

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Syntéza dimerů 2,6-disubstituovaných
derivátů purinu s různými linkery a
testování jejich biologické aktivity**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Eliška Bartelová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2024

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Bartelová
Název práce	Syntéza dimerů 2,6-disubstituovaných derivátů purinu s různými linkery a testování jejich biologické aktivity
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	Purinové deriváty se v současnosti hojně zkoumají z hlediska jejich potenciální neuroprotektivní aktivity. Bylo připraveno šest dimerů 2,6-disubstituovaných derivátů purinu s různými linkery a jeden monomer a pět z nich bylo postoupeno k biologickému testování na buněčné linii SH-SY5Y. Látky prokázaly protektivní účinek potlačující buněčnou smrt. Nejúčinnějším produktem se ukázala být látka EC14 . Působí proti buněčné smrti, oxidativnímu stresu a potlačuje apoptosu.
Klíčová slova	Neurodegenerativní onemocnění, Huntingtonova choroba, purin
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eliška Bartelová
Title of thesis	Synthesis of dimers of 2,6-disubstituted purine derivatives with different linkers and test of their biological activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	Purine derivatives are widely investigated for their potential neuroprotective activity. Six dimers of 2,6-disubstituted purine derivatives with different linkers and one monomer were prepared and five of them were advanced for biological testing on the SH-SY5Y cell line. The substances showed a protective effect by suppressing cell death. The most effective product turned out to be EC14 , which suppresses cell death, oxidative stress and apoptosis.
Keywords	Neurodegenerative diseases, Huntington's disease, purine
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 17. 5. 2024

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D., za jeho odborné vedení a přínosné rady jak v průběhu experimentální části, tak při samotném psaní. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Gabrielu Gonzalezovi, Ph.D., za vedení a pomoc při zhotovení a interpretaci biologické části této práce. Velký dík patří rovněž Bc. Ditě Jordové za veškerou pomoc poskytnutou při provádění jednotlivých experimentů a Mgr. Heleně Kordinové a Mgr. Kristýně Šomodiové za všechny poskytnuté rady a pomoc.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle.....	10
2 Teoretická část	11
2.1 Neurodegenerace	11
2.1.1 Příčiny neurodegenerace	11
2.1.2 Typy neurodegenerativních onemocnění	13
2.1.2.1 Alzheimerova choroba	13
2.1.2.2 Parkinsonova choroba	14
2.1.2.3 Amyotrofická laterální skleróza	15
2.1.2.4 Huntingtonova choroba	16
2.1.3 Terapie neurodegenerativních onemocnění.....	17
2.2 Heterocykly a jejich neuroprotektivní aktivita.....	21
3 Experimentální část	23
3.1 Chemická část	23
3.1.1 Materiál.....	23
3.1.1.1 Chemikálie	23
3.1.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky	23
3.1.2 Metody.....	24
3.1.2.1 Obecný postup syntézy dimerů 2,6-disubstituovaných derivátů purinu	24
3.1.2.2 Syntéza látek EC1A a EC1B	25
3.1.2.3 Syntéza látek EC2A a EC2B	26
3.1.2.4 Syntéza látky EC3.....	27
3.1.2.5 Syntéza látky EC5.....	28
3.1.2.6 Syntéza látek EC7A a EC7B	29

3.1.2.7	Syntéza látek EC8A a EC8B	30
3.1.2.8	Syntéza látek EC9A a EC9B	31
3.1.2.9	Syntéza látky EC10	32
3.1.2.10	Syntéza látky EC12	33
3.1.2.11	Syntéza látky EC13	34
3.1.2.12	Syntéza látky EC14	35
3.2	Biologická část	36
3.2.1	Materiál	36
3.2.1.1	Chemikálie	36
3.2.1.2	Laboratorní přístroje a pomůcky	36
3.2.1.3	Buněčná linie SH-SY5Y	36
3.2.2	Metody	37
3.2.2.1	Obecný postup testování biologické aktivity	37
3.2.2.2	Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu	37
3.2.2.3	Stanovení oxidativního stresu pomocí dihydroethidia	38
3.2.2.4	Stanovení aktivity kaspasy 3	38
3.2.2.5	Stanovení apoptosy pomocí YO-PRO TM -1 jodidu	39
3.2.2.6	Stanovení cytotoxicity testovaných látek	39
3.2.2.7	Vyhodnocení ovlivnění buněk testovanými látkami pomocí konfokálního mikroskopu	39
4	Výsledky a diskuze	41
4.1	Syntéza látek	41
4.2	Testování biologické aktivity	44
5	Závěr	52
	Seznam literatury	54

Seznam zkratek

3NP	3-nitropropionová kyselina
ALS	amyotrofická laterální skleróza
AM	acetoxymethyl
APOE	gen kódující apolipoprotein E
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATRA	<i>all-trans</i> retinová kyselina
BChE	butyrylcholinesterasa
C9orf72	gen kódující protein podílející se na endozomálním transportu nebo opravách DNA
CB1	kanabinoidní receptor 1
CB2	kanabinoidní receptor 2
CTR	kontrolní neovlivněné buňky
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
DHE	dihydroethidium
DJ-1	gen kódující protein 7 Parkinsonovy choroby
DMEM/F12	Dulbeccoho modifikované Eagleho médium obohacené o směs živin F12
DMSO	dimethylsulfoxid
DNAJC13	gen kódující receptorem zprostředkovanou endocytosu
DTT	dithiothreitol
EIF4G1	gen kódující eukaryotický translační iniciační faktor 4 gama 1
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FUS	gen kódující RNA-vázající protein
GBA	gen kódující β -glukocerebrosidasu
HRMS	vysoko-rozlišující hmotnostní spektrometr
HTT	gen kódující huntingtin
CHCHD2	gen kódující protein 2 obsahující doménu dvě spirály svinuté do helixu
iPR	N ⁶ -isopentenyladenosin
K3G	kinetin-3-glukosid
KOMT	katechol-O-methyltransferasa

