

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH LÉČIV ALZHEIMEROVY CHOROBY
JAKOŽTO INHIBITORŮ PROLYLOLIGOPEPTIDASY**

Rigorózní práce

Konzultant rigorózní práce: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Školitel - specialista: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

Veselíčko, 30. srpna 2017

Mgr. Andrea Soukupová

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

V Hradci Králové dne 30. srpna 2017

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala plk. doc. PharmDr. Danielu Junovi Ph.D. a doc. PharmDr. Františkovi Trejtnarovi za odbornou pomoc a ochotu. Mgr. Martině Hrabínové děkuji za uvedení do metodiky použité v rámci této práce.

Děkuji také celé své rodině za jejich podporu.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Andrea Soukupová

Konzultant: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Školitel specialista: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, PhD.

Název rigorózní práce: Hodnocení potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby jakožto inhibitorů prolyloligopeptidasy

Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease, AD), jeden z nejčastěji se vyskytujících typů demence, je stále více znepokojující zdravotní, ekonomickou i sociální hrozbou. Přes značné úsilí a pokroky v poznání tohoto onemocnění za poslední desetiletí není stále k dispozici adekvátní kauzální farmakoterapie. Léčba je založena pouze na potlačení symptomů onemocnění pomocí centrálních inhibitorů acetylcholinesterasy a memantinu. Ovlivnění enzymu prolyloligopeptidasy (POP), jehož funkce pravděpodobně spočívá v regulaci hladin neuronálních peptidů, získalo pozornost jako možný přístup pro léčbu neuronálních poruch. Protože v minulosti byl vliv inhibitorů POP na zlepšení kognitivních vlastností již prokázán, je tato práce zaměřena na stanovení inhibiční účinnosti nově syntetizovaných sloučenin vůči tomuto enzymu. Testované látky byly primárně koncipovány jako inhibitory acetylcholinesterasy s potenciálním vlivem na N-methyl-D-aspartát (NMDA) receptory. Spolu s možným inhibičním účinkem na POP by zapadaly do nového konceptu léčby AD pomocí na několik cílů zaměřených ligandů (multi target directed ligands; MDTLs). K testování inhibiční aktivity látek vůči POP byla zvolena spektrofotometrická metoda se substrátem Z-Gly-Pro-p-nitroanilidem. Dosažené výsledky ovšem ukázaly, že ve srovnání se standardním substrátem mají testované látky relativně nízkou inhibiční aktivitu vůči POP. Na základě těchto *in vitro* dat nelze tedy u zkoumaných sloučenin očekávat jejich další uplatnění jako vývojových inhibitorů POP.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Andrea Soukupová

Supervisor: doc. PharmDr. František Trejtnar, CSc.

Supervisor specialist: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, PhD.

Title of Thesis: Evaluation of potential Alzheimer's disease drugs as prolyl oligopeptidase inhibitors

Alzheimer's disease (AD), which now seems to be one of the most common types of dementia, is alarming health, economic and social threat worldwide. Despite of significant progression in research during the last decade, casual treatment remains still unknown. Treatment of AD is limited only to suppression of the symptoms by centrally acting inhibitors of acetylcholinesterase and memantine. Enzyme prolyl oligopeptidase (POP) plays a role in regulation of neuronal peptides levels and therefore POP has gained attention as one of possible target for the treatment of neuronal disorders. Because effect of POP inhibitors on cognitive functions improvement was reported, the aim of this thesis was to determinate the inhibitory activity of newly prepared substabces. These substances were primarily designed as acetylcholinesterase inhibitors with potential N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonism. Additional POP inhibitory potential of novel compounds would even better fit into a concept of multi-target directed ligands (MDTL). Spectrophotometric method with Z-Gly-Pro-p-nitroanilide as the substrate was used to test the inhibitory potential. However, the results showed that the substances had a very low affinity for POP. Based on these *in vitro* data their furhter use as developmental inhibitors can not be expected.

Obsah práce:

Abstrakt	4
Abstract	5
A. Úvod	9
B. Teoretická část	10
1. Alzheimerova choroba a její patogeneze	10
2. Současné přístupy k léčbě AD	11
3. Experimentální terapeutické směry léčby AD.....	15
Ligandy zaměřené na několik cílů (multitarget-directed ligands).....	19
4. Prolyloligopeptidasa (POP)	19
C. Cíl práce	27
D. Metodika	28
2. Testované látky	28
3. Příprava reagensů.....	33
Příprava vzorků nových látek	34
5. Použité přístroje a pomůcky	35
6. Měření inhibiční aktivity látek vůči POP	35
Zpracování naměřených dat	36
E. Výsledky:	37
F. Diskuze	40
G. Závěr:	43
H. Reference	44

Použité zkratky:

ACPH	acylaminoacylpeptidasa
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
Ach	acetylcholin
AchE	acetylcholinesterasa
AchEi	inhibitory acetylcholinesterasy
AMK	aminokyselina
α -MSH	melanocyty stimulující hormon α
APP	prekurzorový protein amyloidu
A β	β -amyloid
Asp	kyselina asparagová
BuChE	butyrylcholinesterasa
DPPIV	dipeptidylpeptidasa IV
FSH	folikuly stimulující hormon
GnRH	gonadotropiny uvolňující hormon
His	histidin
ChAT	cholinacetyltransferasa
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru způsobující pokles aktivity enzymu o 50 %
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfát
LH	luteinizační hormon
MTDL	multi target direct ligands hypotéza
NGF	nervový růstový faktor (nerve growth factor)
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika (nonsteroid anti-inflammatory drugs)
OB	oligopeptidasa B
PAS	periferní vazebné místo
POP	prolyloligopeptidasa
PPCE	post-prolin štěpící enzym (post-proline cleaving enzyme)

SALAs	selective A β 42 lowering agents
SEM	směrodatná odchylka
Ser	serin
SSRi	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu
TRH	thyreoliberin
TSH	thyreotropin
7-MEOTA	7-methoxytakrin

A. Úvod

Alzheimerova choroba (AD) je jeden z nejčastěji se vyskytujících typů demence, projevující se poruchou paměti, změnou charakterových vlastností osobnosti (poruchy nálady, deprese, nespavost, halucinace), kognitivní dysfunkcí a dalšími symptomy. První popis onemocnění byl proveden roku 1907 Aloisem Alzheimerem, ovšem objasnění podstaty, diagnostika, popis příznaků, určení rizikových faktorů a způsob terapie zaznamenali širší rozvoj až v posledních 30 letech.

Mezi hlavní rizikové faktory onemocnění patří vysoký věk a díky stále se prodlužující délce života populace se zvyšuje i výskyt AD, u osob starších 85 let je postiženo přibližně 50 % populace. Celosvětově se počet lidí trpících AD odhaduje na 40 miliónů, v České republice touto chorobou trpí přibližně 50 až 70 tisíc osob a odhaduje se, že v roce 2040 budou tato čísla dvojnásobná. V USA se onemocnění AD vyšplhalo na šesté místo žebříčku příčin úmrtí pacientů (Jago, 2014).

AD začíná obvykle plíživě a rozvíjí se pomalu během několika let. K poruchám paměti se v pozdějších stádiích onemocnění přidružují další symptomy, jako je ztráta orientace v prostoru a čase, poruchy hybnosti, řeči, inkontinence, pacienti jsou pak často odkázáni na pomoc blízkých či pečovatelské služby a institucí. Jsou odloučeni od společnosti, nemoc znatelně snižuje kvalitu jejich života, ale i pečovateli, především rodinných příslušníků. Celková doba přežití je 5 – 19 let od projevu prvních příznaků (Jirák a Koukolík, 2004).

Sociální dopady a náklady na péči a léčbu jsou každým rokem výraznější, jen v USA byla v roce 2012 vynaložena na terapii AD částka 200 miliard dolarů (Jago, 2014). AD se stala znepokojující hrozbou, na kterou je potřeba odpovědět příslušnou léčbou a též prevencí (Salloway et al., 2008). Do výzkumu nových léčebných strategií v současnosti proudí mnoho finančních prostředků, stále se ovšem nepodařilo vyvinout léčbu kauzální. Všechny současné terapeutické postupy potlačují pouze symptomy onemocnění (Venäläinen et al., 2006).

Jedním z mnoha terapeutických přístupů, které v současnosti patří k nadějným vývojovým směrům pro léčbu AD, je zaměření na enzym prolyloligopeptidasu (POP). Tento enzym patřící mezi serinové proteasy je zapojen do mnoha fyziologických

procesů. Zájem farmacie o tento enzym vyvolalo prokázání anti-amnestického působení jeho inhibitorů. Prokázán byl i vliv na ukládání β -amyloidu. (Venäläinen et al., 2006).

B. Teoretická část

1. Alzheimerova choroba a její patogeneze

AD je chronické progresivní onemocnění nervové soustavy na podkladě degenerativního zániku neuronů. Jedná se o nejčastější typ demence ve středním věku. Příčiny a mechanismy AD nejsou doposud zcela objasněny, přičemž se předpokládá, že na vzniku se podílí několik faktorů a možnou roli zde hrají také genetické činitele (Nevšímalová et al., 2002).

AD můžeme pokládat za multifaktoriální onemocnění, v jehož patogenezi se uplatňuje více mechanismů, např. zrychlení apoptózy, toxické působení excitačních aminokyselin, snížená aktivita některých enzymů, reakce volných radikálů, lipoperoxidační děje a další. Možné patofyziologické hypotézy jsou shrnuty v tabulce 1. V důsledku těchto procesů lze pozorovat histopatologické změny (intracelulární neurofibrilární klubka, extracelulární senilní plaky s depozity amyloidu, amyloidovou angiopatii a v neposlední řadě úbytek neuronů, tzn. neurodegeneraci). Nález τ -proteinu a β -amyloidu většinou poukazuje na diagnózu AD, tyto projevy však mohou být přítomny i u jiných onemocnění neurodegenerativního charakteru. Podobně nebylo prokázáno, že nepřítomnost β -amyloidu vylučuje AD (Nevšímalová et al., 2002).

Rozlišujeme tedy minimálně tři hypotézy vzniku AD. První z nich je amyloidová kaskádová, tedy hypotéza založená na hromadění APP (prekurzorový protein amyloidu) a vzniklého A β (β -amyloidu) ve formě amyloidních plaků, které vyvolávají neurodegenerativní zánětlivé pochody poškozující neurony. Lokace genu pro APP je na chromozomu 21, možnou genetickou souvislost nasvědčuje skutečnost, že u jedinců s Downovým syndromem (trisomií 21. chromosomu) se po 35. roce věku

vyvíjejí mozkové a histopatologické projevy jinak typické pro AD. Ve většině případů ovšem není AD dědičná, pouze 2-7 % je podmíněno geneticky (Nevšímalová et al., 2002).

