/fnagi.2022.977411
- [6] Coronel, R., Bernabeu-Zornoza, A., Palmer, C. *et al.* (2018) Role of Amyloid Precursor Protein (APP) and Its Derivatives in the Biology and Cell Fate Specification of Neural Stem Cells. *Mol Neurobiol* 55, 7107–7117. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0914-2>
- [7] Gunhild W., Burns A. (eds) (2017) *Alzheimer's Disease*, 2rd. ed. Ashford Colour Press Ltd, Gosport, Hampshire, 124 strán.
- [8] Chasseigneaux, S. and Allinquant, B. (2012) Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *Journal of Neurochemistry*, 120: 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x>
- [9] Rukmangadachar LA, Bollu PC Amyloid Beta Peptide [online] Posledná revízia 08. 2022 [citované 2023-03-20]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459119/>>

- [10] Yan SD, Stern DM (2005) Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease: role of amyloid-beta peptide alcohol dehydrogenase (ABAD). *Int J Exp Pathol.*;8 (3):161-71. <doi: 10.1111/j.0959-9673.2005.00427.x. >
- [11] Vitolo OV, Sant'Angelo A, Costanzo V, Battaglia F, Arancio O, Shelanski M. (2002) Amyloid beta -peptide inhibition of the PKA/CREB pathway and long-term potentiation: reversibility by drugs that enhance cAMP signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;99(20):13217-21. <doi: 10.1073/pnas.172504199. >
- [12] Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT (2018) Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)* ;4:575-590. doi: 10.1016/j.trci.2018.06.014.
- [13] Awada AA (2015) Early and late-onset Alzheimer's disease: What are the differences? *J Neurosci Rural Pract.* ;6(3):455-6. doi: 10.4103/0976-3147.154581.
- [14] Rabinovici GD (2019). Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneap Minn).* ;25(1):14-33. doi: 10.1212/CON.0000000000000700.
- [15] The UniProt Consortium, UniProt (2023),: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue D1, D523–D531, <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- [16] Pampa Saha, Nilkantha Sen (2019) Tauopathy: A common mechanism for neurodegeneration and brain aging, *Mechanisms of Ageing and Development*, Volume 178, 72-79, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.01.007>.
- [17] Kopan R. (2012) Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* ;4(10):a011213. doi: 10.1101/cshperspect.a011213.
- [18] Gulino A, Di Marcotullio L, Screpanti I. (2010) The multiple functions of Numb. *Exp Cell Res.*;316(6):900-6. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.11.017.
- [19] Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Thirumalai D, Palaniappan B. (2020) Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int J Biol Macromol.*;163:1599-1617. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.327.

- [20] Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. (2020) The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol.*;140(4):417-447. doi: 10.1007/s00401-020-02196-w.
- [21] Liang SY, Wang ZT, Tan L, Yu JT. (2022) Tau Toxicity in Neurodegeneration. *Mol Neurobiol.*;59(6):3617-3634. doi: 10.1007/s12035-022-02809-3.
- [22] Shahani N, Brandt R.(2002) Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci.* ;59(10):1668-80. doi: 10.1007/pl00012495. PMID: 12475178.
- [23] Stoothoff WH, Johnson GV. (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta.*;1739(2-3):280-97. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.017.
- [24] Albayram O, Herbert MK, Kondo A, Tsai CY, Baxley S, Lian X, Hansen M, Zhou XZ, Lu KP. (2016) Function and regulation of tau conformations in the development and treatment of traumatic brain injury and neurodegeneration. *Cell Biosci.*;6:59. doi: 10.1186/s13578-016-0124-4.
- [25] Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. (2010) Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.*;7(8):656-64. doi: 10.2174/156720510793611592.
- [26] Cavallini A, Brewerton S, Bell A, Sargent S, Glover S, Hardy C, Moore R, Calley J, Ramachandran D, Poidinger M, Karran E, Davies P, Hutton M, Szekeres P, Bose S. (2013) An unbiased approach to identifying tau kinases that phosphorylate tau at sites associated with Alzheimer disease. *J Biol Chem.*;288(32):23331-47. doi: 10.1074/jbc.M113.463984.
- [27] Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. (2013) The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol.*;4:83. doi: 10.3389/fneur.2013.00083.
- [28] Afram E, Lauritzen I, Bourgeois A, El Manaa W, Duplan E, Chami M, Valverde A, Charlotte B, Pardossi-Piquard R, Checler F. (2023) The η -secretase-derived APP fragment η CTF is localized in Golgi, endosomes and extracellular vesicles and

contributes to A β production. *Cell Mol Life Sci.* ;80(4):97. doi: 10.1007/s00018-023-04737-4.

