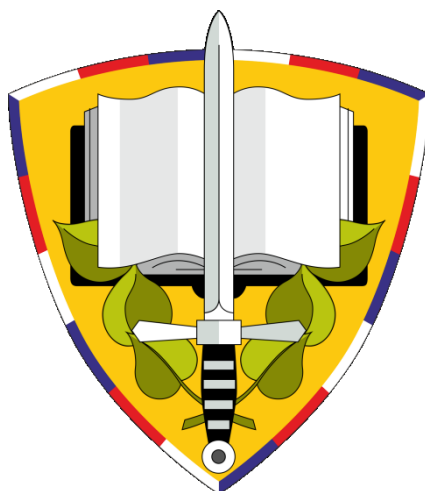


UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ  
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

**Doktorský studijní program TOXIKOLOGIE**



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Název:** *In vitro* charakterizácia látok modulujúcich aktivitu acetylcholinesterasy

Zpracoval: Mgr. Ľubica Múčková  
Školitel: plk. gšt. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

# Písomné zadanie dizertačnej práce

Mgr. Lubica MÚČKOVÁ

## Stanovení tématu disertační práce

**Student:** Mgr. Lubica MÚČKOVÁ

**Stanovené téma disertační práce:**

In vitro charakterizace látek modulujících aktivitu acetylcholinesterasy

**Klíčová slova v ČJ (5-10):**

biochemické parametry, toxikologické parametry, acetylcholinesterasa, buněčné linie, in vitro, cytotoxicita

**Klíčová slova v AJ (5-10):**

biochemical parameters, toxicological parameters, acetylcholinesterase, cell lines, in vitro, cytotoxicity

**Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):**

V rámci disertační práce bude studentka Mgr. Lubica Múčková pracovat na měření biochemických a toxikologických parametrů látek modulujících aktivitu acetylcholinesterasy při interakci s buněčnými liniemi in vitro. Práce bude zaměřena na sledování cytotoxicity, markerů buněčné smrti (např. aktivace kaspáz), oxidačního poškození, popř. antioxidační aktivity testovaných látek.

**Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků):**

MSc. Lubica Múčková will be working on measurement of biochemical and toxicological parameters of compounds modulating activity of acetylcholinesterase in interaction with cell lines in vitro. Objectives of study will be monitoring of cytotoxicity, markers of apoptosis (e. g. activation of caspases), oxidative stress and antioxidant activity of these substances.

**Stanovisko oborové rady:**

Souhlasím – ~~nesouhlasím~~\*/ se stanoveným tématem disertační práce.

18.11.2014  
.....  
datum

.....  
předseda oborové rady

Schvaluji.

24.11.2014  
.....  
datum

.....  
děkan

\*/ nehodící se škrtněte

## **Pod'akovanie**

Ďakujem plk. gšt. doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za vedenie mojej dizertačnej práce a tiež všetkým kolegom z Katedry toxikológie a vojenskej farmácie za pomoc v priebehu celého doktorandského štúdia na Fakulte vojenského zdravotníctva.

# Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som túto dizertačnú prácu vypracovala pod vedením školiteľa samostatne za použitia v práci uvedených prameňov a literatúry. Ďalej prehlasujem, že táto dizertačná práca nebola využitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 30.6.2020

Mgr. Ľubica Múčková

.....

## Abstrakt a kľúčové slová

Pre hodnotenie toxicity látok a taktiež ich mechanizmu toxicity v počiatočných fázach procesu vývoja nových chemických entít sú dostupné rôzne *in vitro* prístupy. Tieto systémy sa využívajú hlavne pre účely skríningu a umožňujú vytváranie komplexnejších toxikologických profilov. Predkladaná práca je zameraná na *in vitro* hodnotenie látok modulujúcich aktivitu acetylcholinesterasy. Tento enzým zohráva kľúčovú úlohu nervového systému a vyskytuje sa predovšetkým na cholinergných synapsiách a neuromuskulárnych spojeniach. Jeho hlavnou biologickou úlohou je terminácia nervového impulzu na týchto synapsiách a to rýchlou hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholínu na cholín a acetát. Acetylcholinesterasa je cieľovým enzýmom pre mnohé liečivá, napr. na Alzheimerovu chorobu alebo iné neurodegeneratívne ochorenia. Najčastejšie sa používajú jej reverzibilné a pseudoreverzibilné inhibítory. Taktiež zohráva úlohu pri otravách chemickými bojovými látkami zo skupiny nervovo paralytických látok a organofosforovými pesticídmi. U týchto otráv sa ako antidota využívajú práve reaktivátory acetylcholinesterasy.

Reaktivátory (asoxím, pralidoxím, obidoxím, trimedoxím, metoxím a oxím K027, K048, K074, K075 a K203) a inhibítory (pyridostigmín, galantamín, rivastigmín, donepezil, takrín, 7-metoxytakrín a 6-chlorotakrín) acetylcholinesterasy boli hodnotené pomocou viacerých *in vitro* testov s využitím bunkových línií. Bola stanovená ich cytotoxicita využitím kolorimetrickej a elektroimpedančnej metódy, ďalej bola sledovaná indukcia apoptózy pomocou mikrokapilárnej prietokovej cytometrie. Prostredníctvom rôznych fluorescenčných sond bola sledovaná zmena hladiny voľných radikálov v bunkách a taktiež antioxidačný potenciál testovaných látok.

Cytotoxicita látok a indukcia apoptózy jednotlivých testovaných látok bola stanovená na 4 rôznych bunkových modeloch (HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF) po 24 hodinovej inkubácií. K najmenej toxickým reaktivátorom možno zaradiť oxím K027 (najmenej toxický pre bunkovú líniu HepG2 a SH-SY5Y) a K048 (najnižšia toxicita pre ACHN a NHLF bunky). U ďalších oxímov sa cytotoxicita látok postupne zvyšovala, pričom bolo možné sledovať určité štrukturálne aspekty, ktoré mali vplyv na cytotoxicitu látok. Jednalo sa o dĺžku a charakter spojovacieho reťazca medzi

pyridiniovými kruhmi, počet oxímových skupín a taktiež ich polohu na pyridiniovom kruhu. Najmenej toxickým inhibítorom pre všetky bunkové línie bol pyridostigmín. Nakoľko sa jednalo o pomerne rôznorodú skupinu látok, nebolo možné zhodnotenie vzťahu cytotoxicita a štruktúra látky. Indukcia apoptózy alebo nekrózy po ovplyvnení buniek reaktivátormi alebo inhibítormi sa odlišovala medzi jednotlivými líniami, čo by mohlo byť pripísané odlišnej metabolickej kapacite jednotlivých bunkových modelov. U reaktivátorov sme sledovali, že na vstup buniek do apoptózy a/alebo nekrózy by mohli mať vplyv rovnaké aspekty štruktúry ako pri hodnotení cytotoxicity.

Narušenie oxidačno-redukčnej rovnováhy bolo sledované pomocou nešpecifickej fluorescenčnej sondy 2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetát v časových intervaloch 4 a 24 hodín spolu s viabilitou buniek. Na základe výsledkov možno konštatovať, že reaktivátory by mohli byť rozdelené do 3 skupín a to, u ktorých možno predpokladať oxidačný stres ako ich mechanizmus toxicity (K027, K048, K074, trimedoxím a obidoxím), u ktorých sa mechanizmus toxicity javí skôr ako kombinovaný, takže oxidačný stres môže zohrávať určitú rolu (K203 a K075), a u ktorých oxidačný stres pravdepodobne nezohráva významnejšiu úlohu (pralidoxím, metoxím a asoxím). Pre lepšie porovnanie schopnosti reaktivátorov narušiť oxidačno-redukčnú rovnováhu buniek boli ďalej testovaný vplyv pri koncentráciách, ktoré odpovedali hodnotám  $IC_{50}$ . Produkcia voľných radikálov bola sledovaná pomocou troch rôznych fluorescenčných sond v časových intervaloch 1, 4 a 24 hodín. Ako najsilnejší induktor oxidačného a nitrosatívneho stresu sa javil obidoxím. U inhibítorov acetylcholinesterasy sme nepozorovali žiadne narušenie oxidačno-redukčnej rovnováhy.

Antioxidačná kapacita bola stanovená pomocou fluorescenčnej sondy 2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetát. Po indukcii oxidačného stresu *tert*-butylhydroperoxidom sme pozorovali antioxidačný efekt po ovplyvnení buniek oxímami K075 a K203, ktoré vo svojej molekule obsahujú dvojitú väzbu a u jediného sledovaného monopyridiniového oxímu pralidoxímu. K inhibítorom, ktoré sa vyznačovali určitými antioxidačnými vlastnosťami, možno zaradiť donepezil, rivastigmín a galantamín.

**Kľúčové slová:** *in vitro* testovanie, acetylcholinesterasa, inhibítory, reaktivátory, cytotoxicita, apoptóza, oxidačný stres, antioxidačné vlastnosti

## Abstrakt a klíčová slova

Pro hodnocení toxicity látek a jejího mechanismu v počátečních fázích procesu vývoje nových chemických entit jsou dostupné různé *in vitro* přístupy. Tyto systémy se využívají hlavně pro účely screeningu a umožňují komplexně hodnotit toxikologické profily nově syntetizovaných sloučenin. Předkládaná práce je zaměřena na *in vitro* hodnocení látek modulujících aktivitu acetylcholinesterasy. Tento enzym sehrává klíčovou roli v nervovém systému a vyskytuje se především na cholinergních synapsích a neuromuskulárních spojích. Jeho hlavní biologickou rolí je terminace nervového impulzu na těchto synapsích, a to rychlou hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a acetát. Acetylcholinesterasa je cílovým enzymem pro mnohé léčivá, např. na Alzheimerovu chorobu nebo jiná neurodegenerativní onemocnění. Nejčastěji se používají její reverzibilní a pseudoreverzibilní inhibitory. Taktéž sehrává úlohu při otravách chemickými bojovými látkami ze skupiny nervově paralytických látek a organofosfátovými pesticidy. U těchto otrav se jako antidota využívají právě reaktivátory acetylcholinesterasy.

Reaktivátory (asoxim, pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, metoxim a oximy K027, K048, K074, K075 a K203) a inhibitory (pyridostigmin, galantamin, rivastigmin, donepezil, takrin, 7-metoxytakin a 6-chlorotakin) acetylcholinesterasy byly hodnoceny pomocí různých *in vitro* testů s pomocí buněčných linií. Byla stanovena jejich cytotoxicita využitím kolorimetrické a elektroimpedanční metody. Dále byla sledovaná indukce apoptózy pomocí mikropilární průtokové cytometrie. Prostřednictvím různých fluorescenčních sond byla sledovaná změna hladiny volných radikálů v buňkách a taktéž antioxidační potenciál testovaných látek.

Cytotoxicita látek a indukce apoptózy jednotlivých testovaných látek byla stanovena na 4 různých buněčných modelech (HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF) po 24hodinové inkubaci. K nejméně toxickým reaktivátorům je možné zařadit oxim K027 (nejméně toxický pro buňkovou linii HepG2 a SH-SY5Y) a K048 (nejnižší toxicita pro ACHN a NHLF buňky). U dalších oximů se cytotoxicita látek postupně zvyšovala, přičemž bylo možné sledovat určité strukturální aspekty, které měli vliv na cytotoxicitu látek. Jednalo se o délku a charakter spojovacího řetězce mezi pyridinovými kruhy, počet oximových skupin a jejich polohu na pyridinovém kruhu. Nejméně toxickým

inhibitorem pro všechny buňkové linie bol pyridostigmin. Vzhledem k poměrně vysoké různorodosti inhibitorů nebylo možné zhodnocení vztahu cytotoxicity a struktury látek. Indukce apoptózy anebo nekrózy po ovlivnění buněk reaktivátory anebo inhibitory se odlišovala mezi jednotlivými liniemi. Důvodem by mohla být odlišná metabolická kapacita jednotlivých buněčných modelů. U reaktivátorů jsme sledovali, že na vstup buněk do apoptózy a/nebo nekrózy by mohli mít vliv stejné strukturální aspekty jako při hodnocení cytotoxicity.

Narušení oxidačně-redukční rovnováhy bylo sledované pomocí nespecifické fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát v časových intervalech 4 a 24 hodin spolu s viabilitou buněk. Na základě výsledků je možné konstatovat, že reaktivátory lze rozdělit do několika skupin: 1) reaktivátory, u kterých je možné předpokládat oxidační stres jako mechanismus jejich toxicity (K027, K048, K074, trimedoxim a obidoxim), 2) reaktivátory, u kterých se mechanismus toxicity jeví spíše jako kombinovaný, takže oxidační stres může sehrávat určitou roli (K203 a K075) a 3) reaktivátorů, u nichž oxidační stres pravděpodobně nesehrává úlohu (pralidoxim, metoxim nebo asoxim). Pro lepší porovnání schopnosti reaktivátorů narušit oxidačně-redukční rovnováhu buněk byl dále testován vliv na hladinu volných radikálů při koncentracích, které odpovídali hodnotám  $IC_{50}$ . Produkce volných radikálů byla sledována pomocí třech různých fluorescenčních sond v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin. Jako nejsilnější induktor oxidačního a dusíkatého stresu se jevil právě obidoxim. U inhibitorů acetylcholinesterasy jsme nepozorovali žádné narušení oxidačně-redukční rovnováhy.

Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát. Po indukci oxidačního stresu *tert*-butylhydroperoxidem jsme pozorovali antioxidační efekt po ovlivnění buněk oximy K075 a K203, které ve své molekule obsahují dvojnou vazbu a u jediného sledovaného monopyridinového oximu pralidoximu. K inhibitorům, jež se vyznačovaly určitými antioxidačními vlastnostmi, je možné zařadit donepezil, rivastigmin a galantamin.

**Klíčové slova:** *in vitro* testování, acetylcholinesterasa, inhibitory, reaktivátory, cytotoxicita, apoptóza, oxidační stres, antioxidační vlastnosti



## Abstract and keywords

Various *in vitro* approaches are available to evaluate the toxicity of substances as well as their mechanism of toxicity in the early stages of the process of developing new chemical entities. These systems are mainly used for screening and allow the creation of more complex toxicological profiles. The present work focuses on *in vitro* evaluation of substances modulating acetylcholinesterase activity. The enzyme plays a crucial role in the nervous system and occurs mainly in cholinergic synapses and neuromuscular junctions. The primary biological function of this enzyme is the termination of the nerve impulse at these synapses by the rapid hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine to choline and acetate. Acetylcholinesterase is a target enzyme for many drugs, e.g., for Alzheimer's disease or other neurodegenerative diseases. The most often used are reversible and pseudoreversible inhibitors. It also plays a role in poisoning by chemical warfare agents, namely nerve agents and organophosphorus pesticides. Acetylcholinesterase reactivators are used as antidotes for these poisons.

Reactivators (asoxime, pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime and oximes K027, K048, K074, K075, and K203) and inhibitors (pyridostigmine, galantamine, rivastigmine, donepezil, tacrine, 7-methoxytacrine, and 6-chlorotacrine) of acetylcholinesterase were evaluated using several cell-based *in vitro* assays. Colorimetric and electroimpedance methods determined their cytotoxicity. Furthermore, the induction of apoptosis was monitored by microcapillary flow cytometry. The change in the level of free radicals in the cells as well as the antioxidant potential of the test substances was observed using various fluorescent probes.

The cytotoxicity and the induction of apoptosis of tested compounds were determined in 4 different cell models (HepG2, ACHN, SH-SY5Y, and NHLF) after 24 hours incubation. The least toxic reactivators were oximes K027 (least toxic to the HepG2 and SH-SY5Y cell lines) and K048 (least toxic to ACHN and NHLF cells). The cytotoxicity of other substances further increased. According to our results, certain structural aspects affect the cytotoxicity of substances, including the length and nature of the linker chain between pyridinium rings, the number of oxime groups, and also their position on the pyridinium ring. The least toxic inhibitor for all cell lines was pyridostigmine. Because this group was structurally diverse, it was not possible to

evaluate the relationship between cytotoxicity and the structure of the compounds. The induction of apoptosis or necrosis after treatment of cells with reactivators or inhibitors varied between cell lines, which could be attributed to the different metabolic capacities of used cell models.

Disruption of the redox equilibrium was monitored using a non-specific fluorescent probe of 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate at time intervals of 4 and 24 hours together with cell viability. The results showed that reactivators could be divided into three different groups. These include a group with strong oxidative stress response (K027, K048, K074, trimedoxime, obidoxime), a group in which oxidative stress could play a partial role (K203 and K075), and finally, a group of substances with weak oxidative stress induction (pralidoxime, methoxime, asoxime). For a better comparison of the ability of reactivators to disrupt the redox equilibrium of cells, we further tested oxidative stress status at concentrations that corresponded to IC<sub>50</sub> values. The production of free radicals was monitored by three different fluorescent probes at time intervals of 1, 4, and 24 hours. Obidoxime appeared to be the strongest inductor of oxidative and nitrosative stress. We did not observe any dysregulation of the redox equilibrium after acetylcholinesterase inhibitors treatment.

Antioxidant capacity was determined using a 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescence probe. After induction of oxidative stress by *tert*-butyl hydroperoxide, we observed an antioxidant effect in cells treated with oximes K075, K203 and pralidoxime. Both K075 and K203 contain double bond in their molecule, while pralidoxime represents monopyridinium oximes. Inhibitors with antioxidant properties include donepezil, rivastigmine, and galantamine.

**Keywords:** *in vitro* testing, acetylcholinesterase, inhibitors, reactivators, cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, antioxidant properties

# Obsah

Písomné zadanie dizertačnej práce.....	2
PodĎakovanie.....	3
Čestné prehlásenie.....	4
Abstrakt a kľúčové slová .....	5
Abstrakt a kľúčová slova .....	7
Abstract and keywords .....	9
Obsah.....	11
Zoznam použitých skratiek .....	15
Zoznam obrázkov .....	19
Zoznam tabuliek.....	23
1. Úvod.....	24
1.1 Využitie <i>in vitro</i> metód v toxikológii .....	25
1.1.1 Bunkové modely.....	25
1.1.1.1 Bunkové kultúry .....	25
1.1.1.2 Organoidy .....	28
1.1.1.3 Orgány na čipe.....	28
1.1.2 Možnosti stanovenia cytotoxicity látok a bunkovej proliferácie.....	28
1.1.2.1 Sledovanie membránovej integrity.....	29
1.1.2.2 Sledovanie metabolickej aktivity buniek.....	30
1.1.2.3 Sledovanie obsahu ATP, proteas a proteínov v bunkách .....	32
1.1.2.4 Sledovanie apoptických zmien a aktivity kaspas .....	33
1.1.2.5 Sledovanie proliferácie buniek .....	35
1.1.3 Bunková smrť a oxidačný stres .....	36
1.1.3.1 Možnosti stanovenia voľných radikálov .....	37

1.1.3.2	Možnosti stanovenia markerov oxidačného stresu.....	39
1.1.4	Vývoj potenciálnych liečiv a antidot na pracovišti .....	41
1.2	Látky modulujúce aktivitu AChE .....	41
1.2.1	Acetylcholinesterasa.....	41
1.2.2	Reaktivátory AChE .....	43
1.2.2.1	Mechanizmus reaktivácie inhibovanej AChE .....	45
1.2.2.2	Vzťah medzi štruktúrou a účinnosťou rAChE.....	47
1.2.3	Inhibítory AChE .....	48
2.	Cieľ práce.....	51
3.	Materiál a metodika.....	52
3.1	Testované látky .....	52
3.2	Použité <i>in vitro</i> modely.....	54
3.3	Stanovenie cytotoxicity testovaných látok .....	55
3.3.1	Kolorimetrická metóda a postup stanovenia cytotoxicity .....	56
3.3.2	Elektroimpedančná metóda a postup stanovenia cytotoxicity.....	57
3.4	Sledovanie apoptickej aktivity buniek .....	57
3.4.1	Postup stanovenia apoptickej aktivity .....	58
3.5	Sledovanie zmeny intracelulárnej hladiny voľných radikálov .....	59
3.5.1	Použité fluorescenčné sondy .....	59
3.5.2	Postup stanovenia voľných radikálov pomocou rôznych fluorescenčných sond .....	59
3.6	Sledovanie antioxidačnej aktivity testovaných látok.....	60
3.6.1	Postup stanovenia antioxidačnej aktivity .....	60
3.7	Štatistické spracovanie výsledkov .....	61
4.	Výsledky .....	62
4.1	Sledovanie cytotoxicity testovaných látok .....	62

4.1.1	Reaktivátory AChE .....	62
4.1.2	Inhibítory AChE .....	65
4.2	Sledovanie apoptickej aktivity .....	68
4.2.1	Reaktivátory AChE .....	68
4.2.2	Inhibítory AChE .....	74
4.3	Zmeny intracelulárnej hladiny RONS v kontexte s viabilitou buniek.....	80
4.3.1	Reaktivátory AChE .....	80
4.3.1.1	Porovnanie schopnosti rAChE indukcie RONS v bunkách .....	91
4.3.2	Inhibítory AChE .....	99
4.4	Sledovanie antioxidačnej aktivity .....	107
4.4.1	Reaktivátory AChE .....	107
4.4.2	Inhibítory AChE .....	110
5.	Diskusia.....	112
5.1	Cytotoxické účinky testovaných látok .....	112
5.1.1	Reaktivátory AChE .....	112
5.1.2	Inhibítory AChE .....	114
5.2	Sledovanie apoptického profilu .....	116
5.2.1	Reaktivátory AChE .....	116
5.2.2	Inhibítory AChE .....	118
5.3	Vplyv látok na oxidačno-redukčnú rovnováhu.....	119
5.3.1	Reaktivátory AChE .....	119
5.3.1.1	Indukcia oxidačného stresu pri hodnotách IC <sub>50</sub> .....	121
5.3.2	Inhibítory AChE .....	123
5.4	Sledovanie antioxidačnej aktivity .....	123
5.4.1	Reaktivátory AChE .....	124

5.4.2	Inhibitory AChE .....	124
6.	Prínos práce .....	126
7.	Záver .....	127
8.	Zoznam použitej literatúry .....	128
	Zoznam príloh .....	145
	Prílohy .....	146

## Zoznam použitých skratiek

$^1\text{O}_2$	singletový kyslík
2,3-DAN	2,3-diaminonaftalén
2-PAM	pralidoxím
4,5-DAF	4,5-diaminofluoresceín diacetát
7-AAD	7-aminoaktinomycín D
7-MEOTA	7-metoxytakrín
8-oxodG	8-hydroxydeoxyguanozín
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholín
AChE	acetylcholinesterasa
APF	3'-( <i>p</i> -aminofenyl)fluoresceín
ATB	antibiotiká
ATP	adenozíntrifosfát
BBB	hematoencefalická bariéra
BChE	butyrylcholinesterasa
bis-AAF-R110	bialanylalanylfenylalanyl rodamín 110
CI	bunkový index
Cl-THA	6-chlorotakrín
DCF-DA	2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetát
DCF	dichlorofluoresceín
DHE	dihydroetídium
DMA	9,10-dimetylantracén
DMAX	9-[2-(3-Carboxy-9,10-dimetyl)antryl]-6-hydroxy-3H-xanten-3-on

DMEM	Eaglovo médium modifikované Dupleccom
DMEM/F12	Eaglovo médium modifikované Dupleccom so zmesou F12
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPAX	9-[2-(3-carboxy-9,10-difenyl)antryl]-6-hydroxy-3H-xanten-3-on
DPBF	1,3-difenylozobenzofurán
dUTP	deoxyuridíntrifosfát
EI	elektroimpedančná
FBS	fetálne bovinné sérum
G-6-PD	glukóza-6-fosfát dehydrogenasa
GF-AFC	glycylfenylalanyl-aminofluorokumarín
HI-6	asoxím
HO•	hydroxyloxy radikál
HOCl	kyselina hypochlórna
HPF	3'-( <i>p</i> -hydroxyfenyl) fluoresceín
HRP	chrenová peroxidasa
ChS	cholinergná synapsia
iAChE	inhibítory acetylcholinesterasy
LDH	laktátdehydrogenasa
LüH-6	obidoxím
MDA	malodialdehyd
MMB-4	metoxím
MTS	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxy-metoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium



MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD <sup>+</sup>	nikotínamidadenín dinukleotid
NADPH	redukovaný nikotínamidadenín dinukleotid fosfát
NO	oxid dusnatý
NPL	nervovoparalytické látky
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoxidový aniónový radikál
ONOO <sup>-</sup>	peroxynitritový anión
OP	organofosforové
PBS	fosfátový pufor
PI	propídium jodid
PMS	fenazínmetosulfát
PRiMA	<i>"proline-rich membrane anchor"</i>
PS	fosfatidylserín
rAChE	reaktívatory acetylcholinesterasy
rGLU	redukovaný glutatión
RNS	reaktívne formy dusíka
RO•	alkoxylový radikál
RONS	reaktívne formy kyslíka a dusíka
ROO•	peroxylový radikál
ROS	reaktívne formy kyslíka
SRB	sulforodamín B
TBARS	reaktívne formy kyseliny tiobarbiturovej
tBuOOH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TdT	terminálna deoxynukleotidyl transferasa
THA	takrín

TMB-4	trimedoxím
TUNEL	<i>"TdT-mediated dUTP-biotine Nick End Labelling"</i>
WST-8	2-(2-metoxý-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazólium
XTT	2,3-bis-(2-metoxý-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazólium-5-carboxanilid

## Zoznam obrázkov

Obrázok 1 - Schéma inhibície AChE sománom	46
Obrázok 2 - Mechanizmus reaktivácie AChE inhibovanej sarínom pomocou 2-PAM	47
Obrázok 3 - Štruktúra konvenčne používaných reaktivátorov AChE	52
Obrázok 4 - Štruktúra oxímových reaktivátorov so série K	53
Obrázok 5 - Chemická štruktúra reverzibilných inhibítorov acetylcholinesterasy	54
Obrázok 6 - Použité <i>in vitro</i> modely.	55
Obrázok 7 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek HepG2 vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín.	69
Obrázok 8 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek ACHN vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín.	70
Obrázok 9 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek SH-SY5Y vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín.	72
Obrázok 10 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek NHLF vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín.	73
Obrázok 11 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek HepG2 vyvolaných reverzibilnými/pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín.	75
Obrázok 12 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek ACHN vyvolaných reverzibilnými/pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín.	76
Obrázok 13 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek SH-SY5Y vyvolaných reverzibilnými/ pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín.	78
Obrázok 14 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek NHLF vyvolaných reverzibilnými/pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín.	79
Obrázok 15 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom 2-PAM.	81
Obrázok 16 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom TMB-4.	82
Obrázok 17 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom LüH-6.	83
Obrázok 18 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom MMB-4.	84

Obrázok 19 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom HI-6.	85
Obrázok 20 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K027.	86
Obrázok 21 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K048.	87
Obrázok 22 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K074.	88
Obrázok 23 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K075.	90
Obrázok 24 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K203.	91
Obrázok 25 - Zmena viability buniek po ich ovplyvnení štandardne používaných rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov $IC_{50}$ v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín.	92
Obrázok 26 - Zmena viability buniek po ich ovplyvnení oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov $IC_{50}$ v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín.	93
Obrázok 27 - Zmena intracelulárnej hladiny RONS pomocou fluorescenčnej sondy DCF-DA po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov $IC_{50}$ v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín.	94
Obrázok 28 - Zmena intracelulárnej hladiny RONS pomocou fluorescenčnej sondy DCF-DA po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov $IC_{50}$ v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín.	95
Obrázok 29 - Zmena hladiny $O_2^{\bullet-}$ v bunkách detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DHE po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov $IC_{50}$ v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín.	96
Obrázok 30 - Zmena hladiny $O_2^{\bullet-}$ v bunkách detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DHE po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentráciou	

- odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. 97
- Obrázok 31 - Zmena intracelulárnej hladiny NO detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-DAF po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. 98
- Obrázok 32 Zmena intracelulárnej hladiny NO detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-DAF po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. 99
- Obrázok 33 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom THA. 100
- Obrázok 34 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom Cl-THA. 101
- Obrázok 35 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom 7-MEOTA. 102
- Obrázok 36 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom galantamínom. 103
- Obrázok 37 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom donepezilom. 104
- Obrázok 38 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom rivastigmínom. 105
- Obrázok 39 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom pyridostigmínom. 106
- Obrázok 40 - Antioxidačný efekt testovaných štandardne používaných rAChE sledovaný kontinuálne každých 15 minút po dobu 2 hodín. 108
- Obrázok 41 - Antioxidačný efekt testovaných rAChE z K-série sledovaný kontinuálne každých 15 minút po dobu 2 hodín. 109

Obrázok 42 - Antioxidačný efekt testovaných iAChE sledovaný kontinuálne každých 15  
minút po dobu 2 hodín.

111

## Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Prehľad najčastejšie používaných 2D bunkových modelov	26
Tabuľka 2 Populácia buniek, ktoré umožňuje stanoviť metóda využívajúca Annexin V a 7-AAD	58
Tabuľka 3 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii HepG2.	62
Tabuľka 4 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii ACHN.	63
Tabuľka 5 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii SH-SY5Y.	64
Tabuľka 6 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii NHLF.	65
Tabuľka 7 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii HepG2.	66
Tabuľka 8 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii ACHN.	66
Tabuľka 9 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii SH-SY5Y.	67
Tabuľka 10 Porovnanie toxikologických indexov $IC_{50}$ inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii NHLF.	68
Tabuľka 11 Prehľad testovaných koncentrácií jednotlivých rAChE	107
Tabuľka 12 Prehľad testovaných koncentrácií jednotlivých iAChE	110

# 1. Úvod

Predkladaná dizertačná práca sa zaoberá *in vitro* charakterizáciou látok, ktoré sú schopné určitej modulácie acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7). Rôzne *in vitro* prístupy sa čoraz viac využívajú pri hodnotení toxicity látok, po prípade pri stanovení mechanizmov toxicity v počiatočných fázach procesu vývoja nových chemických entít. *In vitro* prístupy poskytujú dôležitý nástroj pre lepšie pochopenie nebezpečných a nežiaducich účinkov potenciálnych novosyntetizovaných liečiv. Tieto systémy sa využívajú hlavne pre účely skríningu a umožňujú vytváranie komplexnejších toxikologických profilov. Rovnako sú potenciálne použiteľné pre sledovanie lokálnych alebo cielených špecifických účinkov (Eisenbrand et al. 2002). *In vitro* prístupy sa významne podieľajú na uplatnení konceptu 3R: *reduction, refinement, replacement* (znižovanie, zlepšenie, nahradenie). Tento koncept poskytuje určitú stratégiu pre postupnú minimalizáciu používania a utrpenia laboratórnych zvierat bez toho, aby bola znížená kvalita vedeckovýskumnej práce (Kandárová a Letašiová 2011). Bol prvý krát publikovaný už v roku 1959 Russelom a Burchom v knihe *The Principle of Humane Experimental Technique* (Tannenbaum a Bennett 2015).

Prvé R – „*reduction*“ – je definované ako akékoľvek zníženie počtu použitých zvierat počas experimentov. Zníženie počtu zvierat by však malo ostávať v súlade s vedeckými postupmi, ktoré sú nutné pre získanie správnych a platných výsledkov. Toto môže byť dosiahnuté napr. zníženým počtu premenných pomocou kvalitne navrhnutého experimentu, zabezpečením a prísnyh kontrolovaním podmienok, pri ktorých experiment bude prebiehať, po prípade použitím geneticky homogénnych skupín zvierat (Erkekoglu et al. 2013). Pri dodržiavaní tohto R sa môžu uplatňovať i rôzne *in vitro* metodiky. V prípade, že zistíme, že novosyntetizovaná chemická entita je viac toxická ako dostupná štandardne používaná látka, môže byť táto entita z ďalšieho testovania vylúčená a tým pádom dôjde k redukcii počtu použitých laboratórnych zvierat.

Druhé R – „*refinement*“ – zlepšenie, navrhuje rozličné úpravy meraní, ktoré by znižovali stres, bolesť a utrpenie experimentálnych zvierat použitím neinvazívnych techník, anestézie a analgetík. Redukcia stresu, nepohodlia a bolesti vedie k ustáleniu výsledkov, nakoľko stres a bolesť môžu viesť u zvierat'a napr.: k hormonálnej



nerovnováhe, čo môže viesť k nekonštantným výsledkom (Doke a Dhawale 2015). Použitie *in vitro* prístupov u tohto R nezohráva výraznejšiu úlohu.

Významnejšiu rolu naopak zohrávajú pri uplatnení posledného R – „*replacement*“. Jedná sa o nahradenie zvierat entitami, ktoré nemôžu byť poškodené a nemôže im byť spôsobená bolesť ako napríklad počítačovým modelovaním alebo bunkovými modelmi. Nevylučuje sa taktiež použitie fylogeneticky nižších zvierat ako sú napr. rôzne bezstavovce. Nahradenie zvierat'a v experimente môže byť relatívne, čiastočné alebo úplne. Relatívnym nahradením zvierat'a sa rozumie humánnejšie usmrtenie zvierat'a kvôli následnému získaniu jeho vnútorných orgánov pre ďalšie *in vitro* testovanie a tým pádom nie je zviera vystavované ďalším stresovým faktorom v priebehu samotného experimentu. Pri čiastočnom nahradení laboratórnych zvierat je na začiatku uskutočnený *in vitro* experiment, za ktorým nasleduje *in vivo* experiment pre potvrdenie zistených výsledkov. Pri úplnom nahradení je *in vivo* metóda kompletne nahradená *in vitro* metódou (Erkekoglu et al. 2013).

## **1.1 Využitie *in vitro* metód v toxikológii**

### **1.1.1 Bunkové modely**

K najčastejšie využívaným bunkovým modelom, ktoré sa používajú pri *in vitro* experimentoch v toxikológii sú rôzne bunkové kultúry, organoidy alebo orgány na čipe.

#### **1.1.1.1 Bunkové kultúry**

Najbežnejšie využívaným typom bunkových kultúr je 2D model, avšak v poslednej dobe získavajú na popularite 3D bunkové kultúry.

U bežných 2D adherentných bunkových kultúr rastú bunky v monovrstve v rôznych kultivačných nádobách. Rast v monovrstvách umožňuje bunkám prístup k zrovnateľnému množstvu živín a rastových faktorov, ktoré sú prítomné v kultivačných médiách. To má za následkom homogénny rast a proliferáciu (Duval et al. 2017). Primárne bunkové kultúry reprezentujú bunky získané priamo z intaktného organizmu. Tieto bunkové kultúry môžu byť udržiavané v *in vitro* podmienkach len v obmedzenom čase v rozsahu niekoľko dní až mesiacov v závislosti na typu buniek a podmienkach kultivácie (Honegger 1999). Pre primárne bunkové kultúry je charakteristické, že si zachovávajú určité črty pôvodného tkaniva, z ktorého boli izolované. Tieto kultúry

buniek sa vyznačujú nízkou homogenitou a tendenciou k strate morfológických a funkčných vlastností (Ekwall 1983). Namiesto primárnych bunkových kultúr sa pomerne často vo výskume používajú rôzne typy nádorových alebo imortalizovaných bunkových línií (Kaur a Dufour 2012). Najčastejšie využívané ľudské bunkové kultúry sú zosumarizované v tabuľke 1 (Fröhlich 2018; van Delft et al. 2014; Carter a Shieh 2015; Jain et al. 2018; Shastri et al. 2001; Harry et al. 1998).

Tabuľka 1 - Prehľad najčastejšie používaných 2D bunkových modelov

<b>Názov bunkovej línie</b>	<b>Pôvod bunkovej línie</b>
16HBE14o-	SV40 imortalizované bronchiálne epiteliálne bunky
A549	Pľúcny karcinóm
ACHN	Adenokarcinóm obličiek
CaCo-2	Kolorektálny adenokarcinóm
HEK-293T	Embryonálne obličkové bunky
HeLa	Karcinóm cervixu
HepG2	Hepatocelulárny karcinóm
HepaRG	Progenitorové pečňové bunky
IMR32	Neuroblastóm
MRC-5	Fetálne pľúcne fibroblasty
NHLF	Pľúcne fibroblasty
SH-SY5Y	Neuroblastóm
THLE-3	SV40 imortalizované hepatocyty

2D kultúry buniek sa vyznačujú viacerými výhodami spojenými s jednoduchou a nízkonákladovou údržbou bunkovej kultúry a jednoduchým vykonaním funkčných testov. Avšak tieto modely sa vyznačujú aj viacerými nevýhodami. V prvom rade chýba

prítomnosť interakcie medzi jednotlivými bunkami po prípade bunkou a extracelulárnym prostredím. Po izolácií buniek z tkanív môže dochádzať ku zmene ich morfológie, čo môže ďalej zmeniť aj ich špecifickú funkciu. V neposlednom rade patrí k nevýhodám týchto bunkových kultúr aj to, že nie celkom odrážajú prirodzenú štruktúru tkanív, z ktorých boli izolované. Avšak aj napriek týmto nevýhodám sú tieto modely stále veľmi často využívané v preklinickom testovaní nových molekúl a liečiv (Kapałczyńska et al. 2018).

V porovnaní s 2D modelmi 3D bunkové kultúry odrážajú výraznejšie mikroprostredie jednotlivých tkanív, čo je jedna z ich najvýznamnejších výhod. Bunky v 3D modeloch môžu rásť a interagovať s okolitým extracelulárnym prostredím vo všetkých troch rozmeroch. Na základe metódy ich prípravy môžu byť 3D modely rozdelené do troch skupín:

- a) suspenzia buniek kultivovaná na neadherentom kultivačnom plaste,
- b) kultúry kultivované v kultivačných médiách s obsahom gélotvornej substancie,
- c) bunkové kultúry na rôznej matrici (Kapałczyńska et al. 2018).

V prvom prípade sú bunky nasadené do kultivačného média v neadherentnom kultivačnom plaste, pričom formovanie 3D štruktúr možno pozorovať zhruba v priebehu 3 dní. V druhom type 3D kultúr rastú jednotlivé bunky v kultivačnom médiu, ktoré obsahuje gélotvornú substanciu. V prvom kroku kultivácie je na kultivačný plast pridaná rozpustená agaróza. Po jej stuhnutí je pridaná ďalšia vrstva, ktorá obsahuje kultivačné médium s obsahom agarózy a jednotlivými bunkami. V takto upravenom kultivačnom prostredí možno pozorovať tvorbu 3D štruktúr po približne týždni inkubácie. V poslednom prípade sú bunky kultivované na matrici, ktorá výrazne podporuje ich rast vo všetkých smeroch. Táto matrica môže byť rastlinného, živočíšneho alebo syntetického pôvodu. Čas potrebný pre sformovanie 3D štruktúry je závislý na type jednotlivých matric (Knight a Przyborski 2015).

3D bunkové modely sa však vyznačujú aj viacerými nevýhodami, ku ktorým patrí predovšetkým vyššia časová a finančná náročnosť, ale taktiež nízka opakovateľnosť, účinnosť a životnosť v porovnaní s 2D kultúrami (Kapałczyńska et al. 2018; Fröhlich 2018; Edmondson et al. 2014).

### 1.1.1.2 Organoidy

Organoid je 3D tkanivový model, ktorý pozostáva s orgánovo-špecifických typov buniek. Tieto bunky sa vyvíjajú z kmeňových buniek alebo špecifických orgánových progenitorov. Organoid môže byť produkovaný za použitia dospelých, embryonálnych alebo indukovaných pluripotentných kmeňových buniek. Môžu pozostávať z viacerých typov buniek (Truskey 2018; Takahashi 2019). Organoidy sa vyznačujú dôležitými vlastnosťami, ktoré majú spoločné s orgánmi *in vivo*. Zachovávajú si určitú úroveň funkčnosti natívnych orgánov, a to práve vďaka viacerým typom buniek a ich organizácií v organoide (Nadkarni et al. 2016). Tento systém reprezentuje dôležitý medzistupeň, medzi 2D bunkovými kultúrami a zvieracími modelmi. Do súčasnosti boli objavené rôzne typy organoidov a ich kombinácií, napr. črevné, obličkové, pľúcne, pankreatické, pečenevé, ale aj rôzne mozgové organoidy (Kratochvil et al. 2019).

### 1.1.1.3 Orgány na čipe

Orgány na čipe možno charakterizovať ako tkanivové mikrobiomimetické systémy, ktoré reprezentujú funkčné jednotky živých ľudských orgánov. Najčastejšie pozostávajú z transparentných 3D polymetrických mikrokanálov, ktoré sú lemované živými ľudskými bunkami. Zachovávajú si 3 dôležité aspekty intaktných orgánov a to 3D mikroarchitektúru definovanú priestorovým rozložením viacerých tkanivových typov, funkčné rozhranie tkanivo-tkanivo a komplexné orgánovo-špecifické biochemické a mechanické mikroprostredie. Tieto systémy môžu byť použité ako špecializované *in vitro* modely, ktoré umožňujú simuláciu, skúmanie a farmakologickú moduláciu komplexných biologických procesov (Esch et al. 2015).

### 1.1.2 Možnosti stanovenia cytotoxicity látok a bunkovej proliferácie

Sledovanie bunkovej viability alebo rôzne testy cytotoxicity sú pomerne často využívané pri toxikologických skríningoch. Testy pre sledovanie bunkovej viability sú založené na sledovaní funkčnosti rôznych bunkových kompartmentov po prípade enzymatickej výbavy buniek. Najčastejšie sa sleduje membránová integrita, enzymatická aktivita, produkcia adenoíntrifosfátu (ATP), obsah proteínov a aktivita proteas v bunkách a v neposlednom rade sledovanie apoptickej aktivity a bunkovej proliferácie (Adan et al. 2016).

### 1.1.2.1 Sledovanie membránovej integrity

Neporušená integrita bunkovej membrány je jedným zo znakov viabilnej bunky. Pomocou rôznych farbív možno teda rozlíšiť viabilné bunky od mŕtvych buniek v suspenzii. Princípom týchto metód je, že živé bunky s neporušenou membránou neumožnia prienik farbiva do bunky (ostanú neofarbené) v porovnaní s mŕtvymi bunkami, ktoré majú porušenú membránu a farbivo tak do nich môže preniknúť. Sledovanie membránovej integrity je možné pomocou viacerých farbív vrátane eozínu, kongo červene, erytrozínu B a trypanovej modrej (Aslantürk 2017).

Najčastejšie využívaným farbivom je práve trypanová modrá. Táto metóda sa vyznačuje viacerými výhodami. Tými sú hlavne jednoduchosť, nízke finančné náklady a taktiež rýchlosť rozlíšenia mŕtvych buniek od živých (po niekoľkých sekundách od expozície buniek farbivu). Aj napriek jednoduchosti tohto testu, je pomerne ťažké spracovávať väčšie množstvo vzoriek súčasne. Rovnako farbenie trypanovou modrou nie je možné použiť v prípade, že je potrebné rozlíšiť zdravé a živé bunky, ktoré už však strácajú niektoré svoje bunkové funkcie. Tým pádom nie je dostatočne citlivým testom pre testovanie cytotoxicity *in vitro*. Ďalšou nevýhodou tohto farbiva sú aj toxické vedľajšie účinky na bunky cicavcov (Adan et al. 2016; Aslantürk 2017).

Ďalšou možnosťou sledovania membránovej integrity je použitie fluorescenčného farbiva propidium jodid (PI). Toto fluorescenčné farbivo preniká do bunky v prípade poškodenia bunkovej membrány. Jedná sa o interkalačné farbivo, ktoré sa viaže na dvojláknovú deoxyribonukleovú kyselinu (DNA) a následne vykazuje červenú fluorescenciu (Rieger et al. 2011). Farbenie pomocou PI je taktiež pomerne jednoduchá, rýchla a lacná metóda. Hlavnou nevýhodou je, že sa jedná o látku s karcinogénnym účinkom. Táto fluorescenčná próba sa pomerne často využíva v prietokovej cytometrii v kombinácii s ďalšími farbivami pri stanovení apoptického profilu buniek (Rieger et al. 2010).

Membránová integrita buniek môže byť stanovená aj pomocou metód, ktoré sledujú vylúčenie vnútrobunkového obsahu mimo bunku, ako napríklad vylúčenie intracelulárneho enzýmu laktátdehydrogenasa (LDH) alebo glukóza-6-fosfát dehydrogenasa (G-6-PD) (Eisenbrand et al. 2002; Adan et al. 2016).

LDH je stabilný cytoplazmatický enzým, ktorý sa nachádza vo všetkých bunkách. V prípade poškodenia plazmatickej membrány, je LDH rýchlo vylučovaný do supernatantu bunkovej kultúry (Kumar et al. 2018). Stanovenie aktivity LDH v supernatante prebieha pomocou 2-krokovej reakcie. V prvom kroku LDH katalyzuje premenu laktátu na pyruvát redukciou oxidovanej formy nikotínamidadenín-dinukleotidu (NAD<sup>+</sup>). V ďalšom kroku je jodonitrotetrazólium chlorid redukovaný v prítomnosti diaforasy a redukovaného NAD na formazán červeného zafarbenia (Rayamajhi et al. 2013; Adan et al. 2016).