Druhá, cytoskeletální degenerativní hypotéza, udává jako spouštěcí mechanismus nemoci vznik neurofibrilárního klubka hyperfosforylovaného τ -proteinu (Pooler et al. 2014; Buée et al. 2000). Současně probíhají další neuropatologické změny jako je rozvoj zánětlivého procesu v okolí senilních plaků (Prokop et al., 2013) či projevy oxidativního stresu, oxidace proteinů, lipidů, DNA a tvorba toxických látek. To vše vede k buněčné apoptóze, nekróze a rozvoji neurodegenerativního onemocnění (Zhang et al., 2014)

Třetí, klasická teorie, která dala vznik současné léčbě pomocí inhibitorů acetylcholinesterasy (AChEi) si všímá hypofunkce centrálního cholinergního systému. Vychází zejména ze snížené aktivity cholinacetyltransferasy a pyruvát-dehydrogenásového komplexu, klíčových enzymů v syntéze acetylcholinu. Snížení cholinergní transmise je navíc podpořeno sníženou funkcí muskarinových cholinergních receptorů, která je spíše než úbytkem receptorů dána sníženým intracelulárním přenosem. Tato malfunkce mj. zapříčiňuje zvýšenou aktivitu enzymu GSK3 β , což vede k patologické hyperfosforylaci τ -proteinu. Oproti tomu, u nikotinových cholinergních receptorů byl pozorován snížený počet klíčových receptorů (Babic, 1999, Bartus et al., 1982).

Z výše uvedeného je patrné, že cholinergní, amyloidní i Tau teorie mají dosti společného a jsou vzájemně propojené. Je tedy logické, že výzkum se orientuje na léčiva stimulující cholinergní transmissi buď formou inhibice hydrolýzy acetylcholinu (AChEi), či aktivace centrálních M1 muskarinových a nikotinových receptorů (Babic, 1999).

2. Současné přístupy k léčbě AD

AD je považována za amyloidózu a proto je prevence či odstranění ukládání A β jeden z nejslibnějších přístupů k léčbě. Tímto směrem se vydala řada výzkumných týmů avšak i přes značné úsilí a finance investované do výzkumu není prozatím

k dispozici žádná kauzální léčba proti tomuto toxickému proteinu. Při AD je také výrazná ztráta cholinergní, noradrenergí, dopaminergní a GABAergní neurotransmise, tudíž mezi současně používaná léčiva patří inhibitory cholinesterasy (donepezil, rivastigmin a galantamin) a nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů (memantin) (Silvestrelli et al., 2006). Tento přístup přináší primárně pouze symptomatické benefity zahrnující pouze dočasné zlepšení kognitivních funkcí a zpomalení progresu onemocnění (Salloway et al., 2008).

Tabulka 1. Přehled patofyziologických hypotéz AD a dle nich cílené experimentální terapie. (adaptováno dle (Shah et al., 2008))

Patogenní proces	Léčba
Úbytek cholinergní neurotransmise	Inhibitory AChE 1. generace: takrin 2. generace: donepezil, rivastigmin, galantamin
Oxidativní stres	Selegilin, alfa-tokoferol, huperzin A
Amyloidní kaskáda	Statiny, A β vakcinace, modulátory sekretáz, SALAs
Fosforylace τ -proteinu	Inhibitory GSK 3 β
Zánět	NSAIDs
Excitační toxicita	Memantin
Jiné	Středozevní dieta (zdravá strava, nekuřáctví, sportovní aktivita) Nervový růstový faktor (NGF) Prolyloligopeptidasa

Inhibitory cholinesteras

Mnoho kognitivních poruch souvisí se zánikem cholinergních neuronů v mozkových oblastech. Biopsie mozku a studie *post mortem* ukázaly, že pacienti trpící AD mají sníženou aktivitu cholinacetyltransferasy (ChAT), která syntetizuje ACh z cholinu. Acetylcholin má důležitou fyziologickou roli v mechanismech učení se novým informacím, paměti a udržení pozornosti (Gauthier, 2002).

Existuje mnoho látek, o kterých je známo, že ovlivňují cholinergní neurotransmisi, avšak k symptomatické léčbě AD jsou indikovány pouze inhibitory cholinesteras. Tyto látky snižují biochemickou degradaci acetylcholinu a teoreticky tak prodlužují

cholinergní neurotransmisi. Rozlišujeme dva typy cholinesteras nalézajících se v lidském organismu: acetylcholinesterasu (AChE) a butyrylcholinesterasu (BuChE). Fyziologická role BuChE není doposud přesně objasněna, ale ukazuje se, že hladina tohoto enzymu u pacientů s AD je zvýšena, naproti tomu hladina AChE je snížena. Přítomnost obou enzymů v amyloidním plaku poukazuje na možnost ovlivnění tvorby A β , dokonce byla prokázána přímá účast AChE na agregaci A β pomocí svého periferního vazebného místa (PAS) (Silvestrelli et al., 2006).

Jako první "tolerabilní" inhibitor centrální acetylcholinesterasy (AChEi) byl do terapie zaveden takrin, později byl ovšem pro své nežádoucí účinky (hepatotoxicita, cholinergní nežádoucí účinky především na GIT) a krátký poločas v organismu stažen z trhu (Lüllmann et al., 2004). Nová generace méně toxických AChEi je zastoupena donepezilem, rivastigminem a galantaminem (Korabecny et al., 2012). Tato skupina má, kromě nižšího výskytu nežádoucích účinků, delší poločas a lepší účinnost (Shah et al., 2008). Donepezil a galantamin jsou selektivními inhibitory AChE, rivastigmin inhibuje AChE i BuChE. Tato tři léčiva jsou indikována u pacientů s mírnými příznaky a u středně těžkého stádia, jelikož některé studie naznačují pouze slabý přínos u pacientů trpících pokročilejšími stádii AD (Silvestrelli et al., 2006). Meta-analýza 29 randomizovaných zaslepených studií prokázala léčebný efekt u pacientů s AD užívajících inhibitory cholinesteras, spočívající v oddálení zhoršení stavu choroby o 2 měsíce ročně. Na počátku terapie se většinou volí nízké dávky AChEi pro minimalizaci nežádoucích účinků, jako je např. zrudnutí v obličeji, průjem, zvracení či nauzea. Dávkování je poté postupně titrováno k dosažení maximální tolerované dávky (Silvestrelli et al., 2006).

Snahou je zavést do terapie transdermální aplikační formu léčiv, umožňující jejich optimálnější dávkování i dostupnost (Sadowsky et al., 2014).

Memantin

Skupina antagonistů NMDA receptorů zabraňuje vazbě excitačních aminokyselin na NMDA receptory a tím zvýšené expresi genů pro buněčnou apoptózu. Excitačním neurotransmiterem je glutamát. Následkem nadměrné stimulace NMDA receptorů glutamátem jsou neurodegenerativní poruchy (Jirák, 2003). Memantin je

zatím jediným dostupným zástupcem z této skupiny a je používán v terapii pokročilejších až těžkých stádií AD. Je nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů, přesný mechanismus účinku však není plně objasněn. Oproti ketaminu a amantadinu, které mají vysokou afinitu k NMDA receptorům a vykazují tak mj. neuropsychiatrické nežádoucí účinky, je memantin nízkoafinitním nekompetitivním NMDA antagonistou. Vykazuje on/off kinetické vlastnosti důležité pro zachování fyziologické aktivace glutamátových receptorů, přičemž blokuje efekt abnormální aktivity glutamátu.

In vitro studie naznačují, že memantin zvyšuje odolnost vůči toxicitě A β a možná i omezuje jeho produkci. K ujasnění přínosu léčebné strategie, kombinující memantin s cholinergní terapií, jsou ovšem nezbytné další studie (Silvestrelli et al., 2006).

3. Experimentální terapeutické směry léčby AD

Nové terapeutické strategie v léčbě AD jsou zaměřené na léčiva, působící specificky na několik neuronálních a biochemických cílů. Záměrem je tedy vyvinout multifunkční léčivo, které by působilo symptomaticky a zároveň i zabránilo progresi neurodegenerativních procesů. Bylo by tedy schopno kombinovat dvě nebo více z následujících strategií: inhibice acetylcholinesterasy, aktivace nebo inhibice specifických subtypů acetylcholinových receptorů či α -adrenoreceptorů, protizánětlivý účinek, inhibice monoaminoxidasy či katechol-O-methyltransferasy, inhibice β a γ -sekretasy, neuroprotektivní účinek, potlačení apoptózy, snížení oxidačního stresu a zánětu, aktivace proteinů a mitochondriálních genů pro ochranu buňky (Morain et al., 2000).

Obecně lze říci, že léčba AD vyžaduje optimalizaci terapeutického přístupu pro každé stádium onemocnění a jednotlivého pacienta. Dále je také nutné nalézt možnosti zjednodušení terapeutického režimu pro jednotlivce z důvodu rizika non-compliance (Wisniewski a Goni, 2014).

Nervový růstový faktor (NGF)

Četné studie se zabývají vlivem růstového faktoru na nervový systém dospělého člověka. Údajné zlepšení kognitivních funkcí podporuje tvrzení o schopnosti NGF zabránit degeneraci cholinergních neuronů ve studii s primáty. Problémem však je neschopnost NGF proteinu přecházet přes hematoencefalickou bariéru, krátký poločas a možné ovlivnění biologických mechanismů (Jönhagen, 2000).

V roce 2001 bylo testováno podání NGFu 8 pacientů s počátečním stádiem AD. Pacientům byly intrakraniálně podány NGF sekretující buňky do *nucleus basalis*. U těchto pacientů nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky po dobu 2 let a pokles kognitivních funkcí byl značně redukován. Pro nízký počet testovaných pacientů, chybějící srovnání s placebem a nezaslepení pokusu, je možná jen omezená interpretace výsledků. Probíhají ovšem i další studie, zabývající se možnostmi podání pomocí jiných vektorů (Shah et al., 2008).

Antioxidanty

Mnohé výzkumy poukazují na fakt, že oxidativní stres je důležitý patologický proces spojený se stárnutím i s AD. Přínos antioxidantů ve zpomalení degenerativních procesů je však stále otázkou a výsledky jednotlivých studií, studujících tento přístup, jsou zatím rozporuplné (Shah et al., 2008).

