

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium biologické aktivity přírodních a syntetických
derivátů polyfenolů a brassinosteroidů na
glutamátem-indukovaném modelu excitotoxicity**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Górová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Gabriel Gonzalez
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěla bych vyjádřit velký vděk Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi nejen za svědomité vedení bakalářské práce, trpělivost, ale především za jeho každodenní předávání nadšení a chuti do práce, které se mi staly obrovskou motivací a neustále mě poháněly kupředu. Možnosti práce na tomto tématu si velmi vážím. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Ditě Jordové, Janě Holinkové a Kateřině Fakové, za jejich pomoc a vstřícnost. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Miroslavovi Kvasnicovi, Ph.D. a Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D za poskytnutí látek k testování.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Veronika Górová
Název práce	Studium biologické aktivity přírodních a syntetických derivátů polyfenolů a brassinosteroidů na glutamátém indukovaném modelu excitotoxicity
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Gabriel Gonzalez
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Neurodegenerativní choroby představují jednu z hlavních skupin civilizačních onemocnění. I přes ohromný počet pacientů trpících těmito chorobami není stále známá jednoznačná příčina, což je částečně zapříčiněno nedostatkem výzkumných modelů. V této práci jsem se zaměřila na optimalizaci modelu excitotoxicity indukovanou glutamátém simulujícího jednu z podob Parkinsonovy či Huntingtonovy choroby. Na tomto modelu byl proveden základní screening látek ze skupin brassinosteroidů a polyfenolů, jejich aktivita poté porovnána s používanými léčivy a následně byly 2 nejaktivnější látky, 1 negativní kontrola a 1 léčivo vybrány pro další experimenty. Také byl na základě získaných experimentálních dat, tedy aktivit těchto látek, vyhotoven model potenciálního vazebného místa pro design nových derivátů brassinosteroidů s možnou srovnatelnou či vyšší anti-excitotoxickou aktivitou.
Klíčová slova	Glutamát, excitotoxicita, neurony, brassinosteroidy, polyfenoly, diference, neurotransmitter, ER stres, oxidativní stres
Počet stran	67
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Górová
Title	Biological evaluation of natural and synthetic derivatives of polyphenols and brassinosteroids in glutamate-induced model of excitotoxicity.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of growth regulators
Supervisor	Mgr. Gabriel Gonzalez
The year of presentation	2019

Abstract

Neurodegenerativne diseases make one of the major groups of diseases of civilization. In spite of the huge amount of patients suffering from the neurodegenerative disorders, the clear causation remains still unknown, which is partly caused by the lack of research models. I focused on the optimalization of glutamate-induced model of excitotoxicity simulating on of the form of Parkinson's or Huntington's diseases in my thesis. The basic screening of substances of brassinosteroids and polyphenols has been done and activities of those substances were compared to used medicaments. Consecutively 2 most active substances, one negative control and one medicament were chosen for additional experiments. Moreover a model of possible active site based on acquired data – activities of these substances - was made for the styling of the new brassinosteroid derivatives with possibly comparable or even higher anti-excitotoxic activity.

Keywords	Glutamate, excitotoxicity, neurons, brassinosteroids, polyphenols, differentiation, neurotransmitter, ER stress, oxidative stress
Number of pages	67
Number of appendices	4
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Parkinsonova choroba	9
2.2	Modely Parkinsonovy choroby	10
2.3	Excitotoxicita a glutamátový model	15
2.4	SH-SY5Y buněčná linie pro studium neurodegenerativních onemocnění	18
2.5	Neuroprotektce a léčba Parkinsonovy choroby	20
2.6	Vybrané skupiny látek vykazující neuroprotektivní účinky	21
2.6.1	Brassinosteroidy	22
2.6.2	Polyfenoly	24
3	Experimentální část	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Chemikálie a biologický materiál	27
3.1.2	Testované látky	27
3.1.3	Roztoky	27
3.1.4	Přístrojové vybavení	28
3.1.5	Plasty	28
3.1.6	Software	28
3.2	Kultivace	28
3.3	Příprava buněk na experiment	28
3.4	Diferenciace	29
3.5	Glutamátový model – primární screening a kalibrace toxinu	29
3.6	Cytotoxicita	30
3.7	Calcein AM	30
3.8	Dihydroethidium	31
3.9	Propidium jodid	31
3.10	Laktátdehydrogenasa	32
3.11	Porovnání MK 238 s deferoxaminem	32
3.12	Zpracování dat a statistická analýza	32
3.13	Flexibilní zarovnání (<i>in silico</i>)	32
4	Výsledky a diskuse	34
4.1	Cytotoxicita zkoumaných látek	34
4.2	Diferenciace buněk	35
4.3	Kalibrační testy – glutamátový model	38
4.4	Primární screening látek ze skupin brassinosteroidů a polyfenolů	41
4.5	Propidium jodid	43
4.6	Laktátdehydrogenasa	44
4.7	Dihydroethidium	46
4.8	Porovnání MK 238 s deferoxaminem	47
4.9	Flexibilní zarovnání	49
5	Závěr	53
6	Literatura	55
7	Seznam použitých symbolů a zkratk	63
8	Přílohy	65

Cíle práce

Teoretická část:

1. Excitotoxicita: role u Parkinsonovy choroby a jiných onemocnění
2. Glutamátem-indukovaný *in vitro* model
3. SH-SY5Y neuroblastomová buněčná linie pro studium neurodegenerativních onemocnění
4. Neuroprotektce a současná léčba
5. Vybrané skupiny látek vykazující neuroprotektivní účinky

Praktická část:

1. Vývoj glutamátem-indukovaného modelu excitotoxicity (kultivace buněk, diferenciace, optimalizace glutamátového modelu)
2. primární screening:
 - a) cytotoxicita experimentálních látek a standardů na diferenciovaných neuronálních SH-SY5Y buňkách
 - b) identifikace látek s neuroprotektivní aktivitou na glutamátem-indukovaném modelu excitotoxicity
3. Dílčí studium aktivních substancí nalezených v primárním screeningu
4. Vyhotovení možného vazebného místa na základě identifikovaných aktivních látek pro návrh a budoucí testování další generace sloučenin

1 ÚVOD

V dnešní době čelíme mnoha různým civilizačním onemocněním, přičemž jednu z hlavních skupin tvoří neurodegenerativní choroby. Řada z nich je výsledkem neurodegenerativních procesů, kterými mohou být například genetické mutace nebo nesprávné složení proteinů, a mohou tak způsobit progresivní degeneraci nebo dokonce smrt nervových buněk (Olanow *et al.*, 2003).

S přibývajícím věkem jsme čím dál více těmto nemocem vystavováni. Prevalence neurodegenerativních onemocnění vykazuje vzestupný trend ve výskytu v populaci starších osob (Brookmeyer *et al.*, 2007), konkrétně u Parkinsonovy choroby jde celosvětově přibližně o 1 % osob starších 60 let (Tysnes a Storstein, 2017).

Parkinsonova choroba se projevuje redukcí motorických funkcí, symptomaticky se projevuje ztuhlostí, třesem a zpomalením pohybu (Tysnes a Storstein, 2017). I přes značné vzájemné odlišnosti v symptomech jsou si neurodegenerativní onemocnění na buněčné úrovni podobná.

Přestože skupina neurodegenerativních chorob postihuje značnou část populace, nebyla dosud u některých z nich (např. idiopatická forma Parkinsonovy choroby) objevena jednoznačná příčina vedoucí k neurodegeneraci, částečně také z důvodu nedostatku vhodných modelů, které by mohly být k výzkumu použity (Schapira, 2009a). Nicméně procesy neurodegenerace, ke kterým během ní dochází, již byly identifikovány. Problémem je i samotná léčba, která má za cíl především zmírnění symptomů, stále však není možné zajistit prevenci vzniku samotných neurodegenerativních onemocnění, stejně jako regeneraci akutního stavu.

Dále je velmi důležité zdůraznit, že porozumění mechanismům zapojených v těchto onemocněních je velmi komplikované kvůli významné roli genetických, metabolických a environmentálních faktorů (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Za předpokladu, že budeme znát mechanismy neurodegenerace, kterým neurony podléhají, bude možné v budoucnu poskytnout terapii onemocnění zcela modulující.

Ve své práci jsem se zaměřila na idiopatickou formu Parkinsonovy choroby, která má spojitost s patologickým procesem, kterým je excitotoxicita. Proces excitotoxicity přispívá k neurodegenerativním procesům, při kterých jsou nervové buňky poškozeny nebo zcela zničeny oxidativním stresem spolu s nadměrnou stimulací neurotransmiteru, L-glutamátem (Mattson 2000).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je po Alzheimerově chorobě druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění, které celosvětově postihuje přibližně 1-2 osoby z tisíce (Tysnes a Storstein, 2017). Jedná se o chronické onemocnění, mezi jehož typické klinické projevy patří třes, zpomalení pohybu, ztuhlost, neplynulost řeči a dystonie (abnormální pohyby, postavení a záškuby těla). Dále můžeme také pozorovat i neuropsychiatrické a nemotorické projevy jako jsou kognitivní poruchy, deprese a úzkost (Thanvi *et al.*, 2003). Obvykle se typické parkinsonické symptomy objeví při ztrátě 70-80 % dopaminergních zakončení v oblasti *striatu* a více než 50 % neuronů z oblasti *substantia nigra* (Sarkar *et al.*, 2016).

V případě Parkinsonovy choroby nejde o onemocnění s pouze jedinou příčinou, přestože se úbytek dopaminergních neuronů v *substantia nigra* uvádí jako hlavní problém, jedná se o multifaktorové onemocnění. Mezi další faktory podněcující jeho vznik patří formace Lewyho tělísek (Beitz, 2014), která jsou tvořena shluky intracelulárního neuronálního proteinu α -synukleinu. V nativní podobě se v cytosolu vyskytuje pouze ve formě monomeru, ale patologickou oligomerizací a následnou agregací dochází k tvorbě neurotoxických cytoplazmatických shluků, které nemohou být degradačními drahami jednoduše odstraněny, neboť onemocnění, která jsou spojena s výskytem těchto tělísek, zahrnují i poruchy degradace proteinů (ubikvitin-proteasomový systém a proces autofagie) (Beyer *et al.*, 2009). K dalším faktorům podněcujícím vznik této choroby řadíme poruchy endoplasmatického retikula vyvolané nadměrným přísunem Ca^{2+} iontů (jedna z možností vyvolání ER stresu) (Sarkar *et al.*, 2016), dysfunkci mitochondrií nebo například nadprodukcii reaktivních forem kyslíku (ROS) zapříčiněnou buněčným stresem.

Rozlišujeme dva hlavní typy tohoto onemocnění, a sice familiární a idiopatickou formu PD. Přibližně 5–10 ze 100 případů této choroby je zapříčiněna genetickými mutacemi. Genů zapojených v patologii je více, ale mezi nejvýznamnější řadíme: *SNCA*, který kóduje protein α -synuklein, *PARK2* kódující E3 podjednotku ubikvitin ligasy, *PARK7* kódující antioxidační protein DJ-1 nebo *PINK1* - gen kódující PTEN-indukovaná kinasa 1, který, pokud je mutován, vyvolává změny v morfologii a funkci mitochondrií - konkrétně jde o poruchy aktivity komplexu I (Gandhi a Wood,

2010). Modifikace těchto genů mají podíl na vzniku PD u pacientů před dosažením 50 let věku (Kim, 2013). Protein dardarin, též známý jako LRRK2, kódovaný genem *PARK8*, je spojen s rozvojem PD v pozdějším věku (Khan *et al.*, 2005).

Zbýlých 90–95 % pacientů trpí idiopatickou formou PD, tedy onemocněním s dosud neznámou příčinou vzniku, nicméně s již objevenými patologickými procesy zodpovědnými za degeneraci a smrt dopaminergních neuronů. Mezi ně patří například poškození mitochondrií, dysregulace hladin železa nebo nadměrná produkce ROS vedoucí k oxidativnímu stresu a následným modifikacím makromolekul (lipidy, proteiny a DNA). Tyto procesy mohou zapříčinit poškození nebo dokonce smrt nervových buněk. Dále nadbytek ROS vede k redukci produkce ATP, zvýšení hladiny iontů železa a intracelulárního vápníku a také ke změnám v komplexech dýchacího řetězce mitochondrií (Henchcliffe a Beal, 2008).

Okolnost, že se u idiopatické formy PD nejedná pouze o jediný mechanismus vzniku onemocnění, ale o možnou kombinaci několika současně, znesnadňuje tvorbu modelů pro hodnocení účinnosti terapie a léčiv. Jelikož příčina vzniku a rozvoje tohoto onemocnění není zcela známa, snažíme se získávat další znalosti z oblasti etiologie a patologie PD pomocí *in vitro* a *in vivo* experimentálních modelů (Dauer a Przedborski, 2003).

2.2 Modely Parkinsonovy choroby

K výzkumu biochemických dysfunkcí se používá několik modelů, které můžeme rozdělit na genetické a toxinem indukované. Genetické modely však neposkytují plnou charakterizaci degenerace dopaminergních neuronů, proto se převážně používají toxinem indukované modely PD (Simola *et al.*, 2007).

Nejčastěji jsou používány následující toxiny: 1) čistě syntetické, jako jsou 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) a paraquat, a 2) přirozeně se vyskytující endotoxiny/environmentální toxiny, mezi které řadíme 6-hydroxydopamin (6-OHDA), salsolinol, rotenon a glutamát či N-methyl-D-Aspartát (NMDA).

První zmíněný MPTP-indukovaný model slouží k výzkumu PD člověka a ostatních primátů, protože způsobuje podobné kognitivní a motorické poruchy, jaké jsou pozorovány u PD člověka (Stern, 1990). Aplikace toxinu na myši má pouze malý efekt, protože jejich dopaminergní neurony jsou z neznámých důvodů poměrně resistantní vůči neurotoxické navozené touto látkou (Przedborski *et al.*, 2001). MPTP byl vyroben nedopatřením při ilegální syntéze drogy 1-methyl-4-fenyl-4-propionoxypiperidin

(MPPP) (Langston *et al.*, 1983). MPTP, stejně jako PD, způsobuje selektivní ztrátu dopaminergních neuronů v *substantia nigra* (Seniuk *et al.*, 1990; Muthane *et al.*, 1994). Toxicitu MPTP způsobuje především jeho nestabilní produkt metabolismu kation methylfenylpyridinium (MPP^+) za působení enzymu monoaminoxidasa typu B (MAO-B) (Roth J., 2005). Toxicita MPP^+ je způsobena inhibicí mitochondriálního elektronového transportního řetězce komplexu I, kterou je zabráněno NADH přispět ke vzniku ATP, což následně vede k metabolické smrti buňky.

Posledním zmiňovaným syntetickým toxinem používaným pro výzkum PD je paraquat – herbicid, který je svou strukturou podobný MPP^+ (toxický metabolit MPTP). Podobně jako u zmíněného MPP^+ , spočívá jeho mechanismus účinku v inhibici komplexů v mitochondriích. Pravděpodobně se jedná o další PD toxin působící v přírodě. Ve studii Brooks *et al.* (1999) byla zjištěna snížená motorická aktivita a úbytek dopaminergních neuronů v *substantia nigra* po injekci myši paraquatem (Brooks *et al.*, 1999). Obecně platí, že styk s pesticidy zvyšuje pravděpodobnost vzniku PD (environmentální aspekt PD) (Butterfield *et al.*, 1993; Gorell *et al.*, 1998).

Prvním z výše uvedených přirozeně se vyskytujících toxinů používaných k modelování PD je 6-hydroxydopamin (6-OHDA), což je neurotoxický metabolit dopaminu způsobující selektivní ztrátu dopaminergních neuronů a je také často detekován v mozku a moči PD pacientů (Curtius *et al.*, 1974; Andrew *et al.*, 1993). Strukturální podobnost k dopaminu a noradrenalinu umožňuje 6-OHDA mít vysokou afinitu ke katecholaminergním membránovým transportérům (dopaminový transporter – DAT a norepinefrinový transporter – NET) (Jonsson, 1980), a tedy snadno prostupovat do intracelulárního prostoru neuronů. Farmakologickou blokadou DAT a NET nebo genetickou inaktivací je možné předejít intoxikaci, neboť 6-OHDA neprochází přes hematoencefalickou bariéru díky své nízké lipofilitě a relativně polárnímu charakteru. Z těchto důvodů blokadou transportérů (DAT a NET) nemůže dojít k proniknutí 6-OHDA na druhou stranu bariéry (Luthman *et al.*, 1989; Van Kampen *et al.*, 2000). Proto je pro použití 6-OHDA v *in vivo* modelu nutná injekce přímo do mozku (Jonsson, 1980). Ačkoliv injekcí této látky dochází k dramatickému poklesu dopaminergních neuronů v oblasti mozku *substantia nigra*, hodnota extracelulárního dopaminu zůstává poměrně stálá (Sarre *et al.*, 2004). Kombinací oxidativního stresu (OS) generovaným autooxidací 6-OHDA a účinků 6-OHDA-chinonu jsou ničeny katecholaminergní struktury, jakými jsou například dopaminergní neurony (Cohen, 1984). Mechanismus toxicity

6-OHDA spočívá v jeho autooxidaci vzdušným kyslíkem, kdy vzniká H_2O_2 a *p*- chinon (Saner a Thoenen, 1971; Heikkila a Cohen, 1971). Míra toxicity je majoritně dána právě množstvím vzniklého *p*-chinonu, který zprostředkovává smrt dopaminergních neuronů (Shimizu *et al.*, 2002; Galindo *et al.*, 2003). Cytotoxicita je tedy časově závislá a má klesající tendenci, neboť po autooxidaci *p*-chinonu stoupá a dosahuje maxima, načež následně klesá a nakonec dosahuje až nedetekovatelných hodnot (Izumi *et al.*, 2005).

Na rozdíl od 6-OHDA *p*- chinon prochází přes buněčnou membránu (Decker *et al.*, 1993) a jakožto elektrofil snadno reaguje s nukleofilními skupinami (Tse *et al.*, 1976), jakými jsou například -SH skupiny cysteinu nebo glutathionu (GSH). Redukovaná forma GSH zmírňuje cytotoxicitu indukovanou 6- OHDA (Shimizu *et al.*, 2002), díky reakci *p*- chinonu za vzniku 2-S-glutathionyl-6-OHDA (Liang *et al.*, 1977). V případě glutathionu tedy můžeme mluvit o protektivních účincích. Vzhledem k faktu, že GSH neprochází přes membránu, nemůže tedy zmírňovat toxicitu způsobenou 6-OHDA vně buněk. Tudíž lze říct, že 6- OHDA přispívá k cytotoxicitě svým oxidačním produktem (H_2O_2) extracelulárně, potažmo přeměnou H_2O_2 na jiné ROS (Levy *et al.*, 1993). Paradoxně bylo zjištěno, že H_2O_2 má na celkové cytotoxicitě indukované pomocí 6-OHDA pouze malý podíl. Výše zmíněný fakt byl prokázán experimenty s enzymem katalasou ve studii Izumi *et al.* (2005), ve které po přidavku katalasy, enzymu rozkládajícího H_2O_2 na vodu a kyslík, nedošlo k inhibici buněčné smrti indukované pomocí 6- OHDA (Izumi *et al.*, 2005). Hlavním aspektem vyvolávajícím cytotoxické účinky je inhibice mitochondriálních elektronových transportních systémů I a V, která byla potvrzena ve studii Iglesias-Gonzalez (2012) již v koncentracích v řádu $nmol.l^{-1}$ (Iglesias-Gonzalez *et al.*, 2012). Celkově tedy 6-OHDA model navíc představuje cenný nástroj k hodnocení farmakologického efektu léčiv figurujících v dopaminergním systému pomocí testů chování (u krys). Díky vylepšení testů motorické odpovědi, a dále díky vývoji nových testů, je možné kvalitativně a kvantitativně zhodnotit efekty podaného léčiva na motorické symptomy vyskytující se u PD (Simola *et al.*, 2007).

6-OHDA model je také úspěšně používán ke studiu motorických komplikací spojených s dopaminergní léčbou. U tohoto modelu se ale nevyskytují Lewyho tělíska a navíc není vhodný pro simulaci vícečetné PD dysfunkce. Nespornou výhodou PD modelu indukovaného pomocí 6-OHDA je jeho nízká toxicita při manipulaci, neboť, jak již bylo zmíněno, hematoencefalická bariéra je pro tento toxin neprostupná (Simola *et al.*, 2007).

Dalším endogenním a environmentálním toxinem je tetrahydroisochinolinový derivát salsolinol (1-methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin), který byl poprvé detekován v moči PD pacientů léčených L-dihydroxyphenylalaninem (L-DOPA) (Sandler *et al.*, 1973). Salsolinol se vyskytuje také přirozeně v potravinových zdrojích, jako jsou vajíčka, sýr, pivo, houby, banán, mléko nebo ryby (Riggin a Kissinger, 1976; Riggin *et al.*, 1976; Collins *et al.*, 1990; Duncan a Smythe, 1982; Duncan *et al.*, 1984), avšak dosud není známo, zdali je exogenní salsolinol schopen překonat hematoencefalickou bariéru (Kurnik-Łucka *et al.*, 2018). Za endogenní výskyt salsolinolu je zodpovědná *R*-salsolinolsynthasa, která pravděpodobně katalyzuje reakci dopaminu s acetaldehydem nebo pyruvátém za vzniku *R*-salsolinolu nebo *R*-salsolinol-1-karboxylové kyseliny. Nicméně *R*- i *S*-salsolinol mohou vzniknout reakcí dopaminu s acetaldehydem i neenzymaticky. Jelikož je pro endogenní syntesu salsolinolu nutné dodržení určitých podmínek, je pravděpodobné, že za zvýšení hladiny jsou zodpovědné dysregulace enzymatických drah, genetické mutace a také exogenní inhibitory (Kurnik-Łucka *et al.*, 2018).