Ďalšou metódou pre sledovanie viability buniek je fluorescenčná metóda založená na vylúčení G-6-PD z bunky cez poškodenú bunkovú membránu. Tento enzým je zapojený do pentózofosfátovej dráhy a je zodpovedný za vznik redukovaného nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH). Exogénne pridaný resazurín môže byť tak v prítomnosti NADPH redukovaný na vysokofluorescenčný produkt resofurín. Test je teda založený na meraní fluorescenčného signálu, pričom jeho intenzita je priamo úmerná množstvu mŕtvych buniek. V porovnaní s LDH testom je tento test citlivejší (Adan et al. 2016).

### **1.1.2.2 Sledovanie metabolickej aktivity buniek**

Testy založené na sledovaní metabolickej aktivity sú kolorimetrické metódy, ktoré využívajú rôzne tetrazóliové soli ako 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid (MTT), 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboxy-metoxifenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazólium (MTS), 2,3-bis-(2-metoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazólium-5-carboxanilid (XTT) a 2-(2-metoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazólium (WST-8) (Riss et al. 2004).

MTT redukčný test bol prvým testom pre sledovanie viability buniek, ktorý bol vyvinutý pre 96-jamkový formát doštičiek. Tento test je pomerne často využívaný. Životaschopné bunky s aktívnym metabolizmom sú schopné konvertovať MTT pomocou NADPH-dependentných oxidoreduktas na vo vode nerozpustné fialovo-zafarbené kryštály formazánu, ktoré sú akumulované v intracelulárnom priestore. Kryštály formazánu musia byť rozpustené pomocou vhodného organického rozpúšťadla, najčastejšie dimetylsulfoxidu (DMSO). Intenzita zafarbenia vzniknutého

roztoku je potom priamo úmerná viabilite buniek a je meraná spektrofotometricky (Riss et al. 2004; Kuete et al. 2017).

XTT test bol navrhnutý ako náhrada MTT testu. Na rozdiel od MTT je formazán vznikajúci metabolizáciou z XTT rozpustný vo vode. Na jeho konverzii vo viabilných bunkách sa podieľajú mitochondriálne sukcinát oxidasy, cytochróm P450 a taktiež flavoproteín oxidasy. Vznikajúci formazán oranžového zafarbenia je možné v supernatante stanoviť pomocou spektrofotometrie (Kuete et al. 2017).

MTS test je často označovaný ako jednokrokový MTT test. V prítomnosti fenazínmetosulfátu (PMS) je MTS redukovaný viabilnými bunkami na formazánový produkt, ktorý je rozpustný v kultivačnom médiu. Predpokladá sa, že konverzia na formazán sa deje pomocou NADPH-dehydrogenas. Hlavnou výhodou MTS oproti XTT je jeho vyššia rozpustnosť a nižšia toxicita. Hlavnou nevýhodou MTS je nutná prítomnosť PMS pre jeho úspešnú redukciu v bunkách (Wang et al. 2010; Kuete et al. 2017).

WST-8 patrí k najpopulárnejším tetrazóliovým soliam, ktoré sa využívajú pre sledovanie životaschopnosti buniek. WST-8 je v prítomnosti mediátorov elektrónu, ako napríklad 1-metoxi-5-metylfenazínmetylsulfát, redukovaný pomocou NADPH dependentných dehydrogenas na formazán oranžového zafarbenia a je teda detekovaný spektrofotometricky (Chamchoy et al. 2019).

Cytotoxicita látok môže byť stanovená aj pomocou rôznych fluorescenčných farbív, ktoré sú v bunkách metabolizované na vysokofluorescenčné produkty. Najčastejšie používané fluorescenčné próby sú kalceín-AM a resazurín.

Kalceín-AM je rozpustné farbivo, ktoré voľne preniká do živých buniek cez ich neporušenú membránu rovnako dobre ako do mŕtvych buniek. Viabilné bunky sú metabolicky aktívne a tak sú schopné odštiepiť pomocou cytoplazmatických esteraz acetometoxy skupinu za vzniku zeleného vysokofluorescenčného produktu. Cytoplazmatické esterasy sa v mŕtvych bunkách nemôžu aktivovať, preto je ich možné rozlíšiť od viabilných buniek. Táto metóda je pomerne lacná, rýchla a jednoduchá. Jej hlavnou nevýhodou je jej použitie u adherentných buniek, nakoľko adhéncia môže blokovat' prestup kalceínu do buniek (Yang et al. 2002; Adan et al. 2016).

Resazurín, známy tiež pod názvom „*Alamar Blue*“ (alamárová modrá), je netoxické, fluorescenčné, vitálne farbivo. Táto zlúčenina preniká ľahko cez bunkovú membránu do intracelulárneho priestoru buniek. V metabolicky aktívnych, teda životaschopných bunkách, je pomocou mitochondriálnych reduktas metabolizovaný na vysokofluorescenčný produkt resofurín (Kueete et al. 2017; Adan et al. 2016).

### **1.1.2.3 Sledovanie obsahu ATP, proteas a proteínov v bunkách**

ATP je hlavným zdrojom energie pre živé organizmy a je produkovaný predovšetkým v mitochondriách. Stanovenie intracelulárnej hladiny ATP môže byť použité pre sledovanie viability buniek alebo cytotoxického efektu rôznych látok na bunky. ATP test je založený na monitorovaní levelu ATP pomocou bioluminiscenčnej detekcie. Exogénne pridaný substrát luciferín je v prítomnosti ATP a pridaného enzýmu luciferasy metabolizovaný na oxyluciferín, ktorý produkuje silnú luminiscenciu. Množstvo luminiscenčného svetla je priamo úmerné viabilite buniek (Riss et al. 2011; Adan et al. 2016).

K sledovaniu bunkovej viability môže byť použitá aj metóda, ktorá využíva aktivitu proteas. Pri strate integrity bunkovej membrány sú intracelulárnej proteasy uvoľnené do kultivačného média buniek. Proteasy možno rozdeliť do troch skupín a to cytoplazmatické, lyzozomálne a transmembránové proteasy. Proteasový test viability buniek je založený na detekcii rôznych proteolytických aktivít, ktoré sú asociované ako aj s intaktnými bunkami, tak aj s bunkami, ktoré stratili svoju membránovú integritu. To umožňuje simultánne meranie počtu viabilných a mŕtvych buniek v populácii buniek (Ong a Yang 2017; Adan et al. 2016). Metóda využíva fluorescenčný proteasový substrát glycyľfenylalanyl-aminofluorokumarín (GF-AFC), ktorý je schopný preniknúť do buniek. Tento substrát je používaný pre selektívnu detekciu proteasovej aktivity vo viabilných bunkách. Zo substrátu GF-AFC je v bunke pomocou cytoplazmatickej aminopeptidasy odštiepená aminokyselina glycín a fenylalanín. Vzniká tak fluorescenčný produkt aminofluorokumarín, pričom fluorescenčný signál je priamoúmerný viabilite buniek. Táto proteasa stráca aktivitu v prípade bunkovej smrti. V prípade straty integrity bunkovej membrány je do kultivačného média vylúčená ďalšia proteasa, ktorej aktivita je meraná pomocou fluorescenčného substrátu bis-alanylalanylfenylalanyl-rodamin 110 (bis-AAF-R110), ktoré nie je schopný preniknúť intaktnou bunkovou membránou. Nakoľko teda tento substrát nie je schopný preniknúť



do bunky, fluorescenčný signál, ktorý vznikne po štiepení tohto substrátu proteasami, ktoré boli uvoľnené do kultivačného média, je priamo úmerný počtu mŕtvych buniek v populácií (Adan et al. 2016).

Ďalším testom, ktorým je možné stanoviť cytotoxicitu látky je použitie kolorimetrickej metódy, ktorá využíva sulforodamín B (SRB). Táto metóda je založená na stanovení obsahu proteínov v bunkách. SRB sa pomerne ľahko viaže na proteínové komponenty buniek. SRB je jasno ružové, aminoxanténové farbivo s dvoma sulfónovými skupinami. Tieto skupiny sa viažu na zvyšky bázičných aminokyselín v mierne acidických podmienkach a následne disociujú v mierne bázičných podmienkach. Koncentrácia SRB je priamoúmerná počtu živých buniek (Vichai a Kirtikara 2006).

#### **1.1.2.4 Sledovanie apoptických zmien a aktivity kaspas**

Apoptóza alebo programovaná smrť bunky nastáva počas fyziologického vývoja a starnutia ako homeostatický mechanizmus pre udržanie bunkovej populácie v tkanivách. Môže sa však vyskytovať aj ako obranný mechanizmus pri rôznych imunitných reakciách alebo pri poškodení buniek nejakou patológiou po prípade exogénne pôsobiacimi škodlivými látkami (Elmore 2007).

Existujú dve základné apoptické cesty pre bunky obsahujúce jadro a to vonkajšia cesta a vnútorná alebo mitochondriálna cesta. Tieto cesty sa líšia predovšetkým v iniciačnej fáze, avšak potom sa stretávajú pri aktivácii prokaspasy 3, čo následne vedie ku aktivácii ďalších kaspas. Existuje 10 hlavných kaspas, ktoré sú rozdelené do 3 skupín a to iniciačné (kaspasa 2, 8, 9, 10), efektorové (kaspasa 3, 6, 7) a zápalové (kaspasa 1, 4, 5). Dôsledok apoptického procesu je fragmentácia DNA, degradácia cytoskeletálnych a jadrových proteínov, tvorba apoptických telies, expresia ligandov pre receptory fagocytov a na záver absorpcia poškodenej bunky fagocytárnymi bunkami (M. Martinez et al. 2010).

Apoptóza môže byť detekovaná viacerými prístupmi a to pomocou elektrónovej mikroskopie, využitím proteomických a genomických metód, spektroskopických techník, prietokovej cytometrie alebo rôznymi testami pre stanovenie aktivity kaspas. Pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie je možné predovšetkým sledovanie jednotlivých morfológických zmien charakteristických pre priebeh apoptózy. V prípade

použitia imunochemického farbenia je možné sledovanie aj rôznych chemických zmien v bunkách. V porovnaní s elektrónovou mikroskopiou, proteomické a genomické testy poskytujú výrazne väčšie množstvo informácií o priebehu apoptózy v bunkách.

Väčšina spektroskopických metód pre stanovenie apoptózy sa opiera o fluorescenčnú detekciu po prípade imunochemické značenie. Existuje viacero spektroskopických techník pre štúdium apoptózy a to hlavne TUNEL („*TdT-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling*“) test, farbenie pomocou anexínu V, detekcia kaspas alebo sledovanie potenciálu mitochondriálnej membrány. Metódou TUNEL je možné detekovať fragmentovanú DNA pomocou špecifického naviazania určitých molekúl na jedno- alebo dvojreťazcové zlomy DNA. Jej princípom je, že prostredníctvom terminálnej deoxynukleotidyl transferasy (TdT) je na 3'-OH koniec fragmentovanej DNA naviazaný analóg bázy. Týmto analógom je deoxyuridín trifosfát (dUTP), ktorý je najčastejšie značený biotínom. Biotinylovaný dUTP je možné detekovať pomocou streptavidín-peroxidasy a následne je vizualizovaný pomocou diaminobenzidínu, čo umožňuje sledovanie pomocou svetelnej mikroskopie, fluorescenčnými technikami alebo pomocou prietokovej cytometrie (Kyrylkova et al. 2012; M. Martinez et al. 2010)

Prietoková cytometria využíva najčastejšie značenie pomocou anexínu V. Jedná sa o proteín, ktorý sa viaže na fosfolipidy Ca-dependentným spôsobom. Vyznačuje sa vysokou afinitou k fosfatidylserínu (PS), čo je fosfolipid, ktorý je významnou zložkou bunkovej membrány a vyskytuje sa takmer výhradne na vnútornej stene membrány. Medzi prvé zmeny, ku ktorým dochádza v priebehu apoptózy je práve externalizácia PS na bunkový povrch, na ktorý sa následne anexín V naviaže. Pre detekciu neskorej fázy apoptózy po prípade už mŕtvych buniek sa v kombinácii s anexínom V používa aj 7-aminoaktinomycín D (7-AAD) alebo PI. Jedná sa o fluorescenčné látky, ktoré majú vysokú afinitu k DNA. Obe neprechádzajú cez neporušenú membránu. Do buniek sa dostávajú iba v prípade, že je bunková membrána narušená (Gillis et al. 2017; Zhang et al. 2017).

Kaspasy sú skupina proteas. Ku ich aktivácií dochádza kaskádovito a je jedným z prvých dejov, ktoré nastávajú počas apoptózy. Ich aktivitu je možné sledovať pomocou rôznych metód. Najčastejšie sa ich aktivita stanovuje pomocou prietokovej cytometrie za využitia rôznych substrátov, najčastejšie fluorescenčne značených. Tieto fluorescenčné próby môžu byť špecifické pre jednu alebo pre celú skupinu kaspas

(Telford et al. 2002; M. Martinez et al. 2010). Okrem fluorescenčných metód je možné stanovenie aktivity kaspas aj kolorimetricky. Najčastejšie sa takto stanovuje aktivita kaspasy 3, pričom sa využíva substrát acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid, ktorý je kaspasou 3 štiepený na p-nitroanilín, pričom vzniká žltozafarbený roztok (Ros et al. 2016). Aktivita kaspas môže byť stanovená aj pomocou rôznych protilátok. Tie sa viažu buď priamo na konkrétne kaspasy, alebo na jednotlivé produkty štiepenia kaspas. Z bunkového lyzátu sú proteíny prenesené na vhodnú membránu a gélovou elektroforézou separované a značené jednotlivými protilátkami (McStay a Green 2014).

#### **1.1.2.5 Sledovanie proliferácie buniek**

Testy založené na sledovaní bunkovej proliferácie je taktiež možné použiť k stanoveniu cytotoxických účinkov látok. Najčastejšie sa využíva klonogénny test. Strata reprodukčnej integrity buniek a schopnosti proliferácie patria k základným znakom bunkovej smrti. Klonogénny test je založený na schopnosti prežívajúcich buniek proliferovať a tvoriť kolónie. Pri tomto teste sú bunky nasadené do Petriho misiek v nízkom počte. Následne sú ovplyvnené nejakým inzultom a po dobu niekoľkých dní až týždňov sa sleduje schopnosť tvorby kolónií. Na konci experimentu sú kolónie ofarbené najčastejšie kryštálovou violetou a následne počítané. Krivka prežívanie buniek potom opisuje vzťah medzi koncentráciou použitej látky a prežívaním buniek (Munshi et al. 2005).

Sledovanie schopnosti buniek proliferovať a taktiež bunkovej smrti v reálnom čase je možné aj pomocou systému xCELLigence. Okrem bunkového rastu a smrti buniek je možné pomocou tohto systému sledovať aj zmeny morfológie, bunkovej migrácie a adhézie. Tento systém je založený na meraní elektrickej impedancie pomocou zlatých mikroelektród na dne každej jamky kultivačnej doštičky. Hodnota impedancie je vyjadrená ako bezrozmerná jednotka bunkový index (CI, z angl. „*cell index*“). CI poskytuje kvantitatívne údaje o biologickom statuse buniek vrátane ich životaschopnosti a morfológie. Meranie proliferácie buniek v reálnom čase poskytuje aj informácie a tom, kedy testovaná látka vyvolá cytotoxický účinok, čo sa prejaví poklesom hodnoty CI (Ke et al. 2011; Martinez-Serra et al. 2014).

### 1.1.3 Bunková smrť a oxidačný stres

Existujú dva základné typy bunkovej smrti, ktoré boli určené podľa rôznych bunkových, morfológických a biochemických vlastností, a to nekróza a apoptóza. Pri nekróze dochádza k lýze buniek dôsledkom určitého poškodenia. Dochádza k výraznému poškodeniu bunkovej membrány a vyliatiu bunkového obsahu do extracelulárneho priestoru. Ako bolo vyššie spomenuté apoptóza je regulovaná forma bunkovej smrti. Oba typy bunkovej smrti môžu byť spôsobené napr. zvýšenou koncentráciou rôznych voľných radikálov. Tie môžu byť generované endogénne alebo ako reakcia na určitý stres v prostredí, čo má za následok poškodenie buniek (Ryter et al. 2006).

Voľný radikál je definovaný ako molekula, ktorá obsahuje nepárový elektrón v atómovom orbitále. Prítomnosť nepárového elektrónu má za následok nestabilitu a vysokú reaktivitu voľných radikálov. Medzi najvýznamnejších zástupcov patria hydroxylový ( $\text{HO}\cdot$ ), alkoxylový ( $\text{RO}\cdot$ ), peroxylový ( $\text{ROO}\cdot$ ), superoxidový aniónový radikál ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), kyslíkový singlet ( $^1\text{O}_2$ ), oxidu dusnatý ( $\text{NO}$ ) a peroxyinitritový anión ( $\text{ONOO}^-$ ). Voľné radikály teda možno rozdeliť na reaktívne formy kyslíku (ROS) alebo dusíku (RNS) (Lobo et al. 2010).

ROS vznikajú ako bežné medziprodukty fyziologického aeróbného metabolizmu buniek a v nižších koncentráciách zohrávajú dôležitú úlohu v intracelulárnych signálnych dráhach a homeostáze, v bunkovej smrti, ochrane organizmu pred rôznymi patogénmi. Okrem endogénnej produkcie však môže byť ich vznik u človeka indukovaný rôznymi exogénnymi zdrojmi ako je UV žiarenie, ionizujúce žiarenie, životný štýl, stres, fajčenie alebo rôzne chemické látky. Bunky ľudského tela sú vybavené rôznymi antioxidantnými mechanizmami, ktoré sú schopné regulovať hladinu voľných radikálov a udržiavajú tak správnu fyziologickú funkciu. Existuje však stav, ktorý je známy pod pojmom oxidačný stres. Tento stav vzniká v prípade, že dochádza k nadmernej produkcii voľných radikálov, ktoré môžu ďalej poškodzovať rôzne makromolekuly v tele ako proteíny, lipidy a nukleové kyseliny (Katerji et al. 2019).

$\text{NO}$  zohráva taktiež významnú fyziologickú úlohu v organizme, avšak jeho nadmerná produkcia môže byť spojená s rôznymi patofyziologickými stavmi. V biologickom systémech je zdrojom RNS práve  $\text{NO}$ . Jednou z hlavným ciest tvorby

RNS v organizme je reakcia NO s rôznymi voľnými radikálmi. Najvýznamnejšou je práve reakcia so  $O_2\cdot^-$ , ktorá vedie ku formácii  $ONOO^-$ , ktorý je pomerne nestabilný. Z tohto dôvodu môže dochádzať ku jeho interakcii s rôznymi biomolekulami ako sú lipidy, tioly, bázy DNA ale aj nízkomolekulové antioxidanty. Tieto procesy môžu viesť k následnej cytotoxicite (Patel et al. 1999). Sledovanie oxidačného stresu je možné pomocou viacerých prístupov. Najčastejšie je využívané priame stanovenie voľných radikálov a stanovenie produktov oxidačného poškodenia (Katerji et al. 2019).

### 1.1.3.1 Možnosti stanovenia voľných radikálov

Najjednoduchšou cestou, ktorá umožňuje sledovať oxidačný stres, je priame stanovenie voľných radikálov pomocou použitia rôznych fluorescenčných sond, ktoré možno rozdeliť na nešpecifické a špecifické sondy. Okrem fluorescenčných sond je možné využitie aj rôznych kolorimetrických metód.

Najčastejšie používanou fluorescenčnou próbou je 2,7-dichlorodihydrofluoresceín diacetát (DCF-DA). Jedná sa o nešpecifickú sondu, ktorá preniká do buniek cez membránu. Pomocou tohto fluorescenčného farbiva je možné stanovenie celého spektra voľných radikálov, ako napr.  $HO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $ROO\cdot$  radikály, po prípade  $ONOO^-$ . Farbivo je schopné pasívne prenikať do buniek, kde je následne deacetylované cytoplazmatickými esterázami na nefluorescenčnú látku. V prípade prítomnosti reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (RONS) je táto látka oxidovaná na dichlorofluoresceín (DCF). DCF vykazuje vysokú fluorescenciu, pričom intenzita fluorescencie je priamo úmerná intracelulárnej hladine RONS (Gomes et al. 2005; Yazdani 2015).

Ďalšou nešpecifickou fluorescenčnou sondou je dihydrorodamín 123. Vďaka svojim lipofilným vlastnostiam môže jednoducho prenikať cez bunkové membrány do intracelulárneho priestoru. Okrem detekcie  $H_2O_2$ , ku ktorej je však potrebná prítomnosť peroxidasy, je možné sledovať aj hladinu  $ONOO^-$  po prípade kyseliny hypochlórnej ( $HOCl$ ) (Winterbourn 2014; Gomes et al. 2005).

K nešpecifickým fluorescenčným sondám je možné zaradiť aj 3'-(*p*-aminofenyl) fluoresceín (APF) a 3'-(*p*-hydroxyfenyl) fluoresceín (HPF). Sonda APF je nefluorescenčné farbivo, ktoré umožňuje stanovenia  $HO\cdot$ ,  $HOCl$ ,  $ONOO^-$  alebo  $ROO\cdot$ . APF môže byť transformované na fluorescenčnú formu pomocou  $H_2O_2$  v prítomnosti chrovej peroxidasy (HRP). Nefluorescenčné farbivo HPF je premenené na

vysokofluorescenčný produkt v prítomnosti HO• alebo ONOO<sup>-</sup>. HPF sa však vyznačuje vyššou špecifitou k HO•, pričom intenzita fluorescencie produkovanej reakciou farbiva a spomenutých voľných radikálov je 6-krát vyššia práve v prípade prítomnosti voľného radikálu HO• (Tomizawa et al. 2005; Cohn et al. 2009).

K najčastejšie používaným špecifickým fluorescenčným sondám sa radí dihydroetidium (5-ethyl-5,6-dihydro-6-phenyl-3,8-diaminophenanthridine, DHE). Pomocou tohto farbiva je možné stanoviť O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Táto hydrofóbná zlúčenina je schopná prenikať extra- a intracelulárnymi membránami. Farbivo v bunke podlieha v prítomnosti voľného radikálu dvojelektrónovej oxidácií za vzniku fluorescenčného produktu etídium (Kalyanaraman et al. 2012; Yazdani 2015). K sledovaniu O<sub>2</sub><sup>•-</sup> možno použiť aj fluorescenčnú sondu 2-(2-pyridil)-benzothiazolín, ktorá je práve v prítomnosti O<sub>2</sub><sup>•-</sup> metabolizovaná na vysokofluorescenčný produkt 2-(2-pyridil)-benzotiazol (Gomes et al. 2005).

Pomocou fluorescenčného farbiva 1,3-difenylišobenzofuran (DPBF) je možné stanoviť taktiež O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Okrem toho radikálu je možné stanovenia aj <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. DPBF silno absorbuje svetlo okolo vlnovej dĺžky 410 nm a emituje svetlomodrú fluorescenciu pri vlnovej dĺžke 458 nm. V prítomnosti <sup>1</sup>O<sub>2</sub> dochádza ku kvantitatívnej reakcii za vzniku *o*-dibenzoylbenzénu, ktorý následne narušuje systém  $\pi$ -izobenzofuran, čo má za následok neschopnosť absorpcie svetla a následnej emitácie. Z tohto dôvodu je zníženie intenzity fluorescencie priamo úmerné vygenerovanému množstvu <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Zhang a Li 2011).

K sledovaniu hladiny <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sú dostupné aj následné tri fluorescenčné próby, a to 9,10-dimetylantracén (DMA), 9-[2-(3-carboxy-9,10-difeny)antryl]-6-hydroxy-3H-xanten-3-on (DPAX) a 9-[2-(3-Carboxy-9,10-dimetyl)antryl]-6-hydroxy-3H-xanten-3-on (DMAX) (Gomes et al. 2005).

K stanoveniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je možné použitie prirodzene vyskytujúcej sa fluorescenčnej látky skopoletín (7-hydroxy-6-methoxy-kumarín). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v prítomnosti HRP alebo katalasy vytvára komplex, ktorý je schopný oxidovať skopoletín za vzniku nefluorescenčného produktu. Pokles intenzity fluorescencie je teda v korelácii s koncentráciou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wu et al. 2018).

Hladinu  $H_2O_2$  je možné stanoviť za pomoci *N*-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazínu („*Amplex Red*“). Jedná sa o nefluorescenčnú látku, ktorá je v prítomnosti HRP a  $H_2O_2$  metabolizovaná na vysokofluorescenčný produkt resofurín. Toto fluorescenčné farbivo môže byť použité aj na stanovenie  $O_2^{\bullet-}$  za využitia superoxididismutasy, ktorá metabolizuje  $O_2^{\bullet-}$  na  $H_2O_2$  (Votyakova a Reynolds 2004; Gomes et al. 2005).

Kyselina homovanilová [kyselina (4-hydroxy-3-metoxyfenyl) octová] predstavuje dôležitý metabolit dopamínu v mozgu. Jedná sa o nefluorescenčnú molekulu, z ktorej reakciou s  $H_2O_2$  v prítomnosti HRP vzniká fluorescenčný dimér (Werner 2003; Gomes et al. 2005).

Najčastejšie využívanou fluorescenčnou sondou pre detekciu NO je 4,5-diaminofluoresceín diacetát (4,5-DAF). Toto farbivo preniká do buniek, kde je účinkom cytoplazmatických esteraz hydrolyzované za odštiepenia diacetátových skupín. Vzniká nefluorescenčný produkt 4,5-diaminofluoresceín, ktorý je následne v prítomnosti NO nitrozovaný a tvorí tak vysokofluoreskujúci produkt triazolofluoresceín. Ďalšou sondou, ktorú možno použiť pre sledovanie formácie NO, je 2,3-diaminonaftalén (2,3-DAN). Nefluorescenčná sonda reaguje pomerne rýchlo s  $N_2O_3$ , ktorý vzniká pri interakcii NO s kyslíkom alebo z kyseliny dusitej. Pri tejto reakcii dochádza ku vzniku vysokofluorescenčného produktu 2,3-naftotriazolu (Bryan a Grisham 2007). Okrem vyššie spomenutých fluorescenčných sond je pre detekciu NO známe aj využitie kolorimetrickej metódy. Táto metóda využíva dvojkrokovú diazotačnú Griessovu reakciu. Dusitany prítomné v kultivačnom médiu reagujú so sulfanylamidom v kyslom prostredí, čím sa vytvorí prechodná diazoniová soľ. Tá ďalej reaguje s kopulačným činidlom *N*-naftyletyléndiamínom za vzniku azozlúčeniny, ktoré je možné detekovať spektrofotometricky (Griendling et al. 2016).

### 1.1.3.2 Možnosti stanovenia markerov oxidačného stresu

Biomarkery oxidačného stresu sú charakterizované ako molekuly, ktoré môžu byť modifikované po interakcii s ROS alebo RNS a tiež molekuly antioxidačného systému, ktoré sa menia v súvislosti s odpoveďou na zvyšujúci sa oxidačný stres.

Jedným z mechanizmov, ktorým oxidačný stres môže spôsobiť poškodenie buniek, je lipidová peroxidácia. Lipidy sú pomerne citlivé k oxidačnému poškodeniu a to hlavne z dôvodu ich molekulovej štruktúry, ktorá je bohatá na vysokoreaktívne dvojité väzby.

Najčastejšie sledovanými markermi lipidovej peroxidácie sú isoprostany a malondialdehyd (MDA) (Ho et al. 2013). Isoprostany sú stabilné prostaglandínové produkty peroxidácie lipidov, ktoré sú tvorené pri oxidačnom poškodení polynenasýtených mastných kyselín. Ako marker oxidačného stresu sa najčastejšie stanovujú v plazme alebo v moči pomocou rôznych chromatografických metód (Labuschagne et al. 2013).

V bunkových lyzátoch sa najčastejšie stanovuje MDA ako marker lipidovej peroxidácie. MDA môže byť stanovený pomocou reaktívnych molekúl kyseliny tiobarbiturovej (TBARS). V bunkovom lyzáte po prípade v kultivačnom médiu reaguje MDA s kyselinou tiobarbiturovou za vzniku fluorescenčných produktov (Potter et al. 2011). Okrem tejto metódy možno stanoviť MDA v bunkových lyzátoch aj pomocou rôznych chromatografických metód doplnené detekciou za použitia hmotnostnej spektrometrie (Vanova et al. 2018a).

Cieľom pôsobenia voľných radikálov sú aj proteíny. Voľné radikály pôsobia najčastejšie na jednotlivé aminokyseliny, čo má za následok stratu biologickej funkcie celého proteínu. K hlavným produktom oxidačného poškodenia proteínov možno zaradiť karbonylové deriváty a nitroproteíny. Detekcia karbonylových derivátov môže byť uskutočnená pomocou viacerých metód, pričom väčšina sa opiera o derivatizáciu karbonylovej skupiny. Najčastejšie používaným postupom pre detekciu proteínových karbonylov je ich derivatizácia s 2,4-dinitrofenylhydrazínom s následnou detekciou spektrofotometrickými alebo fluorescenčnými metódami, vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou, alebo použitím anti-DNP protilátok v imunoblottingu, po prípade pomocou enzýmovej imunoanalýzy (Weber et al. 2015).

Nitrácia tyrozínu je jedna z najbežnejších posttranslačných modifikácií, ktorá je asociovaná s oxidačným stresom. Pri nitrácii tyrozínu zohráva najdôležitejšiu úlohu  $\text{ONOO}^-$ . Detekcia a kvantifikácia nitrotyrozínu môže byť uskutočnená celým spektrom metód, ku ktorým možno zaradiť imunoanalýzu, spektrofotometriu, plynovú alebo vysokoúčinnou kvapalinovú chromatografiu s následnou absorpčnou, fluorescenčnou, elektrochemickou alebo hmotnostnou detekciou (Yang et al. 2010).

K oxidačnému poškodeniu sú rovnako citlivé aj nukleové kyseliny. Vplyvom  $\text{HO}\cdot$  dochádza k deštrukcii sacharidu v DNA, čo má za následok rozpletenie dvojzávitnice



DNA. Tento radikál je schopný reakcie s purínovými a pyrimidínovými bázami. Dochádza pritom k oxidácii za vzniku hydroxyderivátov a oxoderivátov. Za najzávažnejšie poškodenie DNA vplyvom oxidačného stresu možno považovať oxidáciu guanínu v polohe C8, pričom vzniká 8-hydroxydeoxyguanosín (8-oxodG) s následným vznikom rôznych mutácií. Práve 8-oxodG je najčastejším markerom oxidačného poškodenia DNA (Lee a Pervaiz 2011). Tento marker je možné stanoviť viacerými metódami. Najčastejšie sa pritom využívajú rôzne chromatografické prístupy najčastejšie v kombinácii s hmotnostnou spektroskopiou. Okrem nich je možné použitie imunofluorescenčnej metódy s následnou konfokálnou mikroskopiou, rôzne PCR techniky a použitie kometovej analýzy (Soultanakis et al. 2000; Ravanat et al. 1998; Gonzalez-Hunt et al. 2018).

#### **1.1.4 Vývoj potenciálnych liečiv a antidot na pracovišti**

Vývoj nového liečiva možno opísať ako proces, pomocou ktorého je identifikovaná nová chemická entita, ktorá má potenciál stať sa látkou s rôznym terapeutickým účinkom. Tento proces možno rozdeliť na dva základné časti, a to preklinické a klinické testovanie (Sinha a Vohora 2018). Dôležitou súčasťou preklinického testovania potenciálnych liečiv práve využitie rôznych *in vitro* prístupov, ktoré zahŕňujú okrem sledovania funkčných vlastností novej chemickej entity aj stanovenia cytotoxicity daných látok alebo vplyv na oxidoredukčnú rovnováhu buniek (Andrade et al. 2016).

Hlavným zameraním Katedry toxikologie a vojenskej farmacie (KTVF) sú rôzne modulátory aktivity AChE. Jedná sa predovšetkým o reaktivátory (rAChE) a inhibítory AChE (iAChE). Počas riešenie predkladanej dizertačnej práce sme sa zamerali na *in vitro* charakterizáciu týchto modulátorov pomocou ich interakcie z rôznymi typmi bunkových kultúr.

## **1.2 Látky modulujúce aktivitu AChE**

### **1.2.1 Acetylcholinesterasa**

AChE je s ohľadom na svoju rýchlostnú konštantu jeden z najúčinnějších enzýmov nervového systému, ktorý sa sústreďuje predovšetkým na cholinergných synapsiách (ChS) a neuromuskulárnych spojeniach. Hlavnou biologickou úlohou tohto enzýmu je terminácia nervového impulzu na ChS a to rýchlou hydrolýzou neurotransmiteru

acetylcholínu (ACh) na cholín a acetát (Tripathi a Srivastava 2010; Sussman a Silman 1992). U človeka je AChE kódovaná génom, ktorý je lokalizovaný na dlhom ramene chromozómu 7 v pozícii q22 (Getman et al. 1992). Gén pre AChE môže produkovať niekoľko kódujúcich sekvencií, ktoré sa líšia alternatívnou voľbou akceptorového zostrihového miesta v oblasti 3'. Na základe tohto procesu môžu byť vytvorené rôzne izoformy AChE, ktoré sú označované ako AChE<sub>R</sub>, AChE<sub>H</sub> a AChE<sub>T</sub>. Tieto izoformy obsahujú rovnakú katalytickú doménu, ale odlišnú C-terminálnu doménu (Chen et al. 2011). AChE<sub>R</sub> je rozpustný monomér, ktorý je v mozgu regulovaný stresovými podmienkami. Fyziologicky sa v mozgu myši vyskytuje len vo veľmi malom množstve, avšak v stresových podmienkach alebo po otravách somanom, dochádza ku zvýšenej expresii (približne 3-násobnej; Perrier et al. 2006). AChE<sub>H</sub> sa viaže s glykofosfatidylinozitolom a je hlavne exprimovaná v červených krvinkách. Jej výskyt bol sledovaný aj v hrubom čreve (Chen et al. 2011; Montenegro et al. 2006). Izoforma AChE<sub>T</sub> sa môže v organizme vytvárať homooligoméry a to solubilné amfifilné monoméry (G1a), diméry (G2a) alebo tetraméry (G4a) a taktiež neamfifilné tetraméry (G4na). Ďalšou skupinou sú heterooligoméne formy. V nervovosvalových platničkách sa vyskytuje asymetrická forma, ktorá sa skladá z kotviaceho proteínu kolagénu Q (ColQ) a zo 4 (A4), 8 (A8) alebo 12 (A12) podjednotiek AChE<sub>T</sub>. Predovšetkým v nervovej sústave sa vyskytujú komplexy tetramérnych globulárnych foriem spolu s kotviacim transmembránovým proteínom PRiMA (z angl. „*proline-rich membrane anchor*“; Massoulié 2002; Chen et al. 2011).

3D štruktúra AChE bola prvý krát popísaná Sussmanom v roku 1991 na proteíne izolovanom z *Torpedo californica* (Sussman et al. 1991). Štruktúra katalytickej domény AChE z rôznych druhov ako je *T. californica*, myš alebo človek je veľmi podobná (Tripathi a Srivastava 2010). AChE je serínová hydrolasa, ktorá patrí do rodiny esteraz u vyšších eukaryotov, pričom enzýmy tejto rodiny pôsobia na rôzne estery karboxylových kyselín (Gupta 2009). Monomér enzýmu má molekulovú hmotnosť približne 6 kDa. Jedná sa o elipsoidnú molekulu o veľkosti približne 45Å × 60Å × 65Å, ktorá sa skladá z 12 centrálnych β-skladaných listov obklopených 14 α-hélixovými štruktúrami (Sussman a Silman 1992; Tripathi a Srivastava 2010). Katalytické miesto enzýmu je lokalizované približne 4 Å od dna rovnej priehlbiny hlbkej ~ 20 Å a pozostáva z dvoch podjednotiek a to anionickej a esteratickej.

Anionická podjednotka je nenabitá a lipofilná. Viaže kvartérny amín cholínovej skupiny ACh, rôzne kvartérne ligandy ako napríklad edrofónium a taktiež oxímy, ktoré reaktivujú AChE inhibovanú organofosfátom. Kationové substráty nie sú viazané záporne nabitou aminokyselinou v aniónovom mieste, ale interakciou 14 aromatických zvyškov, ktoré lemujú priehlbnu vedúcu k aktívnemu miestu enzýmu. Spomedzi aromatických aminokyselín je rozhodujúci tryptofán 84 a jeho nahradenie alanínom spôsobuje 3000-násobné zníženie aktivity enzýmu (Čolović et al. 2013). Esteratická podjednotka je zodpovedná za hydrolýzu ACh na cholín a acetát a obsahuje katalytickú triádu troch aminokyselín, a to Ser203, His447 a Glu334 (Zhou et al. 2010).

Význam AChE pramení vo fakte, že je cieľovým enzýmom pre mnohé liečivá napr. na Alzheimerovu chorobu (AD) alebo iné neurodegeneratívne ochorenia a taktiež pre chemické bojové látky – nervovoparalytické látky (NPL) – a organofosforové (OP) pesticídy, u ktorých sa ako antidota využívajú práve rAChE (Tripathi a Srivastava 2010; Dawson 1994).

### **1.2.2 Reaktivátory AChE**

rAChE zohrávajú dôležitú úlohu v terapii otráv NPL alebo OP pesticídmi. NPL sú vysoko toxické OP zlúčeniny, ktorých základným mechanizmom toxicity je ireverzibilná inhibícia AChE a tým pádom následná akumulácia ACh na cholinergných synapsiách. Hromadenie ACh na synapsiách vedie ku cholinergnej hyperstimulácií a dlhotrvajúcej stimulácií muskarínových a nikotínových ACh receptorov. Príznaky otravy možno rozdeliť na muskarínové, nikotínové a centrálné. K muskarínovým symptómom možno zaradiť: diarrehu, miózu, bronchospazmus, slzenie, slinenie a iné. Stimulácia nikotínových receptorov vedie k tachykardii, vysokému krvnému tlaku, svalovým fascikuláciám až k paralýze dýchacích svalov. Centrálnymi príznakmi sú najčastejšie nepokoj, kóma, kŕče. Smrť najčastejšie nastáva v dôsledku respiračnej nedostatočnosti, generalizovaných kŕčov alebo multiorgánového zlyhania (Kassa et al. 2008b; Lorke a Petroianu 2019).

Oxímové reaktivátory boli objavené v 2. polovici 20. storočia. V 50. rokoch Wilson poukázal na to, že hydroxylamín a kyselina nikotínhydroxámová sú schopné reaktivovať dietylfosforylovanú AChE (Wilson 1951; 1952; Mercey et al. 2012). Tieto informácie rýchlo viedli k objavu ďalších látok, a to hlavne kvartérnych

heteroaromatických zlúčenín, ktoré vo svojej molekule obsahujú oxímovú skupinu (Musilek et al. 2011). rAChE využívané v klinickej aplikácii možno rozdeliť do dvoch skupín. Sú nimi monopyridíniové a bispyridíniové reaktívatory. V súčasnosti je jediným monopyridíniovým oxímom využívaným v klinickej praxi pralidoxím (2-PAM). Zo skupiny bispyridíniových oxímov sú najvýznamnejšie trimedoxím (TMB-4), obidoxím (LüH-6), metoxím (MMB-4) a asoxím (HI-6, Jokanović 2009; Žunec et al. 2015).

V roku 1955 v USA bol prvý krát syntetizovaný 2-PAM. Tento rAChE je schopný reaktivovať AChE inhibovanú sarínom alebo látkou VX, avšak v prípade otravy somanom alebo tabunom je tento reaktívator neúčinný (Wilson a Ginsburg 1955; Jokanović a Stojiljković 2006; Gupta 2009). TMB-4 bol prvý krát pripravený taktiež v USA roku 1957. Bola sledovaná jeho účinnosť reaktivovať AChE u experimentálnych zvierat otrávených tabunom, sarínom alebo látkou VX. V prípade intoxikácie somanom bol aj tento rAChE neúčinný (Gupta 2009; Jokanović a Stojiljković 2006). Nemecko predstavilo v roku 1964 ďalší bispyridíniový reaktívator – LüH-6. Pri rôznych *in vivo* experimentoch bola sledovaná účinnosť reaktivovať AChE inhibovanú tabunom, sarínom a látkou VX. V porovnaní s TMB-4 je LüH-6 účinnejším rAChE v prípade intoxikácie tabunom (Heilbronn a Tolagen 1965; Jokanović a Stojiljković 2006). Hobbiger a Sadler v roku 1959 prvý krát predstavili molekulu MMB-4 (Hobbiger a Sadler 1959). V porovnaní s TMB-4 je MMB-4 účinnejší pri otravách sarínom a somanom (Marrs et al. 2007). Posledným bispyridíniovým rAChE používaným v praxi je HI-6. Tento reaktívator bol prvý krát syntetizovaný vo Freiburgu Hagedornom, Schoeneom and Starkom v roku 1966 (Eyer a Hell 1985; Kepner a Wolthuis 1978). Tento oxím je najefektívnejším v reaktivácii AChE inhibovanej somanom. U viacerých druhov laboratórnych zvierat bola dokázaná jeho účinnosť reaktivovať AChE inhibovanú sarínom a látkou VX. V prípade intoxikácie tabunom je však HI-6 neúčinný (Antonijevic a Stojiljkovic 2007; Jokanović a Stojiljković 2006).

Doposiaľ nebol syntetizovaný žiaden oxímový reaktívator, ktorý by vykazoval zrovnateľnú účinnosť voči všetkým NPL a OP pesticídom (Jokanović a Prostran 2009). Z tohto dôvodu sa laboratória po celom svete snažia syntetizovať nové rAChE. K-oxímy, ktoré boli syntetizované na KTVF, Fakulty vojenského zdravotníctví Univerzity obrany v Brně (FVZ UO) sa javia ako sľubné reaktívatory inhibovanej AChE rôznymi

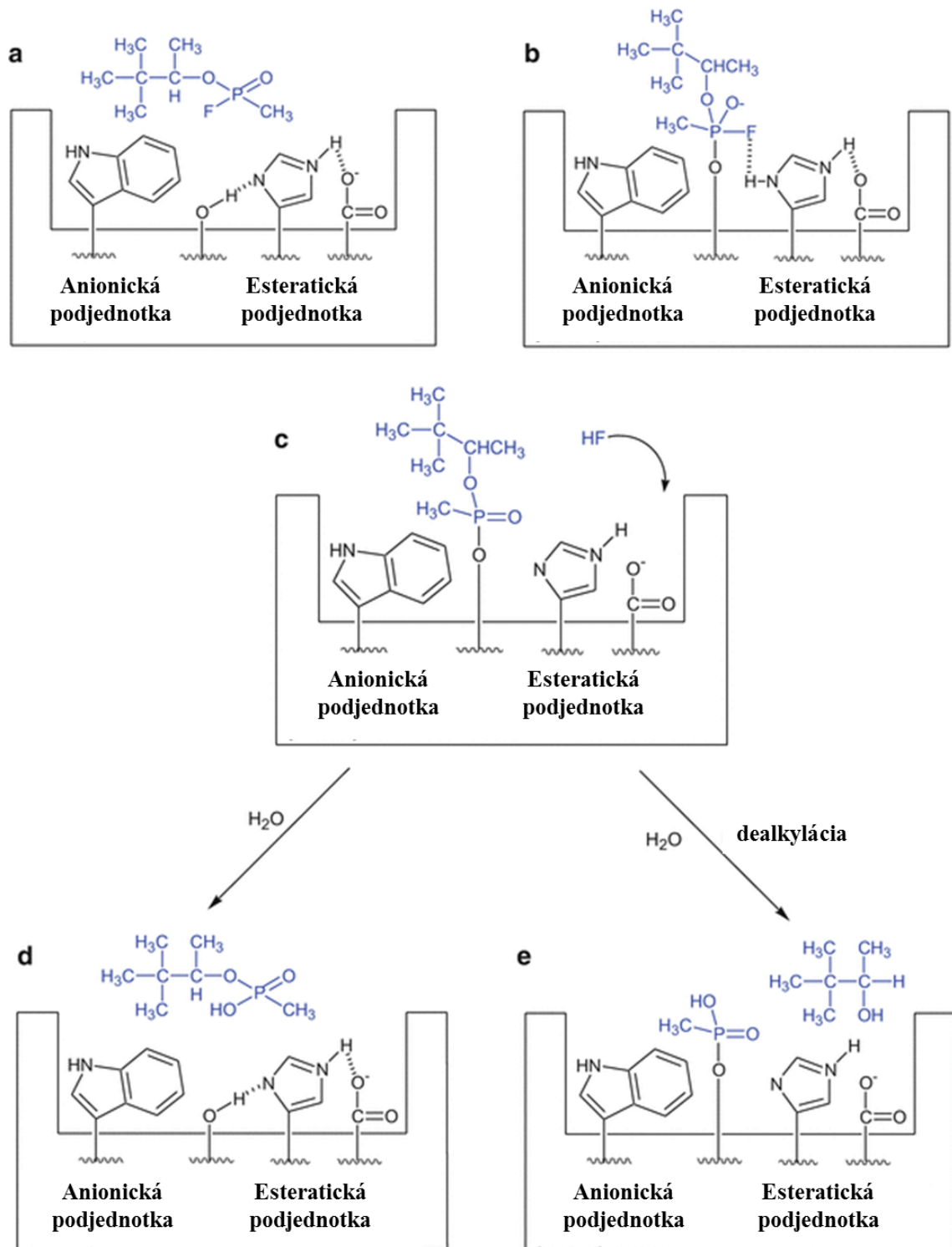
NPL (Antonijević a Stojiljković 2007; Kassa et al. 2008a; Žunec et al. 2015; Kuca et al. 2015).