Vitamin E

Alfa-tokoferol (vitamin E) je vitamínem rozpustným v tucích. Vychytává volné radikály a přerušuje řetězec reakcí, které poškozují buňky. *In vitro* dokáže ochránit nervové buňky před A β , ale nedokáže podobně ochránit proti jiným onemocněním nervového systému jako je např. Parkinsonova choroba (oxidační procesy pravděpodobně i zde hrají roli v destrukci nervových buněk). Kromě nejasného benefitu podávání vitamin E je negativem také chabá evidence jeho nežádoucích účinků, tím spíš, že AD pacienti trpí často současně několika chorobami.

Vitamin E spolu s vitaminem C jsou však společně často spojovány s poklesem incidence a prevalence AD (Shah et al., 2008).

Selegilin

Selegilin je inhibitorem monoaminoxidasy, působící zvýšení hladiny katecholaminů, čímž může zlepšit kognitivní deficit. Mnoho studií poukazuje na jeho pozitivní vliv na chování, náladu i poznávací schopnosti, i přesto není stále dostatek průkazných dat pro jeho terapeutické použití. Selegilin má navíc interakční potenciál především ve vztahu k tricyklickým antidepresivům, SSRI a u terapie některými opioidy (Silvestrelli et al., 2006).

Nesteroidní antiflogistika (NSAIDs)

Zánětlivé procesy, provázející A β , jsou jedním z klíčových faktorů patogeneze AD (Silvestrelli et al., 2006). Neuroprotektivní efekt NSAIDs je sice věrohodný, zatím však není podpořen klinickými daty. Přes možné benefity v terapii AD je nutné též zohlednit rizika nežádoucích účinků, spojených s terapií NSAIDs (Salloway et al., 2008).

Imunoterapie

Jedním z dalších potenciálně slibných přístupů, umožňujících předcházet tvorbě a hromadění senilních plaků, byla imunizace proti β -amyloidu (Panza et al.,

2012). Klinicky byly testovány vakcíny tvořené antigenem (aktivní imunizace), bohužel studie byly záhy ukončené pro výskyt fatálních nežádoucích účinků (meningoencefalitidy u 6 % takto imunizovaných pacientů). Při pasivní imunizaci monoklonálními protilátkami proti A β , případně imunoglobuliny se v klinických studiích prokázalo snížení depozitů A β , ovšem nedošlo ke zlepšení kognitivních funkcí (Wisniewski a Goni, 2014). Zátěž senilními plaky narůstá převážně v období před manifestací klinických projevů AD. Pro možné dosažení pozitivních výsledků v oblasti kognitivních funkcí by bylo pravděpodobně nutné imunoterapii zahájit již v dřívějších fázích onemocnění či před jejím plným propuknutím (Herrmann a Spires–Jones, 2014).

Několik látek pro pasivní imunizaci se v současnosti nachází v různých stádiích klinického testování. Pro aktuální přehled viz (Honegr et al., 2015).

Statiny

Výsledky několika epidemiologických studií naznačují pokles hladiny A β *in vivo* po podání statinů a to zejména při jejich nasazení pacientům před 80. rokem života (Lüllmann et al., 2004). Účinek na kognitivní funkce u pacientů s AD ovšem potvrzen nebyl (Korabecny et al., 2012, McGuinness et al., 2009). Z výsledků vyplývá, že statiny sice mohou zpomalit neurodegenerativní procesy, ale nejsou schopny zvrátit neuronální degeneraci u pacientů s projevy AD (McGuinness et al., 2013).

Modulátory sekretas

A β je tvořen z APP pomocí dvou štěpících enzymů β -sekretasy a γ -sekretasy (Lüllmann et al., 2004). Slibnou cestou k zamezení tvorby A β je výzkum inhibitorů těchto sekretas zaměřující se na látky, které jsou schopné prostoupit hematoencefalickou bariéru a snížit (ale neeliminovat) aktivitu β - nebo γ -sekretasy, popř. působí tzv. neamyloidní cestu štěpení pomocí α -sekretasy (Silvestrelli et al., 2006).

Ligandy zaměřené na několik cílů (multitarget-directed ligands)

Vzhledem k multifaktoriální povaze AD je při hledání a vývoji nových léčiv postupně opouštěn postup, snažící se vyvinout molekulu, která by na konkrétní patologický aspekt působila specificky a zvrátila by tak rozvoj onemocnění. Nový, moderní přístup ve vývoji léčiv je založený na návrhu tzv. „multi-target-directed ligands“ (Cavalli et al., 2008). Tato metodologie byla speciálně vyvinuta pro onemocnění s komplexním mechanismem patogeneze, kdy záměrem je, aby daná molekula byla schopná zasáhnout několik různých cílů na různých úrovních. Tento způsob terapie by mohl přinést efektivnější výsledky v léčbě těchto chorob.

4. Prolyloligopeptidasa (POP)

Jedním z nových potenciálních terapeutických cílů, studovaných v současnosti, je prolyloligopeptidasa (POP). Jde o enzym ze skupiny serinových peptidas, zahrnující POP, oligopeptidasu B (OB), dipeptidylpeptidasu IV (DPPIV) a acylaminoacylpeptidasu (ACPH). POP a OB patří mezi cytosolová endopeptidas, ACPH a DPPIV jsou exopeptidas. Tyto enzymy hydrolyzují peptidy o délce kratší než 30 AMK, jejichž C-konec obsahuje prolin. Funkce jednotlivých subtypů se liší dle jejich specifity a výskytu.

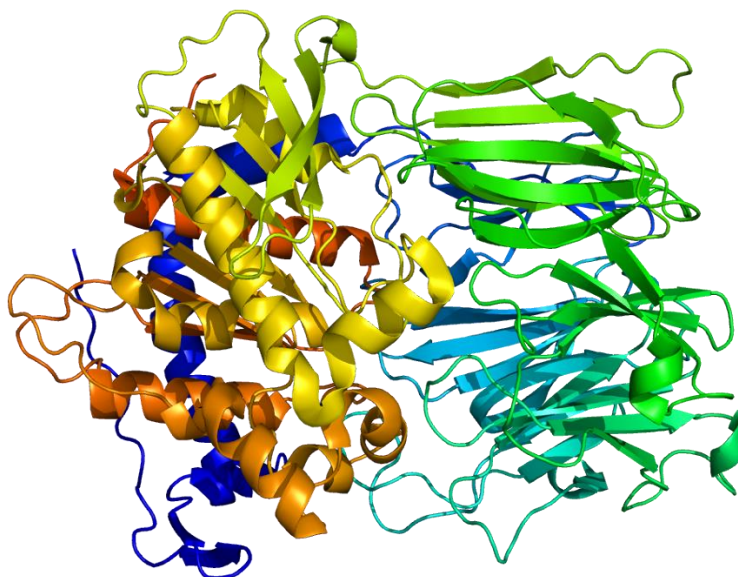
POP rozkládá peptidové hormony, neuroaktivní peptidy a další biologicky účinné látky. Účastní se mnoha fyziologických procesů a je proto považována za jeden z možných terapeutických cílů u některých psychiatrických poruch. V podmínkách *in vivo* byl prokázán vliv POP na metabolismus substance P, vasopresinu, thyreoliberinu, gonadoliberinu a argininu. Přes tyto údaje, není však přesná fyziologická úloha POP doposud plně objasněna (Garcia-Horsman et al., 2007).

Distribuce POP v organismu

Poprvé byla POP objevena v lidské děloze jako enzym degradující oxytocin a byla tehdy nazvána post-prolin štěpící enzym (post-proline cleaving enzyme, PPCE). Později byla však dle své substrátové specifity přejmenována na prolyl oligopeptidasu, (Garcia-Horsman et al., 2007). Dnes již víme, že POP se vyskytuje u různých prokaryotních i eukaryotních organismů, je hojně rozšířena ve všech částech těla savců a její nejvyšší aktivita je všeobecně nacházena v mozku, zejména v mozkové kůře (Jalkanen et al., 2012). Zvýšená aktivita POP byla také pozorována např. v mozečku a v mozkovém kmeni (Myöhänen et al., 2009).

Struktura POP

Molekulová hmotnost POP je přibližně 80 kDa a je rozdílná podle druhu organismu, ze kterého byla izolována. Má jednoduchý proteinový řetězec s délkou 710 AMK, který byl identifikován pomocí rentgenové strukturní krystalografie (obr. 1). Tento enzym obsahuje peptidasovou doménu s katalytickou triádou Ser554, His680, Asp641 kovalentně propojenou se sedmiramennou β doménou (Babkova et al., 2017)



Obr. 1. Struktura POP s typickým střídáním sekundární α a β struktury (zdroj: wikipedia.org)

Aktivní místo enzymu si lze představit tak, že uprostřed 3D struktury se dlouhá kavita rozšiřuje v centrální tunel, je přístupná skrz zúžený otvor. Díky tomuto zúženému vstupu je enzym selektivní vůči oligopeptidům kratším než 30 AMK (MD Bastos et al., 2013). Kratší oligopeptidy bez sekundární struktury reagují s tímto enzymem snadněji a difundují nejjednodušší cestou do aktivního místa. Z důvodu této strukturní vlastnosti jsou dlouhé biologicky aktivní peptidy, které většinou ve své struktuře obsahují prolin, chráněny před proteolýzou v cytosolu.

Fyziologický význam POP

Jedna z hlavních funkcí proteas je jejich účast na posttranslační modifikaci. Téměř všechny bioaktivní neuropeptidy jsou syntetizovány proteolytickým štěpením z inaktivních prekurzorů, případně jsou funkční neuropeptidy enzymaticky štěpeny pro ukončení jejich aktivity.

Díky jeho struktuře není většina proteas schopna hydrolyzovat peptidickou vazbu tvořenou prolinem (Garcia-Horsman et al., 2007). Prolin je totiž spíše imino- než aminokyselina a tak přítomnost prolinu může ochránit biologicky aktivní peptidy před enzymatickou degradací. Ve skutečnosti většina peptidických hormonů a neuropeptidů obsahuje ve své struktuře prolin a proces rozkladu těchto peptidů často vyžaduje pro prolin specifický enzym.