LRRK2	gen kódující kinasu 2 bohatou na leucinové repetice
MAO-B	monoaminoxidasa B
MPP+	1-methyl-4-fenylpyridinium
NAC	N-acetylcystein
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	nukleární magnetický rezonanční spektrometr
Nrf2	jaderný faktor 2 spjatý s erythroidním faktorem 2
PBS	fosfátový pufr
PI	propidium jodid
PINK-1	gen kódující PTEN indukovanou kinasu 1
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PolyQ	polyglutamin
SEM	standardní chyba průměru
SNCA	gen kódující α -synuklein
SOD1	gen kódující superoxid dismutasu 1
TARDBP	gen kódující TDP-43
TDP-43	transaktivní DNA vázající protein
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
VMAT2	vezikulární monoaminový transportér 2
VPS35	gen kódující vakuolární třídící protein 35
YO-PRO-1	YO-PRO TM -1 jodid

1 Úvod a cíle

Neurodegenerativní onemocnění jsou různorodé choroby, za jejichž typický znak a příčinu jsou považovány abnormální proteinové agregace. Mezi nejvíce skloňovaná onemocnění patří Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza (ALS) a Huntingtonova choroba. Dosud nebyla vyvinuta léčba těchto onemocnění, přistupuje se pouze k léčbě symptomatické, a proto má velký význam studium a vývoj neuroprotektivních látek.

Jako potenciální neuroprotektivní látky jsou zkoumány např. deriváty purinu. Tato aktivita již byla prokázána např. C2,C6-disubstituovaným-9-benzyl-9H-purinovým derivátům a některým cytokininům.

Dimerní látky představují slibný studijní cíl díky předpokládané současné interakci se dvěma vazebnými místy cílových struktur.

Cíle práce:

1. Provést literární rešerši zaměřující se na neuroprotekcí, neurodegeneraci, deriváty purinu a Huntingtonovu chorobu.
2. Syntetizovat dimery 2,6-disubstituovaných derivátů purinu s různými linkery.
3. Provést testování biologické aktivity připravených látek se zaměřením na neuroprotektivní vlastnosti.

2 Teoretická část

2.1 Neurodegenerace

Neurodegenerativní onemocnění je pojmenování skupiny různorodých patologických stavů vyznačujících se ztrátou neuronů centrálního či periferního nervového systému. Základním průvodním znakem jsou typické proteinové abnormality v nervové soustavě. Neurony nejsou schopny autoopravy z důvodu jejich terminální diferenciaci. Tato onemocnění postihují především starší pacienty a jsou tedy závažným problémem vzhledem k současnému stárnutí populace. Příkladem neurodegenerativního onemocnění je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba nebo ALS.

Mezi znaky neurodegenerativních onemocnění patří patologické shlukování proteinů, nesprávná funkce synaptických a neuronových sítí, odchylky v proteostáze a cytoskeletu, abnormální energetický metabolismus, chyby RNA a DNA, zánět a v neposlední řadě samotný zánik neuronů (Wilson III et al., 2023).

2.1.1 Příčiny neurodegenerace

Mezi neurodegenerativními onemocněními a vysokým věkem je úzká souvislost. V mozku starších lidí byla prokázána přítomnost různých pozměněných proteinů, např. β -amyloidu tvořícího amyloidní plaky, hyperfosforylovaného tau proteinu, transaktivního DNA vázajícího proteinu (TDP-43) nebo α -synukleinu. Tyto proteinové abnormality se dají považovat za příčinu neurodegenerace, ale vyskytují se i u pacientů bez kognitivního poškození, proto je nelze považovat za její jednoznačné markery (Elobeid et al., 2016).

β -amyloid je peptidový fragment o velikosti 40 nebo 42 aminokyselin (Selkoe, 2000), jehož shlukováním vznikají amyloidové plaky, tzv. senilní plaky, které jsou považovány za hlavní znak a příčinu Alzheimerovy choroby (Reiss et al., 2018). β -amyloid je odvozen od amyloidního prekurzorového proteinu (APP), integrálního membránového glykoproteinu. APP se podílí na regulaci tvorby a opravy synapsí (Priller et al., 2006). Je štěpen pomocí β -sekrety a γ -sekrety na β -amyloid (Chen et al., 2017). Po proteolytickém vzniku β -amyloidu z APP se může vyskytovat

v několika formách, např. jako monomer či oligomer. Pro patologický stav je typický výskyt v tzv. amyloidních fibrilách (Selkoe, 2000). Právě ty se shlukují do amyloidních plaků, zatímco rozpustné oligomery se šíří po celém mozku (Chen et al., 2017). Amyloidní plaky mohou narušovat přenos signálu mezi dvěma neurony a mohou způsobovat imunitní reakci nebo angiopatii (Ashrafian et al., 2021).

Po rozštěpení APP je β -amyloid ve formě oligomeru uvolněn do extracelulárního prostředí, kde může být odbourán pomocí genu kódujícího apolipoprotein E (APOE) nebo může být vyloučen astrocyty. Část těchto oligomerů se ale v extracelulárním prostoru shlukuje a tvoří fibrily, z nichž se vytváří plaky. Amyloidní plaky mohou být degradovány pomocí makrofágů a mikroglíí nebo endoproteasami z astrocytů. Neodbourané oligomery z amyloidních plaků jsou neurotoxické pro blízké synapse a indukují shlukování tau proteinu (Masters et al., 2015).

Tau protein je protein asociovaný s mikrotubuly, nachází se především v neuronech, konkrétně v bílé hmotě mozkové, tedy v axonech (Binder et al., 1985), kde stabilizuje mikrotubuly (Drubin & Kirschner, 1986). Tau protein se může vyskytovat ve fosforylovaném nebo defosforylovaném stavu. Na rozdíl od fosforylované formy ta defosforylovaná zajišťuje mnohem rychlejší polymerizaci tubulinu (Lindwall & Cole, 1984).