### 1.2.2.1 Mechanizmus reaktivácie inhibovanej AChE

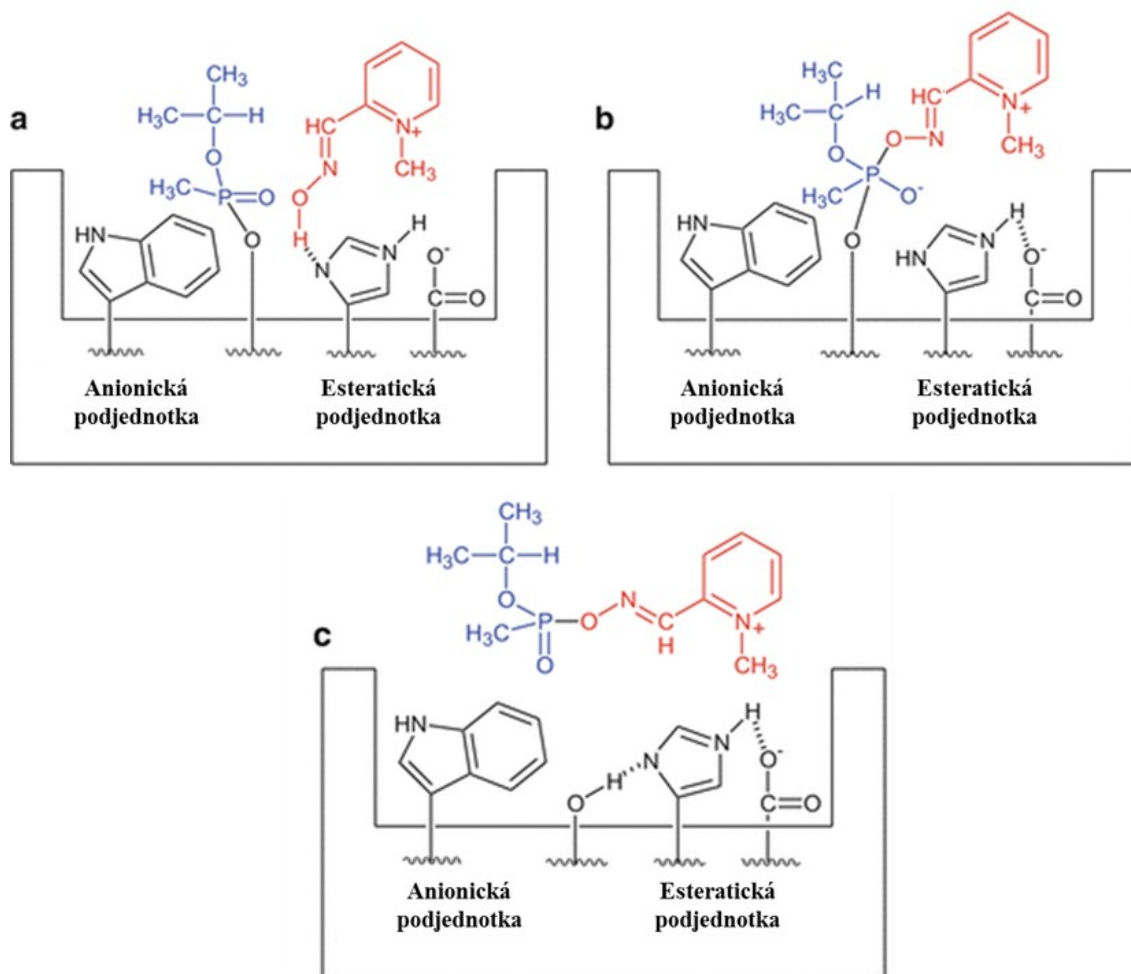
Katalytický mechanizmus AChE pozostáva z dvoch krokov. V prvom kroku dochádza acetylácií, pričom Ser203 atakuje acetylovú skupinu ACh a následne vzniká acetylovaný enzým a dochádza k uvoľneniu cholínu. V ďalšom kroku je acetylovaný enzým hydrolyzovaný, pričom dôjde k rozkladu na enzým a kyselinu octovú. Tento mechanizmus je veľmi účinný, pričom každá molekula AChE dokáže hydrolyzovať viac ako  $10^4$  molekúl ACh za sekundu (Mercey et al. 2012).

V prípade intoxikácie OP zlúčeninou je hydroxylová skupina Ser203 v aktívnom mieste fosforylovaná spôsobom analogickým acetylácií enzýmu. Na rozdiel od acetylovaného enzýmu je fosforylovaný enzým vysoko stabilný, ireverzibilne inhibovaný a neschopný vykonávať svoju fyziologickú funkciu (Fukuto 1990). Pri inhibícií AChE nejakou OP zlúčeninou môže veľmi pomaly dochádzať k spontánnej reaktivácií alebo môže postupne dochádzať k „stárnutiu“ enzýmu (obrázok 1). V druhom prípade dochádza k dealkylácií komplexu organofosfát-serín, po ktorej nie je možná prípadná reaktivácia AChE pomocou oxímových reaktivátorov (Vale 2016).

V prípade, že ešte nedošlo k procesu stárnutia enzýmu, je možné použiť práve rAChE. Mechanizmus reaktivácie AChE pomocou oxímových reaktivátorov (obrázok 2) spočíva v nukleofilnom ataku hydroxyiminometylovej, teda oxímovej skupiny oproti OP zvyšku na fosforylovanej AChE. Tento proces vedie k štiepeniu vzniknutej kovalentnej väzby medzi OP zlúčeninou a serínom v aktívnom mieste, pričom vzniká komplex organofosfát-reaktivátor (fosforylovaný oxím) a enzým, ktorý je schopný plniť ďalej svoju fyziologickú funkciu (Čolović et al. 2013).



Obrázok 1 - Schéma inhibície AChE sománom (b, c) a následná spontánna reaktivácia (d) alebo „stárnutie“ enzýmu. Modifikované podľa (Vale 2016)



Obrázok 2 - Mechanizmus reaktivácie AChE inhibovanej sarínom pomocou 2-PAM. a) inhibovaná AChE sarínom – vznik kovalentnej väzby medzi serínom a sarínom. Pri reaktivácii dochádza ku vzniku vodíkovej väzby medzi histidínom a 2-PAM. b) vznik nestabilného komplexu medzi inhibovaným enzýmom a oxímom. c) 2-PAM sa naviaže na isopropyl metylfosfonylový zvyšok a enzým je reaktivovaný. Modifikované podľa (Vale 2016)

### 1.2.2.2 Vzťah medzi štruktúrou a účinnosťou rAChE

Existujú rôzne štruktúrne aspekty, ktoré majú vplyv na schopnosť látky reaktivovať inhibovanú AChE. Možno ku nim zaradiť prítomnosť kvartérneho dusíka, prítomnosť oxímovej skupiny, dĺžku a charakter spojovacieho reťazca.

Kvartérny dusík je zodpovedný za afinitu rAChE ku samotnému enzýmu. Tento dusík interaguje pomocou neväzbových interakcií s anionickou časťou enzýmu v aktívnom mieste. Z tohto dôvodu majú rAChE schopnosť kompetitívne inhibovať AChE, avšak iba v pomerne vysokých koncentráciách. Prítomnosť kvartérneho dusíka

v molekule má rovnako vplyv aj na ich farmakokinetiku. Ovplyvňuje hlavne schopnosť penetrovat' cez hematoenfecalickú bariéru (BBB) do mozgu (Kuca et al. 2006; Patočka et al. 2005).

Oxímová skupina je nukleofil, ktorý je schopný deprotonovať v závislosti na okolnom pH na oximátový anión. Ten je zodpovedný práve za reaktivačný proces. V štruktúre reaktivátora môže figurovať viacej oxímových skupín, avšak bolo zistené, že nie počet oxímových skupín, ale práve ich poloha na pyridiniovom kruhu má vplyv na schopnosť reaktívacie inhibovaného enzýmu. Najlepšou polohou oxímovej skupiny na pyridiniovom kruhu je poloha 2 alebo 4 (Bajgar 2009; De Paula et al. 2018).

V prípade dĺžky spojovacieho reťazca sa ukázalo, že práve spojovací reťazec o dĺžke 3C alebo 4C u biskvartérnych reaktivátorov sa javil ako najúčinnjší. V prípade dĺžky postranného reťazca u monokvartérnych reaktivátorov bola sledovaná najvýraznejšia reaktivačná účinnosť u látok s najkratším postranným reťazcom (metyl). Prítomnosť dvojitej väzby v spojovacom reťazci rovnako ako aj rôznych heteroatómov môže mať vplyv na reaktivačný potenciál oxímov (Bajgar 2009; Patočka et al. 2005).

### 1.2.3 Inhibítory AChE

iAChE je možné rozdeliť do dvoch skupín, a to reverzibilné a ireverzibilné inhibítory. Mechanizmus účinku ireverzibilných iAChE bol spomenutý v predchádzajúcej kapitole. Reverzibilné inhibítory možno rozdeliť ďalej na kompetitívne, nekompetitívne a látky kombinujúce oba typy inhibície. Väčšinou majú rôznu terapeutickú aplikáciu, po prípade je možné ich použiť ako profylaktika proti otravám NPL alebo iných OP zlúčenín. K týmto inhibítoram možno zaradiť zlúčeniny s rôznymi funkčnými skupinami ako je karbamátová, kvartérna alebo terciárna amóniová skupina (Čolović et al. 2013).

Pyridostigmín patrí do skupiny karbamátových pseudoreverzibilných iAChE. Pre tento inhibítor je charakteristická kvartérna amóniová štruktúra. Z tohto dôvodu nie je pyridostigmín schopný prenikať bunkovou membránou ani prechádzať cez BBB. Najčastejšie sa používa pri liečbe autoimunitného ochorenia *myasthenia gravis*. Okrem inhibičných vlastností je schopný aj zvýšenej aktivácie cholinergných nikotínových receptorov. Pyridostigmín sa veľmi často používa aj ako profylaktikum proti otravám



NPL (Anderson a Pope 2017; Čolović et al. 2013; Pellegrini et al. 2000; Nair a Hunter 2004; Petrov et al. 2018).

V terapii AD sa využívajú rôzne reverzibilné iAChE. Možno k nim zaradiť predovšetkým donepezil, rivastigmín, galantamín a takrín.

Donepezil je piperidínový derivát a jedná sa o selektívny iAChE, ktorý je schopný sa viazať na periférne aniónové miesto. Okrem anticholinergného mechanizmu sa donepezil vyznačuje aj ďalšími noncholinergnými mechanizmami. Je schopný zvyšovať citlivosť nikotínových receptorov v kortikálnych neurónoch, čo potencie jeho neuroprotektívne účinky a taktiež má vplyv na ukládanie amyloidných plakov (Kumar a Sharma 2020).

Rivastigmín je karbamátový iAChE vyznačujúci sa prolongovanou inhibíciou. Pomerne ľahko preniká cez BBB. Viaže sa na esteratickú časť aktívneho miesta enzýmu. Rivastigmín je neselektívny a nekompetitívny inhibítor, ktorý okrem AChE inhibuje aj enzým butyrylcholinesterasu (BChE, EC 3.1.1.8). Okrem terapie AD sa rivastigmín pomerne často využíva aj pri demencii asociovej s Parkinsonovou chorobou (Čolović et al. 2013; Aracava et al. 2009). Okrem toho bolo sledované, že rivastigmín je účinný aj pri znížení poškodenia kognitívnych funkcií pri traumatickou poškodení mozgu. Lavon et al. (2015) testovali bezpečnosť rivastigmínu pre profylaktické podanie proti otravám spôsobených OP zlúčeninami, jeho farmakokinetiku a farmakodynamiku na skupine 19 zdravých dobrovoľníkov vo vekovom rozmedzí od 18 do 40 rokov. Zistenia viacerých nežiaducich účinkov, nelineárnych farmakologických vlastností, negatívneho vplyvu na niektoré kognitívne vlastnosti počas tejto štúdie obmedzujú potenciálne použitie rivastigmínu ako profylaktickej terapie proti otravám NPL (Lavon et al. 2015).

Galantamín je terciárny alkaloid, ktorý bol izolovaný z cibulí snežienky (rod *Galanthus*). Jedná sa o selektívny a kompetitívny iAChE, ktorý sa viaže na aktívne miesto enzýmu v anionickej podjednotke a tiež v aromatickej priehlbine. Mimoriadne dôležité sú jeho inhibičné účinky na AChE v hipokampálnych oblastiach mozgu a vo frontálnom kortexe. Najčastejšie sa používa v terapii AD pri jej miernom až strednom priebehu. Okrem inhibičných vlastností sa vyznačuje aj schopnosťou pozitívnej alosterickej modulácie nikotínových ACh receptorov (Lilienfeld 2002; Scott a Goa

2000; Čolović et al. 2013). Albuquerque et al. (2006) vo svojej štúdií demonštrovali potenciál galantamínu na zlepšenie účinku antidotálnej terapie v prípade otravy sarínom alebo somanom u morčat. Mechanizmus protektívneho účinku však nie je úplne objasnený. Možno predpokladať, že úlohu zohráva hlavne špecifita galantamínu ku AChE. Plazmatická BChE ostáva neinhibovaná, čo pomáha zachovať jej vychytávaciu kapacitu pre OP zlúčeniny v plazme, zatiaľ čo mozgová AChE je chránená pred ireverzibilnou inhibíciou spôsobenou OP zlúčeninami (Albuquerque et al. 2006; Pereira et al. 2010).

Takrín (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridín, THA) je centrálny pôsobiaci reverzibilný iAChE známy od roku 1949. Táto látka sa vyznačuje zmiešaným typom reverzibilnej inhibície, vykazuje teda vlastnosti kompetitívneho aj nekompetitívneho iAChE. Jedná sa o nešpecifický inhibítor, ktorý inhibuje taktiež BChE. Okrem inhibičných vlastností sa vyznačuje aj schopnosťou modulovať muskarínové a nikotínové receptory a taktiež pôsobí na amyloidnú cestu rozvoja AD. Jeho klinické použitie je výrazne limitované predovšetkým hepatotoxicitou. Z tohto dôvodu bola snaha vyvinúť látku, ktorá by vykazovala nižšie toxické účinky. Jedným z takýchto derivátov THA je 7-metoxytakrín (7-MEOTA). Za jeho nižšiu toxicitu môže byť zodpovedný jeho hlavný metabolit 7-hydroxytakrín, ktorý v organizme vzniká demetyláciou. Tento metabolit je po konjugácii s kyselinou glukuronovou vylučovaný močom (Tsopelas a Marin 2001; Korabecny et al. 2012).

## 2. Cieľ práce

Cieľom predkladanej dizertačnej práce bolo charakterizovať látky modulujúce aktivitu AChE pomocou rôznych *in vitro* metód. Testovanými látkami boli antidota proti NPL – konvenčne dostupné mono- alebo biskvartérne rAChE (2-PAM, TMB-4, MMB-4, LüH-6 a HI-6) a oxímy z K-série (K027, K048, K074, K075 a K203). Ďalšou skupinou látok boli reverzibilné, po prípade pseudoreverzibilné iAChE [THA, 7-MEOTA, 6-chlorotakrín (Cl-THA) , donepezil, rivastigín, galantamín a pyridostigín], ktoré možno využiť k profylaktickej terapii intoxikácie NPL alebo ako liečivá niektorých neurodegeneratívnych ochorení.

Jednotlivými cieľmi práce bolo u vyššie spomenutých látok:

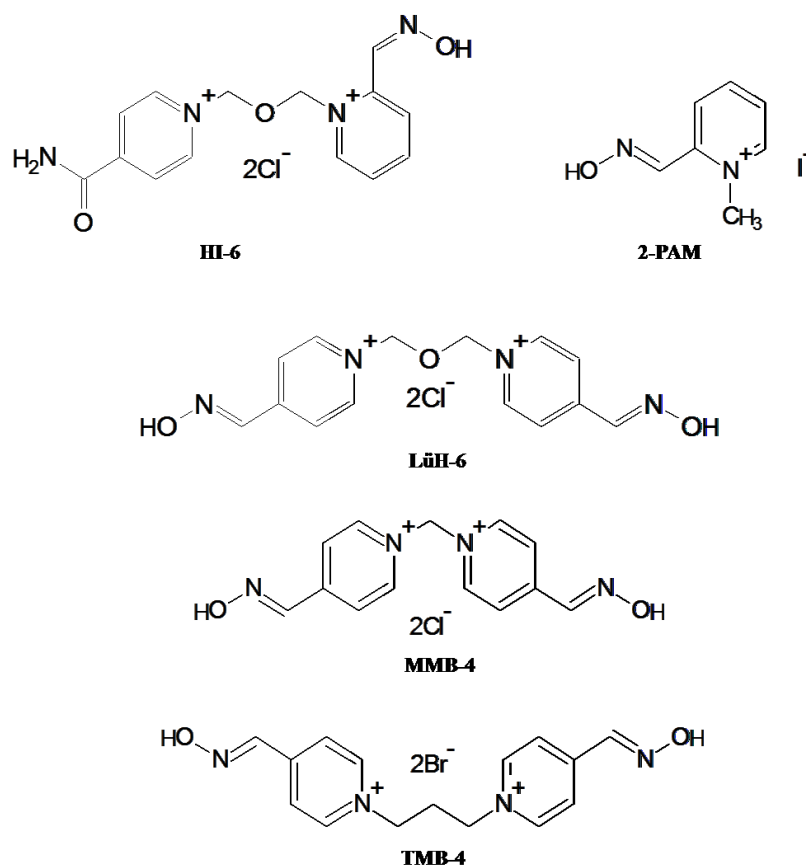
1. Stanovenie cytotoxicity látok vyjadrenej pomocou toxikologických indexov  $IC_{50}$  využitím kolorimetrickej a elektroimpedačnej (EI) metódy na bunkových modeloch HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF,
2. Stanovenie apoptického profilu buniek HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF po ich ovplyvnení rAChE a iAChE v koncentrácií, ktorá odpovedala hodnotám jednotlivých toxikologickým indexom  $IC_{50}$ ,
3. Sledovanie zmeny intracelulárnej hladiny voľných radikálov pomocou rôznych fluorescenčných sond,
4. Sledovanie antioxidačných účinkov jednotlivých testovaných látok pomocou fluorescencie.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1 Testované látky

Testovanými látkami boli rôzne modulátory aktivity AChE. Jednalo sa o reaktivátory a reverzibilné, po prípade pseudoreverzibilné inhibítory tohto enzýmu.

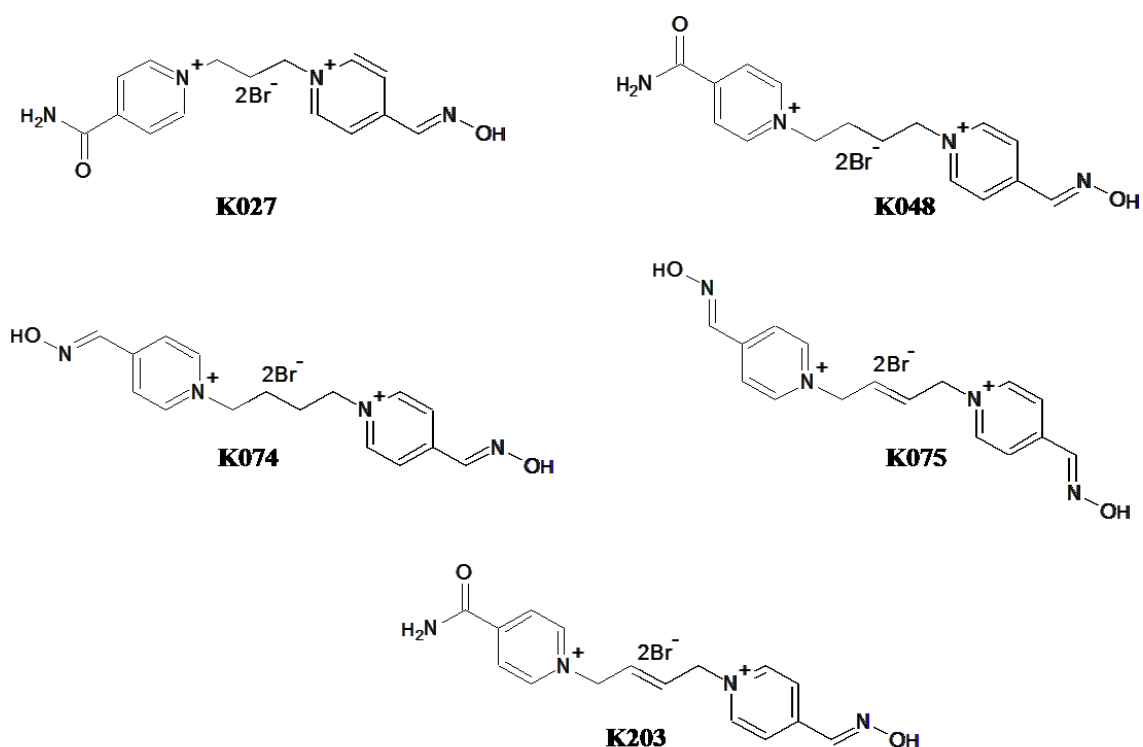
Počas riešenie dizertačnej práce boli použité konvenčne používané rAChE (obrázok 3), a to HI-6 (CAS No. 34433-31-3), 2-PAM (CAS No. 6735-59-7), LüH-6 (CAS No. 114-90-9), MMB-4 (CAS No. 51026-61-0) a TMB-4 (CAS No. 56-97-3) syntetizované na KTVF, FVZ UO v Brně.



Obrázok 3 - Štruktúra konvenčne používaných reaktivátorov AChE

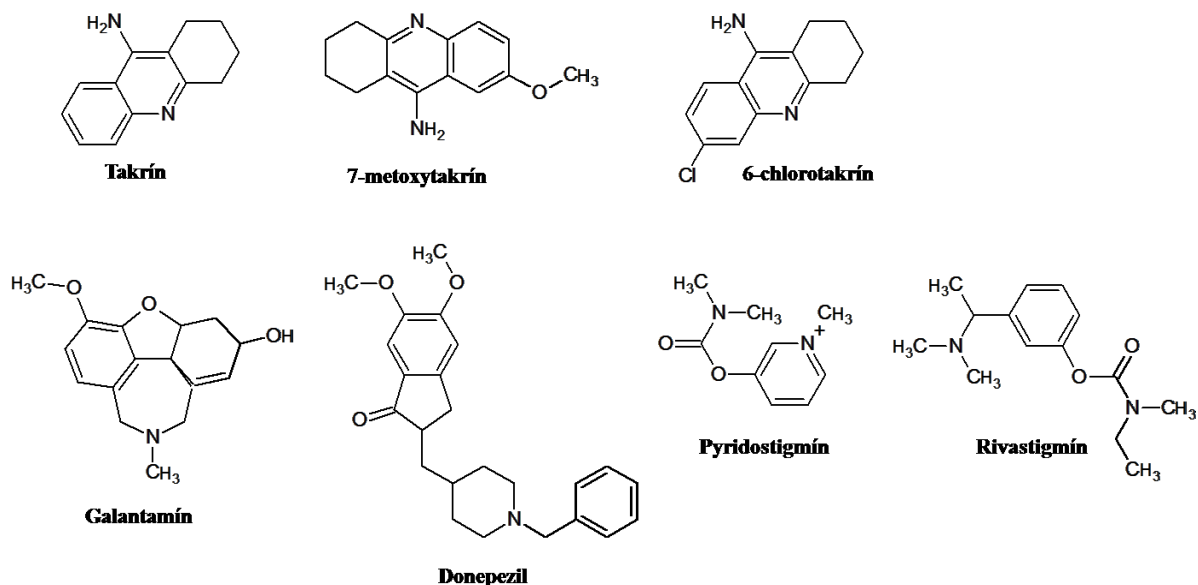
Ďalšími testovanými látkami boli oxímy zo série K a to zlúčeniny 1-(4-hydroxyiminometylpyridínium)-3-(4-carbamoylpyridínium) propán dibromid

(K027), 1-(4-hydroxyimino-metylpyridínium)-3-(4-carbamoylpyridínium) bután dibromid (K048) 1,4-bis(4-hydroxyiminometylpyridínium) bután dibromid (K074), (E)-1,4-bis(4-hydroxyimino-metylpyridínium)-but-2-én dibromid (K075) a (E)-1-(4-carbamoyl-pyridínium)-4-(4-hydroxyiminometylpyridínium)-but-2-én dibromid (K203, obrázok 4) syntetizované na KTVF, FVZ UO.



Obrázok 4 - Štruktúra oximových reaktivátorov so série K

Zo skupiny reverzibilných alebo pseudoreverzibilných iAChE boli testované nasledovné látky: THA (CAS No. 321-64-2), 7-MEOTA (CAS No. 5778-80-3), Cl-THA. (CAS No. 5778-84-7), donepezil (CAS No. 120014-06-4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), rivastigmín (CAS No. 123441-03-2, Sigma-Aldrich), galantamín (CAS No. 357-70-0, Sigma-Aldrich) a pyridostigmín (CAS No. 101-26-8, Sigma-Aldrich, obrázok 5). THA, 7-MEOTA a Cl-THA boli pripravené na KTVF, FVZ.



Obrázok 5 - Chemická štruktúra reverzibilných inhibítorov acetylcholinesterasy

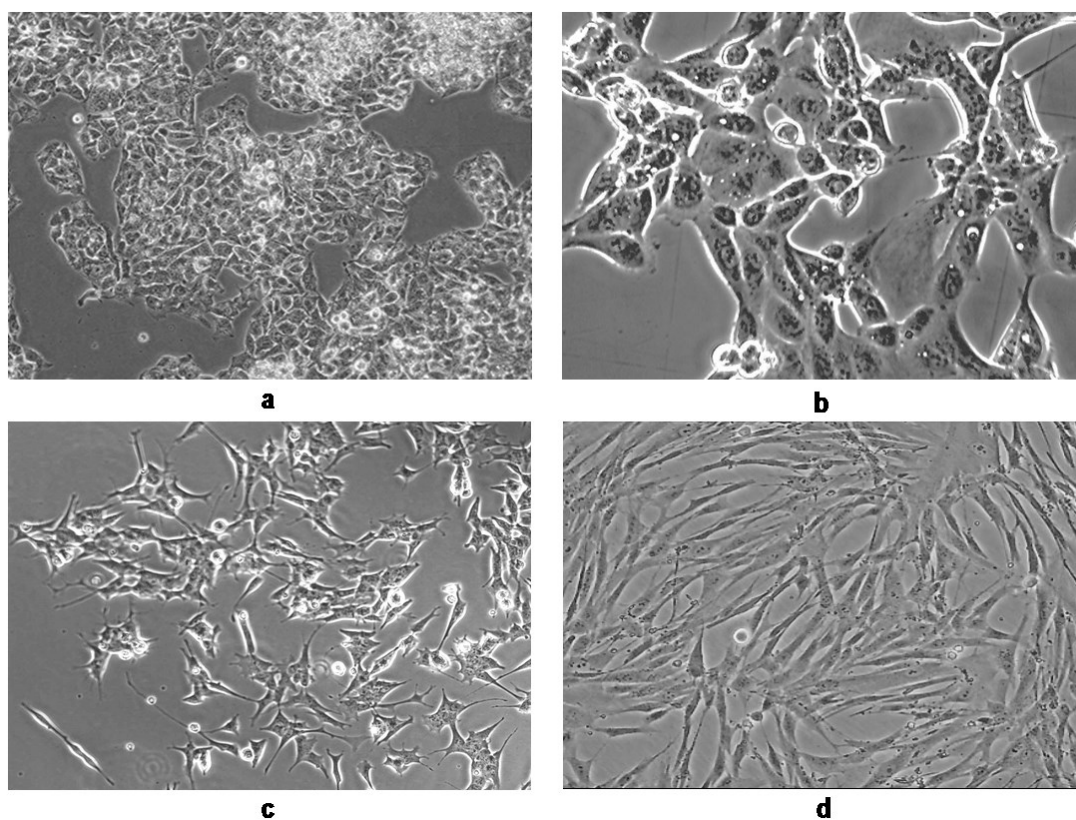
### 3.2 Použitie *in vitro* modely

K sledovaniu jednotlivých toxikologických parametrov testovaných látok boli použité 4 bunkové línie na základe porovnateľnosti s ďalšími prácami, a to: HepG2, ACHN, SH-SY5Y (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) a NHLF (Lonza, Walkersville, MD, USA).

HepG2 bunky (obrázok 6a) boli použité ako model pečenevého ľudského tkaniva. Táto línia buniek je izolovaná z hepatocelulárneho karcinómu 15-ročného muža. Ako model vylučovacej sústavy človeka boli použité bunky ACHN (obrázok 6b), ktoré sú izolované z adenokarcinómu obličiek 22-ročného muža. Ako model nervového tkaniva boli použité bunky SH-SY5Y (obrázok 6c) izolované z neuroblastómu 4-ročnej ženy. Poslednou použitou bunkovou líniou boli normálne ľudské pľúcne fibroblasty (NHLF, obrázok 6d).

Bunkové línie HepG2, ACHN a NHLF boli kultivované v Eaglovom médiu modifikovanom Dulbeccom (DMEM, Biosera, Nuaille, Francúzsko), ktoré bolo ďalej suplementované fetálnym bovinným sérom (FBS, finálna koncentrácia v kultivačnom médiu bola 10 %, Biosera), L-glutamínom (finálna koncentrácia 4 mmol.dm<sup>-3</sup>, Sigma-Aldrich) a zmesou antibiotík penicilín-streptomycín (ATB, finálna koncentrácia bola 1 %, Sigma-Aldrich). Bunky SH-SY5Y boli kultivované v rastovom médiu DMEM

obohatenom zmesou živín F12 (DMEM/F12, Biosera) a suplementovanom FBS (finálna koncentrácia 10 %), L-glutamínom (finálna koncentrácia 2,5 mmol.dm<sup>-3</sup>), ATB (finálna koncentrácia 1 %) a roztokom neesenciálnych aminokyselín (finálna koncentrácia 1 %, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Bunky boli inkubované pri podmienkach 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a pri 85 – 90% relatívnej vlhkosti vzduchu (CO<sub>2</sub> inkubátor CB 160, Binder, Tuttlingen, Nemecko).



Obrázok 6 - Použité *in vitro* modely: a) HepG2, b) ACHN, c) SH-SY5Y, d) NHLF. Snímky boli opatrené pomocou invertovaného svetelného mikroskopu s fázovým kontrastom (Nikon Eclipse TS100-F, Nikon, Tokio, Japonsko) vybaveným digitálnou kamerou (AM7023CT Dino-Lite, Nová Tchaj-pej, Taiwan) pri zväčšení 200 x

### 3.3 Stanovenie cytotoxicity testovaných látok

K stanoveniu cytotoxicity látok modulujúcich aktivitu AChE bola použitá kolorimetrická metóda využívajúca farbivo MTT (Sigma-Aldrich). K verifikácii

výsledkov získaných pomocou MTT testu bola použitá EI metóda, ktorá umožňuje sledovanie viability buniek v reálnom čase.

### **3.3.1 Kolorimetrická metóda a postup stanovenia cytotoxicity**

MTT je vo vode rozpustná tetrazoliová soľ, ktorú sú schopné viabilné bunky metabolicky redukovať pomocou svojej enzymatickej výbavy na nerozpustné kryštály formazánu. Tieto kryštály sú kumulované v intracelulárnom priestore. Vo vodnom prostredí nerozpustné kryštály formazánu sa následne vyextrahujú pomocou DMSO (Sigma-Aldrich) za vzniku fialovo zafarbeného roztoku. Intenzita zafarbenia, ktorá je priamo úmerná metabolickej aktivite buniek, a teda aj ich viabilite, je detekovaná spektrofotometricky.

#### *Postup stanovenia*

Do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky (Techno Plastic Products AG, TPP, Trasadingen, Švajčiarsko) boli nasadené bunky resuspendované v kultivačnom médiu DMEM alebo DMEM/F12 v množstve  $15 \times 10^3$  (HepG2),  $10 \times 10^3$  (ACHN),  $35 \times 10^3$  (SH-SY5Y) a  $9 \times 10^3$  (NHLF) buniek/jamku a následne boli inkubované cez noc pri podmienkach 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a pri 85 – 90% relatívnej vlhkosti vzduchu (CO<sub>2</sub> inkubátor CB 160). Nasledujúci deň boli bunky ovplyvnené sériovo nariadenými roztokmi jednotlivých reaktivátorov v kultivačnom médiu a boli inkubované ďalších 24 hodín. V prípade iAChE boli v prvom kroku zo zásobných roztokov v DMSO pripravené pracovné roztoky o určitej koncentrácii. Pracovné roztoky boli ďalej sériovo riedené v kultivačnom médiu v pomere 1:1. Takto pripravená koncentračná rada bola pridaná k bunkám nasadeným v 96-jamkovej doštičke, ktorá bola 24 hodín inkubovaná pri podmienkach 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a pri 85 – 90% relatívnej vlhkosti vzduchu (CO<sub>2</sub> inkubátor CB 160). Po uplynutí tejto doby inkubácie bolo médium odsaté a k bunkám bolo pridaných 100 µl roztoku MTT (5 mg.ml<sup>-1</sup>) na 1 hodinu (inkubácia pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a pri 85 – 90% relatívnej vlhkosti vzduchu, CO<sub>2</sub> inkubátor CB 160). Po 1-hodinovej inkubácii bolo médium obsahujúce MTT odsaté a kryštály formazánu boli extrahované pomocou DMSO. Po premiešaní obsahu jamiek na trepačke prebehlo meranie absorbancie pomocou multidetekčného readeru Synergy 2 Multi-Mode Microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) pri vlnovej dĺžke 570 nm.



Meranie cytotoxicity testovaných látok bolo uskutočnené v triplikátoch. Hodnota  $IC_{50}$  bolo vyjadrená ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM.

### **3.3.2 Elektroimpedančná metóda a postup stanovenia cytotoxicity**

Verifikácia výsledkov získaných z MTT testu bola uskutočnená pomocou EI metódy monitorovaním viability buniek v reálnom čase s využitím systému xCELLigence (ACEA Biosciences, Inc., San Diego, CA, USA). Tento systém využíva špeciálne zhotovené 96-jamkové doštičky (e-plate, ACEA Biosciences, Inc.) s integrovanými zlatými mikroelektrodami na dne každej jamky. Rast, proliferácia a zmena viability adherentných buniek je meraná ako zmena elektrickej impedancie a vyjadrená pomocou CI.

#### *Postup stanovenia*

Do e-plate bolo v prvom kroku pridané kultivačné médium (50  $\mu$ l) k zmeraniu impedančného signálu pozadia (background). Následne bolo pridané do každej jamky 100  $\mu$ l bunkovej suspenzie v hustote  $9 - 35 \times 10^3$ /jamku podľa charakteru buniek (viď kapitola 3.3.1). E-plate bola vložená do prístroja a proliferácia buniek bola monitorovaná cez noc za podmienok 37 °C, 5 %  $CO_2$  a 85 - 90% vlhkosti ( $CO_2$  inkubátor CB 160) v intervale 1 hodina. Ďalší deň bolo odobrané z každej jamky 50  $\mu$ l média a nahradené médiom obsahujúcim testované koncentrácie reaktivátorov a inhibítorov pripravené sériovým riedením. Pracovné roztoky a sériovo riedená koncentračná rada bolo pripravená rovnako ako v prípade MTT testu. Elektrická impedancia vyjadrená ako CI bola ďalej automaticky zaznamenávaná každých 60 min po dobu 48 hodín. Cytotoxicita jednotlivých látok bola vypočítaná z hodnôt CI pre interval 24 h od ovplyvnenia a vyjadrená ako hodnota  $IC_{50}$ . Hodnoty boli vyjadrené ako priemer hodnôt získaných z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM.

### **3.4 Sledovanie apoptickej aktivity buniek**

Pre sledovanie apoptickej aktivity po ovplyvnení buniek rAChE a iAChE bolo použitá metóda mikrokapilárnej prietokovej cytometrie. Táto metóda využíva anexín V a 7-AAD. Táto kombinácia umožňuje počas analýzy odlišenie 4 populácií buniek (tabuľka 2).

Tabuľka 2 - Populácia buniek, ktoré umožňuje stanoviť metóda využívajúca anexín V a 7-AAD

Populácia buniek	Anexín V	7-AAD
Živé bunky	-	-
Včasná fáza apoptózy	+	-
Neskorá fáza apoptózy/ mŕtve bunky	+	+
Mŕtve bunky	-	+

### 3.4.1 Postup stanovenia apoptickej aktivity

Pre sledovanie zmeny apoptickej aktivity boli použité 12-jamkové kultivačné doštičky (TPP). Do každej jamky boli nasadené bunky o hustote  $1,5 \times 10^5$  a boli inkubované cez noc pri podmienkach 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 85 - 90% vlhkosti (CO<sub>2</sub> inkubátor CB 160). Experimenty boli uskutočnené na bunkových líniiach HepG2, ACHN, NHLF a SH-SY5Y. Nasledujúci deň boli k bunkám pridané testované látky. Testovanými koncentráciami jednotlivých reaktivátorov a inhibítorov boli ich hodnoty IC<sub>50</sub> zistené pomocou MTT testu. Po uplynutí 24-hodinovej inkubácie boli vzorky spracované nasledujúcim postupom. Z jednotlivých jamôk bolo odsaté médium a prepipetované do centrifugačných skúmaviek. Bunky boli prevedené do suspenzie pomocou trypsínu a následne pridané k médiu v centrifugačnej skúmavke. Jamka bola niekoľkokrát opláchnutá pomocou fosfátového pufru (PSB, Sigma-Aldrich) a tekutina bola pridaná k obsahu v skúmavke. Následne bola suspenzia buniek centrifugovaná 4 minúty pri rýchlosti 1000 otáčok za minútu (stolná centrifúga Universal 320/320R, Hettich, Tuttlingen, Nemecko). Po centrifugácii bol supernatant odsatý a peleta buniek resuspendovaná v 100 µl kultivačného média. K resuspendovaným bunkám bolo pridaných 100 µl reagentie z kitu Muse Annexin V & Dead Cell Assay (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko). Takto upravená vzorka bola inkubovaná pri laboratórnej teplote bez prístupu svetla 20 minút a následne analyzovaná pomocou prístroja Muse Cell Analyzer (Merck Millipore). Experimenty boli uskutočnené v triplikátoch a v 3 nezávislých experimentoch a výsledky boli vyjadrené ako priemer ± SEM.

### **3.5 Sledovanie zmeny intracelulárnej hladiny voľných radikálov**

#### **3.5.1 Použité fluorescenčné sondy**

Pre stanovenie intracelulárnej hladiny RONS bola použitá metóda, ktorá využíva nešpecifickú fluorescenčnú sondu DCF-DA (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Pre sledovanie intracelulárnej hladiny  $O_2^{\bullet-}$  bola použitá vysoko špecifická fluorescenčná sonda DHE (Sigma-Aldrich). Pre sledovanie vzniku NO v bunkách bola použitá fluorescenčná sonda 4,5-DAF (Sigma-Aldrich).

#### **3.5.2 Postup stanovenia voľných radikálov pomocou rôznych fluorescenčných sond**

Pre stanovenie hladiny RONS pomocou DCF-DA boli použité čierne 96-jamkové doštičky s transparentným dnom pre meranie fluorescencie (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Rakúsko). Do každej jamky boli nasadené HepG2 bunky o hustote  $15 \times 10^3$  buniek/jamku a inkubované cez noc za podmienok  $37^\circ C$ , 5 %  $CO_2$  a 85-90 % vlhkosti ( $CO_2$  inkubátor CB 160). Nasledujúci deň boli bunky ovplyvnené sériovo riedenými roztokmi jednotlivých rAChE a iAChE v kultivačnom médiu DMEM obdobne ako pri stanovení toxikologických indexov  $IC_{50}$ . Po uplynutí 4 alebo 24 hodín, bol obsah jamiiek odsatý. Do každej jamky bolo pridaných 80  $\mu l$  DCF-DA o koncentrácii 20  $\mu M$  v bezfarebnom kultivačnom médiu (Biosera) s obsahom antibiotík. Súbežne s meraním intracelulárnej hladiny RONS bola meraná aj viabilita buniek pomocou MTT testu.

Okrem sondy DCF-DA boli použité aj ďalšie špecifické fluorescenčné farbivá, a to DHE ( $O_2^{\bullet-}$ ) a 4,5-DAF (NO). Bunky HepG2 boli nasadené do čiernych 96-jamkových doštičiek s transparentným dnom v rovnakej hustote ako pri predchádzajúcom experimente. Nasledujúci deň boli bunky ovplyvnené roztokmi jednotlivých rAChE, pričom koncentrácia týchto roztokov odpovedala hodnotám  $IC_{50}$  stanovených pomocou MTT testu. Paralelne so stanovením intracelulárnej hladiny jednotlivých voľných radikálov bola za rovnakých podmienok stanovená aj viabilita buniek pomocou MTT testu. Detekcia voľných radikálov spolu s viabilitou buniek bola stanovená v troch rôznych časových intervaloch 1, 4 a 24 hodín. Po uplynutí stanovenej inkubačnej doby bol obsah jamiiek odsatý a nahradený 80  $\mu l$  roztoku jednotlivých fluorescenčných sond. V prípade DCF-DA sa jednalo o 20  $\mu M$  roztok v bezfarebnom

médiu, v prípade DHE o 1000  $\mu\text{M}$  roztok v PBS a v prípade 4,5-DAF o 5  $\mu\text{M}$  roztok v PBS. Bunky boli s jednotlivými fluorescenčnými farbivami inkubované 1 hodinu. Následne bola detekovaná intenzita fluorescenčného signálu, pri rôznych vlnových dĺžkach charakteristických pre jednotlivé použité fluorescenčné sondy (DCF-DA - excitačná 485 nm a emisná 535 nm, DHE - excitačná 528 nm a emisná 590 nm, 4,5-DAF – excitačná 485 nm a emisná 535 nm) pomocou prístroja Synergy 2 Multi-Mode Microplate reader. Experimenty boli uskutočnené v triplikátoch v 3 nezávislých experimentoch a výsledky boli vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM.

### **3.6 Sledovanie antioxidačnej aktivity testovaných látok**

K stanoveniu antioxidačnej aktivity jednotlivých látok (rAChE a iAChE) bola použitá fluorescenčná sonda DCF-DA.

#### **3.6.1 Postup stanovenia antioxidačnej aktivity**

HepG2 bunky boli nasadené v kultivačnom médiu DMEM do čiernej 96-jamkovej doštičky s transparentným dnom o hustote  $15 \times 10^3$ . Takto nasadené bunky inkubované cez noc za podmienok 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  a 85-90 % vlhkosti ( $\text{CO}_2$  inkubátor CB 160). Nasledujúci deň bolo kultivačné médium aspirované a nahradené roztokom fluorescenčnej sondy DCF-DA o koncentrácií 20  $\mu\text{M}$  v bezfarebnom médiu. Bunky boli s fluorescenčným farbivom inkubované po dobu 1 hodiny. Po uplynutí času inkubácie bol roztok obsahujúci DCF-DA odsatý a bunky boli opatrne opláchnuté PBS. Pre vyvolanie oxidačného stresu bol použitý *tert*-butylhydroperoxid (tBuOOH, Sigma-Aldrich) v koncentrácií, ktorá odpovedala hodnote  $\text{IC}_{50}$  (0,13  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). K takto ovplyvneným bunkám boli pridané roztoky jednotlivých testovaných látok, pričom koncentrácia týchto roztokov odpovedala koncentrácií, ktorá nemala vplyv po 24 hodinovej inkubácií ani na viabilitu buniek ani na zmenu intracelulárnej hladiny RONS. Súbežne s testovanými rAChE a iAChE bol ako antioxidant testovaný aj redukovaný glutatión (rGLU, Sigma Aldrich), taktiež v koncentrácií, ktorá nespôsobila pokles viability ani nárast RONS po 24 hodinovej inkubácií. Intenzita fluorescencie bola u takto ovplyvnených buniek monitorovaná ihneď po pridaní testovaných látok (0 minút), následne každých 15 minút po dobu 2 hodín pomocou multifunkčného prístroja Synergy 2 Multi-Mode Microplate reader pri excitačnej vlnovej dĺžke 485 nm a emisnej

535 nm. Experimenty boli uskutočnené v triplikách a v 3 na sebe nezávislých experimentoch a výsledky boli vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM.

### **3.7 Štatistické spracovanie výsledkov**

Analýza získaných dát bola uskutočnená pomocou štatistického programu GraphPad Prism (verzia 6.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Hodnoty toxikologických indexov  $IC_{50}$  boli získané použitím 4-parametrickej nelineárnej regresie. Pre porovnanie hodnôt  $IC_{50}$  získaných z MTT testu a pomocou EI metódy bol použitý nepárový t-test (95% konfidenčný interval).