- [29] Craig LA, Hong NS, McDonald RJ. (2011) Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.*;35(6):1397-409. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.03.001.
- [30] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. (2016) Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol.*;14(1):101-15. doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
- [31] Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*;66(2):137-147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137.
- [32] Bartus RT. (1978) Evidence for a direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav.*;9(6):833-6. doi: 10.1016/0091-3057(78)90364-7.
- [33] Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. (2013) Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol.*;9(2):106-18. doi: 10.1038/nrneurol.2012.263.
- [34] Hunsberger HC, Pinky PD, Smith W, Suppiramaniam V, Reed MN. (2019) The role of APOE4 in Alzheimer's disease: strategies for future therapeutic interventions. *Neuronal Signal.*;3(2):NS20180203. doi: 10.1042/NS20180203.
- [35] Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. (2021) APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol.*;20(1):68-80. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- [36] Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S,

Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Slegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.*;41(10):1088-93. doi: 10.1038/ng.440.

- [37] Minta K, Brinkmalm G, Janelidze S, Sjödin S, Portelius E, Stomrud E, Zetterberg H, Blennow K, Hansson O, Andreasson U. (2020) Quantification of total apolipoprotein E and its isoforms in cerebrospinal fluid from patients with neurodegenerative diseases. *Alzheimers Res Ther.*;12(1):19. doi: 10.1186/s13195-020-00585-7.
- [38] Tan JZA, Gleeson PA. (2019) The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr.*;1861(4):697-712. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.11.013.
- [39] Limegrover CS, LeVine H 3rd, Izzo NJ, Yurko R, Mozzoni K, Rehak C, Sadlek K, Safferstein H, Catalano SM. (2021) Alzheimer's protection effect of A673T mutation may be driven by lower A β oligomer binding affinity. *J Neurochem.*;157(4):1316-1330. doi: 10.1111/jnc.15212.
- [40] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016 Jun 1;8(6):595-608. doi: 10.15252/emmm.201606210. PMID: 27025652; PMCID: PMC4888851.
- [41] Greenwald J, Riek R. (2010) Biology of amyloid: structure, function, and regulation. *Structure.*;18(10):1244-60. doi: 10.1016/j.str.2010.08.009.
- [42] Mendez MF. (2019) Early-onset Alzheimer Disease and Its Variants. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*;25(1):34-51. doi: 10.1212/CON.0000000000000687.

- [43] Rabinovici GD. (2019) Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis)*;25(1):14-33. doi: 10.1212/CON.0000000000000700.
- [44] Calabrò M, Rinaldi C, Santoro G, Crisafulli C. (2020) The biological pathways of Alzheimer disease: a review. *AIMS Neurosci.*;8(1):86-132. doi: 10.3934/Neuroscience.2021005.
- [45] Epis R, Marcello E, Gardoni F, Di Luca M. (2012) Alpha, beta-and gamma-secretases in Alzheimer's disease. *Front Biosci (Schol Ed)*.;4(3):1126-50. doi: 10.2741/s322.
- [46] Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, Villemagne VL, Aisen P, Vendruscolo M, Iwatsubo T, Masters CL, Cho M, Lannfelt L, Cummings JL, Vergallo A. (2021) The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*.;26(10):5481-5503. doi: 10.1038/s41467-021-01249-0.
- [47] Vecchi G, Sormanni P, Mannini B, Vandelli A, Tartaglia GG, Dobson CM, Hartl FU, Vendruscolo M. (2020) Proteome-wide observation of the phenomenon of life on the edge of solubility. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;117(2):1015-1020. doi: 10.1073/pnas.1910444117.
- [48] Li JW, Zong Y, Cao XP, Tan L, Tan L. (2018) Microglial priming in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*.;6(10):176. doi: 10.21037/atm.2018.04.22.
- [49] Ono K, Watanabe-Nakayama T. (2021) Aggregation and structure of amyloid β -protein. *Neurochem Int*.;151:105208. doi: 10.1016/j.neuint.2021.105208.
- [50] Almeida ZL, Brito RMM. (2020) Structure and Aggregation Mechanisms in Amyloids. *Molecules*.;25(5):1195. doi: 10.3390/molecules25051195.
- [51] Srivastava A, Pittman J, Zerweck J, Somireddy B, Moore P, Sachleben J, Meredith S. (2019). β -Amyloid Aggregation and Heterogeneous Nucleation. *Protein Science*. 28. 10.1002/pro.3674.
- [52] Chatani E, Yamamoto N.(2018) Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys Rev*. ;10(2):527-534. doi: 10.1007/s12551-017-0353-8.