Při zvýšené hladině salsolinolu dochází k uvolňování ROS z mitochondrií, což indukuje oxidativní stres v buňkách. Toxicitu může způsobovat dále inaktivace Cu,Zn-superoxiddismutasy, která katalyzuje přeměnu O_2^- na méně toxický H_2O_2 . V případě inaktivace tohoto enzymu dochází k porušení buněčného dýchání díky zvýšení koncentrace ROS, a tedy působení oxidativního stresu na buňky a jejich následné poškození. Toxicita salsolinolu je také způsobena zvýšením exprese pro-apoptotických (např. BAX) a snížením exprese anti-apoptotických proteinů (např. Bcl-2). Aktivací BAX proteinu může dojít ke zvýšení uvolňování cytochromu *c* z mitochondrií a zároveň k poklesu respirace a aktivity mitochondriálního komplexu II (Wanpen *et al.*, 2007), díky čemuž klesá poměr koncentrace ATP/ADP v čase při inkubaci buněk se salsolinolem (Storch *et al.*, 2000b). Avšak kromě aktivity neurotoxické disponuje i neuroprotektivní aktivitou v nižších koncentracích, a to díky schopnosti limitovat excitotoxicitu a oxidativní stres (Wasik *et al.*, 2015).

Svým působením je salsolinol podobný syntetickému toxinu MPTP. Stejně jako MPP^+ (metabolický produkt MPTP) i salsolinol podléhá *N*-methyloaci *N*-methyltransferasou za vzniku *N*-methyl-salsolinolu, který je následně přeměněn autooxidací na 1,2-dimethyl-6,7-dihydroxyisochinolinové ionty (Maruyama *et al.*, 1992) nebo enzymaticky oxidasou na semikarbazid (Naoi *et al.*, 1995). Výše zmíněný

endotoxin působí antagonisticky na účinky L-DOPA a také potlačuje přenos dopaminu přes D₁ a D₃ receptory (Antkiewicz-Michaluk *et al.*, 2000). Je tedy možné říct, že může ovlivňovat průběh L-DOPA léčby díky změnám v dopaminergním a serotoninergním přenosu do mozku. Ve studii Waśik *et al.* (2015) bylo zjištěno, že injekce salsolinolu zvyšuje uvolňování dopaminu indukované L-DOPA. Naproti tomu v případě jeho chronické přítomnosti dochází ke kompletní blokaci zvýšení uvolňování dopaminu vyvolaného L-DOPA ve *striatu* u krys, a proto klesá odpověď dopaminergních neuronů na léčbu L-DOPA (Wasik *et al.*, 2015). Salsolinol je dále také považován za inhibitor zpětného příjmu katecholaminů v synapsích krysího mozku, protože podle studie Heikkila *et al.* (1971) došlo jeho působením ke kontinuální stimulaci receptorů katecholaminy (Heikkila *et al.*, 1971). V těle má především inhibiční roli v transportu katecholaminů v nigrostriatální dráze, modulaci mesolimbické dráhy zesílené při konzumaci alkoholu a také působí jako faktor pro uvolňování prolaktinu (Kurnik-Łucka *et al.*, 2018).

Rotenon je z chemického hlediska přírodní flavonoid, který se nachází v kořenech rostlin (například ve vinné révě). Navíc je vysoce lipofilní, může tedy procházet přes všechny buněčné membrány, především přes hematoencefalickou bariéru do mozku (Talpade *et al.*, 2000). Do těla se dostává nejčastěji trávicí soustavou (Betarbet *et al.*, 2000), neboť se používá jako insekticid a piscicid (pesticid zabíjející ryby). V dnešní době je v USA zakázán – nesmí se vyskytovat v blízkosti zavlažovacích a plaveckých objektů. Díky možnosti degradace na slunci nemůže být tato látka pokládána za znečišťovatele spodní vody (v létě se rozloží již za 2–3 dny) (Dawson *et al.*, 1991). Zajímavá je také akumulace rotenonu v buněčných organelách (např. mitochondrie, kde podobně jako MPP⁺ zasahuje elektronové transportní řetězce) (Schuler a Casida, 2001). Dále rotenon inhibuje přestavbu tubulinu na mikrotubuly (Brinkley *et al.*, 1974), čímž se zvýší množství monomerů tubulinu, což může být pro buňku toxické (Weinstein a Solomon, 1990; Burke *et al.*, 1989). Pro modelování PD etiologie se moc nepoužívá, a to především kvůli svému nekonzistentnímu efektu na nigrostriatální dráhu – jde především o neselektivitu účinku (Bove *et al.*, 2005).

Posledním, pro modelování PD často používaným, činidlem je L-glutamát. K jeho syntese dochází v samotných neuronech i v gliových buňkách v cyklu trikarboxylových kyselin a dále v glutamát-glutamin cyklu, po jehož dovršení je uskladněn ve vesikulách pro pozdější využití. Jakožto neurotransmitter je glutamát schopen vázat se na receptory,

kteře jsou podle funkce rozděleny do dvou kategorií působení dle vazby na své receptory. První z nich jsou ionotrofičké glutamátové receptory (iGluRs), kteře jsou transmembránovými iontovými kanály, skládají se z více podjednotek, a tvoří tak homo-/heteromerní komplexy, jejichž vlastnosti závisejí na skladbě daných podjednotek. Dělí se dále na 4 podtypy: receptory kyseliny N-methyl-D-Aspartátové (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové (AMPA), delta a kainátové (KAR) receptory. Tyto receptory jsou zprostředkovateli rychlého přenosu skrze transport vápenatých iontů (Ca^{2+}) (Keinanen *et al.*, 1990; Monyer *et al.*, 1992; Nakanishi *et al.*, 1994). Druhou kategorií zaujímají metabotrofičké glutamátové receptory (mGluRs, mGluR1-8), což jsou receptory spřažené s G-proteinem (vazba na GTP). mGluRs spouštějí kaskádu přenosu druhého posla (Pin a Duvoisin, 1995). Přestože se v případě glutamátu jedná o přirozeně se vyskytující neurotransmitter, který hraje důležitou roli v přenosu signálů, při nadměrně vysokých extracelulárních koncentracích může zapříčinit spuštění excitotoxičkých procesů vedoucích k poškození až možné smrti buněk (Danysz a Parsons, 2003; Dong *et al.*, 2009).

2.3 Excitotoxicita a glutamátový model

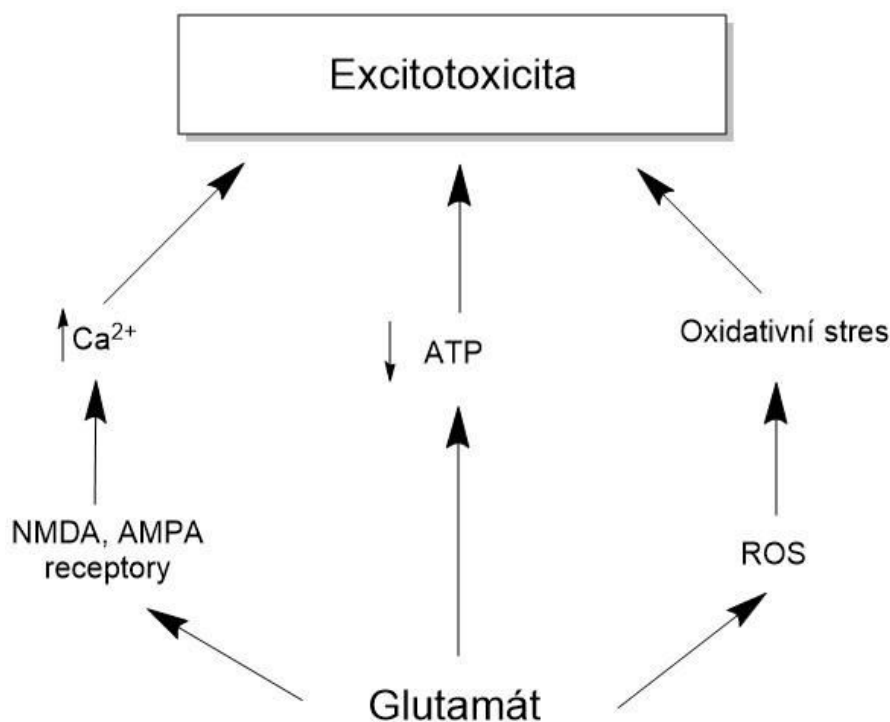
Existuje několik teorií popisujících apoptotické dráhy, kteře se mohou podílet na vzniku neurodegenerativních onemocnění, avšak mezi klíčové patří oxidativní stres, agregace proteinů, poškození či dysfunkce mitochondrií a excitotoxicita.

Excitotoxicita je patologický proces, který hraje významnou roli při vzniku neurodegenerativních onemocnění, jako jsou Alzheimerova, Parkinsonova a Huntingtonova choroba nebo mrtvice (Kritis *et al.*, 2015). Jedním z neurotransmiterů, kteře mohou tyto patologické procesy spouštět, je například glutamát, jehož mechanismus vzniku excitotoxicity je schematicky znázorněn viz (Obr. 1). Glutamát může způsobovat patologii několika způsoby: prvním z nich je vazba molekuly na ionotrofičké glutamátové receptory NMDA a AMPA. NMDA receptory tvoří kanály, kteře jsou propustnější pro vápenaté ionty než pro draselné nebo sodné kationty. Po navázání molekuly glutamátu dochází k uvolnění Mg^{2+} iontů, původně kanál blokujících, což následně umožní vstup vápenatých iontů do cytoplasmy (Mehta *et al.*, 2013). Ca^{2+} ionty mají tedy umožněn průchod do buněk v poměrně vysokých koncentracích a následně dochází k aktivaci enzymů (proteasy, nukleasy a fosfolipasy), depolarizaci a poté k dysfunkci mitochondrií (otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti), produkci ROS, vzniku stresu endoplasmatického retikula

spojeného s uvolněním zásob Ca^{2+} a uvolnění lyzozomálních enzymů (Danysz a Parsons, 2003; Dong *et al.*, 2009). Všechny tyto procesy mohou vyústit v poškození a zánik buněčných organel vedoucí ke smrti neuronů.

Metabotrofické receptory mohou však po navázání ligandu snížit přenos signálu neurotransmiterů, a tedy tím i ztrátu dopaminergních neuronů díky schopnosti regulace excitačního přenosu v synapsi (Conn *et al.*, 2005).

Další možnou cestou vedoucí k procesu excitotoxicity je přes antiporter Cystin/Glutamát (Xc^-), který upravuje jak intra-, tak extracelulární koncentrace glutamátu. Nadměrné koncentrace glutamátu blokují příjem cystinu nezbytného k biosyntese glutathionu, jehož nedostatek ovlivňuje míru schopnosti buněk odstraňovat volné radikály, čímž dochází k nadměrné tvorbě ROS a změnám v Ca^{2+} homeostáze (Fukui *et al.*, 2009) (Obr. 2). ROS nejsou samy o sobě nebezpečné - jejich funkcí je regulace signalizace, navíc jsou běžně produkovány v dýchacím řetězci a jejich hladiny jsou udržovány mitochondriálními antioxidanty, jakými jsou například glutathionový, thioredoxinový a katalasový systém (Mailloux, 2018). V případě nadbytku ROS může být antioxidační obrana buňky nedostatečná, díky čemuž může dojít ke vzniku oxidativního stresu.



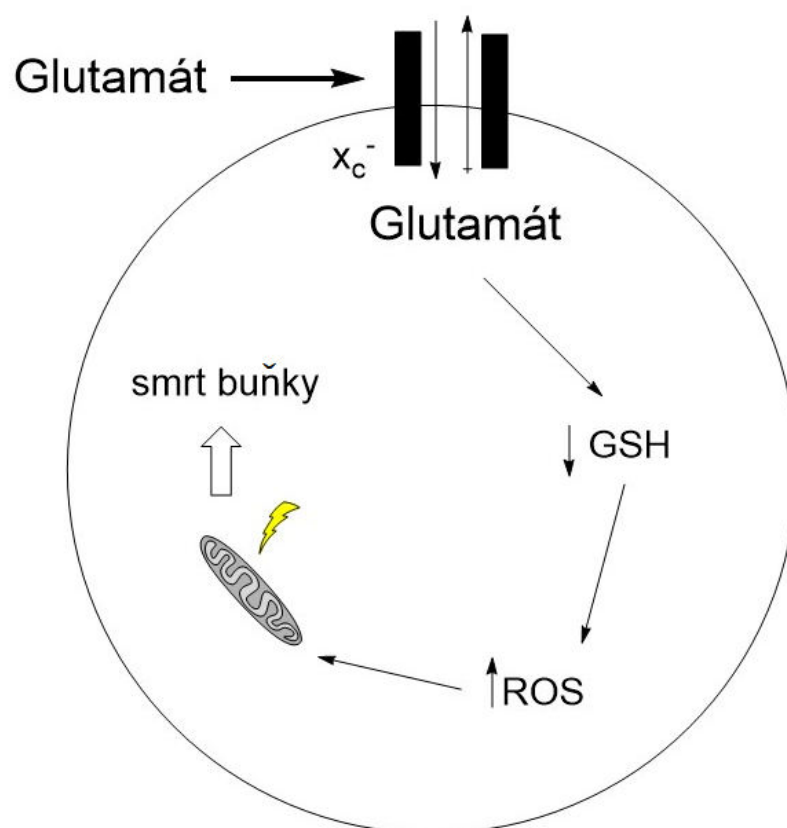
Obr. 1 Mechanismy působení toxicity glutamátu

Vápníkem řízené napěťové kanály presynaptické membrány mohou být alternativní cestou vedoucí k procesům excitotoxicity. Po jejich depolarizaci dochází k uvolnění glutamátu (Anderson a Swanson, 2000), který je během milisekundy navrácen zpět. V gliových buňkách může být takto zpětně propuštěný glutamát přeměněn na glutamin pomocí enzymu glutaminsynthetasy, čímž dojde k ukončení přenosu neurotransmiteru, a tedy prevenci excitotoxicity (Daikhin a Yudkoff, 2000).

Poslední na schématu uvedou cestou (Obr. 1) vedoucí k excitotoxicitě je přes působení ATP synthasy, která může začít hydrolyzovat ATP, a tímto procesem dojde k uvolňování iontů potřebných pro glutamátové transportery na uvolnění glutamátu. Následkem toho dojde k nekontrolované trvající depolarizaci vedoucí ke spuštění procesu excitotoxicity, která může vyústit až ve smrt neuronu (Danysz a Parsons, 2003; Dong *et al.*, 2009).

Z výše popsaných faktů můž být zřejmé, že glutamát moduluje zvýšení hladiny intracelulárního vápníku a indukuje tím buněčnou smrt (Mody a Macdonald, 1995). Výskyt jevu, kdy aktivací NMDA receptorů dochází k patologickým jevům, byl dokázán např. ve studii Brouillet *et al.* (1993), ve které došlo po navázání NMDA antagonistů k NMDA receptorům k ochraně proti neurotoxicitě vzniklé intoxikací pomocí látky MPP⁺ (Brouillet a Beal, 1993). Dalším příkladem může být studie Hsieh *et al.* (2012), ve které po navázání antagonisty NMDA receptorů MK 801 byla pozorována prevence vzniku parkinsonického syndromu a ochrana dopaminergních neuronů před degenerací indukovanou tímto toxinem (Hsieh *et al.*, 2012). Ne však každá buněčná linie disponuje expresí všech podjednotek NMDA receptorů a v takovém případě je toxicita způsobena indukcí oxidativního stresu přes Cyss/Glu antiporterový systém (Kritis *et al.*, 2015).

S ohledem na působení této látky může glutamátem indukované poškození neuronů sloužit jako model excitotoxicity a být použito pro další zkoumání látek a probíhajících patologických procesů. Excitotoxicita je jednou z možností mechanismu vzniku neurodegenerativního onemocnění a v případě jejího potlačení, pomocí zkoumané látky, lze uvažovat o potenciálních neuroprotektivních účincích s aplikací nejen u PD, ale i dalších onemocnění.



Obr. 2 Molekulární mechanismus toxicity glutamátu přes X_c^- antiporterový systém, převzato a upraveno dle Kritis *et al.* (2015)

2.4 SH-SY5Y buněčná linie pro studium neurodegenerativních onemocnění

Jako *in vitro* buněčný model dopaminergních neuronů u PD je velmi často používána buněčná linie SH- SY5Y, což je lidská buněčná linie získaná ze čtyřleté pacientky trpící neuroblastomem. Jedná se o neuronální subklonální linii původně získanou z buněčné linie SK-N-SH biopsií kostní dřeně z roku 1970 (Biedler *et al.*, 1973). Původní buněčná linie obsahuje tři různé fenotypy: neuronový, Schwannový a přechodný (Joshi *et al.*, 2006).

SH- SY5Y má mnoho charakteristik dopaminergních neuronů, jako jsou například exprese tyrosin hydroxylasy a dopamin- β -hydroxylasy a transporter dopaminu (DAT). Zmíněná podobnost zapříčiňuje vysokou citlivost na toxicitu dopaminergních toxinů, např.: 6-OHDA, salsolinol a rotenon či jiných PD toxinů (MPP^+ , paraquat), a tudíž možné využití pro *in vitro* modely. Navíc je schopna diferencovat se do funkčního neuronového fenotypu, který je dán použitým činidlem (Cheung *et al.*, 2009). Kromě vlastního dopaminergního fenotypu lze použitím kyseliny *all trans* retinové (ATRA)

indukovat diferenciaci do cholinergního a adrenergního fenotypu (Pahlman *et al.*, 1984).

Mezi buňkami SH-SY5Y můžeme zaznamenat významné rozdíly v diferenciovaném a nediferenciovaném stavu. Nápadnou vlastností nediferenciovaných buněk je rapidní proliferace, růst ve shlucích a také nepolarizovanost (na membráně není rozdíl elektrochemického potenciálu), která je dána krátkými axony (Kovalevich a Langford, 2013).

Po diferenciaci buněk je jejich proliferace výrazně snížena až do úplného zastavení a stálý počet buněk je následně udržován (Fagerstrom *et al.*, 1996). Z tohoto důvodu může mít použití diferenciovaných buněk SH-SY5Y vyšší vypovídající hodnotu pro zjišťování neuroprotektivity na modelech PD, AD, HD a dalších neurodegenerativních chorob, jelikož počet buněk se mění v závislosti na použitých látkách, nezvyšuje se tedy samovolnou proliferací. Navíc jsou diferenciované buňky citlivější k neurotoxinům a neuroprotektivním látkám (Storch *et al.*, 2000a). Z pohledu morfologie buněk dochází k typickému prodloužení axonů, jejich spojení v nejbližším okolí buňky a změny tvaru těla buněk SH-SY5Y z kulatého na spíše protáhlý až pyramidální (Shipley *et al.*, 2016).

Nespornou výhodou buněčné linie SH-SY5Y je možnost kultivace linie po dlouhou dobu bez kontaminací. Nediferenciované buňky vydrží při pravidelném pasážování o několik týdnů déle oproti diferenciovaným. Takto je možno je udržovat přibližně po patnáctou až dvacátou pasáž, počítanou od dodání, po jejímž přesažení mohou nediferenciované buňky začít ztrácet citlivost na toxin a expresi markerů dopaminergních neuronů, také mohou snadněji podléhat nespecifické diferenciaci. Proces diferenciaci je také velmi ovlivňován počtem buněk v daných experimentech, zvláště s vyšším počtem buněk se proces diferenciaci stává obtížnějším díky vzájemnému spojování se těly neuronů, tedy tvorbě shluků. Také viabilita uvnitř shluků se snižuje, a to především díky rakovinnému charakteru buněčné linie SH-SY5Y (Shipley *et al.*, 2016). Všechny tyto okolnosti znesnadňují následné analýzy, proto se všeobecně doporučuje nepřekračovat 70-80% konfluenci buněk.

Vzhledem k výše zmíněným faktům byla pro studium excitotoxicity indukované glutamátem a testování neuroprotektivní aktivity vybrána tato buněčná linie (Oyarce a Fleming, 1991).

2.5 Neuroprotektce a léčba Parkinsonovy choroby

Od 60. let 20. století, kdy se zjistilo, že dopamin přítomný ve *striatu* je zodpovědný za motorické symptomy u PD pacientů, je většina léčby směřována k substituci dopaminu (Carlsson *et al.*, 1957; Carlsson a Waldeck, 1958). Léčba je však symptomatická, řeší tedy pouze příznaky onemocnění, jakými jsou již zmíněný pomalý pohyb, ztuhlost a třes (Sarkar *et al.*, 2016).

Jednou z terapeutických strategií prevence, popřípadě léčby těchto onemocnění, je cílení na mitochondrie látkami, které by mohly předcházet případným dysfunkcím mitochondrií, nebo je alespoň minimalizovat (Lin a Beal, 2006; Martin, 2012). Mitochondrie totiž ovlivňují mnoho metabolických a apoptotických signálních drah, také tvoří energii pro buňky ve formě ATP, dochází zde k regulaci Ca^{2+} homeostázy a udržování rovnováhy mezi produkcí a detoxifikací ROS. V případě jejich selhání může dojít k indukci neurogenerativních onemocnění (Fernandez-Moriano *et al.*, 2015). Další možností neuroprotektce je cílení na NMDA receptory, Cyss/Glu antiporter, ochranu endoplasmatického retikula před stresem a využívání antioxidačních účinků látek pro ochranu buněk před oxidativním stresem.