Výsledky získané pri stanovení apoptózy mikrokapilárnou prietokovou cytometriou a intracelulárnej hladiny RONS pomocou rôznych fluorescenčných sond boli spracované pomocou programu Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) a následne štatisticky vyhodnotené pomocou softwaru GraphPad Prism. Pre určenie štatisticky významných rozdielov bola použitá jednocestná alebo dvojcestná analýza rozptylu (ANOVA) spolu s Dunnettovým testom pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 4. Výsledky

### 4.1 Sledovanie cytotoxicity testovaných látok

#### 4.1.1 Reaktivátory AChE

Cytotoxicita rAChE bola stanovená pomocou dvoch metód – kolorimetrickej metódy využívajúcej tetrazóliovú soľ MTT a EI metódy sledujúcej viabilitu buniek v reálnom čase. Jednotlivé bunkové línie boli vystavené testovaným látkam po dobu 24 hodín. Cytotoxicita jednotlivých rAChE bola vyjadrená toxikologickým indexom  $IC_{50}$  ( $mmol.dm^{-3}$ ).

U bunkovej línie HepG2 bol oxím K027 najmenej toxický (MTT test  $IC_{50} = 40,06 mmol.dm^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 38,92 mmol.dm^{-3}$ , priemerná hodnota  $IC_{50}$  [ $pIC_{50}$ ], ktorá reprezentuje priemer z oboch použitých metód bola  $39,49 mmol.dm^{-3}$ , tabuľka 3).

Tabuľka 3 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej líni HepG2 stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $mmol.dm^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM,$ $mmol.dm^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM,$ $mmol.dm^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50},$ $mmol.dm^{-3}$
<b>2-PAM</b>	$22,84 \pm 0,84$	$22,04 \pm 0,76$	0,52	22,44
<b>TMB-4</b>	$21,47 \pm 0,45$	$22,48 \pm 0,71$	0,29	21,96
<b>LüH-6</b>	$4,02 \pm 0,28$	$4,32 \pm 0,07$	0,35	4,17
<b>MMB-4</b>	$3,55 \pm 0,22$	$3,64 \pm 0,05$	0,70	3,60
<b>HI-6</b>	$2,76 \pm 0,08$	$2,92 \pm 0,10$	0,28	2,84
<b>K027</b>	$40,06 \pm 0,63$	$38,92 \pm 1,59$	0,54	39,49
<b>K048</b>	$30,60 \pm 2,17$	$29,80 \pm 1,12$	0,76	30,20
<b>K074</b>	$34,36 \pm 1,57$	$32,76 \pm 1,61$	0,52	33,56
<b>K075</b>	$2,18 \pm 0,23$	$2,22 \pm 0,12$	0,88	2,20
<b>K203</b>	$1,58 \pm 0,09$	$2,20 \pm 0,22$	0,06	1,89

Cytotoxicita testovaných látok sa postupne zvyšovala od oxímu K074, K048, 2-PAM, TMB-4, LüH-6, MMB-4, HI-6, K075 ku K203, pričom hodnota  $pIC_{50}$  bola nižšia 1,2-, 1,3-, 1,7-, 1,8-, 9,5-, 10,9-, 13,9-, 17,9- a 20,9-krát.

U ACHN buniek bol najmenej toxický účinok pozorovaný u oxímu K048 (MTT test  $IC_{50} = 34,58 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 34,25 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 32,92 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , tabuľka 4). V porovnaní s oxímom K048  $pIC_{50}$  postupne klesala u testovaných látok v nasledujúcom poradí TMB-4, K027, 2-PAM, K074, K203, K075, HI-6, LüH-6 a MMB-4, pričom hodnota  $pIC_{50}$  bola nižšia 1,3-, 1,4-, 2,3-, 2,7-, 2,9-, 4,9-, 6,1-, 6,5- a 34,9- krát.

Tabuľka 4 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii ACHN stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $\text{mmol.dm}^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50}$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$
<b>2-PAM</b>	14,24 ± 0,26	13,92 ± 0,43	0,52	14,08
<b>TMB-4</b>	25,26 ± 0,12	24,64 ± 0,40	0,29	24,95
<b>LüH-6</b>	5,33 ± 0,23	4,84 ± 0,21	0,35	5,09
<b>MMB-4</b>	0,92 ± 0,04	0,99 ± 0,02	0,70	0,96
<b>HI-6</b>	5,42 ± 0,07	5,36 ± 0,07	0,28	5,39
<b>K027</b>	24,48 ± 1,09	23,63 ± 0,89	0,54	24,06
<b>K048</b>	31,58 ± 1,46	34,25 ± 2,13	0,76	32,92
<b>K074</b>	11,73 ± 0,28	12,26 ± 0,10	0,52	12,00
<b>K075</b>	6,90 ± 0,35	6,66 ± 0,38	0,88	6,78
<b>K203</b>	11,20 ± 0,45	11,33 ± 0,25	0,06	11,27

U neuroblastomových buniek SH-SY5Y vykazovala najnižší toxický potenciál látka K027 (MTT test  $IC_{50} = 26,27 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 25,43 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 25,85 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ; tabuľka 5). Cytotoxicita ostatných oxímov sa postupne zvyšovala v poradí od 2-PAM, K048, TMB-4, HI-6, K074, LüH-6, K075, K203 ku

MMB-4, pričom toxikologické indexy boli v porovnaní s pIC<sub>50</sub> oxímu K027 nižšie 1,2-, 1,3-, 2,0-, 4,7-, 5,4-, 8,0-, 15,2-, 16,4- a 19,0-krát.

Tabuľka 5 - Porovnanie toxikologických indexov IC<sub>50</sub> reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii SH-SY5Y stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota IC<sub>50</sub> (pIC<sub>50</sub>, mmol.dm<sup>-3</sup>). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky p > 0,05)

Testovaná látka	MTT test IC <sub>50</sub> ± SEM, mmol.dm <sup>-3</sup>	EI metóda IC <sub>50</sub> ± SEM, mmol.dm <sup>-3</sup>	p-hodnota	pIC <sub>50</sub> , mmol.dm <sup>-3</sup>
<b>2-PAM</b>	21,45 ± 0,56	22,66 ± 0,40	0,15	22,06
<b>TMB-4</b>	12,99 ± 0,45	12,46 ± 1,01	0,66	12,73
<b>LüH-6</b>	3,25 ± 0,03	3,20 ± 0,11	0,66	3,23
<b>MMB-4</b>	1,41 ± 0,10	1,31 ± 0,03	0,38	1,36
<b>HI-6</b>	5,81 ± 0,07	5,24 ± 0,42	0,26	5,53
<b>K027</b>	26,27 ± 0,89	25,43 ± 0,32	0,42	25,85
<b>K048</b>	19,77 ± 0,88	20,17 ± 0,69	0,85	19,97
<b>K074</b>	4,93 ± 0,10	4,72 ± 0,02	0,10	4,83
<b>K075</b>	1,62 ± 0,07	1,78 ± 0,04	0,13	1,70
<b>K203</b>	1,48 ± 0,05	1,68 ± 0,08	0,12	1,58

Pre bunkovú líniu NHLF bola najmenej toxická látka K048 (MTT test IC<sub>50</sub> = 30,54 mmol.dm<sup>-3</sup>, EI metóda IC<sub>50</sub> = 29,34 mmol.dm<sup>-3</sup>, pIC<sub>50</sub> = 29,94 mmol.dm<sup>-3</sup>; tabuľka 6). U ostatných testovaných oxímov sa toxický potenciál látky postupne zvyšoval v nasledujúcom poradí: TMB-4, K027, 2-PAM, K203, K074, HI-6, LüH-6, K075 a MMB-4, pričom hodnoty pIC<sub>50</sub> sa postupne znižovali 1,0-, 1,1-, 1,2-, 2,7-, 3,3-, 4,0-, 4,0-, 4,4- až 8,5-krát oproti hodnote pIC<sub>50</sub> oxímu K048.



Tabuľka 6 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  reaktivátorov AChE testovaných na bunkovej línii NHLF stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $mmol.dm^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM,$ $mmol.dm^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM,$ $mmol.dm^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50},$ $mmol.dm^{-3}$
<b>2-PAM</b>	29,13 ± 0,37	29,19 ± 0,73	0,95	29,16
<b>TMB-4</b>	30,63 ± 0,20	29,14 ± 0,62	0,08	29,89
<b>LüH-6</b>	7,53 ± 0,17	7,45 ± 0,12	0,72	7,49
<b>MMB-4</b>	3,60 ± 0,05	3,42 ± 0,15	0,31	3,51
<b>HI-6</b>	7,44 ± 0,06	7,60 ± 0,11	0,26	7,52
<b>K027</b>	27,73 ± 0,55	26,85 ± 0,57	0,33	27,29
<b>K048</b>	30,54 ± 0,71	29,34 ± 1,24	0,57	29,94
<b>K074</b>	8,57 ± 0,28	9,48 ± 0,79	0,34	9,03
<b>K075</b>	6,97 ± 0,20	6,66 ± 0,20	0,38	6,82
<b>K203</b>	11,70 ± 0,23	10,78 ± 0,37	0,10	11,24

#### 4.1.2 Inhibítory AChE

Cytotoxicita iAChE bola stanovená rovnako ako u rAChE dvoma metódami, a to MTT testom a EI metódou v reálnom čase. Cytotoxicita jednotlivých iAChE bola vyjadrená toxikologickým indexom  $IC_{50}$  ( $mmol.dm^{-3}$ ) po 24-hodinovom časovom intervale.

Pre líniu buniek HepG2 bol najmenej toxickým inhibítorom pyridostigmín (MTT test  $IC_{50} = 21,16 mmol.dm^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 20,89 mmol.dm^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 21,03 mmol.dm^{-3}$ ; tabuľka 7). Toxický potenciál jednotlivých látok narastal v poradí galantamín, rivastigmín, THA a donepezil. Látky boli v porovnaní s najmenej toxickou látkou 5,3-, 6,0, 124,4- a 136,6-krát toxickejšie. Cl-THA a 7-MEOTA vykazovali rovnakú mieru cytotoxicity (457,2-krát vyššia cytotoxicita ako u pyridostigmínu).

Tabuľka 7 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii HepG2 stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $mmol.dm^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM$ , $mmol.dm^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM$ , $mmol.dm^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50}$ , $mmol.dm^{-3}$
THA	0,168 $\pm$ 0,003	0,170 $\pm$ 0,001	0,76	0,169
7-MEOTA	0,044 $\pm$ 0,003	0,048 $\pm$ 0,001	0,37	0,046
CI-THA	0,043 $\pm$ 0,001	0,049 $\pm$ 0,004	0,24	0,046
Donepezil	0,154 $\pm$ 0,002	0,153 $\pm$ 0,002	0,48	0,154
Galantamín	4,19 $\pm$ 0,21	3,80 $\pm$ 0,04	0,26	3,99
Pyridostigmín	21,16 $\pm$ 1,68	20,89 $\pm$ 0,32	0,90	21,03
Rivastigmín	3,42 $\pm$ 0,21	3,54 $\pm$ 0,05	0,67	3,48

U bunkovej línii ACHN bol pozorovaný najnižší toxický efekt opäť u pyridostigmínu (MTT test  $IC_{50} = 42,62 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 44,76 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 43,69 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ; tabuľka 8).

Tabuľka 8 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii ACHN stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $mmol.dm^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM$ , $mmol.dm^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM$ , $mmol.dm^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50}$ , $mmol.dm^{-3}$
THA	0,155 $\pm$ 0,001	0,151 $\pm$ 0,001	0,14	0,153
7-MEOTA	0,049 $\pm$ 0,003	0,042 $\pm$ 0,002	0,19	0,046
CI-THA	0,055 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,006	0,11	0,051
Donepezil	0,280 $\pm$ 0,007	0,291 $\pm$ 0,009	0,42	0,286
Galantamín	7,79 $\pm$ 0,02	7,36 $\pm$ 0,23	0,27	7,56
Pyridostigmín	42,62 $\pm$ 1,12	44,76 $\pm$ 0,76	0,28	43,69
Rivastigmín	11,14 $\pm$ 0,60	9,87 $\pm$ 0,40	0,20	11,51

U tejto línie sa cytotoxicita testovaných inhibítorov postupne zvyšovala od najmenej toxickej látky v poradí rivastigmín, galantamín, donepezil, THA, CI-THA a 7-MEOTA, pričom  $pIC_{50}$  boli nižšie 3,8-, 5,8-, 152,8-, 285,6-, 586,7- a 949,8-krát.

Pseudoreverzibilný inhibítor pyridostigmín bol najmenej toxickou testovanou látkou aj u buniek izolovaných z neuroblastómu (MTT test  $IC_{50} = 27,02 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 25,91 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 26,47 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ; tabuľka 9). Hodnota  $pIC_{50}$  postupne klesala u jednotlivých inhibítorov v poradí: galantamín, rivastigmín, donepezil, THA, 7-MEOTA a CI-THA, pričom ich hodnota sa postupne znižovala 5,7-, 6,5-, 155,7-, 206,8-, 490,2- a 575,4-krát.

Tabuľka 9 - Porovnanie toxikologických indexov  $IC_{50}$  inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii SH-SY5Y stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota  $IC_{50}$  ( $pIC_{50}$ ,  $\text{mmol.dm}^{-3}$ ). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky  $p > 0,05$ )

Testovaná látka	MTT test $IC_{50} \pm SEM$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$	EI metóda $IC_{50} \pm SEM$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$	p-hodnota	$pIC_{50}$ , $\text{mmol.dm}^{-3}$
THA	$0,122 \pm 0,012$	$0,134 \pm 0,013$	0,06	0,128
7-MEOTA	$0,053 \pm 0,003$	$0,054 \pm 0,002$	0,98	0,046
CI-THA	$0,050 \pm 0,002$	$0,054 \pm 0,002$	0,13	0,054
Donepezil	$0,173 \pm 0,005$	$0,166 \pm 0,012$	0,37	0,170
Galantamín	$4,65 \pm 0,21$	$4,63 \pm 0,05$	0,95	4,64
Pyridostigmín	$27,02 \pm 0,02$	$25,91 \pm 1,83$	0,67	26,47
Rivastigmín	$4,07 \pm 0,09$	$4,09 \pm 0,43$	0,28	4,08

Podobne ako u predchádzajúcich bunkových línii, aj u buniek NHLF vykazoval inhibítor pyridostigmín najnižší toxický efekt (MTT test  $IC_{50} = 29,10 \text{ mmol.dm}^{-3}$ , EI metóda  $IC_{50} = 28,62 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ,  $pIC_{50} = 28,86 \text{ mmol.dm}^{-3}$ ; tabuľka 10). Cytotoxicita testovaných látok sa postupne zvyšovala v nasledujúcom poradí: galantamín, rivastigmín, donepezil, THA, 7-MEOTA a CI-THA, pričom jednotlivé látky boli 2,8-, 4,7-, 64,0-, 132,4-, 317,1- a 627,4-krát toxickejšie v porovnaní s inhibítorom s najnižšou cytotoxicitou.

Tabuľka 10 - Porovnanie toxikologických indexov IC<sub>50</sub> inhibítorov AChE testovaných na bunkovej línii NHLF stanovených pomocou kolorimetrickej metódy (MTT test) a elektroimpedančnou metódou (EI metóda) a priemerná hodnota IC<sub>50</sub> (pIC<sub>50</sub>, mmol.dm<sup>-3</sup>). Medzi hodnotami získanými oboma metódami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (všetky p > 0,05)

Testovaná látka	MTT test IC <sub>50</sub> ± SEM, mmol.dm <sup>-3</sup>	EI metóda IC <sub>50</sub> ± SEM, mmol.dm <sup>-3</sup>	p-hodnota	pIC <sub>50</sub> , mmol.dm <sup>-3</sup>
THA	0,208 ± 0,016	0,227 ± 0,017	0,06	0,218
7-MEOTA	0,089 ± 0,007	0,093 ± 0,005	0,52	0,046
Cl-THA	0,079 ± 0,003	0,081 ± 0,005	0,15	0,091
Donepezil	0,447 ± 0,007	0,455 ± 0,014	0,63	0,451
Galantamín	9,88 ± 0,52	11,03 ± 0,62	0,28	10,46
Pyridostigmin	29,10 ± 1,35	28,62 ± 0,84	0,83	28,86
Rivastigmin	6,32 ± 0,14	5,92 ± 0,40	0,24	6,12

## 4.2 Sledovanie apoptickej aktivity

### 4.2.1 Reaktivátory AChE

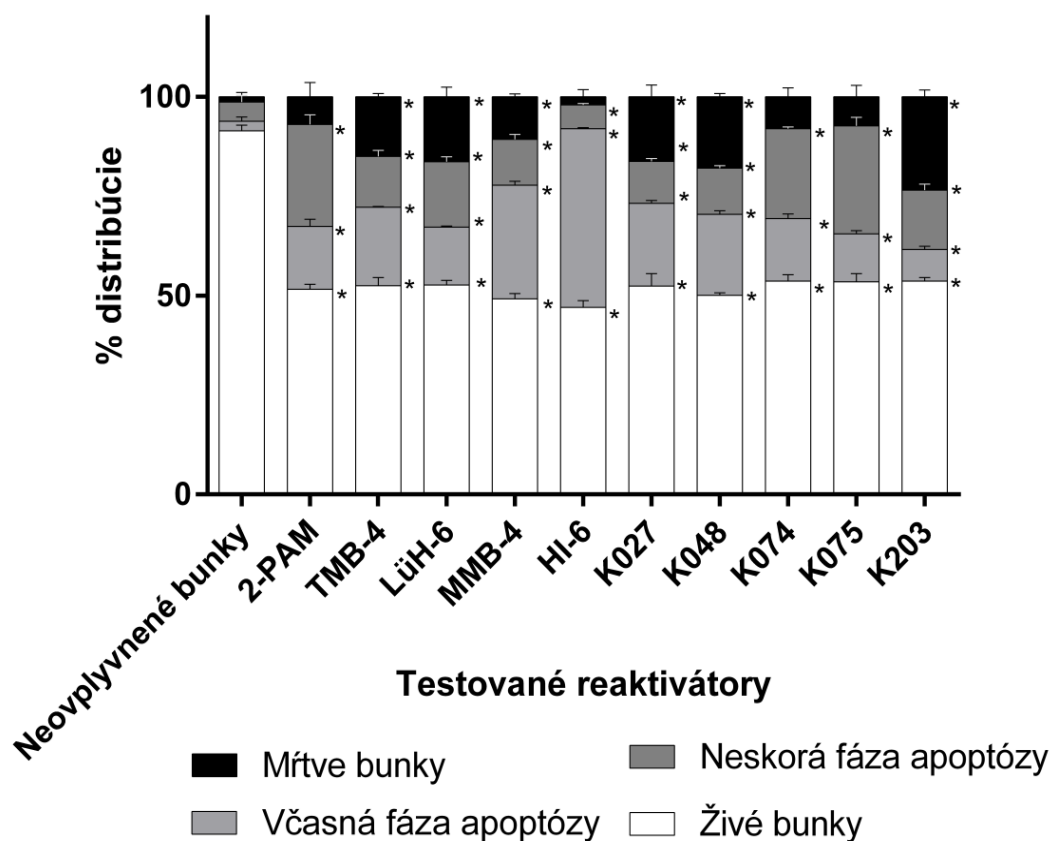
Apoptické zmeny boli sledované na bunkových líniiach HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF po 24-hodinovej dobe inkubácie s testovanými reaktivátormi. Testovanými koncentraciami boli hodnoty IC<sub>50</sub>, ktoré sme predtým získali pomocou MTT testu.

Zmeny v apoptickej aktivite buniek HepG2 sú znázornené na obrázku 7. Populácia živých buniek sa po ich ovplyvnení jednotlivými rAChE pohybovala v rozmedzí 50 % do 57 %, pričom medzi látkami nebol pozorovaný signifikantný rozdiel.

Bunky vo včasnej fázy apoptózy boli v najvyššom zastúpení po ich ovplyvnení reaktivátorom HI-6, pričom oproti neovplyvnenej kontrole sa počet včasne apoptických buniek zvýšil o 43 %. Populácia buniek vo včasnej fáze apoptózy sa postupne zmenšovala v nasledujúcom poradí: MMB-4, K027, K048, TMB-4, 2-PAM, K074, LüH-6, K075 a K203, pričom bol detekovaný nárast o 26 %, 18 %, 18 %, 17 %, 13 %, 13 %, 12 %, 10 % a 6 %.

Populácia buniek v neskorej fázy apoptózy bola najvýraznejšia po ich ovplyvnení oxímom K075, pričom došlo k 22% nárastu. Zastúpenie buniek v neskorej

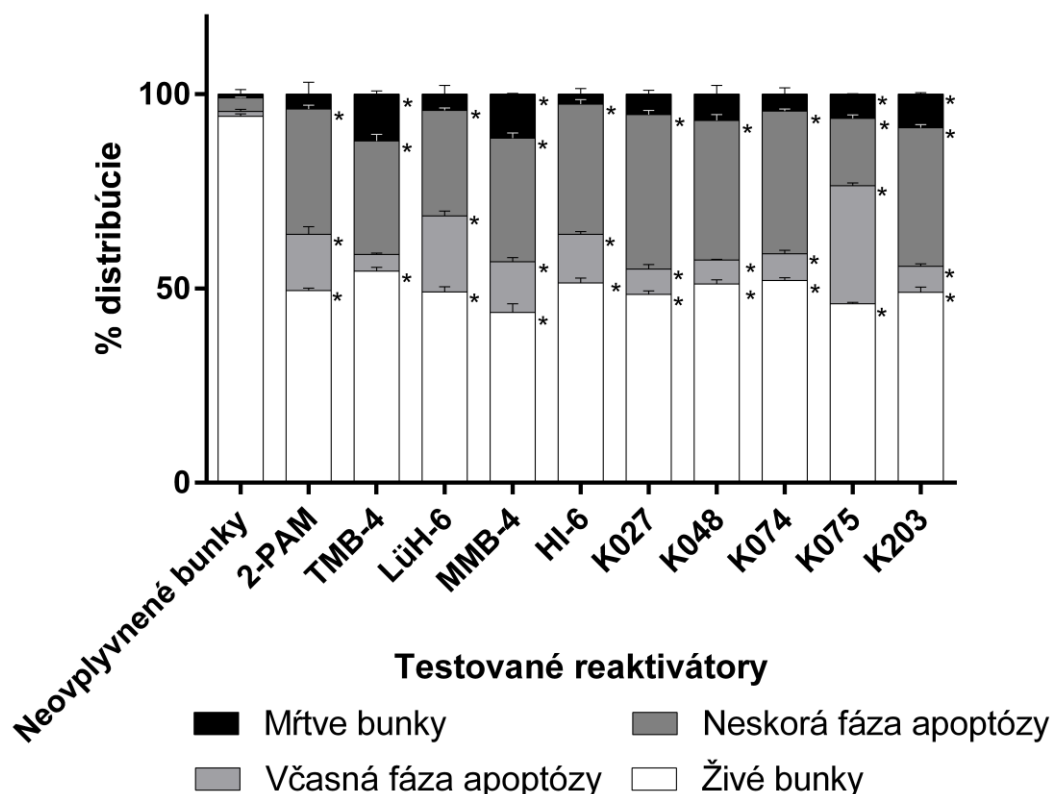
fázy apoptózy sa postupne znižovalo u jednotlivých testovaných látok v poradí: 2-PAM, K074, LüH-6, K203, TMB-4, K048, MMB-4, K027 a HI-6. Populácia buniek v neskoréj fáze apoptózy bola zvýšená o 21 %, 18 %, 12 %, 10 %, 8 %, 7 %, 7 %, 6 % a 2 % oproti neovplyvnenej kontrole.



Obrázok 7 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek HepG2 vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Poslednou sledovanou bunkovou populáciou boli mŕtve bunky. Táto populácia buniek bola najvýraznejšie zastúpená po expozícii buniek oxímu K203 a oproti neovplyvnenej kontrole došlo k 22% zvýšeniu. K poklesu počtu nekrotických buniek v porovnaní s K203 došlo v poradí: K048, LüH-6, K027, TMB-4 a MMB-4 a bol sledovaný nárast o 17 %, 15 %, 15 %, 14 % a 9 % v porovnaní s kontrolnými bunkami.

Zmeny percentuálneho zastúpenia populácie živých, včasne apoptických, buniek v neskoréj fáze apoptózy a nekrotických buniek po ich ovplyvnení jednotlivými testovanými látkami u bunkovej línie ACHN sú znázornené na obrázku 8.



Obrázok 8 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek ACHN vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Počet životaschopných buniek sa pohyboval v rozmedzí od 46 % až 57 % v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou a medzi jednotlivými rAChE nebol sledovaný signifikantný rozdiel.

Najvýraznejší nárast populácie buniek vo včasnej fáze apoptózy bol pozorovaný u oxímu K075 (29% zvýšenie oproti neovplyvnenej kontrole). Po ovplyvnení buniek testovanými látkami populácia včasne apoptických buniek postupne klesala v poradí:

LüH-6, 2-PAM, MMB-4, HI-6, K074, K203, K027 a K048, pričom bol detekovaný 18%, 13%, 12%, 11%, 6%, 5%, 5% a 5% nárast oproti neovplyvnenej kontrole. Po inkubácií buniek s TMB-4 nedošlo k signifikantnej zmene v zastúpení buniek v tejto fáze.

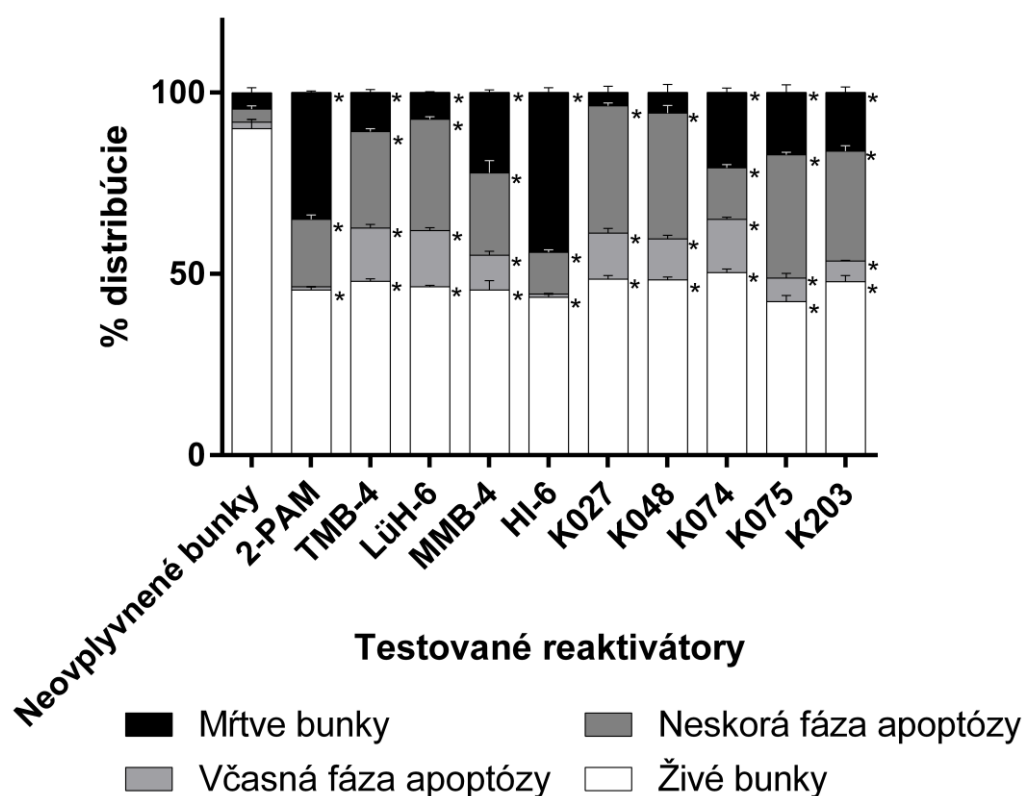
Bunky ovplyvnené oxímom K027 vykazovali najvyšší nárast populácie neskorej fázy apoptózy a oproti neovplyvnenej kontrole došlo k 36% nárastu. Po inkubácií s rAChE K074, K048, K203, HI-6, 2-PAM, MMB-4, TMB-4, LüH-6 a K075 sa populácia buniek v neskorej fáze apoptózy postupne znižovala v porovnaní s oxímom K027. Oproti kontrolným bunkám bolo detekované zvýšenie počtu neskoro apoptických buniek o 33 %, 33 %, 32 %, 30 %, 29 %, 28 %, 26 %, 24 % a 14 %.

Najvyššie zastúpenie nekrotických buniek bolo pozorované u buniek inkubovaných s TMB-4 (11% nárast populácie v porovnaní s neovplyvnenými bunkami). Populácia nekrotických buniek ďalej postupne klesala u buniek ovplyvnených jednotlivými rAChE v poradí: MMB-4 (zvýšenie o 10 %), K203 (o 8 %), K048 (o 6 %) a K075 (o 5 %). U oxímov K027, K074, LüH-6 a 2-PAM a HI-6 nedošlo k signifikantnej zmene oproti neovplyvnenej kontrole.

Zmeny percentuálneho zastúpenia populácie živých, včasne apoptických, buniek v neskorej fáze apoptózy a nekrotických buniek po ich ovplyvnení jednotlivými testovanými látkami u bunkovej línie SH-SY5Y sú znázornené na obrázku 9.

Po 24-hodinovej inkubácií s testovanými oxímami bol detekovaný počet viabilných buniek v rozmedzí 47 % až 55 %. Medzi jednotlivými testovanými oxímami nebol sledovaný štatisticky významný rozdiel.

Najvýraznejšie zastúpenie buniek vo včasnej fáze apoptózy bolo pozorované u buniek, ktoré boli inkubované spolu s LüH-6, TMB-4 a K074 (vo všetkých 3 prípadoch nárast o 13 % oproti kontrolným bunkám). Populácia včasne apoptických buniek sa postupne znižovala po ich ovplyvnení jednotlivými testovanými látkami v nasledujúcom poradí: K027, K048, MMB-4, K075 a K203, pričom bol oproti neovplyvnenej kontrole detekovaný nárast v počte včasne apoptických buniek o 11 %, 10 %, 8 %, 5 % a 4 %.



Obrázok 9 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek SH-SY5Y vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Bunky v neskoršej fáze apoptózy boli najviac zastúpené u látok K027 a K048 (u oboch nárast oproti kontrole o 31 %). K redukcii buniek v tejto fáze apoptózy dochádzalo postupne v poradí: K075, LüH-6, K203, TMB-4, MMB-4, 2-PAM, K074 až HI-6, pričom v porovnaní s kontrolnými bunkami bol sledovaný 30%, 27%, 27%, 23%, 19%, 15%, 11% a 8% nárast.

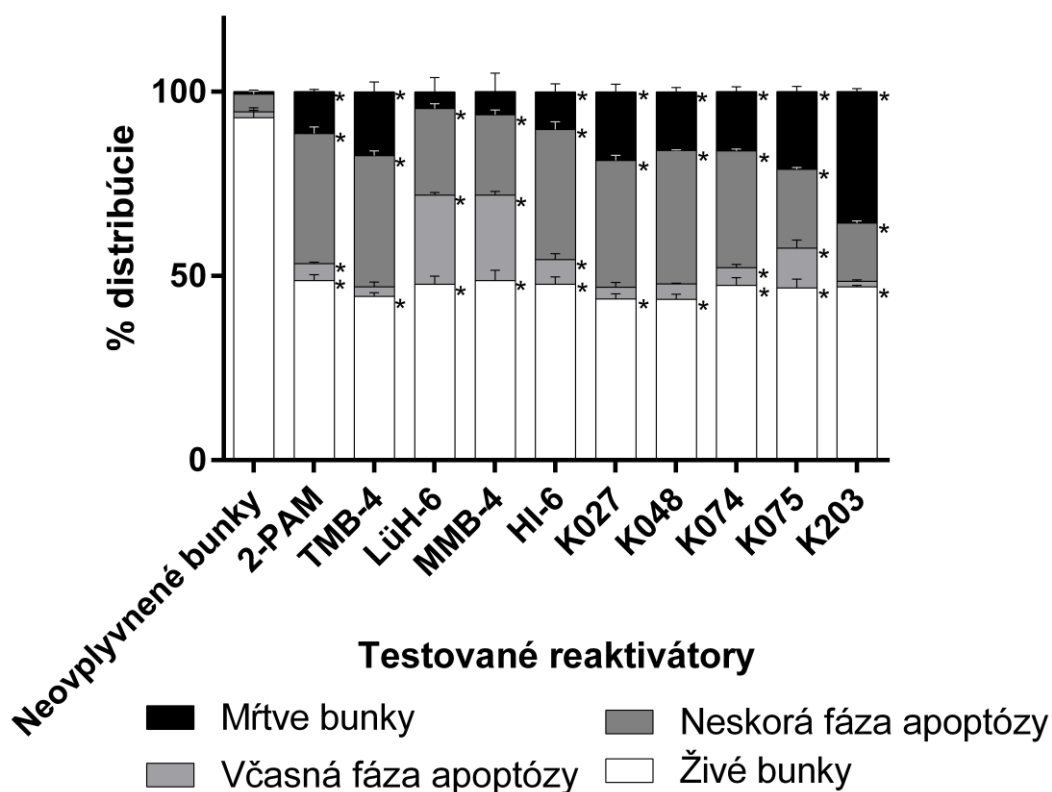
V populácií nekrotických buniek bolo zistené najvýraznejšie zastúpenie u buniek inkubovaných s HI-6, kedy došlo k nárastu počtu týchto buniek o 40 %. V poradí 2-PAM, MMB-4, K074, K075, K203, TMB-4 a LüH-6 dochádzalo k postupnému zníženiu počtu nekrotických buniek, pričom v porovnaní s neovplyvnenými bunkami



došlo k 31%, 18%, 17%, 13%, 12%, 7% a 5% nárastu tejto populácie. U reaktivátorov K048 a K027 nedošlo k signifikantnej zmene v tejto skupine buniek.

Zmeny v percentuálnom zastúpení sledovaných populácií buniek NHLF (živé, včasne apoptické, bunky v neskoréj fáze apoptózy a mŕtve bunky) po 24-hodinovej inkubácii s testovanými látkami sú vyjadrené na obrázku 10.

V sledovanom časovom intervale živé bunky predstavovali 47 % až 53 % populácie. Medzi jednotlivými látkami nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel v poklese životaschopnosti buniek.



Obrázok 10 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek NHLF vyvolaných rAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neoplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Najvýraznejší nárast počtu buniek vo včasnej fáze apoptózy oproti neovplyvnenej kontrole bol pozorovaný po inkubácií buniek s LüH-6 (23% nárast). Populácia buniek v tejto fáze apoptózy sa postupne znižovala po ich inkubácií s testovanými substanciami v poradí: MMB-4, K075, HI-6, K074 a 2-PAM, pričom bolo detekované 21%, 9%, 5%, 4% a 3% zvýšenie. U buniek inkubovaných spolu s reaktivátormi TMB-4, K203, K027, K048 nenastala významná zmena v porovnaní s neovplyvnenými bunkami.

Oproti kontrolným bunkám došlo k najvyššiemu nárastu buniek v neskoršej fáze apoptózy po ich inkubácií s HI-6, 2-PAM, TMB-4 a K048 (nárast populácie o 31 %). U buniek, ktoré boli inkubované spolu s ďalšími testovanými reaktivátormi populácia buniek v neskoršej fáze apoptózy postupne klesala v nasledujúcom poradí: K027, K074, LüH-6, MMB-4, K075 a K203. V porovnaní s neovplyvnenými bunkami došlo k 30%, 27%, 19%, 17%, 17% a 11% zvýšeniu počtu buniek v tejto fáze.

Poslednou sledovanou populáciou buniek boli nekrotické bunky. Najvýraznejšie zastúpenie tejto populácie buniek bolo pozorované po ovplyvnení buniek oxímom K203 a bolo pozorované zvýšenie počtu nekrotických buniek o 35 %. Po ovplyvnení buniek ostatnými testovanými látkami došlo k postupnému poklesu počtu nekrotických buniek v poradí K075, K027, TMB-4, K074, K048, 2-PAM a HI-6, pričom došlo v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou k 20%, 18%, 17%, 15%, 15%, 11% a 10% nárastu. V porovnaní s kontrolnými bunkami nebol pozorovaný významný rozdiel v populácií nekrotických buniek po ich ovplyvnení MMB-4 a LüH-6.

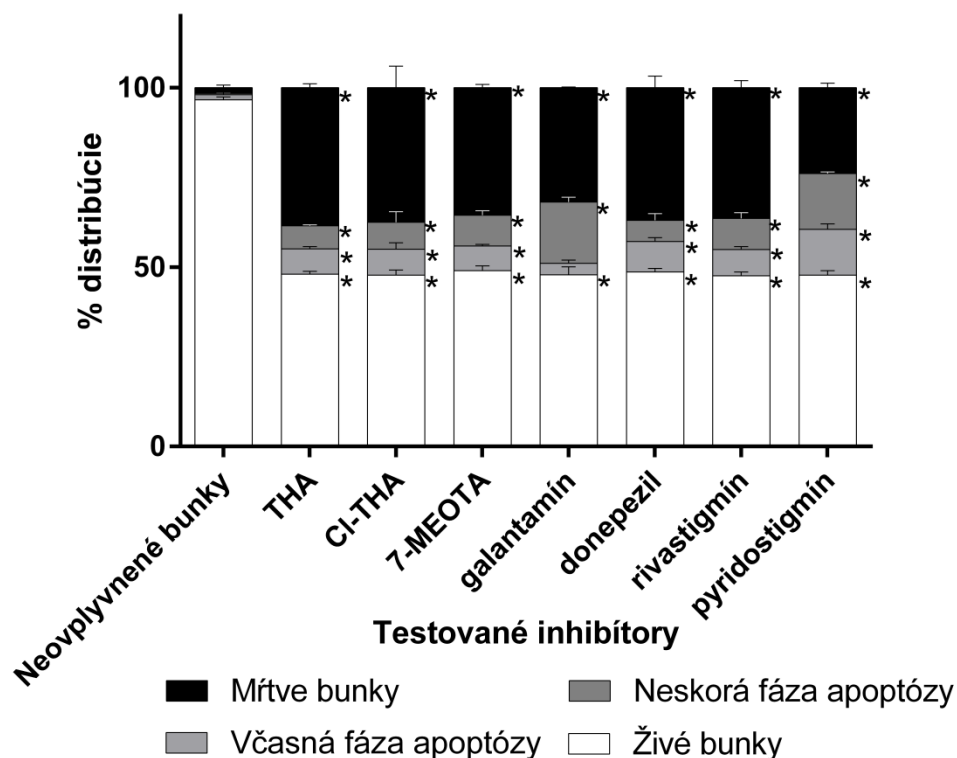
#### **4.2.2 Inhibítory AChE**

Zmeny percentuálneho zastúpenie buniek v jednotlivých fázach apoptózy boli sledované u bunkových línií HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF po 24-hodinovej inkubácií s iAChE. Testované koncentrácie vychádzali obdobne ako u reaktivátorov z hodnôt  $IC_{50}$ , ktoré boli získané pomocou MTT testu.

Apoptický profil u buniek HepG2 po ich 24-hodinovej interakcii s testovanými látkami je znázornený na obrázku 11. U tejto bunkovej línie živé bunky predstavovali 49 – 51 % a medzi jednotlivými látkami nebol sledovaný štatisticky významný rozdiel.

Vo včasnej fáze apoptózy boli bunky najviac zastúpené po ich ovplyvnení pyridostigminom (11% nárast oproti neovplyvneným bunkám). Táto populácia buniek

sa postupne znižovala po ich inkubácii s jednotlivými inhibítormi, a to v poradí: donepezil, rivastigmín, Cl-THA, THA a 7-MEOTA. U týchto inhibítorov bola populácia včasne apoptických buniek zvýšená oproti kontrole o 7 %, 6 %, 6 %, 6 % a 5 %. Po ovplyvnení buniek galantamínom nedošlo k štatisticky významnej zmene oproti neovplyvnenej kontrole.



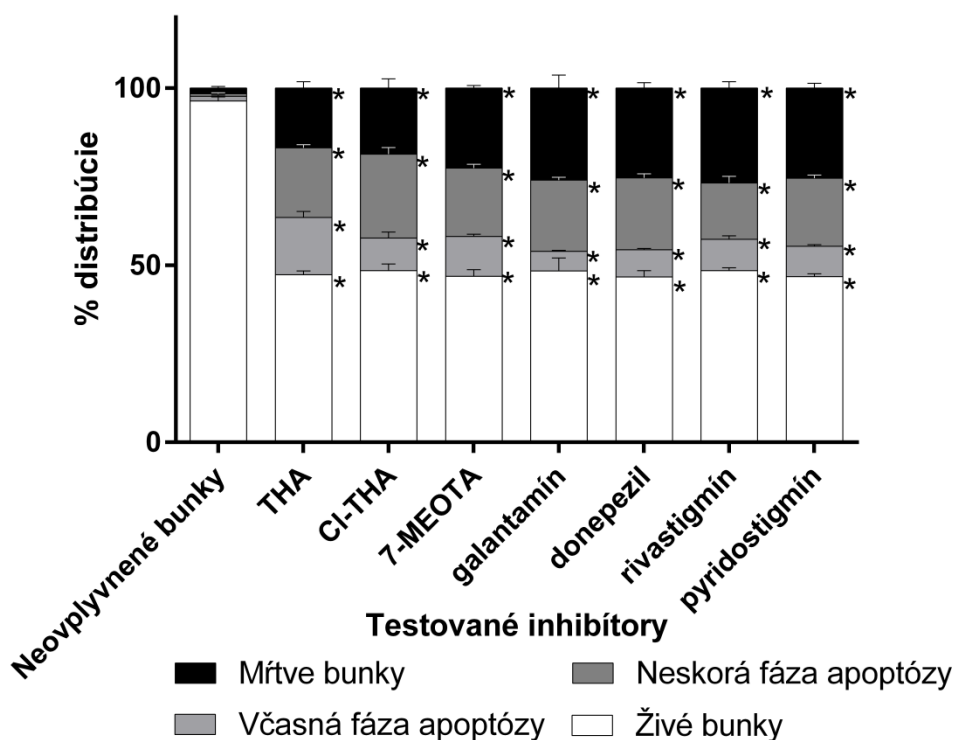
Obrázok 11 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek HepG2 vyvolaných reverzibilnými/pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Populácia buniek v neskorej fáze apoptózy bola najvýraznejšie zastúpená po interakcii buniek s galantamínom (nárast oproti neovplyvnenej kontrole 17 %). Pokles počtu buniek v tejto fáze bol pozorovaný po ovplyvnení s ostatnými testovanými látkami, a to v poradí pyridostigmín, rivastigmín, 7-MEOTA, Cl-THA,

THA a donepezil, pričom bol v porovnaní s negatívnou kontrolou pozorovaný 15%, 8%, 8%, 7%, 6% a 5% nárast populácie buniek v neskoréj apoptóze.

Najvýraznejšie zastúpenie nekrotických buniek bolo detekované po ich ovplyvnení THA (zvýšenie o 37 %). Počet nekrotických buniek sa ďalej postupne znižoval v poradí CI-THA, donepezil, rivastigmín, 7-MEOTA, galantamín a pyridostigmín. V porovnaní s kontrolnými bunkami bolo sledované zvýšenie počtu nekrotických buniek o 36 %, 35 %, 35 %, 34 %, 30 % a 22 %.

Zmeny v apoptickej aktivite ACHN buniek po ich 24-hodinovej inkubácii s testovanými iAChE sú znázornené na obrázku 12. Po uplynutí stanovenej inkubácie predstavovali viabilné bunky 47 – 49 %. Medzi testovanými látkami nebol sledovaný signifikantný rozdiel.



Obrázok 12 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek ACHN vyvolaných reverzibilnými/ pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

K najvýraznejšiemu nárastu buniek vo včasnej fáze apoptózy došlo po ich interakcii s THA (15% nárast v porovnaní s kontrolnými bunkami). Populácia buniek v tejto fáze postupne klesala po inkubácií s látkami v poradí: 7-MEOTA, CI-THA, rivastigmín, pyridostigmín, donepezil a galantamín, pričom bol v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou sledovaný 10%, 8%, 7%, 7%, 6% a 4% nárast.

Neskorá fáza apoptózy bola najvýraznejšia u buniek inkubovaných spolu s CI-THA, pričom došlo k nárastu tejto populácie o 23 %. Počet buniek v tejto fáze postupne klesal po ich ovplyvnení jednotlivými iAChE: donepezil > galantamín > THA > 7-MEOTA > pyridostigmín > rivastigmín. V porovnaní s kontrolnými bunkami bol pozorovaný nárast o 20 %, 19 %, 19 %, 19 %, 19 % a 15 %.

Posledná sledovaná populácia predstavovala nekrotické bunky. Najvýraznejšie zastúpenie bolo pozorované po 24-hodinovej inkubácií buniek s rivastigmínom (nárast o 25 %). Ďalej sa počet nekrotických buniek postupne znižoval po ich ovplyvnení látkami galantamín, donepezil, pyridostigmín (u všetkých nárast oproti kontrolným bunkám o 24 %), 7-MEOTA (o 21 %), CI-THA (o 17 %) a THA (o 15 %).