- [53] Törnquist M , Michaels TCT , Sanagavarapu K , Yang X , Meisl G , Cohen SIA , Knowles TPJ , Linse S .(2018) Secondary nucleation in amyloid formation. *Chem Commun (Camb)*. ;54(63):8667-8684. doi: 10.1039/c8cc02204f.
- [54] Muschol M, Hoyer W. (2023) Amyloid oligomers as on-pathway precursors or off-pathway competitors of fibrils. *Front Mol Biosci*.;10:1120416. doi: 10.3389/fmolb.2023.1120416.
- [55] Sinnige T. (2022) Molecular mechanisms of amyloid formation in living systems. *Chem Sci*. 2022 May 17;13(24):7080-7097. doi: 10.1039/d2sc01278b.
- [56] Economou NJ, Giammona MJ, Do TD, Zheng X, Teplow DB, Buratto SK, Bowers MT. (2016) Amyloid β -Protein Assembly and Alzheimer's Disease: Dodecamers of A β 42, but Not of A β 40, Seed Fibril Formation. *J Am Chem Soc*.;138(6):1772-5. doi: 10.1021/jacs.5b11913.
- [57] Sipe JD., Cohen AS. (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*.;130(2-3):88-98. doi: 10.1006/jsbi.2000.4221.
- [58] Sugimoto A., Ono K. (2022) Chapter 4 - Basics of amyloid β -protein in Alzheimer's disease. In: Hamano T., Mutoh T. (ed.) *Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease and Dementia*, Academic Press, str. 73-89.
- [59] Sanches MN., Knapp K., Oliveira AB. Jr, Wolynes PG., Onuchic JN., Leite VBP. (2022) Examining the Ensembles of Amyloid- β Monomer Variants and Their Propensities to Form Fibers Using an Energy Landscape Visualization Method. *J Phys Chem B*.;126(1):93-99. doi: 10.1021/acs.jpcc.1c08525.
- [60] Mroczko B., Groblewska M., Litman-Zawadzka A., Kornhuber J., Lewczuk P. (2018) Amyloid β oligomers (A β Os) in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*.;125(2):177-191. doi: 10.1007/s00702-017-1820-x.
- [61] Cline EN., Bicca MA., Viola K.L, Klein WL. (2018) The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis*.;64(s1):S567-S610. doi: 10.3233/JAD-179941.

- [62] Huang YR. A Liu RT. (2020) The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *Int J Mol Sci.*;21(12):4477. doi: 10.3390/ijms21124477.
- [63] Ono K. a Tsuji M.(2020) Protofibrils of Amyloid- β are Important Targets of a Disease-Modifying Approach for Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.*;21(3):952. doi: 10.3390/ijms21030952.
- [64] Paranjape GS., Terrill SE., Gouwens LK., Ruck BM., Nichols MR. (2013) Amyloid- β (1-42) protofibrils formed in modified artificial cerebrospinal fluid bind and activate microglia. *J Neuroimmune Pharmacol.*;8(1):312-22. doi: 10.1007/s11481-012-9424-6.
- [65] Walker LC. (2020) A β Plaques. *Free Neuropathol.*;1:1-31. doi: 10.17879/freeneuropathology-2020-3025.
- [66] Schreiner TG., Schreiner OD., Adam M., Popescu BO. (2023) The Roles of the Amyloid Beta Monomers in Physiological and Pathological Conditions. *Biomedicines.*;11(5):1411. doi: 10.3390/biomedicines11051411.
- [67] Boon BDC, Bulk M, Jonker AJ, Morrema THJ, van den Berg E, Popovic M, Walter J, Kumar S, van der Lee SJ, Holstege H, Zhu X, Van Nostrand WE, Natté R, van der Weerd L, Bouwman FH, van de Berg WDJ, Rozemuller AJM, Hoozemans JJM. (2020) The coarse-grained plaque: a divergent A β plaque-type in early-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*;140(6):811-830. doi: 10.1007/s00401-020-02198-8.
- [68] Dominguez-Meijide A, Vasili E, Outeiro TF. (2020) Pharmacological Modulators of Tau Aggregation and Spreading. *Brain Sci.*;10(11):858. doi: 10.3390/brainsci10110858.
- [69] Chu D. a Liu F. (2019) Pathological Changes of Tau Related to Alzheimer's Disease. *ACS Chem Neurosci.*;10(2):931-944. doi: 10.1021/acchemneuro.8b00457.
- [70] Sebastián-Serrano Á, de Diego-García L, Díaz-Hernández M. (2018) The Neurotoxic Role of Extracellular Tau Protein. *Int J Mol Sci.*;19(4):998. doi: 10.3390/ijms19040998.
- [71] Fleeman RM, Proctor EA. (2021) Astrocytic Propagation of Tau in the Context of Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.*;15:645233. doi: 10.3389/fncel.2021.645233.