Bezesporu nejznámějším a nejpoužívanějším léčivem je Levodopa (1-3,4-dihydroxyfenylalanin, L-DOPA). Jedná se o prekurzor dopaminu a na rozdíl od něj je L-DOPA schopna procházet přes hematoencefalickou bariéru, díky čemuž se stala standardní terapií po dobu několika dekad (Barbeau, 1969; Birkmayer a Hornykiewicz, 1961). Na druhou stranu se L-DOPA rozkládá už v trávicí soustavě, pomocí enzymu dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin (AADC) či DOPA dekarboxylasy, čemuž se zabráňuje kombinací s inhibítorem tohoto enzymu Karbidopou (N-amino- α -methyl-3-hydroxy-L-tyrosin monohydrát). Díky tomu je dopravena až do mozku, kde dochází k její biotransformaci na dopamin (Martínková, 2007).

Po intoxikaci MPTP mohou být lidé i opice léčeni, podobně jako PD pacienti, pomocí L-DOPA/karbidopa (Kostic *et al.*, 1991), avšak dlouhodobá léčba vede k nepříznivým vedlejším účinkům, jako je např. dyskineze a kognitivní dysfunkce (Langston a Ballard, 1984). Dyskineze je v podstatě nevědomý pohyb, který je odlišitelný od klasického třesu způsobeného nemocí jako takovou. Klasický třes je obvykle rytmický a zasahuje ruce, zatímco je pacient v klidu – tento třes se tedy často nazývá klidový. Dyskineze se odlišuje především svou nerytmičností a tento nevědomý pohyb se vyskytuje ve více částech těla. Vedlejší účinky, jejichž nejvýraznějším

představitelem je již zmiňovaná dyskineze, byly hlavní nevýhodou užívání Levodopy jakožto léčiva a současně jedním z hlavních důvodů vývoje nových léčiv pro pacienty v raném stádiu PD.

Jednou ze skupin léčiv jsou agonisté dopaminového receptoru D2 (např. Apomorfin, Pramipexol), jejichž nespornou výhodou je relativně nízký rozvoj dyskineze (Calne *et al.*, 1974a; Calne *et al.*, 1974b; Corrodi *et al.*, 1973) a předcházení nežádoucího buněčného poškození volnými radikály jako produktů metabolismu léčiva (typické pro metabolismus Levodopy). Avšak po delším pozorování účinků těchto léčiv se ukázalo, že způsobují jiné závažné vedlejší účinky nemotorického, tedy kognitivního charakteru, jako je L-DOPA indukovaná demence (Korczyn, 2003). Z tohoto důvodu bylo od vývoje tohoto směru léčby PD upuštěno.

Další možností ochrany dopaminu může být ireverzibilní zablokování monoaminooxidasy B (MAO-B) – enzymu rozkládající aminy. Často se tedy inhibitor z této skupiny (např. dříve Selegilin, nyní Rasagilin) kombinuje s L-DOPA, a navíc k nim může být přidán i inhibitor katechol-*O*-methyltransferasy (COMT, například Entacapon), bránící biodegradaci Levodopy *O*-methylací.

Jakožto další varianty léčby se jevíly transplantace dopaminergních neuronů (Brundin *et al.*, 2010) nebo práce s kmenovými buňkami, avšak tyto metody byly kvůli malé efektivitě, bezpečnosti a značné náročnosti regulací zavrhnuty (Li *et al.*, 2008). Neurodegenerativní procesy totiž dále ovlivňovaly i transplantované buňky, jak se zjistilo nálezem patologického ukládání proteinu α -synukleinu u pacientů 10–15 let po provedení transplantace (Li *et al.*, 2008; Kordower *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010).

Snaha ve vývoji nových farmakoterapeutik je zaměřena jak na redukci parkinsonských motorických znaků, tak na nemotorické symptomy a měly by vykazovat také neuroprotektivní účinky (Schapira, 2009a; Schapira, 2009b; Siderowf a Stern, 2006). Za takové jsou považovány ty, které chrání dopaminergní neurony ve středním mozku před patologickými procesy spojené s etiologií PD, jakými jsou inhibitory NMDA a non-NMDA modulované excitotoxicity, mitochondriální stimulatory, činidla snižující nadprodukcii reaktivních forem kyslíku (ROS), inhibitory buněčné smrti a další.

2.6 Vybrané skupiny látek vykazující neuroprotektivní účinky

Jelikož neurodegenerativní choroby nemají pouze jediný farmakologický cíl, nemohou být léčiva ovlivňující pouze jedinou dráhu efektivní. Na rozdíl od takových látek,

přírodní látky mohou pracovat na polyfarmakologickém principu, a tím mít větší šanci uspět v léčbě neurodegenerativních onemocnění (Habtemariam, 2017).

2.6.1 Brassinosteroidy

Jednou ze skupin látek s potenciálními neuroprotektivními efekty jsou brassinosteroidy. Jedná se o skupinu rostlinných hormonů, které jsou podobné živočišným steroidům (Obr. 3). Nacházejí se nejvíce v dělivých pletivech, reprodukčních orgánech a pylu, především u čeledi brukvovitých. V rostlinách nemají pouze jednu funkci, ale ovlivňují například procesy růstu, hospodaření rostliny s vodou, indukují kvetení, zrání plodů a klíčení semen (Müssig a Altmann, 1999). Dále se podílejí na aktivaci syntesy proteinů a nukleových kyselin a antioxidační enzymatické kaskády. Zajímavé na této skupině látek je také schopnost zvyšování rezistence k nepříznivým environmentálním faktorům, stresu a chorobám (Altmann, 1998), zejména v období pro rostlinu neoptimálních environmentálních podmínek (teplota, množství srážek), díky čemuž jsou tyto látky využívány v zemědělství. Nezvyšují pouze výnosy, ale i kvalitu plodin, například snižují poměr nasycených mastných kyselin vzhledem k nenasyceným, působením na receptory na povrchu rostlinných buněk, čímž jsou tyto signální molekuly schopny zesilovat či zeslabovat funkce genů (Prusakova a Chizhova, 1996).

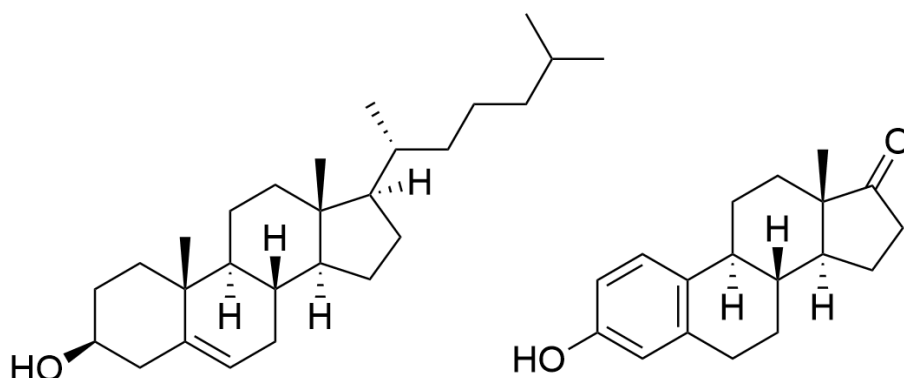
Obecně jsou steroidy u savců zachycovány jaderným receptorem, oproti tomu u rostlinných buněk dochází k zachycení signálů již na povrchu buňky, a to díky transmembránovému receptorovému komplexu sestávajícího z receptoru Brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1) a jeho koreceptoru s BRI1 asociovanou kinasou (BAK1) (Jaillais a Vert, 2016; She *et al.*, 2011). Brassinosteroid je rozpoznán extracelulární doménou BR1 bohatou na aminokyselinu leucin, a následně tak reguluje genovou expresi indukcí fosforylační kaskády (She *et al.*, 2011). Nepolární konec brassinosteroidu je tedy navázán do vysoce nepolárního prostoru receptoru a hydroxylové skupiny interagují s BAK1 nebo s rozpouštědlem (Hothorn *et al.*, 2011).

Prvním izolovaným brassinosteroidem byl brassinolid (Obr. 4) [(22R,-23R, 24S)-2 α ,3 α ,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-7 α -homo-7-oxa-5 α -cholestan-6-on], který byl získán v roce 1979 z pylu řepky (*Brassica napus* L.), podle níž dostala tato skupina rostlinných hormonů název (Grove, 1979). V dnešní době je známo okolo 70 přírodních látek ze skupiny brassinosteroidů, avšak je poměrně náročné tyto látky získat a následně stanovit kvůli jejich vysoké hydrofobicitě

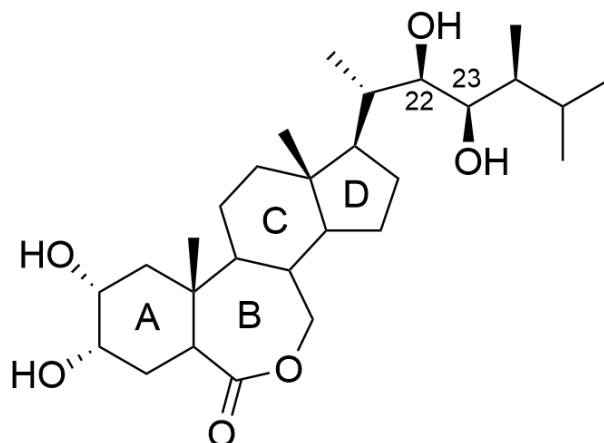
a nízkému obsahu ve vzorku pohybujícího se v řádech pg.g^{-1} čerstvé hmoty (Bajguz a Tretyn, 2003).

Nevýhodou přirozeně se vyskytujících neurosteroidů jsou především jejich krátký eliminační poločas a nedostatečná specifita i selektivita. Cílem navržení a syntesy nové generace neuroprotektivních steroidů je především vylepšení vlastností jako jsou prodloužení biologického poločasu a specifity spolu se selektivitou k neurotransportním receptorům (Dubrovsky, 2006).

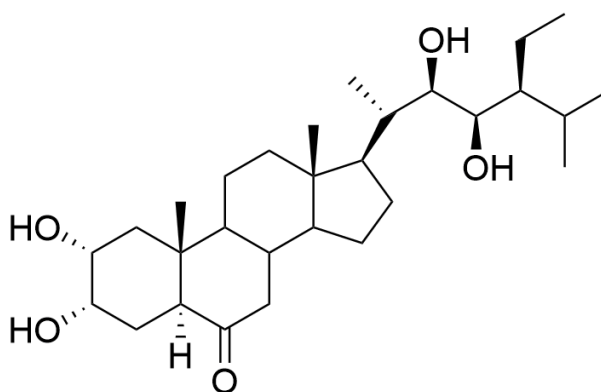
Potenciální vliv brassinosteroidů na neurodegenerativní poškození byl zkoumán a popsán například ve studii Carange *et al.* (2011), kde byly analyzovány antioxidační účinky 2 přírodních brassinosteroidů a 5 syntetických analogů. Po indukci oxidativního stresu a degeneraci dopaminergních neuronů pomocí toxinu MPP^+ v buňkách linie PC12 byla zaznamenána snížená úmrtnost po aplikaci brassinosteroidů (24-epibrassinolid) i jeho syntetických derivátů. Mechanismus působení těchto látek tkvěl ve snížení intracelulárního oxidativního stresu a modulaci aktivity enzymů superoxiddismutasy (SOD), katalasy (KAT) a glutathionperoxidasy (GPx) (Carange *et al.*, 2011). Provedením SAR studií (vztah mezi strukturou a aktivitou) byla zjištěna souvislost mezi neuroprotektivní aktivitou a přítomností ketoskupiny na B kruhu a nenasycenou vazbou na C–C lokantech 22 a 23- na steroidním jádru. Přítomnost laktonu na B kruhu, na rozdíl od ketoskupin (Obr. 5), však neposkytovala žádné neuroprotektivní účinky (Obr. 4) (Ismaili *et al.*, 2012). Naopak byl vyloučen stereochemický vliv pozice 22 a 23 na neuroprotektivní efekt, stejně jako nehraje roli orientace hydroxylových skupin na kruhu A (Ismaili *et al.*, 2012).



Obr. 3 Příklady živočišných steroidů, zleva: cholesterol, estrogen



Obr. 4 Struktura brassinolidu



Obr. 5 22R,23R-Homocastasteron

Díky strukturní podobnosti brassinosteroidů s živočišnými steroidy lze usuzovat o podobných vlastnostech. Neuroprotektivní steroidy chrání neurony různými mechanismy, mezi které patří například regulace transkripce, signalizace v mitochondriích, regulace kinas a fosfatů v plazmatické membráně a indukce antioxidantních efektů, což potenciálně vede ke snížení apoptózy, excitotoxicity a oxidativního stresu. Mohou také snižovat uvolňování prozánětlivých cytokinů jako jsou $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ a IL-6 (Giatti *et al.*, 2012). Jak přírodní, tak syntetické neuroprotektivní steroidy skýtají potenciál pro léčbu neuropatologických onemocnění způsobených např. oxidativním stresem (Bansal a Singh, 2018).

2.6.2 Polyfenoly

Polyfenoly jsou velmi různorodou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů, z nichž jednu z nejčastějších skupin tvoří struktura C6–C1 derivátů kyseliny

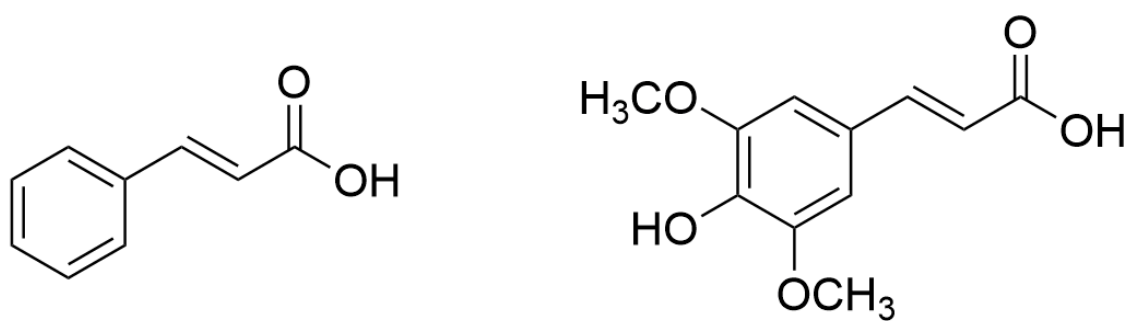
hydroxybenzoové pocházející z biosyntetické dráhy kyseliny šikimové. Fenolické kyseliny, jako například ferulová, rozmarýnová, sinapová a skořicová (Obr. 6), vykazují neuroprotektivní aktivitu (Szwajgier *et al.*, 2018; Chen, 2016).

Další skupinou je struktura C6–C3–C6 tvořená šestičlennými A- a B-kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem, který může utvořit C-kruh (Elufioye *et al.*, 2017). Mezi skupinu polyfenolů jsou kromě fenolických kyselin řazeny i flavonoidy, které je možno dále dělit na flavonoly, flavony, flavonony, isoflavony a anthokyany.

Obecně jsou polyfenoly schopny zaměřit se na více farmakologických cílů, tedy inhibovat tvorbu agregátů α -synukleinu, redukovat dysfunkce mitochondrií vzniklé zánětlivými procesy, odstraňovat ROS přímo, působit antioxidantně a nebo chelatačně (Habtemariam, 2017). Ovlivňují také geny buněčného cyklu a signální dráhy. Všechny tyto mechanismy byly ověřeny na *in vitro* modelech. Například ve studii Luo *et al.* (2002) byla prokázána inhibice aktivace kaspasy-3 a tvorby amyloidů- β , jež jsou typické pro Alzheimerovu chorobu (indukovaná genovou mutací), po aplikaci extraktů z *Ginkgo biloby* (Luo *et al.*, 2002). Nicméně nelze poznatky přenést beze změny do *in vivo* podmínek, neboť velmi záleží na schopnosti polyfenolů a jejich metabolitů překonat hematoencefalickou bariéru.

Dále jsou polyfenoly schopny aktivovat heterodimery faktorů 2 související s NF-E2 (z angl. *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), tedy Nrf2 dráhu. Aktivace genů zapojených do Nrf2 dráhy, která je klíčová pro regulaci exprese antioxidantních genů, má u neuronů a astrocytů neuroprotektivní účinky – působí proti zánětu, oxidativnímu poškození a buněčné smrti obecně (Scapagnini *et al.*, 2011). Za nestresových podmínek se Nrf2 transkripční faktor váže na protein Keap1 (z angl. *Kelch-like erythroid cell-derived protein 1*) a je degradován interakcí s ubikvitin ligasou v proteasomu (Z. Sun *et al.*, 2007). Při stresových podmínkách dochází ke konformačním změnám residuí cysteinu vlivem oxidace, v důsledku čehož není schopen Keap1 vázat Nrf2 (Yamamoto *et al.*, 2008). Transkripční faktor Nrf2 se tedy uvolní z komplexu Nrf2/Keap1, v jádru interaguje s proteiny antioxidantní odpovědi ARE (z angl. *Antioxidant response element*) a tato aktivace vede například ke snížení oxidativního stresu vlivem transkripce genů účastnících se detoxifikačních a antioxidantních procesů (Scapagnini *et al.*, 2011).

Ve studii Scapagnini *et al.* (2011), která se zabývala polyfenolickými látkami – kurkumin a od něj odvozená strukturní analoga, byla dokázána indukce Nrf2 dráhy (Scapagnini *et al.*, 2011).



Obr. 6 Příklady struktur polyfenolů, zleva: kyselina skořicová, kyselina sinapová

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie a biologický materiál

Fetalní bovinní serum (Sigma Aldrich), enzym Trypsin (Sigma Aldrich), Dulbecco's modified Eagle's Medium and Ham's F12 Nutrient Mixture (DMEM:F-12, 1:1) (Sigma Aldrich), penicilin-streptomycin (10 000 jednotek penicilin, 10 mg streptomycin v 1 l) (Sigma Aldrich), Trypsin-EDTA roztok – 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA 4Na/L Hankův balancovaný solný roztok s fenolovou červení (Sigma Aldrich), L-glutamát (Sigma Aldrich), kyselina All-*trans* retinová (Sigma Aldrich), buněčná linie SH-SY5Y (ATCC), Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher TM), dihydroethidium DHE (Sigma Aldrich), propidium jodid PI (Sigma Aldrich), Calcein AM (Thermo Fisher), standardy léčiv a neuroprotektiv (struktury viz Příloha 4) (donepezil, ginsenosid Rb1, deferoxamin a tenuigenin – Sigma Aldrich), MK 801 (Sigma Aldrich)

3.1.2 Testované látky

Brassinosteroidy a jejich deriváty: 22*S*,23*S*-Homocastasteron, 22*R*,23*R*-Homocastasteron, 24-Epicastasteron, MK 259, Trisepicastasteron, MK 238, MK 238-7 – byly nasyntetizovány RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D. (struktury viz Příloha 1)

Brassinolidy a deriváty: 24-Epibrassinolid, MK 266 – byly nasyntetizovány RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D. (struktury viz Příloha 2)

cholestanolové deriváty: 4368, Cholestanol, 2822, CH-7 – byly nasyntetizovány RNDr. Miroslavem Kvasnicou, Ph.D. (struktury viz Příloha 3)

polyfenoly: Pol1, Pol2, Pol3 – vzorky poskytnuté Mgr. Jiřím Grúzem, Ph.D.

3.1.3 Roztoky

1x PBS (1 l): 2,31 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O + 0,2 g KH₂PO₄ + 8 g NaCl + 0,2 g KCl + voda; (úprava pH na hodnotu 7,4; doplněn do 1 l, rozpuštěn a autoklávován)

Zásobní roztoky testovaných látek: všechny látky byly naváženy a rozmíchány v DMSO tak, aby měl výsledný roztok koncentraci 10 mmol.l⁻¹

Zásobní roztok ATRA: pevná *all trans* kyselina retinová byla navážena a výsledný roztok v DMSO byl připraven o koncentraci 10 mmol.l⁻¹

Zásobní roztok DHE: pevné dihydroethidium bylo naváženo a výsledný roztok v DMSO byl připraven o koncentraci 10 mmol.l⁻¹

Zásobní roztok PI: pevný propidium jodid byl navážen a výsledný roztok v DMSO byl připraven o koncentraci $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

Zásobní roztok LDH: postup podle výrobce (Thermo Fisher™)

3.1.4 Přístrojové vybavení

CO₂ inkubátor MCO-18AIC (SANYO), mikroskop CKX41 (Olympus), fluorescenční mikroskop (Leica), objektiv N PLAN 2,5x/0,07 (Leica), zdroj světla Kubler Codix (Leica), kamera DP73 (Olympus), centrifuga BR4 (Jouan), lázeň Heat master (Heat), vortex Minishaker MS2 (IKA), centrifuga 5702 (Eppendorf), laminární flowbox s vertikálním prouděním vzduchu (MSC ADvantage), spektrofotometr infinite M200 Pro (Tecan), vývěva (VWR), pipetor (Swiftpipet Pro), pipety (Finpipette, Eppendorf), Bürkerova počítací komůrka

3.1.5 Plasty

kultivační misky (TPP); kultivační lahev (TPP) – 75 cm²; 96jamkové mikrotitrační desky (TPP, Eppendorf); konické centrifugační zkumavky – 15 a 50 ml (Eppendorf); mikrozkušavky – 0,6 ml a 1,5 ml (Eppendorf)

3.1.6 Software

Molecular Operating Environmet 2010.12 (Chemical computing group, Montreal, Canada); GraphPad Prism 6.01 (2012) (GraphPad Software, La Jolla California USA)

3.2 Kultivace

Buňky linie SH-SY5Y byly kultivovány na Petriho miskách (50 cm²) v kultivačním médiu DMEM/F12 s 10% obsahem fetálního bovinního séra a 1% přídavkem antibiotika penicilinu a streptomycinu. Teplota v inkubátoru dosahovala hodnoty přibližně 37 °C, podíl CO₂ činil 5–5,5 %. Při hodnotách konfluency 70–90 % plochy misky byly buňky promyty 1x PBS a pasážovány pomocí trypsinu.