Vlastní fyziologická funkce POP tedy pravděpodobně spočívá v regulaci hladin neuronálních peptidů, avšak i přes intenzivní výzkum není doposud spolehlivě objasněna. Enzym je spojován s neuropatologickými procesy, snížená aktivita POP byla pozorována u pacientů trpících různým stupněm deprese, navíc peptidy související s patopsychologií deprese (např. thyreoliberin, β -endorfin, substance P, arginin-vasopresin) jsou substráty POP. Zvýšená aktivita byla naopak pozorována u pacientů s mánií a schizofrenií. Nižší aktivita POP byla pozorována při anorexii a bulimii (Polgar, 2002). Výčet substrátů POP a jejich fyziologický význam je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2. Vybrané substráty POP a jejich biologický význam (tučně jsou zvýrazněny substráty mající potenciální roli v patofyziologii a symptomech AD, dle (Garcia-Horsman et al., 2007))

Substrát	Biologický význam
Substance P	Vnímání bolesti, zánět, paměť a učení
TRH	Uvolnění TSH resp. hormonů štítné žlázy
GnRH	Sekrece LH, FSH, resp. pohlavních hormonů
Arginin-vasopresin	Učení, paměť,
Bradykinin	Vazodilatace - ↓ TK
Oxytocin	Porod, kojení
β-Endorfin	Analgesie, euforie
Neurotensin	Regulace dopaminergní transmise, termoregulace
α-MSH	Pigmentace vlasů a pokožky
Urotensin II	Vasokonstrikce
Morfeptin	Analgesie, opioidní účinky
Humanin	Neuroprotektivní účinky, ↓Aβ
Endomorfiny	Opioidní účinky
Galanin	Neuroprotektce, inhibice uvolňování ACh, nocicepce, kognice
Neuromedin U	Nocicepce, regulace TK,
Orexin	Neuroexitační mediátor, regulace příjmu potravy, regulace spánku a bdění, deficit souvisí s narkolepsií
Somatostatin	Regulace růstového hormonu, hormonů štítné žlázy, inhibice gastrinu, inzulínu, glukagonu
Tuftsín	Stimulace fagocytární a baktericidní aktivity neutrofilních granulocytů a makrofágů
Gastrin	Stimulace produkce žaludečních šťáv

Význam inhibice POP

V posledních letech získává POP význam jako terapeutický cíl u léčby schizofrenie, bipolární afektivní poruchy a kognitivních poruch, jako je AD. POP se kromě štěpení aktivních peptidů, ovlivňujících kognitivní schopnosti (substance P či arginin-vasopresin), účastní také metabolismu inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃). IP₃, který je uvolňován jako druhý posel po aktivaci receptorů spřažených s Gq-proteinem, po navázání na jeho receptory v endoplasmatickém retikulu indukuje uvolnění Ca²⁺. Právě tento mechanismus přenosu signálu je charakteristický pro muskarinové

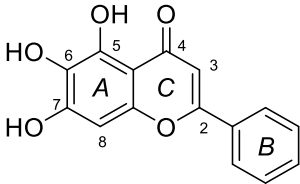
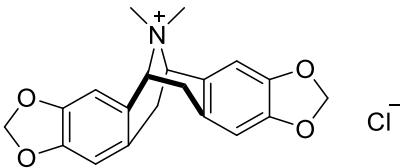
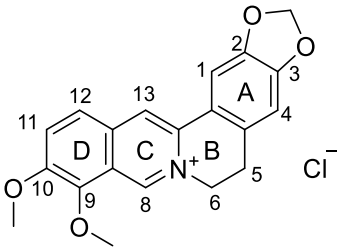
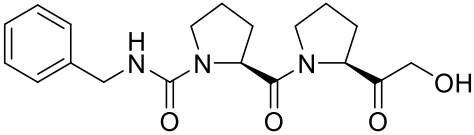
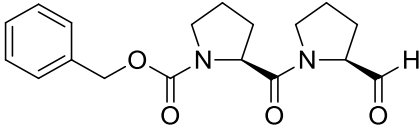
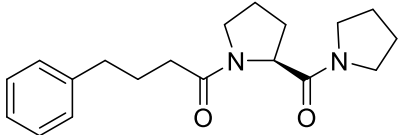
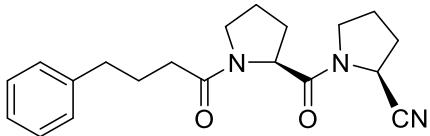
receptory typu 1, které jsou v CNS hojně zastoupeny a hrají klíčovou roli v procesech učení a paměti. Studie ukazují, že inhibicí POP se zvyšuje koncentrace IP_3 (Garcia-Horsman et al., 2007, Williams a Harwood, 2000).

Signální dráha IP_3 je součástí terapeutického efektu několika účinných látek (lithium, karbamazepin a kyselina valproová) a proto představují inhibitory POP zajímavou skupinu látek s terapeutickým potenciálem (Tarragó et al., 2008).

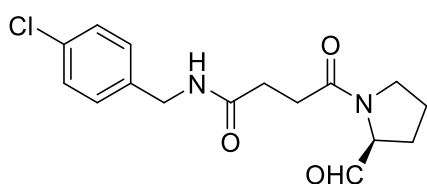
Mezi inhibitory POP patří látky přírodního (např. berberin, baicalin) i syntetického původu (tab. 3). První účinný inhibitor, benzyloxycarbonyl-pro-prolinal, dokázal zvrátit u potkanů amnézii vyvolanou skopolaminem (Polgar, 2002). Inhibitory většinou obsahují ve své struktuře prolin nebo jeho analoga což je důvodem toho, že mohou být také substrátem POP. Důležitá je i substituce skeletu inhibitorů, např. pyrrolidinová struktura je klíčová pro vazbu inhibitoru do aktivního místa enzymu. Kyanoskupina, hydroxyacetylová a aldehydová skupina pak zvyšují afinitu inhibitorů k enzymu (Garcia-Horsman et al., 2007).

Tabulka 3. Inhibitory POP a jejich základní vlastnosti.

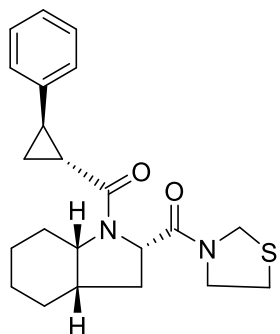
(Pozn.: zdroj enzymu se může mezidruhově lišit)

Struktura	Název	Affinita k POP
	Baicalein	IC ₅₀ = 12 μM (počítáno pro baicalin) (Tarragó et al., 2008)
	Californidin	IC ₅₀ = 55,6 μM (Cahlíková et al., 2015)
	Berberin	IC ₅₀ = 145 μM (Kang et al., 2002)
	JTP-4819	IC ₅₀ = 0,58 nM K _i = 0,055 nM (Venäläinen et al., 2002)
	ZPP	IC ₅₀ = 0,74 nM K _i = 0,35 nM (Bakker et al., 1990)
	SUAM-1221	IC ₅₀ = 2,0 nM K _i = 0,97 nM (Venäläinen et al., 2006)
	KYP-2047	IC ₅₀ = 0,023 nM (Venäläinen et al., 2006)

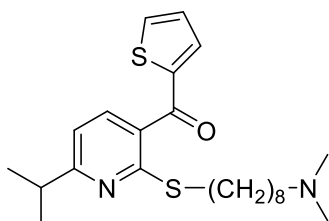
Tabulka 3. Inhibitory POP a jejich základní vlastnosti (pokračování)



ONO-1603 $IC_{50} = 57 \text{ nM}$
 $K_i = 12 \text{ nM}$ (Katsube
et al., 1996)



S-17092-1 $IC_{50} = 1,2 \text{ nM}$
 $K_i = 1,5 \text{ nM}$ (Barelli
et al., 1999)



Y-29794 $IC_{50} = 3,0 \text{ nM}$
 $K_i = 0,95 \text{ nM}$
(Nakajima et al.,
1992)

Význam inhibitorů POP pro léčbu AD

Různé inhibitory POP prokázaly u hlodavců vliv na paměť a schopnost učení (Morain et al., 2000). Efekt na zlepšení paměti byl pozorován také u primátů (Schneider et al., 2001). Mnoho studií uvádí změny hladin některých neuropeptidů v mozku u pacientů s neurodegenerativním onemocněním, jako je AD. Nižší hladiny byly například pozorovány u substance P, vasopresinu a neurotensinu. Tyto neuropeptidy jsou také substráty POP, a proto se spekuluje o souvislosti změn hladin neuropeptidů a pozměněnou aktivitou POP. Výsledky studií se ovšem rozcházejí, některé studie hovoří o zvýšené aktivitě a jiné naopak o snížené aktivitě enzymu. Snížení aktivity je přisuzováno *ante mortem* hypoxii (Terwel et al., 1998).

Pozměněná aktivita POP byla pozorována také u dalších neurodegenerativních onemocnění jako Parkinsonova choroba, demence s Lewyho tělísky a Huntingtonova choroba (Garcia-Horsman et al., 2007). Je tedy teoreticky možné, že centrálně působící inhibitory POP mohou být prospěšné u pacientů s kognitivními poruchami. Z hlediska patogeneze AD je zajímavé, že tyto inhibitory mohou mít též preventivní účinek na ukládání β -amyloidu (Venäläinen et al., 2006).

Potenciální vlastnosti inhibitorů POP v oblasti zlepšení kognitivních funkcí upoutaly zájem farmaceutických firem a bylo připraveno a studováno několik látek. Ovšem doposud postoupila pouze jediná látka - inhibitor S17092 - do I. fáze klinického hodnocení. I přes zajímavé výsledky v této klinické fázi, další vývoj této látky literatura již neuvádí (Morain et al., 2000).

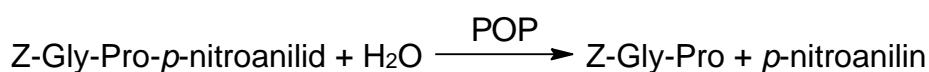
C. Cíl práce

Cílem této práce bylo stanovit inhibiční aktivitu nově připravených látek vůči POP a porovnat tuto aktivitu s dalšími dostupnými látkami využitelnými pro léčbu AD. Záměrem bylo zjistit, zda mají testované látky kromě svého primárního mechanismu účinku podobě inhibice enzymu AChE také inhibiční účinek na POP a jsou tak potenciálně aplikovatelné pro multiligandovou léčbu AD.

