

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2020**

**Filip Blažek**

**Univerzita Hradec Králové**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra chemie**

Takrinové deriváty jako potenciální prokognitivní léčiva

Bakalářská práce

|                     |                                 |
|---------------------|---------------------------------|
| Autor:              | Filip Blažek                    |
| Studijní program:   | B1407 Chemie                    |
| Studijní obor:      | Toxikologie a analýza škodlivin |
| Vedoucí práce:      | RNDr. Dávid Maliňák, PhD.       |
| Odborný konzultant: | PharmDr. Jan Korábečný, Ph.D.   |

# UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Filip Blažek  
Osobní číslo: S17CH017BP  
Studijní program: B1407 Chemie  
Studijní obor: Toxikologie a analýza škodlivin  
Téma práce: Takrinové deriváty jako potenciální prokognitivní léčiva  
Zadávající katedra: Katedra chemie

### Zásady pro vypracování

Cílem bakalářské práce studenta je připravit syntetickými metodami nové takrinové deriváty s obměnou v 1) alifatické části i 2) aromatické části v poloze C7, u kterých bude dále studován inhibiční potenciál vůči cholinesterásám a afinita k jednotlivým receptorovým podjednotkám NMDAR.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Dávid Maliňák, Ph.D.  
Katedra chemie  
Oponent bakalářské práce: PharmDr. Ondřej Benek, Ph.D.  
Katedra chemie  
Datum zadání bakalářské práce: 26. června 2019  
Termín odevzdání bakalářské práce: 6. května 2020

L.S.

---

doc. RNDr. Jan Kříž, Ph.D.  
děkan

---

prof. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.  
vedoucí katedry

## Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 6. 5. 2020

Filip Blažek

## Poděkování:

Děkuji za vedení bakalářské práce RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD., dále děkuji za ochotu, vstřícnost a neustálou podporu na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany), PharmDr. Janu Korábečnému, Ph.D., Ing. Barboře Svobodové, PharmDr. Lukáši Góreckému, Ph.D. a Ing. Janu Konečnému. Dále bych chtěl poděkovat doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a PharmDr. Lukáši Prchalovi Ph.D. za tvorbu spekter, bez kterých by nebylo možné práci realizovat.

## **Anotace**

BLAŽEK, F. *Takrinové deriváty jako potenciální prokognitivní léčiva*. Hradec Králové, 2020. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Dávid Maliňák, PhD. 63 s.

Bakalářská práce je zaměřena na organickou syntézu derivátů takrinu, které mají terapeutický potenciál pro paliativní léčbu Alzheimerovy nemoci. U nově připravených sloučenin se předpokládá inhibiční účinek vůči cholinesterázám a antagonistické působení na *N*-methyl-D-aspartátových receptorech. Parentní takrin byl modifikován v aromatické oblasti v poloze C7 fenoxo, 4-methylfenoxo a 4-chlorofenoxo skupinou. Další modifikace probíhaly v cykloalifatické části, kde se objevuje pětičlenný, šestičlenný nebo sedmičlenný cyklus. Teoretická část bakalářské práce se věnuje obecným aspektům Alzheimerovy nemoci, rizikovým faktorům a teoriemi vzniku tohoto onemocnění. Podrobně byly popsány amyloidní, tau proteinová, kaskádová mitochondriální, cholinergní a glutamatergní teorie. Abnormální výskyt proteinů amyloidu beta a tau, dysfunkční mitochondrie, poškozená cholinergní a glutamatergní neurotransmise v mozku vytváří vhodné podmínky pro vznik Alzheimerovy nemoci. Experimentální část je zaměřena na popis syntéz série vedoucí k osmi cílovým derivátům takrinu a jejich strukturní charakterizaci pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie a hmotnostní spektrometrií.

## **Klíčová slova**

Alzheimerova nemoc, takrin, 7-fenoxytakrin, excitotoxicita, glutamát, cholinesteráza

## **Annotation**

BLAŽEK, F. *Tacrine derivatives as potential procognitive drugs*. Hradec Králové, 2020. Bachelor Thesis at Faculty of Science, University of Hradec Králové. Supervisor: RNDr. Dávid Maliňák, PhD. 63 pages.

The Bachelor Thesis focuses on organic synthesis of tacrine derivatives with therapeutic potential in palliative treatment of Alzheimer's disease (AD). Inhibitory effect upon cholinesterase and antagonistic effect upon *N*-methyl-D-aspartate receptors is expected for all the newly developed compounds. Parent template drug, namely tacrine, has been modified in aromatic region at C7 position with phenoxy, 4-methylphenoxy and 4-chlorophenoxy substituents. Next modification was carried out in cycloaliphatic part by introducing either cyclopentyl, cyclohexyl or cycloheptyl moieties. The theoretical part of the Bachelor Thesis discusses general aspects of AD, risk factors and hypotheses for that stands beyond illness onset or progression. Abberant proteins such as amyloid beta and tau, disrupted mitochondria, and impaired neurotransmission like cholinergic and glutamatergic provide substantial base for AD. Experimental part is devoted to description of three-step organic synthesis leading to eight final tacrine derivatives, and their structural characterization with nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry.

### **Key words**

Alzheimer's disease, tacrine, 7-phenoxytacrine, excitotoxicity, glutamate, cholinesterase

# Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....                               | 11 |
| 2     | Teoretická část.....                    | 13 |
| 2.1   | Alzheimerova nemoc.....                 | 13 |
| 2.1.1 | Definice Alzheimerovy nemoci.....       | 13 |
| 2.1.2 | Výskyt Alzheimerovy nemoci.....         | 14 |
| 2.1.3 | Mortalita.....                          | 15 |
| 2.2   | Rizikové faktory pro vznik AN.....      | 15 |
| 2.2.1 | Věk.....                                | 15 |
| 2.2.2 | Rodinná anamnéza.....                   | 15 |
| 2.2.3 | Apolipoprotein $\epsilon$ .....         | 15 |
| 2.2.4 | Vaskulární onemocnění.....              | 16 |
| 2.2.5 | Diabetes mellitus druhého typu.....     | 16 |
| 2.2.6 | Vzdělání a sociální zapojení.....       | 16 |
| 2.3   | Hypotézy vzniku AN.....                 | 17 |
| 2.3.1 | $\beta$ -amyloidní hypotéza.....        | 17 |
| 2.3.2 | $\tau$ protein hypotéza.....            | 18 |
| 2.3.3 | Mitochondriální kaskádová hypotéza..... | 20 |
| 2.3.4 | Cholinergní teorie.....                 | 23 |
| 2.3.5 | Glutamátergní teorie.....               | 25 |
| 2.4   | Současná farmakologická léčba AN.....   | 28 |
| 2.4.1 | Inhibitory acetylcholinesterázy.....    | 28 |
| 2.4.2 | Antagonisté NMDA receptoru.....         | 29 |
| 2.4.3 | Takrin.....                             | 30 |
| 3     | Cíl práce.....                          | 33 |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4     | Výsledky a diskuze.....                                | 34 |
| 4.1   | Příprava produktů prvního kroku syntézy.....           | 34 |
| 4.2   | Příprava produktů druhého kroku syntézy.....           | 37 |
| 4.3   | Příprava finálních produktů třetího kroku syntézy..... | 39 |
| 5     | Experimentální část.....                               | 43 |
| 5.1   | Postup přípravy série připravovaných látek.....        | 44 |
| 5.1.1 | První krok syntézy.....                                | 44 |
| 5.1.2 | Druhý krok syntézy.....                                | 44 |
| 5.1.3 | Třetí krok syntézy.....                                | 45 |
| 5.2   | Přehled meziproduktů.....                              | 45 |
| 5.3   | Přehled finálních produktů.....                        | 53 |
| 6     | Závěr.....   | 58 |
| 7     | Použitá literatura.....                                | 59 |

## Seznam zkratek

|                 |   |
|-----------------|---|
| $\delta$        | Chemický posun  |
| $J$             | Interakční konstanta                                      |
| $\tau$ protein  | Tau protein   |
| $A\beta$        | Amyloid $\beta$   |
| $A\beta_{40}$   | Amyloid $\beta$ o délce 40 aminokyselin                   |
| $A\beta_{42}$   | Amyloid $\beta$ o délce 42 aminokyselin                   |
| ACh             | Acetylcholin  |
| AChE            | Acetylcholinesteráza                                      |
| AICD            | Amyloidní intracelulární doména                           |
| AN              | Alzheimerova nemoc  |
| Apo- $\epsilon$ | Alipoprotein $\epsilon$                                   |
| APP             | Transmembránový integrální amyloidní prekurzorový protein |
| ATP             | Adenosintrifosfát   |
| BACE1           | $\beta$ -sekretáza 1                                      |
| bs              | broad singlet   |
| BuChE           | Butyrylcholinesteráza                                     |
| COX             | Enzym cytochrom c oxidáza                                 |
| CNS             | Centrální nervová soustava                                |
| d               | Dublet  |
| dd              | Dublet dubletu  |
| DCM             | Dichlormethan   |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>     | Deuterovaný dimethylsulfoxid                  |
| EtOH                            | Ethanol                                       |
| FDA                             | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv            |
| HCl                             | Kyselina chlorovodíková                       |
| HRMS                            | Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením |
| IACHe                           | Inhibitor acetylcholinesterázy                |
| m                               | Multiplet                                     |
| mAChR                           | Muskarinový acetylcholinový receptor          |
| MAP                             | Proteiny asociované s mikrotubuly             |
| MeOH                            | Methanol                                      |
| Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Síran sodný                                   |
| nAChR                           | Nikotinový acetylcholinový receptor           |
| NaOH                            | Hydroxid sodný                                |
| NH <sub>3</sub>                 | Amoniak                                       |
| NMDA                            | <i>N</i> -methyl-D-aspartát                   |
| NMR                             | Nukleární magnetická rezonance                |
| POCl <sub>3</sub>               | Trichlorid fosforýlu                          |
| PTSA                            | Kyselina <i>p</i> -toluensulfonová            |
| s                               | Singlet                                       |
| sAPPβ                           | Solubilní amyloidní prekurzorový protein-β    |
| t                               | Triplet                                       |
| TLC                             | Tenkvrstvá chromatografie                     |

# 1 Úvod

Alzheimerova nemoc (AN) patří mezi nejběžnější formy demence. Tento typ demence byl poprvé popsán Aloisem Alzheimerem, který zjistil změny v mozkové tkáni u osob trpících touto nemocí. Jednalo se převážně o přítomnost senilních plaků a pozměněnou strukturu mozkové kůry, která byla tenčí a měla rozdílnou stavbu oproti zdravým jedincům [1].

V dnešní době trpí AN několik desítek milionů lidí, postižených v České republice je přes sto tisíc. Rok od roku se tento počet zvyšuje [1].

AN je nevratné neurodegenerativní onemocnění, které se může projevovat zhoršující se schopností pamatovat si nové informace a ztrátou paměti. Průběh nemoci je individuální, při zhoršujícím se stavu trpícího AN dochází k poklesu kognitivních schopností. V posledním stádiu nemoci nejsou osoby trpící AN schopny vykonávat úkony běžného života [2].

Nejdůležitějším faktorem pro vznik této nemoci je věk. Riziko vzniku AN se rapidně zvyšuje u osob starších 65 let [3]. Okolnosti pro vznik choroby mohou být genetického původu (rodinná anamnéza), přítomnost alely pro apolipoprotein  $\epsilon$  (Apo- $\epsilon$ ), traumatická poranění mozku, míra dosaženého vzdělání a využívání kapacit mozku memorováním [2].

Shlukování mozkových plaků obsahujících Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) mimo neuron a neurofibrilárních klubek mikrotubulů vázající tau protein ( $\tau$  protein) uvnitř neuronů mozku jsou jedním z nejdůležitějších patologických znaků pro diagnózu AN [4]. Distrofované axony neuronů v mozkové kůře, pokles počtu neuronů, ztráta bílé hmoty v mozku, mozková amyloidní angiopatie, zánět a oxidativní poškození tkání mohou být dalšími patologickými projevy AN [3].

Existuje celá řada teorií popisující vznik AN. Nejznámějšími hypotézami jsou cholinergní, glutamatergní či amyloidní hypotéza. Hypotézy se navzájem doplňují,

překrývají a nelze jednoznačně říci, která stojí za vznikem onemocnění. Vznik a průběh AN je značně individuální záležitostí.

Tato práce se zaměřuje na syntézu takrinových derivátů, které mají slibný potenciál v léčbě AN s ohledem na zlepšení kognitivních mozkových funkcí, zejména v paliativní léčbě AN. Historicky byla molekula takrinu hodnocena zajímavě svým komplexním mechanismem účinku. Vedlejší účinky při jeho používání však ve většině případů vedou k hepatotoxickým projevům [5]. Proto bylo nasnadě najít deriváty, které si zachovávají komplexní účinek parentní sloučeniny, ale bez možných nežádoucích efektů. Stejný mechanismus účinku byl objeven u dalších takrinových derivátů, konkrétně u 7-methoxytakrinu [6] a 7-fenoxytakrinu, které jsou velkým příslibem v paliativní léčbě AN [7].

Předkládaná práce se skládá ze dvou částí. Teoretická část se zabývá vznikem AN, rizikovými faktory pro vznik AN, teoriemi vzniku a současnou léčbou AN. Praktická část se věnuje metodologií popisu pracovního postupu, popisu pracovního postupu při syntéze takrinových derivátů a výsledkům syntéz. Cílem práce bylo připravit deriváty takrinu metodami organické chemie v dostatečném množství pro účely *in vitro* a *in vivo* testování. Výsledky těchto testů by měly následně poskytnout vztah mezi strukturou a účinkem a zároveň by mohly přinést naději pro pacienty, kterým bylo diagnostikováno toto neurodegenerativní onemocnění.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Alzheimerova nemoc

#### 2.1.1 Definice Alzheimerovy nemoci

Demence je chápána jako jakýkoliv úpadek kognitivních funkcí, který je natolik závažný, že zasahuje do každodenních aktivit. Demence se dá nejlépe charakterizovat jako syndrom. Demence můžeme rozdělit na neurodegenerativní a neneurodegenerativní. Neurodegenerativní onemocnění jako AN je nejvíce zastoupené u pacientů v pokročilejším věku, naopak druhý typ je charakteristický pro mladší populaci a je často spojován s traumatickým onemocněním nebo nádory mozku [8].

AN je nejběžnější formou demence, která postihuje především osoby staršího věku. Výjimkou nejsou ani jedinci ve středním věku [8]. První zmínka o AN se objevila již v roce 1910. Později se AN stala celosvětově známým pojmem jak v medicíně, tak i mezi širokou veřejností [9].

Vliv AN na jedince může být individuální, nejběžnějším společným znakem je zhoršená schopnost pamatovat si nové informace. Důvodem je poškození mozku v částech, kde jsou informace ukládány do paměti. S postupným rozvojem onemocnění a snižujícím se počtem neuronů dochází k dalším projevům onemocnění, jako je netečnost, deprese, zhoršený úsudek, problémy se spaním, psaním, řečí, ztrátou paměti, zhoršenou schopností řešit problémy či ztrátou abstraktního myšlení. Pacienti jsou často v pozdních fázích AN upoutáni na lůžko, díky čemuž může sekundárně dojít ke tvorbě krevních sraženin, sepsi až multiorgánovému selhání. Důsledky onemocnění neumožňují pacientům s plně rozvinutými symptomy AN starat se sami o sebe a jsou odkázáni na péči ošetřovatelů [2].