3.3 Příprava buněk na experiment

Nejprve bylo odsáto medium, jeho zbytky odmyty pomocí 1 ml 1x PBS a poté byl přidán 1 ml roztoku trypsinu do Petriho misky s buňkami. Po 5 minutové inkubaci trypsinu s buňkami (při laboratorní teplotě) došlo k narušení jejich adherence a k buňkám přidány 4 ml živného media DMEM/F12, s 10% obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a 1% přídavkem antibiotika penicilinu a streptomycinu (PS). Buněčná suspenze byla následně napipetována do zkumavky (13 ml) a centrifugována při 140 g po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Poté bylo medium odsáto, pelet

rozsuspendován v 10 ml DMEM media a odebráno 10 μ l suspenze do Bürkerovy počítací komůrky. Nakonec byla suspenze naředěna na požadovaný počet buněk na 100 μ l media, přičemž tento počet se měnil v závislosti na prováděném experimentu, a takto přenesena do mikrotitračních desek. Pro primární screening, focení diferenciaci, kalibraci koncentrace glutamátu a testy cytotoxicity byly prováděny násady 7000 buněk na 100 μ l v jamce, pro metody vyžadující větší počet buněk či náročnější operace s nimi (PI, DHE, LDH) 20000 buněk na 100 μ l v jamce.

3.4 Diferenciace

Po 24 hodinách od násady buněk byla aplikována kyselina *all-trans* retinová (ATRA) v mediu (1% FBS, DMEM/F12) ve výsledné koncentraci 10 μ mol.l⁻¹ ve výsledném objemu 200 μ l na jamku. Buňky byly ponechány procesu diferenciaci po dobu 48 hodin.

Pro morfologické srovnání diferenciovaných a nediferenciovaných buněk a dále pro potvrzení růstu ve shlucích u nediferenciovaných buněk byly pořízeny mikroskopické snímky – před diferenciací a po uplynutí 48 hodin inkubace s diferenciačním činidlem. Viabilita u nediferenciovaných buněk byla aproximována jako maximální rychlost proliferace, a tudíž měření snížení viability vlivem procesu diferenciaci viabilitním testem Calcein AM porovnávala rozdíly v proliferaci buněk diferenciovaných s nediferenciovanými buňkami. Viabilita byla měřena na části mikrotitrační desky před aplikací diferenciačního činidla pomocí Calcein AM. Následně, po uplynutí 48 hodin od aplikace diferenciačního činidla, byl postup zopakován a viabilita hodnocena na druhé části desky. V souladu s literaturou, kde se uvádí čas pro diferenciaci v rozmezí 48 hodin až 18 dní, byla zvolena spodní hranice intervalu, a to z důvodu vyšší propustnosti testu (Shiple *et al.*, 2016).

3.5 Glutamátový model – primární screening a kalibrace toxinu

Pro zajištění navození excitotoxických procesů v buňkách, převážně přes Xc⁻ antiporterový systém (Bridges *et al.*, 2012), byl přidán L-glu v koncentraci 160 mmol.l⁻¹ v mediu (1% FBS, DMEM/F12), v němž byly látky ze skupiny brassinosteroidů, brassinolidů a polyfenolů vyředovány do výsledných koncentrací 0,1 μ mol.l⁻¹, 1 μ mol.l⁻¹ a 10 μ mol.l⁻¹ ze zásobních roztoků 10 mmol.l⁻¹. Tyto roztoky byly aplikovány na buňky po uplynutí 48 hodin od diferenciaci tak, že médium s ATRA bylo jehlou odsáto a testované látky přidány v požadovaných koncentracích v mediu (1% FBS,

DMEM/F12) s L-glu o objemu 100 μ l na jamku. Optimální hodnota koncentrace L-glu v roztoku media (1% FBS, DMEM/F12) v závislosti na projektivní odpověď byla experimentálně zjišťována pomocí kalibrační řady (40, 80, 160 a 320 mmol.l^{-1}). Roztoky L-glu v mediu byly aplikovány na buňky v triplikátech a následně vyhodnocovány pomocí testu viability (Calcein AM) a cytotoxicity (propidium jodid a laktátdehydrogenasový test). Hodnoty signálů byly vždy srovnány jako % signálu, které poskytla kontrola DMSO < 0,1 % (bez přídavku toxinu).

3.6 Cytotoxicita

Pro zjištění toxického efektu samotných zkoumaných látek byly podrobeny testům zjišťujících cytotoxicitu. Po 48 hodinách od provedení diferenciacce bylo medium s ATRA od buněk odsáto a vyměněno za 1 % médium (viz výše) s aplikovanými látky v koncentracích 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ze zásobních roztoků 10 mmol.l^{-1} . Tyto roztoky byly na buňky aplikovány v triplikátech a po 24 hodinách byla vyhodnocována viabilita buněk oproti kontrole DMSO < 0,1 % pomocí Calcein AM testu.

3.7 Calcein AM

Jedná se o metodu využívající fluorescenci na poskytnutí signálu živou buňkou a možnost detekovat tak její aktivitu. V principu jde o přeměnu nefluorescenčního barviva na fluorescenční barvivo s vlnovou délkou exc. 488/em. 517 nm pomocí intracelulárních esteraz. Míra fluorescence tedy koreluje s počtem živých buněk, případně mírou stimulace buněčného metabolismu, proto byla v experimentech použita na měření možné cytotoxicity zkoumaných látek a viability buněk pro provedení základního screeningu látek. V experimentech primárního screeningu a hodnocení viability byl Calcein AM (koncentrace zásobního roztoku 1 mg.ml^{-1} Invitrogen™, ThermoFisher) v PBS (ředění 1000 x) aplikován na buňky po předchozí uplynulé 24hodinové inkubaci se zkoumanými látkami ze skupin brassinosteroidů a polyfenolů v mediu (1% FBS, DMEM/F12), resp. s látkami a přidaným L-glu jakožto toxinem v koncentraci 160 mmol.l^{-1} v mediu (1% FBS, DMEM/F12). 1000x ředěný roztok Calcein AM v PBS byl přidáván v objemu 100 μ l na jamku a po inkubaci 60 min byl signál měřen na spektrofotometru. Od každé hodnoty signálu byla následně odčítána průměrná hodnota signálu pozadí a výsledky zpracovávány do tvaru procent hodnot kontroly s tím, že kontrolní skupina (neintoxikovaná) nabývala hodnoty 100 %.

3.8 Dihydroethidium

Dihydroethidium je fluorescenční sonda, která je oxidována superoxidovým radiálem (marker oxidativního stresu (OS)) za tvorby ethidia, jenž je fluorescenčně kvantifikováno při vlnové délce exc. 500/em. 580 nm. Tímto mechanismem je měřen oxidativní stres přímo v živých buňkách.

Po intoxikaci buněk roztokem L-glu o koncentraci 160 mmol.l^{-1} spolu s testovanými látkami a uplynutí 4 hodin potřebných pro dostatečnou indukci oxidativního stresu bez výrazného poškození buněk, byly, pro zamezení ztráty buněk, mikrotitrační desky centrifugovány po dobu 5,5 min při 142 g. Následně bylo medium vyměněno za roztok DHE v PBS (ředění 1000x), v objemu 100 μl na jamku. Po inkubaci 15 a 30 minut byl spektrofotometricky měřen signál, a tedy zjišťována míra snížení oxidativního stresu u buněk s testovanými látkami oproti kontrolním skupinám (DMSO < 0,1 %). Pro interpretaci výsledků byl zvolen čas 30 minut, neboť tato doba inkubace poskytla optimální rozdíl v signálech DMSO kontroly a kontroly glutamátu při koncentraci 160 mmol.l^{-1} . Doba indukce 4 hodiny byla experimentálně testována a z časů 1, 2, 3, 4 a 6 hodin byla vybrána jako nejvhodnější.

3.9 Propidium jodid

Propidium jodid (PI) je interkalační kladně nabitá fluorescenční sonda, která hodnotí viabilitu/cytotoxicitu. PI se stálým kladným nábojem není schopen projít přes membránu vitálních buněk, dále díky interkalaci sondy do fragmentované DNA lze fluorescenčně značit výrazně poškozené buňky (začínající, probíhající či pozdní fáze buněčné smrti).

Po 24hodinové inkubaci buněk s L-glu, respektive s L-glu a zkoumanou látkou v příslušné koncentraci, byly mikrotitrační desky, s násadou 20 000 buněk na jamku, centrifugovány po dobu 5,5 min při 142 g a poté aplikováno 100 μl roztoku PI v PBS (ředění 1000x ze základního roztoku o koncentraci 1 mg.ml^{-1}). Výsledná fluorescence byla měřena po 15 a 30 minutách inkubace při vlnové délce ex. 535 nm/em. 617 nm. Data byla sbírána v čase 15 minut, neboť signál vykazoval optimální rozdíly DMSO kontroly a kontroly glutamát 160 mmol.l^{-1} . Signál byl hodnocen jako procento signálu DMSO kontroly.

3.10 Laktátdehydrogenasa

Kolorimetrická metoda poskytuje kvantifikaci buněčné cytotoxicity ze supernatantu. Enzym laktátdehydrogenasa (LDH), obsažený v cytosolu buněk, je po narušení plazmatické membrány vypuštěn do kultivačního media, kde může být kvantifikován spřaženými enzymatickými reakcemi, ve kterých LDH katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát za současné redukce NAD^+ . NADH následně redukuje tetrazoliovou sůl na červený formazan, který přímo odpovídá množství uvolněného LDH do media. Kvantifikace probíhá měřením absorbance při 490 nm s referenční vlnovou délkou 680 nm (pozadí) na mikrodestičkovém readeru.

Po 24 hodinách od aplikace toxinu a toxinu s látkami na buňky bylo odebráno 50 μl supernatantu z každé jamky, přidáno 50 μl LDH roztoku do každé jamky mikrotitrační desky (připravený podle návodu firmy Thermo ScientificTM) a po 30minutové inkubaci přidán roztok na zastavení reakce (rovněž dodán firmou Thermo ScientificTM). Nakonec byla míra poklesu toxicity spektrofotometricky měřena na mikrodestičkovém readeru za výše uvedeného nastavení a signál porovnáván s DMSO kontrolou.

3.11 Porovnání MK 238 s deferoxaminem

Jelikož se syntetický derivát odvozený od brassinosteroidů MK 238 ve všech provedených testech jevil jako nejlepší látka (v koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), bylo provedeno srovnání jeho účinků v kalibrační řadě glutamátu (40, 80, 160 a 320 mmol.l^{-1}) oproti DFO (v koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) pomocí LDH a PI testů. Experimenty byly provedeny metodicky stejně jako předchozí kalibrace toxinu.

3.12 Zpracování dat a statistická analýza

Všechny výsledky byly vyhodnocovány jako průměr \pm SEM (standardní chyba měření), experimenty provedeny minimálně ve 3 opakováních ve 3 různých dnech, u kalibrační testů pouze ve 2 opakováních se ziskem 6 hodnot. Statistické porovnání mezi datovými skupinami bylo provedeno jedнокrokovou ANOVA metodou s post hoc Dunnetovým testem v programu GraphPad 6.01. Rozdíly mezi skupinami byly považovány za statisticky signifikantní pro hodnotu $P < 0,05$. Anova a post hoc Dunnetův test nebyly aplikovány na data z kalibračních testů kvůli nedostatku hodnot.

3.13 Flexibilní zarovnání (*in silico*)

Metodu flexibilního zarovnání molekul lze využít k vyhotovení modelu potenciálního vazebného místa a následnému návrhu nové generace sloučenin. V našem případě byly

pro účely vykreslení aktivního centra, tedy potenciálního aktivního místa molekulárního cíle, vybrány 2 látky s experimentálně zjištěnou nejvyšší aktivitou (MK 238 a MK 238-7), u kterých však nebyla známa přesná struktura jejich molekulárního cíle. Flexibilní zarovnání bylo v tomto případě vybráno také z důvodu, že aktivní a navrhované látky si byly tvarem, orientací donoru a akceptoru vodíků na A-kruhu a celkovým skeletem A,B,C,D-kruhů velmi podobné.

V programu Molecular Operating Environment 2010.12 byly nakresleny struktury 9 nových derivátů odvozených od MK 238 a následně byla u těchto molekul minimalizována energie (gradient: 0,0001). U takto upravených struktur bylo provedeno flexibilní zarovnání za základního nastavení se změnou podmínek - iteration limit: 20, energy cut-off: 5 kcal.mol⁻¹ (viz webové zdroje, Chemical Computing Group ULC (2009)). Díky flexibilnímu zarovnání byly získány hodnoty, na jejichž základě byly kandidátní molekuly seřazeny a vybrány ty, které mohou mít potenciálně vyšší aktivitu než referenční MK 238, od kterých jsou odvozené (skóre podobnosti F, deformační energie ligandů U, součet těchto skóre S). Zarovnání probíhá na základě maximalizace sterického (prostorového) a funkčního překryvu, zároveň s minimalizací vnitřního pnutí ligandů.

Po odstranění nepolárních vodíků byl vytvořen molekulární povrch u zarovnání derivátů nové generace s MK 238 s nejlepšími parametry. Bylo zvoleno van der Waalovo pole ve vzdálenosti 4,5 Å od ligandů, pro vykreslení oblastí se zvýšenou pravděpodobností výskytu vodíkových vazeb (červená), hydrofobních oblastí (zelená) a také polárních skupin (modrá) v okolí ligandů. Dále byl použit elektrostatický povrch (vzdálenost od zarovnání molekul = 4,5 Å), který zobrazuje rozmístění donorů (modrá síť) a akceptorů (červená síť) vodíkových vazeb a také hydrofobních míst (bílá síť) na straně aktivního místa potenciálního molekulárního cíle molekul. Tato místa vykazují z energetického hlediska nejvyšší pravděpodobnost výskytu těchto interakčních center.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Cytotoxicita zkoumaných látek

Vyhodnocením hodnot signalů získaných z Calcein AM testů cytotoxicity bylo zjištěno, že téměř žádná z látek podrobených experimentu v žádné z 3 testovaných koncentrací nevykazovala výrazný toxický efekt na diferenciované buňky linie SH-SY5Y (Tabulka 1). Výjimku představovala pouze látka CH-7, v jejíž nejvyšší použité koncentraci ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) můžeme mluvit o cytotoxickém efektu.

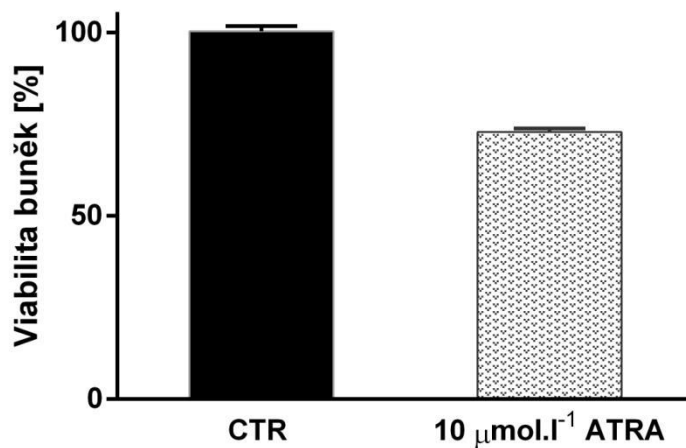
Tabulka 1 Hodnocení cytotoxicity zkoumaných látek v příslušných koncentracích, hodnoty vyjádřeny v procentech jako průměry procent viability DMSO kontroly \pm SEM

Kontrola (DMSO)	Průměr [%]	100,9	\pm SEM	1,201		
Látka	0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	\pm SEM	1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	\pm SEM	10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$	\pm SEM
22R,23R-Homocastasteron	98,52	6,208	105,6	4,499	113,4	4,19
24-Epicastasteron	104,4	1,53	104,7	3,43	124,2	7,014
MK-259	101,3	1,962	106,1	3,962	121	7,729
22S,23S -Homocastasteron	98,63	3,617	102,8	6,691	126,4	10,1
MK 266	95,84	4,19	101,2	6,498	107,4	7,232
Trisepicastasteron	101,3	4,301	102,9	8,04	109,2	6,806
24-Epibrassinolid	97,21	3,608	97,8	3,964	119,2	6,148
MK 238	97,35	4,742	104	4,189	131,9	10,67
MK 238-7	87,1	4,666	88,91	5,184	99,65	4,093
4368	89,67	4,431	90,82	4,121	93,65	4,213
2822	99	3,55	98,7	4,886	98,52	4,172
CH-7	91,33	6,152	100,4	4,419	53,77	8,58
Cholestanol	95,88	4,849	97,24	3,075	96,58	5,131
Pol 1	85,35	4,558	91,31	7,816	93,94	3,772
Pol 2	92,63	4,309	102,4	5,167	96,62	4,36
Pol 3	86,3	1,996	90,2	3,352	89,04	1,992
Tenuigenin	108,4	6,377	109,6	6,974	100,9	5,438
Ginsenosid Rb1	93,62	5,078	98,86	4,464	101,8	4,584
Donepezil	99,95	3,057	99,67	3,73	111,5	4,925
Deferoxamin	84,6	3,102	92,7	3,087	107,3	4,472

4.2 Diferenciace buněk

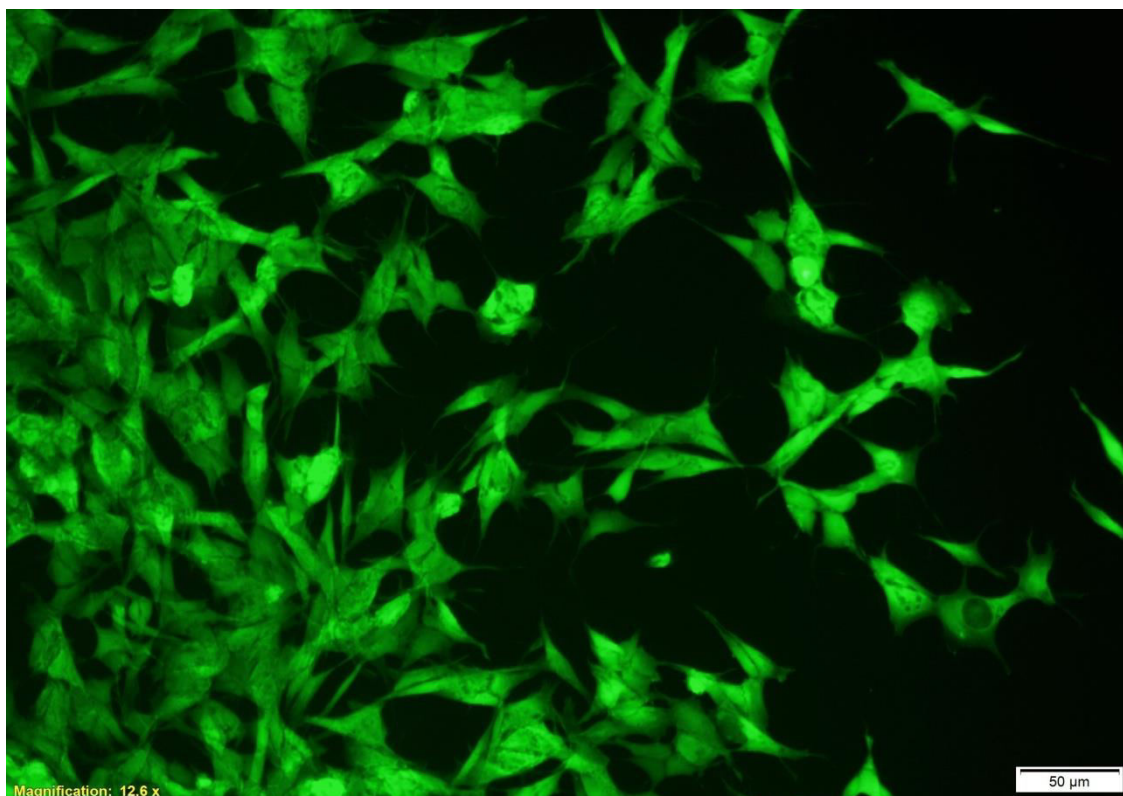
Pro získání neuronálního fenotypu z nediferenciováných neuroblastomárních buněk SH-SY5Y byla aplikována ATRA ve výsledné koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Během tohoto procesu a relativně krátkého času došlo nejen k poklesu proliferace přibližně o 20 % (Obr. 7), ale také došlo ke změně morfologie buněk, která je rovněž popisována například ve studii Forster *et al.* (2016), ve kterém je zmíněna i tvorba shluků u nediferenciováných buněk, která byla nápadná i v mém experimentu (Obr. 8) (Forster *et al.*, 2016). Kromě změny tvaru těl SH-SY5Y buněk ze zaobleného (Obr. 8) na pyramidální (Obr. 10) došlo navíc také k nápadnému zvýšení prodloužení neuritů

(Obr. 10). Na Obr. 8 a 9 je srovnání nediferenciovaných buněk druhý den od násady na mikrotitrační desku a po 48 hodinách od předešlého vyfocení, přičemž nedošlo k žádné výrazné změně.