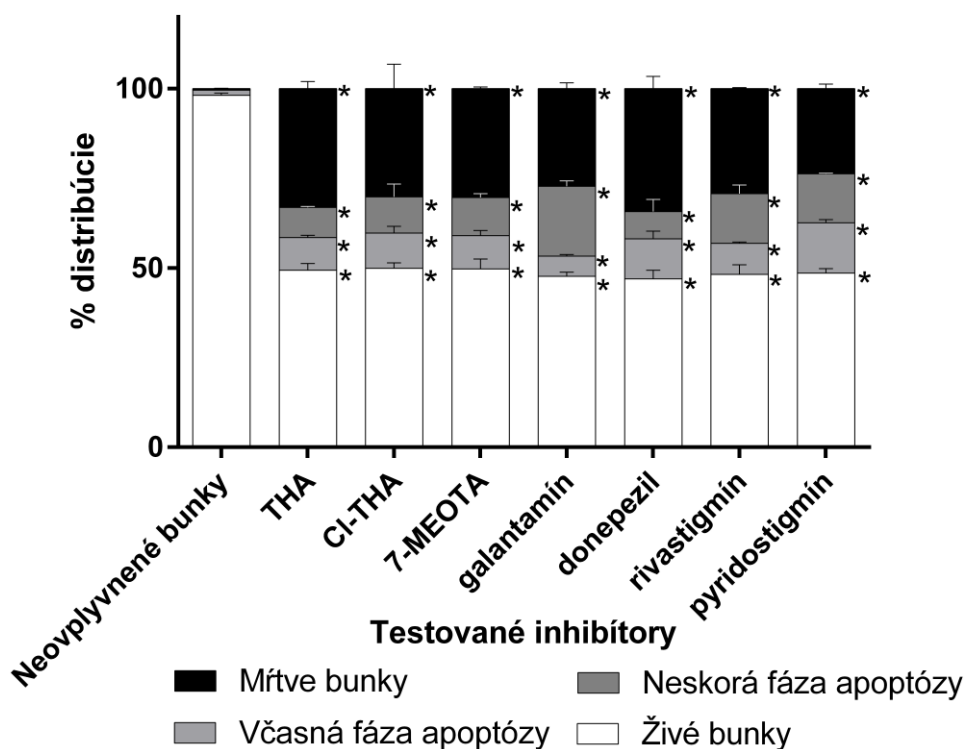
Percentuálna zmena apoptického profilu buniek SH-SY5Y je znázornená na obrázku 13. Po ovplyvnení týchto buniek jednotlivými iAChE bolo detekovaných 48 – 51 % viabilných buniek a nebol medzi nimi sledovaný štatisticky významný rozdiel.

Populácia včasne apoptických buniek bola najviac zastúpená u buniek ovplyvnených pyridostigmínom (nárast o 13 % oproti kontrolným bunkám). Populácia buniek v tejto fáze sa postupne znižovala v poradí: donepezil > CI-THA > rivastigmín > 7-MEOTA > THA > galantamín. Oproti bunkám kultivovaným iba v kultivačnom médiu bol sledovaný 10%, 8%, 8%, 8%, 8%, 7% a 4% nárast populácie buniek vo včasnej fáze apoptózy.

Ďalšou sledovanou fázou bola neskorá apoptóza. Najvýraznejšie zastúpenie buniek v tejto fáze bolo pozorované po ich ovplyvnení galantamínom (nárast o 19 % oproti kontrolným bunkám), nasledovaný dvojicou iAChE pyridostigmín a rivastigmín (oba nárast o 13 %). Ďalej sa počet buniek v tejto fáze postupne znižoval u buniek kultivovaných spolu CI-THA, 7-MEOTA, THA a donepezil. V porovnaní

s neovplyvnenou kontrolou bol sledovaný nárast počtu buniek v tejto fáze o 10 %, 10 %, 8 % a 7 %.

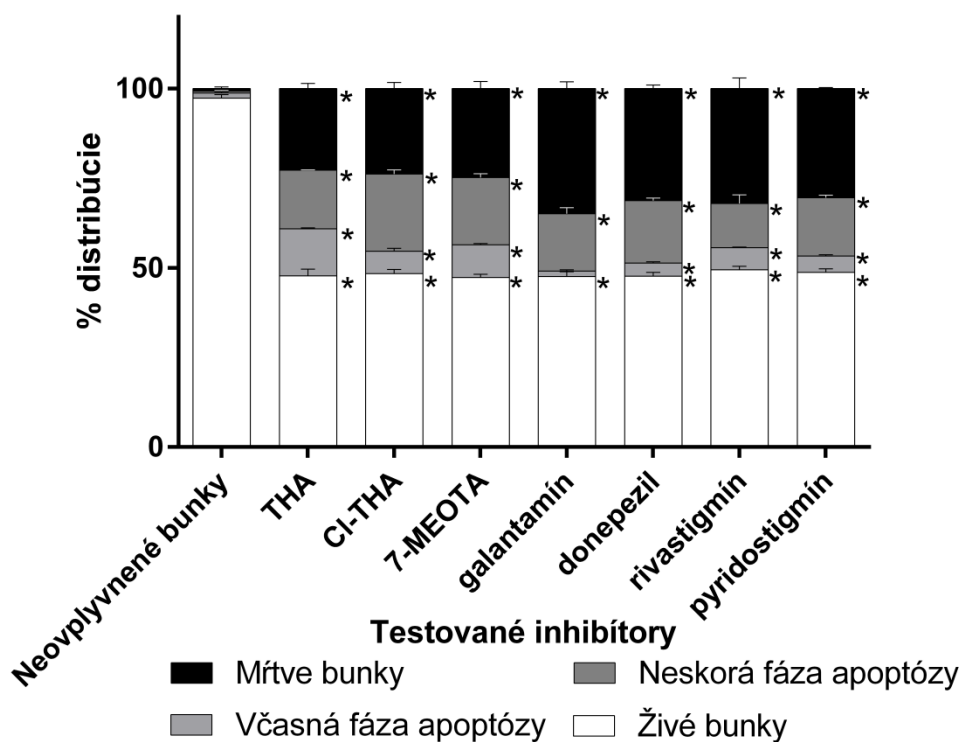
Nasledujúcou sledovanou populáciou boli nekrotické bunky, pričom najviac boli zastúpené po ovplyvnení SH-SY5Y buniek donepezilom (počet mŕtvych buniek bol zvýšený o 34 %), nasledovaný THA s 33% nárastom počtu nekrotických buniek. Ďalej sa táto populácia postupne znižovala v porovnaní s kontrolnými bunkami v poradí 7-MEOTA > rivastigmin > Cl-THA > galantamín > pyridostigmin, pričom počet nekrotických buniek bol zvýšený v porovnaní s neovplyvnenými bunkami o 30 %, 30 %, 29 %, 27 % a 23 %.



Obrázok 13 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek SH-SY5Y vyvolaných reverzibilnými/pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

NHLF boli poslednou líniou buniek, na ktorých bolo sledované percentuálne zastúpenie buniek v jednotlivých fázach apoptózy (obrázok 14). Počet živých buniek po ovplyvnení jednotlivými testovanými látkami predstavoval 49 až 51 %, pričom medzi testovanými látkami nebol sledovaný signifikantný rozdiel.

Bunky vo včasnej fáze apoptózy boli najviac zastúpené po ich ovplyvnení THA (11% nárast oproti kontrole). Populácia buniek v tejto fáze sa postupne znižovali v poradí: 7-MEOTA, Cl-THA, rivastigmín, pyridostigmín a donepezil (zvýšenie počtu včasne apoptických buniek o 8 %, 5 %, 5 %, 3 % a 2 %). U buniek inkubovaných galantamínom nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel.



Obrázok 14 - Zmeny apoptickej aktivity u buniek NHLF vyvolaných reverzibilnými/ pseudoreverzibilnými iAChE v časovom intervale 24 hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel oproti neovplyvnenej kontrole je vyznačený \* v prípade, že  $p \leq 0,05$

Bunky v neskoršej fáze apoptózy boli najviac zastúpené po ich ovplyvnení CI-THA (21% zväčšenie populácie buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami). Táto populácia sa ďalej znižovala po inkubáciách s jednotlivými iAChE v poradí: 7-MEOTA, donepezil, THA, pyridostigmín, galantamín a rivastigmín. Jej nárast v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou bol o 18 %, 17 %, 16 %, 16 %, 15 % a 12 %.

Najvyšší podiel nekrotických buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami bol sledovaný po ich inkubáciách s galantamínom (nárast o 34 % oproti kontrole). Počet nekrotických buniek klesal po inkubáciách s testovanými iAChE v nasledujúcom poradí: rivastigmín, donepezil, pyridostigmín, 7-MEOTA, CI-THA a THA (počet mŕtvych buniek bol zvýšený o 31 %, 31 %, 30 %, 24 %, 23 % a 22 % v porovnaní s kontrolnými bunkami).

### **4.3 Zmeny intracelulárnej hladiny RONS v kontexte s viabilitou buniek**

#### **4.3.1 Reaktivátory AChE**

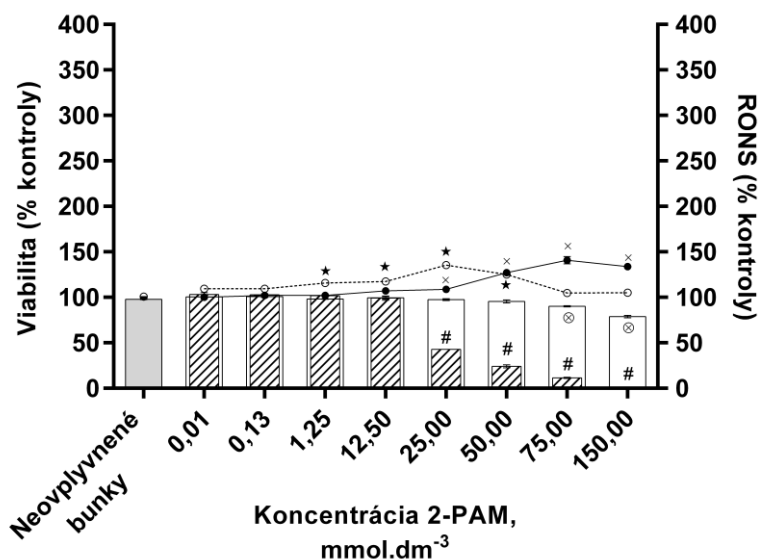
Sledovanie zmien intracelulárnej hladiny RONS po 4- a 24-hodinovej inkubáciách s jednotlivými testovanými rAChE bolo prevedené pomocou metódy, ktorá využíva fluorescenčnú sondu DCF-DA. K stanoveniu viability buniek (rovnaké časové intervaly ako pri detekcii RONS) bola použitá kolorimetrická metóda využívajúca MTT. Toto testovanie bolo uskutočnené na bunkovej línii HepG2.

Zmena intracelulárnej hladiny RONS spolu so zmenou viability buniek po ich ovplyvnení 2-PAM v 4- a 24-hodinovom časovom intervale je znázornená na obrázku 15.

Po 4 hodinách inkubácie nastal pokles viability, v prípade že bunky boli kultivované s 2-PAM v koncentráciách 75 a 150  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (8% a 19% pokles oproti neovplyvnenej kontrole). Intracelulárna hladina RONS bola zvýšená po 4-hodinovej inkubáciách v prípade, že bunky boli vystavené koncentráciám v rozsahu 25 – 150  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  s maximom pri koncentracii 75  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (hladina RONS zvýšená 1,4-krát). Pokles životaschopnosti buniek po 24 hodinách bol pozorovaný pri testovaných koncentráciách v rozmedzí 25 – 150  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (zníženie prežívajúcich buniek oproti



neovplyvnenej kontrole o 55 – 97 %). Signifikantný nárast hladiny RONS bol pozorovaný po 24 hodinách v rozsahu koncentrácií 1,25 – 50 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom maximálne zvýšenie bolo sledované pri koncentrácií 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (hladina RONS zvýšená 1,3-krát).



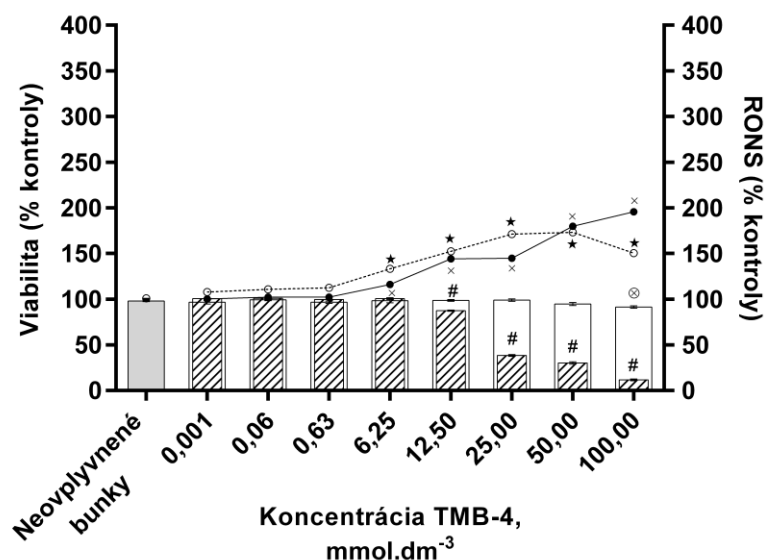
Obrázok 15 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom 2-PAM. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Zmeny intracelulárnej hladiny RONS a bunkovej viability po ich ovplyvnení TMB-4 v 4- a 24-hodinovom časovom intervale sú znázornené na obrázku 16.

Pokles viability buniek po 4 hodinách inkubácie bol sledovaný pri testovanej koncentrácií 100 mmol.dm<sup>-3</sup> (zníženie viability o 7 %). Nárast hladiny RONS v bunkách bol pozorovaný po 4-hodinovej inkubácii pri použitých koncentráciách v rozmedzí 6,25 – 100 mmol.dm<sup>-3</sup>. Maximálne zvýšenie hladiny RONS bolo pozorované pri koncentrácií 100 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bol pozorovaný 1,9-násobný nárast. Pokles životaschopnosti buniek po 24 hodinách bol pozorovaný pri testovaných

koncentráciách v rozmedzí 12,50 – 100 mmol.dm<sup>-3</sup> (zistený 10- až 86% pokles viability buniek). Po 24 hodinách bola zmena hladiny RONS pozorovaná pri testovaných koncentráciách v rozsahu 6,25 – 100 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom najvyšší nárast bol sledovaný pri koncentrácií 50 mmol.dm<sup>-3</sup> (hladina RONS zvýšená 1,7-krát).



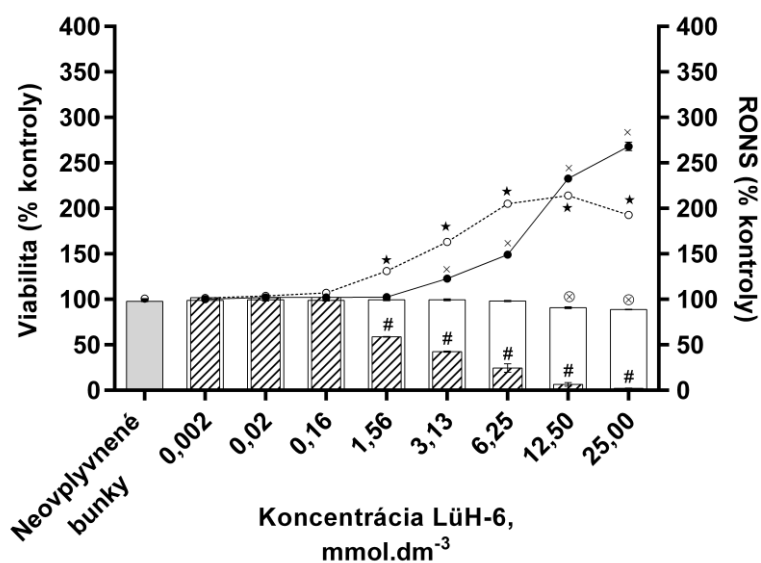
Obrázok 16 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom TMB-4. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Na obrázku 17 je znázornená zmena produkcie RONS v bunkách spolu s prežívaním buniek po 4- a 24- hodinovej inkubácii s LüH-6.

Viabilita buniek signifikantne poklesla po 4 hodinách pri koncentráciách 12,50 mmol.dm<sup>-3</sup> a 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (pokles o 7 % a 9 % oproti neovplyvnenej kontrole). Produkcia intracelulárnych RONS kontinuálne narastala v rozmedzí testovaných koncentrácií 3,13 až 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom maximum dosiahla pri koncentrácií 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (nárast RONS oproti neovplyvnenej kontrole 2,7-krát). V 24-hodinovom

intervale bol sledovaný významný pokles životaschopnosti buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami po ich ovplyvnení koncentraciami v rozsahu od 1,56 do 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (zníženie prežívajúcich buniek o 55 – 96 %). Zmena intracelulárnej hladiny RONS oproti neovplyvneným bunkám bola v 24-hodinovom intervale zistená v rozmedzí koncentrácií 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom najvýraznejšia zmena bola pozorovaná pri koncentracii 12,5 mmol.dm<sup>-3</sup> (2,1-násobné zvýšenie produkcie RONS).



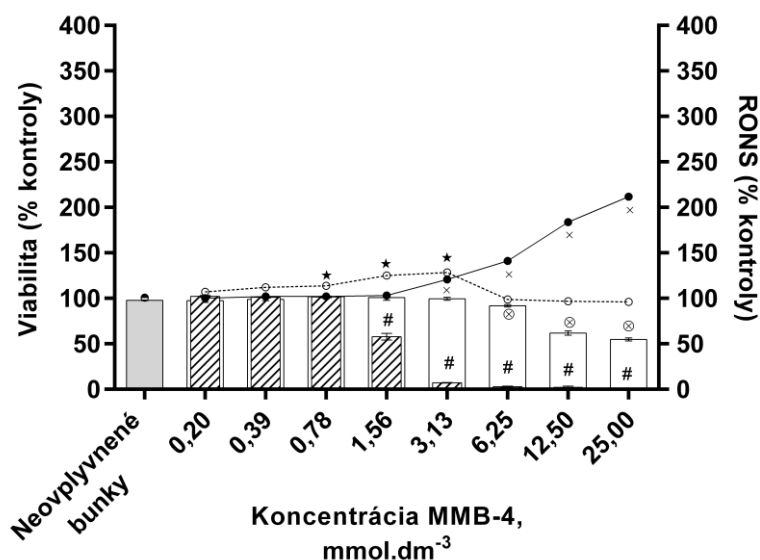
Obrázok 17 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom LüH-6. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Indukcia produkcie RONS a zmena bunkovej viability v sledovaných časových intervaloch po ovplyvnení reaktivátorom MMB-4 je znázornená na obrázku 18.

V 4-hodinovom časovom intervale došlo k významnému poklesu živých buniek po ich ovplyvnení MMB-4 koncentraciami od 6,25 do 25 mmol.dm<sup>-3</sup> o 6,2 – 43 %. Hladina

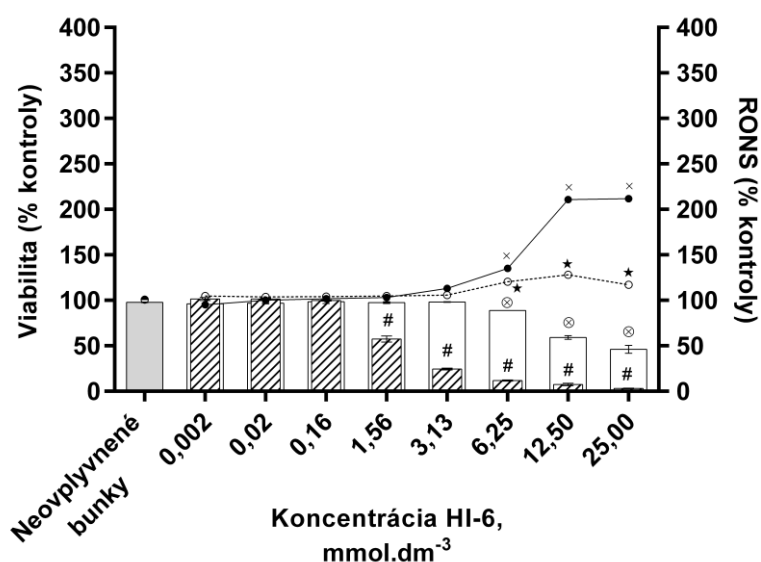
intracelulárnych RONS bola po 4-hodinovej inkubácii spolu s testovanou látkou MMB-4 v koncentráciách 3,13 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup> zvýšená. Maximum bolo dosiahnuté pri použití koncentrácie 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (2,1-násobné zvýšenie v porovnaní s kontrolnými bunkami). V časovom intervale 24 hodín došlo k poklesu viability buniek, v prípade inkubácie buniek spolu s koncentraciami 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (pokles životaschopnosti buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami o 40 – 97 %). Signifikantné zvýšenie intracelulárnej hladiny RONS bolo sledované po ovplyvnení buniek koncentraciami 0,78 až 3,13 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom najvýraznejší nárast bol zistený pri použitej koncentracii 3,13 mmol.dm<sup>-3</sup> (zvýšenie produkcie RONS oproti neovplyvnenej kontrole 1,3-krát).



Obrázok 18 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom MMB-4. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Zmena bunkovej viability a intracelulárnej hladiny RONS v časových intervaloch 4 a 24 hodín po ovplyvnení buniek reaktivátorom HI-6 je znázornená na obrázku 19.

Významný pokles životaschopných buniek nastal v 4-hodinovom intervale pri použití koncentrácií 6,25 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (oproti neovplyvnenej kontrole bola viabilita buniek znížená o 9 až 52 %). Zvýšenie hladiny RONS v bunkách bolo sledované v koncentráciách 6,25 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom maximálna produkcia RONS bola dosiahnutá pri koncentrácií 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (2,1-násobné zvýšenie oproti hladine RONS v kontrolných bunkách).



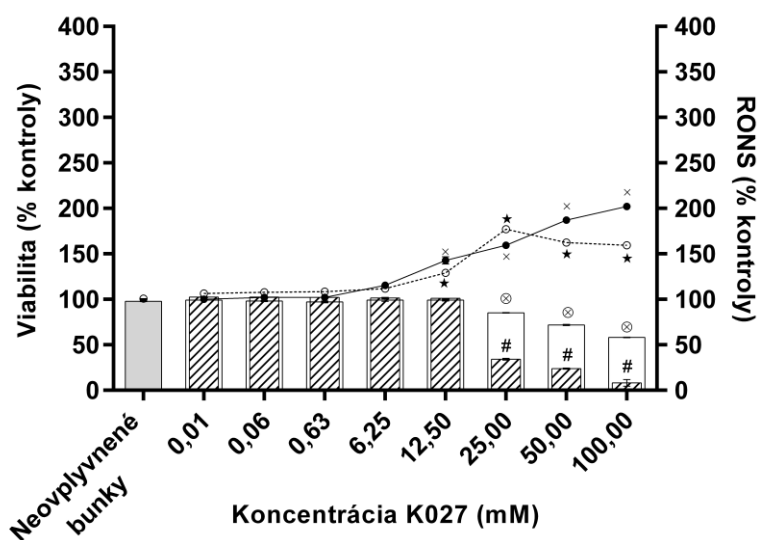
Obrázok 19 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek reaktivátorom HI-6. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Po 24 hodinách inkubácie s HI-6 došlo k štatisticky významnému poklesu prežívajúcich buniek pri použití koncentrácií v rozsahu 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (40 – 95%

zníženie). Signifikantné zvýšenie produkcie RONS bolo sledované v časovom intervale 24 hodín v prípade zvolenej koncentrácie 6,25 až 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom maximálna indukcia produkcie RONS bolo pozorované pri koncentrácií 12,5 mmol.dm<sup>-3</sup> (1,3-násobný intracelulárny nárast RONS oproti kontrole).

Ďalšou testovanou látkou bol oxím K027. Jeho účinok na viabilitu buniek a intracelulárnu hladinu RONS je znázornený na obrázku 20.

Štatisticky významný pokles živých buniek nastal po ich ovplyvnení oxímom K027 v koncentráciách 25 – 100 mmol.dm<sup>-3</sup> v časom intervale 4 hodiny (zaznamenaný pokles v porovnaní s kontrolnými bunkami o 13 – 40 %). Po 4 hodinách bol sledovaný nárast RONS po použití koncentrácií 12,5 – 100 mmol.dm<sup>-3</sup>. Maximálna produkcia bola zistená po ovplyvnení buniek koncentráciou 100 mmol.dm<sup>-3</sup> (2,0-násobný nárast oproti kontrole).

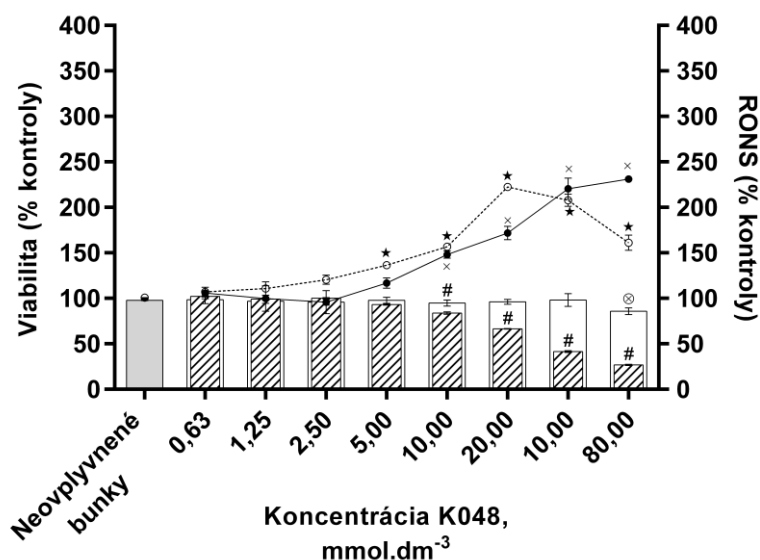


Obrázok 20 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K027. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Pokles bunkovej viability po 24-hodinovej inkubácii bol zistený pri koncentráciách v rozsahu od 25 do 100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (v porovnaní s kontrolnými bunkami sa viabilita buniek znížila o 64 až 90 %). V rozsahu použitých koncentrácií 12,5 – 100  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  bol sledovaný po 24-hodinovej inkubácii Signifikantný nárast produkcie RONS, pričom maximum bolo dosiahnuté pri 25  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  (oproti neovplyvneným bunkám došlo k 1,8-násobnému nárastu intracelulárnych RONS).

Zmena bunkovej viability a intracelulárnej hladiny RONS po ovplyvnení buniek oxímom K048 je znázornená na obrázku 21.

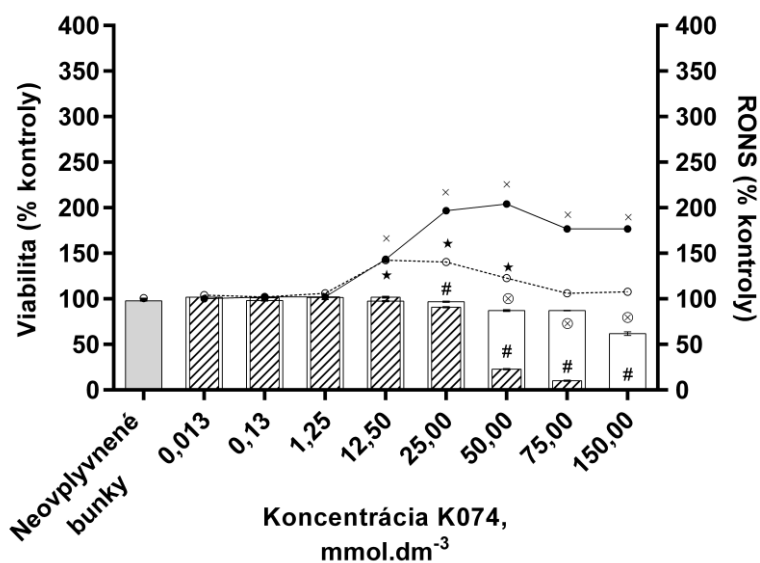


Obrázok 21 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K048. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Oxím K048 vyvolal signifikantný pokles viability buniek po 4-hodinovom časovom intervale iba pri najvyššej testovanej koncentrácii (80  $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , 12% pokles oproti

neovplyvnenej kontrole). Po 4 hodinovej inkubácie s oxímom K048 bola hladina RONS v bunkách zvýšená po použití koncentrácií v rozmedzí od 10 do 80  $\text{mmol.dm}^{-3}$ . Najvýraznejšie zvýšenie RONS bolo pozorované pri koncentracii 80  $\text{mmol.dm}^{-3}$  (nárast RONS 2,3-krát oproti kontrolným bunkám). Štatisticky významný pokles viabilných buniek voči kontrole bol po 24-hodinovom časovom intervale sledovaný v prípade použitia koncentrácií 10 až 80  $\text{mmol.dm}^{-3}$  (bunková viabilita bola znížená o 14 až 71 %). Intracelulárny level RONS sa výrazne zvýšil po 24-hodinovej inkubácii buniek spolu s K048 v koncentraciách 5 – 80  $\text{mmol.dm}^{-3}$ . Maximálny nárast bol pritom pozorovaný pri koncentracii 20  $\text{mmol.dm}^{-3}$  (2,2-násobné zvýšenie hladiny RONS oproti kontrolným bunkám).

Ďalším testovaným oxímom zo série K bola látka K074. Zmena viability a hladiny RONS v bunkách po 4- a 24-hodinovej inkubácii je zobrazená na obrázku 22.



Obrázok 22 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K074. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)



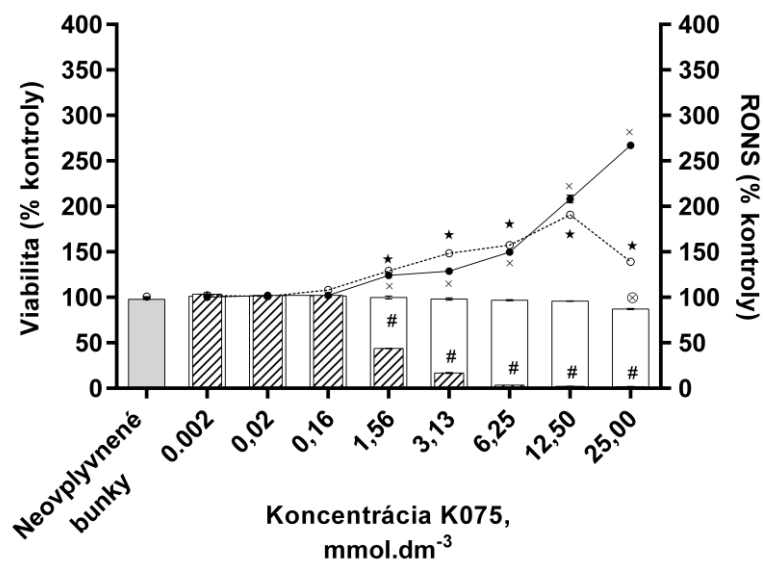
Po 4-hodinovej inkubácii s oxímom K074 bol pozorovaný pokles viability pri použitých koncentráciách 50 – 150 mmol.dm<sup>-3</sup> (11 – 36% pokles oproti kontrole, ktorá reprezentovala neovplyvnené bunky). Intracelulárna hladina RONS bola signifikantne zvýšená oproti kontrolným bunkám po ovplyvnení koncentraciami v rozmedzí od 12,5 až 150 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom najvýraznejší nárast bol pozorovaný pri koncentracii 50 mmol.dm<sup>-3</sup> (hladina RONS v bunkách bola zvýšená oproti kontrole 2,0-krát).

V 24-hodinovom intervale došlo k štatisticky významnému poklesu viability buniek po ich inkubácii s oxímom K074 v koncentráciách 25 – 150 mmol.dm<sup>-3</sup> (pokles v porovnaní s kontrolnými bunkami o 7 – 97 %). Vnútro bunková hladina RONS po 24 hodinách inkubácie bola zvýšená v koncentračnom rozmedzí od 12,5 do 50 mmol.dm<sup>-3</sup>. Najvýraznejší vzostup voľných radikálov v bunkách bol sledovaný pri 12,5 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bol v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou detekovaný 1,4-násobný nárast RONS.

Ďalšou látkou, ktorá bola testovaná, bol oxím K075 a jeho schopnosť indukovať zmenu viability a hladiny RONS v bunke je znázornená na obrázku 23.

Po jeho 4-hodinovom pôsobení na bunky HepG2 sme sledovali pokles viability iba v najvyššej testovanej koncentracii (25 mmol.dm<sup>-3</sup>, 11% pokles oproti kontrolným bunkám). Zvýšená produkcia RONS v bunkách po 4 hodinovej inkubácii bola pozorovaná pri koncentráciách v rozmedzí 1,56 - 25 mmol.dm<sup>-3</sup>. Najvýraznejší nárast bol pritom pozorovaný pri koncentracii 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (zvýšenie hladiny RONS 2,7-krát v porovnaní s kontrolou).

Pokles bunkovej viability po 24 hodinách bol sledovaný v rozmedzí koncentracii 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>. Pri inkubácii s oxímom K075 v tomto koncentračnom rozmedzí bol sledovaný pokles životaschopnosti buniek medzi 54 až 96 %. Intracelulárna hladina RONS bola v 24-hodinovom intervale zvýšená pri koncentráciách od 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom pri koncentracii 12,5 mmol.dm<sup>-3</sup> sme sledovali najvýraznejšie zvýšenie hladiny voľných radikálov (1,9-násobný nárast v porovnaní s neovplyvnenými bunkami).

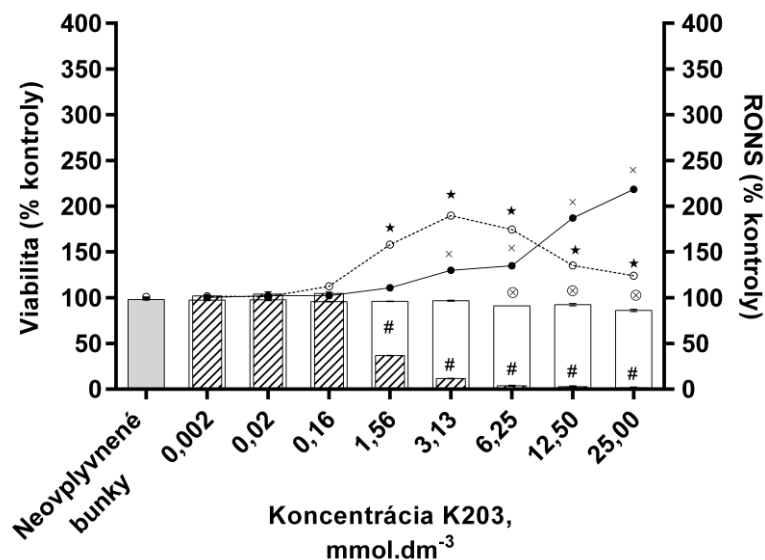


Obrázok 23 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K075. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:   
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),   
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),   
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),   
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Posledným testovaným reaktivátorom zo série K bol oxím K203. Zmena bunkovej viability a RONS v bunkách je znázornená na obrázku 24.

Viabilita buniek po 4 hodinách inkubácie poklesla pri koncentráciách v intervale 6,25 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bolo pozorované zníženie životaschopnosti buniek o 7 – 11 % v porovnaní s kontrolnými bunkami. V časovom intervale 4 hodiny bola hladina RONS v bunkách zvýšená v prípade použitia testovaných koncentrácií v rozmedzí 3,13 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup>. Najvýraznejší nárast produkcie RONS bol sledovaný pri 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (2,2-násobné zvýšenie v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou). Po 24 hodinách došlo k poklesu viability buniek v koncentračnom rozmedzí 1,56 – 25 mmol.dm<sup>-3</sup> (pričom bol detekovaný pokles o 61 – 96 %). Intracelulárna hladina RONS bola po 24-hodinovej inkubácii signifikantne zvýšená v koncentráciách od 1,56 do 25

mmol.dm<sup>-3</sup>, s maximom pri koncentracii 3,13 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom nárast oproti neovplyvnenej kontrole bol 1,9-násobný.



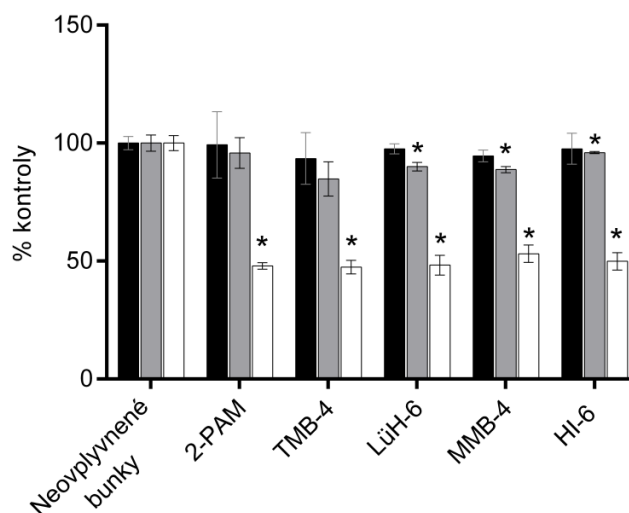
Obrázok 24 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek oxímom K203. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

#### 4.3.1.1 Porovnanie schopnosti rAChE indukcie RONS v bunkách

Pre porovnanie schopnosti rAChE indukovať zmenu intracelulárnej hladiny kyslíkatých a dusíkatých voľných radikálov, boli bunky HepG2 vystavené pôsobeniu testovanými oxímami po dobu 1, 4 a 24 hodín v koncentraciách, ktoré odpovedali jednotlivým hodnotám IC<sub>50</sub>. Voľné radikály v bunkách boli stanovené použitím 3 fluorescenčných sond, a to DCF-DA, DHE a 4,5-DAF. Paralelne som stanovením hladiny RONS v bunkách bola stanovená aj viabilita buniek v jednotlivých časových intervaloch pomocou kolorimetrickej metódy využívajúcej tetrazóliovú soľ MTT.

Zmena bunkovej viability po ich ovplyvnení štandardne používanými rAChE v časových intervaloch 1, 4 a 24 hodín je znázornená na obrázku 25.

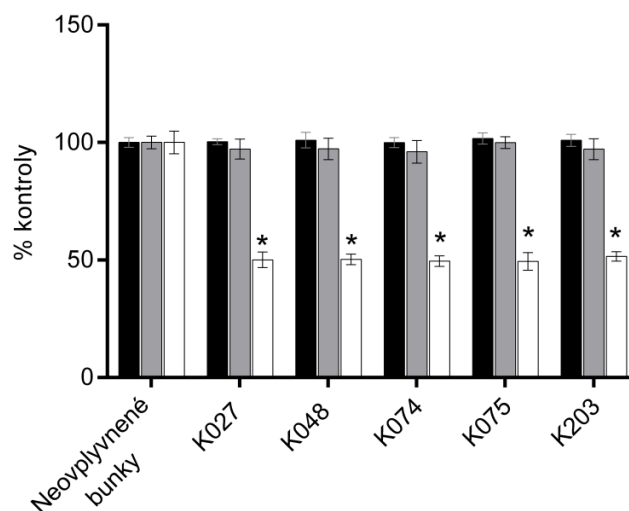


Obrázok 25 - Zmena viability buniek po ich ovplyvnení štandardne používaných rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Po 1-hodinovej inkubácii neboli pozorované žiadne signifikantné zmeny. V časovom intervale 4 hodiny poklesla životaschopnosť buniek po ich ovplyvnení reaktivátorom LüH-6, MMB-4 a HI-6 na 85 %, 89 % a 95 % viabilných buniek v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. Po 24-hodinovej inkubácii predstavovali živé bunky 48 % (2-PAM), 47 % (TMB-4), 48 % (LüH-6), 53 % (MMB-4) a 50 % (HI-6). Medzi jednotlivými testovanými látkami nebol pozorovaný signifikantný rozdiel.

Zmena viability buniek po ich inkubácii s oxímami zo série K: K027, K048, K074, K075 a K203 v časovom intervale 1, 4 a 24 hodín je znázornená na obrázku 26.

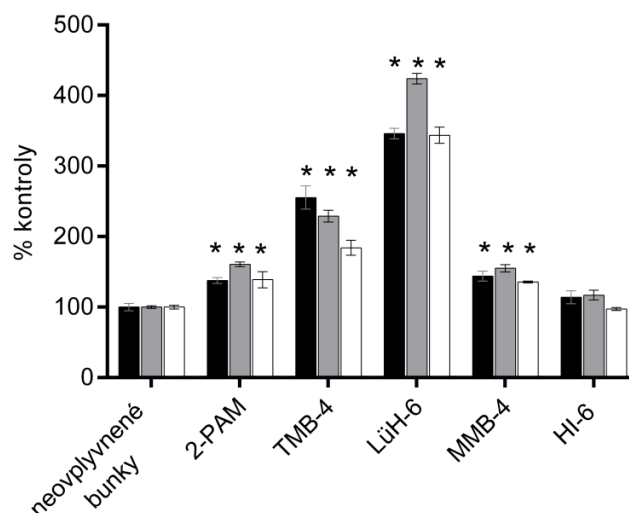
V 1- a 4-hodinovom intervale nebol v porovnaní s neovplyvnenými bunkami pozorovaný žiadny štatisticky významný rozdiel. Po 24-hodinovej inkubácii došlo k poklesu živých buniek na 50 % (K027), 51 % (K048), 49 % (K074), 50 % (K075) a 51 % (K203) a medzi jednotlivými látkami nebol sledovaný signifikantný rozdiel.



Obrázok 26 - Zmena viability buniek po ich ovplyvnení oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Zmena intracelulárnej hladiny RONS detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DCF-DA v časových intervaloch 1, 4 a 24 hodín po ovplyvnení štandardne používanými rAChE je znázornená na obrázku 27.

Po 1-hodinovom časovom intervale bolo množstvo RONS signifikantne zvýšené po ovplyvnení buniek všetkými sledovanými látkami, pričom najvýraznejšia zmena bola detekovaná u LüH-6 (zvýšenie hladiny RONS v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou 3,5-krát) nasledovaný reaktivátormi TMB-4 (2,6-krát), 2-PAM (1,4-krát) a MMB-4 (1,4-krát). V časovom intervale 4 hodiny bola sledovaná opäť najvýraznejšia zmena v hladine RONS po ovplyvnení buniek LüH-6 (zvýšenie RONS 4,2-krát v porovnaní s kontrolnými bunkami) nasledovaným TMB-4 (2,3-krát), 2-PAM (1,6-krát) a MMB-4 (1,6-krát). LüH-6 vyvolal najsilnejšiu indukciu RONS v bunkách aj po 24-hodinovej inkubácii (nárast 3,4-krát v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou). Hladina RONS postupne klesala po ovplyvnení buniek jednotlivými látkami v poradí TMB-4 (1,8-násobne), 2-PAM a MMB-4 (obe látky indukovali 1,4-násobný nárast).



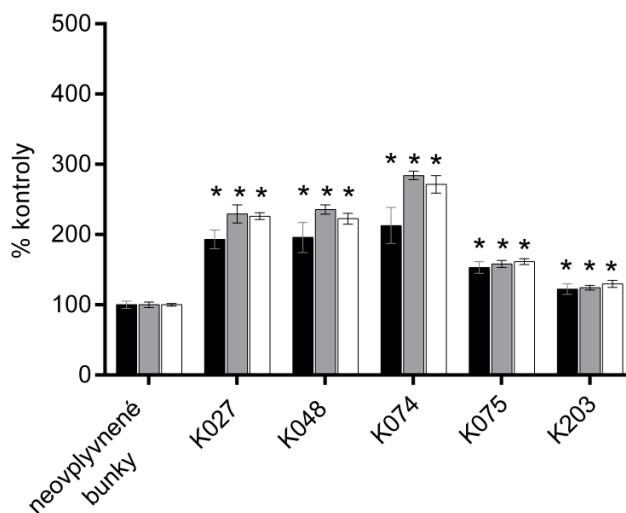
Obrázok 27 - Zmena intracelulárnej hladiny RONS pomocou fluorescenčnej sondy DCF-DA po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Zmena hladiny RONS v bunkách po ich ovplyvnení oxímami zo série K po 1-, 4- a 24-hodinovom časovom intervale je znázornené na obrázku 28.

V porovnaní s bunkami inkubovanými so samotným kultivačným médiom bola po 1-hodinovej inkubácii detekovaná najvýraznejšia zmena po ich ovplyvnení oxímom K074 (2,1-násobný nárast) nasledovaný oxímami K027 a K048 (oba 1,9-násobný), K075 (1,5-násobný) a K203 (1,2-násobný).

V ďalšom časovom intervale (4 hodiny) došlo v porovnaní s kontrolnými bunkami k signifikantnému nárastu u všetkých testovaných oxímov, pričom najsilnejšiu indukciu RONS v bunkách vyvolal oxím K074 (zvýšenie 2,8-krát) nasledovaný oxímami K048 (2,4-krát), K027 (2,3-krát), K075 (1,58-krát) a K203 (1,2-krát). V poslednom časovom intervale bola detekovaná štatisticky významná zmena v porovnaní s neovplyvnenými bunkami opäť u všetkých sledovaných oxímov, pričom najvýraznejšia zmena bola zistená u oxímu K074 (nárast 2,7-krát). Produkcia RONS v bunkách postupne klesala

v nasledujúcom poradí: K027 (2,3-krát), K048 (2,2-krát), K075(1,6-krát) a K203 (1,3-krát).