- [72] Kaku T, Tsukakoshi K, Ikebukuro K. (2021) Cytotoxic A β Protofilaments Are Generated in the Process of A β Fibril Disaggregation. *Int J Mol Sci.*;22(23):12780. doi: 10.3390/ijms222312780.
- [73] Xue WF, Hellewell AL, Hewitt EW, Radford SE. (2010) Fibril fragmentation in amyloid assembly and cytotoxicity: when size matters. *Prion.*;4(1):20-5. doi: 10.4161/pri.4.1.11378.
- [74] Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.*;118(1):5-36. doi: 10.1007/s00401-009-0532-1.
- [75] Alonso AC, Li B, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. (2008) Mechanism of tau-induced neurodegeneration in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.*;5(4):375-84. doi: 10.2174/156720508785132307.
- [76] Brunello CA, Merezhko M, Uronen RL, Huttunen HJ. (2020) Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cell Mol Life Sci.*;77(9):1721-1744. doi: 10.1007/s00018-019-03349-1.
- [77] Vogel JW, Iturria-Medina Y, Strandberg OT, Smith R, Levitis E, Evans AC, Hansson O; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Swedish BioFinder Study (2020). Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nat Commun.*;11(1):2612. doi: 10.1038/s41467-020-15701-2.
- [78] d'Errico P, Meyer-Luehmann M. (2020) Mechanisms of Pathogenic Tau and A β Protein Spreading in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.*;12:265. doi: 10.3389/fnagi.2020.00265.
- [79] Annadurai N, De Sanctis JB, Hajdúch M, Das V. (2021) Tau secretion and propagation: Perspectives for potential preventive interventions in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Exp Neurol.*;343:113756. doi: 10.1016/j.expneurol.2021.113756.
- [80] Zhang H, Wei W, Zhao M, Ma L, Jiang X, Pei H, Cao Y, Li H. (2021) Interaction between A β and Tau in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biol Sci.*;17(9):2181-2192. doi: 10.7150/ijbs.57078.

- [81] Guglietti B, Sivasankar S, Mustafa S, Corrigan F, Collins-Praino LE. (2021) Fyn Kinase Activity and Its Role in Neurodegenerative Disease Pathology: a Potential Universal Target? *Mol Neurobiol.*;58(11):5986-6005. doi: 10.1007/s12035-021-02518-3.
- [82] Busche MA, Hyman BT. (2020) Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.*;23(10):1183-1193. doi: 10.1038/s41593-020-0687-6.
- [83] Tan A, Prasad R, Lee C, Jho EH. (2022) Past, present, and future perspectives of transcription factor EB (TFEB): mechanisms of regulation and association with disease. *Cell Death Differ.*;29(8):1433-1449. doi: 10.1038/s41418-022-01028-6.
- [84] Lee WJ, Brown JA, Kim HR, La Joie R, Cho H, Lyoo CH, Rabinovici GD, Seong JK, Seeley WW; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.(2022) Regional A β -tau interactions promote onset and acceleration of Alzheimer's disease tau spreading. *Neuron.*;110(12):1932-1943.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2022.03.034.
- [85] Anand r., Gill D.K., Mahdi A.A., (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future, *Neuropharmacology*, Volume 76, Part A, 27-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.004>.
- [86] Cummings J, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Cheng F. (2023) Alzheimer's disease drug development pipeline: 2023. *Alzheimers Dement (N Y).*;9(2):e12385. doi: 10.1002/trc2.12385.
- [87] Alušík Š., Doležal Z., Málek F., Seifert B., Slíva J., Vaněk T., Živný J. (2022) Novinky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty*, číslo 1. ISSN 1211-0647
- [88] Marucci G, Buccioni M, Ben DD, Lambertucci C, Volpini R, Amenta F. (2021) Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.*;190:108352. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108352.
- [89] Sharma K. (2019) Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Mol Med Rep.*;20(2):1479-1487. doi: 10.3892/mmr.2019.10374.

- [90] Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS. (2019) History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal Transduct Target Ther.*;4:29. doi: 10.1038/s41392-019-0063-8.
- [91] Cui X, Guo YE, Fang JH, Shi CJ, Suo N, Zhang R, Xie X. (2019) Donepezil, a drug for Alzheimer's disease, promotes oligodendrocyte generation and remyelination. *Acta Pharmacol Sin.*;40(11):1386-1393. doi: 10.1038/s41401-018-0206-4.
- [92] Alhazmi HA, Albratty M. (2022) An update on the novel and approved drugs for Alzheimer disease. *Saudi Pharm J.*;30(12):1755-1764. doi: 10.1016/j.jsps.2022.10.004.
- [93] Atri A. (2019) Current and Future Treatments in Alzheimer's Disease. *Semin Neurol.*;39(2):227-240. doi: 10.1055/s-0039-1678581.
- [94] Miranda A, Montiel E, Ulrich H, Paz C. (2021) Selective Secretase Targeting for Alzheimer's Disease Therapy. *J Alzheimers Dis.*;81(1):1-17. doi: 10.3233/JAD-201027.
- [95] Pardo-Moreno T, González-Acedo A, Rivas-Domínguez A, García-Morales V, García-Cozar FJ, Ramos-Rodríguez JJ, Melguizo-Rodríguez L. (2022) Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease: Current Treatments and New Perspectives. *Pharmaceutics.*;14(6):1117. doi: 10.3390/pharmaceutics14061117.
- [96] Curtis D, Bandyopadhyay S. (2021) Mini-review: Role of the PI3K/Akt pathway and tyrosine phosphatases in Alzheimer's disease susceptibility. *Ann Hum Genet.*;85(1):1-6. doi: 10.1111/ahg.12410.
- [97] Ramanan VK, Day GS. (2023) Anti-amyloid therapies for Alzheimer disease: finally, good news for patients. *Mol Neurodegener.*;18(1):42. doi: 10.1186/s13024-023-00637-0.
- [98] Pernecky R, Jessen F, Grimmer T, Levin J, Flöel A, Peters O, Froelich L. (2023) Anti-amyloid antibody therapies in Alzheimer's disease. *Brain.*;146(3):842-849. doi: 10.1093/brain/awad005.
- [99] Parrocha CMT, Nowick JS. (2023) Current Peptide Vaccine and Immunotherapy Approaches Against Alzheimer's Disease. *Pept Sci (Hoboken).*;115(1):e24289. doi: 10.1002/pep2.24289.