Fosforylovaný tau protein tvoří neurofibrilární klubka. Jejich tvorba je úzce spjata i s amyloidními plaky, protože právě ty spouští procesy, které v důsledku v buňce aktivují kinasy, jež fosforylují tau protein. Po fosforylaci se tau protein uvolní z mikrotubulů a shlukuje se do neurofibrilárních klubek. Při nedostatku tohoto proteinu se mikrotubuly stávají slabými, narušuje se jejich funkce a může dojít až k apoptose (Ashrafian et al., 2021).

Transaktivní DNA vázající protein, TDP-43, byl prokázán jako součást abnormálních ubiquitinových inkluzí u frontotemporální lobární degenerace a ALS (Arai et al., 2006). TDP-43 je heterogenní ribonukleoprotein za fyziologických podmínek mimo jiného např. regulující metabolismus RNA nebo opravy DNA (Liao et al., 2022).

V mozku pacientů postižených Parkinsonovou chorobou byla prokázána přítomnost tzv. Lewyho tělísek, jejichž hlavní složkou je α -synuklein (Spillantini et al., 1998). Je to presynaptický neuronální protein kódovaný genem SNCA. Patologický α -synuklein není specifický pouze pro Parkinsonovu chorobu, ale

vyskytuje se i u řady jiných synukleinopatií, jako je např. demence s Lewyho tělísky nebo multisystémová atrofie (Stefanis, 2012). Patologický vliv α -synukleinu spočívá v jeho agregaci, kdy se z rozvolněných monomerů stává heterogenní směs protofibril, které předchází fibrilám (Periquet et al., 2007). Ty se shlukují do Lewyho tělísek v perikaryonu a Lewyho neuritů v neuronových výběžcích (Kalia & Lang, 2015). Agregovaný α -synuklein byl prokázán jako dopaminergní neurotoxická látka (Periquet et al., 2007).

2.1.2 Typy neurodegenerativních onemocnění

2.1.2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou demence. Odhaduje se, že v roce 2020 trpělo tímto onemocněním 6,07 milionů obyvatel USA starších 65 let a v roce 2060 se očekává nárůst až na 13,85 milionů (Rajan et al., 2021).

Alzheimerova choroba je neurodegenerativní onemocnění postihující velkou část mozkové kůry a hipokampu. Rozlišuje se častější sporadická forma onemocnění, která postihuje právě starší populaci s průměrným věkem nástupu nemoci v 80 letech. Méně než 1 % nemocných ale tvoří pacienti s genetickou autozomálně dominantní formou choroby, která se projevuje průměrně již ve 45. roku života (Masters et al., 2015).

Hlavním příznakem je ztráta paměti nejvýznamnější pro nedávné vzpomínky (krátkodobou paměť), zatímco například procedurální paměť s centrem mimo hipokampus zůstává zachována. Dalším projevem může být změna chování nebo problém s nalezením vhodných slov (Erkkinen et al., 2018).

Klinické fázi Alzheimerovy choroby předchází velmi dlouhá preklinická a prodromální fáze (Masters et al., 2015). Za preklinickou fází onemocnění je považován stav, kdy jsou přítomny markery typické pro Alzheimerovu chorobu u jedince bez kognitivního postižení (Dubois et al., 2016).

Typickým znakem tohoto onemocnění je hromadění nerozpustného β -amyloidu v amyloidních placích v extracelulárním prostoru a cévních stěnách a také intracelulární tvorba neurofibrilárních klubek z fosforylovaného tau proteinu. Charakteristický je rovněž úbytek synapsí a neuronů a pokles specifických

neurotransmiterů (Masters et al., 2015). Významným faktorem jsou také neurozánětlivé reakce, které sice napomáhají odstranění poškozené tkáně, ale ve zvýšené míře naopak způsobují poškození, chronický zánět a zánik neuronů (Pardo-Moreno et al., 2022).

APOE je významný genetický rizikový faktor pozdního nástupu Alzheimerovy choroby, konkrétně jeho alela APOE ϵ 4. Jedná se o gen kódující apolipoprotein E, v lidském těle hojně exprimovaný glykoprotein, jenž se účastní mimo jiného transportu cholesterolu a jiných lipidů, clearance amyloidu nebo neuronové signalizace. Kromě alely APOE ϵ 4 se vymezují i alely ϵ 2 a ϵ 3. U heterozygotů nesoucích jednu alelu ϵ 4 je třikrát vyšší pravděpodobnost nástupu Alzheimerovy choroby, u homozygotů až desetkrát vyšší. Zatímco apolipoprotein 4 působí neurotoxicky, apolipoprotein 3 působí neuroprotektivně (Muñoz, Garner, & Ooi, 2019).

2.1.2.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je typ neurodegenerativního onemocnění, pro něž je typické odumírání dopaminergních neuronů v *substantia nigra pars compacta*. To má za následek úbytek dopaminu v bazálních gangliích, a tedy motorické poruchy. Dalším průvodním znakem je potom Lewyho patologie sestávající z Lewyho tělísek a Lewyho neuritů (Kalia & Lang, 2015).

Mezi klasické projevy tohoto onemocnění patří bradykineze (zpomalení pohybu), svalová ztuhlost, klidový třes nebo posturální nestabilita. Motorickým symptomům mohou předcházet nemotorické symptomy v prodromální fázi onemocnění, která může trvat i 20 let (Kalia & Lang, 2015). Často se jedná o smyslové poruchy zasahující čich, zrak či vnímání bolesti (většinou muskuloskeletální). Dále také deprese, úzkosti a apatie, u většiny pacientů se s postupem onemocnění rozvíjí i demence, přičemž mírnou kognitivní poruchou trpí 25 % pacientů již v počátcích onemocnění. Častá je ortostatická hypotenze, gastrointestinální problémy, detruzorová hyperaktivita a v neposlední řadě nespavost nebo porucha spánku v REM fázi (Pfeiffer, 2016).