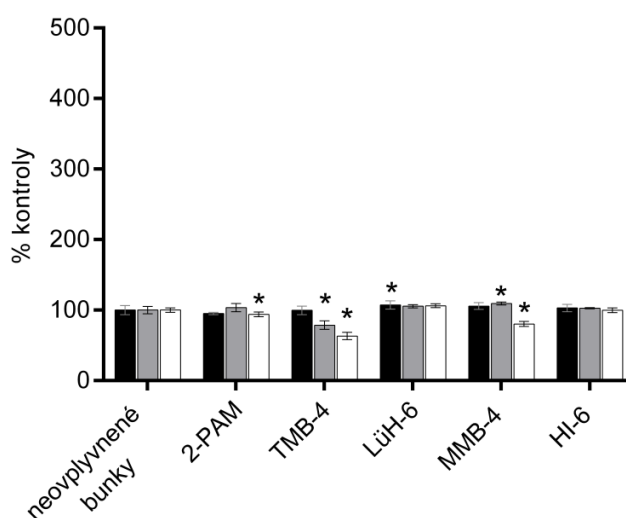


Obrázok 28 - Zmena intracelulárnej hladiny RONS pomocou fluorescenčnej sondy DCF-DA po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Zmena hladiny  $O_2^{\bullet-}$  v bunkách bola detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DHE v časových intervaloch 1, 4 a 24 hodín po ovplyvnení štandardne používanými rAChE a je znázornená na obrázku 29.

V časovom intervale 1 hodina došlo v porovnaní s neovplyvnenými bunkami k signifikantnému nárastu produkcie  $O_2^{\bullet-}$  po inkubácii buniek s LüH-6 (1,1-násobný nárast). Po 4 hodinách inkubácie s testovanými rAChE došlo k štatisticky významnému zvýšeniu hladiny  $O_2^{\bullet-}$  v prípade použitia MMB-4 (1,1-násobný zvýšenie). Na druhej strane v prípade inkubácie buniek s TMB-4 došlo k signifikantnému poklesu produkcie  $O_2^{\bullet-}$  o 21 %. V poslednom časovom intervale (24 hodín) nastal štatisticky významný

pokles hladiny  $O_2^{\bullet-}$  po ovplyvnení buniek TMB-4 (pokles o 37 %), MMB-4 (20 %) a 2-PAM (6 %).

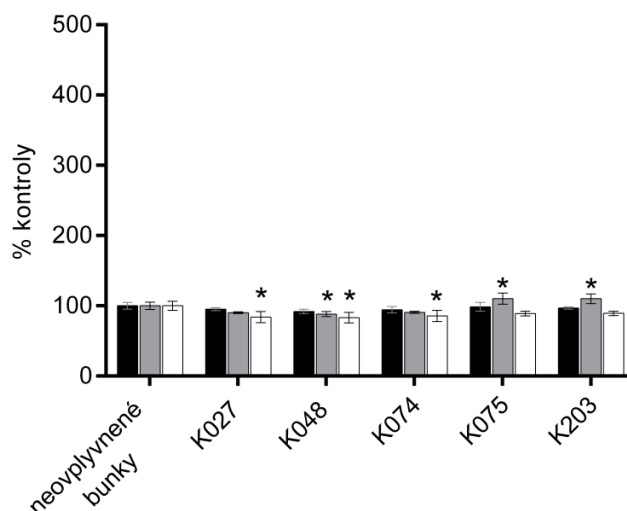


Obrázok 29 - Zmena hladiny  $O_2^{\bullet-}$  v bunkách detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DHE po ovplyvnení buniek po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentraciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Zmena hladiny  $O_2^{\bullet-}$  v bunkách po 1, 4 a 24 hodinách inkubácie spolu s oxímami z K-série je znázornená na obrázku 30.

V prvom časovom úseku (1 hodina) nebola pozorovaná žiadna významná zmena v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou. Po 4-hodinovej inkubácii s testovanými látkami došlo k štatisticky významnému nárastu u oxímov K075 a K203 (v oboch prípadoch bol sledovaný 1,1-násobný nárast v porovnaní s kontrolnými bunkami). Naopak po ovplyvnení buniek oxímom K048 bol po 4 hodinách zistený významný pokles hladiny  $O_2^{\bullet-}$  o 12 %. V poslednom sledovanom inkubačnom intervale 24 hodín bol pozorovaný pokles hladiny  $O_2^{\bullet-}$  po ovplyvnení buniek oxímami K027, K048 a K074. Najvýraznejší zostup levelu intracelulárneho  $O_2^{\bullet-}$  bol detekovaný u oxímu K048 (o 17 %) nasledovaný oxímami K027 (16 %) a K074 (14 %).

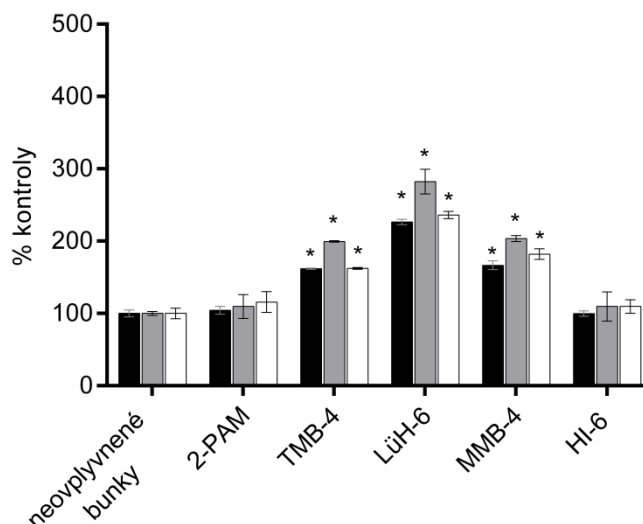




Obrázok 30 - Zmena hladiny O<sub>2</sub>•- v bunkách detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy DHE po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentráciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov IC<sub>50</sub> v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

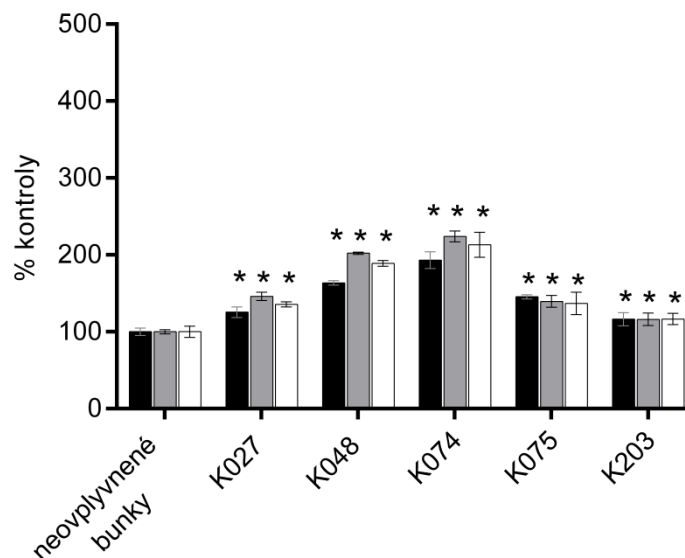
Zmena intracelulárnej hladiny NO, ktorá bola detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-DAF v časovom intervale 1, 4 a 24 hodín je na obrázku 31.

Po 1-hodinovej inkubácii došlo k signifikantnej zmene po ovplyvnení buniek TMB-4, LüH-6 a MMB-4, pričom najvýraznejší nárast NO v bunkách vyvolal LüH-6 (2,3-násobný nárast v porovnaní s neovplyvnenými bunkami), nasledovaný MMB-4 (1,7-krát) a TMB-4 (1,6-krát). V ďalšom sledovanom intervale (4 hodiny) vyvolal LüH-6 opäť najsilnejšiu indukciu produkcie NO (2,8-násobné zvýšenie v porovnaní s kontrolnými bunkami). Signifikantnú zmenu opäť vyvolal aj MMB-4 (2,1-násobné zvýšenie) a TMB-4 (1,9-násobné zvýšenie). V poslednom sledovanom intervale bola znova pozorovaná najsilnejšia produkcia NO v bunkách sledovaná po stimulácii buniek LüH-6 (1,8-násobné zvýšenie oproti kontrole) a štatisticky významný nárast levelu NO vyvolal aj MMB-4 (zvýšenie 1,8-krát) a TMB-4 (1,6-krát).



Obrázok 31 - Zmena intracelulárnej hladiny NO detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-DAF po ovplyvnení buniek štandardne používanými rAChE koncentraciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

Zmena hladiny NO v bunkách vyvolaná po 1-, 4- a 24-hodinovej inkubácií s oxímami z K-série je znázornená na obrázku 32. V prvom sledovanom časovom intervale sa ako najsilnejší induktor produkcie NO javil oxím K074 (v porovnaní s kontrolou nárast intracelulárneho NO 1,9-krát). Produkcia NO po 1-hodinovej stimulácii buniek jednotlivými oxímami ďalej klesala v poradí K048 (1,6-násobný nárast), K075 (1,5-násobný nárast), K027 (1,3-násobný nárast) a K203 (1,2-násobný nárast). V 4-hodinovom časovom intervale bola opäť najsilnejším induktorom produkcie NO oxím K074 (2,2-násobné zvýšenie v porovnaní s neovplyvnenými bunkami) nasledovaný oxímami K048 (zvýšenie 1,9-krát), K027 (zvýšenie 1,5-krát), K075 (1,4-krát) a K203 (1,2-krát). Po 24 hodinách inkubácie vyvolal oxím K074 najvyššiu intracelulárnu produkciu NO (2,1-násobné zvýšenie v porovnaní s kontrolnými bunkami). Množstvo NO v bunkách sa postupne znižovalo po ovplyvnení jednotlivými oxímami v 24-hodinovom časovom intervale v poradí K048 (zvýšenie 1,9-krát), K075 (1,4-krát), K027 (1,3-krát) a K203 (1,2-krát).



Obrázok 32 Zmena intracelulárnej hladiny NO detekovaná pomocou fluorescenčnej sondy 4,5-DAF po ovplyvnení buniek oxímami zo série K koncentraciou odpovedajúcou hodnotám toxikologických indexov  $IC_{50}$  v časovom intervale 1 (čierny stĺpec), 4 (šedý stĺpec) a 24 (biely stĺpec) hodín. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený \*

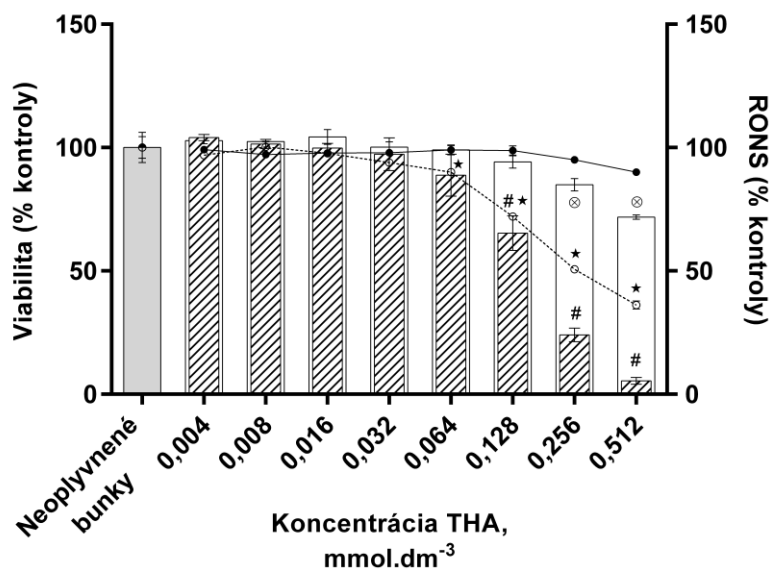
#### 4.3.2 Inhibítory AChE

Sledovanie zmien intracelulárnej hladiny RONS po 4- a 24-hodinovej inkubácii s jednotlivými testovanými iAChE bolo prevedené pomocou metódy využívajúcej fluorescenčné farbivo DCF-DA. Súbežne so sledovaním intracelulárnej hladiny RONS bola testovaná aj viabilita buniek v rovnakých časových intervaloch pomocou kolorimetrickej metódy využívajúcej tetrazóliovú soľ MTT.

Zmena intracelulárnej hladiny RONS spolu so zmenou viability buniek po ich ovplyvnení THA v 4- a 24-hodinovom časovom intervale je znázornená na obrázku 33.

V časovom intervale 4 hodiny bol detekovaný pokles viability buniek o 15 a 28 % v prípade použitia koncentrácií 0,256 a 0,512  $mmol.dm^{-3}$  v porovnaní s kontrolou, ktorá predstavovala bunky inkubované s čistým kultivačným médiom. Pokles životaschopnosti buniek po 24 hodinách bol pozorovaný pri testovaných koncentráciách

v rozmedzí 0,128 – 0,512 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bolo sledované zníženie prežívajúcich buniek oproti neovplyvnenej kontrole o 35 až 95 %. Po 24-hodinovej inkubácii bol sledovaný signifikantný pokles intracelulárnej hladiny RONS pri použití koncentrácií v rozsahu 0,064 – 0,512 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom hladina RONS bol znížená o 10 – 64 % v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou.

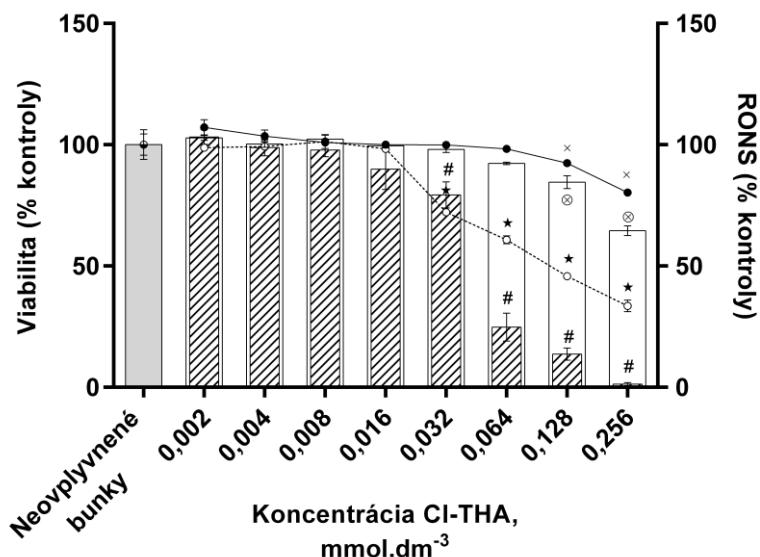


Obrázok 33 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom THA. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

V prípade inkubácie buniek spolu s reverzibilným iAChE Cl-THA (obrázok 34) po dobu 4 hodiny došlo k signifikantnému poklesu viability buniek pri najvyšších testovaných koncentráciách, a to 0,256 mmol.dm<sup>-3</sup> (pokles o 35 %) a 0,128 mmol.dm<sup>-3</sup> (o 16 %). Pri oboch vyššie spomenutých koncentráciách došlo v 4-hodinovom časovom

intervale aj k poklesu intracelulárnych RONS o 20 a 8 % v porovnaní s kontrolnými bunkami.

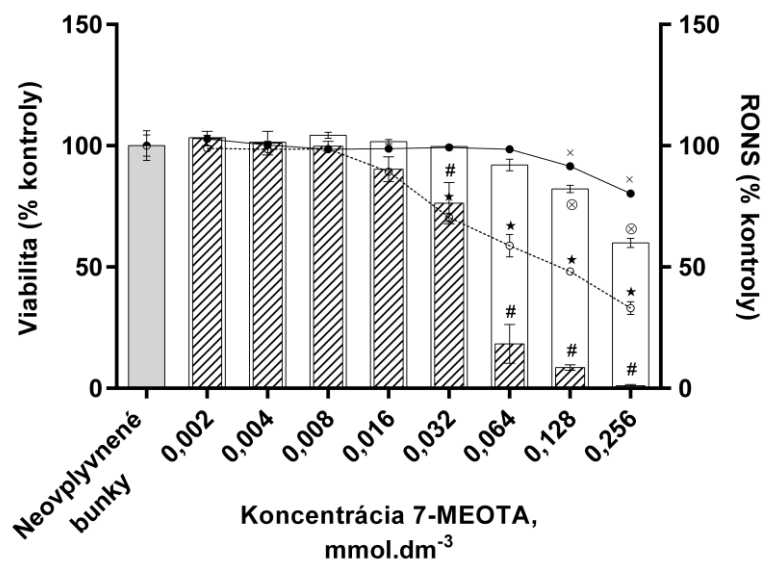


Obrázok 34 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom CI-THA. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Po 24-hodinovej inkubácii došlo k štatisticky významnému zníženiu bunkovej životaschopnosti v rozmedzí koncentrácií 0,032 – 0,256 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bol pozorovaný oproti kontrolným bunkám 21 až 99% pokles viability. S poklesom viability bola taktiež pozorovaná redukcia hladiny RONS v bunkách pri vyššie zmienovaných koncentráciách (28 až 66% zníženie hladiny intracelulárnych RONS v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou).

Zmena viability buniek a intracelulárnej hladiny RONS po ich inkubácii s 7-MEOTA je znázornená na obrázku 35.

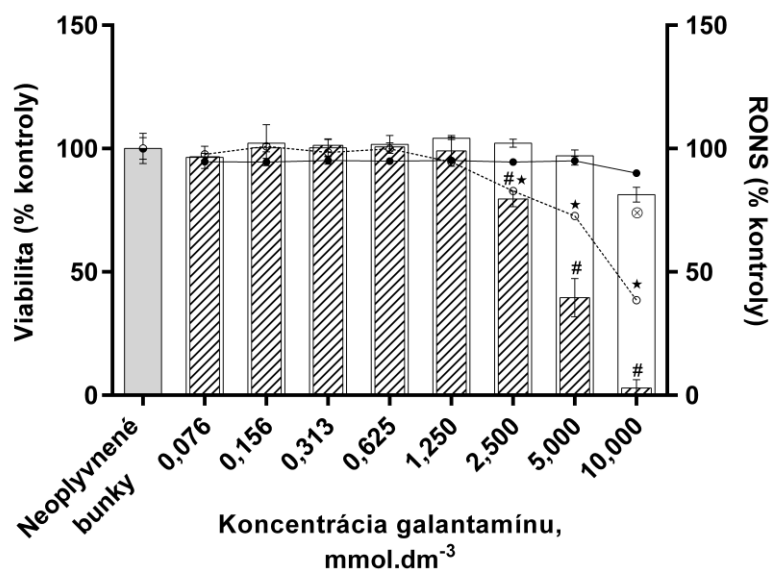


Obrázok 35 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom 7-MEOTA. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

- × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),
- ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),
- ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),
- # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

V časovom intervale 4 hodiny bol sledovaný signifikantný pokles viability a intracelulárnej hladiny RONS pri testovaných koncentráciách 0,128 a 0,256 mmol.dm<sup>-3</sup>. Životaschopnosť buniek poklesla o 18 a 40 % a hladina RONS bunkách bola znížená 9 a 20 % v porovnaní s neovplyvnenými bunkami. Po 24 hodinovej inkubácii došlo k poklesu viability a hladiny RONS pri použitých koncentráciách v rozsahu od 0,032 do 0,256 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bol v porovnaní s kontrolnými bunkami zaznamenaný 21 až 99% pokles viability buniek a 28 až 67% pokles intracelulárnej hladiny RONS.

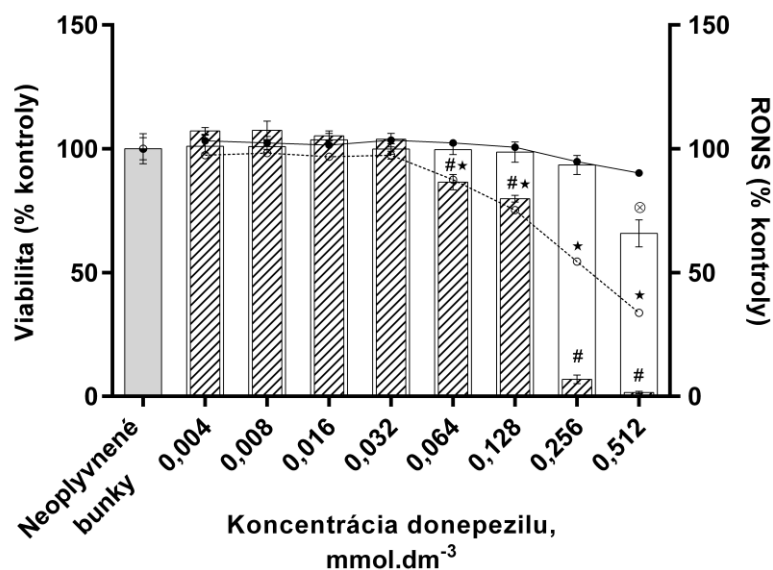
Zmena hladiny RONS v bunkách a ich viability po 4- a 24-hodinovej inkubácii s galantamínom je znázornená na obrázku 36.



Obrázok 36 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom galantamínom. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neoplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

V časovom intervale 4 hodiny došlo k štatisticky významnému poklesu životaschopnosti buniek pri najvyššej sledovanej koncentrácii 10 mmol.dm<sup>-3</sup>, a to o 19 %. V prípade intracelulárnej hladiny RONS nebol v tomto čase pozorovaný žiaden signifikantný rozdiel v porovnaní s neoplyvnenou kontrolou. V ďalšom časovom intervale (24 hodín) bol sledovaný pokles viability buniek v rozmedzí koncentrácií 2,5 – 10 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bolo zaznamenané 20 – 97% zníženie. Pri testovaných koncentráciách (2,5 – 10 mmol.dm<sup>-3</sup>) nastala taktiež signifikantná redukcia intracelulárnej hladiny RONS a bolo pozorované 17 – 61% zníženie oproti kontrolným bunkám.

Ďalším testovaným iAChE bol donepezil. Zmena viability buniek a intracelulárnej hladiny RONS po 4 a 24 hodinách inkubácia s týmto inhibítorom je znázornená na obrázku 37.



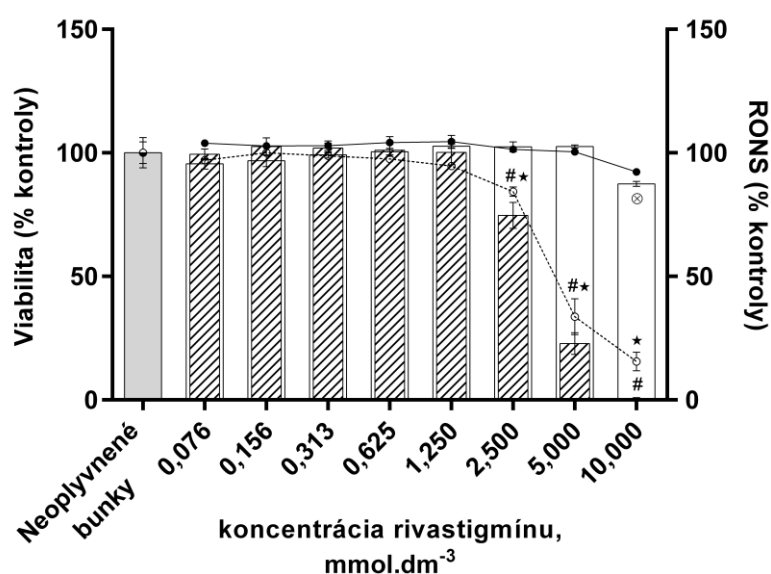
Obrázok 37 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom donepezilom. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neoplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viabilita buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viabilita buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

V prvom sledovanom časovom úseku (4 hodiny) došlo k signifikantnému poklesu bunkovej viability pri najvyššej testovanej koncentrácii (0,512 mmol.dm<sup>-3</sup>). Oproti neoplyvneným bunkám, ktoré boli inkubované s čistým kultivačným médiom došlo 24% poklesu životaschopnosti buniek. V tomto časovom intervale nedošlo k žiadnej signifikantnej zmene intracelulárnej hladiny RONS. Po 24 hodinovej inkubácii nastal štatisticky významný pokles bunkovej viability v prípade, že boli použité koncentrácie v rozmedzí od 0,064 do 0,512 mmol.dm<sup>-3</sup>. V porovnaní s kontrolnými bunkami došlo k redukcii viabilných buniek o 14 až 98 %. Podobne ako u sledovania prežívania buniek, došlo k poklesu intracelulárnej hladiny RONS pri rovnakých koncentráciách a bolo pozorované 13 až 66% zníženie množstva voľných radikálov v bunkách v porovnaní s neoplyvnenými kontrolnými bunkami.



Zmena viability buniek a vnútrobunkovej hladiny RONS po ovplyvnení buniek rivastigmínom po dobu 4 a 24 hodín je znázornená na obrázku 38.

V časovom intervale 4 hodiny nastal signifikantný pokles viability buniek iba v prípade použitia najvyššej testovanej koncentrácie (10 mmol.dm<sup>-3</sup>), pričom bolo detekované 13% zníženie životaschopnosti buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami. Množstvo intracelulárnych voľných radikálov nebolo v tomto časovom úseku signifikantne zmenené.



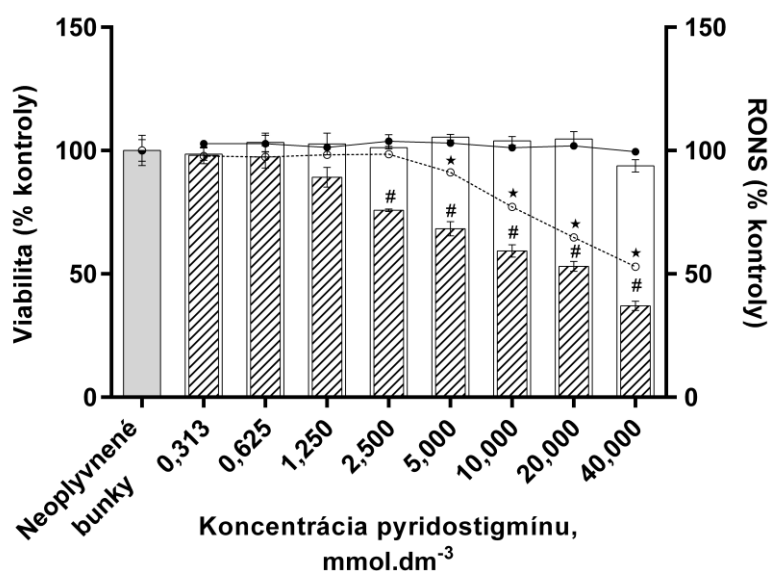
Obrázok 38 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom rivastigmínom. Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov ± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:  
 × zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),  
 ★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),  
 ⊗ viability buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),  
 # viability buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

Po 24 hodinovej inkubácii bol sledovaný signifikantný pokles živých buniek pri koncentráciách v rozmedzí 2,5 až 10 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom bol sledovaný 25 až 100% pokles viabilných buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami. V prípade intracelulárnej

hladiny RONS nastal štatisticky významný pokles pri rovnakých koncentráciách (pokles o 16 až 84 % v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou).

Posledným testovaným inhibítorom bol pyridostigmin. Odpoveď buniek (zmena viability a intracelulárnej hladiny RONS) po 4 a 24 hodinách inkubácie s týmto iAChE je znázornená na obrázku 39.

V prvom spomenutom časovom intervale (4 hodiny) nedošlo ku žiadnym signifikantným zmenám v porovnaní s neovplyvnenými bunkami ani v prípade sledovania bunkovej viability ani v prípade vnútrobunkového levelu RONS.



Obrázok 39 - Zmena hladiny intracelulárnych RONS v kontexte s viabilitou buniek v časovom intervale 4 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek inhibítorom pyridostigminom.

Dáta sú reprezentované ako priemer z 3 nezávislých experimentov

± SEM. Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou jednocestnej ANOVY a

Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou je znázornený:

× zmena intracelulárnej hladiny RONS po 4 hodinovej inkubácii (plná krivka),

★ zmena intracelulárnej hladiny RONS po 24 hodinovej inkubácii (prerušovaná krivka),

⊗ viability buniek po 4 hodinovej inkubácii (biely stĺpec),

# viability buniek po 24 hodinovej inkubácii (stĺpec so vzorom)

V 24-hodinovom časovom intervale bol detekovaný pokles životaschopnosti buniek v koncentračnom rozmedzí 2,5 – 40 mmol.dm<sup>-3</sup>, pričom viability buniek bola oproti

kontrolným bunkám znížená o 24 až 63 %. Pokles intracelulárneho levelu RONS po 24-hodinovej inkubácii bol sledovaný pri koncentráciách v rozmedzí od 5 do 40 mmol.dm<sup>-3</sup>. V prípade zrovnania s neovplyvnenými bunkami sa jednalo o 9 až 47% pokles.

#### 4.4 Sledovanie antioxidačnej aktivity

Pre stanovenie antioxidačnej účinnosti jednotlivých rAChE a iAChE bola použitá fluorescenčná sonda DCF-DA. Experimenty boli uskutočnené na bunkovej línii HepG2. Súbežne s testovanými rAChE a iAChE bol testovaný ako štandardný antioxidant rGLU v koncentrácií, ktorá nemala vplyv na viabilitu buniek ani na intracelulárnu hladinu RONS (0,75 mmol.dm<sup>-3</sup>). tBuOOH bol použitý ako látka spôsobujúca nárast intracelulárnej hladiny RONS v koncentrácií totožnej s jeho IC<sub>50</sub> (0,13 mmol.dm<sup>-3</sup>).

##### 4.4.1 Reaktivátory AChE

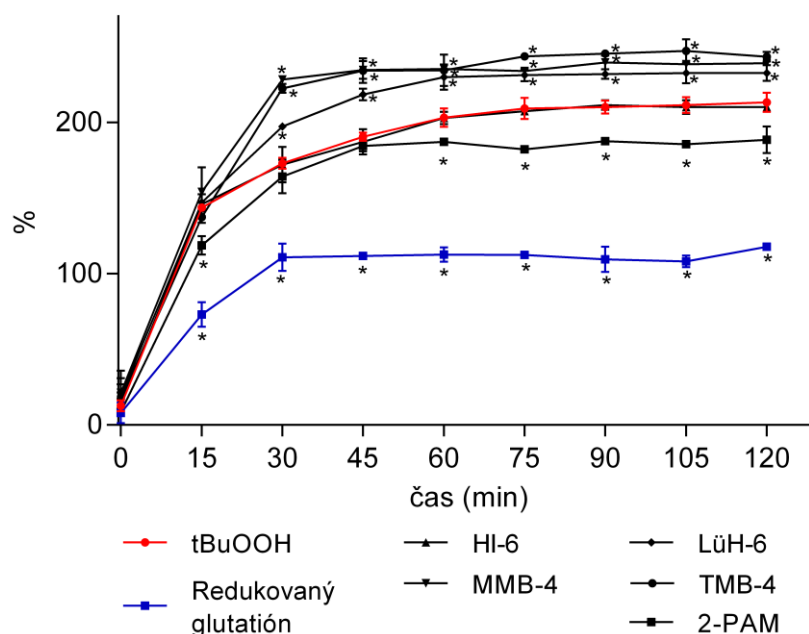
Testované koncentrácie jednotlivých rAChE odpovedajúce koncentracii, ktorá nemala vplyv po 24 hodinovej inkubácii ani na viabilitu buniek ani na zmenu intracelulárnej hladiny RONS sú zosumarizované v tabuľke 11.

Tabuľka 11 - Prehľad testovaných koncentrácií jednotlivých rAChE

<b>rAChE</b>	<b>Testovaná koncentrácia, mmol.dm<sup>-3</sup></b>
<b>2-PAM</b>	0,13
<b>TMB-4</b>	0,63
<b>LüH-6</b>	0,16
<b>MMB-4</b>	0,39
<b>HI-6</b>	0,16
<b>K027</b>	6,27
<b>K048</b>	2,50
<b>K074</b>	1,25
<b>K075</b>	0,16
<b>K203</b>	0,16

Antioxidačný efekt štandardne používaných rAChE po vyvolaní oxidačného stresu tBuOOH je znázornený na obrázku 40 a oxímov zo série K na obrázku 41. Ako pozitívna kontrola bol zvolený antioxidant rGLU, ktorý vyvolal pokles RONS v bunkách v priemere o  $87 \pm 5$  % (priemerná hodnota časových intervalov 15 až 120 minút) oproti hladine RONS v bunkách stimulovaných tBuOOH.

Z konvenčne používaných rAChE (obrázok 40) vyvolal miernu redukciu intracelulárneho levelu RONS iba po ovplyvnení 2-PAM. V porovnaní s bunkami, ktoré boli ovplyvnené iba tBuOOH došlo po pridaní 2-PAM k bunkám v časových intervaloch 15 – 120 minút k poklesu v priemere o  $20 \pm 3$  %.

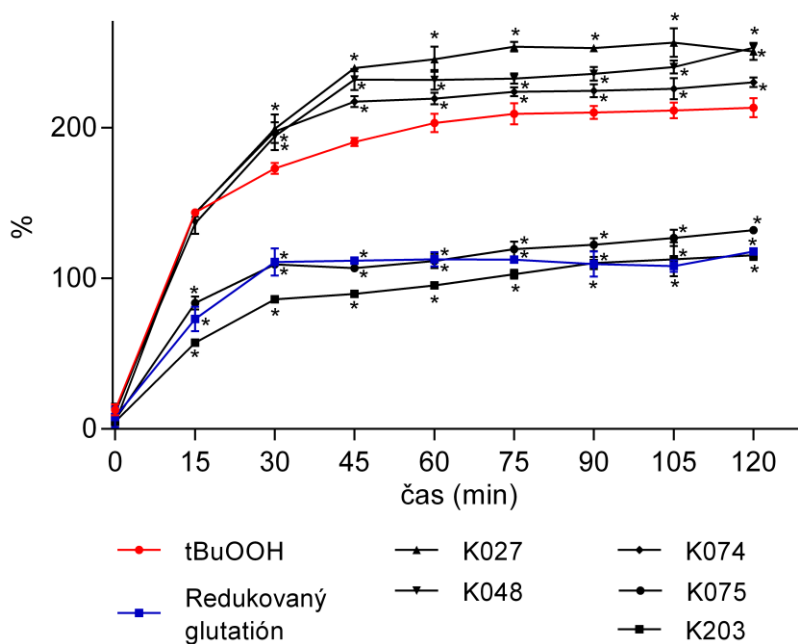


Obrázok 40 - Antioxidačný efekt testovaných štandardne používaných rAChE sledovaný kontinuálne každých 15 minút po dobu 2 hodín. Ako oxidačné činidlo bol použitý tBuOOH (červená krivka) a ako pozitívna kontrola bol použitý antioxidant rGLU (modrá krivka). Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou dvojcestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s bunkami ovplyvnenými samotným tBuOOH je znázornený \*. Dáta sú vyjadrené ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM

Testované biskvartérne oxímvy MMB-4, LüH-6 a TMB-4 vyvolali dokonca ďalší nárast produkcie voľných radikálov v bunkách v porovnaní s bunkami, ktoré boli

inkubované iba s tBuOOH. U týchto rAChE došlo zvýšeniu produkcie RONS v priemere o  $31 \pm 5 \%$ ,  $21 \pm 3 \%$  a  $31 \pm 6 \%$ .

Pokles hladiny intracelulárnych RONS bol pozorovaný po stimulácii buniek tBuOOH a následnom ovplyvnení buniek oxímami K075 a K203 (obrázok 41). Redukcia RONS v bunkách bola u oboch vyššie spomenutých látok signifikantná už od 15 minúty inkubácie, pričom oxím K075 vyvolal pokles v priemere o  $80 \pm 4 \%$  a oxím K203 v priemere  $98 \pm 3 \%$  v porovnaní s hladiny RONS v bunkách po ich ovplyvnení samotným tBuOOH. Ďalšie testované rAChE K027, K048 a K074 spôsobili nárast produkcie RONS v porovnaní s bunkami inkubovanými so samotných tBuOOH a to v priemere o  $36 \pm 5 \%$ ,  $25 \pm 5 \%$  a  $16 \pm 3 \%$ .



Obrázok 41 - Antioxidačný efekt testovaných rAChE z K-série sledovaný kontinuálne každých 15 minút po dobu 2 hodín. Ako oxidačné činidlo bol použitý tBuOOH (červená krivka) a ako pozitívna kontrola bol použitý antioxidant rGLU (modrá krivka). Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou dvojcestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s bunkami ovplyvnenými samotným tBuOOH je znázornený \*. Dáta sú vyjadrené ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM

#### 4.4.2 Inhibítory AChE

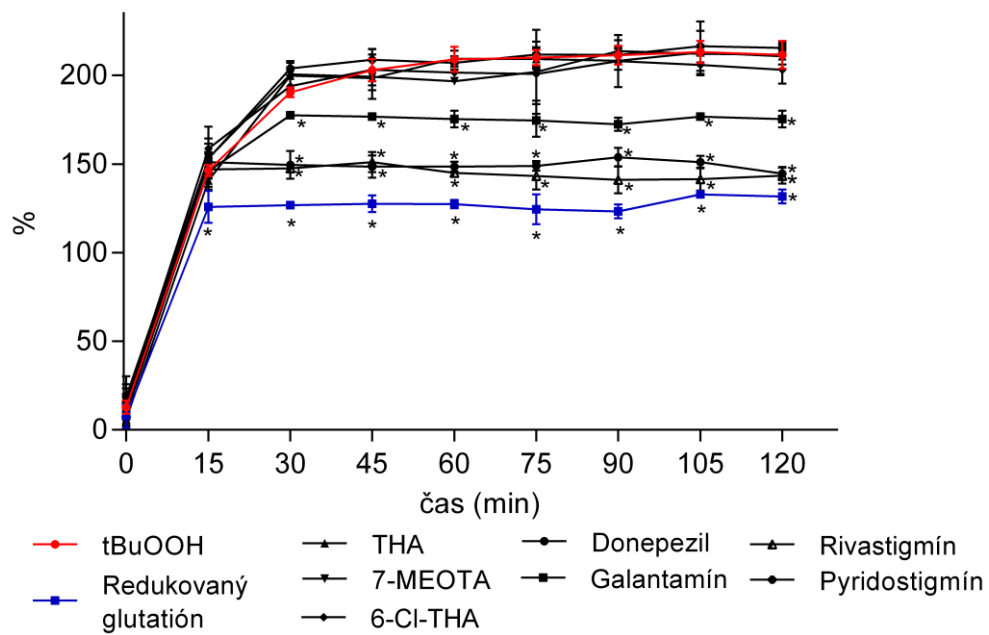
Testované koncentrácie jednotlivých iAChE odpovedajúce koncentrácii, ktorá nemala vplyv po 24 hodinovej inkubácii ani na viabilitu buniek ani na zmenu intracelulárnej hladiny RONS sú zosumarizované v tabuľke 12.

Tabuľka 12 - Prehľad testovaných koncentrácií jednotlivých iAChE

<b>iAChE</b>	<b>Testovaná koncentrácia (mmol.dm<sup>-3</sup>)</b>
<b>THA</b>	0,032
<b>7-MEOTA</b>	0,016
<b>6-CI-THA</b>	0,016
<b>Donepezil</b>	0,032
<b>Galantamín</b>	1,25
<b>Rivastigmín</b>	1,25
<b>Pyridostigmín</b>	1,25

Zmena intracelulárnej hladiny RONS po stimulácii buniek tBuOOH a ich následným ovplyvnením iAChE je znázornená na obrázku 42.

Ako pozitívna kontrola bol zvolený rGLU. V jednotlivých časových intervaloch vyvolal signifikantnú zmenu oproti bunkám kultivovaným iba so samotným tBuOOH vo všetkých sledovaných časových intervaloch v rozmedzí 15 - 120 minút, pričom bol detekovaný pokles RONS v bunkách v priemere o  $72 \pm 8$  %. Antioxidačné účinky vykazovali aj 3 testované iAChE a to donepezil, rivastigmín a galantamín. U buniek ovplyvnených tBuOOH spolu s donepezilom bola pozorovaná redukcia množstva intracelulárnych RONS, pričom došlo k ich poklesu v priemere o  $50 \pm 8$  %. Podobný efekt na hladinu RONS v bunkách bol sledovaný aj po ovplyvnení buniek galantamínom, pričom bol detekovaný pokles v priemere o  $54 \pm 9$  %. Posledným inhibítorom, ktorý vyvolal signifikantný pokles voľných radikálov v bunkách, bol rivastigmín, pričom po ovplyvnení buniek tBuOOH v kombinácii s týmto iAChE došlo k poklesu v priemere o  $27 \pm 5$  %.



Obrázok 42 - Antioxidačný efekt testovaných iAChE sledovaný kontinuálne každých 15 minút po dobu 2 hodín. Ako oxidačné činidlo bol použitý tBuOOH (červená krivka) a ako pozitívna kontrola bol použitý antioxidant rGLU (modrá krivka). Štatistické hodnotenie prebehlo pomocou dvojcestnej ANOVY a Dunnettovým testom post-hoc pri štatistickej hladine významnosti  $\alpha = 0,05$ . Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) v porovnaní s bunkami ovplyvnenými samotným tBuOOH je znázornený \*. Dáta sú vyjadrené ako priemer z 3 nezávislých experimentov  $\pm$  SEM

## 5. Diskusia

Dostupnosť rôznych *in vitro* prístupov poskytuje dôležitý nástroj pre lepšie pochopenie účinkov nových chemických derivátov, ktoré by mohli byť využité ako potenciálne liečivá. V snahe obmedziť používanie zvierat pri experimentoch boli navrhnuté rôzne alternatívne metódy, ktoré umožňujú zníženie počtu zvierat nevyhnutných pre experiment, po prípade nahrádzajú zvieracie modely za nezvieracie (Kandárová a Letašiová 2011).

Predkladaná dizertačná práca bola zameraná na *in vitro* charakterizáciu látok, ktoré sú schopné ovplyvniť aktivitu AChE (rAChE a iAChE). Testované boli cytotoxické účinky, ich vplyv na apoptickú aktivitu buniek, vplyv na narušenie oxidačno-redukčnej rovnováhy a taktiež antioxidačný potenciál daných látok.

### 5.1 Cytotoxické účinky testovaných látok

Vplyv testovaných látok na bunkovú viabilitu bol sledovaný u 4 rôznych bunkových línii, a to HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF. Cytotoxicita látok bola stanovená pomocou dvoch principiálne odlišných metód, a to kolorimetrickou metódou využívajúcou MTT a EI metódou.

#### 5.1.1 Reaktívatory AChE

U jednotlivých rAChE bola stanovená hodnota  $pIC_{50}$  v rozmedzí od 0,96 do 39,49  $mmol.dm^{-3}$ . Napriek tomu, že sa použité bunkové kultúry vyznačovali odlišnou citlivosťou k jednotlivým testovaným rAChE, pričom rozdielnosť medzi nimi by mohla byť spôsobená práve rozdielnou metabolickou kapacitou jednotlivých bunkových modelov (diskutované v kapitole 5.2.2), je možné nájsť určité podobnosti medzi jednotlivými líniami.

Existujú rôzne štrukturálne aspekty, ktoré majú vplyv na reaktivačný potenciál jednotlivých rAChE, ku ktorým možno zaradiť počet oxímových skupín v molekule, ich polohy na pyridíniovom kruhu, dĺžka spojovacieho reťazca medzi 2 pyridíniovými kruhmi a taktiež prítomnosť kyslíku alebo dvojitej väzby v spojovacom reťazci (Patočka et al. 2005; Bajgar 2009; De Paula et al. 2018; Kuca et al. 2006). Práve na sledovanie týchto faktorov som sa zamerala aj pri sledovaní vzťahu cytotoxicity a štruktúry testovaných látok.



Najmenej toxickou látkou u bunkovej línie HepG2 bol oxím K027, ktorý je predstaviteľom rAChE s 3-uhlíkatým spojovacím reťazcom a jednou oxímovou skupinou v polohe 4. Toxický potenciál látok s 3C sa zvýšil v prípade prítomnosti 2 oxímových skupín v polohe 4 (TMB-4). Cytotoxicita látok bola ďalej intenzifikovaná v prípade prítomnosti kyslíka v spojovacom reťazci (LüH-6). Ešte výraznejší nárast cytotoxicity bol detekovaný v prípade kombinácie kyslíkovej inzercie v uhlíkatom reťazci a 1 oxímovej skupiny v polohe 2 (HI-6). Zvýšenie toxicity v poradí K027 < LüH-6 < HI-6 koreluje so znížením expície multiliekového rezistentného proteínu 2, ktorá bola detekovaná *in vivo* (Pejchal et al. 2008). Inkorporácia kyslíka do spojovacieho reťazca by mohla ovplyvniť exkréciu pečene a tým pádom by mohla zohrávať významnú úlohu pri hepatotoxicite rAChE. Cytotoxicita testovaných rAChE sa mierne zvýšila aj v prípade spojovacieho reťazca s dĺžkou 4C (oxímy K074 a K048), pričom u týchto dvoch látok sme nepozorovali vplyv počtu oxímových skupín na ich cytotoxický potenciál. V 4C zlúčeninách mala vplyv na zvýšenie cytotoxických vlastností prítomnosť dvojitej väzby v spojovacom reťazci (oxímy K075 a K203). Najvýraznejší nárast cytotoxického potenciálu bol pozorovaný v prípade skrátenia spojovacieho reťazca na 1C (MMB-4). Jediný testovaný monopyridíniový rAChE 2-PAM vykazoval podobný cytotoxický efekt ako TMB-4.