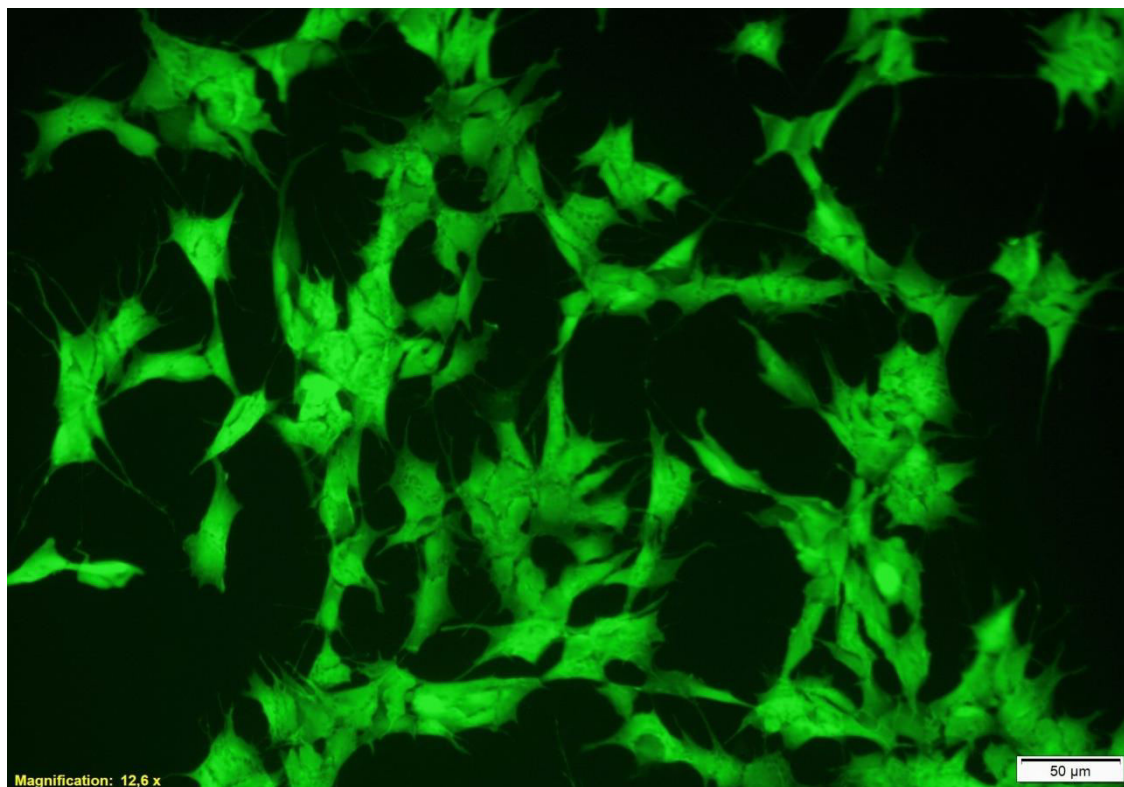


Experimentální skupina

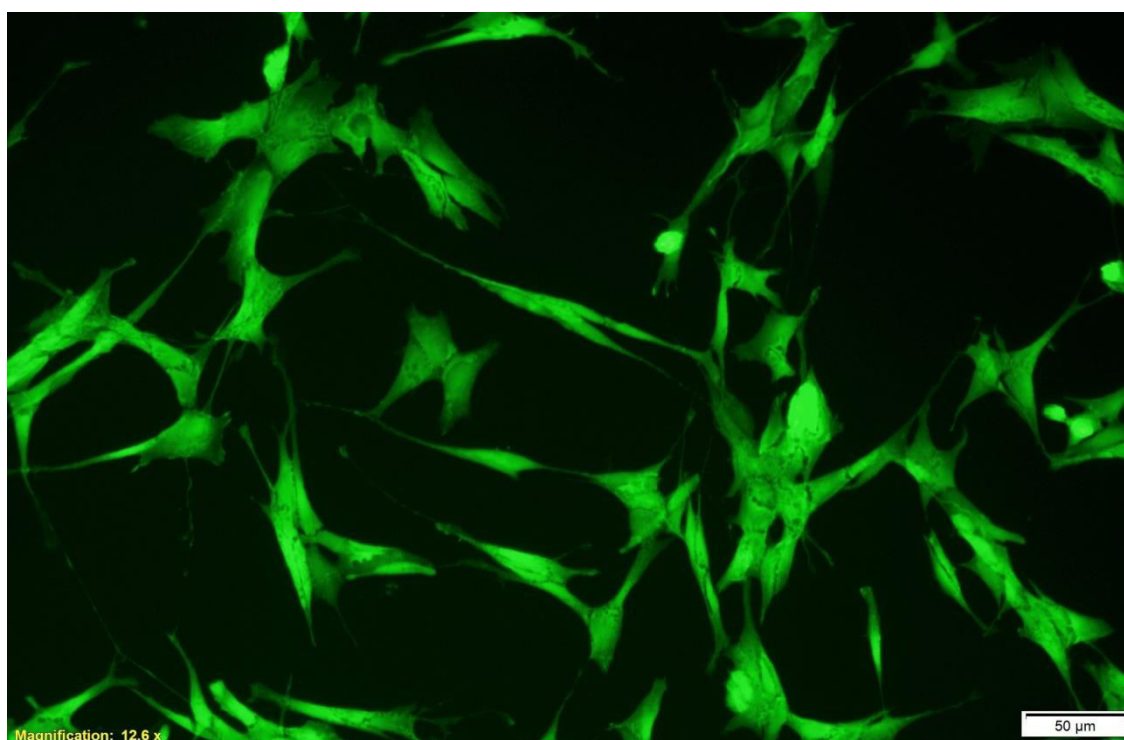
Obr. 7 Proliferace buněk SH-SY5Y po 48 hodinách od diferenciacie pomocí 10 μmol.l⁻¹ ATRA vyjádřená v procentech nediferenciované DMSO kontroly



Obr. 8 Nediferenciované buňky linie SH-SY5Y, nápadné shluky a krátké axony



Obr. 9 Nediferenciované buňky linie SH-SY5Y po 48 hodinách, nápadné shluky a krátké axony



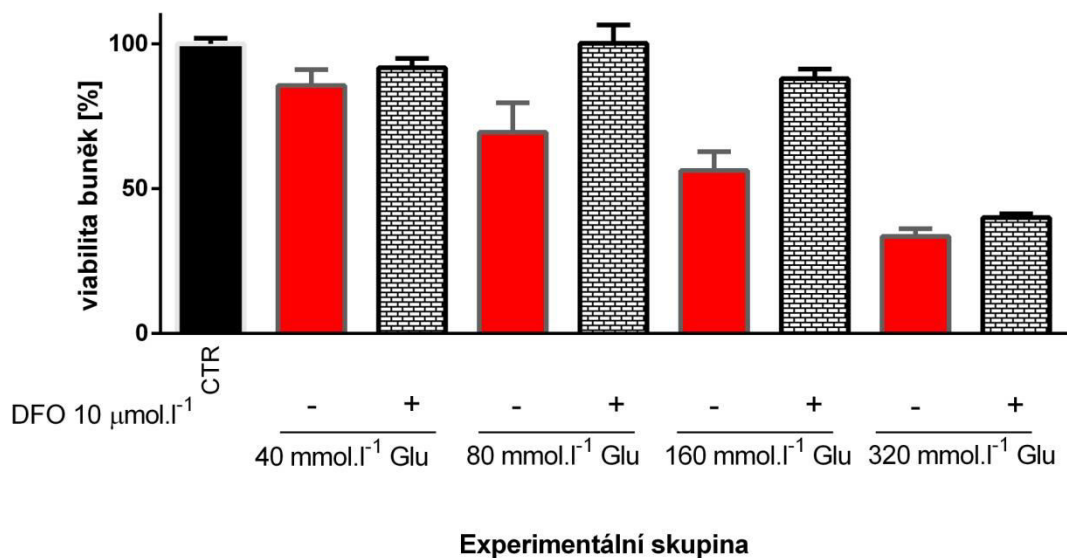
Obr. 10 Buňky linie SH-SY5Y po 48 hodinách od diferenciace pomocí 10 μmol.l⁻¹ ATRA, buňky již nejsou ve shlucích a došlo k nápadnému prodloužení axonů

4.3 Kalibrační testy – glutamátový model

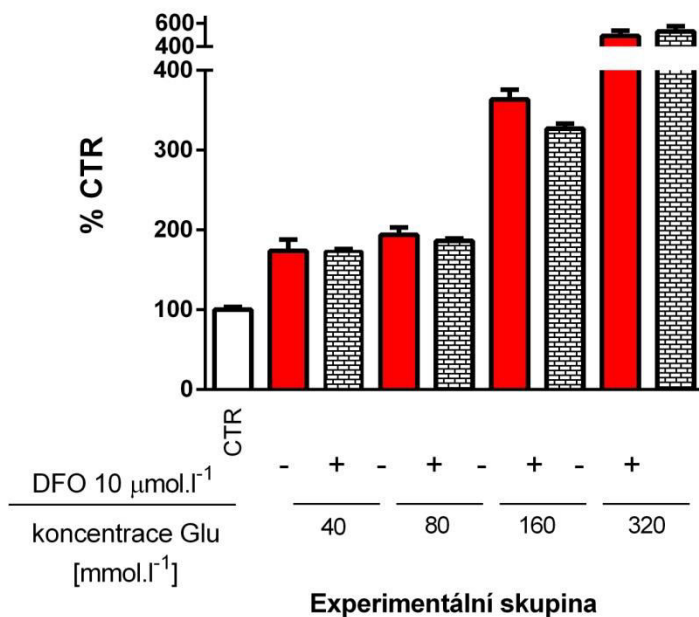
Kalibrace byla provedena za použití roztoků L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l⁻¹ pro zjištění optimální koncentrace L-glu pro veškerá testování látek, tedy k zajištění dostatečně toxického efektu, ale zároveň dostatečného počtu živých buněk, které by poskytovaly signál pro měření. Nejlepší výsledky (Obr. 11), tedy viabilitu v rozmezí 50 a 70 % a zároveň největší rozdíl mezi kontrolní a intoxikovanou skupinou, poskytovala koncentrace 160 mmol.l⁻¹, a proto byla zvolena a používána v dalších experimentech. Ve srovnání s literaturou, která uvádí používaný rozptyl 8–80 mmol.l⁻¹ (Z. W. Sun *et al.*, 2010), je to hodnota dvojnásobně vyšší, nicméně v uvedené publikaci nebyly buňky diferenciovány, nebyl zde uveden ani jejich počet a doba pro inkubaci byla dvojnásobně delší než námi použitá. Koncentrace 160 mmol.l⁻¹ byla pro 24 hodinovou intoxikaci nejvhodnější.

Pro potvrzení výsledků kalibrace získaných pomocí Calcein AM testu byla provedena kalibrace množství toxinu i další metodou, kterou bylo měření míry buněčné smrti pomocí interkalační sondy PI. V grafu (Obr. 12) můžeme vidět nárůst buněčného poškození se vzrůstající koncentrací L-glu. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo opět při koncentraci 160 mmol.l⁻¹, jelikož při použití této koncentrace toxinu byl rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s toxinem dostatečně velký (Obr. 12).

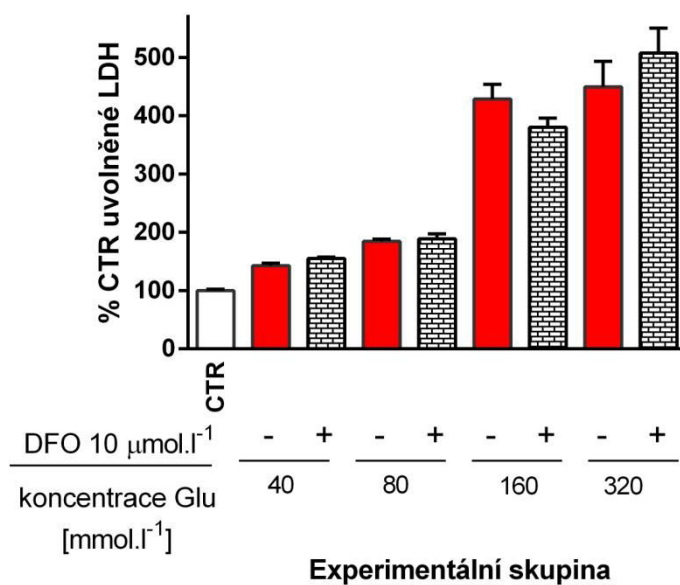
Kalibrace pomocí LDH byla provedena pro srovnání PI metody a Calcein AM testu s komerčním kitem LDH (Obr. 13). Byl ověřen největší rozdíl signálů mezi skupinou s toxinem a skupinou s aplikovaným deferoxaminem (DFO) v koncentraci 10 μmol.l⁻¹. DFO byl jako referenční látka vybrán, protože, jakožto chelátor železa, účinně snižuje poškození buněk vyvolané nadměrným přísunem L-Glu. Glutamát ve vysoké koncentraci dysreguluje Xc⁻ antiporterový systém a stimuluje NMDA receptory, jejichž aktivací dochází k přísunu iontů železa (Tian *et al.*, 2017) či navození železem indukované smrti (ferroptosa) (Nunez a Hidalgo, 2019; Dixon *et al.*, 2012). Ty hrají důležitou roli v dýchacím řetězci mitochondrií a pokud vzroste jejich obsah ve volné formě, může docházet k tvorbě ROS z H₂O₂ díky Fentonově reakci až k indukci buněčné smrti (Ke a Ming Qian, 2003).



Obr. 11 Kalibrace použité koncentrace toxinu (L-glu) – Calcein AM
Skupiny po aplikaci L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l⁻¹ (červené sloupce) a tytéž koncentrace s navíc přidáním DFO v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ (šrafovaně)



Obr. 12 Kalibrace použité koncentrace toxinu (L-glu) – PI
Skupiny po aplikaci L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l⁻¹ (červené sloupce) a tytéž koncentrace s navíc přidáním DFO v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ (šrafovaně)



Obr. 13 Kalibrace použité koncentrace toxinu (L-glu) – LDH
 Skupiny po aplikaci L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l^{-1} (červené sloupce) a tytéž koncentrace s navíc přidáním DFO v koncentraci 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (šrafovaně)

4.4 Primární screening látek ze skupin brassinosteroidů a polyfenolů

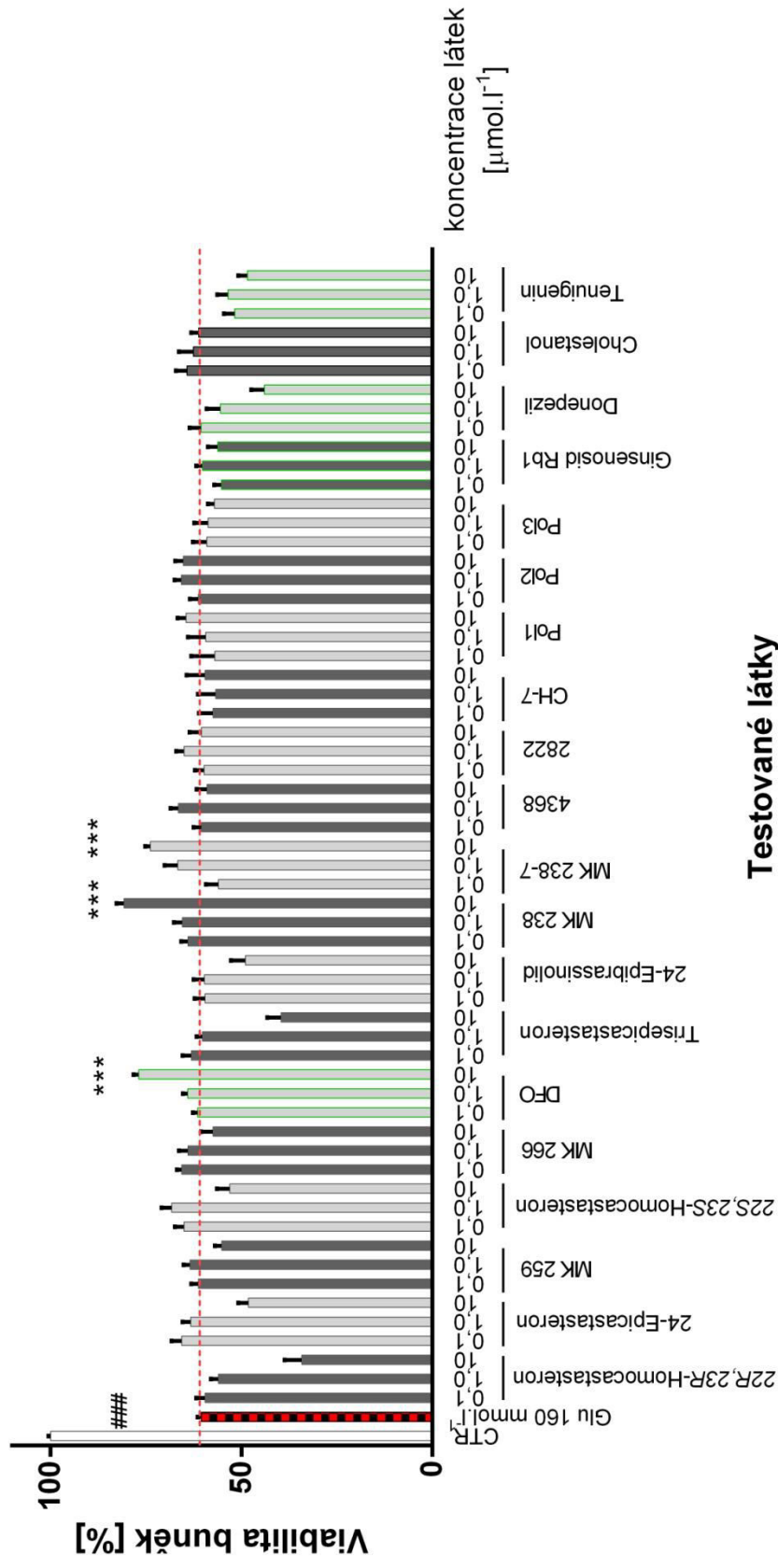
Viabilita buněk po 24hodinové intoxikaci 160 mmol.l^{-1} L-glu spolu s aplikací testované látky byla porovnávána s kontrolní skupinou zdravých buněk, tj. bez intoxikace (obsah DMSO < 0,1% V/V). Do hodnocení (Obr. 14) byla zahrnuta i používaná léčiva (DFO, donepezil, tenuigenin, ginsenosid Rb1) pro srovnání účinnosti přírodních a syntetických derivátů brassinosteroidů a polyfenolů s již používanými syntetickými léčivy. Jako referenční látka byl vybrán chelátor železa DFO (Tian *et al.*, 2017), zkoumána byla však i další léčiva. Donepezil – cholinesterasový inhibitor (Gawel *et al.*, 2016), tenuigenin – protizánětlivá látka (Fan *et al.*, 2017) a ginsenosid Rb1 – steroid původně získaný z ženšenu, který by měl zabraňovat tvorbě shluků α -synukleinu (Qu *et al.*, 2019).

Přerušovaná čára v grafu symbolizuje průměrnou viabilitu buněk po intoxikaci L-glu (60 %) a slouží pro orientační hodnocení poklesu/vzestupu viability buněk po aplikaci látek v jednotlivých koncentracích. Léčiva jsou zvýrazněna zeleným ohraničením.

Viabilita buněk s aplikovanými látkami byla srovnávána s viabilitou intoxikované skupiny, jejíž hodnota dosahovala průměrně 60 %. Po inkubaci buněk s látkami MK 238 a MK 238-7 v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ dosahovala viabilita k 73 % v obou případech, což je srovnatelný výsledek s referenční látkou DFO vykazující viabilitu buněk 77 % ve stejné koncentraci. Naopak snížení viability bylo pozorováno ve skupinách s látkami při koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$: 22R,23R-Homocastasteron, přírodní brassinosteroid, který vykazoval viabilitu buněk 34 %, 24-Epicastasteron s hodnotou 48 % a Trisepicastasteron 40 %.

Hodnoty viabilit buněk po aplikaci polyfenolů vykazovaly pouze nevýraznou míru protekce, a proto s nimi nebyla prováděna další testování.

Jak je z grafu zřejmé, za významně aktivní látky mohou být považovány DFO, MK 238, MK 238-7, které byly vybrány pro následné analýzy (DHE, LDH a PI). Spolu s těmito látkami byl vybrán i 22S,23S-Homocastasteron, syntetický derivát brassinosteroidů, jakožto negativní kontrola, tedy látka snižující viabilitu ve své nejvyšší koncentraci v kombinaci s L-glu. Podobný efekt této látky byl zjištěn i ve studii Malíková *et al.* (2008), kde byl efekt tohoto syntetického analogu castasteronu hodnocen dokonce jako cytotoxický na buňky leukémie (CEM) (Malikova *et al.*, 2008).



Testované látky

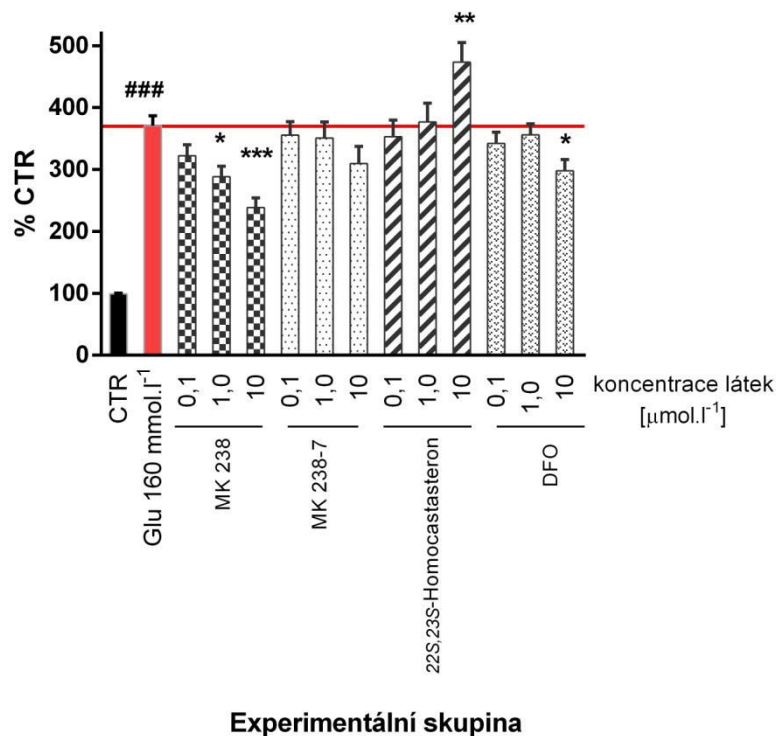
Obr. 14 Hodnocení neuroprotektivní aktivity brassinosteroidů a polyfenolů na glutamát-indukovaném modelu excitotoxicity na diferenciovanych buňkách SH-SY5Y. Procentuální hodnota viability pro L-glu v koncentraci 160 mmol.l⁻¹ (srafovaný sloupec prodloužen jako červená přerušovaná čára). Testované látky z řad brassinosteroidů, brassinolidů a polyfenolů ve 3 koncentracích (šedá), referenční látky a léčiva: DFO, donepezil, tenuigenin a ginsenosid Rb1 (ohraňičeny zelenou barvou). Všechny výsledky prezentovány jako průměrná hodnota ± standardní chyba průměru (SEM), minimálně v triplicáttech a ve 3 různých dnech. ANOVA, Dunnet post hoc test; # P < 0.05; *, ## P < 0.01; *, ### P < 0.001; * P porovnání vzorku s Glu 160 mmol.l⁻¹, P porovnání vzorku se skupinou bez Glu 160 mmol.l⁻¹. Hodnota P < 0.05 je považována za statisticky signifikantní.