Hlavními patologickými nálezy v mozku pacientů trpících AN je extracelulární akumulace A $\beta$  a intracelulární akumulace neurofibrilárních klubek. Dalšími

patologickými změnami je chronický zánět, atrofie a oxidativní poškození tkání mozku [3]. Přítomnost toxických oligomerů A $\beta$  a hyperfosforylovaného  $\tau$  proteinu způsobuje aktivaci mikroglíí, které se podílí na imunitní odpovědi v nervové tkáni [2]. Nadměrně aktivované mikroglie podporují tvorbu zánětu v mozku. Dále se tvoří kyslíkaté a dusíkaté radikály, které poškozují důležité mitochondriální enzymy [3]. Důsledkem narušené funkce mozku je i snížená míra utilizace glukózy [2].

Zdravý mozek obsahuje přibližně sto miliard neuronů, které jsou navzájem propojené výběžky zvané axony. Tyto výběžky zprostředkovávají komunikaci s ostatními neurony. Místo spojení neuronu s axonem se nazývá synapse. Zde dochází pomocí neurotransmiterů k přenosu signálů v mozku. Dohromady je v mozku přibližně sto biliónů synapsí. U postižených osob AN dochází k poškození synapsí a apoptóze neuronů. Mozek jedinců s AN v pozdních fázích onemocnění je významně zmenšený a jeho struktura je poškozená [2].

Onemocnění AN se může rozdělit na tři fáze. Preklinická fáze začíná více než 20 let před prvotními projevy nemoci. Jednotlivci v preklinické fázi mohou mít měřitelné změny v mozkové tkáni a mozkomíšním moku, které mohou naznačovat začátek průběhu nemoci. Tyto změny mozku je možné zjistit pomocí vyšetření pozitronovou emisní tomografií nebo analýzou mozkomíšního moku. V druhé fázi dochází k projevu mírných kognitivních dysfunkcí, které neovlivňují plnění každodenních úkolů. Tento stav lze definovat termínem mírná kognitivní porucha. Ve třetí fázi jsou symptomy zřetelné v takové míře, že neumožňují vykonávat jedincům každodenní povinnosti [2].

### **2.1.2 Výskyt Alzheimerovy nemoci**

Celosvětově trpí demencí 46,8 milionů lidí, z toho jen v České republice jich je okolo 153 tisíc. Tento počet stále roste. Předpokládá se, že každým rokem bude celosvětově přibývat dalších pět milionů případů osob, kterým byla diagnostikována demence. Až dvě třetiny jedinců postižených demencí trpí AN [1].

### **2.1.3 Mortalita**

AN je letální choroba. Mortalitu AN není možné přesně určit. AN může způsobovat neschopnost pohybu, poškození polykání a podvýživu. Sekundárně tyto poruchy mohou vést k vážným akutním stavům, které mohou způsobit smrt. Jedním z takových stavů je zápal plic [2].

Populace celosvětově stárne, to může mít velký dopad na zvyšující se počet osob trpících AN a úmrtí spojená s tímto onemocněním. Délka života u pacienta staršího 65 let, kterému byla diagnostikována AN je kolem čtyř až osmi let. Průběh nemoci je individuální [2].

## **2.2 Rizikové faktory pro vznik AN**

### **2.2.1 Věk**

S přibývajícím věkem se výskyt AN zvyšuje. Kritickou hranicí pro výskyt AN je věk 65 let, výskyt onemocnění se po překročení této hranice rapidně zvyšuje [2].

### **2.2.2 Rodinná anamnéza**

Rodinná anamnéza výskytu AN není nutným předpokladem pro vznik onemocnění. Avšak pokud byla diagnostikována AN u příbuzných prvního stupně, tedy u rodičů či sourozenců, pak je riziko pro vznik onemocnění vyšší. Omezené pohybové aktivity a špatné stravovací návyky v rodině mohou rovněž přispívat ke vzniku AN [2].

### **2.2.3 Apolipoprotein $\epsilon$**

Apolipoprotein  $\epsilon$  (Apo- $\epsilon$ ) je lipoprotein transportující cholesterol. Gen Apo- $\epsilon$  kóduje vznik tohoto lipoproteinu a vyskytuje se ve třech alelách označených  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  a  $\epsilon 4$ . Každý jedinec získá jednu z těchto alel od každého rodiče, existuje tedy až šest možných variant párů [2].



Přítomnost alely  $\epsilon 4$  u jedince v homozygotní nebo heterozygotní formě je významným predikujícím faktorem pro rozvoj AN. Naproti tomu přítomnost alely  $\epsilon 2$  snižuje riziko vzniku AN [2].

#### **2.2.4 Vaskulární onemocnění**

Mozek je zásoben kyslíkem a živinami pomocí krve. Nedostatečné krevní zásobování a průtok krve mozkem může způsobovat hypoxii, narušovat integritu a aktivitu mozku. Cerebrovaskulární dysfunkce jako je krvácení, ateroskleróza, dysfunkce hematoencefalické bariéry a infarkt přispívají ke snižování kognitivních schopností. Popsané změny v mozku podporují štěpení transmembránového integrálního amyloidního prekurzorového proteinu (APP) pomocí enzymu  $\beta$  sekretázy 1 (EC 3.4.23.46; BACE1) směrem k tvorbě  $A\beta$  a jeho ukládání do fibrilárních amyloidních plaků [10].

#### **2.2.5 Diabetes mellitus druhého typu**

Diabetes mellitus je onemocnění, které se týká několika stovek miliónů lidí po celém světě. Jedná se o komplexní metabolické onemocnění, které je charakterizováno intolerancí glukózy a inzulinovou rezistencí. Pankreatické  $\beta$  buňky jsou zodpovědné za sekreci hormonu inzulinu, který je schopen regulovat hladinu glukózy v krvi. Při tomto onemocnění dochází k nadměrnému vyplavování inzulinu, které sekundárně vede k útlumu glykémie pod normální hodnoty (3,9–5,6 mmol/l nalačno). Chronické zatěžování  $\beta$  buněk pankreatu tyto buňky poškozuje a vede k nedostatku inzulinu. U jedinců trpících diabetem druhého typu se zvyšuje riziko rozvoje AN až dvojnásobně [10].

#### **2.2.6 Vzdělání a sociální zapojení**

Výše dosaženého vzdělání má rovněž zásadní vliv na vznik AN. Delší formální vzdělávání vytváří kognitivní rezervu a snižuje šanci pro rozvinutí AN. Dalším možným faktorem je forma zaměstnání. Pokud je mozek dlouhodobě stimulován skrze mentálně aktivní práci, snižuje se riziko rozvoje AN [2].

## 2.3 Hypotézy vzniku AN

### 2.3.1 $\beta$ -amyloidní hypotéza

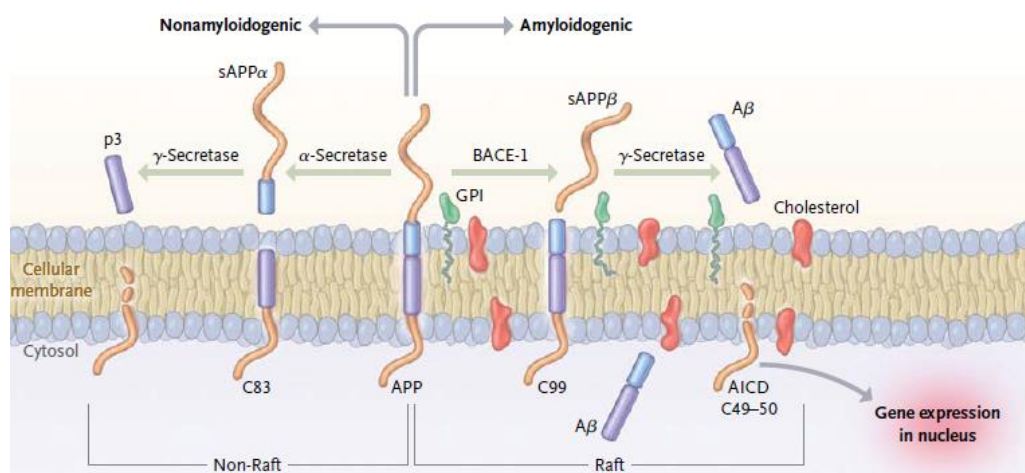
$A\beta$  je jedním z nejvíce studovaných proteinů patogeneze AN. George Glenner a Caine Wong roku 1984 dokázali izolovat a částečně sekvenovat  $A\beta$  z mozkových plen u osob postižených AN. Jejich úspěch je pro dnešní studium mechanismu vzniku AN důležitým milníkem [11].

$A\beta$  je přirozenou součástí lidského organismu, skládá se z 36 až 43 aminokyselin [3], může se vyskytovat v mozkomíšním moku a plazmě [12]. Převládajícím monomermem je  $\beta$ -amyloidní peptid o délce 40 aminokyselin ( $A\beta_{40}$ ), dalším typem je  $\beta$ -amyloidní peptid o délce 42 aminokyselin ( $A\beta_{42}$ ), který je náchylný ke shlukování a má vliv na rozvoj AN již v raném stádiu.  $A\beta$  je tvořen proteolýzou APP. Ten je spojován s fyziologickým rozvojem neuronů, růstem axonů a axonálním transportem. APP může být štěpen amyloidním či neamyloidním směrem. Nerovnováha mezi produkcí, eliminací a agregací peptidů má za následek akumulaci  $A\beta$  s následným vznikem AN [3].

$A\beta$  se může samovolně tvořit v několika formách. Tento protein se může vyskytovat jako oligomer složený z dvou až šesti peptidů, který může podléhat agregaci. Možnou formou  $A\beta$  jsou fibrily, které vytváří strukturu  $\beta$ -skládaného listu, tato forma je přítomná v amyloidních placích. Nejvíce neurotoxickou formou  $A\beta$  jsou intermediární a rozpustné oligomerní peptidy. Vážnost kognitivních dysfunkcí při onemocnění AN je spojena s množstvím oligomerů  $A\beta$  [3].

Proces zpracovávání APP (**Obrázek 1**) může probíhat dvěma naprosto rozdílnými mechanismy. Rozštěpením APP enzymem  $\alpha$ -sekretázou (EC 3.4.24.81) vzniká ektodoména rozpustného amyloidního proteinu- $\alpha$  a membránově vázaný fragment C83. Tento membránově vázaný fragment se následně štěpí  $\gamma$ -sekretázou (EC 3.4.23), vzniká peptid p3 a amyloidní intracelulární doména (AICD). Tento mechanismus je neamyloidního charakteru [3].

Proces, při kterém vzniká  $A\beta$  je zahájen enzymem BACE1, který štěpí APP na solubilní amyloidní protein- $\beta$  (sAPP $\beta$ ) a membránově vázaný fragment C99. Fragment C99 je substrátem pro enzym  $\gamma$ -sekretázu, která jej štěpí na  $A\beta$  a AICD. AICD je krátký protein skládající se přibližně z 50 aminokyselin, v obou případech vznikající AICD se přesouvá do jádra buňky, kde signalizuje aktivaci transkripce určitých genů [4].



**Obrázek 1:** Znázornění rozdílných mechanismů zpracování APP. Neamyloidní zpracování (vlevo) APP probíhá pomocí  $\alpha$ -sekretázy a  $\gamma$ -sekretázy za vzniku fragmentu p3. Při amyloidní cestě zpracování (vpravo) je APP enzymaticky štěpen pomocí BACE1 a  $\gamma$ -sekretázou za vzniku AICD a  $A\beta$  [3].

Za fyziologických podmínek se APP štěpí na fragmenty  $A\beta$ , které jsou sekretovány vně buňku, kde se rozštěpí a degradují. Starší osoby mají sníženou schopnost eliminace  $A\beta$ . Zvýšení hladiny  $A\beta_{42}$  či zvýšení poměru  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  může indukovat tvorbu amyloidních fibrilárních struktur, které se mohou akumulovat do senilních plaků. Proces resultuje v neurotoxicitu, sekundárně je ovlivněna  $\tau$  proteinová patologie a dochází k apoptóze neuronů [13].

## 2.3.2 $\tau$ protein hypotéza

### 2.3.2.1 Charakteristika $\tau$ proteinu a mikrotubulů

$\tau$  protein je jedním z doprovodných proteinů cytoskeletu buňky, takzvané proteiny asociované s mikrotubuly (MAP). Vazbou na mikrotubuly je stabilizuje a podporuje

polymeraci.  $\tau$  protein se vyskytuje v šesti molekulárních izoformách, tyto izoformy jsou kódovány genem na 17. chromozomu [13].

$\tau$  protein je typem fosfoproteinů, jehož biologická aktivita je řízená stupněm fosforylace [14]. Obsahuje 85 vhodných serinových, threoninových a tyrosinových částí pro fosforylaci. Ve vývojových stádiích neuropatií je tvořena 0N3R izoforma  $\tau$  proteinu a fosforylace  $\tau$  proteinu je signifikantně zvýšená [15].

Velké množství kináz a fosfatáz ovlivňují fosforylaci  $\tau$  proteinu. Příkladem kináz fosforylující protein  $\tau$  mohou být glykogen syntáza kináza-3 $\beta$  (EC 2.7.11.1), která řídí fosforylaci zbytků aminokyselin serinu a threoninu; cyklin-dependentní kináza 5 (EC 2.7.11.22); AMP-aktivovaná protein kináza (EC 2.7.11.3) a protein kináza A (2.7.11.11). Naopak mezi fosfatázy defosforylující protein  $\tau$  patří proteinfosfatáza 1 a 2A (EC 3.1.3.16). Mnoho z těchto enzymů může být negativně ovlivněno působením A $\beta$  [15].

Mikrotubuly je možné si představit jako duté válečky tvořené 13 řetězci protofilament, které jsou složené z dimerových jednotek bílkovinného charakteru  $\alpha$ -tubulinu a  $\beta$ -tubulinu. Tyto dvě jednotky se v jednotlivých protofilamentárních řetězcích pravidelně střídají. Protofilamentum je na jednom konci zakončeno  $\alpha$ -tubulinem a na druhém  $\beta$ -tubulinem. V buňce dochází k neustálému růstu mikrotubulů, tedy polymeraci, ale také k disociaci, kdy se mikrotubulus zmenšuje. Vše probíhá dle potřeb buňky. Mikrotubuly jsou důležitou opěrnou strukturou buňky, určují její tvar nebo zprostředkovávají vezikulární transport [16].

### **2.3.2.2 Tauopatie**

Tauopatie je souhrnný výraz pro neurodegenerativní onemocnění zahrnující rovněž AN. Společným rysem tauopatií je neuropatologická charakteristika v podobě narušeného metabolismu  $\tau$  proteinu. Tato dysfunkce může vyústit v tvorbu hyperfosforylovaných  $\tau$  proteinových inkluzí zvaných neurofibrilární klubka. Charakteristika jednotlivých inkluzí  $\tau$  proteinu napříč neurodegenerativními

onemocněními se může značně lišit [17]. Navzdory rozdílům napříč nemocemi je  $\tau$  protein v patologických lézích značně fosforylovaný [15].

### **2.3.2.3 Toxicita $\tau$ proteinu a vliv na nervovou soustavu**

V mozku postiženého AN jsou izoformy  $\tau$  proteinu 3R a 4R nahromaděné v hyperfosforylované podobě do takzvaně párově uspořádaných helikálních nebo rovných filament. Tyto patologické shluky v neuronech tvoří neurofibrilární klubka, která mohou být nebezpečná, pokud se vyskytují v dendritech či axonech neuronů [13]. Synaptická dysfunkce a poškození synapsí způsobené inkluzemi  $\tau$  proteinu mohou být jedním z nejčasnějších důsledků tauopatie. Narušení axonálního transportu může vést také k dřívějším projevům degenerace mozku [15].

Důsledkem hyperfosforylace  $\tau$  proteinu s následným hromaděním v dendritických trnech způsobuje lokální zvýšení koncentrace vápenatých iontů. Tento jev vyvolává narušení synaptických funkcí a kotví glutamátové receptory v neuronech [15].