U buniek ACHN bol najmenej toxický oxím K048 so 4-uhlíkatým spojovacím reťazcom a 1 oxímovou skupinou. U tejto bunkovej línie v porovnaní s HepG2 bunkami naopak pridanie druhej oxímovej skupiny výrazne zvýšilo cytotoxický potenciál látok so 4C reťazcom (oxím K074). Určitá podobnosť s HepG2 bunkami bola sledovaná pri inkorporácii dvojitej väzby do spojovacieho reťazca, kedy taktiež došlo k výraznému zhoršeniu cytotoxických účinkov rAChE (oxím K203 a K075). Skrátenie uhlíkatého reťazca na 3C spôsobilo v porovnaní s K048 mierny nárast toxického účinku (K027 a TMB-4), pričom vplyv počtu oxímových skupín nebol v tomto prípade pozorovaný. Naopak obdobne ako u HepG2 buniek inkorporácia kyslíka do spojovacieho reťazca mala výrazný vplyv na zvýšenie nežiaducich účinkov rAChE (HI-6 a LüH-6). A taktiež ďalšie skrátenie uhlíkatého reťazca na 1C výrazne zvýšilo toxický potenciál rAChE (MMB-4).

Rovnako ako u bunkovej línie HepG2 aj pre bunky SH-SY5Y bol najmenej toxickým reaktivátorom predstaviteľ s 3C spojovacím reťazcom a jednou oxímovou

skupinou v polohe 4 (K027). Pridaním druhej oxímovej skupiny (TMB-4) sa cytotoxicita zvýšila približne 2-krát. Podobný trend ako v prípade HepG2 a ACHN buniek nastal aj v prípade inkorporácie kyslíka do 3C spojovacieho reťazca (oxímy HI-6 a LüH-6) a taktiež skrátenie uhlíkového reťazca na 1C významne zvýšilo cytotoxické vlastnosti látok (MMB-4). Takmer rovnakými toxickými účinkami, ktoré boli sledované u oxímu K027, sa vyznačoval aj jediný testovaný monopyridiniový oxím (2-PAM). V prípade skupiny oxímov so 4C spojovacím reťazcom bola najmenej toxickou látka oxím K048, ktorý obsahuje jednu oxímovú skupinu. Pridaním druhej (oxím K074) došlo k výraznému nárastu toxického účinku látky, pričom došlo k približne 4-násobnému zvýšeniu. Rovnako ako v prípade bunkových modelov HepG2 a ACHN zavedenie dvojitej väzby do 4C reťazca malo negatívny vplyv na cytotoxicitu látok (oxímy K075 a K203).

U NHLF buniek bol rovnako ako u ACHN najmenej toxickým rAChE oxím K048. Ďalším pridaním oxímovej skupiny, inkorporáciou dvojitej väzby, skrátením reťazca na 3C po prípade na 1C, a taktiež pridaním molekuly kyslíka do spojovacieho reťazca sa cytotoxicita látok zvyšovala.

### 5.1.2 Inhibítory AChE

Rovnako ako u predchádzajúcej skupiny látok, tak aj u iAChE bola stanovená ich cytotoxicita na vyššie spomenutých bunkových modeloch. Cytotoxicita týchto látok sa pohybovala v rozmedzí od 0,046 do 43,69 mmol.dm<sup>-3</sup>.

Najmenej toxickou látkou u všetkých sledovaných bunkových línií bol pyridostigmín, ktorý má oproti ďalším sledovaným iAChE najnižšiu molekulovú hmotnosť (181,21 g.mol<sup>-1</sup>). Tento karbamátový pseudoreverzibilný iAChE sa používa najčastejšie pri terapii *myastenia gravis*. Okrem toho sa používa vo viacerých armádach aj ako profylaktikum proti otravám OP zlúčeninami. Kvôli svojej neschopnosti prenikať cez BBB, je pyridostigmín schopný chrániť iba periférnu AChE (Kassa et al. 2017).

Reverzibilné iAChE rivastigmín a galantamín mali druhú najnižšiu cytotoxicitu. V porovnaní s najmenej toxickým pyridostigmínom majú tieto látky vyššiu molekulovú hmotnosť (250,33 a 287, 354 g.mol<sup>-1</sup>). Tieto nepriame parasymptomimetiká sa používajú pri liečbe AD, a to hlavne pri miernom až stredne

ťažkom priebehu tohto ochorenia. Tieto látky už vo svojej molekule neobsahujú kvartérny amóniový dusík, preto ľahko prenikajú cez BBB (Švihovec et al. 2018).

Štvrtým najmenej toxickým iAChE bol donepezil, ktorý sa taktiež radí medzi nepriame parasymptomimetiká a používa sa k terapii AD. Zo štandardne používaných iAChE v liečbe AD má donepezil najvyššiu molekulovú hmotnosť (379,50 g.mol<sup>-1</sup>) a taktiež najvyššiu cytotoxicitu.

Ďalšiu skupinu testovaných iAChE tvoril THA a jeho deriváty 7-MEOTA a Cl-THA. iAChE na báze THA patria z dôvodu ich terapeutického využitia k najviac preštudovaným inhibítorm. THA je schopný inhibovať AChE na základe svojich biologických vlastností už vo veľmi nízkych koncentráciách (nmol.dm<sup>-3</sup>). Rovnako sa vyznačuje aj výbornou schopnosťou prenikať cez BBB (Korabecny et al. 2012). THA sa však kvôli svojim silným hepatotoxickým účinkom v klinickej praxi už nevyužíva. 7-MEOTA bola syntetizovaná ako menej hepatotoxický inhibítor, avšak s obdobnými terapeutickými vlastnosťami pri liečbe AD. Na rozdiel od *in vivo* experimentov (Patočka a Kuca 2008; Soukup et al. 2013), kedy bola sledovaná u inhibítora 7-MEOTA nižšia toxicita ako u THA, u všetkých sledovaných *in vitro* modelov bol sledovaný opačný trend. 7-MEOTA bola v porovnaní s THA takmer 4-krát toxickejšia. Tento opačný trend možno vysvetliť tým, že v prípade *in vitro* testovania sa pôsobí priamo na bunky, ktoré majú oproti bunkám odpovedajúcich orgánov *in vivo* nižšiu metabolickú aktivitu. Práve rozdielu v metabolizácii látok sa pripisuje nižšia *in vivo* toxicita u 7-MEOTA. THA podlieha metabolizmu pomocou mikrozomálneho cytochrómu P450. Môžu vznikáť rôzne hydroxy-THA, ktoré sa vyznačujú len miernou toxicitou, avšak môže dochádzať aj ku vzniku vysokoreaktívnej formy chinón methidu, ktorá ďalej môže spôsobiť poškodenie buniek prostredníctvom interakcie s tiolovými skupinami bunkových proteínov (Soukup et al. 2013). Hlavným metabolitom 7-MEOTA je 7-hydroxytakrín, ktorý vzniká demetyláciou metoxy- skupiny, ktorý je následne konjugovaný s kyselinou glukuronovou a vylučovaný močom (Patočka a Kuca 2008; Korabecny et al. 2012). Ďalšia látka Cl-THA sa vyznačovala veľmi podobnou cytotoxicitou ako 7-MEOTA na všetkých sledovaných bunkových modeloch. Zvýšenie cytotoxicity oproti východzej molekuly THA môže byť spôsobené práve prítomnosťou atómu chlóru v jeho molekule. Tento aspekt štruktúry môže byť spojený so zvýšenou lipofilicitou látky. Na druhej strane práve zvýšenie lipofilicity zvyšuje inhibičný

potenciál v dôsledku lepšej interakcie v hydrofóbnej časti AChE (Misik et al. 2018). Z tohto dôvodu je potrebné posudzovať jednotlivé látky nielen z pohľadu ich toxicity ale je nutné posudzovať aj ich účinnosť, nakoľko v prípade látky s vyššou účinnosťou nemusí byť zvýšená toxicita nutnou prekážkou pre ich liečebné využitie.

## 5.2 Sledovanie apoptického profilu

Schopnosť testovaných látok indukovať apoptózu bola uskutočnená na všetkých zvolených bunkových modeloch pri koncentráciách, ktoré odpovedali ich hodnotám  $IC_{50}$ , ktoré boli získané v predchádzajúcich experimentoch pomocou MTT testu po 24-hodinovej inkubácii.

### 5.2.1 Reaktivátory AChE

Z výsledkov je zrejmé, že všetky reaktivátory u jednotlivých bunkových línii aktivujú určité zmeny v apoptóze. Medzi jednotlivými líniami a testovanými látkami sú však zrejmé určité rozdiely, ktoré môžu byť vyvolané či už tým, že boli použité ako nádorové (HepG2, ACHN a SH-SY5Y) tak aj primárna ľudská bunková línia (NHLF), po prípade rozdielnou metabolickou kapacitou jednotlivých buniek. Obdobne ako pri sledovaní cytotoxicity, je možné aj u hodnotenia či už apoptického profilu alebo počtu nekrotických buniek nájsť vzťah k určitým štrukturálnym aspektom testovaných látok.

U bunkovej línie HepG2 u všetkých testovaných látok s výnimkou oxímu K203 prevažovali bunky s prvkami apoptózy nad nekrotickými bunkami. Oxím K203 vo svojej molekule obsahuje kombináciu 4C spojovacieho reťazca, dvojitej väzby a jednej oxímovej skupiny. Medzi rAChE, u ktorých prevládala celková populácia apoptických buniek sme pozorovali určité rozdiely. V prípade 3C spojovacieho reťazca (K027 a TMB-4) a 3C spojovacieho reťazca s kyslíkom (LüH-6) sme sledovali približne rovnaké rozloženie buniek vo včasnej a neskorej fáze apoptózy. Avšak pri kombinácii kyslíkového substituentu a 1 oxímovej skupiny v polohe 2 (HI-6) došlo k výraznému nárastu počtu včasne apoptických buniek. V prípade kombinácie 4C spojovacieho reťazca a 1 oxímovej skupiny (K048) sme sledovali vyššie zastúpenie včasne apoptických buniek, avšak v pridaní ďalšej oxímovej skupiny sa tento pomer obrátil (oxímy K074 a K075). Prítomnosť dvojitej väzby v spojovacom reťazci, ešte mierne zvýšila počet buniek v neskorej fáze apoptózy. Skrátene uhlíkového reťazca na 1C (MMB-4) vyvolalo výrazný nárast počtu buniek vo včasnej fáze apoptózy. Naopak

monopyridiniová štruktúra (2-PAM) spôsobila nárast počtu buniek v neskorej fáze apoptózy na úkor včasne apoptických buniek.

V prípade ACHN buniek nebola ani u jedného sledovaného reaktivátora pozorovaná prevaha nekrotických buniek v porovnaní s apoptickými bunkami. Jediný reaktivátor, u ktorého po ovplyvnení buniek prevažovala včasne apoptická fáza nad neskorou apoptózou bol oxím K075 (4C s dvojitou väzbou vo spojovacom reťazci a s 2 oxímovými skupinami v polohe 4). Naopak v prítomnosti 1 oxímovej skupiny (K203) sa tento pomer úplne otočil. U zástupcom rAChE s 3C a 4C spojovacím reťazcom bez ohľadu na počet oxímových skupín výrazne prevyšoval počet neskoro apoptických buniek. 1C uhlíkatý reťazec (MMB-4), 3C reťazec s kyslíkom a jednou oxímovou skupinou na pyridiniovom kruhu v polohe 2 (HI-6) a monopyridiniová štruktúra (2-PAM) sa počet včasne apoptických buniek mierne zvýšil, avšak neprekročil počet neskoro apoptických buniek. Rozdiel v počte buniek vo včasnej a neskorej fáze apoptózy sa ďalej znížil v prípade kombinácie inkorporácie kyslíka do 3C reťazca a 2 oxímových skupín v polohe 4 (LüH-6), avšak aj v tomto prípade naďalej prevyšoval počet neskoro apoptických buniek nad včasne apoptickými bunkami.

U bunkovej línie SH-SY5Y bola prevaha nekrotických buniek pozorovaná u 2-PAM (monopyridiniová štruktúra) a HI-6 (kyslík v spojovacom reťazci a 1 oxímová skupina v polohe 2). Ďalej sme pozorovali skupinu látok, u ktorého bol pomer apoptických a nekrotických buniek približne rovnaký. Tento jav bol pozorovaný u MMB-4 (1C spojovací reťazec) a oxímu K074 (4C spojovací reťazec a 2 oxímovými skupinami). U ďalších sledovaných reaktivátorov opäť prevyšovali apoptické bunky. Z výsledkov sa môže zdať, že u štruktúry, ktorá obsahovala 4C uhlíkatý reťazec spolu s dvojitou väzbou, výrazne prevyšoval počet buniek v neskorej fáze apoptózy nad včasne apoptickými bunkami. Aj u oxímov s 3C (1 alebo 2 oxímové skupiny, K027 alebo TMB-4), 4C (1 oxímová skupina, K048) a 3C inkorporovaný o atóm kyslíka (LüH-6) bola sledovaná prevaha buniek v neskorej fáze apoptózy, avšak nie s takým rozdielom ako v prípade oxímov K075 a K203.

Poslednou bunkovou líniou bola NHLF. U týchto buniek sme pozorovali rovnako ako u HepG2 buniek prevahu nekrotických buniek nad apoptickými bunkami u jediného oxímu a to K203. U ďalšieho oxímu, ktorý vo svojej štruktúre obsahuje dvojitú väzbu, bol pomer nekrotických a apoptických buniek približne 1:1,5, pričom z buniek

v apoptóze boli viac zastúpené bunky v neskoršej fáze. U ostatných oxímov počet buniek v apoptóze výrazne prevyšoval počet nekrotických buniek. U rAChE LüH-6 (3C, kyslíkový atóm) a MMB-4 (1C) bol pomer včasne a neskoro apoptických približne 1:1. U ostatných rAChE prevyšovali bunky v neskoršej fáze apoptózy nad včasne apoptickými, pričom sme u tejto línie nesledovali nejakú štrukturálnu závislosť.

### 5.2.2 Inhibítory AChE

Apoptická aktivita bola sledovaná aj po ovplyvnení buniek iAChE po 24 hodinovej inkubácii s koncentráciami, ktoré odpovedali ich hodnotám  $IC_{50}$ . Nakoľko sa jednalo o pomerne rôznorodú skupinu látok, čo sa týka štruktúry, nie je celkom možné v tejto časti diskutovať určité štrukturálne aspekty, ktoré by mohli mať vplyv na vstup buniek do apoptózy, či nekrózy.

U bunkovej línie HepG2, ktorá sa vyznačuje nízkou hladinou cytochrómov, ale normálnou hladinou enzýmov fázy II s výnimkou UDP-glukuronosyl transferasy (Westerink a Schoonen 2007), prevládala u všetkých testovaných iAChE, s výnimkou pyridostigmínu, populácia nekrotických buniek. U pyridostigmínu, ktorý sa vyznačoval najnižším cytotoxickým potenciálom, sme sledovali približne rovnaký počet apoptických a nekrotických buniek (pomer 1,18 : 1). Naopak u buniek ACHN, ktoré sa vyznačujú extrémne nízkou metabolickou aktivitou vo fáze I a II (Khoury et al. 2016), bola sledovaná prevaha apoptických buniek u troch sledovaných iAChE a to THA, 7-MEOTA a Cl-THA. U ostatných iAChE sme pozorovali približne rovnaký pomer zastúpenia apoptických a nekrotických buniek. Rozdiel v metabolickej kapacite vyššie spomenutých bunkových línií by mohol byť zodpovedný za odlišné zastúpenie buniek v jednotlivých populáciách.

Obdobný trend v distribúcií buniek v apoptóze alebo nekróze ako u HepG2 buniek bol sledovaný aj u SH-SY5Y bunkovej línie. U všetkých testovaných iAChE prevládali nekrotické bunky s výnimkou pyridostigmínu a galantamínu, kedy bola populácia apoptických a nekrotických buniek približne v rovnováhe. Mann a Tyndale (2010) sledovali, že práve SH-SY5Y bunky sú schopné expresie cytochrómu P450 2D6 enzýmu a taktiež potvrdili jeho metabolickú aktivitu v týchto bunkách. Tento enzým sa vyskytuje v pečeni, ale taktiež v mozgu. Jedná sa o enzým, ktorý je schopný metabolizovať rôzne liečivá a taktiež toxíny (Mann a Tyndale 2010). Práve podobná

metabolická aktivita týchto dvoch bunkových línií by mohla byť zodpovedná, za rovnakú distribúciu buniek v apoptóze a nekróze.

U NHLF prevládali nekrotické bunky u iAChE donepezil, galantamín, rivastigmín a pyridostigmín. Naopak u THA a jeho derivátov bola populácia nekrotických a apoptických buniek približne rovnako distribuovaná. Fibroblasty sú hlavnou zložkou spojivového tkaniva. Tento typ buniek zohráva dôležitú úlohu predovšetkým v produkcii extracelulárnej matrix, kolagénu, fibronektínu, cytokínov a rastových faktorov a zohrávajú teda hlavnú úlohu v patologických procesoch, ktoré vedú k fibróze (Golpour et al. 2014). Fibroblasty produkujú predovšetkým enzým kolagenasu a ďalšie faktory ako rôzne prostaglandíny a aktivátor plasminogénu, pričom sú schopné modulovať funkciu ďalších typov buniek obsiahnutých v pľúcach (Thum et al. 2006; Harkema et al. 2018).

Na záver je dôležité je podotknúť, že bunky, u ktorých nastane externalizácia PS, teda sú anexín V pozitívne, nemusia podliehať len apoptickému procesu, nakoľko u buniek ktoré podliehajú nekroptóze dochádza taktiež k externalizácií PS. Z tohto dôvodu bude do budúca dôležité pre ďalšie rozlíšenie potrebné sledovanie aktivity kaspas, nakoľko nekroptóza nie je závislá na aktivácií týchto enzýmov (Zargarian et al. 2017).

### **5.3 Vplyv látok na oxidačno-redukčnú rovnováhu**

Narušenie oxidačno-redukčnej rovnováhy buniek možno považovať za jeden z možných mechanizmov cytotoxicity látok. Z tohto dôvodu som sa zamerala na sledovanie zmeny intracelulárnej hladiny RONS vo vzťahu k viabilite buniek.

#### **5.3.1 Reaktivátory AChE**

Schopnosť látok indukovať produkciu voľných radikálov bola sledovaná pomocou fluorescenčnej sondy DC-FDA v dvoch časových intervaloch 4 a 24 hodín. Koncentračné rady použité v tento experimente boli rovnaké ako pri stanovení hodnôt  $IC_{50}$  pomocou MTT testu a EI metódy.

V jednotlivých sledovaných časových intervaloch a koncentráciách boli pozorované rôzne zmeny produkcie RONS a taktiež bunkovej viability. Z výsledkov je zrejmé, že v prípade indukcie RONS je pozorovaná určitá koncentračná závislosť, pričom pri

najvyšších testovaných koncentráciách bola hladina voľných radikálov po 4-hodinovej inkubácii signifikantne zvýšená u všetkých testovaných rAChE. Aj po 24-hodinovej inkubácii s testovanými látkami sme pozorovali u najvyšších sledovaných koncentrácií nárast RONS u všetkých testovaných látok s výnimkou MMB-4, 2-PAM a K074. Pri najvyšších koncentráciách jednotlivých rAChE dochádzalo aj k určitému poklesu viability a to po 4-hodinovej inkubácii, tak aj po 24-hodinovej inkubácii.

Na základe výsledkov je možné konštatovať, že určitý nárast hladiny RONS (približne do 50 %) v bunkách nevyvolal signifikantný pokles viability, čo by mohlo byť pripísané určitej antioxidačnej kapacite buniek. Napr. u oxímu K027 (koncentrácia 12,5 mmol.dm<sup>-3</sup>) bol sledovaný nárast o 43 % v 4 hodinovom časovom intervale, pričom po 24 hodinách inkubácie došlo dokonca k poklesu intracelulárnych voľných radikálov na 29%. Podobný efekt bol sledovaný aj u oxímu K048, K074, TMB-4, LüH-6. Naopak pri vyšších sledovaných koncentráciách, kedy bola hladina RONS zvýšená o viac ako 50 % dochádzalo následne k poklesu viability buniek, či už po 4 alebo 24 hodinách.. U týchto oxímov by sa mohlo teda predpokladať, že ich mechanizmom cytotoxicity by mohlo byť aspoň z určitej časti narušenie oxidačno-redukčnej rovnováhy.

U oxímov K203 a K075 nedochádzalo k výraznému poklesu viability, ani pri prekročení pomyslenej antioxidačnej kapacity po 4 hodinovej inkubácii. Avšak po 24 hodinách u týchto koncentrácií dochádzalo k výraznému poklesu viability. Na základe týchto zistení sa môže mechanizmus cytotoxicity javiť ako kombinovaný, v ktorom by mohla zohrávať určitú úlohu aj zvýšená produkcia voľných radikálov.

Ďalej by bolo možné vytvoriť skupinu látok, do ktorej je možné zaradiť oxím HI-6 a MMB-4, u ktorých dochádzalo v nárastu hladiny RONS až vo veľmi vysokých koncentráciách, pričom u nižších koncentrácií nebol pozorovaný signifikantný nárast RONS, avšak pokles viability bol už sledovaný. Z tohto dôvodu možno usúdiť, že mechanizmus cytotoxicity HI-6 a MMB-4 by bol byť odlišný v porovnaní s predchádzajúcou skupinou, pričom zvýšená produkcia RONS pri vysokých koncentráciách by mohla byť spôsobená v súvislosti s bunkovou smrťou.

U oxímu 2-PAM bol sledovaný pokles viability aj pri veľmi nízkej produkcii RONS v 24 hodinovou časovom intervale. Nakoľko zvýšenie hladiny RONS nepresiahlo



hranicu, ktorú by sme na základe výsledkov prvej skupiny mohli označiť ako antioxidačnú kapacitu buniek, teda 50 %, je možné predpokladať, že sa jedná o iný mechanizmus cytotoxicity.

Pre lepšie pochopenie mechanizmu cytotoxicity testovaných látok, by bolo potrebné využitie ďalších metodík, a to napr. sledovanie genotoxického účinku, zmeny v antioxidačnej kapacite buniek, po prípade priebehu zápalového procesu v bunkách a narušenie funkcie jednotlivých bunkových organel a kompartmentov.

Nakoľko pri jednotlivých testovaných koncentračných radách dochádzalo k veľmi variabilným výsledkom, boli ďalej pre lepšie porovnanie schopnosti jednotlivých rAChE indukovať tvorbu voľných radikálov uskutočnené experimenty použitím koncentrácií, ktoré odpovedali ich hodnotám IC<sub>50</sub>.

### **5.3.1.1 Indukcia oxidačného stresu pri hodnotách IC<sub>50</sub>**

K sledovaniu zmeny intracelulárnej hladiny po ovplyvnení buniek hodnotami, ktoré odpovedali IC<sub>50</sub> boli použité 3 rôzne fluorescenčné sondy, a to nešpecifická sonda DC-FDA (RONS) a 2 špecifické sondy DHE (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) a 4,5-DAF (NO). Sledovanie zmeny jednotlivých voľných radikálov v bunkách bolo uskutočnené v troch časových intervaloch (1, 4 a 24 hodín).

Z výsledkov je zrejmé, že najsilnejším induktorom oxidačného stresu bol LüH-6, ktorý vyvolal najvýraznejší nárast fluorescencie v prípade použitia sondy DC-FDA a 4,5-DAF (vo všetkých sledovaných časových intervaloch), a veľmi mierny nárast v prípade DHE (v časovom intervale 1 hodina). Okrem toho LüH-6 vyvolal aj najvýraznejšiu produkciu MDA, ktorý odráža lipidovú peroxidáciu a membránové poškodenie, v 24 hodinovom časovom intervale (Muckova et al. 2019). Obdobne LüH-6 vyvolal po 24 hodinovej inkubácii aj najvýraznejší nárast 3-NT (biomarker nitrácie proteínov) a taktiež najrozsiahlejšiu dysreguláciu metabolizmu tiolov (Muckova et al. 2019). V skupine konvenčne dostupných rAChE produkcia voľných radikálov v bunkách klesala v poradí TMB-4 > MMB-4 > 2-PAM > HI-6. V skupine oxímových rAChE so série K bol najvýraznejší nárast RONS detekovaný pomocou DCF-DA pozorovaný u oxímu K074 vo všetkých časových intervaloch. Hladina voľných radikálov postupne klesala v poradí K048 > K027 > K075 > K203. Obdobne aj pri sledovaní intracelulárnej produkcie NO bol vyvolaný najvýraznejší nárast po

ovplyvnení buniek rAChE K074, pričom ďalej množstvo NO v bunkách klesalo v rovnakom poradí ako pri použití sondy DCF-DA. K veľmi nízkemu, ale signifikantnému nárastu  $O_2^{\bullet-}$  v bunkách došlo v 4 hodinovom časovom intervale po ovplyvnení buniek oxímami K203 a K075.

Na základe výsledkov by sme mohli predpokladať, že na zmenu hladiny voľných radikálov v bunkách by mohla mať vplyv práve štruktúra látok. V prípade prvej sledovanej skupiny konvenčne používaných rAChE sme pozorovali najvýraznejší nárast RONS po ovplyvnení buniek oxímami LüH-6 a TMB-4. Pre tieto biskvartérne oxímy je charakteristická prítomnosť 2 oxímových skupín v pozícií 4 a ďalej sa líšia len charakterom spojovacieho reťazca (oba disponujú 3-uhlíkatým spojovacím reťazcom, avšak štruktúra LüH-6 je ďalej suplementovaná o atóm kyslíka v spojovacom reťazci). Oxím MMB-4 (uhlíkový reťazec 1C, 2 oxímové skupiny) a monokvartérny oxím 2-PAM s 1 oxímovou skupinou indukovali približne rovnaký nárast RONS v bunkách..

Najvýznamnejší štruktúrny aspekt, ktorý mal vplyv na hladinu NO v bunkách, bol práve počet oxímových skupín. U všetkých rAChE, ktoré vyvolali nárast NO, sú prítomné 2 oxímové skupiny v polohe 4, pričom je zrejmé, že substitúcia atómu kyslíka do 3C spojovacieho reťazca ešte prehĺbila schopnosť látky indukovať produkciu NO.

V skupine oxímov zo série K vyvolal najvýraznejší nárast RONS, detekovaný sondou DCF-DA oxím K074, pre ktorý je charakteristický 4C uhlíkatý reťazec medzi pyridiniovými kruhmi a prítomnosť 2 oxímových skupín. Nižší potenciál produkovať RONS mali oxímy K048 a K027, pre ktoré je charakteristická 1 oxímová skupina a medzi sebou sa líšia dĺžkou spojovacieho reťazca (4C a 3C). Ešte nižšiu produkciu voľných radikálov vyvolala dvojica oxímov K075 a K203, pričom tieto dve látky sa od ostatných líšia prítomnosťou dvojitej väzby v 4C uhlíkovom reťazci. Je dôležité podotknúť, že aj v tejto dvojici bol sledovaný vplyv počtu oxímových skupín, nakoľko oxím K075 (2 oxímové skupiny) vyvolal vyššiu produkciu RONS v porovnaní s K203 (1 oxímová skupina). Tieto dve látky ako jediné signifikantne zvýšili hladinu  $O_2^{\bullet-}$  v bunkách, za čo môže byť zodpovedná práve prítomnosť dvojitej väzby v spojovacom reťazci medzi pyridiniovými kruhmi.

Obdobne ako u skupiny konvenčne dostupných rAChE, aj u oxímov zo série K, mal na produkciu NO vplyv počet oxímových skupín, charakter a dĺžka spojovacieho

reťazca. Najvýraznejší nárast vyvolal oxím K074 (2 oxímové skupiny, 4C) nasledovaný oxímom K048 (1 oxímová skupina, 4C). V prípade dvojice oxímomom s dvojitou väzbou bol opäť silnejším induktorom produkcie NO oxím K075 (2 oxímové skupiny) v porovnaní s K203 (1 oxímová skupina). Oxím K027, ktorý sa svojou štruktúrou odlišuje od TMB-4 iba počtom oxímových skupín (K027 1 oxímová skupina), vyvolal podobný nárast ako K075 a K203, avšak v porovnaní s TMB-4 vyvolal nižšiu produkciu NO.

### **5.3.2 Inhibítory AChE**

Detekcia schopnosti látky narušiť oxidačno-redukčnú rovnováhu buniek bola sledovaná aj u skupiny látok, do ktorých boli zaradené rôzne iAChE. Produkcia RONS v bunkách a kombinácií so sledovaním bunkovej viability bola uskutočnená v rozličných koncentračných radách (rovnaké ako pri stanovení hodnôt  $IC_{50}$  pomocou MTT testu a EI metódy) v dvoch rôznych časových intervaloch (4 a 24 hodín).

V porovnaní s predchádzajúcou skupinou testovaných látok, iAChE negenerovali pri žiadnej sledovanej koncentrácii produkciu voľných radikálov. Naopak oproti kontrolným skupinám buniek bol sledovaný pokles intracelulárnych RONS, ktorý pomerne dobre koreloval s poklesom počtu viabilných buniek. U bunkovej línie HepG2 sme pri stanovení apoptickej aktivity buniek sledovali u všetkých testovaných iAChE s výnimkou pyridostigmínu prevahu nekrotických buniek. Z dôvodu, že po ovplyvnení buniek iAChE nebol detekovaný žiaden nárast RONS v porovnaní s kontrolou, by bolo možné konštatovať, že mechanizmom cytotoxicity tejto skupiny látok môže byť práve dysregulácia hladiny vápnika v bunkách, ktorá zohráva významnú úlohu pri nekrotických zmenách buniek. Počas nekrózy vedie dysregulácia hladiny vápnika v cytosole k preťaženiu mitochondrií a k aktivácií proteas a fosfolipas, čo môže viesť k destabilizácii membrány (Vanlangenakker et al. 2008; Celsi et al. 2009).

## **5.4 Sledovanie antioxidačnej aktivity**

Oxidačný stres je považovaný za jeden z možných mechanizmov toxicity OP látok pri akútnych a chronických intoxikáciách. Zohráva rovnako pomerne dôležitú úlohu v patogenéze AD (Vanova et al. 2018b; HUANG et al. 2016). Z tohto dôvodu bola otestovaná schopnosť jednotlivých látok redukovať hladinu voľných radikálov indukovanú pomocou tBuOOH na HepG2 bunkách.

### 5.4.1 Reaktivátory AChE

Sledovanie antioxidantnej aktivity testovaných rAChE bolo stanovené kontinuálne v čase po dobu 2 hodín. Na základe výsledkov je možné rAChE rozdeliť do troch skupín, a to na (a) látky, ktoré hladinu voľných radikálov ďalej mierne zvyšovali aj napriek zvolenej koncentrácii, ktorá v predchádzajúcom experimente nemala vplyv na viabilitu buniek a na intracelulárnu hladinu RONS, (b) látky, ktoré na intracelulárnu hladinu voľných radikálov indukovanú tBuOOH nemali žiaden vplyv a (c) látky, ktoré sa vyznačovali schopnosťou znížiť množstvo detekovateľných voľných radikálov.

K látkam, ktoré ďalej zvyšovali hladinu RONS oproti kontrolnej skupine buniek inkubované so samotným tBuOOH, patrili MMB-4, TMB-4, LüH-6 a z oxímov zo série K to boli látky K027, K048 a K074. U biskvartérneho rAChE HI-6 nebola detekovaná žiadna zmena v množstve voľných radikálov v bunkách.

Naopak u dvoch oxímových rAChE, K075 a K203, bolo detekované výrazné zníženie hladiny RONS v bunkách, ktoré bolo zrovnateľné s antioxidantným účinkom rGLU. Pre štruktúru týchto látok je charakteristická dvojité väzba v spojovacom reťazci medzi dvoma pyridiniovými kruhmi. Práve prítomnosť dvojitej väzby v molekule je považovaná za štruktúrny aspekt, ktorý by mohol zvyšovať schopnosť látky vychytávať voľné radikály (Chen 2018; Bendary et al. 2013; Li et al. 2018).

Mierny pokles, avšak tak významný ako v prípade K075 a K203 spôsobil aj jediný testovaný monokvartérny rAChE 2-PAM.

### 5.4.2 Inhibítory AChE

Sledovanie antioxidantných vlastností iAChE bolo uskutočnené obdobne ako pri predchádzajúcej skupine látok. V porovnaní s predchádzajúcimi látkami, je možné na základe získaných dát rozdeliť iAChE do dvoch skupín, a to (a) látky, ktoré na intracelulárnu hladinu voľných radikálov indukovanú tBuOOH nemali žiaden vplyv, (b) látky, ktoré sa vyznačovali schopnosťou znížiť množstvo detekovateľných voľných radikálov.

K látkam, ktoré nemali vplyv na hladinu voľných radikálov, ktoré boli indukované tBuOOH patrili THA a jeho deriváty 7-MEOTA a Cl-THA, a ďalej pyridostigmín. Naopak donepezil a rivastigmín vykazovali zrovnateľnú antioxidantnú aktivitu

v porovnaní s rGLU. Tieto dva iAChE sú považované za najúčinnnejšie a najčastejšie používané iAChE pre farmakoterapiu AD. Antioxidačné vlastnosti donepezilu boli potvrdené v rôznych štúdiách. Munishamappa et al. (2019) sledovali schopnosť donepezilu vychytávať voľné radikály meraním NO syntasy a pomocou DPPH metódy. Na základe ich výsledkov konštatovali, že donepezil sa vyznačuje podobnými antioxidačnými vlastnosťami ako vitamín C (Munishamappa et al. 2019). Antioxidačné vlastnosti samotného donepezilu alebo v jeho kombinácii s kofeínom boli sledované a potvrdené aj pri *in vivo* experimentoch na potkanoch, kedy bola sledovaná koncentrácia MDA v ich mozgu a taktiež enzymatický a neenzymatický antioxidačný status v mozgu potkanov (Oboh et al. 2017). Rivastigmín sa okrem antioxidačných vlastností vyznačuje aj schopnosťou redukovať glutamátom indukovanú excitotoxicitu a taktiež protizápalovými vlastnosťami a to redukciou produkcie cytokínov a inhibíciou reaktivity encefalitogénnych T-lymfocytov (Egbuna et al. 2020; Goschorska et al. 2018).

Galantamín je známym scavengerom ROS a pôsobí tak neuroprotektívne (Tsvetkova et al. 2013). Z výsledkov získaných počas riešenie práce je zrejmé, že galantamín sa vyznačuje mierne slabšími, ale významnými antioxidačnými vlastnosťami. Antioxidačné vlastnosti a schopnosť vychytávať rôzne voľné radikály potvrdili vo svojej štúdiu pomocou chemiluminiscencie a spektrofotometrie závislej na luminolu aj Traykova et al. (2003). Protektívne účinky galantamínu boli sledované aj použitím buniek SK-N-SH, ktoré boli inkubované s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a následne ovplyvnené galantamínom, pričom došlo k 50% poklesu množstva voľných radikálov a taktiež k významnej inhibícii produkcie nitritu indukovanej pomocou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ezoulin et al. 2008).

## 6. Prínos práce

Hlavným prínosom predkladanej dizertačnej práce je zavedenie niekoľkých nových metód pre *in vitro* charakterizáciu látok. Okrem metód, ktoré už boli na pracovisku zavedené (sledovanie cytotoxicity pomocou MTT testu a metódou využívajúcou systém xCelligence), boli počas riešenia experimentálnej časti dizertačnej práce zavedené 3 fluorescenčné metódy, pomocou ktorých je možné sledovanie hladiny voľných radikálov v bunkách. Korelácia fluorescenčných metód spolu so stanovením MDA, 3-NT a tiolovej redoxnej rovnováhy pomocou LC-MS/MS a HLPC-UV zavedené v laboratóriu analytickej chémie KTVF, FVZ UO poskytujú komplexný nástroj pre hodnotenie oxidačného poškodenia buniek *in vitro*, ktorý je ďalej využiteľný pri sledovaní cytotoxicity látok a možného mechanizmu toxicity nových potenciálnych antidot pri otravách NPL alebo liečiv. Nakoľko jedným z mechanizmov toxicity NPL je oxidačný stres, ktorý rovnako zohráva aj určitú úlohu pri patogenéze rôznych neurodegeneratívnych ochorení, je možné pomocou týchto fluorescenčných sond sledovanie antioxidačného účinku nových potenciálnych antidot a liečiv. Ďalej boli sledovaný aj určité štruktúrne aspekty, ktorý by mohli mať vplyv na toxicitu látok rovnako ako schopnosť indukovať RONS, po prípade mať vplyv na antioxidačné vlastnosti látok. Nakoľko ešte stále neexistuje žiaden univerzálny rAChE, tieto poznatky by sa mohli uplatniť pri ich vývoji.

## 7. Záver

Sledovanie cytotoxicity *in vitro* a sledovanie možných mechanizmov toxicity látok je možné zaradiť medzi základné procesy, ktoré sa uskutočňujú v preklinickou hodnotení nových potenciálnych liečiv, po prípade rôznych antidot. Aj napriek tomu, že rôzne *in vitro* modely nedokážu úplne nahradiť experimenty na laboratórnych zvieratách, umožňujú určitý skrínig celého spektra chemických entít a následne ich tak vylúčiť z ďalšieho procesu testovania. Táto primárna selekcia látok tak vedie k určitej redukcii počtu laboratórnych zvierat. Okrem cytotoxicity po prípade schopnosti indukovať oxidačné poškodenie, či vstup buniek do apoptózy alebo nekrózy, je nutné posudzovať tieto látky aj s pohľadu ich účinnosti.

Počas riešenie predkladanej práce bolo zistené, že existujú určité štruktúrne aspekty rAChE, ktorý by mohli mať vplyv na ich cytotoxicitu, rovnako ako aj vstup bunky do apoptózy či nekrózy, schopnosť látky narušiť oxidačno-redukčnú rovnováhu buniek, po prípade vykazovať určité antioxidačné vlastnosti. K týmto aspektom štruktúry možno dĺžku a charakter spojovacieho reťazca medzi pyridiniovými kruhy, počet oxímových skupín a taktiež ich polohu na pyridiniovom kruhu. U iAChE sme nepozorovali žiadne štruktúrne závislosti vo vzťahu k toxicite látok, avšak čím bola molekulová hmotnosť látky vyššia, tým sme pozorovali aj vyšší cytotoxický potenciál (u látok pyridostigmín, rivastigmín, galantamín a donepezil). THA a jeho deriváty 7-MEOTA a Cl-THA vykazovali najvyšší toxický potenciál. Nakoľko u iAChE nebola detekovaná žiadna dysbalancia v oxidačno-redukčnej rovnováhe, je možné predpoklad, že mechanizmom cytotoxicity týchto látok je dysregulácia hladiny vápnika v bunkách.

Na záver je však dôležité podotknúť, že medzi testovaním toxicity na bunkách a *in vivo* experimentami je možné mnohokrát sledovať určité rozdiely. Tieto odlišnosti možno vysvetliť tým, že pri *in vitro* experimentoch prichádzajú do kontaktu s testovanými látkami bunky, nakoľko laboratórne zviera predstavuje vysokoorganizovaný systém rôznych typov buniek. Z tohto dôvodu je do budúcnosti dôležité zaviesť na pracovisku bunkové modely, pomocou ktorých by sme sa priblížili čo najviac práve ku komplexnosti zvieracích modelov.

## 8. Zoznam použitej literatúry

ADAN, Aysun, Yağmur KIRAZ a Yusuf BARAN, 2016. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. **17**(14), 1213–1221. ISSN 1873-4316. Dostupné z: doi:10.2174/1389201017666160808160513

ALBUQUERQUE, Edson X., Edna F. R. PEREIRA, Yasco ARACAVA, William P. FAWCETT, Maristela OLIVEIRA, William R. RANDALL, Tracey A. HAMILTON, Robert K. KAN, James A. ROMANO a Michael ADLER, 2006. Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **103**(35), 13220–13225. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0605370103

ANDERSON, Tim a Carey N. POPE, 2017. Pyridostigmine☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2020-03-31]. ISBN 978-0-12-801238-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.97627-X

ANDRADE, E.L., A.F. BENTO, J. CAVALLI, S.K. OLIVEIRA, C.S. FREITAS, R. MARCON, R.C. SCHWANKE, J.M. SIQUEIRA a J.B. CALIXTO, 2016. Non-clinical studies required for new drug development - Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. **49**(11) [vid. 2020-04-17]. ISSN 0100-879X. Dostupné z: doi:10.1590/1414-431X20165644

ANTONIJEVIC, Biljana a Milos P. STOJILJKOVIC, 2007. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. *Clinical Medicine & Research* [online]. **5**(1), 71–82. ISSN 1539-4182. Dostupné z: doi:10.3121/cm.2007.701

ARACAVA, Yasco, Edna F. R. PEREIRA, Miriam AKKERMAN, Michael ADLER a Edson X. ALBUQUERQUE, 2009. Effectiveness of Donepezil, Rivastigmine, and (±)Huperzine A in Counteracting the Acute Toxicity of Organophosphorus Nerve Agents: Comparison with Galantamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. **331**(3), 1014–1024. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.109.160028

ASLANTÜRK, Özlem Sultan, 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World* [online]. [vid. 2020-02-13]. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.71923

BAJGAR, Jiri, 2009. *Central and peripheral nervous system: Effects of highly toxic organophosphates and their antidotes*. B.m.: Research Signpost. ISBN 978-81-308-0331-9.

BENDARY, E., R. R. FRANCIS, H. M. G. ALI, M. I. SARWAT a S. EL HADY, 2013. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences* [online]. **58**(2), 173–181. ISSN 0570-1783. Dostupné z: doi:10.1016/j.aos.2013.07.002



BRYAN, Nathan S. a Matthew B. GRISHAM, 2007. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free radical biology & medicine* [online]. **43**(5), 645–657. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026

CARTER, Matt a Jennifer SHIEH, 2015. Chapter 14 - Cell Culture Techniques. In: Matt CARTER a Jennifer SHIEH, ed. *Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition)* [online]. San Diego: Academic Press, s. 295–310 [vid. 2020-02-05]. ISBN 978-0-12-800511-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800511-8.00014-9

CELSI, Fulvio, Paola PIZZO, Marisa BRINI, Sara LEO, Carmen FOTINO, Paolo PINTON a Rosario RIZZUTO, 2009. Mitochondria, calcium and cell death: A deadly triad in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. **1787**(5), Mitochondrial Physiology and Pathology, 335–344. ISSN 0005-2728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2009.02.021

COHN, Corey A, Christopher E PEDIGO, Shavonne N HYLTON, Sanford R SIMON a Martin AA SCHOONEN, 2009. Evaluating the use of 3'-(p-Aminophenyl) fluorescein for determining the formation of highly reactive oxygen species in particle suspensions. *Geochemical Transactions* [online]. **10**, 8. ISSN 1467-4866. Dostupné z: doi:10.1186/1467-4866-10-8

ČOLOVIĆ, Mirjana B, Danijela Z KRSTIĆ, Tamara D LAZAREVIĆ-PAŠTI, Aleksandra M BONDŽIĆ a Vesna M VASIĆ, 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. **11**(3), 315–335. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006

DAWSON, R. M., 1994. Review of oximes available for treatment of nerve agent poisoning. *Journal of applied toxicology: JAT*. **14**(5), 317–331. ISSN 0260-437X.

DE PAULA, Reuel L., Joyce S. F. D. DE ALMEIDA, Samir F. A. CAVALCANTE, Arlan S. GONÇALVES, Alessandro B. C. SIMAS, Tanos C. C. FRANCA, Martin VALIS, Kamil KUCA, Eugenie NEPOVIMOVA a José M. GRANJEIRO, 2018. Molecular Modeling and In Vitro Studies of a Neutral Oxime as a Potential Reactivator for Acetylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **23**(11), 2954. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23112954

DOKE, Sonali K. a Shashikant C. DHAWALE, 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* [online]. **23**(3), 223–229. ISSN 1319-0164. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002

DUVAL, Kayla, Hannah GROVER, Li-Hsin HAN, Yongchao MOU, Adrian F. PEGORARO, Jeffery FREDBERG a Zi CHEN, 2017. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* [online]. **32**(4), 266–277. ISSN 1548-9213. Dostupné z: doi:10.1152/physiol.00036.2016

EDMONDSON, Rasheena, Jessica Jenkins BROGLIE, Audrey F. ADCOCK a Liju YANG, 2014. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug

Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay and Drug Development Technologies* [online]. **12**(4), 207–218. ISSN 1540-658X. Dostupné z: doi:10.1089/adt.2014.573

EGBUNA, Chukwuebuka, Shashank KUMAR, Jonathan C. IFEMEJE, Shahira M. EZZAT a Saravanan KALIYAPERUMAL, 2020. *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery* [online]. B.m.: Elsevier [vid. 2020-05-20]. ISBN 978-0-12-817890-4. Dostupné z: doi:10.1016/C2018-0-02367-1

EISENBRAND, G, B POOL-ZOBEL, V BAKER, M BALLS, B. J BLAAUBOER, A BOOBIS, A CARERE, S KEVEKORDES, J. -C LHUGUENOT, R PIETERS a J KLEINER, 2002. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **40**(2–3), 193–236. ISSN 0278-6915. Dostupné z: doi:10.1016/S0278-6915(01)00118-1

EKWALL, B., 1983. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **407**, 64–77. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/j.1749-6632.1983.tb47814.x

ELMORE, Susan, 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic pathology* [online]. **35**(4), 495–516. ISSN 0192-6233. Dostupné z: doi:10.1080/01926230701320337

ERKEKOGLU, Pınar, Belma Kocer GIRAY a Nurşen BAŞARAN, 2013. 3 R Principle and Alternative Toxicity Testing Methods. In: .