D. Metodika

1. Princip stanovení aktivity POP

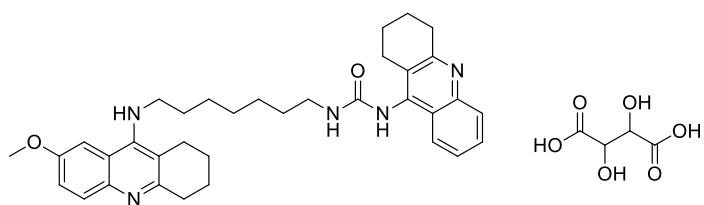
Pro stanovení inhibiční aktivity testovaných látek byla využita spektrofotometrická metoda založená na štěpení specifického substrátu POP, probíhající dle následující rovnice:



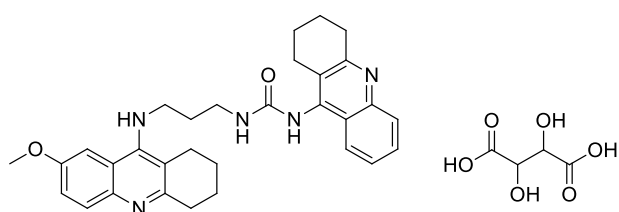
Míra inhibice POP byla určena dle míry tvorby výsledného chromoforu *p*-nitroanilinu.

2. Testované látky

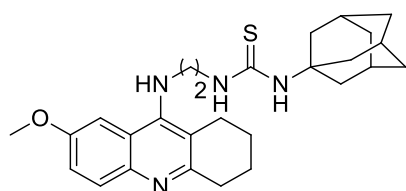
Na obr. 2 jsou zobrazeny struktury nově připravených látek, u kterých byla testována inhibiční aktivita vůči POP. Jedná se o látky odvozené od 7-methoxytakrinu (7-MEOTA), který byl popsán jako takrinu příbuzný inhibitor AChE. V preklinických studiích nevykazoval takové vedlejší účinky jako samotný takrin (Dejmek, 1990, Patocka et al., 2008, Soukup et al., 2013). Kromě farmakoforu v podobě 7-MEOTA obsahují látky i druhý farmakofor ve smyslu MTDL teorie, který je připojen přes různě dlouhý spojovací řetězec a močovinu, resp. thiomčovinu. Spojovací řetězce byly voleny s ohledem na případné vyhodnocení strukturně-aktivitní závislosti. Jako druhý farmakofor je přítomný buď takrin samotný, adamantylamin či tryptofan. Tyto druhé farmakofory byly navrženy tak, aby rozšířily mechanismus účinku z inhibice AChE následovně: přítomnost takrinu zvyšovala účinnost inhibice AChE, adamantylová skupina, odvozená od memantinu, afinitu k NMDA receptorům a tryptofanová skupina měla působit jako potenciální antioxidant (Gazova et al., 2017, Spilovska et al., 2016a, Spilovska et al., 2016b).



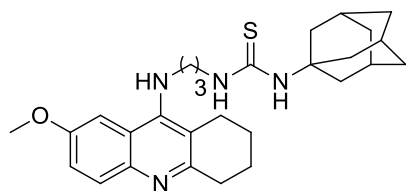
KB-38 (7-methoxy-N-(7-(3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)ureido)heptyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-aminium 3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoát)



KB-36 (7-methoxy-N-(7-(3-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)ureido)propyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-aminium 3-carboxy-2,3-dihydroxypropanoát)

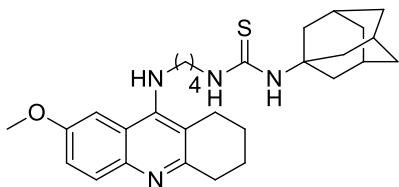


KS-19 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)ethyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)

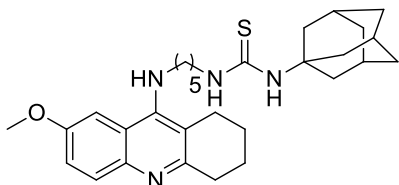


KS-20 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)propyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)

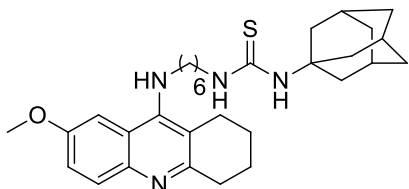
Obr. 2a. Struktury nově připravených látek testovaných na inhibiční účinek vůči POP



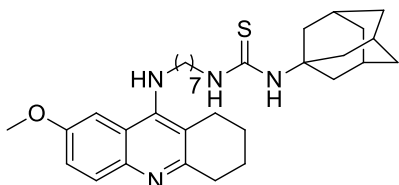
KS-28 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)butyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)



KS-29 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)pentyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)

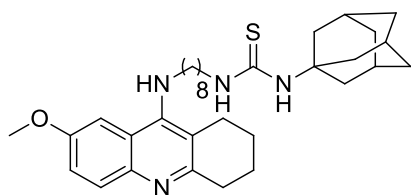


KS-32 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)hexyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)

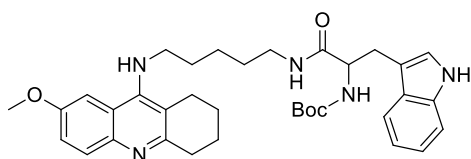


KS-34 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)heptyl)thiourea 2,3-dihydroxysuccinát)

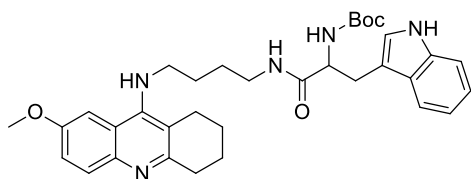
Obr. 2b. Struktury nově připravených látek testovaných na inhibiční účinek vůči POP



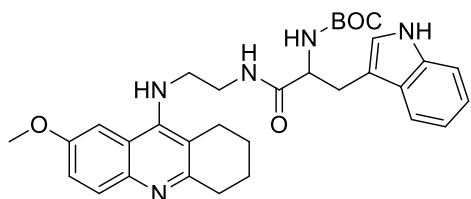
KS-17 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)oktylthiourea 2,3-dihydroxysuccinát)



KS-52 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)pentyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)

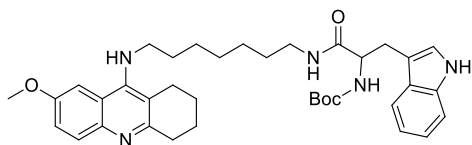


KS-54 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)butyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)

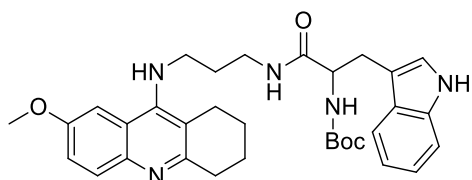


KS-55 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)ethyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)

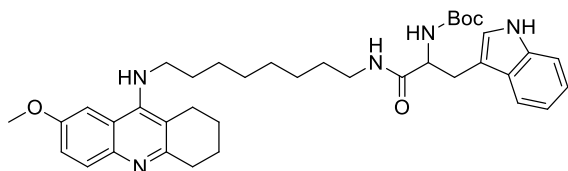
Obr. 2c. Struktury nově připravených látek testovaných na inhibiční účinek vůči POP



KS-57 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)heptyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)



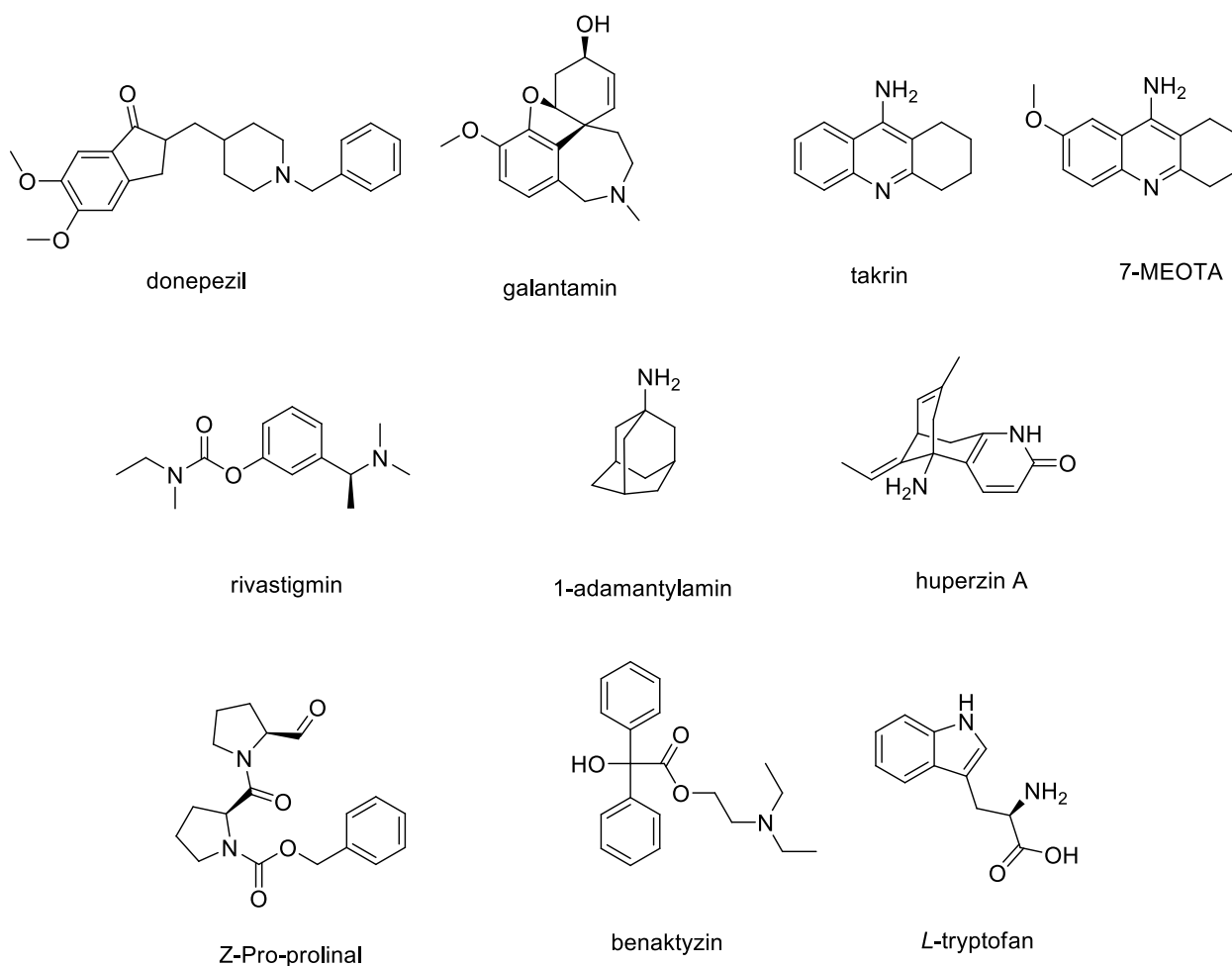
KS-60 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)propyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)



KS-65 (1-Adamantyl-3-(2-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl-amino)oktyl)urea 2,3-dihydroxysuccinát)

Obr. 2d. Struktury nově připravených látek testovaných na inhibiční účinek vůči POP

Na obr. 3 jsou uvedeny látky, které sloužily buď jako pozitivní kontrola (standardní inhibitor POP Z-Pro-Prolinal), nebo jde o parentní látky, ze kterých jsou hybridní léčiva složena (takrin, 7-MEOTA, adamyntylamin a tryptofan), případně se jedná o látky, které jsou již v praxi známy a jejich afinita k POP nebyla nikdy testována (antialzheimerika donepezil, rivastigmin a galantamin, anticholiergikum benaktyzin a experimentální inhibitor AChE huperzin A, používaný ve východní medicíně k terapii AD).