### **2.3.2.4 Spojení amyloidní a $\tau$ proteinové hypotézy**

Amyloidní a  $\tau$  proteinová hypotéza se navzájem prolínají. Extracelulární  $A\beta$  i intracelulární hyperfosforylovaný  $\tau$  protein společně negativně ovlivňují neuronovou synapsi, kde interagují s molekulárními dráhami potřebnými pro synaptickou plasticitu a paměť. Amyloidní hypotéza předpokládá, že průvodním jevem je zvýšená hladina  $A\beta$  v mozku, která následně vyvolává patologické změny  $\tau$  proteinu. Za skutečný spouštěč jsou pak považovány oligomery  $A\beta$ , které navozují strukturní změny  $\tau$  proteinu. Nicméně přímá korelace hladin a specifický vztah mezi  $A\beta$  a inkluzemi  $\tau$  proteinu v nemocném mozku zůstávají nejasnými [18].

## **2.3.3 Mitochondriální kaskádová hypotéza**

### **2.3.3.1 Charakteristika stavby a funkce mitochondrie**

Mitochondrie je membránová organela nacházející se v eukaryotních buňkách. Obsahuje vlastní mitochondriální deoxyribonukleovou kyselinu a ribozomy, které

vytváří většinu mitochondriálních proteinů. Má dvě membrány, první vnější membrána má vysokou permeabilitu, obsahuje poriny, které zprostředkovávají transport látek skrz membránu. Druhou membránou je vnitřní mitochondriální membrána, která je selektivně propustná. Její povrch je tvořen ohyby, takzvanými kristy. Na této vnitřní membráně probíhá většina důležitých enzymatických reakcí jako je například oxidativní fosforylace. Vnitřní část mitochondrie je tvořena matrix [16].

Mitochondrie generuje velké množství energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP). Oxidativní rozklad mastných kyselin a cukrů tvoří redukované koenzymy, které jsou pro tvorbu ATP nezbytné. Redukované koenzymy jsou na vnitřní mitochondriální membráně oxidovány za pomoci elektron transportních proteinů, komplexů I, II, III a IV, které mají vzestupný redoxní potenciál. Tento redoxní potenciál pohání přenos elektronů mezi transportními proteiny, mimo jiné dochází během transportu elektronů k přenosu vodíkových protonů z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru, tím se vytváří elektrochemický potenciál na vnitřní mitochondriální membráně. Dýchací řetězec je zakončen transportním proteinem komplexem IV, který je spojen s komplexem V, také nazývaným ATP syntáza. Komplex V podmiňuje nejdůležitější metabolickou dráhu pro tvorbu ATP, oxidativní fosforylaci. ATP syntáza využívá elektrochemického gradientu v mezimembránovém prostoru mitochondrie pro tvorbu ATP. Dochází ke spontánní protonaci c podjednotky ATP syntázy, pootočení celého enzymu a přesunu vodíkových iontů do matrix mitochondrie. Následně dochází na katalytické podjednotce  $\beta$  ATP syntázy k fosforylaci adenosindifosfátu na ATP. ATP je esenciálním energetickým zdrojem, který zprostředkovává průběh různých fyziologických procesů [16].

### **2.3.3.2 Mitochondriální dysfunkce v mozku postižených AN**

Řada mitochondriálních enzymů je v průběhu AN deficitní; mezi ně patří pyruvát dehydrogenázový komplex (EC 1.2.4.1), ketoglutarát dehydrogenázový komplex (EC 1.2.4.2) a cytochrom c oxidáza (COX; EC 1.9.3.1). Tyto enzymy jsou důležité pro tvorbu energetických zdrojů v buňce a kvůli jejich deficitní funkci dochází k poškození mozkové, srdeční a jaterní tkáně. S progresí onemocnění dochází k poklesu funkce

mitochondrií, to do jisté míry koreluje s tvorbou a ukládáním A $\beta$ , hyperfosforylací  $\tau$  proteinu a neurodegenerací [19].

### **2.3.3.3 Primární mitochondriální kaskádová hypotéza**

Tato hypotéza naznačuje, že mitochondriální dysfunkce může vést k nadprodukcii APP, jeho následné degradaci na A $\beta$  monomery, formování A $\beta$  do fibril či oligomerů a rovněž snižovat clearance A $\beta$ . Poškozené mitochondrie mohou stimulovat produkci a akumulaci A $\beta$ , tvorbu kyslíkatých radikálů a hyperfosforylovaného  $\tau$  proteinu, zvyšovat hladinu vápenatých iontů v buňce, vyvolávat zánětlivé procesy, buněčný stres či způsobit buněčnou smrt. Primární mitochondriální kaskádová hypotéza není kompatibilní s amyloidní hypotézou [20].

### **2.3.3.4 Sekundární mitochondriální kaskádová hypotéza**

Sekundární kaskádová hypotéza je plně provázána s amyloidní hypotézou. Přítomnost A $\beta_{42}$  v buňce zvyšuje množství vápenatých iontů [20]. Dysregulace vápenatých iontů v neuronu hraje důležitou roli v patogenezi osob postižených AN. Pro správnou neuronální funkci je potřeba přesně udržovat buněčnou koncentraci vápenatých iontů, to je ale energeticky náročné. Ve starších neuronech již není tvorba ATP schopná pokrýt energetické výdaje pro regulaci koncentrace vápenatých iontů, důsledkem je vyšší intracelulární hladina těchto iontů. To nakonec ústí v tvorbu reaktivních kyslíkových i dusíkových forem, peroxidu vodíku, dysfunkci mitochondrií, oxidativní poškození, apoptózu či nekrózu buňky [21]. V důsledku změny nitrobuněčné koncentrace vápenatých iontů je výrazně zvýšena tvorba A $\beta$  [20].

Při kontaktu sAPP $\beta$  s vnější mitochondriální membránou dochází k částečnému prostupu skrz mitochondriální proteinový importní aparát vnější mitochondriální membrány. sAPP $\beta$  dokáže blokovat importní infrastrukturu mitochondrie a vystupovat do cytosolu. Tyto deformace mají inhibiční vliv na aktivitu COX. Inhibicí tohoto enzymu dochází ke vzrůstu štěpení APP amyloidní cestou [20].

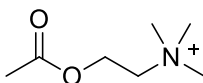
## 2.3.4 Cholinergní teorie

### 2.3.4.1 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh, **Obrázek 2**) byl poprvé syntetizován roku 1867 dávno předtím, než byla objevena jeho biologická funkce. Roku 1936 byl ACh identifikován jako neuromediátor. ACh má velice důležitou roli v lidském organismu jako neurotransmitter v gangliích periferní nervové soustavy a parasymptiku autonomní nervové soustavy [22].

ACh je syntetizován presynapticky v neuronech reakcí exogenního cholinu a acetylkoenzymu A. Tato reakce je katalyzovaná enzymem cholinacetyltransferázou (EC 2.3.1.6). Volný ACh v cytoplasmě neuronu je přesunut pomocí vezikulárního transportéru do synaptických vezikul. Při přenosu nervového vzruchu a následné depolarizaci neuronálního presynaptického terminálu dochází ke vstupu vápenatých iontů do intracelulárního prostoru neuronu. Následně dochází k exocytóze vezikul nesoucí ACh do synaptické štěrbině. ACh dále stimuluje acetylcholinové receptory na postsynaptické membráně neuronu [22].

ACh je v synaptické štěrbině hydrolyzován převážně enzymem acetylcholinesterázou (EC 3.1.1.7, AChE), sekundárně může být metabolizován butyrylcholinesterázou (EC 3.1.1.8, BuChE) [22]. ACh je štěpen na cholin a acetát. V mozku jedinců trpících AN dochází ke snížení aktivity AChE, avšak aktivita BuChE může být v některých oblastech mozku mírně zvýšena [23]. Z toho je patrné, že BuChE může substituovat hypofunkci AChE. Hlavní funkcí cholinesterázy je terminace transmise cholinergního signálu mezi neurony. ACh je znovu ze synaptické štěrbině recyklován vstřebáváním za účasti transportérů zpět do presynaptického neuronu nebo gliových buněk [22].



**Obrázek 2:** Struktura acetylcholinu.



### 2.3.4.2 Receptory vážící acetylcholin

Receptory vážící ACh na postsynaptické membráně můžeme rozdělit na dva typy, nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR) a muskarinový acetylcholinový receptor (mAChR). Tyto dva typy receptorů mají naprosto odlišnou funkčnost a strukturu.

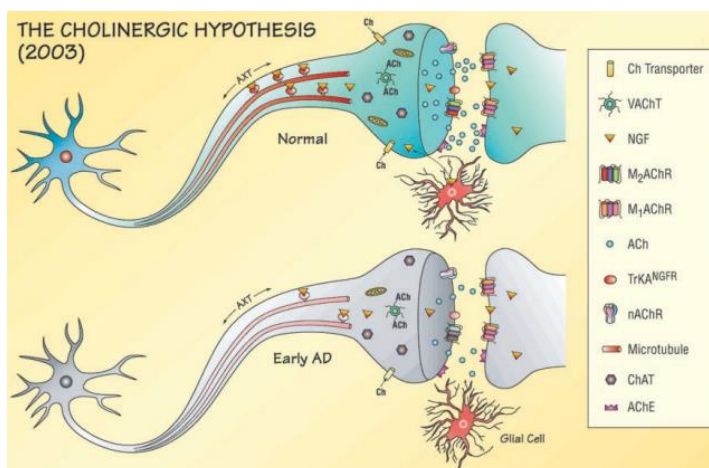
Nikotinový acetylcholinový receptor má charakter ionotropního receptoru. Má pentamerní proteinovou strukturu, v centrální nervové soustavě (CNS) může být složen z kombinace  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek (existuje osm různých podjednotek  $\alpha$ :  $\alpha 2$ - $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ; a tři podjednotky  $\beta$ :  $\beta 2$ - $\beta 4$ ). Tato struktura tvoří iontový kanál pro sodné, draselné a vápenaté ionty, zprostředkovává kontrakce kosterního svalstva. Nikotinové receptory jsou lokalizovány na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky a ganglií autonomní nervové soustavy. Vysoká koncentrace ACh v synaptické štěrbině způsobuje aktivaci a otevření nAChR na 2 milisekundy. Krátce aktivovaný receptor se po uplynulém čase zavírá. Patologické množství ACh v synaptické štěrbině vede ke konformačním změnám v receptoru a inaktivaci nAChR. V případě nervosvalové ploténky má taková změna receptoru za následek svalovou paralýzu [24].

Muskarinový acetylcholinový receptor má povahu metabotropního receptoru. Jedná se o bílkovinnou strukturu tvořenou sedmi transmembránovými  $\alpha$ -helixy. Řadí se mezi receptory spřažené s heterotrimerním G-proteinem, které tvoří buněčnou odpověď pomocí druhého posla. mAChR jsou děleny na podtypy M1-M5. Podtypy M1, M3, M5 jsou spřažené s  $G_q$  nebo  $G_{11}$  proteinem, podtypy M2 a M4 jsou spojené s  $G_i$  a  $G_o$  proteinem. mAChR regulují srdeční frekvenci, kontrakci hladké svaloviny, sekreci žláz, jsou důležité pro stimulaci CNS a synaptickou plasticitu [25].

### 2.3.4.3 Charakteristika cholinergní teorie

Cholinergní systém je tvořen neurony, které využívají k přenosu signálu ACh. Mozková kůra, která je centrem pracovní paměti, je velice bohatě prostoupená cholinergními dráhami. Cholinergní transmise je také velmi frekventovaně zastoupená v hippokampu a amygdale, které se pojí s dlouhodobou pamětí. Propojení cholinergních drah s rektikulární formací v mozkovém kmeni je důležité pro udržení pozornosti.

Stárnutí je doprovázeno změnami v cholinergním systému mozku, s úbytkem cholinergních neuronů a zhoršením paměti (**Obrázek 3**) [26].



**Obrázek 3:** Změny v cholinergním neuronu v počátečních fázích AN (dolní neuron) oproti zdravému neuronu (horní neuron). V počátečních fázích AN dochází v neuronu k útlumu vyplavování ACh, deficitu exprese nAChR a mAChR, snížené podpůrné funkci neurotrofinů a deficitnímu axonálnímu transportu látek do neuronu [27].

Cholinergní teorie předpokládá, že ztráta cholinergního přenosu v CNS vede ke kognitivní dysfunkci. Jedním z prvotních symptomů AN může být postupná ztráta cholinergních neuronů, úbytek ACh a poškození cholinergního systému. Tyto změny mohou být způsobeny zvýšeným transportem cholinu, nesprávným vyplavováním ACh, narušenou expresí nAChR a mAChR či zhoršenou podpůrnou funkcí neurotrofinů [27].

## 2.3.5 Glutamátergí teorie

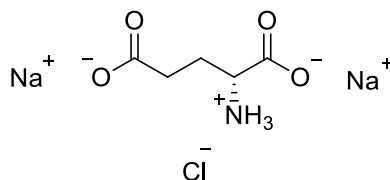
### 2.3.5.1 Role glutamátu a *N*-methyl-D-aspartátového receptoru

Glutamát (**Obrázek 4**) je neurotransmitter, který je zapojen do excitačních procesů v mozku, hlavně v hipokampu a mozkové kůře. Hipokampus se v mozku podílí na rozvoji schopnosti učení a paměti [28]. Množství glutamátu v postsynaptické štěrbině je striktně regulováno, aby docházelo k fyziologické signalizaci. V klidovém stavu je koncentrace glutamátu v synaptické štěrbině okolo 0,6  $\mu\text{M}$ , při přenosu signálu

okolo 10  $\mu\text{M}$ . Množství glutamátu je v extracelulárním prostoru regulováno transportním a regulačním systémem [29].

*N*-methyl-D-aspartátový (NMDA) receptor patří do rodiny ionotropních receptorů, tedy ligandem řízených iontových kanálů. Tento kanál je propustný pro sodné, draselné a vápenaté ionty. NMDA receptory hrají významnou roli v regulaci synaptické plasticity, která je klíčová pro schopnost učení, paměť a dlouhodobou potenciaci [28].

Ionotropní glutamátové receptory můžeme dělit dle farmakologických funkcí na několik skupin jako jsou GluA receptory, kam patří receptor  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny. Další skupinou jsou GluK receptory, kam řadíme kainátové receptory. Do skupiny GluN receptorů spadá NMDA receptor. Receptory  $\delta$  náleží do skupiny GluD receptorů [30].



**Obrázek 4:** Struktura glutamátu v CNS.

### 2.3.5.2 Struktura a aktivace NMDA receptoru

NMDA receptor je tvořen třemi odlišnými jednotkami GluN1, GluN2 a GluN3. Jednotka GluN1 se dále dělí na osm dalších podjednotek, jednotka GluN2 na čtyři podjednotky a jednotka GluN3 na dvě podjednotky. Funkční NMDA receptor má heterotetramerní strukturu tvořenou dvěma GluN1 podjednotkami v kombinaci se dvěma podjednotkami GluN2 nebo GluN3. Tato heterotetramerní struktura tvoří transmembránový, ligandem řízený iontový kanál [29]. Nejčastěji je NMDA receptor tvořen z podjednotek GluN1/GluN2A-D, který se řadí mezi typ receptoru GluN1/GluN2. Menšina NMDA receptorů je tvořena podjednotkami GluN1/GluN3A-B, které se řadí do receptorového typu GluN1/GluN3 [6]. Proces otevírání tohoto kanálu se může shrnout do tří postupných kroků. Prvním krokem je navázání ligandu na receptor, druhým krokem jsou následné konformační změny a třetím krokem je šíření těchto

změn v buňce resultující v otevření kanálu a proudění draselných a vápenatých iontů do intracelulárního prostoru neuronu [30]. Při běžném membránovém potenciálu je iontový kanál NMDA receptoru blokován hořčnatými ionty. Depolarizace membrány způsobuje vyvázání hořčnatých iontů a umožňuje vstup vápenatých iontů. Intracelulární influx vápenatých iontů vyvolává přenos signálu [29].