- [100] Yadollahikhales G, Rojas JC. (2023) Anti-Amyloid Immunotherapies for Alzheimer's Disease: A 2023 Clinical Update. *Neurotherapeutics*.;20(4):914-931. doi: 10.1007/s13311-023-01405-0.
- [101] GRADUATE I and II: Safety Results From Two Phase III Trials of Subcutaneous Gantenerumab in Early Alzheimer's Disease – Medically [online]. Posledná revízia 03.2023 [cit. 2023-08-20]. Dostupné z: <[GRADUATE I AND II: SAFETY RESULTS FROM TWO PHASE III TRIALS OF SUBCUTANEOUS GANTENERUMAB IN EARLY ALZHEIMER'S DISEASE - ADPD-2023-presentation-salloway-graduate-I-and-II-safety-results-from-two-phase.pdf \(gene.com\)](#)>
- [102] A study to look at whether crenezumab works and how safe it is in people with early Alzheimer's disease (CREAD) , Clinical trial results – summary – Roche diagnostics [online]. Posledná revízia 03.2022 [cit. 2023-08-20] Dostupné z: <[Clinical trial for \[Alzheimer's Disease \(AD\)\] - ForPatients by Roche](#)>
- [103] Chen Y, Yu Y. (2023) Tau and neuroinflammation in Alzheimer's disease: interplay mechanisms and clinical translation. *J Neuroinflammation*.;20(1):165. doi: 10.1186/s12974-023-02853-3.
- [104] VandeVrede L, Boxer AL, Polydoro M. (2020) Targeting tau: Clinical trials and novel therapeutic approaches. *Neurosci Lett*.;731:134919. doi: 10.1016/j.neulet.2020.134919.
- [105] Athar T, Al Balushi K, Khan SA. (2021) Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease. *Mol Biol Rep*.;48(7):5629-5645. doi: 10.1007/s11033-021-06512-9.
- [106] Wischik CM, Bentham P, Gauthier S, Miller S, Kook K, Schelter BO. (2022) Oral Tau Aggregation Inhibitor for Alzheimer's Disease: Design, Progress and Basis for Selection of the 16 mg/day Dose in a Phase 3, Randomized, Placebo-Controlled Trial of Hydromethylthionine Mesylate. *J Prev Alzheimers Dis*.;9(4):780-790. doi: 10.14283/jpad.2022.63.
- [107] Dubois B, López-Arrieta J, Lipschitz S, Doskas T, Spiru L, Moroz S, Venger O, Vermersch P, Moussy A, Mansfield CD, Hermine O, Tsolaki M; AB09004 Study Group Investigators. (2023) Masitinib for mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a

randomized, placebo-controlled, phase 3, clinical trial. *Alzheimers Res Ther.*;15(1):39. doi: 10.1186/s13195-023-01169-x.

- [108] Belder CRS, Schott JM, Fox NC. (2023) Preparing for disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*;22(9):782-783. doi: 10.1016/S1474-4422(23)00274-0.
- [109] van Dyck CH, Nygaard HB, Chen K, Donohue MC, Raman R, Rissman RA, Brewer JB, Koeppe RA, Chow TW, Rafii MS, Gessert D, Choi J, Turner RS, Kaye JA, Gale SA, Reiman EM, Aisen PS, Strittmatter SM. (2019) Effect of AZD0530 on Cerebral Metabolic Decline in Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.*;76(10):1219-1229. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.2050.
- [110] Nygaard HB. (2018) Targeting Fyn Kinase in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry.*;83(4):369-376. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.06.004.
- [111] Encyclopedia of Neuroscience (2009) Entorhinal and Perirhinal Cortices, , In: Binder MD., Hirokawa N., Windhorst U. (ed.) Heidelberg ,Berlin ,str. 1126
- [112] Reiss, A., Muhieddine, D., De Leon, A. *et al.* (2022) Tau and Alzheimer's Disease: Molecular Mechanisms and Treatment Approaches. *SN Compr. Clin. Med.* 4.. <https://doi.org/10.1007/s42399-021-01092-y>
- [113] Hana Florian et al., on behalf of the Aware Investigators, (2023) Tilavonemab in early Alzheimer's disease: results from a phase 2, randomized, double-blind study, *Brain*, Volume 146, Issue 6, 2275–2284, <https://doi.org/10.1093/brain/awad024>
- [114] Vivash L, Malpas CB, Hovens CM, Brodtmann A, Collins S, Macfarlane S, Velakoulis D, O'Brien TJ. (2021) Sodium selenate as a disease-modifying treatment for mild-moderate Alzheimer's disease: an open-label extension study. *BMJ Neurol Open.* ;3(2):e000223. doi: 10.1136/bmjno-2021-000223..
- [115] Ionescu-Tucker A, Cotman CW. (2021) Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*;107:86-95. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014.