Je popsáno několik genů, které se podílí na rozvoji autozomálně dominantní formy onemocnění. Hojně skloňovaným genetickým rizikovým faktorem

Parkinsonovy choroby je gen SNCA kódující α -synuklein. Další je potom LRRK2 kódující kinasu 2 bohatou na leucinové repetice a jehož mutace jsou nejčastější příčinou autozomálně dominantní Parkinsonovy choroby. Ostatní rizikové geny jsou gen pro vakuolární třídící protein 35 (VPS35), pro eukaryotický translační iniciační faktor 4 gama 1 (EIF4G1), pro receptorem zprostředkovanou endocytosu (DNAJC13) a pro protein 2 obsahující doménu dvě spirály svinuté do helixu (CHCHD2). Příčina autozomálně recesivních forem Parkinsonovy choroby je přisuzována genu parkin, genu pro PTEN indukovanou kinasu 1 (PINK1) a pro protein 7 Parkinsonovy choroby (DJ-1). V tomto případě je nejčastější příčinou mutace v genu parkin. Významným rizikovým faktorem jsou rovněž mutace v GBA kódujícím β -glukocerebrosidasu (Kalia & Lang, 2015).

2.1.2.3 Amyotrofická laterální skleróza

ALS je fatální typ neurodegenerativního onemocnění vyznačující se postižením motoneuronů mozku, mozkového kmene i míchy. Hlavním symptomem tohoto onemocnění je svalová slabost progredující až k úmrtí z důvodu respiračního selhání, a to již 2 až 4 roky od stanovení diagnózy (Goutman et al., 2022). Postihuje horní i dolní motoneuron. Svalová slabost se projevuje na pohybu končetin, dysfagii, dysartrií a dýchání (Feldman et al., 2022).

ALS způsobuje i kognitivní poškození, konkrétně jazykový deficit nebo deficit v oblasti exekutivních funkcí. Často ALS doprovází frontotemporální demence (Abrahams et al., 2014).

Nejčastěji jsou ALS postiženi jedinci ve věku od 60 do 79 let. Je odhadováno, že celosvětově na tuto nemoc v roce 2015 trpělo 222 801 jedinců a do roku 2040 se předpokládá navýšení tohoto počtu o 69 % na 376 674 nemocných (Arthur et al., 2016).

Typickým znakem ALS jsou inkluze posttranslačně modifikovaného nebo zkráceného proteinu TDP-43 v cytoplasmě, přestože se za fyziologických podmínek jedná o jaderný protein (Goutman et al., 2022).

Za velké procento onemocnění ALS jsou zodpovědny geny C9orf72 (kóduje protein podílející na endozomálním transportu nebo opravách DNA), SOD1 (kóduje superoxid dismutasu 1), TARDBP (kóduje TDP-43) a FUS (kóduje RNA-vázající

protein; Goutman et al., 2022). Geny C9orf72, TARDBP a FUS jsou příčinou narušení metabolismu RNA kvůli shlukování proteinů vázajících DNA a RNA. Dalšími patofyziologickými znaky je narušení proteostázy a autofagie, změny cytoskeletu a genem SOD1 vyvolaná mitochondriální dysfunkce (Feldman et al., 2022).

2.1.2.4 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba je monogenní neurodegenerativní onemocnění vyznačující se autozomálně dominantní dědičností. Je zapříčiněna rozšířenou trinukleotidovou CAG repeticí v genu HTT kódujícím protein huntingtin, které odpovídá polyglutaminová (polyQ) sekvence tohoto proteinu. Fyziologická délka repetice je od 6 do 35 jednotek, při délce nad 40 jednotek se spouští chorobný proces (Bates et al., 2015).

Studie v Německu v roce 2019 uvedla dvouletou incidenci Huntingtonovy choroby 1,8 na 100 000 jedinců a dvouletou prevalenci 9,2 na 100 000 jedinců. Jako nejčastější průvodní jev onemocnění byla zjištěna deprese, a to u 42,9 % pozorovaných osob (Ohlmeier et al., 2019). Medián přežití od nástupu klinických příznaků je 35 let, od nástupu motorických obtíží 24 let a průměrný věk dožití pacientů je 58 let. Nejčastější příčinou smrti bývá zápal plic nebo jiné infekce (Rodrigues et al., 2017).

Charakteristickým symptomem je motorická porucha, ale způsobuje i kognitivní a neuropsychiatrické obtíže. Motorická dysfunkce sestává jak z poruchy mimovolných pohybů, chorey, tak z poruchy volných pohybů. Postižení jedinci mají problémy s pozorností, plánováním nebo emočním porozuměním. Mohou trpět depresí a apatií (Bates et al., 2015).

Významným patogenetickým znakem Huntingtonovy choroby je fragmentace huntingtinu (Bates et al., 2015). Z HTT vzniká kompletní huntingtin a N-terminální fragment, tzv. HTT exon 1. Huntingtin je následně proteolyticky degradován na proteinové fragmenty, které vstupují do jádra buňky, kde se oligomerizují a agregují, čímž tvoří inkluze. Vlivem těchto jaderných procesů dochází k narušení transkripce. Část proteolyticky vzniklých fragmentů agreguje přímo v cytoplazmě, což je vlivem progredujícího onemocnění ještě zesíleno (McColgan & Tabrizi, 2018).

Mutantní huntingtin způsobuje dysfunkci neuronů a v konečném důsledku i jejich zánik. HTT exon 1 a tvorba agregátů ovlivňují proteostázu, axonální přenos, transkripci, translaci, mitochondriální funkci a synaptické spoje (McColgan & Tabrizi, 2018).

Nejčastější diagnostika Huntingtonovy choroby je za využití genetického testu na přítomnost abnormálního počtu CAG repetit v HTT. Dalším důležitým kritériem je i zhodnocení klinických symptomů a rodinná anamnéza (Bates et al., 2015). Vhodným diagnostickým prostředkem jsou ale i zobrazovací metody jako magnetická rezonance, protože u postižených jedinců je patrný úbytek mozkové tkáně, který začíná již mnoho let před faktickou diagnózou onemocnění u pacienta. Nejvýznamnější rozdíl mezi jedincem nemocným a zdravým je ve striatální tkáni, ale úbytek bílé hmoty mozkové je rovněž značný (Paulsen et al., 2010).