ESCH, Eric W., Anthony BAHINSKI a Dongeun HUH, 2015. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. **14**(4), 248–260. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd4539

EYER, Peter a Winfried HELL, 1985. Chemical Stability of the Hagedorn Oximes HGG-12 and HI-6. *Archiv der Pharmazie* [online]. **318**(10), 938–946. ISSN 1521-4184. Dostupné z: doi:10.1002/ardp.19853181015

EZOULIN, Miezan J. M., Jean-Edouard OMBETTA, Hélène DUTERTRE-CATELLA, Jean-Michel WARNET a France MASSICOT, 2008. Antioxidative properties of galantamine on neuronal damage induced by hydrogen peroxide in SK-N-SH cells. *Neurotoxicology* [online]. **29**(2), 270–277. ISSN 0161-813X. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2007.11.004

FRÖHLICH, Eleonore, 2018. Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* [online]. **46**(sup2), 1091–1107. ISSN 2169-1401. Dostupné z: doi:10.1080/21691401.2018.1479709

FUKUTO, T R, 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*. **87**, 245–254. ISSN 0091-6765.

GETMAN, D K, J H EUBANKS, S CAMP, G A EVANS a P TAYLOR, 1992. The human gene encoding acetylcholinesterase is located on the long arm of chromosome 7. *American Journal of Human Genetics*. **51**(1), 170–177. ISSN 0002-9297.

GILLIS, Katherine, Julie CLOR, Asima KHAN a Kamala TYAGARAJAN, 2017. Multiplexed approaches correlating mitochondrial health to cell health using microcapillary cytometry. *Methods* [online]. [vid. 2018-01-22]. ISSN 1046-2023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2017.11.004

GOLPOUR, Monireh, Haleh AKHAVAN NIAKI, Hamid Reza KHORASANI, Arian HAJIAN, Roya MEHRASA a Amrollah MOSTAFAZADEH, 2014. Human Fibroblast Switches to Anaerobic Metabolic Pathway in Response to Serum Starvation: A Mimic of Warburg Effect. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. **3**(2), 74–80. ISSN 2251-9637.

GOMES, Ana, Eduarda FERNANDES a José L. F. C. LIMA, 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. **65**(2–3), 45–80. ISSN 0165-022X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003

GONZALEZ-HUNT, Claudia P., Mandheer WADHWA a Laurie H. SANDERS, 2018. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology* [online]. **7**, Oxidative Toxicology: Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Health and Disease: Mechanisms, Target Organ Toxicities, and Biomarkers, 87–94. ISSN 2468-2020. Dostupné z: doi:10.1016/j.cotox.2017.11.001

GOSCHORSKA, Marta, Izabela GUTOWSKA, Irena BARANOWSKA-BOSIACKA, Katarzyna PIOTROWSKA, Emilia METRYKA, Krzysztof SAFRANOW a Dariusz CHLUBEK, 2018. Influence of Acetylcholinesterase Inhibitors Used in Alzheimer's Disease Treatment on the Activity of Antioxidant Enzymes and the Concentration of Glutathione in THP-1 Macrophages under Fluoride-Induced Oxidative Stress. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. **16**(1). ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph16010010

GRIENDLING, Kathy K., Rhian M. TOUYZ, Jay L. ZWEIER, Sergey DIKALOV, William CHILIAN, Yeong-Renn CHEN, David G. HARRISON a Aruni BHATNAGAR, 2016. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation research* [online]. **119**(5), e39–e75. ISSN 0009-7330. Dostupné z: doi:10.1161/RES.0000000000001110

GUPTA, Ramesh C., 2009. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. B.m.: Academic Press. ISBN 978-0-12-374484-5.

HARKEMA, Jack R., Kristen J. NIKULA a Wanda M. HASCHEK, 2018. Chapter 14 - Respiratory System. In: Matthew A. WALLIG, Wanda M. HASCHEK, Colin G. ROUSSEAU a Brad BOLON, ed. *Fundamentals of Toxicologic Pathology (Third Edition)* [online]. B.m.: Academic Press, s. 351–393 [vid. 2020-05-12]. ISBN 978-0-12-809841-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809841-7.00014-9

HARRY, G J, M BILLINGSLEY, A BRUININK, I L CAMPBELL, W CLASSEN, D C DORMAN, C GALLI, D RAY, R A SMITH a H A TILSON, 1998. In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. **106**(Suppl 1), 131–158. ISSN 0091-6765.

HEILBRONN, E. a B. TOLAGEN, 1965. TOXOGONIN IN SARIN, SOMAN AND TABUN POISONING. *Biochemical Pharmacology* [online]. **14**, 73–77. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(65)90059-6

HO, Edwin, Keyvan KARIMI GALOUGAHI, Chia-Chi LIU, Ravi BHINDI a Gemma A. FIGTREE, 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology* [online]. **1**(1), 483–491. ISSN 2213-2317. Dostupné z: doi:10.1016/j.redox.2013.07.006

HOBBIGER, F. a P. W. SADLER, 1959. Protection against lethal organophosphate poisoning by quaternary pyridine aldoximes. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*. **14**(2), 192–201. ISSN 0366-0826.

HONEGGER, Paul, 1999. Overview of Cell and Tissue Culture Techniques. *Current Protocols in Pharmacology* [online]. **4**(1), 12.1.1-12.1.12. ISSN 1934-8290. Dostupné z: doi:10.1002/0471141755.ph1201s04

HUANG, WEN-JUAN, XIA ZHANG a WEI-WEI CHEN, 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports* [online]. **4**(5), 519–522. ISSN 2049-9434. Dostupné z: doi:10.3892/br.2016.630

CHAMCHOY, Kamonwan, Danaya PAKOTIPRAPHA, Pornpan PUMIRAT, Ubolsree LEARTSAKULPANICH a Usa BOONYUEN, 2019. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry* [online]. **20**(1), 4. ISSN 1471-2091. Dostupné z: doi:10.1186/s12858-019-0108-1

CHEN, Lei, 2018. Dietary phenolic compound with the presence of C2=C3 double bond take the pre-emptive opportunities to enhance its biological effects. *Journal of Food Microbiology* [online]. B.m.: Allied Academies, **0**(0) [vid. 2020-05-18]. ISSN Open Access. Dostupné z: <https://www.alliedacademies.org/abstract/dietary-phenolic-compound-with-the-presence-of-csub2subsub3sub-double-bond-take-the-preemptive-opportunities-to-enhance-its-biolo-9735.html>

CHEN, Vicky P., Wilson K. W. LUK, Wallace K. B. CHAN, K. Wing LEUNG, Ava J. Y. GUO, Gallant K. L. CHAN, Sherry L. XU, Roy C. Y. CHOI a Karl W. K. TSIM, 2011. Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. **4** [vid. 2020-01-14]. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2011.00036

JAIN, Abhishek K., Divya SINGH, Kavita DUBEY, Renuka MAURYA, Sandeep MITTAL a Alok K. PANDEY, 2018. Chapter 3 - Models and Methods for In Vitro Toxicity. In: Alok DHAWAN a Seok KWON, ed. *In Vitro Toxicology* [online]. B.m.: Academic Press, s. 45–65 [vid. 2020-01-29]. ISBN 978-0-12-804667-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804667-8.00003-1

JOKANOVIĆ, Milan, 2009. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicology Letters* [online]. **190**(2), 107–115. ISSN 1879-3169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.025

JOKANOVIĆ, Milan a Milica PROSTRAN, 2009. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **16**(17), 2177–2188. ISSN 0929-8673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788612729

JOKANOVIĆ, Milan a Milos P. STOJILJKOVIĆ, 2006. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology* [online]. **553**(1–3), 10–17. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2006.09.054

KALYANARAMAN, Balaraman, Victor DARLEY-USMAR, Kelvin J. A. DAVIES, Phyllis A. DENNERY, Henry Jay FORMAN, Matthew B. GRISHAM, Giovanni E. MANN, Kevin MOORE, L. Jackson ROBERTS a Harry ISCHIROPOULOS, 2012. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. **52**(1), 1–6. ISSN 1873-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030

KANDÁROVÁ, Helena a Silvia LETAŠIOVÁ, 2011. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. **4**(3), 107–113. ISSN 1337-6853. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-011-0018-6

KAPALCZYŃSKA, Marta, Tomasz KOLENDA, Weronika PRZYBYŁA, Maria ZAJĄCZKOWSKA, Anna TERESIAK, Violetta FILAS, Matthew IBBS, Renata BLIŹNIAK, Łukasz ŁUCZEWSKI a Katarzyna LAMPERSKA, 2018. 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS* [online]. **14**(4), 910–919. ISSN 1734-1922. Dostupné z: doi:10.5114/aoms.2016.63743

KASSA, Jiri, Daniel JUN, Jana KARASOVA, Jiri BAJGAR a Kamil KUČA, 2008a. A comparison of reactivating efficacy of newly developed oximes (K074, K075) and currently available oximes (obidoxime, HI-6) in soman, cyclosarin and tabun-poisoned rats. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **175**(1–3), 425–427. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.05.001

KASSA, Jiří, Jiří BAJGAR, Kamil KUČA, Kamil MUSÍLEK a Jana KARASOVÁ, 2008b. The present approaches to the development of prophylactic and therapeutic antidotes against nerve agents. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. **1**(1), 18–21. ISSN 1337-6853. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-010-0026-y

KASSA, Jiří, Jan KORÁBEČNÝ a Eugenie NEPOVIMOVÁ, 2017. The Evaluation of Benefit of Newly Prepared Reversible Inhibitors of Acetylcholinesterase and Commonly Used Pyridostigmine as Pharmacological Pretreatment of Soman-Poisoned Mice. *Acta Medica (Hradec Kralove)* [online]. **60**(1), 37–43. ISSN 1211-4286. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2017.45

KATERJI, Meghri, Maria FILIPPOVA a Penelope DUERKSEN-HUGHES, 2019. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online] [vid. 2020-03-05]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1155/2019/1279250

KAUR, Gurvinder a Jannette M. DUFOUR, 2012. Cell lines. *Spermatogenesis* [online]. **2**(1), 1–5. ISSN 2156-5554. Dostupné z: doi:10.4161/spmg.19885

KE, Ning, Xiaobo WANG, Xiao XU a Yama A. ABASSI, 2011. The xCELLigence System for Real-Time and Label-Free Monitoring of Cell Viability. In: Martin J. STODDART, ed. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 33–43 [vid. 2020-02-15]. ISBN 978-1-61779-108-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_6

KEPNER, L. A. a O. L. WOLTHUIS, 1978. A comparison of the oximes HS-6 and HI-6 in the therapy of soman intoxication in rodents. *European Journal of Pharmacology* [online]. **48**(4), 377–382. ISSN 0014-2999. Dostupné z: doi:10.1016/0014-2999(78)90164-4

KHOURY, Laure, Daniel ZALKO a Marc AUDEBERT, 2016. Evaluation of four human cell lines with distinct biotransformation properties for genotoxic screening. *Mutagenesis* [online]. B.m.: Oxford Academic, **31**(1), 83–96. ISSN 0267-8357. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/gev058

KNIGHT, Eleanor a Stefan PRZYBORSKI, 2015. Advances in 3D cell culture technologies enabling tissue-like structures to be created in vitro. *Journal of Anatomy* [online]. **227**(6), 746–756. ISSN 0021-8782. Dostupné z: doi:10.1111/joa.12257

KORABECNY, J., K. SPILOVSKA, O. BENEK, K. MUSILEK, O. SOUKUP a K. KUČA, 2012. *Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby* [online] [vid. 2020-03-31]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2012-5-4/takrin-a-jeho-derivaty-v-terapii-alzheimerovy-choroby-39300>

KRATOCHVIL, Michael J., Alexis J. SEYMOUR, Thomas L. LI, Sergiu P. PAȘCA, Calvin J. KUO a Sarah C. HEILSHORN, 2019. Engineered materials for organoid systems. *Nature Reviews Materials* [online]. **4**(9), 606–622. ISSN 2058-8437. Dostupné z: doi:10.1038/s41578-019-0129-9

KUČA, Kamil, Martina HRABINOVA, Daniel JUN, Kamil MUSILEK, Marek PENHAKER, Ondrej KREJCAR a Ondrej SOUKUP, 2015. Universality of Oxime K203 for Reactivation of Nerve Agent-Inhibited AChE. *Medicinal Chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))* [online]. **11**(7), 683–686. ISSN 1875-6638. Dostupné z: doi:10.2174/1573406411666150407154204

KUČA, Kamil, Daniel JUNA a Kamil MUSILEK, 2006. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. **6**(3), 269–277. ISSN 1389-5575. Dostupné z: doi:10.2174/138955706776073510

KUETE, V., O. KARAOSMANOĞLU a H. SIVAS, 2017. Chapter 10 - Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. In: Victor KUETE, ed. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* [online]. B.m.: Academic Press, s. 271–297 [vid. 2020-02-13]. ISBN 978-0-12-809286-6. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-809286-6.00010-8

KUMAR, Anil a Sandeep SHARMA, 2020. Donepezil. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2020-03-31]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513257/>

KUMAR, Priti, Arvindhan NAGARAJAN a Pradeep D. UCHIL, 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2018**(6), pdb.prot095497. ISSN 1940-3402, 1559-6095. Dostupné z: [doi:10.1101/pdb.prot095497](https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497)

KYRYLKOVA, Kateryna, Sergiy KYRYACHENKO, Mark LEID a Chrissa KIOUSSI, 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **887**, 41–47. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-61779-860-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5)

LABUSCHAGNE, Christiaan F., Niels J. F. VAN DEN BROEK, Pjotr POSTMA, Ruud BERGER a Arjan B. BRENKMAN, 2013. A Protocol for Quantifying Lipid Peroxidation in Cellular Systems by F2-Isoprostane Analysis. *PLoS ONE* [online]. **8**(11) [vid. 2020-03-31]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0080935](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080935)

LAVON, Ophir, Arik EISENKRAFT, Merav BLANCA, Lily RAVEH, Erez RAMATY, Amir KRIVOY, Jacob ATSMON, Ettie GRAUER a Rachel BRANDEIS, 2015. Is rivastigmine safe as pretreatment against nerve agents poisoning? A pharmacological, physiological and cognitive assessment in healthy young adult volunteers. *NeuroToxicology* [online]. **49**, 36–44. ISSN 0161-813X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.neuro.2015.05.003](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.05.003)

LEE, Soo Fern a Shazib PERVAIZ, 2011. Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxodG. *Methods in Cell Biology* [online]. **103**, 99–113. ISSN 0091-679X. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-385493-3.00005-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00005-X)

LI, Xican, Hong XIE, Ruicai ZHAN a Dongfeng CHEN, 2018. Effect of Double Bond Position on 2-Phenyl-benzofuran Antioxidants: A Comparative Study of Moracin C and Iso-Moracin C. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [online]. **23**(4) [vid. 2020-05-18]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules23040754](https://doi.org/10.3390/molecules23040754)

LILIENFELD, Sean, 2002. Galantamine — a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews* [online]. **8**(2), 159–176. ISSN 1080-563X. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x](https://doi.org/10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x)

LOBO, V., A. PATIL, A. PHATAK a N. CHANDRA, 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* [online]. **4**(8), 118–126. ISSN 0973-7847. Dostupné z: [doi:10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902)

LORKE, Dietrich E. a Georg A. PETROIANU, 2019. The Experimental Oxime K027—A Promising Protector From Organophosphate Pesticide Poisoning. A Review Comparing K027, K048, Pralidoxime, and Obidoxime. *Frontiers in Neuroscience*

[online]. **13** [vid. 2020-01-15]. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2019.00427

MANN, Amandeep a Rachel F. TYNDALE, 2010. Cytochrome P450 2D6 enzyme neuroprotects against 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in SH-SY5Y neuronal cells. *European Journal of Neuroscience* [online]. **31**(7), 1185–1193. ISSN 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07142.x

MARRS, Dr Timothy T., Robert L. MAYNARD a Frederick SIDELL, 2007. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment*. B.m.: John Wiley & Sons. ISBN 978-0-470-01359-5.

MARTINEZ-SERRA, Jordi, Antonio GUTIERREZ, Saúl MUÑOZ-CAPÓ, María NAVARRO-PALOU, Teresa ROS, Juan Carlos AMAT, Bernardo LOPEZ, Toni F MARCUS, Laura FUEYO, Angela G SUQUIA, Jordi GINES, Francisco RUBIO, Rafael RAMOS a Joan BESALDUCH, 2014. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets and therapy* [online]. **7**, 985–994. ISSN 1178-6930. Dostupné z: doi:10.2147/OTT.S62887

MASSOULIÉ, Jean, 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neuro-Signals* [online]. **11**(3), 130–143. ISSN 1424-862X. Dostupné z: doi:10.1159/000065054

MCSTAY, Gavin P. a Douglas R. GREEN, 2014. Detection of caspase activity using antibody-based techniques. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2014**(7), 783–788. ISSN 1559-6095. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot080291

MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Julien RENOU, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI, Florian NACHON, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD, 2012. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research* [online]. **45**(5), 756–766. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar2002864

MISIK, Jan, Eugenie NEPOVIMOVA, Jaroslav PEJCHAL, Jiri KASSA, Jan KORABECNY a Ondrej SOUKUP, 2018. Cholinesterase Inhibitor 6-Chlorotacrine - In Vivo Toxicological Profile and Behavioural Effects. *Current Alzheimer Research* [online]. **15**(6), 552–560. ISSN 1875-5828. Dostupné z: doi:10.2174/1567205015666171212105412

M. MARTINEZ, Michelle, Randall D. REIF a Dimitri PAPPAS, 2010. Detection of apoptosis : A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods* [online]. B.m.: Royal Society of Chemistry, **2**(8), 996–1004. Dostupné z: doi:10.1039/C0AY00247J

MONTENEGRO, M. F., F. RUIZ-ESPEJO, F. J. CAMPOY, E. MUÑOZ-DELGADO, M. Páez DE LA CADENA, F. J. RODRÍGUEZ-BERROCAL a C. J. VIDAL, 2006. Cholinesterases are down-expressed in human colorectal carcinoma. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* [online]. **63**(18), 2175–2182. ISSN 1420-9071. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-006-6231-3



MUCKOVA, L., N. VANOVA, J. MISIK, D. HERMAN, J. PEJCHAL a D. JUN, 2019. Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. **56**, 110–117. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2019.01.013

MUNISHAMAPPA, Vinay, SEETHALAKSHMI, A E VIJAYAKUMAR a T RAJATHILAGAM, 2019. Evaluation of the antioxidant activity of donepezil - in vitro study. *Evaluation of the antioxidant activity of donepezil - in vitro study* [online]. **9(2)**, National Jpurnal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology, 108–110. Dostupné z: doi:10.5455/njppp.2019.9.1134624112018

MUNSHI, Anupama, Marvette HOBBS a Raymond E. MEYN, 2005. Clonogenic cell survival assay. *Methods in Molecular Medicine* [online]. **110**, 21–28. ISSN 1543-1894. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-869-2:021

MUSILEK, Kamil, Ondrej HOLAS, Anna HOROVA, Miroslav POHANKA, Jana ZDAROVA-KARASOVA, Daniel JUN a Kamil KUCA, 2011. Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides. *Pesticides in the Modern World - Effects of Pesticides Exposure* [online]. [vid. 2020-01-17]. Dostupné z: doi:10.5772/17287

NADKARNI, Rohan R., Soumeya ABED a Jonathan S. DRAPER, 2016. Organoids as a model system for studying human lung development and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **473(3)**, Special Issue: Stem Cells, 675–682. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2015.12.091

NAIR, V. Priya a Jennifer M. HUNTER, 2004. Anticholinesterases and anticholinergic drugs. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* [online]. B.m.: Oxford Academic, **4(5)**, 164–168. ISSN 1743-1816. Dostupné z: doi:10.1093/bjaceaccp/mkh045

OBOH, Ganiyu, Opeyemi Babatunde OGUNSUYI a Oluwaseyi Emmanuel OLONISOLA, 2017. Does caffeine influence the anticholinesterase and antioxidant properties of donepezil? Evidence from in vitro and in vivo studies. *Metabolic Brain Disease* [online]. **32(2)**, 629–639. ISSN 1573-7365. Dostupné z: doi:10.1007/s11011-017-9951-1

ONG, Irvine Lian Hao a Kun-Lin YANG, 2017. Recent developments in protease activity assays and sensors. *Analyst* [online]. **142(11)**, 1867–1881. ISSN 1364-5528. Dostupné z: doi:10.1039/C6AN02647H

PATEL, Rakesh P., Joanne MCANDREW, Hassan SELLA, C. Roger WHITE, Hanjoong JO, Bruce A. FREEMAN a Victor M. DARLEY-USMAR, 1999. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. **1411(2)**, 385–400. ISSN 0005-2728. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2728(99)00028-6

PATOCKA, Jiri a Daniel Jun and Kamil KUCA, 2008. Possible Role of Hydroxylated Metabolites of Tacrine in Drug Toxicity and Therapy of Alzheimers Disease. *Current*

*Drug Metabolism* [online] [vid. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/66810/article>

PATOČKA, Jiří, Jiří CABAL, Kamil KUČA a Daniel JUN, 2005. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. B.m.: Journal of Applied Biomedicine, **3**(2), 91–99. ISSN 1214021X, 12140287. Dostupné z: [doi:10.32725/jab.2005.011](https://doi.org/10.32725/jab.2005.011)

PEJCHAL, Jaroslav, Jan OSTERREICHER, Kamil KUČA, Daniel JUN, Jiri BAJGAR a Jiri KASSA, 2008. The Influence of Acetylcholinesterase Reactivators on Selected Hepatic Functions in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. **103**(2), 119–123. ISSN 1742-7843. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00249.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00249.x)

PELLEGRINI, Joseph E., Andrew B. BAKER, Donald J. FONTENOT a Alex F. CARDENAS, 2000. The Effect of Oral Pyridostigmine Bromide Nerve Agent Prophylaxis on Return of Twitch Height in Persons Receiving Succinylcholine. *Military Medicine* [online]. B.m.: Oxford Academic, **165**(4), 252–255. ISSN 0026-4075. Dostupné z: [doi:10.1093/milmed/165.4.252](https://doi.org/10.1093/milmed/165.4.252)

PEREIRA, Edna F. R., Yasco ARACAVA, Manickavasagom ALKONDON, Miriam AKKERMAN, Istvan MERCHENTHALER a Edson X. ALBUQUERQUE, 2010. Molecular and Cellular Actions of Galantamine: Clinical Implications for Treatment of Organophosphorus Poisoning. *Journal of Molecular Neuroscience* [online]. **40**(1), 196–203. ISSN 1559-1166. Dostupné z: [doi:10.1007/s12031-009-9234-3](https://doi.org/10.1007/s12031-009-9234-3)

PERRIER, Noël A., Monica SALANI, Cinzia FALASCA, Suzanne BON, Gabriella AUGUSTI-TOCCO a Jean MASSOULIÉ, 2006. Readthrough acetylcholinesterase expression remains minor after stress or exposure to inhibitors. *Journal of Molecular Neuroscience* [online]. **30**(1), 75–76. ISSN 1559-1166. Dostupné z: [doi:10.1385/JMN:30:1:75](https://doi.org/10.1385/JMN:30:1:75)

PETROV, Konstantin A., Alexandra D. KHARLAMOVA, Oksana A. LENINA, Ayrat R. NURTDINOV, Marina E. SITDYKOVA, Victor I. ILYIN, Irina V. ZUEVA a Evgeny E. NIKOLSKY, 2018. Specific inhibition of acetylcholinesterase as an approach to decrease muscarinic side effects during myasthenia gravis treatment. *Scientific Reports* [online]. **8** [vid. 2020-06-19]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-017-18307-9](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18307-9)

POTTER, Timothy M., Barry W. NEUN a Stephan T. STERN, 2011. Assay to detect lipid peroxidation upon exposure to nanoparticles. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **697**, 181–189. ISSN 1940-6029. Dostupné z: [doi:10.1007/978-1-60327-198-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_19)

RAVANAT, Jean-Luc, Eric GREMAUD, Jovanka MARKOVIC a Robert J. TURESKY, 1998. Detection of 8-Oxoguanine in Cellular DNA Using 2,6-Diamino-8-oxopurine as an Internal Standard for High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry* [online]. **260**(1), 30–37. ISSN 0003-2697. Dostupné z: [doi:10.1006/abio.1998.2685](https://doi.org/10.1006/abio.1998.2685)

RAYAMAJHI, Manira, Yue ZHANG a Edward MIAO, 2013. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1040**, 85–90. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-523-1\_7

RIEGER, Aja M., Brian E. HALL, Le Thuong LUONG, Luis M. SCHANG a Daniel R. BARREDA, 2010. Conventional apoptosis assays using propidium iodide generate a significant number of false positives that prevent accurate assessment of cell death. *Journal of Immunological Methods* [online]. **358**(1), 81–92. ISSN 0022-1759. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2010.03.019

RIEGER, Aja M., Kimberly L. NELSON, Jeffrey D. KONOWALCHUK a Daniel R. BARREDA, 2011. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* [online]. (50). ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/2597

RISS, Terry L., Richard A. MORAVEC a Andrew L. NILES, 2011. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. In: Martin J. STODDART, ed. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 103–114 [vid. 2020-02-14]. ISBN 978-1-61779-108-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_12

RISS, Terry L., Richard A. MORAVEC, Andrew L. NILES, Sarah DUELLMAN, Hélène A. BENINK, Tracy J. WORZELLA a Lisa MINOR, 2004. Cell Viability Assays. In: *Assay Guidance Manual* [online]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences [vid. 2020-02-13]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

ROS, Mickael, Mathieu PERNICE, Sebastien LE GUILLOU, Martina A. DOBLIN, Verena SCHRAMEYER a Olivier LACZKA, 2016. Colorimetric Detection of Caspase 3 Activity and Reactive Oxygen Derivatives: Potential Early Indicators of Thermal Stress in Corals. *Journal of Marine Biology* [online] [vid. 2020-03-31]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2016/6825949>

RYTER, Stefan W., Hong Pyo KIM, Alexander HOETZEL, Jeong W. PARK, Kiichi NAKAHIRA, Xue WANG a Augustine M. K. CHOI, 2006. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. B.m.: Mary Ann Liebert, Inc., publishers, **9**(1), 49–89. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2007.9.49

SCOTT, L. J. a K. L. GOA, 2000. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs* [online]. **60**(5), 1095–1122. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200060050-00008

SHASTRY, P., A. BASU a M. S. RAJADHYAKSHA, 2001. Neuroblastoma cell lines-- a versatile in vitro model in neurobiology. *The International Journal of Neuroscience* [online]. **108**(1–2), 109–126. ISSN 0020-7454. Dostupné z: doi:10.3109/00207450108986509

SINHA, Sandeep a Divya VOHORA, 2018. Chapter 2 - Drug Discovery and Development: An Overview. In: Divya VOHORA a Gursharan SINGH, ed. *Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research* [online]. Boston: Academic Press, s. 19–32 [vid. 2020-04-17]. ISBN 978-0-12-802103-3. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802103-3.00002-X

SOUKUP, Ondrej, Daniel JUN, Jana ZDAROVA-KARASOVA, Jiri PATOCKA, Kamil MUSILEK, Jan KORABECNY, Jan KRUSEK, Martina KANIAKOVA, Vendula SEPISOVA, Jana MANDIKOVA, Frantisek TREJTAR, Miroslav POHANKA, Lucie DRTINOVA, Michal PAVLIK a Gunnar Tobin and Kamil KUCA, 2013. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Current Alzheimer Research* [online] [vid. 2020-04-30]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/115716/article>

SOULTANAKIS, Rebecca P, Robert J MELAMEDE, Ivan A BESPALOV, Susan S WALLACE, Kenneth B BECKMAN, Bruce N AMES, Douglas J TAATJES a Yvonne M. W JANSSEN-HEININGER, 2000. Fluorescence detection of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNA of cultured cells using a recombinant Fab and confocal scanning laser microscopy. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. **28**(6), 987–998. ISSN 0891-5849. Dostupné z: doi:10.1016/S0891-5849(00)00185-4

SUSSMAN, J. L., M. HAREL, F. FROLOW, C. OEFNER, A. GOLDMAN, L. TOKER a I. SILMAN, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*. **253**(5022), 872–879. ISSN 0036-8075.

SUSSMAN, Joel L. a Israel SILMAN, 1992. Acetylcholinesterase: Structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Current Biology* [online]. **2**(11), 612. ISSN 0960-9822. Dostupné z: doi:10.1016/0960-9822(92)90176-B

ŠVIHOVEC et al., 2018. *Farmakologie*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-5558-8.

TAKAHASHI, Toshio, 2019. Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. **59**, 447–462. ISSN 1545-4304. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010818-021108

TANNENBAUM, Jerrold a B Taylor BENNETT, 2015. Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*. **54**(2), 120–132. ISSN 1559-6109.

TELFORD, William G., Akira KOMORIYA a Beverly Z. PACKARD, 2002. Detection of localized caspase activity in early apoptotic cells by laser scanning cytometry. *Cytometry* [online]. **47**(2), 81–88. ISSN 0196-4763. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.10052

THUM, Thomas, Veit J. ERPENBECK, Julia MOELLER, Jens M. HOHLFELD, Norbert KRUG a Jürgen BORLAK, 2006. Expression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes in Different Lung Compartments of Smokers and Nonsmokers. *Environmental*

*Health Perspectives* [online]. **114**(11), 1655–1661. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.8861

TOMIZAWA, Shinichiro, Hideaki IMAI, Shota TSUKADA, Tatsuya SIMIZU, Fumiaki HONDA, Mitsunobu NAKAMURA, Tetsuo NAGANO, Yasuteru URANO, Yuki MATSUOKA, Noboru FUKASAKU a Nobuhito SAITO, 2005. The detection and quantification of highly reactive oxygen species using the novel HPF fluorescence probe in a rat model of focal cerebral ischemia. *Neuroscience Research* [online]. **53**(3), 304–313. ISSN 0168-0102. Dostupné z: doi:10.1016/j.neures.2005.08.002

TRAYKOVA, M., T. TRAYKOV, V. HADJIMITOVA, K. KRIKORIAN a N. BOJADGIEVA, 2003. Antioxidant properties of galantamine hydrobromide. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* [online]. **58**(5–6), 361–365. ISSN 0939-5075. Dostupné z: doi:10.1515/znc-2003-5-613

TRIPATHI, Anurag a U. C. SRIVASTAVA, 2010. Acetylcholinesterase :A Versatile Enzyme of Nervous System. *Annals of Neurosciences* [online]. **15**(4), 106–111. ISSN 0972-7531. Dostupné z: doi:10.5214/95

TRUSKEY, George A., 2018. Human Microphysiological Systems and Organoids as in Vitro Models for Toxicological Studies. *Frontiers in Public Health* [online]. **6** [vid. 2020-01-24]. ISSN 2296-2565. Dostupné z: doi:10.3389/fpubh.2018.00185

TSOPELAS, Nicholas D. a Deborah B. MARIN, 2001. 32 - Cholinergic Treatments of Alzheimer's Disease. In: PATRICK R. HOF a CHARLES V. MOBBS, ed. *Functional Neurobiology of Aging* [online]. San Diego: Academic Press, s. 475–486 [vid. 2020-03-31]. ISBN 978-0-12-351830-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012351830-9/50034-2

TSVETKOVA, D., D. OBRESHKOVA, D. ZHELEVA-DIMITROVA a L. SASO, 2013. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current Medicinal Chemistry* [online]. **20**(36), 4595–4608. ISSN 1875-533X. Dostupné z: doi:10.2174/09298673113209990148

VALE, J. Allister, 2016. Oximes. In: Jeffrey BRENT, Keith BURKHART, Paul DARGAN, Benjamin HATTEN, Bruno MEGARBANE a Robert PALMER, ed. *Critical Care Toxicology* [online]. Cham: Springer International Publishing, s. 1–16 [vid. 2020-02-26]. ISBN 978-3-319-20790-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-20790-2\_51-1

VAN DELFT, Joost, Karen MATHIJS, Jan POLMAN, Maarten COONEN, Ewa SZALOWSKA, Geert R. VERHEYEN, Freddy VAN GOETHEM, Marja DRIESSEN, Leo VAN DE VEN, Sreenivasa RAMAIAHGARI a Leo S. PRICE, 2014. Chapter 5.1 - Hepatotoxicity Screening on In Vitro Models and the Role of 'Omics. In: Jos KLEINJANS, ed. *Toxicogenomics-Based Cellular Models* [online]. San Diego: Academic Press, s. 193–212 [vid. 2020-02-05]. ISBN 978-0-12-397862-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397862-2.00010-3

VANLANGENAKKER, Nele, Tom Vanden BERGHE, Dmitri V. KRYSKO a Nele Festjens and Peter VANDENABEELE, 2008. Molecular Mechanisms and

Pathophysiology of Necrotic Cell Death. *Current Molecular Medicine* [online] [vid. 2020-05-29]. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/66848/article>

VANOVA, Nela, Lubica MUCKOVA, Monika SCHMIDT, David HERMAN, Alzbeta DLABKOVA, Jaroslav PEJCHAL a Daniel JUN, 2018a. Simultaneous determination of malondialdehyde and 3-nitrotyrosine in cultured human hepatoma cells by liquid chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* [online]. **32**(12), e4349. ISSN 1099-0801. Dostupné z: [doi:10.1002/bmc.4349](https://doi.org/10.1002/bmc.4349)

VANOVA, Nela, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Alzbeta DLABKOVA a Daniel JUN, 2018b. Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *Journal of Applied Toxicology* [online]. **38**(8), 1058–1070. ISSN 1099-1263. Dostupné z: [doi:10.1002/jat.3605](https://doi.org/10.1002/jat.3605)

VICHAI, Vanicha a Kanyawim KIRTIKARA, 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols* [online]. **1**(3), 1112–1116. ISSN 1750-2799. Dostupné z: [doi:10.1038/nprot.2006.179](https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179)

VOTYAKOVA, Tatyana V. a Ian J. REYNOLDS, 2004. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **431**(1), 138–144. ISSN 0003-9861. Dostupné z: [doi:10.1016/j.abb.2004.07.025](https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.025)

WANG, Piwen, Susanne M. HENNING a David HEBER, 2010. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLOS ONE* [online]. **5**(4), e10202. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0010202](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202)

WEBER, Daniela, Michael J. DAVIES a Tilman GRUNE, 2015. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology* [online]. **5**, 367–380. ISSN 2213-2317. Dostupné z: [doi:10.1016/j.redox.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005)

WERNER, Erica, 2003. Determination of Cellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production. *Science Signaling* [online]. B.m.: Science Signaling, **2003**(168), pl3–pl3. ISSN 1945-0877, 1937-9145. Dostupné z: [doi:10.1126/stke.2003.168.pl3](https://doi.org/10.1126/stke.2003.168.pl3)

WESTERINK, Walter M. A. a Willem G. E. J. SCHOONEN, 2007. Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* [online]. **21**(8), 1592–1602. ISSN 0887-2333. Dostupné z: [doi:10.1016/j.tiv.2007.06.017](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.017)

WILSON, I. B., 1951. Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of tetraethyl pyrophosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. **190**(1), 111–117. ISSN 0021-9258.

WILSON, I. B., 1952. Acetylcholinesterase. XIII. Reactivation of alkyl phosphate-inhibited enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. **199**(1), 113–120. ISSN 0021-9258.

WILSON, I. B. a B. GINSBURG, 1955. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **18**(1), 168–170. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0006-3002(55)90040-8

WINTERBOURN, Christine C., 2014. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. **1840**(2), Current methods to study reactive oxygen species - pros and cons, 730–738. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.004

WU, Man, George T. F. WONG a Yao-Chu WU, 2018. The Scopoletin-HRP Fluorimetric Determination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Seawaters—A Plea for the Two-Stage Protocol. *Methods and Protocols* [online]. B.m.: Multidisciplinary Digital Publishing Institute, **1**(1), 4. Dostupné z: doi:10.3390/mps1010004

YANG, A., D. L. CARDONA a F. A. BARILE, 2002. In vitro cytotoxicity testing with fluorescence-based assays in cultured human lung and dermal cells. *Cell Biology and Toxicology* [online]. **18**(2), 97–108. ISSN 0742-2091. Dostupné z: doi:10.1023/a:1015328100876

YANG, Hong, Yingyi ZHANG a Ulrich PÖSCHL, 2010. Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **397**(2), 879–886. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3557-3

YAZDANI, Mazyar, 2015. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species in vitro. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* [online]. **30**(1 Pt B), 578–582. ISSN 1879-3177. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2015.08.010

ZARGARIAN, Sefi, Inbar SHLOMOVITZ, Ziv ERLICH, Aria HOURIZADEH, Yifat OFIR-BIRIN, Ben A. CROKER, Neta REGEV-RUDZKI, Liat EDRY-BOTZER a Motti GERLIC, 2017. Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLOS Biology* [online]. B.m.: Public Library of Science, **15**(6), e2002711. ISSN 1545-7885. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.2002711

ZHANG, Jia, Yini WANG, Lin WU, Jingshi WANG, Ran TANG, Shuo LI, Jianhang CHEN, Zhuo GAO, Ruijun PEI a Zhao WANG, 2017. Application of an improved flow cytometry-based NK cell activity assay in adult hemophagocytic lymphohistiocytosis. *International Journal of Hematology* [online]. **105**(6), 828–834. ISSN 0925-5710, 1865-3774. Dostupné z: doi:10.1007/s12185-017-2195-3

ZHANG, Xian-Fu a Xiaoli LI, 2011. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence* [online]. **131**(11), 2263–2266. ISSN 0022-2313. Dostupné z: doi:10.1016/j.jlumin.2011.05.048

ZHOU, Yanzi, Shenglong WANG a Yingkai ZHANG, 2010. Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born-Oppenheimer ab initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. *The journal of physical chemistry. B* [online]. **114**(26), 8817–8825. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp104258d

ŽUNEC, Suzana, Božica RADIĆ, Kamil KUČA, Kamil MUSILEK a Ana LUCIĆ VRDOLJAK, 2015. Comparative determination of the efficacy of bispyridinium oximes in paraoxon poisoning. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* [online]. **66**(2), 129–134. ISSN 0004-1254. Dostupné z: doi:10.1515/aiht-2015-66-2623



## **Zoznam príloh**

**Príloha A** Zoznam publikácií na tému dizertačnej práce

**Príloha B** Zoznam publikácií s toxikologickou problematikou

**Príloha C** Zoznam publikácií s inou ako toxikologickou problematikou

## Prilohy

### Priloha A

1. **Muckova, L.**, N. Vanova, J. Misik, D. Herman, J. Pejchal, and D. Jun. 2019. 'Oxidative Stress Induced by Oxime Reactivators of Acetylcholinesterase in Vitro'. *Toxicology in Vitro* 56 (April): 110–17. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.01.013>.
2. **Muckova, Lubica**, Jaroslav Pejchal, Petr Jost, Nela Vanova, David Herman, and Daniel Jun. 2019. 'Cytotoxicity of Acetylcholinesterase Reactivators Evaluated in Vitro and Its Relation to Their Structure'. *Drug and Chemical Toxicology* 42 (3): 252–56. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1432641>.
3. Hepnarova Vendula, **Lubica Muckova**, Avi Ring, Jaroslav Pejchal, David Herman, Jan Misik, Martina Hrabnova, Daniel Jun, a Ondrej Soukup. 2019. Pharmacological and Toxicological in Vitro and in Vivo Effect of Higher Doses of Oxime Reactivators?. *Toxicology and Applied Pharmacology*, October, 114776. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114776>.

## Príloha B

1. Chalupova, Katarina, Jan Korabecny, Manuela Bartolini, Barbara Monti, Dorian Lamba, Rosanna Caliendo, Alessandro Pesaresi, **Lubica Muckova**, et al. 2019. 'Novel Tacrine-Tryptophan Hybrids: Multi-Target Directed Ligands as Potential Treatment for Alzheimer's Disease'. *European Journal of Medicinal Chemistry* 168 (April): 491–514. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.02.021>.

2. Gorecki, Lukas, Lucie Junova, Tomas Kucera, Vendula Hepnarova, Lukas Prchal, Tereza Kobrlova, **Lubica Muckova**, Ondrej Soukup, and Jan Korabecny. 2019. 'Tacroximes: Novel Unique Compounds for the Recovery of Organophosphorus-Inhibited Acetylcholinesterase'. *Future Medicinal Chemistry*, September. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0027>.

3. Hepnarova, V., J. Korabecny, L. Matouskova, P. Jost, **L. Muckova**, M. Hrabnova, N. Vykoukalova, et al. n.d. 'The Concept of Hybrid Molecules of Tacrine and Benzyl Quinolone Carboxylic Acid (BQCA) as Multifunctional Agents for Alzheimer's Disease'. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Accessed 13 March 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.083>.

4. Jošt, Petr, **Lubica Múčková**, Rudolf Štětina, and Jaroslav Pejchal. 2018. 'SIRNÝ YPERIT: PŘETRVÁVAJÍCÍ HROZBA'. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2018.021>.

5. Jost, Petr, Jaroslav Pejchal, Tomas Kucera, **Lubica Muckova**, and Rudolf Stetina. 2019. 'Screening of the Chemoprotective Effect of 13 Compounds and Their Mixtures with Sodium 2-Mercaptoethanesulfonate against 2-Chloroethyl Ethyl Sulfide', June. <http://jab.zsf.jcu.cz/doi/10.32725/jab.2019.009.html>.

6. Mezeiova, Eva, Jan Korabecny, Vendula Sepsova, Martina Hrabnova, Petr Jost, **Lubica Muckova**, Tomas Kucera, et al. 2017. 'Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy'. *Molecules* 22 (8): 1265. <https://doi.org/10.3390/molecules22081265>.

7. Nepovimov, Eugenie, Jan Korabecny, Vendula Hepnarova, Daniel Jun, Rafael Dolezal, **Lubica Muckova**, Petr Jost, et al. 2019. 'N-Alkylated Tacrine Derivatives as

Potential Agents in Alzheimer's Disease Therapy'. *Current Alzheimer Research*, March. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190314163942>.

8. Nepovimova, Eugenie, Jan Korabecny, Rafael Dolezal, Katerina Babkova, Ales Ondrejicek, Daniel Jun, Vendula Sepsova, **Lubica Muckova**, et al. 2015. 'Tacrine-Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity'. *Journal of Medicinal Chemistry* 58 (22): 8985–9003. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01325>.

9. Nepovimova, Eugenie, Jan Korabecny, Rafael Dolezal, Thuy Duong Nguyen, Daniel Jun, Ondrej Soukup, Marketa Pasdiorova, **Lubica Muckova**, et al. 2016. '7-Methoxytacrine – 4-Pyridinealdoxime Hybrid as Novel Prophylactic Agent with Reactivation Properties in Organophosphate Intoxications'. *Toxicology Research*, May. <https://doi.org/10.1039/C6TX00130K>.

10. Spilovska, Katarina, Jan Korabecny, Vendula Sepsova, Daniel Jun, Martina Hrabnova, Petr Jost, **Lubica Muckova**, et al. 2017. 'Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation'. *Molecules* 22 (6): 1006. <https://doi.org/10.3390/molecules22061006>.

11. Svobodova, Barbora, Eva Mezeiova, Vendula Hepnarova, Martina Hrabnova, **Lubica Muckova**, Tereza Kobrlova, Daniel Jun, et al. 2019. 'Exploring Structure-Activity Relationship in Tacrine-Squaramide Derivatives as Potent Cholinesterase Inhibitors'. *Biomolecules* 9 (8): 379. <https://doi.org/10.3390/biom9080379>.

12. Vanova, Nela, **Lubica Muckova**, Monika Schmidt, David Herman, Alzbeta Dlabkova, Jaroslav Pejchal, and Daniel Jun. n.d. 'Simultaneous Determination of Malondialdehyde and 3-Nitrotyrosine in Cultured Human Hepatoma Cells by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry.' *Biomedical Chromatography* 0 (ja): e4349. <https://doi.org/10.1002/bmc.4349>.

13. Zdarova Karasova, Jana, Vendula Hepnarova, Rudolf Andrys, Miroslav Lisa, Petr Jost, **Lubica Muckova**, Jaroslav Pejchal, et al. 2019. 'Encapsulation of Oxime K027 into Cucurbit[7]Uril: In Vivo Evaluation of Safety, Absorption, Brain Distribution and Reactivation Effectiveness'. *Toxicology Letters*, November. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.11.021>.

## Príloha C

1. Filipova, Alzbeta, Jan Marek, Radim Havelek, Jaroslav Pejchal, Marcela Jelicova, Jana Cizkova, Martina Majorosova, **Lubica Muckova**, et al. 2020. 'Substituted Piperazines as Novel Potential Radioprotective Agents'. *Molecules* (Basel, Switzerland) 25 (3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030532>.
2. Marek, Jan, Ales Tichy, Radim Havelek, Martina Seifrtova, Alzbeta Filipova, Lenka Andrejsova, Tomas Kucera, **Lubica Muckova**, et al. 2020. 'A Novel Class of Small Molecule Inhibitors with Radioprotective Properties'. *European Journal of Medicinal Chemistry*, January, 111606. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111606>.