- [116] Bai R, Guo J, Ye XY, Xie Y, Xie T. (2022) Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.*;77:101619. doi: 10.1016/j.arr.2022.101619.
- [117] Ardanaz CG, Ramírez MJ, Solas M. (2022) Brain Metabolic Alterations in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.*;23(7):3785. doi: 10.3390/ijms23073785.
- [118] Rojas M, Chávez-Castillo M, Bautista J, Ortega Á, Nava M, Salazar J, Díaz-Camargo E, Medina O, Rojas-Quintero J, Bermúdez V. (2021) Alzheimer's disease and type 2 diabetes mellitus: Pathophysiologic and pharmacotherapeutics links. *World J Diabetes.*;12(6):745-766. doi: 10.4239/wjd.v12.i6.745.
- [119] Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. (2022) Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci.*;23(5):2687. doi: 10.3390/ijms23052687.
- [120] Chen LL, Fan YG, Zhao LX, Zhang Q, Wang ZY. (2023) The metal ion hypothesis of Alzheimer's disease and the anti-neuroinflammatory effect of metal chelators. *Bioorg Chem.*;131:106301. doi: 10.1016/j.bioorg.2022.106301.
- [121] Di Natale G, Sabatino G, Sciacca MFM, Tosto R, Milardi D, Pappalardo G. (2022) A β and Tau Interact with Metal Ions, Lipid Membranes and Peptide-Based Amyloid Inhibitors: Are These Common Features Relevant in Alzheimer's Disease? *Molecules.*;27(16):5066. doi: 10.3390/molecules27165066.
- [122] Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, Pozo-Molina G, Méndez-Catalá CF, Cardenas-Aguayo MD, Diaz-Cintra S, Pacheco-Herrero M, Luna-Muñoz J, Soto-Rojas LO. (2023) Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci.*;24(4):3754. doi: 10.3390/ijms24043754.
- [123] Quan M, Cao S, Wang Q, Wang S, Jia J. (2023) Genetic Phenotypes of Alzheimer's Disease: Mechanisms and Potential Therapy. *Phenomics.*;3(4):333-349. doi: 10.1007/s43657-023-00098-x.

- [124] Piaceri I, Nacmias B, Sorbi S. (2013) Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Front Biosci (Elite Ed)*.;5(1):167-77. doi: 10.2741/e605.
- [125] Katsinelos T, Zeitler M, Dimou E, Karakatsani A, Müller HM, Nachman E, Steringer JP, Ruiz de Almodovar C, Nickel W, Jahn TR. (2018) Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau. *Cell Rep*.;23(7):2039-2055. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.056.
- [126] Aslantürk S.O. (2018) Chapter 1: In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: [Larramendy LM.](#), Soloneski S. (ed.) *Genotoxicity* . IntechOpen, Rijeka, str. 1-13.
- [127] Buckberry, L.D. (1999). Cytotoxicity Testing Using Cell Lines. In: Jenkins, N. (eds) *Animal Cell Biotechnology. Methods in Biotechnology™*, vol 8. Humana Press, Totowa NJ, str. 239-252 . DOI: 10.1385/0-89603-547-6:239
- [128] Gupta R.,Rajpoot K., Tekade M., Mukesh Sharma CHM., Tekade KR. (2022) Chapter 7 - Methods and models for in vitro toxicity, In: Tekade KR. (ed.) *In Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations*, Academic Press,Volume 2, str. 145-174.
- [129] Badr-Eldin SM, Aldawsari HM, Kotta S, Deb PK, Venugopala KN. (2022) Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. *Pharmaceuticals (Basel)*;15(8):926. doi: 10.3390/ph15080926.
- [130] Kamiloglu, S, Sari, G, Ozdal, T, Capanoglu, E. (2020) Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. ; 1: 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- [131] Eisenmenger LB, Peret A, Famakin BM, Spahic A, Roberts GS, Bockholt JH, Johnson KM, Paulsen JS. (2023) Vascular contributions to Alzheimer's disease. *Transl Res*.;254:41-53. doi: 10.1016/j.trsl.2022.12.003.
- [132] Rius-Pérez S, Tormos AM, Pérez S, Taléns-Visconti R. (2018) Vascular pathology: Cause or effect in Alzheimer disease? *Neurologia (Engl Ed)*.;33(2):112-120. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2015.07.010.