2.1.3 Terapie neurodegenerativních onemocnění

Léčba neurodegenerativních onemocnění se v současnosti stále omezuje na léčbu symptomů (Erkkinen et al., 2018).

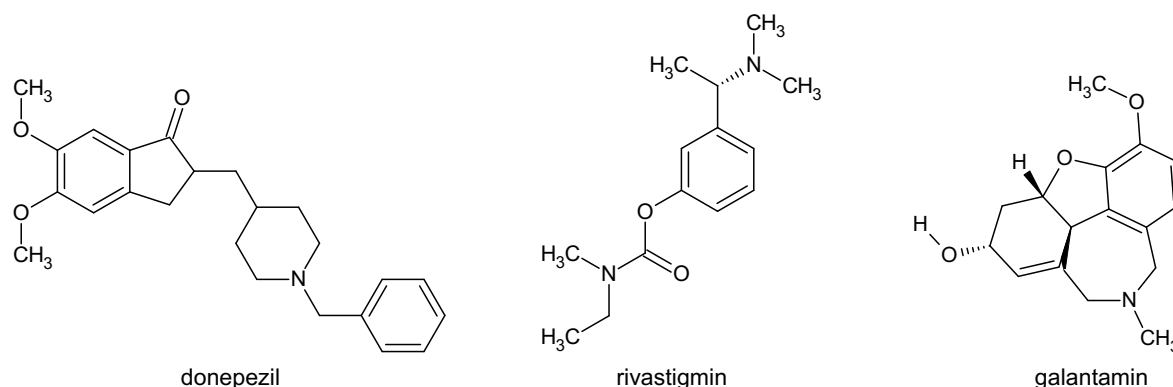
Jedním z problémů léčby neurodegenerativních onemocnění je samotný transport případného léčiva do CNS. Jejich uvolňování totiž brání hematoencefalická a hematolikvorová bariéra. Řešením mohou být invazivní metody, injektování léčiva přímo do mozku nebo např. intranazální aplikace. Značný potenciál pro léčbu neurodegenerativních onemocnění má aplikace léčiv pomocí nanočástic (Akhtar et al., 2021).

Alzheimerova choroba

Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil pouze několik léků na Alzheimerovu chorobu, např. aducanumab, lecanemab, donepezil, galantamin, rivastigmin, memantin a lék kombinující memantin a donepezil (Pardo-Moreno et al., 2022).

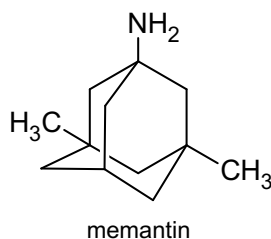
Donepezil, rivastigmin a galantamin (Obr. 1) jsou inhibitory acetylcholinesterasy. Zvyšují hladinu acetylcholinu, neurotransmiteru, který má vliv

na kognici a jehož hladina je u jedinců trpících touto chorobou snížena (Erkkinen et al., 2018).



Obr. 1: Struktury donepezilu, rivastigminu a galantaminu

Memantin (Obr. 2) je antagonist N-methyl-D-aspartátového (NMDA) receptoru a zpomaluje progresi u pacientů se středně těžkou až těžkou formou onemocnění (Erkkinen et al., 2018).



Obr. 2: Struktura memantinu

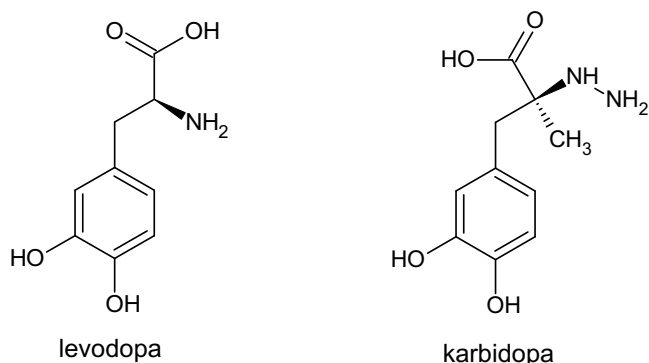
Aducanumab a lecanemab jsou anti-amyloidové monoklonální protilátky. Jsou to jediná léčiva, která působí přímo na molekulárně biologický aspekt Alzheimerovy choroby, čímž nemoc modifikují, na rozdíl od ostatních, které cílí pouze na symptomatickou léčbu. Byl prokázán jejich účinek na redukci amyloidních plaků, čímž zpomalují progresi onemocnění (Cummings, 2023).

Parkinsonova choroba

Léčba Parkinsonovy choroby cílí především na nedostatek dopaminu v *substantia nigra* a tedy na motorické příznaky (Kalia & Lang, 2015).

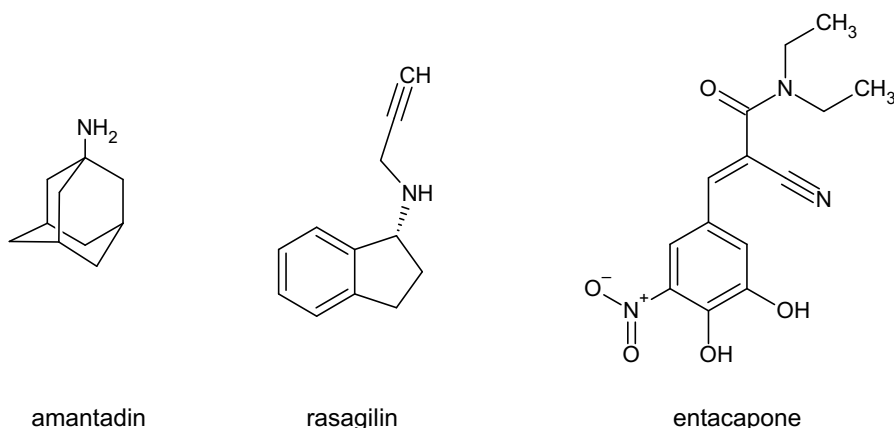
Dosud nejúčinnějším lékem je levodopa (Obr. 3) patřící do skupiny prekurzorů dopaminu. Při léčbě se využívá její přeměny na dopamin pomocí striatálních enzymů. Užívání tohoto léčiva ale provází mnoho nežádoucích účinků, a proto se téměř vždy podává v kombinaci s dalšími léčivy, např. s karbidopou (Obr. 3), dalším

dopaminovým prekurzorem, který inhibuje předčasnou přeměnu levodopy na dopamin (Cacabelos, 2017).