Ligandy můžeme rozdělit na antagonisty a agonisty. Při navázání agonisty na receptor dochází k navození odpovědi receptoru, u antagonistů je tomu naopak [31]. Antagonisty dělíme na kompetitivní a nekompetitivní. Kompetitivní antagonisté soutěží s agonisty o vazebné místo na receptoru. Nekompetitivní antagonisté se vážou na receptor na jiné než vazebné místo, takzvané alosterické místo, a nesoutěží tak s agonisty [30].

Aktivace NMDA receptoru tvořeného dvěma podjednotkami GluN1 a dvěma podjednotkami GluN2 vyžaduje navázání dvou molekul koagonisty glycinu a dvou molekul agonisty glutamátu. Naproti tomu pro aktivaci receptorů tvořených podjednotkami GluN1 a GluN3 jsou potřeba čtyři molekuly glycinu. Glycin se samovolně vyskytuje v extracelulárním prostoru, díky čemuž jsou místa pro vazbu glycinu na NMDA receptoru přirozeně obsazena. Mezi agonisty NMDA receptoru patří také L-glutamát, D-glutamát, NMDA, *N*-methyl-L-aspartát, D-aspartát nebo L-aspartát [30].

### **2.3.5.3 Vliv NMDA receptorů na Alzheimerovu nemoc**

Neurodegenerativní onemocnění jako je AN, Parkinsonova nemoc či Huntingtonova choroba jsou spojena se zvýšeným glutamátergním přenosem signálu mezi neurony. Přítomnost zvýšené hladiny glutamátu vede k nadměrné stimulaci NMDA receptorů. Tento stav je nazýván jako excitotoxicita. Nadměrný influx vápenatých iontů do intracelulárního prostoru neuronu kvůli zvýšené aktivaci NMDA receptorů způsobuje apoptózu a poškození synaptické plasticity. U pacientů postižených AN bylo pozorováno poškození regulačních a transportních mechanismů glutamátu [29].

Excitotoxicita může kromě akutních účinků vyvolávat také postupný rozvoj neurodegenerativních onemocnění, chronickou excitotoxicitu, snižovat citlivost receptorů a může vyústit v dlouhodobý pokles synaptické síly [29].

Glutamátergní receptory se jeví jako další cíl pro oligomerní A $\beta$ . Oligomerní A $\beta$  struktury mohou kaskádově navodit hyperfosforylaci  $\tau$  proteinu, ústící v apoptózu neuronu a neurodegeneraci [32].

## **2.4 Současná farmakologická léčba AN**

V současné době není zcela známá příčina AN, a proto léčba AN spoléhá výhradně na symptomatickou intervenci [2]. Snahou je balancovat nerovnováhu neurotransmiterů v mozku a tím mírnit projevy onemocnění [33]. Terapie AN můžeme rozdělit na farmakologickou a nefarmakologickou. Farmakologická léčba je založena na použití inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE) a antagonistů NMDA receptoru. Americká agentura Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválila rivastigmin, galantamin, donepezil, memantin, a memantin kombinovaný s donepezilem jako léčiva pro terapii AN [2].

Nefarmakologickým postupem léčby je například trénink paměti, poslech oblíbené hudby nebo zlepšení spánku jedince. Tento postup léčby bez použití léčiv však nezastavuje poškození neuronů, může však zpomalit úpadek kognice, mírnit projevy agrese a rozrušení [2].

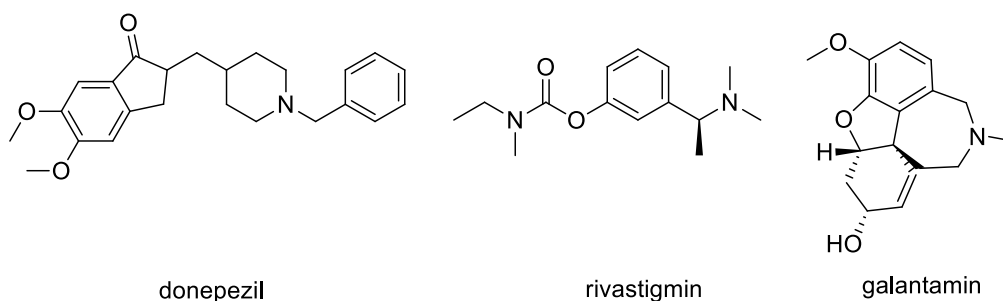
### **2.4.1 Inhibitory acetylcholinesterázy**

Při průběhu AN dochází k poškození cholinergního systému v bazální části předního mozku, hipokampu a amygdale, to způsobuje ztrátu paměti a kognitivních schopností [33]. Inhibicí AChE dochází ke zpomalení rozkladu ACh v synaptické štěrbině.

AChE lze rozdělit dle mechanismu působení na ireverzibilní, pseudo-ireverzibilní a reverzibilní. Při ireverzibilní inhibici dochází ke tvorbě kovalentní vazby za vzniku komplexu enzym-substrát, tato inhibice je dlouhodobá/nevratná. Při inhibici

pseudo-ireverzibilní dochází ke kovalentní interakci enzymu a substrátu. Tato kovalentní vazba je však časem hydrolyzována a molekula substrátu se stává znovu přístupnou pro enzymatickou reakci. Reverzibilní inhibice je vratná, dochází k nekovalentní interakci substrátu s enzymem a lze ji zvrátit elevací hladiny substrátu. Mezi reverzibilní IChE lze zařadit takrin, donepezil, mezi pseudo-ireverzibilní rivastigmin. Ireverzibilní IChE je například skupina organofosfátů [34].

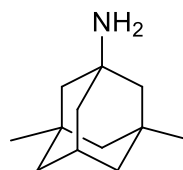
Donepezil, rivastigmin a galantamin (**Obrázek 5**) jsou jedinými léčivými látkami na bázi IChE, které se používají v léčbě AN. Tato léčiva se používají u pacientů s mírným až středně těžkým průběhem nemoci. Použití léčiv na bázi IChE zlepšuje kognitivní projevy a schopnost plnit každodenní úkony u pacientů trpících AN [33].



**Obrázek 5:** Zástupci z rodiny IChE; donepezil, rivastigmin a galantamin.

## 2.4.2 Antagonisté NMDA receptoru

K prevenci vzniku excitotoxicity v neuronu lze použít antagonisty NMDA receptorů. Schváleným léčivem pro středně-těžká až těžká stadia nemoci je memantin (**Obrázek 6**), který se může pro léčbu používat samostatně nebo v kombinaci s IChE [35].



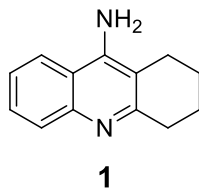
**Obrázek 6:** Struktura memantinu.

Toto léčivo při zvýšené hladině glutamátu působí neuroprotektivně. Je účinným nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů a blokuje tyto receptory. Memantin

má minimální vliv na fyziologickou funkci synaptické transmise [30]. Kromě vlivu na NMDA receptor má také tlumící efekt na fosforylaci  $\tau$  proteinu [35].

### 2.4.3 Takrin

Prvním schváleným léčivem na bázi IChE pro léčbu AN byl takrin (**1**; **Obrázek 7**). Systematicky se jedná o 9-amino-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin. Poprvé byl **1** připraven Adrianem Albertem jakožto intravenózní antiseptikum pro léčbu zraněných vojáků za druhé světové války. Jako terapeutikum AN byl **1** schválen Americkou agenturou FDA roku 1993.



**Obrázek 7:** Struktura takrinu (**1**).

Takrin disponuje neselektivním inhibičním potenciálem vůči AChE a BuChE v nanomolárních koncentracích, váže se do aktivního místa enzymu. Také dobře prostupuje přes hematoencefalickou bariéru [36]. Mimo inhibice AChE a BuChE funguje také jako antagonist NMDA receptorů [6]. Snižuje oxidativní poškození tkání vyvolané  $A\beta$  [36], tlumí sekreci sAPP $\beta$  a následnou produkci  $A\beta$  [7], apoptózu neuronů vyvolanou peroxidem vodíku a snižuje tvorbu reaktivních kyslíkatých sloučenin. Má také schopnost tlumit fosforylaci  $\tau$  proteinu a ostatních MAP [36].

Kvůli nežádoucím účinkům, jako jsou gastrointestinální dyskomfort a hepatotoxicita, není možné dále takrin používat [37]. Definitivně byl stažen z trhu v roce 2013. **1** je metabolizován v játrech pomocí enzymu cytochromu P450 [7]. Z důvodu jeho nežádoucích účinků bylo připraveno mnoho jeho derivátů. Tyto deriváty lze rozdělit do tří skupin podle strukturních rozdílů. Jedná se o homodimerní, heterodimerní a monotakrinové deriváty. Homodimery takrinu jsou symetrické látky spojené ze dvou jednotek takrinu spojovacím řetězcem o různé délce. Heterodimerní deriváty spojují ve své struktuře dvě rozdílné molekuly zpravidla za účelem vzniku

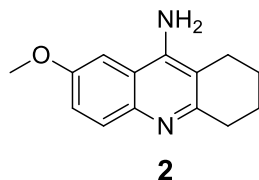
molekuly s multipotentní účinností. U monotakrinových derivátů se mění základní skelet léčiva a dochází k substituci funkčních skupin v různých polohách základního skeletu [37]. Tato práce se věnuje syntéze monotakrinových derivátů se substituenty v poloze C7 s rozdílnou cykloalifatickou částí v základním skeletu molekuly.

### 2.4.3.1 7-methoxytakrin

Poprvé byl 7-methoxytakrin (**2**; **Obrázek 8**) syntetizován v České republice na přelomu 70. a 80. let 20. století. Systematicky se jedná o název 9-amino-7-methoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin. **2** vykazuje shodně jako parentní takrin neselektivní nekompetitivní inhibiční potenciál vůči AChE a BuChE včetně antagonistických účinků na NMDA receptory. Inhibiční aktivita **2** na AChE a BuChE je však oproti **1** přibližně třicetkrát nižší. [7]. Nicméně, účinnost **2** oproti **1** je mnohem vyšší vůči NMDA receptorům typu GluN1/GluN2, GluN1/GluN3 a jeho účinek tak lze označit za více neuroprotektivní [6].

Rozdílná metabolizace **2** je pravděpodobně zodpovědná za nižší toxicitu, než má jeho parentní sloučenina **1**. Metabolickou demethylací vzniká hlavní metabolit 7-hydroxytakrin, který má velmi podobné farmakologické účinky jako **2**. Následně dochází ke konjugaci s kyselinou glukoronovou, poté je metabolit vyloučen močí [37].

**2** úspěšně prošel první a druhou fází klinického hodnocení a byl doporučen pro vstup do třetí fáze. Z politických i finančních důvodů v roce 1989 nebylo klinické hodnocení dokončeno. V rámci druhé fáze klinického hodnocení však tento derivát prokázal mírné zlepšení krátkodobé paměti i při léčbě tardivní dyskineze a prefrontálního syndromu [6].

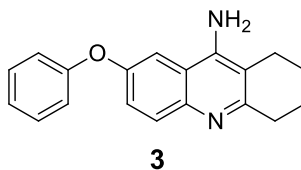


**Obrázek 8:** Struktura 7-methoxytakrinu (**2**).



### 2.4.3.2 7-fenoxytakrin

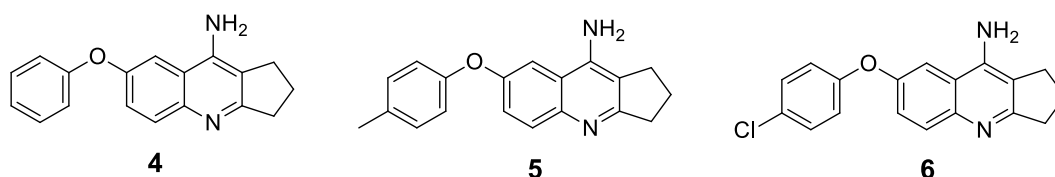
7-fenoxytakrin (**3**; **Obrázek 9**) je derivát **1** s fenoxy substituentem v poloze C7. Systematicky se jedná o 9-amino-7-fenoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin. Tento derivát vykazuje antagonismus *in vitro* i *in vivo* na NMDA receptory. Vedle toho disponuje inhibičními vlastnosti na AChE a BuChE. **3** je více selektivním GluN1/GluN2B NMDA receptorovým antagonistou v porovnání s **2**. **3** Má potenciální neuroprotektivní vlastnosti [nepublikovaná data].



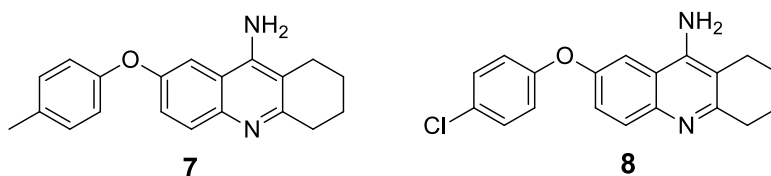
**Obrázek 9:** Struktura 7-fenoxytakrinu (**3**).

### 3 Cíl práce

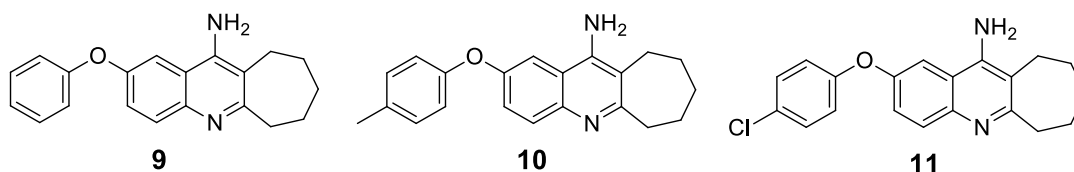
Cílem bakalářské práce byla syntéza série osmi látek obsahující ve své struktuře molekulu modifikovaného takrinu. Aromatický skelet byl v poloze C7 rozšířen o substituovanou fenoxi skupinu methylem nebo chlorem. Další změny byly prováděny v cykloalifatické části takrinu; v rámci této práce byly syntetizovány deriváty s pětičlenným **4-6 (Obrázek 10)**, šestičlenným **7-8 (Obrázek 11)** a sedmičlenným cyklem **9-11 (Obrázek 12)**.