4.5 Propidium jodid

Inkubací buněk s interkalační sondou PI byla zjištěna míra poškozených a mrtvých buněk u nejaktivnějších látek (Obr. 15), dále tento test tedy sloužil pro potvrzení aktivity identifikovaných neuroprotektivních látek. Přerušovaná červená čára v grafu označuje procentuální míru smrti buněk ve skupině bez aplikace zkoumané látky oproti DMSO kontrole, přičemž došlo téměř k čtyřnásobnému nárůstu signálu u skupiny intoxikované glutamátem 160 mmol.l^{-1} (průměr = 370 % kontroly).

V případech látek MK 238, MK 238-7 a DFO došlo k poklesu míry úmrtí/poškození buněk v závislosti na dávce, můžeme tedy pravděpodobně mluvit o antineurodegenerativním efektu. Konkrétně šlo při koncentraci látek $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ o snížení o 131 % v případě látky MK-238 a 60 % u MK-S38-7 oproti intoxikované skupině. DFO snížil tento signál o 72 % ve stejné koncentraci, tedy MK 238 vykazuje v nejvyšší koncentraci vyšší aktivitu než tento chelátor železa.

Naopak u 22S,23S-homocastasteronu, látky, která sloužila jako negativní kontrola (v kombinaci s L-glu), došlo k nárůstu poškození o 103 % v koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, a tedy jeho toxický účinek byl potvrzen.



Obr. 15 Změna míry poškození buněk SH-SY5Y – PI; Skupiny po aplikaci L-glu 160 mmol.l⁻¹ (červený sloupec, hodnota prodloužena jako červená čára), látky v koncentracích 0,1; 1 a 10 μmol.l⁻¹ (různě šrafované), DMSO kontrola bez aplikace glutamátu (černá); Všechny výsledky prezentovány jako průměrná hodnota ± standardní chyba průměru (SEM), minimálně v triplikátech a ve 3 různých dnech. ANOVA, Dunnet post hoc test; # P < 0.05; *, ## P < 0.01; *, ### P < 0.001; * P porovnání vzorku s Glu 160 mmol.l⁻¹, P porovnání vzorku se skupinou bez Glu 160 mmol.l⁻¹. Hodnota P < 0.05 je považována za statisticky signifikantní

4.6 Laktátdehydrogenasa

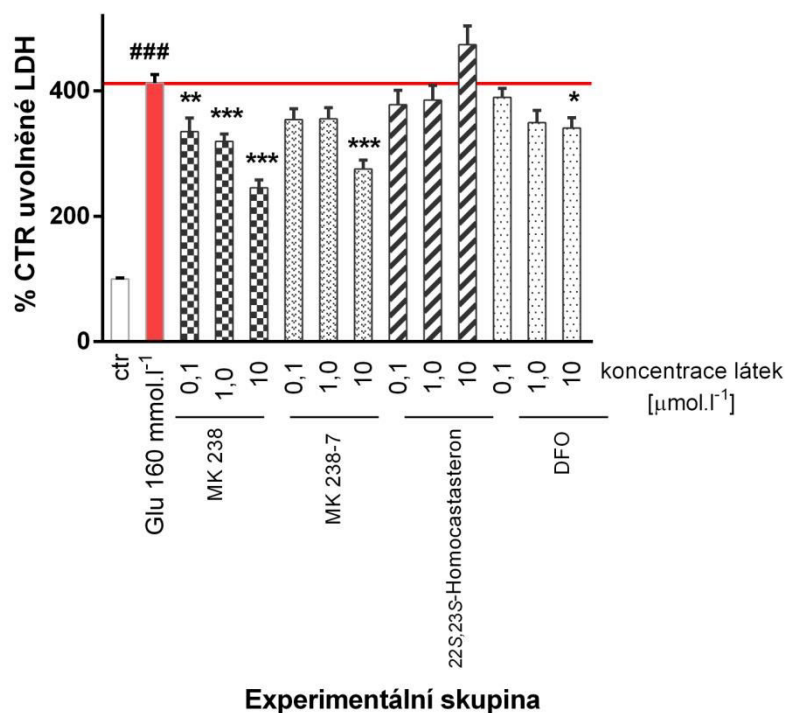
Obdobně jako v předchozím grafu přerušovaná čára označuje procentuální míru signálu uvolněného LDH v 160 mmol.l⁻¹ glutamátem intoxikované skupině, jehož aplikací došlo k výraznému poškození buněk, respektive porušení integrity membrán, oproti DMSO kontrole (průměr = 412 %).

Jak je možné si povšimnout (Obr. 16), koncentrační závislost účinku látky na cytotoxicitu je obdobná jako v případě PI testu. Srovnání výsledků získaných pomocí PI metody a LDH komerčního kitu nám posloužilo především k možnosti zavedení levnějšího PI testu pro větší soubor vzorků.

Nejsilnější efekt snížení toxikality L-glu i v tomto vykazovala látka MK-238 v nejvyšší koncentraci, kde šlo o snížení o 167 %. Taktéž MK-238-7 poskytovala účinnou ochranu buněk se snížením signálu o 137 % ve své nejvyšší koncentraci. Obě

tyto látky vykazovaly větší míru snížení signálu, tudíž mohou být považovány za účinnější než referenční látka DFO.

Funkci negativní kontroly 22S,23S-Homocastasteron potvrdil, neboť došlo ke zvýšení cytotoxicity o 62 % v nejvyšší koncentraci této látky.



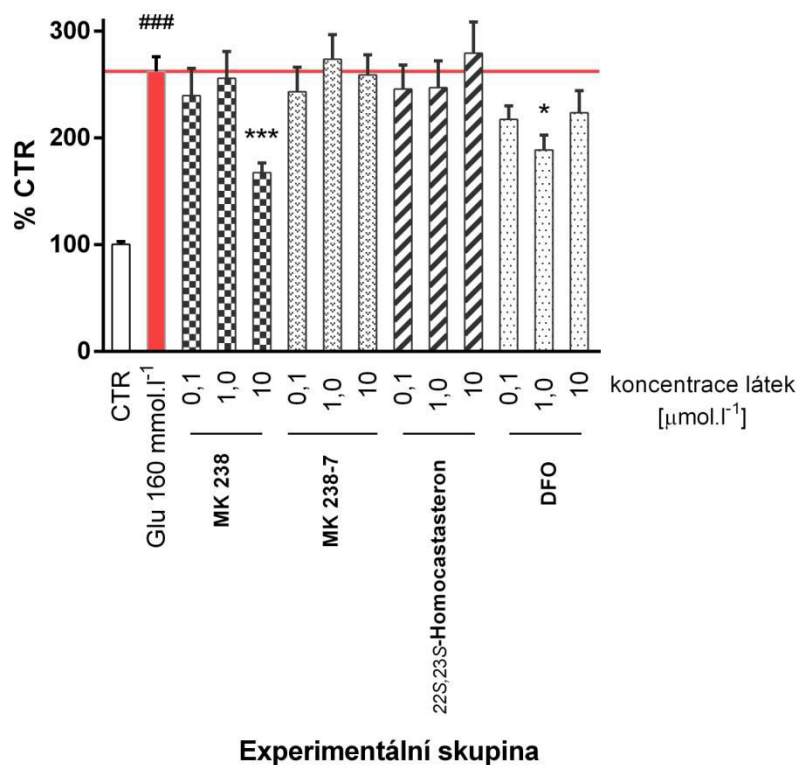
Obr. 16 Cytotoxicita uvolněné LDH do media; Skupiny po aplikaci L-glu 160 mmol.l^{-1} (červený sloupec, hodnota prodloužena jako červená čára), látky v koncentracích 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (různě šrafované), DMSO kontrola bez aplikace glutamátu (černá); Všechny výsledky prezentovány jako průměrná hodnota \pm standardní chyba průměru (SEM), minimálně v triplicátech a ve 3 různých dnech. ANOVA, Dunnet post hoc test; # $P < 0.05$; *, ## $P < 0.01$; *, ### $P < 0.001$; * P porovnání vzorku s Glu 160 mmol.l^{-1} , P porovnání vzorku se skupinou bez Glu 160 mmol.l^{-1} . Hodnota $P < 0.05$ je považována za statisticky signifikantní

4.7 Dihydroethidium

Měření poklesu či vzestupu míry oxidativního stresu vyvolaného aplikací L-glu (Reynolds a Hastings, 1995) pomocí sondy dihydroethidia bylo provedeno u 2 zástupců syntetických derivátů odvozených od brassinosteroidů a cholestanolu (MK 238, MK 238-7), syntetického derivátu 22S,23S-Homocastasteronu a referenční látky (DFO). U všech vybraných látek došlo k poklesu míry oxidativního stresu v porovnání se skupinou intoxikovanou 160 mmol.l⁻¹ L-glu, ať už u zkoumaných derivátů nebo DFO (Obr. 16), u něhož bylo nejvýraznější snížení signálu při koncentraci 1 μmol.l⁻¹. Míra oxidativního stresu u skupiny s toxinem dosáhla 2,6x násobku hodnoty DMSO kontroly. Tato hodnota byla vyšší než např. ve studii Nampoothiri *et al.* (2014), kde vzestup oxidativního stresu vzrostl oproti kontrole pouze dvojnásobně, ale je třeba brát v úvahu i odlišnosti v dalších parametrech, konkrétně koncentraci L-glu 20 mmol.l⁻¹ a 48hodinovou inkubaci (Nampoothiri *et al.*, 2014).

Největší pokles signálu po 4hodinové indukci, byl pozorován u látky MK 238 a tento efekt vykazoval progresivní charakter se vzrůstající koncentrací, konkrétně o 94 % v koncentraci 10 μmol.l⁻¹. Tato hodnota dokonce překonala redukci oxidativního stresu látky DFO ve své nejúčinnější koncentraci (1 μmol.l⁻¹), ve které dosáhla snížení 74 %. I přes pouze drobné strukturální odlišnosti látky MK 238-7 s MK 238, nedošlo po aplikaci MK 238-7 v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ ke snížení oxidativního stresu, přestože obě látky v koncentraci 0,1 μmol.l⁻¹ poskytovaly téměř identické snížení míry oxidativního stresu oproti skupině bez látek – 22 a 19 %.

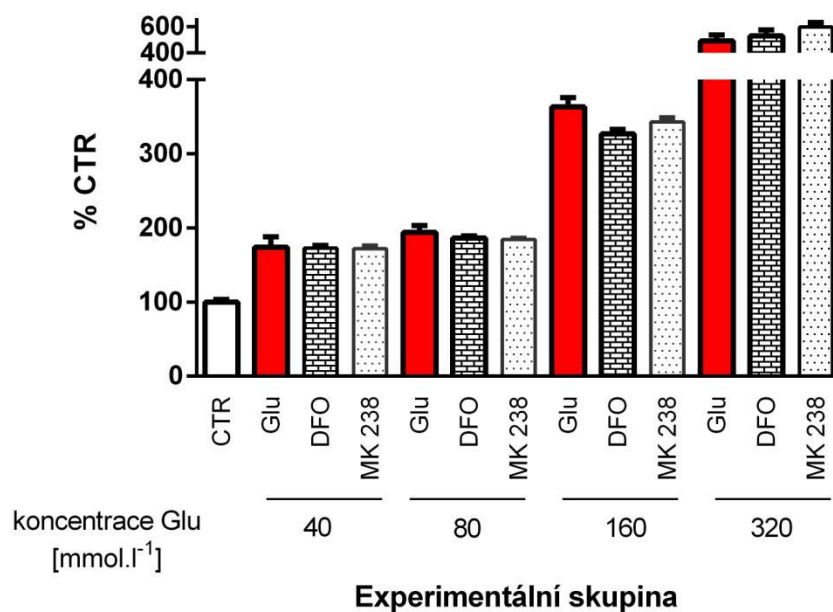
Opačný trend vykazovala látka 22S,23S-Homocastasteron – syntetický derivát odvozený od přírodního 22R,23R-Homocastasteronu. V nejvyšší koncentraci (10 μmol.l⁻¹) je pro buňky v kombinaci s glutamátem toxický, oxidativní stres měl tedy rostoucí charakter se vzrůstající koncentrací látky a v nejvyšší hodnotě byl o 17 % vyšší oproti čistému toxinu. Toto pozorování bylo potvrzeno vlastním předchozím měřením – primární screening, PI, LDH. Efekt byl popsán i ve studii Malíková *et al.* (2008), kde však studovali vliv pouze čisté látky (2008) (Malikova *et al.*, 2008).



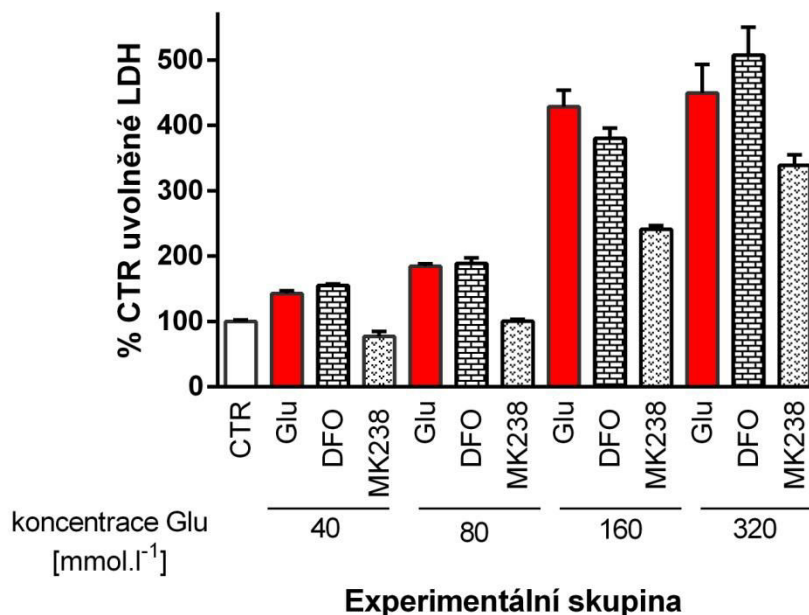
Obr. 17 Míra oxidativního stresu indukovaného 160 mmol.l^{-1} L-Glu; Skupiny po aplikaci L-glu 160 mmol.l^{-1} (červený sloupec, hodnota prodloužena jako červená čára), látky v koncentracích 0,1; 1 a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (různě šrafované), DMSO kontrola bez aplikace glutamátu (černá); Všechny výsledky prezentovány jako průměrná hodnota \pm standardní chyba průměru (SEM), minimálně v triplicátech a ve 3 různých dnech. ANOVA, Dunnet post hoc test; # $P < 0.05$; *, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$; * P porovnání vzorku s Glu 160 mmol.l^{-1} , P porovnání vzorku se skupinou bez Glu 160 mmol.l^{-1} . Hodnota $P < 0.05$ je považována za statisticky signifikantní

4.8 Porovnání MK 238 s deferoxaminem

Porovnáním efektů získaných PI a LDH testy za použití látek DFO a MK 238 v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Obr. 18 a Obr. 19) byl zjištěn výraznější efekt syntetizované látky (MK 238) oproti zakoupené referenční látce (DFO), a tím také potvrzena aktivita látky pro více koncentrací toxinu.



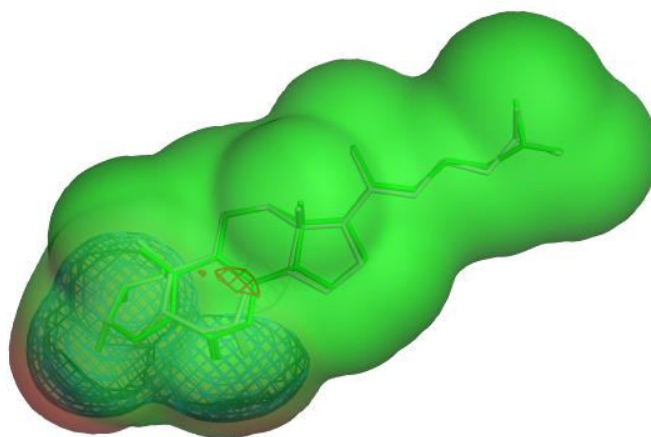
Obr. 18 Porovnání účinků MK 238 a DFO na glutamát indukovaném poškození buněk – PI Skupiny po aplikaci L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l⁻¹ (červené sloupce) a tytéž koncentrace s navíc přidáním DFO nebo MK 238 v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ (různé šrafování)



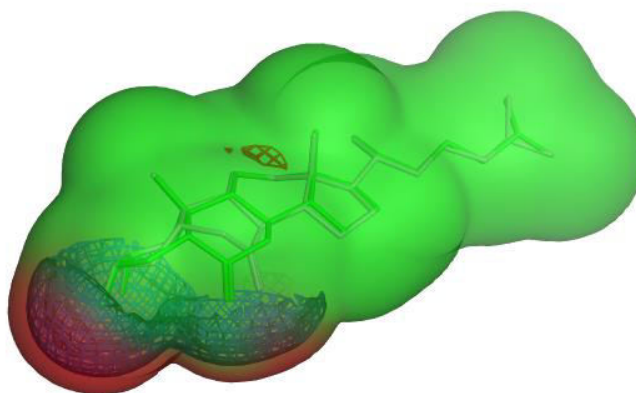
Obr. 19 Porovnání účinků MK 238 a DFO na glutamát indukovaném poškození buněk – LDH; Skupiny po aplikaci L-glu v koncentracích 40, 80, 160 a 320 mmol.l⁻¹ (červené sloupce) a tytéž koncentrace s navíc přidáním DFO nebo MK 238 v koncentraci 10 μmol.l⁻¹ (různé šrafování)

4.9 Flexibilní zarovnání

Pomocí programu Molecular Operating Environment 2010.12 bylo po flexibilním zarovnání MK 238 a MK 238-7 vmodelováno potenciální aktivní místo (Obr. 20 a Obr. 21). Červené oblasti na van der Waalově povrchu vykreslují místa se skupinami akceptujícími vodíkové vazby (-OH skupiny na A-kruhu) a zelené naopak ilustrují hydrofobní oblasti. Na elektrostatickém povrchu jsou modře vyobrazeny donory vodíkových vazeb ze strany potenciálního molekulárního cíle (receptor, protein apod.) (komplementární k červené oblasti na van der Waalově povrchu), akceptory červeně a bílá barva je přiřazena hydrofobním oblastem.



Obr. 20 Potenciální aktivní místo molekulárního cíle MK 238 a MK 238-7 se zobrazením van der Waalova povrchu (akceptory vodíkových vazeb (červená) a hydrofobní oblast (zelená)) a elektrostatického povrchu (donory vodíkových vazeb (modrá síť), akceptory (červená síť) a hydrofobní místa (bílá síť))



Obr. 21 Potenciální aktivní místo molekulárního cíle MK 238 a MK 238-7 se zobrazívaním van der Waalsova povrchu (akceptory vodíkových vazeb (červená) a hydrofobní oblast (zelená)) a elektrostatického povrchu (donory vodíkových vazeb (modrá síť), akceptory (červená síť) a hydrofobní místa (bílá síť))

Úspěšnost zarovnání nových derivátů s MK 238 byla posuzována na základě porovnání hodnot se skóre získaným ze zarovnání MK 238 s MK 238-7, které bylo považováno za referenční. Zhodnocením těchto hodnot mohlo být určeno, zda daný derivát vyhovuje hypotetickému vazebnému místu (Obr. 20 a Obr. 21). Tyto simulace poskytly výsledky, jejichž hodnoty jsou shrnuty v tabulce (Tab. 2). Veličina U vyjadřuje deformační energii ligandů, jejíž limit („cut off“) je nastaven hodnotou 5 kcal.mol^{-1} . Skóre podobnosti je vyjádřeno veličinou F a součet dvou zmíněných veličin poté veličinou S .

Tabulka 2 Získané hodnoty veličin U , F , S a dU flexibilním zarovnáním posuzované látky s MK 238

látka	U	F	S	dU
MK 238-7	118,9655	-261,8419	-142,8764	0,0006
MK 205	129,9117	-272,9374	-143,0256	0,0662
	129,8455	-270,7101	-140,8645	0,0000
DM 29	109,6254	-244,7248	-135,0994	0,0000
DM 30	112,0033	-239,7523	-127,7490	0,0000
DM 68	136,8218	-243,3369	-106,5151	0,0000
DM 70	71,8977	-80,6102	-8,7125	0,0328
	71,8649	-80,2226	-8,3577	0,0000
DM 72	102,9584	-229,1228	-126,1645	0,0000
DM 75	81,7573	-77,5961	4,1612	0,0000
JA196A	129,7548	-267,3861	-137,6313	0,0004
KP38	73,2111	-82,4097	-9,1986	0,0000

Čím je hodnota tohoto skóre nižší, tím je zarovnání považováno za úspěšnější. Současně s veličinou S byl také brán v potaz parametr U a jeho odlišnost hodnoty od hodnoty získané porovnáním látky MK 238 s MK 238-7.