Obr. 3: Struktury levodopy a karbidopy

Dalšími využívanými antiparkinsoniky jsou dopaminergní léky, např. amantadin (Obr. 4). Podávají se také inhibitory monoaminoxidas B (MAO-B), např. rasagilin (Obr. 4), protože MAO-B je zodpovědná za metabolismus dopaminu. Inhibitory katechol-O-methyltransferasy (KOMT), např. entacapone (Obr. 4), prodlužují udržení hladiny levodopy v plazmě (Cacabelos, 2017).



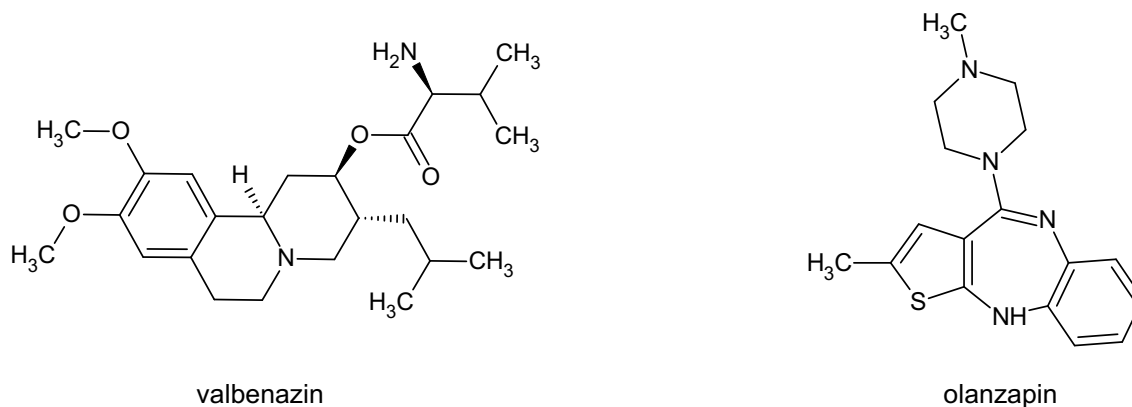
Obr. 4: Struktury amantadinu, rasagilinu a entacapone

Amyotrofická laterální skleróza

Pro pacienty trpící ALS je v současné době schváleno pouze několik léčiv, nejvýznamnější jsou riluzol a edaravon (Obr. 5). Riluzol je antagonist glutamátu prodlužující dobu přežití zhruba o 3 měsíce (Bensimon et al., 1994). Edaravon je látka, která eliminuje reaktivní kyslíkové formy a působí tak, že zpomaluje zhoršování motorických funkcí. Přesný mechanismus účinku obou léků dosud není znám (Jaiswal, 2019).

Prokázaný účinek má i valbenazin (Obr. 7), rovněž ze skupiny inhibitorů VMAT2 (Stimming et al., 2023).

Pacientům s rozvinutými depresemi či psychózou jsou podávána neuroleptika, např. olanzapin (Obr. 7), který má částečný účinek i na léčbu chorey (Paleacu et al., 2002).



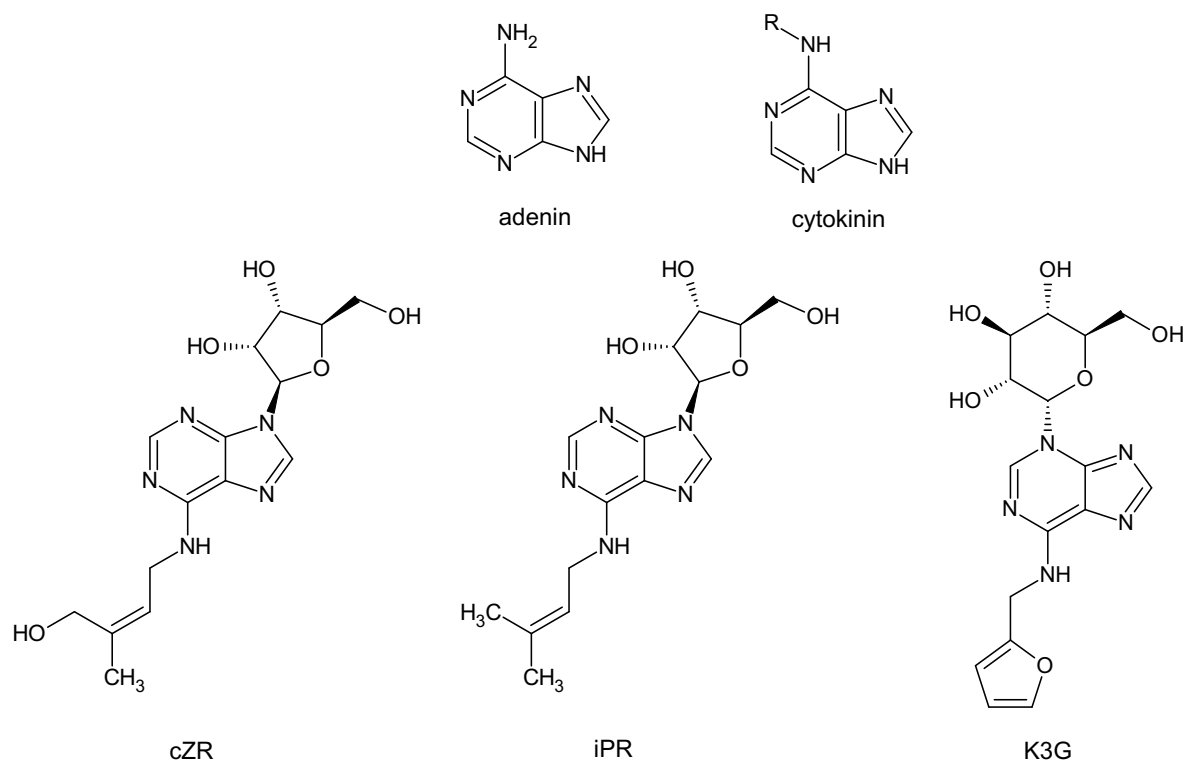
Obr. 7: Struktury valbenazinu a olanzapinu