**Obrázek 10:** Deriváty takrinu **4-6** s pětičlenným cyklem v cykloalifatické části.



**Obrázek 11:** Deriváty takrinu **7-8** se šestičlenným cyklem v cykloalifatické části.



**Obrázek 12:** Deriváty takrinu **9-11** se sedmičlenným cyklem v cykloalifatické části.

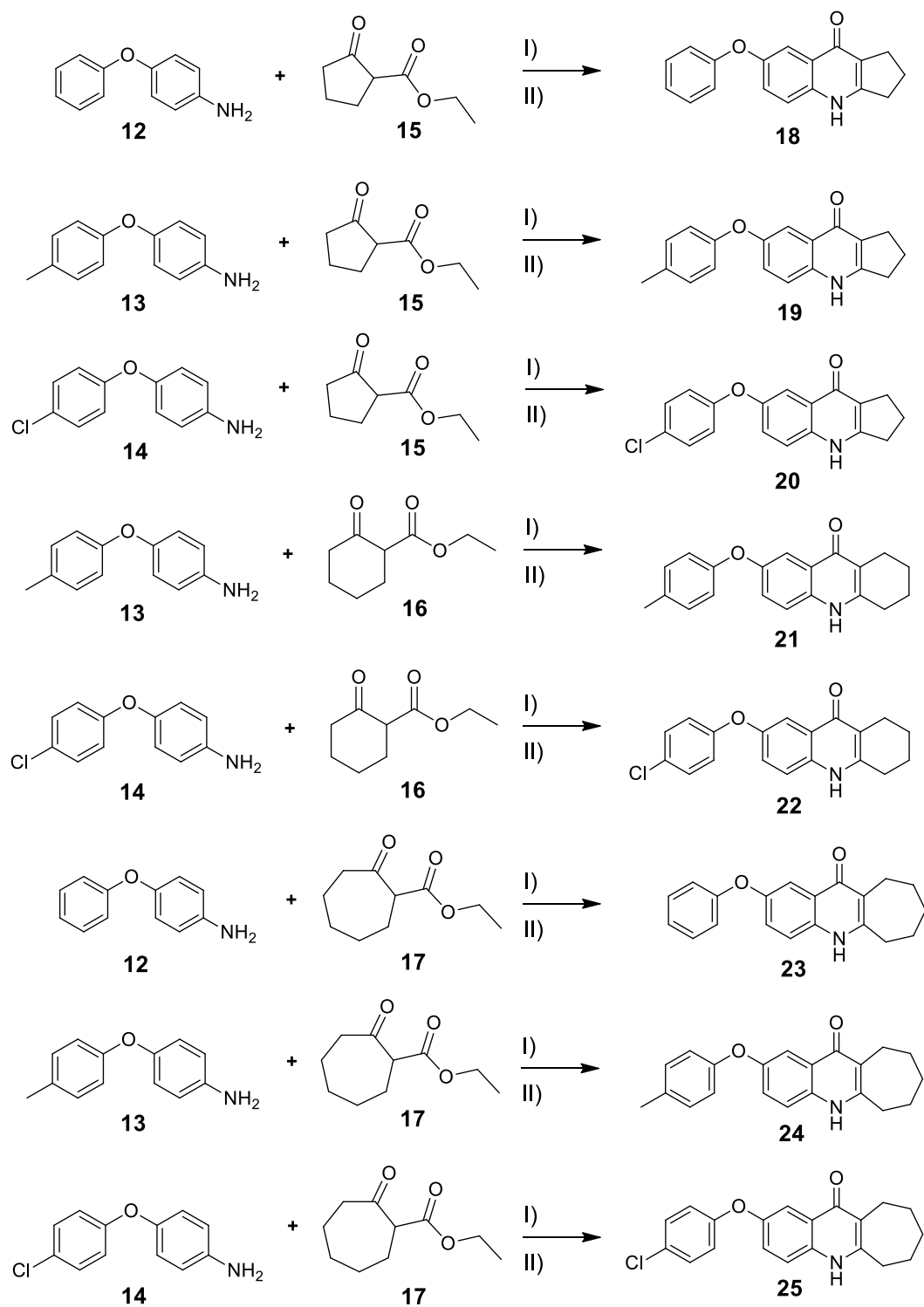
## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Příprava produktů prvního kroku syntézy

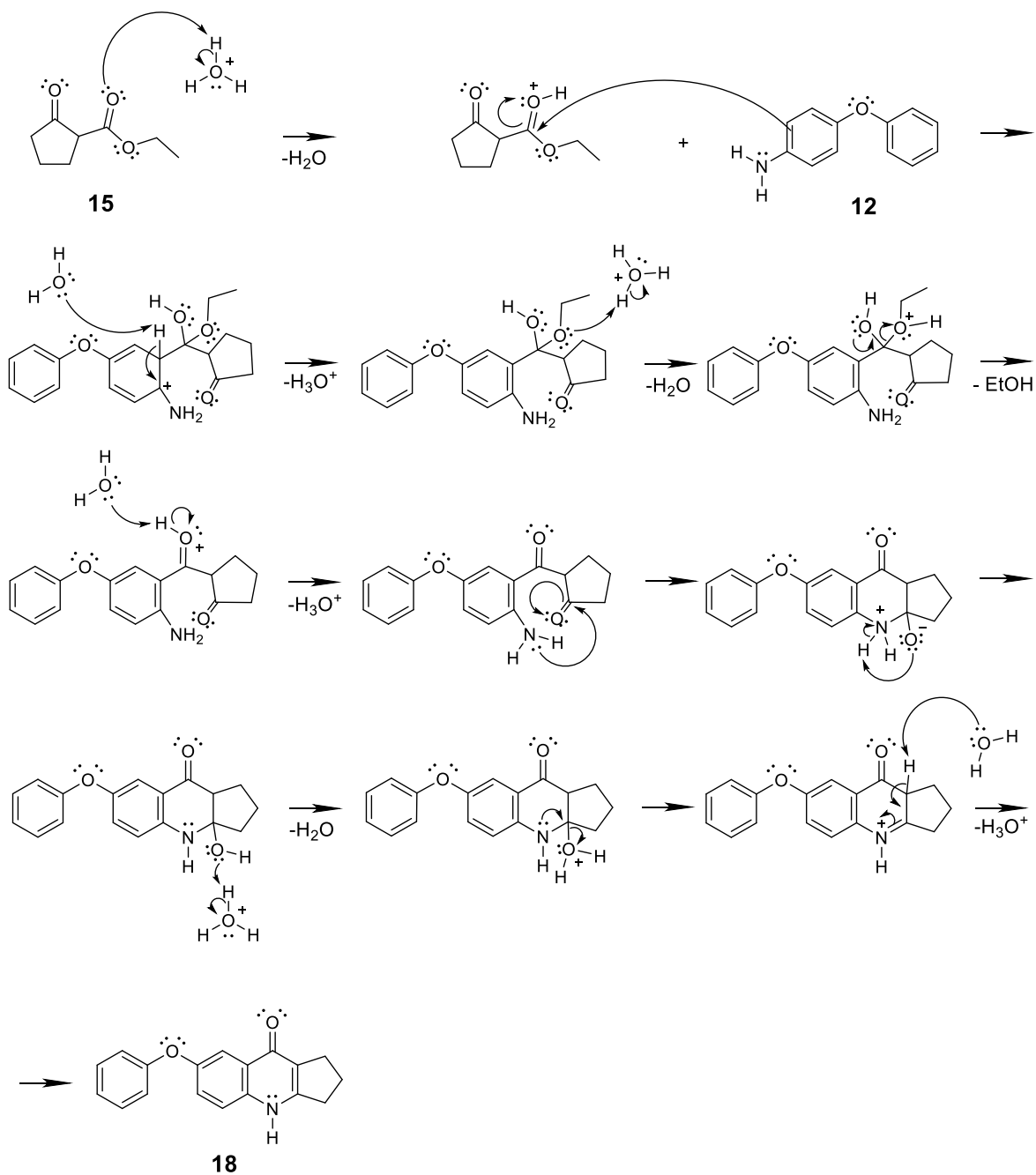
Prvním krokem syntézy byla cyklokondenzační reakce komerčně dostupných výchozích látek, tento reakční krok vycházel z Ullmannovy syntézy [38]. Postup přípravy byl popsán ve **Schématu 1**, reakce probíhala nukleofilní adicí (adičně-eliminačním mechanismem). Ve **Schématu 2** byl popsán mechanismus syntézy produktu **18**, tento mechanismus byl shodný pro ostatní látky **19-25**.

Primární různě substituovaný amin **12-14** a ethyl 2-oxocykloalkancarboxylát **15-17** byly rozpuštěny v toluenu a do reakční směsi byl přidán katalyzátor kyselina p-toluensulfonová (PTSA), ve směsi se vytvořilo kyselé prostředí. Reakce probíhala 24 h při 150 °C. Ukončení reakce bylo provedeno po kontrole pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC). Po ukončení reakce byl odpařen toluen a byl přidán difenylether, směs se zahřívala na 180-200 °C po dobu 15 minut. V tomto mezikroku syntézy bylo nezbytné, aby nedošlo k pyrolýze meziprojektu delším zahříváním. Po ukončení reakce se směs zchladila na laboratorní teplotu a byla vysrážena heptanem. Následně se vzniklá sraženina přefiltrovala přes fritu a byla několikrát promyta heptanem. Výsledné produkty **18-25** byly přečištěny flash chromatografií. Struktura produktů byla stanovena metodou nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HRMS).

Výsledkem prvního kroku syntézy byly látky **18-25**, které se staly výchozími látkami pro druhý krok syntézy. Výtěžnost produktů prvního kroku syntézy byla nejnižší u látky **20** 19 %, nejvyšší byla u látky **22** 91%.



**Schéma 1:** Jednotlivé výchozí látky prvního kroku **12-17** reagující za vzniku produktů **18-25**.  
 Reakční podmínky: I) PTSA (katalyzátor), toluen, 150 °C, 24 h; II) difenylether, 180-200 °C, 15 min.



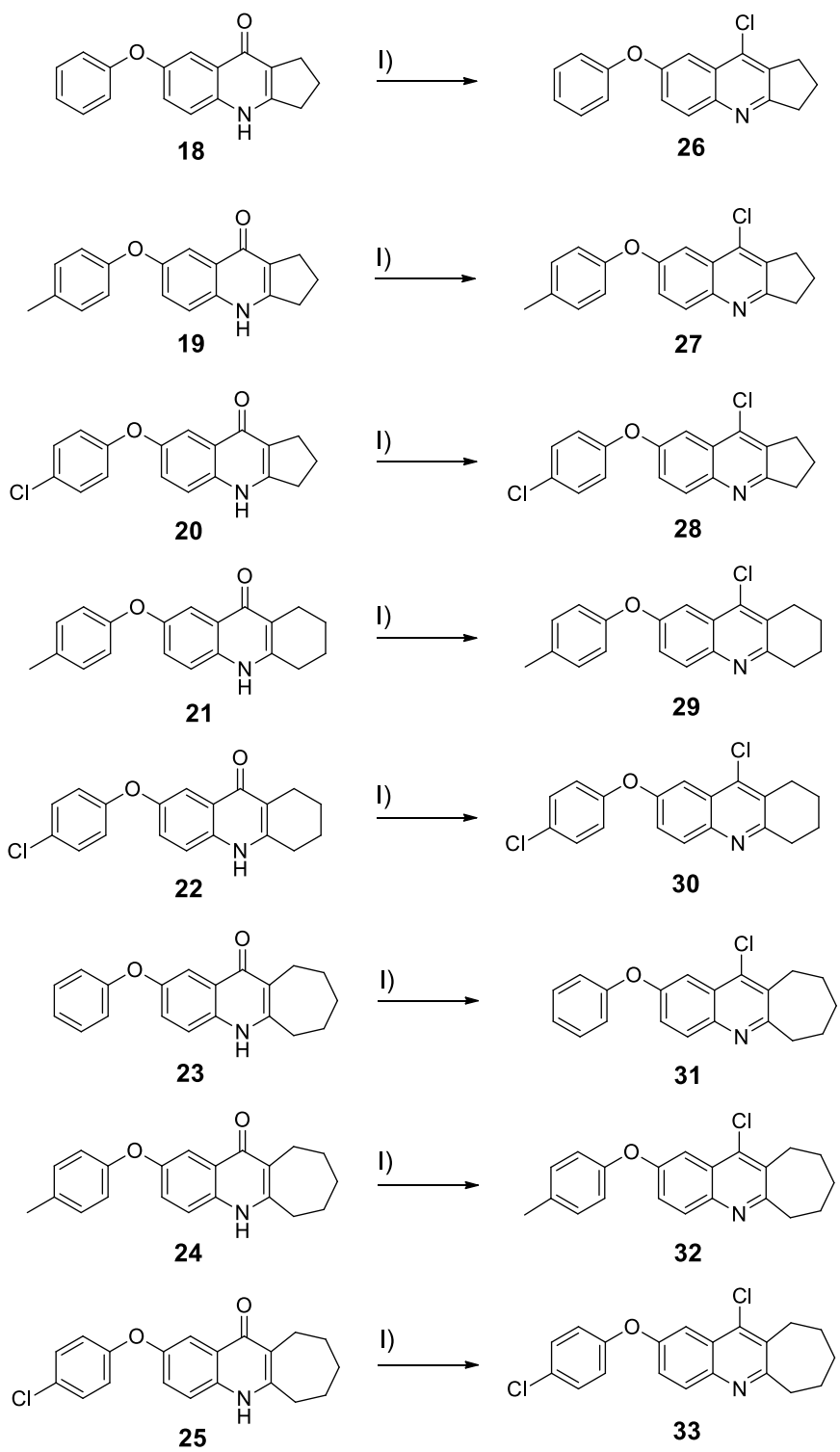
**Schéma 2:** Mechanismus prvního kroku reakce. Látka **12** reagovala nukleofilní adicí s **15** (adičně-eliminacním mechanismem) za vzniku produktu **18**.

## 4.2 Příprava produktů druhého kroku syntézy

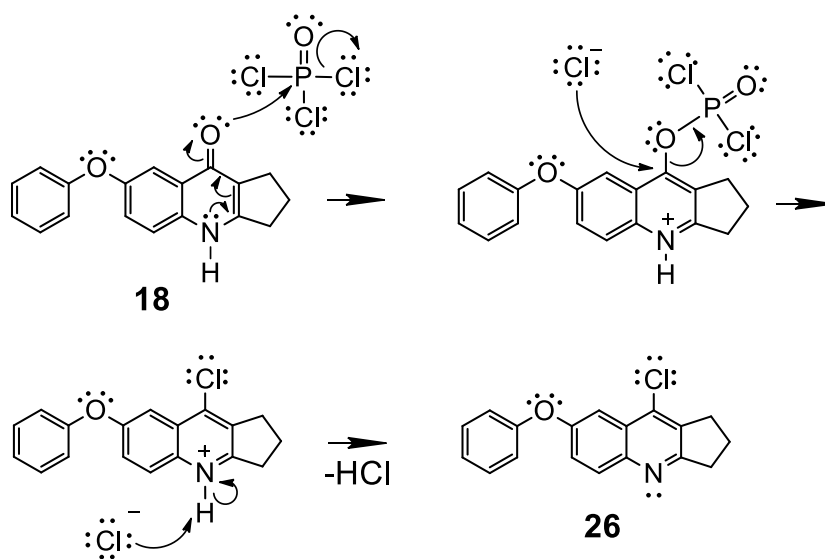
Druhým krokem syntézy byla příprava série produktů **26-33**. Reakce je znázorněna ve **Schématu 3**. Ve **Schématu 4** byl popsán mechanismus syntézy sloučeniny **26**, tento mechanismus byl shodný pro ostatní produkty **27-33**. Reakce probíhala mechanismem nukleofilní substituce.

Výchozí látky **18-25** byly převedeny do 250 ml baňky, rozpuštěny v dichlormethanu (DCM). Následně bylo za stálého chlazení přidáváno chlorační činidlo trichlorid fosforylu ( $\text{POCl}_3$ ). Reakce je silně exotermní, proto byl  $\text{POCl}_3$  přidáván po malých dávkách. Směs se zahřála na 130 °C a reagovala pod zpětným chladičem 1 h. Nezreagovaný  $\text{POCl}_3$  byl oddestilován. Destilační zbytek černé barvy a sirupovitého charakteru byl rozpuštěn v DCM a převeden do ledové lázně s koncentrovaným amoniakem ( $\text{NH}_3$ ) a dále 3 × vytřepáván v dělicí nálevce s DCM. Organické fáze byly po vytřepávání spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Přisypávaný  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , měl nejdříve pevnou strukturu, následně se dalším přídatkem struktura změnila na práškovitou. To značilo, že ve směsi již není vodná fáze a směs se mohla zfiltrvat. Směs byla zfiltrována. Výsledné produkty byly přečištěny flash chromatografií. Struktura produktů byla stanovena pomocí NMR a HRMS.

Produkty druhého kroku syntézy **26-33** se staly výchozími látkami pro třetí krok syntézy. Výtěžnost produktů druhého kroku syntézy byla nejnižší u látky **33** 24% a nejvyšší u látky **32** 95 %.



**Schéma 3:** Jednotlivé výchozí látky druhého kroku **18-25** reagující za vzniku produktů **26-33**.  
 Reakční podmínky: I) POCl<sub>3</sub>, 130 °C, 1 h.