Obr. 3. Struktury standardních látek testovaných na inhibiční účinek vůči POP (Z-Pro-prolinal je standardní vysoce účinný inhibitor POP) (Bakker et al., 1990).

3. Příprava reagensí

Fosfátový pufr (PBS)

Při přípravě pufru bylo naváženo toto množství bezvodých solí: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KHPO₄ do 1 l kádinky. Poté bylo přidáno 950 ml H₂O a zkontrolováno pH roztoku, které bylo 7,4. Výsledný roztok byl převeden do 1 l odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

Roztok prolyl-oligopeptidasy (POP)

Obsah lahvičky komerčně dostupného preparátu enzymu (Sigma-Aldrich kat.č. O9515-20UG) má výrobcem deklarovanou aktivitu ≥200 U (1 U enzymu dle specifikace výrobce přemění 1,0 pM/min substrátu Ala-Pro-aminomethylkumarinu při pH 7,4 a

teplotě 25 °C). Enzym byl v lahvičce naředěn 100 µl PBS s obsahem 0,1 % albuminu, který byl přidán kvůli stabilizaci enzymu. Objem byl postupně doplněn za promíchávání až do celkového objemu 1 ml. Nespotřebovaný enzym byl z důvodu nízké stability uchováván při -70 °C. Při použití zamraženého enzymu byla vždy provedena kontrola aktivity a před vlastním měřením provedena úprava objemu s pomocí výše uvedeného pufru pro dosažení požadované aktivity.

Příprava substrátu Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu

Roztok substrátu s koncentrací 5 mM byl připraven navážením 8,523 mg Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu (Sigma-Aldrich kat. č. 96286) a rozpuštěním v 2 ml 1,4-dioxanu. Před vlastním měřením byla vždy změřena absorbance roztoku (1,4-dioxan zvyšuje absorbanci) a porovnána s kontrolním vzorkem. Roztok byl vždy připraven čerstvý.

Příprava vzorků nových látek

Na základě hodnot M_r jednotlivých testovaných látek bylo vypočteno množství rozpouštědla (DMSO), které bylo zapotřebí přidat pro přípravu zásobního roztoku. Podle rozpustnosti látky v DMSO byla jeho koncentrace 10^{-3} M nebo 10^{-2} M. Dalším ředěním zásobního roztoku látek s pomocí DMSO nebo H_2O , byla připravena koncentrační řada látek (viz postup měření) pro určení hodnoty IC_{50} .

Připravené zásobní roztoky byly důkladně promíchány a uloženy v mikrozkuvkách v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Před použitím byly zásobní roztoky vytaženy z mrazicího boxu a vytemperovány na teplotu 25 °C.

5. Použité přístroje a pomůcky

- Váhy Mettler Toledo AB204-S (Metler Toledo),
- ultrazvuková lázeň Sonorexdigital 10P (BandelinElectronic),
- třepačka mikrodestiček BIOSAN OS-10 (Biotech a.s.),
- sušárna Venticell 55 (BMT a. s.),
- vertex LABdancer IP 40 (IKA a.s.),
- analyzátor automatický mikrodestičkový reader EL800 (Biotek Instruments, INC.).

6. Měření inhibiční aktivity látek vůči POP

Před samotným měřením vzorků byla u každého z nich připravena ze zásobního roztoku ředěním DMSO nebo H₂O koncentrační řada.

Do 96 jamkové mikrotitrační destičky bylo pipetou přidáno 170 μ l 0,01 M PBS a 5 μ l roztoku testované látky vybrané koncentrace. Obsah jamky byl promíchán na třepačce. Dále bylo přidáno 5 μ l roztoku enzymu (3 U/ml), a 5 min inhibováno za kontinuálního třepání. Následně bylo přidáno 20 μ l 5 mM roztoku substrátu Z-Gly-Pro-p-nitroanilidu. Objem reakční směsi byl 200 μ l a tedy maximální podíl DMSO byl 2,5% (V/V). Mikrotitrační destička s reakční směsí byla inkubována 30 min v inkubátoru při teplotě 37 °C. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 405 nm a naměřené hodnoty byly použity k výpočtu inhibiční aktivity.

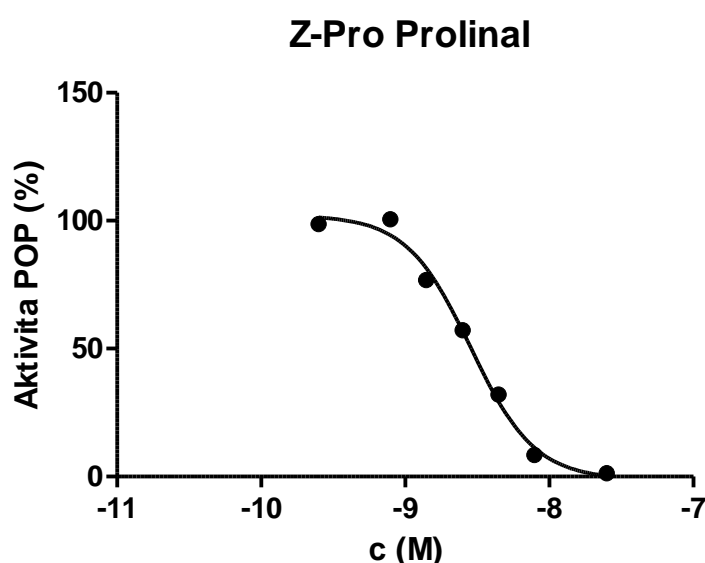
Stejným způsobem byla měřena aktivita čistého enzymu bez přidavku inhibitoru (100% aktivita). Přidaný objem inhibitoru byl nahrazen pufrém. Dále byl měřen kontrolní vzorek testované látky bez enzymu a slepý pokus pufru se substrátem. Jako referenční standardní inhibitor byl použit Z-pro-prolinal.

Zpracování naměřených dat

Všechna měření byla opakována třikrát. Data byla zpracována v programech Microsoft Excel 2007 a GraphPadPrism verze 5.02 pomocí 3 parametrové symetrické nelineární regrese. Vzorce byly vytvořeny v programu ACD/ ChemSketch 12.

E. Výsledky:

Na obr. 4 je zobrazena inhibiční křivka standardního inhibitoru POP Z-Pro-Prolinalu. V rámci použitého testu představuje tento inhibitor pozitivní kontrolu. Z naměřených údajů je patrné, že prokázal vysokou inhibiční aktivitu vůči POP s účinnými inhibičními koncentracemi v řádu jednotek nanomolů. Jeho IC_{50} činila $1,59 \cdot 10^{-9}$ M.



Obr. 4. Inhibiční aktivita standardního inhibitoru Z-Pro-Prolinal

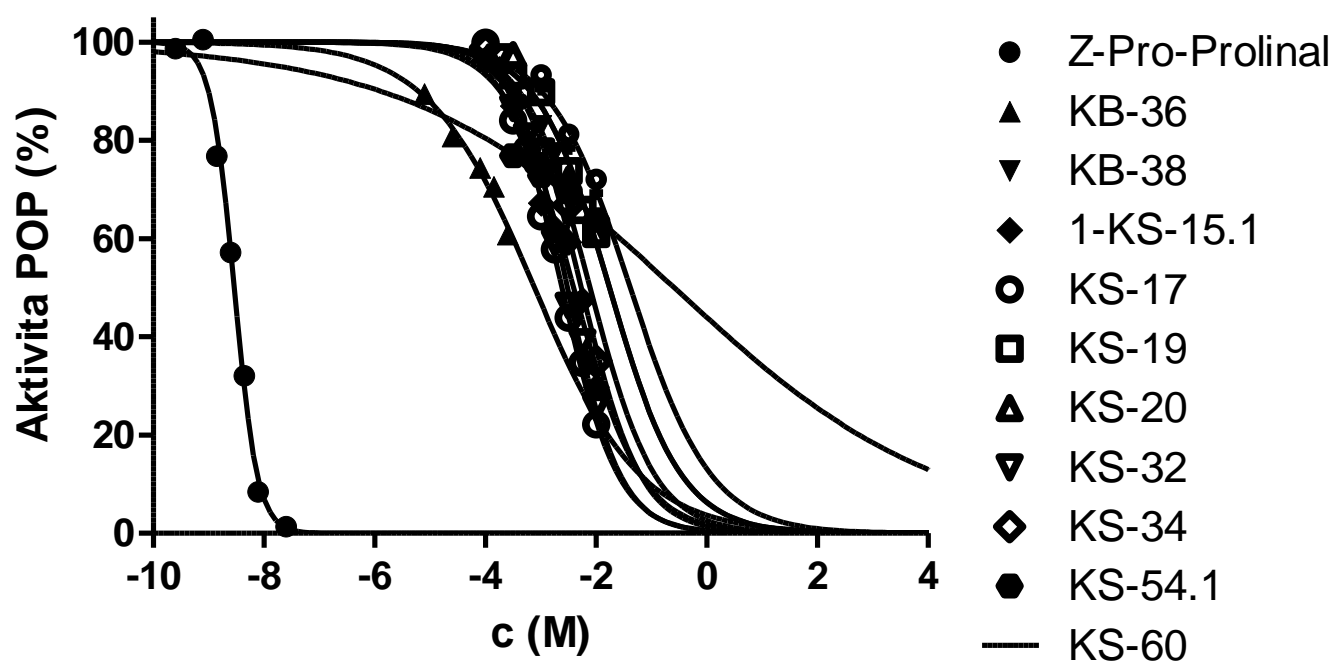
V tab. 4 jsou uvedeny hodnoty IC_{50} (\pm SEM, $n = 3$) pro jednotlivé testované látky. Hodnota IC_{50} odpovídá koncentraci, která způsobila pokles aktivity enzymu na 50 % oproti aktivitě bez inhibitoru. V případě, že hodnota IC_{50} je vyjádřena pouze intervalem (např. $>0,01M$), nebylo možné přesnou hodnotu parametru stanovit, protože díky omezené rozpustnosti látky nebylo možné dosáhnout koncentrace, kdy by látka způsobovala dostatečnou inhibici POP, umožňující výpočet IC_{50} . V těchto případech proto není uváděna chyba měření.