- [133] Scheffer S., van der Weerd L., de Vries E.H., Hermkens A.M.D., Daemen JAPM. (2021) Vascular Hypothesis of Alzheimer Disease. American Heart Association :Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, volume 4, 1265-1283. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.311911
- [134] Mitra S, Muni M, Shawon NJ, Das R, Emran TB, Sharma R, Chandran D, Islam F, Hossain MJ, Safi SZ, Sweilam SH. (2022) Tacrine Derivatives in Neurological Disorders: Focus on Molecular Mechanisms and Neurotherapeutic Potential. *Oxid Med Cell Longev.*;2022:7252882. doi: 10.1155/2022/7252882.
- [135] Kaniakova M, Korabecny J, Holubova K, Kleteckova L, Chvojkova M, Hakenova K, Prchal L, Novak M, Dolezal R, Hepnarova V, Svobodova B, Kucera T, Lichnerova K, Krausova B, Horak M, Vales K, Soukup O. (2021) 7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo. *Biochem Pharmacol.*;186:114460. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114460.
- [136] Fancellu G, Chand K, Tomás D, Orlandini E, Piemontese L, Silva DF, Cardoso SM, Chaves S, Santos MA. (2020) Novel tacrine-benzofuran hybrids as potential multi-target drug candidates for the treatment of Alzheimer's Disease. *J Enzyme Inhib Med Chem.*;35(1):211-226. doi: 10.1080/14756366.2019.1689237.
- [137] Ballard C, Aarsland D, Cummings J, O'Brien J, Mills R, Molinuevo JL, Fladby T, Williams G, Doherty P, Corbett A, Sultana J. (2020) Drug repositioning and repurposing for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.*;16(12):661-673. doi: 10.1038/s41582-020-0397-4.
- [138] Zdarova Karasova J, Soukup O, Korabecny J, Hroch M, Krejciova M, Hrabina M, Misik J, Novotny L, Hepnarova V, Kuca K. (2021) Tacrine and its 7-methoxy derivate; time-change concentration in plasma and brain tissue and basic toxicological profile in rats. *Drug Chem Toxicol.*;44(2):207-214. doi: 10.1080/01480545.2019.1566350.
- [139] Bechthold E, Schreiber JA, Lehmkuhl K, Frehland B, Schepmann D, Bernal FA, Daniliuc C, Álvarez I, Garcia CV, Schmidt TJ, Seebohm G, Wünsch B. (2021) Ifenprodil Stereoisomers: Synthesis, Absolute Configuration, and Correlation with Biological Activity. *J Med Chem.*;64(2):1170-1179. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c01912.

- [140] Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, Gallagher A, Goldstein JM, Kantarci K, Mallampalli MP, Mormino EC, Scott L, Yu WH, Maki PM, Mielke MM. (2018) Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement.*;14(9):1171-1183. doi: 10.1016/j.jalz.2018.04.008.
- [141] Ferretti MT, Martinkova J, Biskup E, Benke T, Gialdini G, Nedelska Z, Rauen K, Mantua V, Religa D, Hort J, Santuccione Chadha A, Schmidt R. (2020) Sex and gender differences in Alzheimer's disease: current challenges and implications for clinical practice: Position paper of the Dementia and Cognitive Disorders Panel of the European Academy of Neurology. *Eur J Neurol.*;27(6):928-943. doi: 10.1111/ene.14174.
- [142] Armstrong AR. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* 2019;57(2):87-105. doi: 10.5114/fn.2019.85929..
- [143] Zampar S, Wirths O. (2020) Chapter 2: Immunotherapy Targeting Amyloid- β Peptides in Alzheimer's Disease. In: Huang X, (ed.) *Alzheimer's Disease: Drug Discovery*. Brisbane (AU): Exon Publications, str. 23
- [144] Mendiola AS, Cardona AE. (2018) The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna).*;125(5):781-795. doi: 10.1007/s00702-017-1732-9.
- [145] NIA statement on crenezumab trial results: Anti-amyloid drug did not demonstrate a statistically significant clinical benefit in people with inherited form of Alzheimer's disease - *National Institute of Aging* [online]. Posledná revízia 06.2022 [cit. 2023-08-14]. Dostupné z: <https://www.nia.nih.gov/news/nia-statement-crenezumab-trial-results-anti-amyloid-drug-did-not-demonstrate-statistically>
- [146] Stewart J., *Drugs.com*: Donanemab FDA Approval Status [online]. Posledná revízia 03.2023 [cit. 2023-08-15]. Dostupné z: <<https://www.drugs.com/history/donanemab.html>>
- [147] *Genentech, Inc*: Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Semorinemab in Patients With Prodromal to Mild Alzheimer's Disease [online]. Posledná revízia 03.2022 [cit. 2023-08-15]. Dostupné z: <<https://clinicaltrials.gov/study/NCT03289143>>
- [148] *Eisai Inc.*: A Study to Assess Safety and Target Engagement of E2814 in Participants With Mild to Moderate Cognitive Impairment Due to Dominantly Inherited Alzheimer's