**Schéma 4:** Mechanismus druhého kroku reakce. Látka **18** reagovala mechanismem nukleofilní substituce za vzniku produktu **26**.

### 4.3 Příprava finálních produktů třetího kroku syntézy

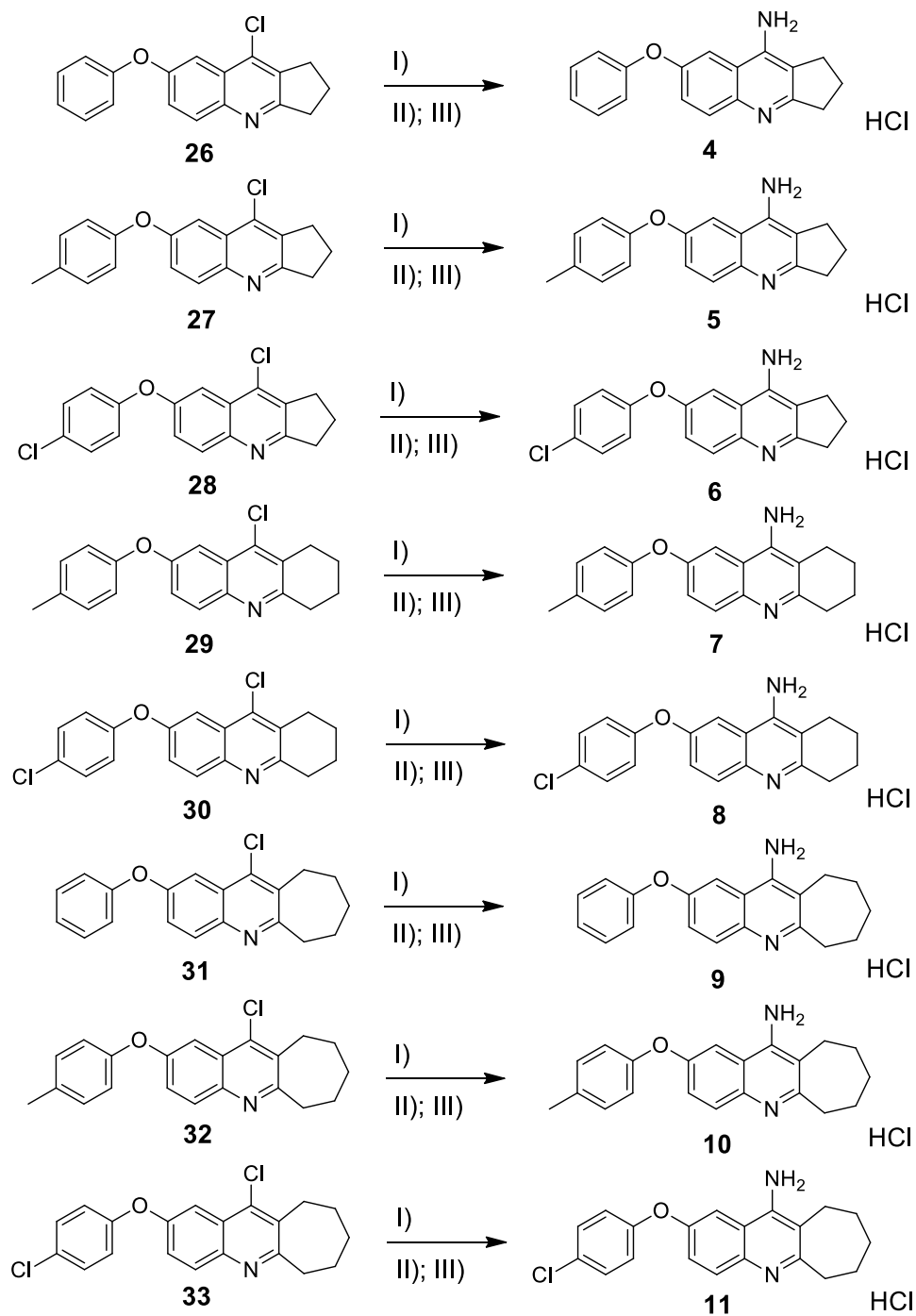
Třetím krokem syntézy byla příprava osmi finálních produktů. Reakce je znázorněna ve **Schématu 5**. Ve **Schématu 6** byl popsán mechanismus syntézy finálního produktu **4**, tento mechanismus byl shodný pro ostatní finální produkty **5-11**. Reakce probíhala nukleofilní substitucí na aromatickém jádře (adičně-eliminačním mechanismem).

Výchozí látky **26-33** byly převedeny do dvouhrdlé baňky a rozpuštěny ve fenolu při teplotě 80 °C. Poté byla teplota reakční směsi zvýšena na 130 °C. Následně byla reakční směs probublávána 2 hodiny vyvíjeným NH<sub>3</sub> *in situ* reakcí pevného hydroxidu sodného (NaOH) a nasyceného roztoku chloridu amonného (NH<sub>4</sub>Cl). Směs v průběhu reakce měnila barvu na tmavě hnědou. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po dokončení reakce se směs vytřepávala mezi 2M NaOH a následně DCM. Reakcí fenolu s NaOH vznikal fenolát sodný, který byl extrahován do vodné fáze. Organická fáze byla spojena a vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, následně byl přefiltrován. Produkty **4-11** byly přečištěny flash chromatografií. Přečištěné produkty byly rozpuštěny v MeOH a ke směsi byly přikapány dvě až tři kapky HCl. Směs se nechala míchat 24 h při laboratorní teplotě. Poté bylo rozpouštědlo MeOH vakuově odpařeno a ke vzniklé hydrochloridové

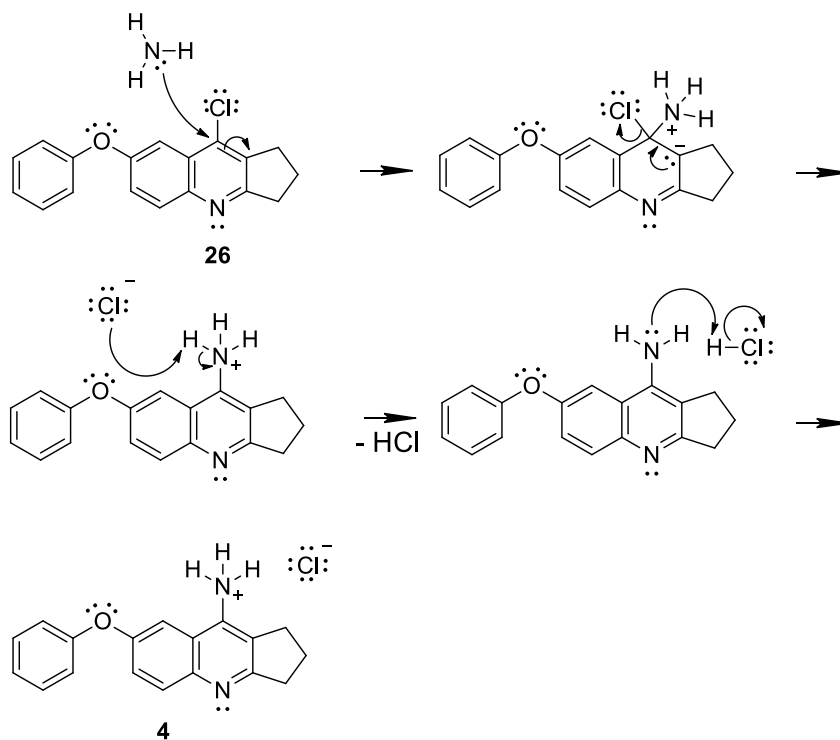


soli byl přidán absolutní ethanol (EtOH). Finální produkty byly převedeny na sůl z důvodu lepší rozpustnosti. Struktura produktů byla stanovena pomocí NMR a HRMS.

Výtěžnost produktů třetího kroku syntézy byla nejnižší u látky **7** 13 % a nejvyšší u látky **9** 62 %.



**Schéma 5:** Jednotlivé výchozí látky třetího kroku **26-33** reagující za vzniku finálních produktů **4-11**. Reakční podmínky: I) fenol, 130 °C; II) NH<sub>3</sub> (g), 2 h; III) MeOH, HCl, 24 h, laboratorní teplota.



**Schéma 6:** Mechanismus třetího kroku reakce. Látka **26** reagovala nukleofilní substitucí (adičně-eliminačním mechanismem) za vzniku finálního produktu **4**.

## 5 Experimentální část

Všechny chemikálie a rozpouštědla potřebné pro syntézu byly dodány firmou Sigma-Aldrich (Česká republika). Průběh reakcí byl kontrolován pomocí TLC za použití tenkovrstvých chromatografických desek Merck Silica gel 60 F<sub>254</sub> zakoupených od firmy Merck (Německo). Detekce byla prováděna pomocí UV detektoru při vlnové délce 254 nm. Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 bez korekce. Purifikace jednotlivých intermediátů a cílových sloučenin byla prováděna pomocí flash chromatografie na přístroji puriFlash 5.050.

<sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektra NMR byla stanovena při laboratorní teplotě v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO-*d*<sub>6</sub>) na NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro <sup>1</sup>H a 125,71 MHz pro <sup>13</sup>C) a Bruker Avance III (600 MHz pro <sup>1</sup>H a 151 MHz pro <sup>13</sup>C). Chemické posuny ( $\delta$ ) protonů v <sup>1</sup>H NMR a uhlíků v <sup>13</sup>C NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. Referenčním standardem pro posun v <sup>1</sup>H NMR spektrech byl centrální pík DMSO-*d*<sub>6</sub> při  $\delta = 2,50$  ppm a pík CDCl<sub>3</sub> při  $\delta = 7,26$  ppm. V <sup>13</sup>C NMR spektrech byl interním standardem pík DMSO-*d*<sub>6</sub> při  $\delta = 39,43$  ppm a pík CDCl<sub>3</sub> při  $\delta = 77,00$  ppm. Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hz. Spinová multiplicita signálů v <sup>1</sup>H NMR spektrech je vyjádřena jako bs (broad singlet), s (singlet), d (doublet), dd (doublet doublet) t (triplet) nebo m (multiplet).

Spektra HRMS byla získána elektrosprejovou ionizací v pozitivním módu (ESI<sup>+</sup>/MS) a selekcí iontů pomocí trojitého quadrupólu na přístroji Agilent 6470. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

## 5.1 Postup přípravy série připravovaných látek

### 5.1.1 První krok syntézy

Komerčně dostupný, různě substituovaný 4-fenoxyanilin (**12-14**; 1,0 eq), byl navážen do 250 ml baňky. Dále bylo do baňky přidáno 50 ml toluenu a 0,1 g PTSA. Do směsi byl přidán ethyl 2-oxocykloalkancarboxylát (**15-17**; 1,1 eq). Baňka se směsí byla umístěna do olejové lázně a na ní byl nasazen Dean-Starkův nástavec se zpětným chladičem. Cyklokondenzační reakce probíhala 24 h při teplotě 150 °C. Po dokončení reakce bylo rozpouštědlo vakuově odpařeno a do reakční směsi byl přidán difenylether (10,0 eq). Reakční směs byla zahřívána 15 minut při 180-200 °C v kovovém bloku pod Dean-Starkovým nástavcem se zpětným chladičem. Po ukončení reakce byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu, a následně bylo přidáno přibližně 30 ml heptanu. Vzniklá sraženina se přefiltrovala za sníženého tlaku přes fritu. Vzniklá sraženina se třikrát promyla heptanem. Meziprodukt **18-25** byl čištěn pomocí flash chromatografie za použití mobilní fáze DCM/methanol (MeOH)/NH<sub>3</sub> (20:1:0,1).

### 5.1.2 Druhý krok syntézy

Ke sloučenině (**18-25**; 1,0 eq) umístěné v 250 ml baňce byl pomalu a za stálého chlazení přidáván POCl<sub>3</sub> (7,8 eq). Následně se reakční směs zahřívala pod zpětným chladičem na 130 °C jednu hodinu. Nezareagovaný POCl<sub>3</sub> byl vakuově oddestilován a destilační zbytek byl zředěn DCM, převeden do ledové lázně (150 ml) s koncentrovaným roztokem NH<sub>3</sub> (30 ml), a 3 × vytřepán v dělicí nálevce s DCM (3 × 50 ml). Organická fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zfiltrován. Rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Surový meziprodukt **26-33** byl přečištěn pomocí flash chromatografie za použití mobilní fáze petrolether/ethylacetát (4:1).

### 5.1.3 Třetí krok syntézy

Intermediát (**26-33**; 1,0 eq) byl převeden do dvouhrdlé 100 ml baňky, rozpuštěn ve fenolu (10,0 eq) při 80 °C, poté byla teplota zvýšena na 130 °C. Reakční směs byla probublávána plynným NH<sub>3</sub> vyvíjeným *in situ*. Po dokončení aminace byla směs ochlazená na laboratorní teplotu a 3 × vytřepána mezi 2M NaOH (100 ml) a DCM (100 ml). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> byl odfiltrován a zbytek vakuově oddestilován. Surový produkt **4-11** byl dále přečištěn pomocí flash chromatografie za použití mobilní fáze DCM/MeOH/NH<sub>3</sub> (9:1:0,1). Přečištěné produkty byly rozpuštěny v MeOH a ke směsi byly přikapány dvě až tři kapky HCl. Směs se nechala míchat 24 h při laboratorní teplotě. Poté se rozpouštědlo MeOH vakuově odpařilo a vzniklá sůl se rozpustila v absolutním EtOH.

## 5.2 Přehled meziproductů

### 7-fenoxy-2,3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9(4H)-on (**18**)

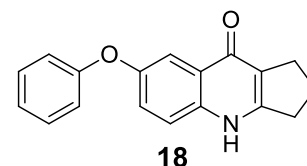
Produkt **18**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 277,32 g/mol

Výtěžek: 5,1 g (68 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 11.99 (bs, 1H), 7.57 – 7.50 (m, 2H), 7.43 – 7.35 (m, 3H), 7.18 – 7.13 (m, 1H), 7.05 – 7.01 (m, 2H), 2.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.06 – 1.96 (m, 2H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 173.5, 157.0, 154.0, 152.4, 136.6, 130.3, 126.2, 123.7, 123.5, 120.3, 119.1, 118.9, 112.0, 31.9, 27.7, 21.6 ppm.

HRMS [M+H]<sup>+</sup>: Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 278,1176; experimentální hodnota 278,1171.

### 7-(4-methylfenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9(4H)-on (19)

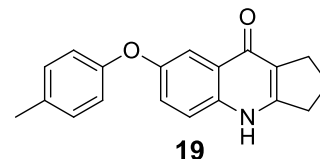
Produkt **19**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 291,34 g/mol

Výtěžek: 728 mg (50 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.94 (bs, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.35 (dd, *J* = 8.9, 2.9 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.96 – 6.92 (m, 2H), 2.96 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.30 (s, 3H), 2.06 – 1.97 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 173.4, 154.5, 153.8, 153.1, 136.3, 133.0, 130.6, 126.1, 123.1, 120.1, 119.2, 119.0, 111.2, 31.9, 27.7, 21.6, 20.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 292,1333; experimentální hodnota 292,1329.

### 7-(4-chlorofenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9(4H)-on (20)

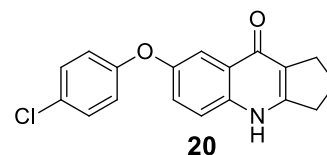
Produkt **20**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 311,76 g/mol

Výtěžek: 268 mg (19 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.99 (bs, 1H), 7.57 – 7.53 (m, 2H), 7.46 – 7.42 (m, 2H), 7.07 – 7.03 (m, 2H), 7.01 – 6.97 (m, 1H), 2.97 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.08 – 1.97 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 173.4, 156.1, 154.1, 151.9, 136.9, 130.1, 127.4, 126.2, 123.5, 120.4, 119.2, 118.8, 112.5, 31.9, 27.7, 21.6 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>ClNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 312,0786; experimentální hodnota 312,0781.