Tabulka 4. Inhibiční aktivity testovaných látek vůči POP vyjádřené hodnotami IC_{50} (\pm SEM, $n = 3$).

Látka	IC_{50} (M)	SEM
Z-Pro-Prolinal	$2,89 \times 10^{-9}$	$1,59 \times 10^{-10}$
Takrin	$> 2,5 \times 10^{-3}$	-
Adamantylamin	$1,07 \times 10^{-3}$	$6,66 \times 10^{-5}$
7-MEOTA	$> 2,5 \times 10^{-3}$	-
Huperzin	$> 1 \times 10^{-3}$	-
Rivastigmin	$> 2,5 \times 10^{-3}$	-
Benaktyzin	$> 1 \times 10^{-2}$	-
Galantamin	$> 1 \times 10^{-2}$	-
Donepezil	$> 1 \times 10^{-2}$	-
Tryptofan	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KB-36	$7,65 \times 10^{-4}$	$1,84 \times 10^{-4}$
KB-38	$7,77 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$
1-KS-15.1	$3,92 \times 10^{-3}$	$4,75 \times 10^{-4}$
KS-17	$2,42 \times 10^{-3}$	$1,60 \times 10^{-4}$
KS-19	$1,73 \times 10^{-2}$	$3,25 \times 10^{-3}$
KS-20	$1,73 \times 10^{-2}$	$7,88 \times 10^{-3}$
KS-28	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KS-29	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KS-32	$3,04 \times 10^{-3}$	$2,08 \times 10^{-4}$
KS-34	$5,39 \times 10^{-3}$	$1,20 \times 10^{-3}$
KS-52	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KS-54.1	$2,57 \times 10^{-1}$	$7,61 \times 10^{-2}$
KS-55.1	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KS-57	$> 1 \times 10^{-2}$	-
KS-60	$4,11 \times 10^{-2}$	$2,12 \times 10^{-2}$
KS-65	$> 1 \times 10^{-2}$	-

Na obr. 5 jsou znázorněny inhibiční křivky nově připravených látek, u kterých bylo možné stanovit hodnotu IC_{50} a standardního inhibitoru Z-Pro-Prolinalu.

IC₅₀ (POP) - nové látky



Obr. 5. Porovnání inhibičních křivek nově připravených látek (a standardního inhibitoru Z-Pro-Prolinalu)

F. Diskuze

Alzheimerova choroba je multifaktoriální onemocnění, pro které se stále neúspěšně hledá nový lék, který by zmírnil zdravotní, ekonomický a sociální dopad této progredující a stále rozšířenější nemoci (Maresova et al., 2015). Jedním z nových směrů ve vývoji léčiv je tzv. MTDL přístup, který je speciálně zaměřen na léčbu onemocnění s komplexním mechanismem patogeneze. Záměrem je, aby daná molekula byla schopná zasáhnout několik různých cílů na různých úrovních (Cavalli et al., 2008). V této práci byl hodnocen inhibiční účinek vůči POP u nových látek, navržených s ohledem na MTDL přístup, a dále byly hodnoceny také standardní látky, které se v terapii AD již užívají jako inhibitory AChE (donepezil, rivastigmin, apod.) či mají jiný vztah k cholinergnímu systému (benaktyzin, 7-MEOTA apod.). Cílem bylo zjistit, zda některé z těchto zavedených látek také neinhibují POP a tento mechanismus nepřispívá k jejich terapeutickým účinkům.

V rámci provedené studie byly testovány nové látky, které byly primárně designovány za účelem inhibice AChE s potenciální modulací NMDA receptorů (Spilovska et al., 2015). U těchto látek by afinita vůči POP mohla vést ke zvýšení kognitivních schopností, které jsou u AD porušeny nejvíce (Garcia-Horsman et al., 2007). Prokognitivní účinek je v případě tohoto enzymu spojován s jeho inhibicí, protože POP se účastní štěpení krátkých bioaktivních peptidů ovlivňujících kognici (substance P či arginin-vasopresin) a také metabolismu inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃), kdy inhibice POP zvyšuje koncentrace IP₃ (Garcia-Horsman et al., 2007, Williams a Harwood, 2000).

V odborné literatuře je popsáno mnoho inhibitorů peptidické povahy, u nichž hodnota IC₅₀ dosahuje až nanomolárních koncentrací. Z hlediska terapeutického je však podání peptidických látek problematické z důvodu nízké biologické dostupnosti po perorálním podání a relativně krátkého poločasu (Jalkanen et al., 2011). Byly také popsány nepeptidické inhibitory, látky přírodního původu jako berberin či bajkalin, ale jejich potenciální užití je limitováno vysokou toxicitou či nízkou afinitou k POP (Tarragó et al., 2008, Tarrago et al., 2007).

Jak je patrné z tab. 4, u mnoha z námi testovaných látek nebylo možné parametr IC_{50} stanovit. Je to dáno především tím, že inhibiční aktivita látek vůči POP byla tak nízká, že by stanovení IC_{50} vyžadovalo koncentraci tak vysokou, že ji nelze díky fyzikálně chemickým vlastnostem, jako je rozpustnost látky, připravit. Tento případ se týkal jak nově syntetizovaných sloučenin KS-28, KS-29, KS 52, KS-55, KS-57 a KS-65, tak všech testovaných standardních látek s výjimkou adamantylaminu (tab. 4). Z hlediska praktického významu není dosažení hodnoty IC_{50} u všech látek důležité, neboť se jedná o aktivity velmi nízké ($IC_{50} > 10\text{mM}$) při koncentracích, které jsou v klinických podmínkách nedosažitelné (donepezil, rivastigmin apod.). Avšak i u látek, u kterých byla hodnota IC_{50} dosažena, tak vyjma standardního inhibitoru Z-Pro-Prolinalu nebyla vždy dosažena úplná inhibice enzymu. Inhibice vyšší než 50 % byla změřena u nejvyšších koncentrací pro látky KS-15, KS-17, KS-32 a KS-34. Hodnota IC_{50} zde byla získána extrapolací, při které se vycházelo z předpokladu, že v určité koncentraci, která je vyšší, než nejvýše dosažená, látka teoreticky enzym inhibuje úplně.

Při pohledu na hodnoty IC_{50} testovaných látek je zřejmé, že se jedná o látky s nízkou, resp. velmi nízkou inhibiční aktivitou vůči POP. Pouze látka KB-36 dosahuje účinnosti v řádu stovek mikromolů ($IC_{50} = 765 \mu\text{M}$). Takováto inhibiční aktivita je řádově porovnatelná s účinností berberinu, jehož hodnota IC_{50} je $140 \mu\text{M}$ (Tarrago et al., 2007). V porovnání s inhibitory POP peptidické povahy je však tato aktivita velmi nízká, jelikož hodnota IC_{50} je až o 8 řádů vyšší než např. u KYP-2047 (Venäläinen et al., 2006). Vzhledem k faktu, že některé hodnoty IC_{50} nebylo možné přesně určit, lze závislosti mezi strukturou a aktivitou u testovaných látek vyvozovat jen obtížně. Zdá se ale, že močovinné hybridy takrinu a adamantylaminu mají o něco vyšší afinitu než jejich thiomocovinová analoga. Zajímavá je také zhruba o 1 řád vyšší afinita látky KB-36, mající spojovací linker v podobě 3 uhlíků oproti jeho 8 uhlíkatému analogu KB-38. Zdá se však, že délka spojovacího řetězce nemá na inhibici POP výrazný vliv, protože např. látka KS-17, mající 8 uhlíkatý spojovací řetězec, vykazuje vyšší afinitu než jeho 3 uhlíkatý analog v podobě KS-20. Lze také konstatovat, že afinita standardních látek k POP je velmi nízká a tedy tento mechanismus účinku je u látek jako donepezil, rivastigmin či galantamin klinicky velmi nepravděpodobný. Ani u látky přírodního původu - huperzinu A, který je ve východní medicíně užíván k terapii AD (Cheng a Tang, 1998, Ou et al., 2001), nebyl tento účinek do koncentrace $1 \mu\text{M}$ potvrzen.

Lze tedy konstatovat, že žádná z nově připravených látek ani žádné ze standardních léčiv nemá tak výraznou inhibiční aktivitu vůči enzymu POP, která by byla využitelná pro multiligandové zacílení a další vývoj.

G. Závěr:

Stanovení inhibiční aktivity studovaných látek vůči enzymu POP *in vitro* ukázalo, že žádná z hodnocených sloučenin nevykazuje výraznější účinnost, která by se jevila vhodná pro léčebné využití. Pouze u jediné látky (KB-36) byla zjištěna hodnota IC_{50} na úrovni stovek mikromolů, což je však v porovnání s peptidickými inhibitory POP o několik řádů nižší účinnost. Podobně byl vyloučen i mechanismus účinku v podobě inhibice POP u běžně používaných antialzheimerik, jako je donepezil, rivastigmin či galantamin.