2.2 Heterocykly a jejich neuroprotektivní aktivita

Heterocyklické sloučeniny jsou základem velkého množství biologicky aktivních látek, významný podíl tvoří především dusíkaté heterocykly. Jejich výhodou je stabilita, účinnost a schopnost dusíku se prostřednictvím vodíkových můstků vázat na DNA (Heravi & Zadsirjan, 2020).

Byla prokázána antineurodegenerativní aktivita derivátů purinu, konkrétně C2,C6-disubstituovaných-9-benzyl-9H-purinových derivátů. Těmto látkám byl prokázán účinek zvyšující životaschopnost neuronů, neuroprotektce a snížení oxidativního stresu. Také aktivují transkripční faktor Nrf2 (jaderný faktor 2 spjatý s erythroidním faktorem 2; Gonzalez et al., 2021a)

Od purinu jsou odvozené rovněž rostlinné hormony cytokininy. Jedná se o látky na bázi adeninu substituované v poloze 6 různými substituenty (Obr. 8). Cytokininy vykazují antioxidační aktivitu, což je stěžejní pro výzkum léčby neurodegenerativních onemocnění, pro něž je oxidativní stres signifikantní. Cytokininům kinetin-3-glukosidu (K3G), *cis*-zeatin ribosidu (cZR) a N⁶-isopentenyladenosinu (iPR) byla prokázána neuroprotektivní aktivita (Obr. 8; Gonzalez et al., 2021b).



Obr. 8: Struktura adeninu, obecná struktura cytokininu a vybrané cytokininy

3 Experimentální část

3.1 Chemická část

3.1.1 Materiál

3.1.1.1 Chemikálie

Cyklohexan, dichlormethan, ethanol, chloroform, methanol, uhličitan draselný – vše od firmy Penta chemicals unlimited. 1,12-dibromdodekan, 1,4-dioxan, 1,5-dibrompentan, 2,6-dichlorpurin, 4,4'-bis(bromomethyl)-bifenylyl, bis(2-(2-chloroethoxy)ethyl) ether, dibromo-*p*-xylen, ethylacetát, heptan, manganistan draselný, N,N-dimethylformamid, pyrrolidin - vše od firmy Sigma-Aldrich. EH6, VM583 – z knihovny Laboratoře růstových regulátorů.

3.1.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytické váhy (Sartorius), digestoř (Merci), hliníkové TLC destičky potažené silikagelem (Merck), horkovzdušná pistole (Steinel), lyofilizátor (Gregor instruments), magnetická míchačka s ohřevem (IKA), nukleární magnetický rezonanční spektrometr (NMR, Jeol), rotační vakuová odparka (Heidolph), silikagel pro kolonovou chromatografii (Lach-ner), skleněné preparativní desky potažené silikagelem (Merck), ultrazvuková lázeň (Kraintek), UV lampa s komorou (Spectroline), vakuová pumpa (Vacuubrand), vysoko-rozlišující hmotnostní spektrometr (HRMS) Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific).

3.1.2 Metody

3.1.2.1 Obecný postup syntézy dimerů 2,6-disubstituovaných derivátů purinu

Reakce probíhaly pod argonovou atmosférou. Po provedené syntéze byly vždy průběh reakce a čistota produktu zkontrolovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Stejným způsobem byla ověřována vhodnost mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a vyvinuté destičky byly analyzovány UV detekcí. Před samotným přečištěním bylo odpařeno rozpouštědlo a surový produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií za využití stacionární fáze silikagelu a vhodně zvolené mobilní fáze. V některých případech byla použita preparativní TLC. Produkty byly ve formě bílého prášku, v případě olejovitých látek byly produkty převedeny do pevného stavu pomocí lyofilizace v 1,4-dioxanu. Výsledné produkty byly analyzovány na NMR a HRMS.

NMR spektra byla měřena na JEOL JNM-ECA 500 (JEOL, Tokyo, Japonsko; ^1H , 500 MHz; ^{13}C , 125 MHz) spektrometru vybaveném 5mm JEOL Royal sondou. ^1H NMR a ^{13}C NMR chemický posun (δ) byly kalibrovány za využití tetramethylsilanu (^1H δ = 0 ppm) nebo rozpouštědla: CDCl_3 (^1H δ = 7,27 ppm, ^{13}C δ = 77,00 ppm) nebo DMSO-d_6 (^1H δ = 2,46 ppm, ^{13}C δ = 40,00 ppm). Chemický posun je udáván v ppm (δ -měřítko), interakční konstanty (J) v Hz. Všechny hodnoty byly získány analýzou prvního řádu a NMR data byla zpracována za využití ACD/NMR Processor Academic Edition (ver. 12.01).