### 7-(4-methylfenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin-9(10H)-on (21)

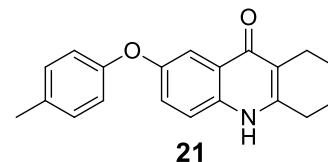
Produkt **21**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 305,37 g/mol

Výtěžek: 652 mg (43 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.40 (bs, 1H), 7.52 – 7.49 (m, 1H), 7.42 – 7.40 (m, 1H), 7.36 – 7.33 (m, 1H), 7.22 – 7.18 (m, 2H), 6.95 – 6.91 (m, 2H), 2.68 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.76 – 1.64 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 175.4, 154.5, 152.7, 146.8, 135.5, 133.0, 130.6, 124.2, 123.6, 119.8, 119.1, 115.0, 111.1, 27.3, 22.1, 21.9, 21.7, 20.5 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 306,1489; experimentální hodnota 306,1478.

### 7-(4-chlorofenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin-9(10H)-on (22)

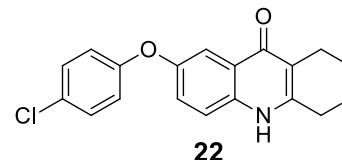
Produkt **22**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 325,79 g/mol

Výtěžek: 1,3 g (91 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.44 (bs, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 2.73 – 2.64 (m, 2H), 2.44 – 2.36 (m, 2H), 1.77 – 1.67 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 175.3, 156.1, 151.6, 147.0, 136.0, 130.1, 127.4, 124.2, 124.0, 120.4, 120.0, 115.2, 112.4, 27.3, 22.0, 21.9, 21.7 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 326,0943; experimentální hodnota 326,0938.



## 2-fenoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydro-5H-cyklohepta[b]chinolin-11(6H)-on (23)

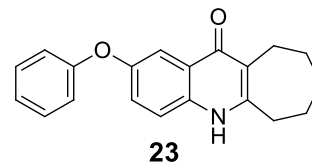
Produkt **23**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 305,37 g/mol

Výtěžek: 6,1 g (74 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.49 (bs, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 7.41 – 7.38 (m, 2H), 7.18 – 7.14 (m, 1H), 7.05 – 7.02 (m, 2H), 7.01 – 6.99 (m, 1H), 2.85 – 2.80 (m, 2H), 2.77 – 2.72 (m, 2H), 1.81 – 1.77 (m, 2H), 1.69 – 1.63 (m, 2H), 1.47 – 1.40 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 174.2, 157.0, 154.2, 147.5, 137.6, 133.8, 129.6, 124.5, 123.4, 122.0, 121.8, 118.9, 111.5, 32.0, 31.5, 26.5, 25.5, 24.6 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 306,1489; experimentální hodnota 306,1475.

## 2-(4-methylfenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-5H-cyklohepta[b]chinolin-11(6H)-on (24)

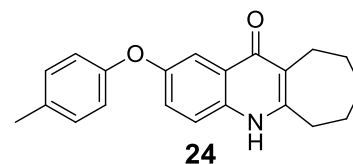
Produkt **24**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 319,40 g/mol

Výtěžek: 1,2 g (74 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.47 (bs, 1H), 7.52 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.36 – 7.33 (m, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.95 – 6.92 (m, 2H), 2.83 – 2.79 (m, 2H), 2.76 – 2.71 (m, 2H), 2.30 (s, 3H), 1.80 – 1.75 (m, 2H), 1.67 – 1.62 (m, 2H), 1.45 – 1.39 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 174.2, 154.5, 153.2, 152.9, 134.9, 133.0, 130.6, 124.5, 123.4, 120.1, 120.1, 119.1, 111.6, 33.7, 32.0, 27.4, 26.0, 23.2, 20.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 320,1646; experimentální hodnota 320,1634.

## 2-(4-chlorofenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-5H-cyklohepta[b]chinolin-11(6H)-on (25)

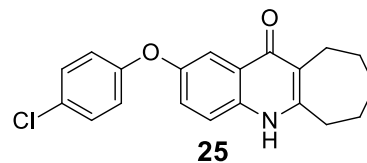
Produkt **25**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub>

Molekulová hmotnost: 339,82 g/mol

Výtěžek: 441 mg (29 %)

Teplota tání: > 300,0 °C



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 11.51 (bs, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 7.45 – 7.41 (m, 2H), 7.40 – 7.36 (m, 1H), 7.07 – 7.03 (m, 2H), 2.85 – 2.80 (m, 2H), 2.77 – 2.72 (m, 2H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.69 – 1.61 (m, 2H), 1.46 – 1.39 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 174.1, 156.1, 153.1, 152.0, 135.5, 130.2, 130.1, 127.4, 124.6, 123.8, 120.4, 120.2, 112.9, 33.8, 32.0, 27.3, 26.0, 23.2 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClNO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 340,1099; experimentální hodnota 340,1089.

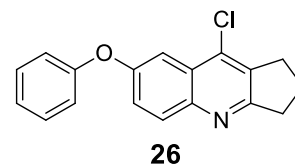
## 9-chloro-7-fenoxy-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin (26)

Produkt **26**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClNO

Molekulová hmotnost: 295,76 g/mol

Výtěžek: 3,7 g (74 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*):** δ 8.00 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 3H), 7.19 – 7.15 (m, 1H), 7.11 – 7.07 (m, 2H), 3.22 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.15 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.29 – 2.19 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>-*d*):** δ 166.2, 156.8, 155.5, 145.3, 136.5, 134.5, 130.8, 129.9, 126.3, 123.8, 122.5, 119.1, 110.2, 35.3, 30.5, 22.7 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>ClNO]<sup>+</sup>: 296,0837; experimentální hodnota 296,0829.

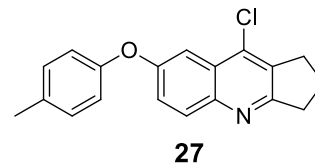
### 9-chloro-7-(4-methylfenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin (27)

Produkt **27**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClNO

Molekulová hmotnost: 309,79 g/mol

Výtěžek: 237 mg (32 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.97 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.46 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 2H), 7.06 – 7.02 (m, 2H), 3.09 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.18 – 2.08 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 166.2, 156.1, 153.5, 144.7, 134.9, 134.6, 133.8, 131.1, 130.8, 125.5, 122.1, 119.7, 107.9, 34.7, 30.1, 22.4, 20.5 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClNO]<sup>+</sup>: 310,0994; experimentální hodnota 310,0988.

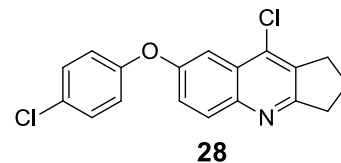
### 9-chloro-7-(4-chlorofenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin (28)

Produkt **28**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molekulová hmotnost: 330,21 g/mol

Výtěžek: 353 mg (56 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.48 (m, 4H), 7.19 – 7.15 (m, 2H), 3.15 – 3.08 (m, 4H), 2.22 – 2.12 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 166.8, 155.1, 145.1, 135.1, 134.9, 131.4, 130.3, 129.9, 128.2, 125.6, 122.5, 121.2, 109.3, 34.8, 30.2, 22.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>NO]<sup>+</sup>: 330,0447; experimentální hodnota 330,0434.

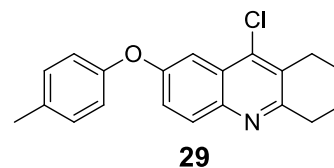
### 9-chloro-7-(4-methylfenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin (29)

Produkt **29**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO

Molekulová hmotnost: 323,82 g/mol

Výtěžek: 530 mg (79 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*):** δ 7.94 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.21 – 7.17 (m, 2H), 7.02 – 6.98 (m, 2H), 3.11 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.99 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.37 (s, 3H), 1.97 – 1.92 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*):** δ 157.8, 156.1, 154.2, 143.4, 140.3, 133.5, 130.6, 130.4, 129.2, 126.3, 122.6, 119.3, 109.2, 34.0, 27.5, 22.7, 22.6, 20.7 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClNO]<sup>+</sup>: 324,1150; experimentální hodnota 324,1143.

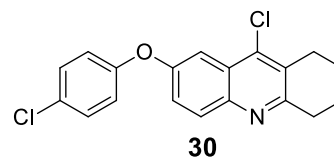
### 9-chloro-7-(4-chlorofenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin (30)

Produkt **30**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molekulová hmotnost: 344,23 g/mol

Výtěžek: 1,1 g (59 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*):** δ 7.97 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.39 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.32 (m, 2H), 7.04 – 7.00 (m, 2H), 3.11 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.97 – 1.93 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*):** δ 158.4, 155.4, 155.1, 143.6, 140.4, 130.9, 129.9, 129.4, 128.9, 126.3, 122.7, 120.4, 110.2, 34.0, 27.6, 22.6, 22.6 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>NO]<sup>+</sup>: 344,0604; experimentální hodnota 344,0602.

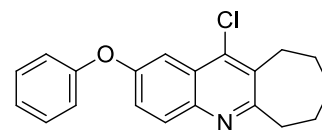
### 11-chloro-2-fenoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin (31)

Produkt **31**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClNO

Molekulová hmotnost: 323,82 g/mol

Výtěžek: 5,1 g (81 %)



**31**

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*):** δ 7.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.43 – 7.37 (m, 3H), 7.20 – 7.15 (m, 1H), 7.12 – 7.07 (m, 2H), 3.25 – 3.19 (m, 5H), 1.94 – 1.86 (m, 3H), 1.86 – 1.78 (m, 2H), 1.78 – 1.71 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*):** δ 163.4, 156.8, 155.7, 143.2, 138.7, 134.3, 130.9, 129.9, 126.5, 123.8, 122.6, 119.1, 111.2, 40.1, 31.8, 30.4, 27.4, 26.9 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClNO]<sup>+</sup>: 324,1150; experimentální hodnota 324,1145.

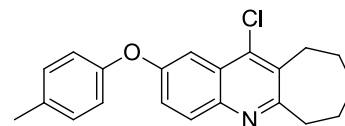
### 11-chloro-2-(4-methylfenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin (32)

Produkt **32**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ClNO

Molekulová hmotnost: 337,84 g/mol

Výtěžek: 1,2 g (95 %)



**32**

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*):** δ 7.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.02 – 6.97 (m, 2H), 3.25 – 3.18 (m, 4H), 2.38 (s, 3H), 1.92 – 1.88 (m, 2H), 1.84 – 1.78 (m, 2H), 1.75 – 1.73 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*):** δ 163.2, 156.3, 154.3, 143.0, 138.7, 134.3, 133.5, 130.7, 130.4, 126.4, 122.3, 119.3, 110.4, 40.1, 31.8, 30.4, 27.4, 26.9, 20.8 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClNO]<sup>+</sup>: 338,1307; experimentální hodnota 338,1301.

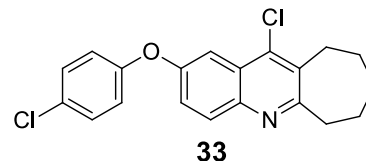
### 11-chloro-2-(4-chlorofenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin (33)

Produkt **33**, žlutý viskózní olej

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO

Molekulová hmotnost: 358,26 g/mol

Výtěžek: 396 mg (24 %)



**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.01 – 7.98 (m, 1H), 7.53 – 7.47 (m, 4H), 7.19 – 7.14 (m, 2H), 3.20 – 3.14 (m, 4H), 1.88 – 1.79 (m, 2H), 1.70 – 1.64 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 163.7, 155.4, 155.2, 143.0, 137.4, 134.6, 131.5, 130.3, 128.2, 125.7, 122.8, 121.1, 110.2, 31.2, 29.9, 27.2, 26.6 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>2</sub>NO]<sup>+</sup>: 358,0760; experimentální hodnota 358,0754.

## 5.3 Přehled finálních produktů

### 7-fenoxy-2, 3, 9, 9a-tetrahydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9-amin hydrochlorid (4)

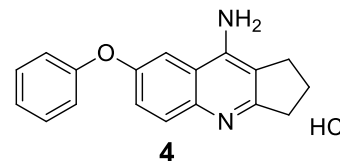
Produkt **4**, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O · HCl

Molekulová hmotnost: 312,79 g/mol

Výtěžek: 1,7 g (50 %)

Teplota tání: 273,9 °C (rozklad sloučeniny)



**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 14.66 (s, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.24 – 8.12 (m, 1H), 8.00 – 7.95 (m, 1H), 7.56 – 7.52 (m, 1H), 7.40 – 7.36 (m, 2H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 7.03 – 7.00 (m, 2H), 3.16 – 3.12 (m, 2H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.20 – 2.13 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 158.8, 157.4, 154.1, 153.2, 135.5, 130.8, 126.0, 124.2, 122.4, 118.7, 117.4, 115.4, 112.7, 32.1, 28.4, 22.5 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 277,1336; experimentální hodnota 277,1337.

**7-(4-methylfenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9-amin hydrochlorid (5)**

Produkt 5, černá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 326,82 g/mol

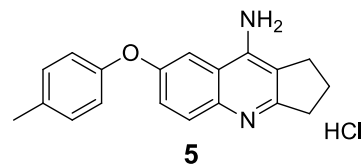
Výtěžek: 20 mg (9 %)

Teplota tání: 292,7 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.92 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 7.30 (s, 2H), 7.17 – 7.13 (m, 2H), 6.90 – 6.85 (m, 2H), 2.98 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.14 – 2.03 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** d 6) δ 162.7, 155.6, 153.3, 149.5, 132.8, 130.9, 129.9, 126.7, 123.7, 118.4, 115.8, 114.7, 111.6, 33.6, 28.2, 22.7, 20.8 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 291,1492; experimentální hodnota 291,1512.



**7-(4-chlorofenoxy)-2, 3-dihydro-1H-cyklopenta[b]chinolin-9-amin hydrochlorid (6)**

Produkt 6, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 347,24 g/mol

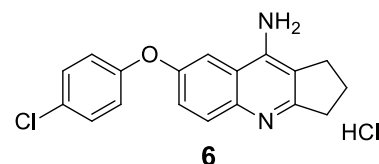
Výtěžek: 113 mg (36 %)

Teplota tání: 281,5 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.86 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.25 (dd, *J* = 9.0, 2.7 Hz, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.38 (s, 2H), 2.89 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.80 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.10 – 2.00 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 166.2, 157.1, 150.9, 145.9, 145.9, 130.5, 129.9, 126.6, 121.7, 119.1, 118.3, 113.9, 111.5, 34.6, 27.8, 22.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>ClN<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 311,0946; experimentální hodnota 311,0940.



### 7-(4-methylfenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin-9-amin hydrochlorid (7)

Produkt 7, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 340,85 g/mol

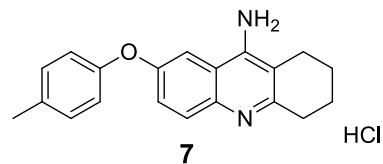
Výtěžek: 80 mg (13 %)

Teplota tání: 268,5 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.86 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.67 – 7.64 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.89 – 6.85 (m, 2H), 6.34 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.83 – 1.78 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 156.4, 155.8, 151.6, 148.1, 143.2, 131.8, 130.4, 129.8, 122.0, 117.6, 117.6, 110.8, 109.3, 33.4, 23.8, 22.7, 22.7, 20.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 305,1649; experimentální hodnota 305,1649.