Byla brána v potaz zarovnání s hodnotou $dU < 1$, jelikož po překročení této hodnoty může docházet k deformaci vazebných a torzních úhlů.

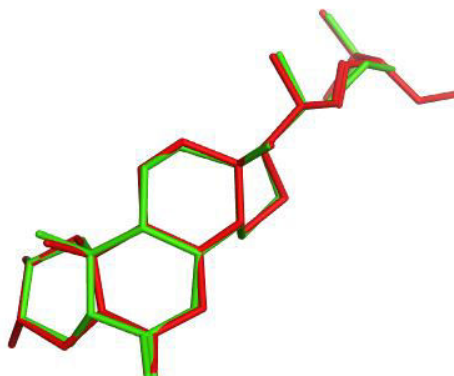
Derivát DM 72 je strukturně shodný s DM 30, který však navíc obsahuje ketoskupinu na alkylovém řetězci. Získaná skóre vykazují podobné hodnoty, proto je pravděpodobné, že ketoskupina nemá velký vliv na úspěšnost v tomto zarovnání.

Strukturní motiv morfolinu se vyskytoval u derivátů DM 68, DM 29 (navíc s keto skupinou na alkylovém řetězci) a DM 75 (hydrochlorid látky DM 68). Ze získaných hodnot veličiny S je patrné, že ketoskupina v případě DM 29 zápornou hodnotu tohoto skóre snižuje (tzn. zvyšuje úspěšnost zarovnání) a jeví se tedy jako vhodná substituce. Naopak amoniiová sůl u látky DM 75 přisuzuje tomuto derivátu skóre v kladných hodnotách, tudíž je posuzován z celé nové generace derivátů jako nejnevhodnější kandidát, což potvrzuje i nutnost nepolární substituce pro řetězce na D-kruhu dle vyhotoveného modelu na základě zarovnání MK 238 a MK 238-7.

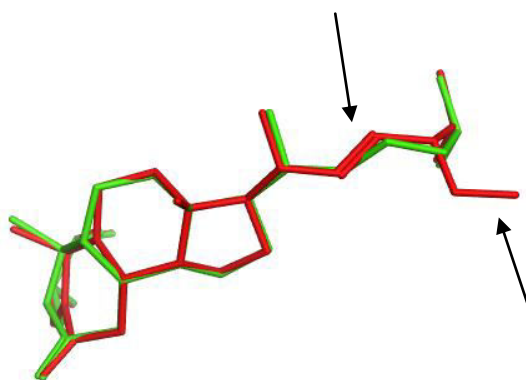
Nevhodnost přítomnosti náboje v hydrofobní kapse modelu aktivního místa u všech nabitých derivátů, tedy DM 70, 75 a KP38 byla viditelná ze získaných hodnot skóre S. DM 70 obsahoval dimethylamoniovou substituci oproti KP38 (amoniová substituce), přesto zjištěné hodnoty byly obdobné, a tedy můžeme usuzovat, že methylace dusíku nemá pravděpodobně vliv při existenci kladně nabitého dusíku.

JA196A se strukturně velmi lišil od ostatních derivátů díky přítomnosti perfluorbutanoylové skupiny na D-kruhu. Nicméně dle hodnot skóre se tento motiv jeví jako výhodný a řadí se tak mezi nejvhodnější testované kandidáty pravděpodobně díky zvýšení lipofilního charakteru molekuly skrze substituci vodíků za fluorové atomy na řetězci.

Celkově nejvhodnější kandidát, tedy s největší podobností a nejmenším sterickým pnutím, může být považován derivát MK 205 (Obr. 22), který je liší strukturou od MK 238 pouze nenasycenou vazbou na alkylovém řetězci a přítomností ethylové skupiny (Obr. 23). Získané skóre bylo zápornější než v případě MK 238-7, a tím by tedy tento derivát mohl mít vyšší aktivitu než látka MK 238-7.



Obr. 22 Flexibilní zarovnání látek MK 238 (zeleně) s MK 205 (červeně)



Obr. 23 Flexibilní zarovnání látek MK 238 (zeleně) s MK 205 (červeně), šipky ukazují na ethylovou skupinu a nenasycenou vazbu na derivátu MK 205 (červeně)

5 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla popsána patologie neurodegenerativních chorob a modely k jejich studiu se zaměřením na excitotoxický proces indukovaný neurotransmiterem glutamátem. Dále jsem se zabývala strategiemi neuroprotektce a látkami ze skupin brassinosteroidů a polyfenolů. Jelikož jsem v praktické části práce pracovala s buněčnou linií SH-SY5Y, byla tato tematika včetně diferenciac buněk pomocí ATRA do literární rešerše zahrnuta také.

V praktické části bylo dokázáno snížení proliferace buněk vlivem diferenciac po 48 hodinách, což bylo v korelaci s literaturou (Fagerstrom *et al.*, 1996). Diferenciované buňky navíc nápadně změnily tvar, jak bylo popsáno např. ve studii Shipley *et al.* (2016) (Shipley *et al.*, 2016). Taktéž byl optimalizován glutamátový model indukované excitotoxicity, především šlo o kalibraci optimální koncentrace glutamátu a čas inkubace této látky s buňkami. Na optimalizovaném modelu bylo provedeno testování látek z řad brassinosteroidů a z nich odvozených derivátů a také polyfenolů v koncentracích $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ spolu s toxinem L-glu v koncentraci 160mmol.l^{-1} . Z těchto látek byly vybrány brassinosteroidy MK 238, MK 238-7 pro svou vysokou aktivitu (viabilita 77 a 73 % oproti 60 % u intoxikované skupiny) a spolu s negativní kontrolou – syntetickým derivátem 22S,23S-Homocastasteronem a referenční látkou DFO byly provedeny experimenty zkoumající vliv těchto látek na snížení oxidativního stresu, míry poškození buněk v testech reverzní viability, tedy cytotoxicity (PI a LDH testy). Součástí experimentů bylo i srovnání komerčního kitu Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher™) s metodou za použití interkalační sondy PI. Trendy závislosti koncentrace látky na míře signálu u obou metod (PI a LDH) korelovaly u všech látek ve všech koncentracích, s výjimkou DFO, jehož maximum signálu se u zmíněných metod lišilo. 22S,23S-Homocastasteron byl jakožto negativní kontrola potvrzen, protože docházelo u obou metod v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ k nárůstu signálu. Metoda s použitím dihydroethidia poskytovala informace o snížení oxidativního stresu. V tomto experimentu měla nejslibnější protektivní účinky na buňky látka MK 238 se snížením okolo 74 %. Její strukturální analog MK 238-7 ve stejné koncentraci neposkytoval téměř žádnou OS redukující aktivitu, naopak vykazoval reverzní trend. V návaznosti na toto pozorování se jeví zajímavý i fakt, že látky MK 238 a MK 238-7 se lišily ve svých hodnotách IC_{50} na buněčné linii fibroblastu BJ zjištěné ve studii Rárová *et al.* (2016)

(Rarova *et al.*, 2016). Zatímco MK238 vykazovala podstatně vyšší hodnoty IC_{50} tj. $> 50 \mu\text{mol.l}^{-1}$, výrazně vyšší toxicita, a tedy nižší hodnota IC_{50} , byla dosažena u MK238-7 ($IC_{50} = 33,9 \pm 16,1$). Tato fakta poukazují na vhodnější strukturu MK 238, coby vedoucí motiv pro vývoj nových potenciálně účinnějších derivátů pro tento typ neurodegenerativní patologie.

Na základě výsledků této práce je tedy možné se domnívat, že nejvyšší aktivitu vykazují látky se strukturními prvky přírodních brassinosteroidů (základní skelet – A, B, C, D kruhy, částečně polární) a cholestanolu (hydrofobní alifatický řetězec navázaný na D kruhy).

Tyto předpoklady byly podpořeny i pomocí simulací, ve kterých bylo zjištěno, že u nových derivátů jsou preferovány spíše hydrofobní substituce na řetězci vázaném na D-kruhu kvůli přítomnosti hydrofobní kapsy na modelu potenciálního vazebného místa. Dále byla zjištěna nevhodnost přítomnosti náboje na řetězci vázaného na D-kruh. Jako nejvhodnější se jevil derivát MK 205, který obsahoval oproti aktivní látce MK 238 navíc nepolární ethylovou skupinu a nenasycenou vazbu na řetězci.

6 LITERATURA

- Altmann T. (1998): A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends in Genetics* **14**, 490-495.
- Anderson C.M., Swanson R.A. (2000): Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* **32**, 1-14.
- Andrew R., Watson D.G., Best S.A., Midgley J.M., Wenlong H., Petty R.K. (1993): The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochemical Research* **18**, 1175-1177.
- Antkiewicz-Michaluk L., Michaluk J., Romanska I., Papla I., Vetulani J. (2000): Antidopaminergic effects of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol. *Journal Neural Transmission (Vienna)* **107**, 1009-1019.
- Bajguz A., Tretyn A. (2003): The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* **62**, 1027-1046.
- Bansal R., Singh R. (2018): Exploring the potential of natural and synthetic neuroprotective steroids against neurodegenerative disorders: A literature review. *Medicinal Research Reviews* **38**, 1126-1158.
- Barbeau A. (1969): Treatment of Parkinson's disease by L-DOPA. *Canadian Medical Association* **98**, 183-186.
- Beitz J.M. (2014): Parkinson's disease: a review. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* **6**, 65-74.
- Betarbet R., Sherer T.B., Mackenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience* **3**, 1301-1306.
- Beyer K., Domingo-Sàbat M., Ariza A. (2009): Molecular pathology of Lewy body diseases. *International journal of molecular sciences* **10**, 724-745.
- Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A. (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research* **33**, 2643-2652.
- Birkmayer W., Hornykiewicz O. (1961): The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klinische Wochenschrift* **73**, 787-788.
- Bove J., Prou D., Perier C., Przedborski S. (2005): Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* **2**, 484-494.
- Bridges R.J., Natale N.R., Patel S.A. (2012): System xc⁻ cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. *British journal of pharmacology* **165**, 20-34.
- Brinkley B.R., Barham S.S., Barranco S.C., Fuller G.M. (1974): Rotenone inhibition of spindle microtubule assembly in mammalian cells. *Experimental Cell Research* **85**, 41-46.
- Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arrighi H.M. (2007): Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers and Dementia* **3**, 186-191.
- Brooks A.I., Chadwick C.A., Gelbard H.A., Cory-Slechta D.A., Federoff H.J. (1999): Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Research* **823**, 1-10.
- Brouillet E., Beal M.F. (1993): NMDA antagonists partially protect against MPTP induced neurotoxicity in mice. *Neuroreport* **4**, 387-390.
- Brundin P., Barker R.A., Parmar M. (2010): Neural grafting in Parkinson's disease Problems and possibilities. *Progress in Brain Research* **184**, 265-294.
- Burke D., Gasdaska P., Hartwell L. (1989): Dominant effects of tubulin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell Biology* **9**, 1049-1059.
- Butterfield P.G., Valanis B.G., Spencer P.S., Lindeman C.A., Nutt J.G. (1993): Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. *Neurology* **43**, 1150-1158.
- Calne D.B., Leigh P.N., Teychenne P.F., Bamji A.N., Greenacre J.K. (1974a): Treatment of Parkinsonism with Bromocriptine. *The Lancet* **304**, 1355-1356.

- Calne D.B., Teychenne P.F., Claveria L.E., Eastman R., Greenacre J.K., Petrie A. (1974b): Bromocriptine in Parkinsonism. *British Medical Journal* **4**, 442-444.
- Carange J., Longpré F., Daoust B., Martinoli M. (2011): 24-Epibrassinolide, a Phytosterol from the Brassinosteroid Family, Protects Dopaminergic Cells against MPP⁺-Induced Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Toxicology* **2011**, 1-13.
- Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T.O.R. (1957): 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature* **180**, 1200.
- Carlsson A., Waldeck B. (1958): A Fluorimetric Method for the Determination of Dopamine (3-Hydroxytyramine.). *Acta Physiologica Scandinavica* **44**, 293-298.
- Cohen G. (1984): Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* **5**, 77-82.
- Collins M.A., Ung-Chhun N., Cheng B.Y., Pronger D. (1990): Brain and plasma tetrahydroisoquinolines in rats: effects of chronic ethanol intake and diet. *Journal of Neurochemistry* **55**, 1507-1514.
- Conn P.J., Battaglia G., Marino M.J., Nicoletti F. (2005): Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 787-798.
- Corrodi H., Fuxe K., Hökfelt T., Lidbrink P., Ungerstedt U. (1973): Effect of ergot drugs on central catecholamine neurons: Evidence for a stimulation of central dopamine neurons. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **25**, 409-412.
- Curtius H.C., Wolfensberger M., Steinmann B., Redweik U., Siegfried J. (1974): Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. *Journal of Chromatography* **99**, 529-540.
- Daikhin Y., Yudkoff M. (2000): Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *Journal of Nutrition* **130**, 1026s-1031s.
- Danysz W., Parsons C.G. (2003): The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **18**, S23-32.
- Dauer W., Przedborski S. (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909.
- Dawson V.K., Gingerich W.H., Davis R.A., Gilderhus P.A. (1991): Rotenone persistence in freshwater ponds: Effects of temperature and sediment adsorption. *North American Journal of Fisheries Management* **11**, 226-231.
- Decker D.E., Althaus J.S., Buxser S.E., Vonvoigtlander P.F., Ruppel P.L. (1993): Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine. *Research Communications in Chemical Pathology Pharmacology* **79**, 195-208.
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., 3rd, Stockwell B.R. (2012): Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060-1072.
- Dong X.X., Wang Y., Qin Z.H. (2009): Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 379-387.
- Dubrovsky B. (2006): Neurosteroids, neuroactive steroids, and symptoms of affective disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **84**, 644-655.
- Duncan M.W., Smythe G.A. (1982): Salsolinol and dopamine in alcoholic beverages. *Lancet* **1**, 904-905.
- Duncan M.W., Smythe G.A., Nicholson M.V., Clezy P.S. (1984): Comparison of high-performance liquid chromatography with electrochemical detection and gas chromatography-mass fragmentography for the assay of salsolinol, dopamine and dopamine metabolites in food and beverage samples. *Journal of Chromatography* **336**, 199-209.
- Elufioye T.O., Berida T.I., Habtemariam S. (2017): Plants-Derived Neuroprotective Agents: Cutting the Cycle of Cell Death through Multiple Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2017**, 27.
- Fagerstrom S., Pahlman S., Gestblom C., Nanberg E. (1996): Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth and Differentiation* **7**, 775-785.

- Fan Z., Liang Z., Yang H., Pan Y., Zheng Y., Wang X. (2017): Tenuigenin protects dopaminergic neurons from inflammation via suppressing NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of Neuroinflammation* **14**, 256.
- Fernandez-Moriano C., Gonzalez-Burgos E., Gomez-Serranillos M.P. (2015): Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 30.
- Forster J.I., Koglsberger S., Trefois C., Boyd O., Baumuratov A.S., Buck L., Balling R., Antony P.M. (2016): Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of Biomolecular Screening* **21**, 496-509.
- Fukui M., Song J.H., Choi J., Choi H.J., Zhu B.T. (2009): Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *European Journal of Pharmacology* **617**, 1-11.
- Galindo M.F., Jordan J., Gonzalez-Garcia C., Cena V. (2003): Chromaffin cell death induced by 6-hydroxydopamine is independent of mitochondrial swelling and caspase activation. *Journal of Neurochemistry* **84**, 1066-1073.
- Gandhi S., Wood N.W. (2010): Genome-wide association studies: the key to unlocking neurodegeneration? *Nature Neuroscience* **13**, 789.
- Gawel K., Labuz K., Gibula-Bruzda E., Jenda M., Marszalek-Grabska M., Filarowska J., Silberring J., Kotlinska J.H. (2016): Cholinesterase inhibitors, donepezil and rivastigmine, attenuate spatial memory and cognitive flexibility impairment induced by acute ethanol in the Barnes maze task in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **389**, 1059-1071.
- Giatti S., Boraso M., Melcangi R.C., Viviani B. (2012): Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *Journal of Molecular Endocrinology* **49**, 125-134.
- Gorell J.M., Johnson C.C., Rybicki B.A., Peterson E.L., Richardson R.J. (1998): The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology* **50**, 1346-1350.
- Grove M.D., Spencer G. F., Rohwedder W. K., Mandava N., Worley J. F., Warthen J. D., Steffens G. L. (1979): Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* **281**, 216-217.
- Habtemariam S. (2017): Going Back to the Good Old Days: The Merit of Crude Plant Drug Mixtures in the 21st Century. *International Journal of Complementary and Alternative Medicine* **6**, 1-5.
- Heikkila R., Cohen G. (1971): Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* **172**, 1257-1258.
- Heikkila R., Cohen G., Dembiec D. (1971): Tetrahydroisoquinoline alkaloids: uptake by rat brain homogenates and inhibition of catecholamine uptake. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **179**, 250-258.
- Henchcliffe C., Beal M.F. (2008): Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology* **4**, 600-609.
- Hothorn M., Belkhadir Y., Dreux M., Dabi T., Noel J.P., Wilson I.A., Chory J. (2011): Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature* **474**, 467-471.
- Hsieh M.H., Gu S.L., Ho S.C., Pawlak C.R., Lin C.L., Ho Y.J., Lai T.J., Wu F.Y. (2012): Effects of MK-801 on recognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's rat model. *Behavioural Brain Research* **229**, 41-47.
- Chen C. (2016): Sinapic Acid and Its Derivatives as Medicine in Oxidative Stress-Induced Diseases and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, 1-10.
- Cheung Y.T., Lau W.K., Yu M.S., Lai C.S., Yeung S.C., So K.F., Chang R.C. (2009): Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* **30**, 127-135.
- Iglesias-Gonzalez J., Sanchez-Iglesias S., Mendez-Alvarez E., Rose S., Hikima A., Jenner P., Soto-Otero R. (2012): Differential toxicity of 6-hydroxydopamine in SH-SY5Y human

- neuroblastoma cells and rat brain mitochondria: protective role of catalase and superoxide dismutase. *Neurochemistry Research* **37**, 2150-2160.
- Ismaili J., Boisvert M., Longpre F., Carange J., Le Gall C., Martinoli M.G., Daoust B. (2012): Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: synthesis and structure-activity relationships. *Steroids* **77**, 91-99.
- Izumi Y., Sawada H., Sakka N., Yamamoto N., Kume T., Katsuki H., Shimohama S., Akaike A. (2005): p-quinone mediates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death and ferrous iron accelerates the conversion of p-quinone into melanin extracellularly. *Journal of Neuroscience Research* **79**, 849-860.
- Jaillais Y., Vert G. (2016): Brassinosteroid signaling and BRI1 dynamics went underground. *Current opinion in plant biology* **33**, 92-100.
- Jonsson G. (1980): Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annual Review of Neuroscience* **3**, 169-187.
- Joshi S., Guleria R., Pan J., Dipette D., Singh U.S. (2006): Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene* **25**, 240-247.
- Ke Y., Ming Qian Z. (2003): Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurology* **2**, 246-253.
- Keinanen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P.H. (1990): A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* **249**, 556-560.
- Khan N.L., Jain S., Lynch J.M., Pavese N., Abou-Sleiman P., Holton J.L., Healy D.G., Gilks W.P., Sweeney M.G., Ganguly M., Gibbons V., Gandhi S., Vaughan J., Eunson L.H., Katzenschlager R., Gayton J., Lennox G., Revesz T., Nicholl D., Bhatia K.P., Quinn N., Brooks D., Lees A.J., Davis M.B., Piccini P., Singleton A.B., Wood N.W. (2005): Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* **128**, 2786-2796.
- Kim H.J. (2013): Alpha-Synuclein Expression in Patients with Parkinson's Disease: A Clinician's Perspective. *Experimental neurobiology* **22**, 77-83.
- Korczyn A.D. (2003): Dopaminergic drugs in development for Parkinson's disease. *Advances in Neurology* **91**, 267-271.
- Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Olanow C.W., Freeman T.B. (2008): Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: A second case report. *Movement Disorders* **23**, 2303-2306.
- Kostic V., Przedborski S., Flaster E., Sternic N. (1991): Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* **41**, 202-205.
- Kovalevich J., Langford D. (2013): Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology* **1078**, 9-21.
- Kritis A.A., Stamoula E.G., Paniskaki K.A., Vavilis T.D. (2015): Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 91.
- Kurnik-Lucka M., Panula P., Bugajski A., Gil K. (2018): Salsolinol: an Unintelligible and Double-Faced Molecule-Lessons Learned from In Vivo and In Vitro Experiments. *Neurotoxicity research* **33**, 485-514.
- Langston J.W., Ballard P. (1984): Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Canadian Journal of Neurological Sciences* **11**, 160-165.
- Langston J.W., Ballard P., Tetrad J.W., Irwin I. (1983): Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* **219**, 979-980.
- Levy E.J., Anderson M.E., Meister A. (1993): Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9171-9175.