- Disease [online]. Posledná revízia 07.2023 [cit. 2023-08-15]. Dostupné z: <
https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04971733?lupd_s=06%2F21%2F2021>
- [149] *Biogen*: Biogen Announces Topline Results From Phase 2 Study of Gosuranemab, an Anti-Tau Antibody, for Alzheimer's Disease [online]. Posledná revízia 06.2021 [cit. 2023-08-16]. Dostupné z: <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/biogen-announces-topline-results-phase-2-study-gosuranemab-anti>
- [150] *Alzforum*: Tilavonemab [online]. Posledná revízia 02.2023 [cit. 2023-08-16]. Dostupné z: <<https://www.alzforum.org/therapeutics/tilavonemab>>
- [151] *Alzforum*: Zagotenemab [online]. Posledná revízia 10.2021 [cit. 2023-08-16]. Dostupné z: <<https://www.alzforum.org/therapeutics/zagotenemab>>
- [152] Zhu D, Tuo W. (2015) QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res.*;3(4):e113. doi: 10.4172/2329-6836.1000e113.
- [153] Eberle Ch. CHO cells – 7 facts about the cell line derived from the ovary of the Chinese hamster [online]. Posledná revízia 03.2022 [cit. 2023-09-01]. Dostupné z: [https://www.evitria.com/journal/cho-cells/cho-cells/#:~:text=CHO%20cells%20\(Chinese%20hamster%20ovary,the%20expression%20of%20recombinant%20antibodies.](https://www.evitria.com/journal/cho-cells/cho-cells/#:~:text=CHO%20cells%20(Chinese%20hamster%20ovary,the%20expression%20of%20recombinant%20antibodies.)
- [154] European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) Catalogue No.: 85051005, Cell Line Name: CHO-K1 [online][cit. 2023-09-07]. Dostupné z: https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85051005&collection=ecacc_gc
- [155] Vanická Michaela (2021): Predikce prostupu derivátů fenoxytakrinu přes hematoencefalickou bariéru. Diplomová práca. Katedra biologických a biochemických vied Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice, Pardubice, str. 61
- [156] Novak M, Svobodova B, Konecny J, Kuratkova A, Nevosadova L, Prchal L, Korabecny J, Lauschke VM, Soukup O, Kučera R. (2023) UHPLC-Orbitrap study of the first phase tacrine in vitro metabolites and related Alzheimer's drug candidates using human liver microsomes. *J Pharm Biomed Anal.*;224:115154. doi: 10.1016/j.jpba.2022.115154.

- [157] Kamel NN, Aly HF, Fouad GI, Abd El-Karim SS, Anwar MM, Syam YM, Elseginy SA, Ahmed KA, Booles HF, Shalaby MB, Khalil WKB, Sandhir R, Deshwal S, Rizk MZ. (2023) Anti-Alzheimer activity of new coumarin-based derivatives targeting acetylcholinesterase inhibition. *RSC Adv.*;13(27):18496-18510. doi: 10.1039/d3ra02344c. PMID: 37346948; PMCID: PMC10280131.
- [158] Maffei, A. (2018). Long-Term Potentiation and Long-Term Depression. *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. Doi: <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780190264086.013.148>
- [159] Chen S, Gouaux E. (2019) Structure and mechanism of AMPA receptor - auxiliary protein complexes. *Curr Opin Struct Biol.*;54:104-111. doi: 10.1016/j.sbi.2019.01.011.
- [160] Alzaforum: Clioguinol [online]. Posledná revízia 10.2012 [cit. 2023-09-08]. Dostupné z: <https://www.alzforum.org/therapeutics/clioguinol>
- [161] Chen H, Mi J, Li S, Liu Z, Yang J, Chen R, Wang Y, Ban Y, Zhou Y, Dong W, Sang Z. (2023) Design, synthesis and evaluation of quinoline-*O*-carbamate derivatives as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *J Enzyme Inhib Med Chem.*;38(1):2169682. doi: 10.1080/14756366.2023.2169682.
- [162] Borland E.,Edgar Ch., Stomrud E.,Cullen N., Hansson O., Palmqvist S. (2023) Clinically Relevant Changes for Cognitive Outcomes in Preclinical and Prodromal Cognitive Stages Implications for Clinical Alzheimer Trials. *Neurology* 99 (11) e1142-e1153; DOI: 10.1212/WNL.0000000000200817