### 7-(4-chlorofenoxy)-1, 2, 3, 4-tetrahydroakridin-9-amin hydrochlorid (8)

Produkt 8, hnědá krystalická látka

Chemický vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 361,27 g/mol

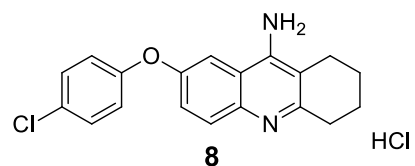
Výtěžek: 556 mg (58 %)

Teplota tání: 296,5 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.42 – 7.37 (m, 2H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 2H), 6.35 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.54 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 1.86 – 1.75 (m, 4H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 157.1, 156.9, 150.8, 148.1, 143.6, 130.2, 129.9, 126.6, 122.1, 119.2, 117.6, 111.3, 109.4, 33.4, 23.8, 22.8, 22.7 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 325,1103; experimentální hodnota 325,1097.





## 2-fenoxy-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin-11-amin hydrochlorid (9)

Produkt **9**, bílá krystalická látka

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 340,85 g/mol

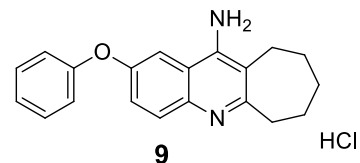
Výtěžek: 1,5 g (62 %)

Teplota tání: 292,8 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.90 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.24 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.11 – 7.06 (m, 1H), 6.99 – 6.96 (m, 2H), 6.39 (s, 2H), 3.01 – 2.95 (m, 2H), 2.83 – 2.76 (m, 2H), 1.83 – 1.76 (m, 2H), 1.66 – 1.60 (m, 2H), 1.59 – 1.52 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 163.5, 158.5, 151.9, 147.4, 143.2, 130.4, 130.3, 123.1, 122.4, 118.9, 117.7, 114.9, 112.3, 39.2, 32.1, 28.1, 27.1, 25.8 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 305,1649; experimentální hodnota 305,1643.



## 2-(4-methylfenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin-11-amin hydrochlorid (10)

Produkt **10**, šedá krystalická látka

Sumární vzorec: C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O . HCl

Molekulová hmotnost: 354,88 g/mol

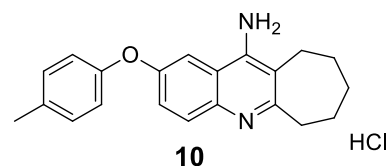
Výtěžek: 382 mg (28 %)

Teplota tání: 310,7 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 7.83 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.89 – 6.85 (m, 2H), 6.31 (s, 2H), 2.99 – 2.94 (m, 2H), 2.81 – 2.76 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.66 – 1.59 (m, 2H), 1.58 – 1.52 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 163.1, 155.8, 152.1, 146.8, 143.0, 131.9, 130.4, 130.1, 121.7, 118.6, 117.7, 114.6, 111.3, 31.8, 27.8, 26.9, 25.5, 20.4 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 319,1805; experimentální hodnota 319,1798.



**2-(4-chlorofenoxy)-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6H-cyklohepta[b]chinolin-11-amin hydrochlorid (11)**

Produkt **11**, hnědá krystalická látka

Sumární vzorec: C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>2</sub>O · HCl

Molekulová hmotnost: 375,29 g/mol

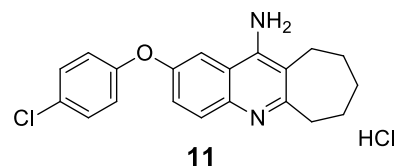
Výtěžek: 101 mg (51 %)

Bod tání: 298,5 °C (rozklad sloučeniny)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 8.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.61 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.46 – 7.42 (m, 2H), 7.08 – 7.05 (m, 2H), 3.12 – 3.09 (m, 2H), 2.86 – 2.82 (m, 2H), 1.83 – 1.79 (m, 2H), 1.71 – 1.66 (m, 2H), 1.57 – 1.50 (m, 2H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 157.9, 156.1, 154.4, 154.3, 133.9, 130.6, 128.3, 126.4, 122.6, 120.4, 117.3, 115.0, 112.3, 33.7, 31.3, 26.5, 25.8, 24.9 ppm.

**HRMS [M+H]<sup>+</sup>:** Vypočítaná hodnota pro [C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>: 339,1259; experimentální hodnota 339,1254.



## 6 Závěr

Předkládaná práce shrnuje aktuální informace o AN. Detailněji byly popsány hypotézy vzniku a progresu AN jako jsou amyloidní,  $\tau$  proteinová, mitochondriální, cholinergní a glutamatergní teorie. V neposlední řadě byla popsána AN z pohledu současné léčby.

Cílem práce byla syntéza série sloučenin příbuzných k molekule 7-fenoxytakrinu. Jednalo se o sloučeniny derivatizované v poloze C7 fenoxyskupinou, která dále byla substituována v poloze C4. Dále lze skupinu finálních produktů rozdělit na sloučeniny s pětičlennou cykloalifatickou částí **4-6**, se šestičlennou cykloalifatickou částí **7-8** a se sedmičlennou cykloalifatickou částí **9-11**. U jednotlivých kroků syntézy byly popsány mechanismy reakcí. První krok probíhal nukleofilní adicí, druhý krok probíhal nukleofilní substitucí a třetí krok probíhal nukleofilní substitucí na aromatickém jádře.

Identita struktur byla potvrzena pomocí metod NMR a HRMS, k charakterizaci byla rovněž stanovena teplota tání. Při stanovování bodu tání produktů převedených na sůl docházelo k rozkladu látek. U výsledných finálních produktů bude dále biologicky testována inhibice AChE a BuChE. Dále se bude ověřovat jejich cytotoxicita a vliv těchto derivátů na NMDA receptory. Biologické testování nebylo součástí práce.

## 7 Použitá literatura

- [1] *Alzheimer nadační fond* [online]. [vid. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://www.alzheimernf.cz/#popup-alzheimerova-choroba>
- [2] 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* [online]. 2020. ISSN 1552-5279. Dostupné z: [doi:10.1002/alz.12068](https://doi.org/10.1002/alz.12068)
- [3] QUERFURTH, Henry W. a Frank M. LAFERLA. Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2010, **362**(4), 329–344. ISSN 1533-4406. Dostupné z: [doi:10.1056/NEJMra0909142](https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142)
- [4] MURPHY, M. Paul a Harry LEVINE. Alzheimer's Disease and the  $\beta$ -Amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 2010, **19**(1), 311 [vid. 2020-02-20]. ISSN 1387-2877. Dostupné z: [doi:10.3233/JAD-2010-1221](https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1221)
- [5] ADEM, Abdu. Putative mechanisms of action of tacrine in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* [online]. 1992, **85**(S139), 69–74 [vid. 2020-02-15]. ISSN 1600-0404. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1600-0404.1992.tb04458.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1992.tb04458.x)
- [6] KANIAKOVA, Martina, Lenka KLETECKOVA, Katarina LICHNEROVA, Kristina HOLUBOVA, Kristyna SKRENKOVA, Miloslav KORINEK, Jan KRUSEK, Tereza SMEJKALOVA, Jan KORABECNY, Karel VALES, Ondrej SOUKUP a Martin HORAK. 7-Methoxyderivative of tacrine is a „foot-in-the-door” open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology* [online]. 2018, **140**, 217–232. ISSN 1873-7064. Dostupné z: [doi:10.1016/j.neuropharm.2018.08.010](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.010)
- [7] SOUKUP, Ondrej, Daniel JUN, Jana ZDAROVA-KARASOVA, Jiri PATOCKA, Kamil MUSILEK, Jan KORABECNY, Jan KRUSEK, Martina KANIAKOVA, Vendula SEP SOVA, Jana MANDIKOVA, Frantisek TREJTAR, Miroslav POHANKA, Lucie DRTINOVA, Michal PAVLIK, Gunnar TOBIN a Kamil KUCA. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Current Alzheimer Research* [online]. 2013, **10**(8), 893–906. ISSN 1875-5828. Dostupné z: [doi:10.2174/1567205011310080011](https://doi.org/10.2174/1567205011310080011)
- [8] GALE, Seth A., Diler ACAR a Kirk R. DAFFNER. Dementia. *The American Journal of Medicine* [online]. 2018, **131**(10), 1161–1169. ISSN 1555-7162. Dostupné z: [doi:10.1016/j.amjmed.2018.01.022](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022)
- [9] TOODAYAN, Nadeem. Professor Alois Alzheimer (1864-1915): Lest we forget. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia* [online]. 2016, **31**, 47–55. ISSN 1532-2653. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jocn.2015.12.032](https://doi.org/10.1016/j.jocn.2015.12.032)

- [10] EDWARDS III, George A., Nazaret GAMEZ, Gabriel ESCOBEDO JR., Olivia CALDERON a Ines MORENO-GONZALEZ. Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. 2019, **11** [vid. 2020-03-03]. ISSN 1663-4365. Dostupné z: doi:10.3389/fnagi.2019.00146
- [11] MASTERS, Colin L. a Dennis J. SELKOE. Biochemistry of Amyloid  $\beta$ -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2012, **2**(6) [vid. 2020-02-19]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006262
- [12] HARDY, John a Dennis J. SELKOE. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 2002, **297**(5580), 353–356. ISSN 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1072994
- [13] KAMETANI, Fuyuki a Masato HASEGAWA. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 2018, **12** [vid. 2020-02-20]. ISSN 1662-4548. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2018.00025
- [14] IQBAL, Khalid, Fei LIU, Cheng-Xin GONG a Inge GRUNDKE-IQBAL. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Current Alzheimer research* [online]. 2010, **7**(8), 656–664 [vid. 2020-02-21]. ISSN 1567-2050. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090074/>
- [15] NOBLE, Wendy, Diane P. HANGER, Christopher C. J. MILLER a Simon LOVESTONE. The Importance of Tau Phosphorylation for Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Neurology* [online]. 2013, **4** [vid. 2020-02-21]. ISSN 1664-2295. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2013.00083
- [16] COOPER, Geoffrey M. Mitochondria. *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* [online]. 2000 [vid. 2020-02-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>
- [17] KANAAN, Nicholas M., Diana S. HIMMELSTEIN, Sarah M. WARD, Benjamin COMBS a Lester I. BINDER. Chapter 56 - Tau Protein: Biology and Pathobiology. In: Mark S. LEDOUX, ed. *Movement Disorders (Second Edition)* [online]. Boston: Academic Press, 2015 [vid. 2020-02-21], s. 857–874. ISBN 978-0-12-405195-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-405195-9.00056-1
- [18] GULISANO, Walter, Daniele MAUGERI, Marian A. BALTRONS, Mauro FÀ, Arianna AMATO, Agostino PALMERI, Luciano D'ADAMIO, Claudio GRASSI, D. P. DEVANAND, Lawrence S. HONIG, Daniela PUZZO a Ottavio ARANCIO. Role of Amyloid- $\beta$  and Tau Proteins in Alzheimer's Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [online]. 2018, **64**(s1), S611–S631. ISSN 1875-8908. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-179935

- [19] SWERDLOW, Russell H., Jeffrey M. BURNS a Shaharyar M. KHAN. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 2010, **20**(Suppl 2), 265–279 [vid. 2020-02-22]. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-100339
- [20] SWERDLOW, Russell H. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. nedatováno, **62**(3), 1403–1416 [vid. 2020-02-24]. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-170585
- [21] SUPNET, Charlene a Ilya BEZPROZVANNY. Neuronal calcium signaling, mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 2010, **20**(Suppl 2), S487–S498 [vid. 2020-02-24]. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-100306
- [22] FISHER, Stephen K. a Susan WONNACOTT. Chapter 13 - Acetylcholine. In: Scott T. BRADY, George J. SIEGEL, R. Wayne ALBERS a Donald L. PRICE, ed. *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* [online]. New York: Academic Press, 2012 [vid. 2020-02-28], s. 258–282. ISBN 978-0-12-374947-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00013-4
- [23] ARENDT, T., M. K. BRÜCKNER, M. LANGE a V. BIGL. Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development--a study of molecular forms. *Neurochemistry International* [online]. 1992, **21**(3), 381–396. ISSN 0197-0186. Dostupné z: doi:10.1016/0197-0186(92)90189-x
- [24] KRAMER, Ijsbrand M. Chapter 4 - Cholinergic Signaling and Muscle Contraction. In: Ijsbrand M. KRAMER, ed. *Signal Transduction (Third Edition)* [online]. Boston: Academic Press, 2016 [vid. 2020-02-28], s. 263–327. ISBN 978-0-12-394803-8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394803-8.00004-8
- [25] KRUSE, Andrew C., Brian K. KOBILKA, Dinesh GAUTAM, Patrick M. SEXTON, Arthur CHRISTOPOULOS a Jürgen WESS. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature reviews. Drug discovery* [online]. 2014, **13**(7), 549–560 [vid. 2020-04-04]. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd4295
- [26] MESULAM, M. Marsel. The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Progress in Brain Research* [online]. 2004, **145**, 67–78. ISSN 0079-6123. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6123(03)45004-8
- [27] TERRY, A. V. a J. J. BUCCAFUSCO. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2003, **306**(3), 821–827. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.102.041616

- [28] DANYSZ, Wojciech a Chris G PARSONS. Alzheimer's disease,  $\beta$ -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, **167**(2), 324–352 [vid. 2020-02-29]. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02057.x
- [29] WANG, Rui a P. Hemachandra REDDY. Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [online]. 2017, **57**(4), 1041–1048 [vid. 2020-02-29]. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-160763
- [30] VYKLIČKY, V., M. KORINEK, T. SMEJKALOVA, A. BALIK, B. KRAUSOVA, M. KANIAKOVA, K. LICHNEROVA, J. CERNY, J. KRUSEK, I. DITTERT, M. HORAK a L. VYKLIČKY. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*. 2014, **63 Suppl 1**, S191-203. ISSN 1802-9973.
- [31] BERG, Kelly A a William P CLARKE. Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity. *International Journal of Neuropsychopharmacology* [online]. 2018, **21**(10), 962–977 [vid. 2020-03-27]. ISSN 1461-1457. Dostupné z: doi:10.1093/ijnp/pyy071
- [32] ESPOSITO, Zaira, Lorena BELLI, Sofia TONIOLO, Giuseppe SANCESARIO, Claudio BIANCONI a Alessandro MARTORANA. Amyloid  $\beta$ , Glutamate, Excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are We on the Right Track? *CNS Neuroscience & Therapeutics* [online]. 2013, **19**(8), 549–555 [vid. 2020-03-01]. ISSN 1755-5930. Dostupné z: doi:10.1111/cns.12095
- [33] YIANNPOULOU, Konstantina G. a Sokratis G. PAPAGEORGIOU. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* [online]. 2013, **6**(1), 19–33 [vid. 2020-03-17]. ISSN 1756-2856. Dostupné z: doi:10.1177/1756285612461679
- [34] ČOLOVIĆ, Mirjana B, Danijela Z KRSTIĆ, Tamara D LAZAREVIĆ-PAŠTI, Aleksandra M BONDŽIĆ a Vesna M VASIĆ. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335 [vid. 2020-04-13]. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006
- [35] MENDIOLA-PRECOMA, J., L. C. BERUMEN, K. PADILLA a G. GARCIA-ALCOCER. Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International* [online]. 2016, **2016** [vid. 2020-03-17]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2016/2589276
- [36] TUMIATTI, V., A. MINARINI, M. L. BOLOGNESI, A. MILELLI, M. ROSINI a C. MELCHIORRE. Tacrine derivatives and Alzheimer's disease. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **17**(17), 1825–1838. ISSN 1875-533X. Dostupné z: doi:10.2174/092986710791111206

- [37] KORÁBEČNÝ, Jan, Katarína SPILOVSKÁ, Ondřej BENEK, Kamil MUSÍLEK, Ondřej SOUKUP a Kamil KUČA. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Česká a Slovenská Farmacie: Časopis České Farmaceutické Společnosti a Slovenské Farmaceutické Společnosti*. 2012, **61**(5), 210–221. ISSN 1210-7816.
- [38] EICHER, Theophil, Siegfried HAUPTMANN a Andreas SPEICHER. *The Chemistry of Heterocycles: Structures, Reactions, Synthesis, and Applications*. B.m.: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-3-527-66986-8.