H. Reference

- BABIC, T. 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 67, 558-558.
- BABKOVA, K., KORABECNY, J., SOUKUP, O., NEPOVIMOVA, E., JUN, D. & KUCA, K. 2017. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future medicinal chemistry*, 9, 1015-1038.
- BAKKER, A. V., JUNG, S., SPENCER, R. W., VINICK, F. J. & FARACI, W. S. 1990. Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochemical Journal*, 271, 559-562.
- BARELLI, H., PETIT, A., HIRSCH, E., WILK, S., DE NANTEUIL, G., MORAIN, P. & CHECLER, F. 1999. S 17092-1, a highly potent, specific and cell permeant inhibitor of human proline endopeptidase. *Biochemical and biophysical research communications*, 257, 657-661.
- BARTUS, R. T., DEAN, R. L., BEER, B. & LIPPA, A. S. 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408-414.
- CAHLÍKOVÁ, L., HULOVÁ, L., HRABINOVÁ, M., CHLEBEK, J., HOŠŤÁLKOVÁ, A., ADAMCOVÁ, M., ŠAFRATOVÁ, M., JUN, D., OPLETAL, L. & LOČÁREK, M. 2015. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, 103, 192-196.
- CAVALLI, A., BOLOGNESI, M. L., MINARINI, A., ROSINI, M., TUMIATTI, V., RECANATINI, M. & MELCHIORRE, C. 2008. Multi-target-Directed-Ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*.
- DEJMEK, L. 1990. 7-MEOTA. *Drugs of the future*, 15, 126-129.
- GARCIA-HORSMAN, J., MÄNNISTÖ, P. & VENÄLÄINEN, J. 2007. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides*, 41, 1-24.
- GAUTHIER, S. 2002. Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *Canadian Medical Association Journal*, 166, 616-623.
- GAZOVA, Z., SOUKUP, O., SEPŠOVA, V., SIPOŠOVA, K., DRTINOVA, L., JOST, P., SPILOVSKA, K., KORABECNY, J., NEPOVIMOVA, E. & FEDUNOVA, D. 2017. Multi-target-directed therapeutic potential of 7-methoxytacrine-adamantylamine heterodimers in the Alzheimer's disease treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863, 607-619.
- HERRMANN, A. & SPIRES-JONES, T. 2014. Clearing the way for tau immunotherapy in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, n/a-n/a.
- HONEGR, P. J., SOUKUP, P. O. & MAREŠOVÁ, M. I. P. 2015. Imunoterapie v léčbě Alzheimerovy choroby Immunotherapy in Alzheimer's disease. *Vážení čtenáři, kolegové a kolegyně*, 172.
- CHENG, D. H. & TANG, X. C. 1998. Comparative studies of huperzine A, E2020, and tacrine on behavior and cholinesterase activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60, 377-386.
- JAGO, C. 2014. *Alzheimer's Disease: One Year Late* [Online]. Thomson Reuters. Available: <http://lsconnect.thomsonreuters.com/alzheimers-disease-year-later/> [Accessed].
- JALKANEN, A. J., HAKKARAINEN, J. J., LEHTONEN, M., VENÄLÄINEN, T., KÄÄRIÄINEN, T. M., JARHO, E., SUHONEN, M. & FORSBERG, M. M. 2011. Brain Pharmacokinetics of Two Prolyl Oligopeptidase Inhibitors, JTP-4819 and

- KYP-2047, in the Rat. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109, 443-451.
- JALKANEN, A. J., PIEPPONEN, T. P., HAKKARAINEN, J. J., DE MEESTER, I., LAMBEIR, A.-M. & FORSBERG, M. M. 2012. The effect of prolyl oligopeptidase inhibition on extracellular acetylcholine and dopamine levels in the rat striatum. *Neurochemistry international*, 60, 301-309.
- JIRÁK, R. 2003. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Česká geriatrická revue*, 2, 10-12.
- JIRÁK, R. & KOUKOLÍK, F. 2004. *Demence*, Praha, Galén
- JÖNHAGEN, M. E. 2000. Nerve growth factor treatment in dementia. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 14, S31-S38.
- KANG, D. G., SOHN, E. J., KWON, E. K., HAN, J. H., OH, H. & LEE, H. S. 2002. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels. *Vascular pharmacology*, 39, 281-286.
- KATSUBE, N., SUNAGA, K., CHUANG, D.-M. & ISHITANI, R. 1996. ONO-1603, a potential antidementia drug, shows neuroprotective effects and increases m 3-muscarinic receptor mRNA levels in differentiating rat cerebellar granule neurons. *Neuroscience letters*, 214, 151-154.
- KORABECNY, J., HRUBA, E., SOUKUP, O., ZEMEK, F., MUSILEK, K., NEPOVIMOVA, E., SPILOVSKA, K., OPLETALOVA, V. & KUCA, K. 2012. Intended pharmacotherapeutical approaches of Alzheimer's disease therapy (in Czech). *Ceska a slovenska farmacie*, 61, 4-10.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K. & WEHLING, M. 2004. Farmakologie a toxikologie. 2 ed. Praha: Grada.
- MARESOVA, P., MOHELSKA, H., DOLEJS, J. & KUCA, K. 2015. Socio-economic Aspects of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 12, 903-911.
- MCGUINNESS, B., CRAIG, D., BULLOCK, R. & PASSMORE, P. 2009. Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*, 2.
- MCGUINNESS, B., O'HARE, J., CRAIG, D., BULLOCK, R., MALOUF, R. & PASSMORE, P. 2013. Cochrane review on 'Statins for the treatment of dementia'. *International journal of geriatric psychiatry*, 28, 119-126.
- MD BASTOS, I., N MOTTA, F., GRELLIER, P. & M SANTANA, J. 2013. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, leishmaniasis and African trypanosomiasis. *Current medicinal chemistry*, 20, 3103-3115.
- MORAIN, P., ROBIN, J., DE NANTEUIL, G., JOCHEMSEN, R., HEIDET, V. & GUEZ, D. 2000. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profile of S 17092, a new orally active prolyl endopeptidase inhibitor, in elderly healthy volunteers. A phase I study. *British journal of clinical pharmacology*, 50, 350-359.
- MYÖHÄNEN, T. T., GARCÍA-HORSMAN, J. A., TENORIO-LARANGA, J. & MÄNNISTÖ, P. T. 2009. Issues about the physiological functions of prolyl oligopeptidase based on its discordant spatial association with substrates and inconsistencies among mRNA, protein levels, and enzymatic activity. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57, 831-848.
- NAKAJIMA, T., ONO, Y., KATO, A., MAEDA, J.-I. & OHE, T. 1992. Y-29794—a non-peptide prolyl endopeptidase inhibitor that can penetrate into the brain. *Neuroscience letters*, 141, 156-160.
- NEVŠÍMALOVÁ, S., RŮŽICKA, E. & TICHÝ, J. 2002. *Neurologie*, Praha, Galén.

- OU, L. Y., TANG, X. C. & CAI, J. X. 2001. Effect of huperzine A on working memory in reserpine-or yohimbine-treated monkeys. *European journal of pharmacology*, 433, 151-156.
- PANZA, F., FRISARDI, V., SOLFRIZZI, V., IMBIMBO, B. P., LOGROSCINO, G., SANTAMATO, A., GRECO, A., SERIPA, D. & PILOTTO, A. 2012. Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-beta-amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy*, 4, 213-238.
- PATOCKA, J., JUN, D. & KUČA, K. 2008. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Current Drug Metabolism*, 9, 332-335.
- POLGAR, L. 2002. The prolyl oligopeptidase family. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 349-362.
- PROKOP, S., MILLER, K. R. & HEPNER, F. L. 2013. Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica*, 126, 461-477.
- SADOWSKY, C. H., MICCA, J. L., GROSSBERG, G. T. & VELTING, D. M. 2014. Rivastigmine from capsules to patch: therapeutic advances in the management of Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia. *The primary care companion for CNS disorders*, 16.
- SALLOWAY, S., MINTZER, J., WEINER, M. F. & CUMMINGS, J. L. 2008. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 4, 65-79.
- SHAH, R. S., LEE, H.-G., XIONGWEI, Z., PERRY, G., SMITH, M. A. & CASTELLANI, R. J. 2008. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62, 199-207.
- SCHNEIDER, J., GIARDINIERE, M. & MORAIN, P. 2001. Effects of the prolyl endopeptidase inhibitor S 17092 on cognitive deficits in chronic low dose MPTP-treated monkeys.
- SILVESTRELLI, G., LANARI, A., PARNETTI, L., TOMASSONI, D. & AMENTA, F. 2006. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology. *Mechanisms of ageing and development*, 127, 148-157.
- SOUKUP, O., JUN, D., ZDAROVA-KARASOVA, J., PATOCKA, J., MUSILEK, K., KORABECNY, J., KRUSEK, J., KANIAKOVA, M., SEP SOVA, V. & MANDIKOVA, J. 2013. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Current Alzheimer Research*, 10, 893-906.
- SPILOVSKA, K., KORABECNY, J., HOROVA, A., MUSILEK, K., NEPOVIMOVA, E., DRTINOVA, L., GAZOVA, Z., SIPOSOVA, K., DOLEZAL, R., JUN, D. & KUČA, K. 2015. Design, synthesis and in vitro testing of 7-methoxytacrine-amantadine analogues: a novel cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research*.
- SPILOVSKA, K., KORABECNY, J., NEPOVIMOVA, E., DOLEZAL, R., MEZEIOVA, E., SOUKUP, O. & KUČA, K. 2016a. Multitarget tacrine hybrids with neuroprotective properties to confront Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry*.
- SPILOVSKA, K., ZEMEK, F., KORABECNY, J., NEPOVIMOVA, E., SOUKUP, O., WINDISCH, M. & KUČA, K. 2016b. Adamantane—A Lead Structure for Drugs in Clinical Practice. *Current medicinal chemistry*, 23, 3245-3266.
- TARRAGÓ, T., KICHIK, N., CLAASEN, B., PRADES, R., TEIXIDÓ, M. & GIRALT, E. 2008. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16, 7516-7524.

- TARRAGO, T., KICHIK, N., SEGUÍ, J. & GIRALT, E. 2007. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem*, 2, 354-359.
- TERWEL, D., BOTHMER, J., WOLF, E., MENG, F. & JOLLES, J. 1998. Affected enzyme activities in Alzheimer's disease are sensitive to antemortem hypoxia. *Journal of the neurological sciences*, 161, 47-56.
- VENÄLÄINEN, J. I., GARCIA-HORSMAN, J. A., FORSBERG, M. M., JALKANEN, A., WALLÉN, E. A., JARHO, E. M., CHRISTIAANS, J. A., GYNTHNER, J. & MÄNNISTÖ, P. T. 2006. Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. *Biochemical pharmacology*, 71, 683-692.
- VENÄLÄINEN, J. I., JUVONEN, R. O., FORSBERG, M. M., GARCIA-HORSMAN, A., POSO, A., WALLÉN, E. A., GYNTHNER, J. & MÄNNISTÖ, P. T. 2002. Substrate-dependent, non-hyperbolic kinetics of pig brain prolyl oligopeptidase and its tight binding inhibition by JTP-4819. *Biochemical pharmacology*, 64, 463-471.
- WILLIAMS, R. S. & HARWOOD, A. J. 2000. Lithium therapy and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences*, 21, 61-64.
- WISNIEWSKI, T. & GONI, F. 2014. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 88, 499-507.
- ZHANG, X. D., LIU, X. Q., KIM, Y. H. & WHANG, W. K. 2014. Chemical constituents and their acetyl cholinesterase inhibitory and antioxidant activities from leaves of *Acanthopanax henryi*: potential complementary source against Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 37, 606-616.