- Li J.Y., Englund E., Widner H., Rehncrona S., Björklund A., Lindvall O., Brundin P. (2010): Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Movement Disorders* **25**, 1091-1096.
- Li J.Y., Christophersen N.S., Hall V., Soulet D., Brundin P. (2008): Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends in Neurosciences* **31**, 146-153.
- Liang Y.O., Plotsky P.M., Adams R.N. (1977): Isolation and identification of an in vivo reaction product of 6-hydroxydopamine. *Journal of Medicinal Chemistry* **20**, 581-583.
- Lin M.T., Beal M.F. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787-795.
- Luo Y., Smith J.V., Paramasivam V., Burdick A., Curry K.J., Buford J.P., Khan I., Netzer W.J., Xu H., Butko P. (2002): Inhibition of amyloid-beta aggregation and caspase-3 activation by the Ginkgo biloba extract EGb761. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12197-12202.
- Luthman J., Fredriksson A., Sundstrom E., Jonsson G., Archer T. (1989): Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behavioural Brain Research* **33**, 267-277.
- Mailloux R. (2018): Mitochondrial Antioxidants and the Maintenance of Cellular Hydrogen Peroxide Levels. **2018**, 1-10.
- Malikova J., Swaczynova J., Kolar Z., Strnad M. (2008): Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* **69**, 418-426.
- Martin L.J. (2012): Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Progress in Molecular Biology and Translation Science* **107**, 355-415.
- Martínková J. (2007): *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Grada Publishing a.s., Praha, 142 stran
- Maruyama W., Nakahara D., Ota M., Takahashi T., Takahashi A., Nagatsu T., Naoi M. (1992): N-methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry* **59**, 395-400.
- Mattson M.P. (2000): Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 120-129.
- Mehta A., Prabhakar M., Kumar P., Deshmukh R., Sharma P.L. (2013): Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology* **698**, 6-18.
- Mody I., Macdonald J.F. (1995): NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends in Pharmacological Sciences* **16**, 356-359.
- Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H. (1992): Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* **256**, 1217-1221.
- Müssig C., Altmann T. (1999): *Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids*.
- Muthane U., Ramsay K.A., Jiang H., Jackson-Lewis V., Donaldson D., Fernando S., Ferreira M., Przedborski S. (1994): Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. *Experimental Neurology* **126**, 195-204.
- Nakanishi S., Masu M., Bessho Y., Nakajima Y., Hayashi Y., Shigemoto R. (1994): Molecular diversity of glutamate receptors and their physiological functions. *Exs* **71**, 71-80.
- Nampoothiri M., Reddy N.D., John J. (2014): Insulin blocks glutamate-induced neurotoxicity in differentiated SH-SY5Y neuronal cells. *Behavioral Neurology* **2014**, 674164.
- Naoi M., Maruyama W., Zhang J.H., Takahashi T., Deng Y., Dostert P. (1995): Enzymatic oxidation of the dopaminergic neurotoxin, 1(R), 2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, into 1,2(N)-dimethyl-6,7-dihydroxyisoquinolinium ion. *Life Sciences* **57**, 1061-1066.
- Nunez M.T., Hidalgo C. (2019): Noxious Iron-Calcium Connections in Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience* **13**, 48.

- Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H., Stoessl A.J., Sossi V., Brin M.F., Shannon K.M., Nauert G.M., Perl D.P., Godbold J., Freeman T.B. (2003): A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* **54**, 403-414.
- Oyarce A.M., Fleming P.J. (1991): Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **290**, 503-510.
- Pahlman S., Ruusala A.I., Abrahamsson L., Mattsson M.E., Esscher T. (1984): Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differentiation* **14**, 135-144.
- Pin J.P., Duvoisin R. (1995): The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **34**, 1-26.
- Prusakova L.D., Chizhova S.I. (1996): The role of brassinosteroids in growth, tolerance and productivity of plants. *Agrokimiya* **1**, 137-150.
- Przedborski S., Jackson-Lewis V., Naini A.B., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., Akram M. (2001): The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Neurochemistry* **76**, 1265-1274.
- Qu S., Meng X., Liu Y., Zhang X., Zhang Y. (2019): Ginsenoside Rb1 prevents MPTP-induced changes in hippocampal memory via regulation of the alpha-synuclein/PSD-95 pathway. *Aging (Albany NY)* **11**, 1934-1964.
- Rarova L., Steigerova J., Kvasnica M., Bartunek P., Krizova K., Chodounska H., Kolar Z., Sedlak D., Oklestkova J., Strnad M. (2016): Structure activity relationship studies on cytotoxicity and the effects on steroid receptors of AB-functionalized cholestanes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **159**, 154-169.
- Reynolds I.J., Hastings T.G. (1995): Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *Journal of Neuroscience* **15**, 3318-3327.
- Riggin R.M., Kissinger P.T. (1976): Letter: Identification of salsolinol as a phenolic component in powdered cocoa and cocoa-based products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 900.
- Riggin R.M., McCarthy M.J., Kissinger P.T. (1976): Identification of salsolinol as a major dopamine metabolite in the banana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **24**, 189-191.
- Roth J. S.M., Růžička E. (2005): *Parkinsonova nemoc*. Maxdorf, Praha, 181 stran
- Sandler M., Carter S.B., Hunter K.R., Stern G.M. (1973): Tetrahydroisoquinoline alkaloids: in vivo metabolites of L-dopa in man. *Nature* **241**, 439-443.
- Saner A., Thoenen H. (1971): Model experiments on the molecular mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Molecular Pharmacology* **7**, 147-154.
- Sarkar S., Raymick J., Imam S. (2016): Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 904.
- Sarre S., Yuan H., Jonkers N., Van Hemelrijck A., Ebinger G., Michotte Y. (2004): In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Journal of Neurochemistry* **90**, 29-39.
- Scapagnini G., Vasto S., Sonya V., G Abraham N., G Nader A., Caruso C., Calogero C., Zella D., Galvano F. (2011): Modulation of Nrf2/ARE Pathway by Food Polyphenols: A Nutritional Neuroprotective Strategy for Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology* **44**, 192-201.
- Seniuk N.A., Tatton W.G., Greenwood C.E. (1990): Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Research* **527**, 7-20.
- She J., Han Z., Kim T.W., Wang J., Cheng W., Chang J., Shi S., Wang J., Yang M., Wang Z.Y., Chai J. (2011): Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature* **474**, 472-476.
- Shimizu E., Hashimoto K., Komatsu N., Iyo M. (2002): Roles of endogenous glutathione levels on 6-hydroxydopamine-induced apoptotic neuronal cell death in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Neuropharmacology* **43**, 434-443.

- Shipley M.M., Mangold C.A., Szpara M.L. (2016): Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 53193-53193.
- Schapira A.H.V. (2009a): Etiology and Pathogenesis of Parkinson Disease. *Neurologic Clinics* **27**, 583-603.
- Schapira A.H.V. (2009b): Molecular and clinical pathways to neuroprotection of dopaminergic drugs in Parkinson disease. *Neurology* **72**, S44-S50.
- Schuler F., Casida J.E. (2001): Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochimica et Biophysica Acta* **1506**, 79-87.
- Siderowf A., Stern M.B. (2006): Preclinical diagnosis of Parkinson's disease: are we there yet? *Current Neurology and Neuroscience Reports* **6**, 295-301.
- Simola N., Morelli M., Carta A.R. (2007): The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* **11**, 151-167.
- Stern Y. (1990): MPTP-induced parkinsonism. *Progress in Neurobiology* **34**, 107-114.
- Storch A., Burkhardt K., Ludolph A.C., Schwarz J. (2000a): Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *Journal of Neurochemistry* **75**, 2259-2269.
- Storch A., Kaftan A., Burkhardt K., Schwarz J. (2000b): 1-Methyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (salsolinol) is toxic to dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via impairment of cellular energy metabolism. *Brain Research* **855**, 67-75.
- Sun Z., Zhang S., Chan J.Y., Zhang D.D. (2007): Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 6334-6349.
- Sun Z.W., Zhang L., Zhu S.J., Chen W.C., Mei B. (2010): Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neuroscience Bulletin* **26**, 8-16.
- Szwajgier D., Baranowska-Wojcik E., Borowiec K. (2018): Phenolic Acids Exert Anticholinesterase and Cognition-Improving Effects. *Current Alzheimer Research* **15**, 531-543.
- Talpade D.J., Greene J.G., Higgins D.S., Jr., Greenamyre J.T. (2000): In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. *Journal of Neurochemistry* **75**, 2611-2621.
- Thanvi B.R., Munshi S.K., Vijaykumar N., Lo T.C.N. (2003): Neuropsychiatric non-motor aspects of Parkinson's disease. *Postgraduate Medical Journal* **79**, 561.
- Tian Y., He Y., Song W., Zhang E., Xia X. (2017): Neuroprotective effect of deferoxamine on N-methyl-d-aspartate-induced excitotoxicity in RGC-5 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **49**, 827-834.
- Tse D.C., McCreery R.L., Adams R.N. (1976): Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *Journal of Medicinal Chemistry* **19**, 37-40.
- Tysnes O.B., Storstein A. (2017): Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* **124**, 901-905.
- Van Kampen J.M., McGeer E.G., Stoessl A.J. (2000): Dopamine transporter function assessed by antisense knockdown in the rat: protection from dopamine neurotoxicity. *Synapse* **37**, 171-178.
- Wanpen S., Kooncumchoo P., Shavali S., Govitrapong P., Ebadi M. (2007): Salsolinol, an endogenous neurotoxin, activates JNK and NF-kappaB signaling pathways in human neuroblastoma cells. *Neurochemical Research* **32**, 443-450.
- Wasik A., Romanska I., Michaluk J., Antkiewicz-Michaluk L. (2015): Chronic salsolinol administration prevents the behavioral and neurochemical effects of L-DOPA in rats. *Neurotoxicity Research* **27**, 399-410.
- Weinstein B., Solomon F. (1990): Phenotypic consequences of tubulin overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*: differences between alpha-tubulin and beta-tubulin. *Molecular and Cellular Biology* **10**, 5295-5304.

Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J. (2011): Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology* **26 Suppl 1**, S1-58.

Yamamoto T., Suzuki T., Kobayashi A., Wakabayashi J., Maher J., Motohashi H., Yamamoto M. (2008): Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 2758-2770.

Webové zdroje:

Chemical Computing Group ULC (2009): Flexible Alignment. *Moe 2018 Tutorials*.

Dostupné z: https://www.chemcomp.com/moe/help/2018/index_tut.html (1.5.2019)

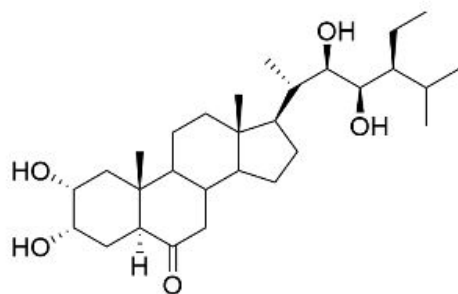
7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

6-OHDA	6-hydroxydopamin
AADC	dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin
AD	Alzheimerova choroba
AMPA	kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová
ARE	proteiny antioxidační odpovědi (<i>Antioxidant response element</i>)
ATRA	kyselina <i>all trans</i> retinová
BAK1	kinasa asociovaná s BRI1
BAX	protein X asociovaný s lymfomem B-buněk (<i>BCL2-Associated X Protein</i>)
Bcl2	lymfom B-buněk 2 (<i>B-cell lymphoma</i>)
BRI 1	Brassinosteroid-insensitive
COMT	katechol- <i>O</i> -methyltransferasa
DAT	dopaminový transporter
DFO	deferoxamin
DHE	dihydroethidium
DJ-1 protein	peptidasa kódovaná genem <i>PARK7</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykoltetraoctová
ER	endoplasmatické reticulum
F	skóre podobnosti
FBS	fetální bovinní sérum
GSH	glutathion
GPx	glutathionperoxidasa
HD	Huntingtonova choroba
iGluRs	ionotropické glutamátové receptory
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-6	interleukin 6
KAR	kainátový receptor
KAT	katalasa
Keap1	z angl. <i>Kelch-like erythroid cell-derived protein 1</i>

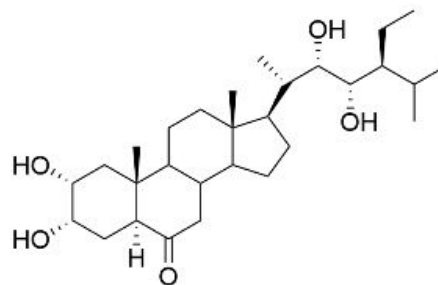
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
LDH	laktátdehydrogenasa
LRRK2	z angl. <i>Leucine rich repeat kinase 2</i>
MAO-B	monoaminoxidasa B
mGluRs	metabotrofické glutamátové receptory
MPPP	1-methyl-4-fenyl-4-propionoxypiperidin
MPP ⁺	methylnfenylpyridin
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NET	norepinefrinový transporter
NF-E2	z angl. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
Nrf2	z angl. <i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NMDA	N-methyl-D-Asp
OS	oxidativní stres
<i>PARK2</i>	<i>Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
<i>PARK7</i>	gen Parkinsonovy choroby 7
<i>PARK8</i>	gen Parkinsonovy choroby 8
PI	propidium jodid
<i>PINK1</i>	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PD	Parkinsonova choroba
ROS	reaktivní formy kyslíku
S	součet F a U skóre u flexibilního zarovnání
SAR	vztah struktury a activity látky
<i>SNCA</i> gen	gen pro synuklein α
SOD	superoxiddismutasa
TNF- α	faktor nádorové nekrosy α
U	skóre deformační energie ligandů
Xc ⁻	antiporter Cyss/Glu

8 PŘÍLOHY

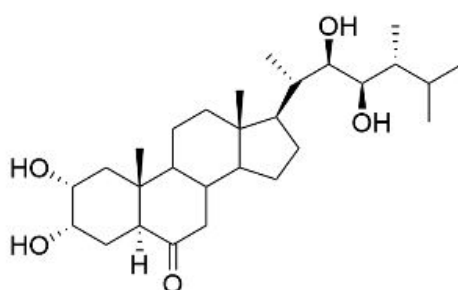
Příloha 1



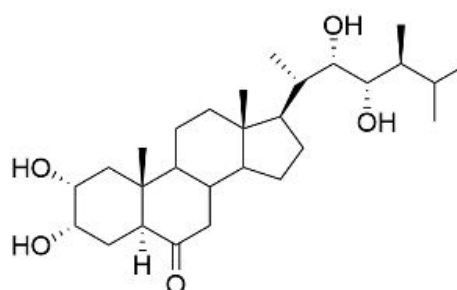
R,R-28-Homocastasteron



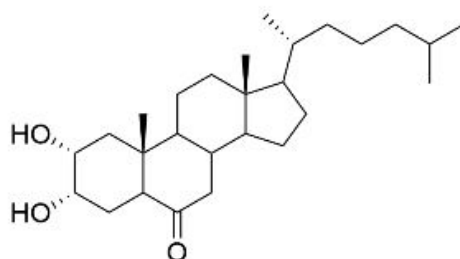
S,S-28-Homocastasteron



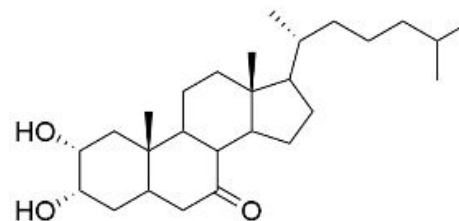
24-Epicastasteron



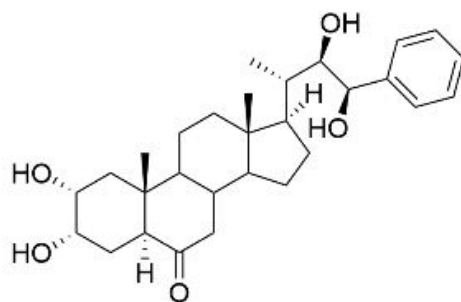
Trisepicastasteron



MK 238

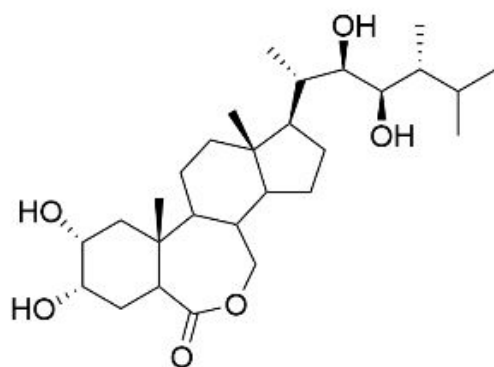


MK 238-7

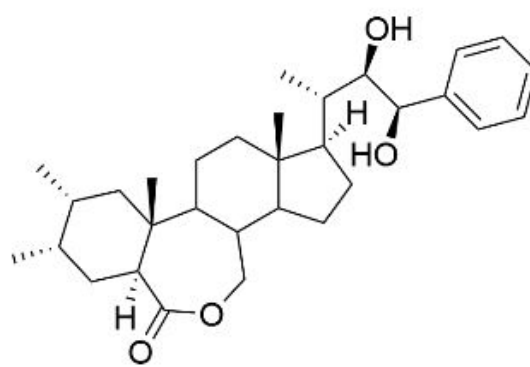


MK 259

Příloha 2

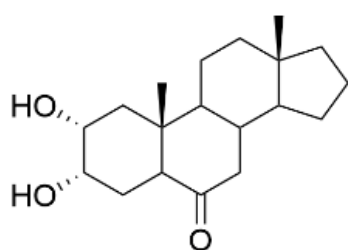


24-Epibrassinolid

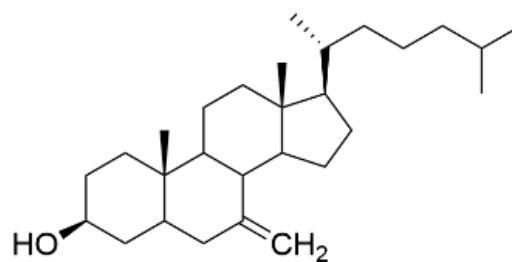


MK 266

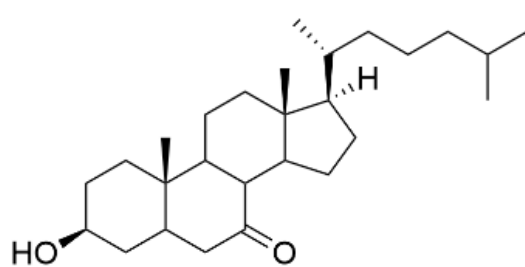
Příloha 3



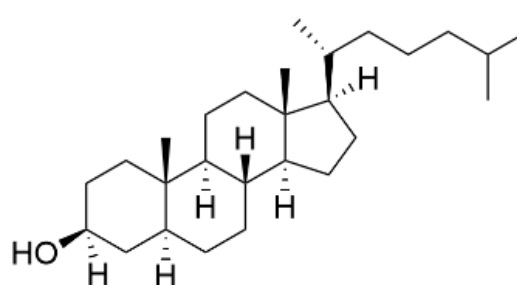
4368



2822

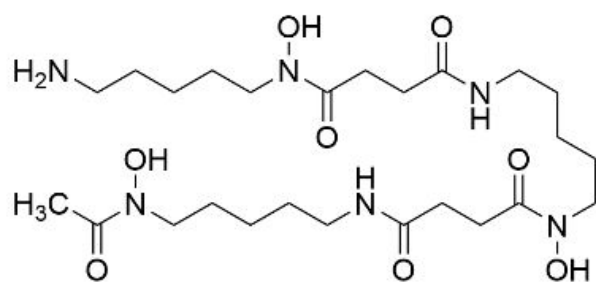


CH-7

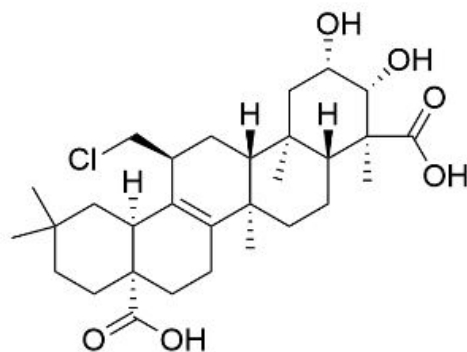


Cholestanol

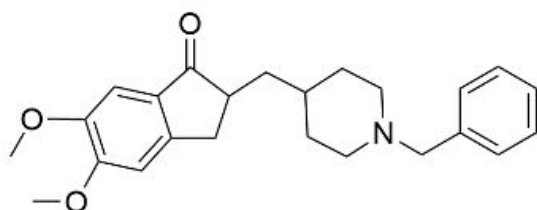
Příloha 4



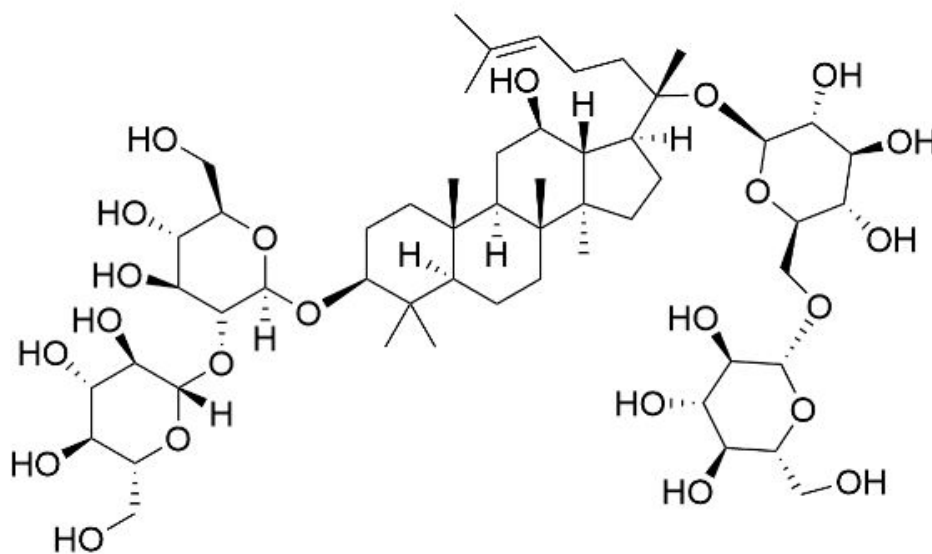
Deferoxamin



Tenuigenin



Donepezil



Ginsenosid Rb1