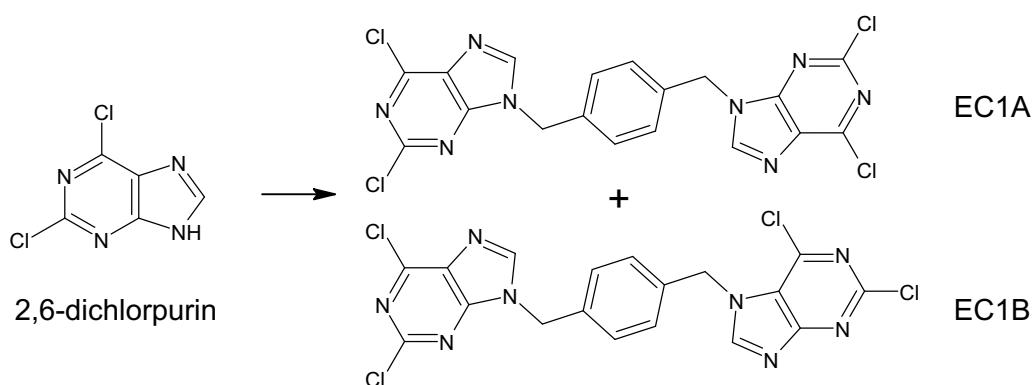
Všechny vzorky byly měřeny vysoko-rozlišujícím hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) s ionizací elektrosprejem metodou přímého nástřiku.

3.1.2.2 Syntéza látek EC1A a EC1B

K 2,6-dichlorpurinu (100 mg, 0,53 mmol) byl přidán dibromo-*p*-xylen (70 mg, 0,27 mmol) a uhličitán draselný (110 mg, 0,80 mmol) (Obr. 9). Směs byla rozpuštěna v dimethylformamidu (3 ml) a pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Pro přečištění produktu a oddělení **EC1A** a **EC1B** sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 2% až 3% methanol v chloroformu. **EC1A** i **EC1B** byly promyty chloroformem. Výtěžek byl 81 mg **EC1A** (64 %) a 35 mg **EC1B** (28 %).

1,4-Bis((2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)methyl)benzen (EC1A): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,47 (s, 4H); 7,33 (s, 4H); 8,82 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 46,72 (2 \times C); 128,10 (4 \times C); 135,58 (2 \times C); 148,42 (2 \times C); 149,81 (2 \times C); 151,13 (2 \times C); 153,38 (2 \times C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 478,9861; nalezeno 478,9858.

2,6-Dichlor-9-(4-((2,6-dichlor-7H-purin-7-yl)methyl)benzyl)-9H-purin (EC1B): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 5,48 (s, 2H); 5,71 (s, 2H); 7,20 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 7,23 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz); 8,92 (s, 1H); 9,02 (s, 1H). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 46,71; 49,20; 121,90; 127,11 (2 \times C); 128,10 (2 \times C); 130,52; 135,40; 136,37; 143,17; 148,42; 149,81; 151,11; 151,13; 152,87; 153,36; 163,38. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 478,9861; nalezeno 478,9858.



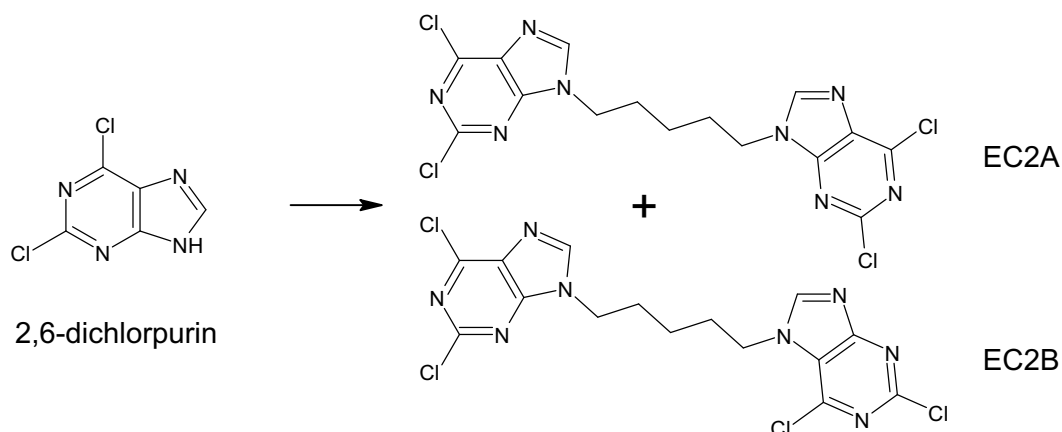
Obr. 9: Syntéza látek EC1A a EC1B

3.1.2.3 Syntéza látek EC2A a EC2B

K 2,6-dichlorpurinu (100 mg, 0,53 mmol) byl přidán 1,5-dibrompentan (61 mg, 0,27 mmol) a uhličitan draselný (146 mg, 1,06 mmol) (Obr. 10). Směs byla rozpuštěna v dimethylformamidu (3 ml) a pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Pro oddělení **EC2A** a **EC2B** sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 1% až 5% methanol v chloroformu. Produkt **EC2A** byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze 2% až 4% methanolu v ethylacetátu a následně promyt heptanem. Produkt **EC2B** byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze 4% až 8% methanolu v ethylacetátu a následně promyt heptanem. Výtěžek byl 72 mg **EC2A** (61 %) a 17 mg **EC2B** (14 %).

1,5-Bis(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)pentan (EC2A): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,42 (m, 2H); 2,02 (dt, 4H, $J = 15,1, 7,6$ Hz); 4,28 (t, 4H, $J = 7,3$ Hz); 8,11 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 23,55; 29,20 (2×C); 44,14 (2×C); 130,66 (2×C); 145,55 (2×C); 151,85 (2×C); 152,92 (2×C); 153,05 (2×C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445,0017; nalezeno 445,0011.

2,6-Dichlor-9-(5-(2,6-dichlor-7H-purin-7-yl)pentyl)-9H-purin (EC2B): ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 1,26 (m, 2H); 1,83-1,91 (m, 4H); 4,24 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz); 4,42 (t, 2H, $J = 7,0$ Hz); 8,73 (s, 1H); 8,85 (s, 1H). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 22,64; 28,28; 30,10; 43,72; 46,44; 121,79; 130,46; 143,09; 148,52; 149,55; 150,79; 150,88; 152,44; 153,52; 163,26. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 445,0017; nalezeno 445,0015.

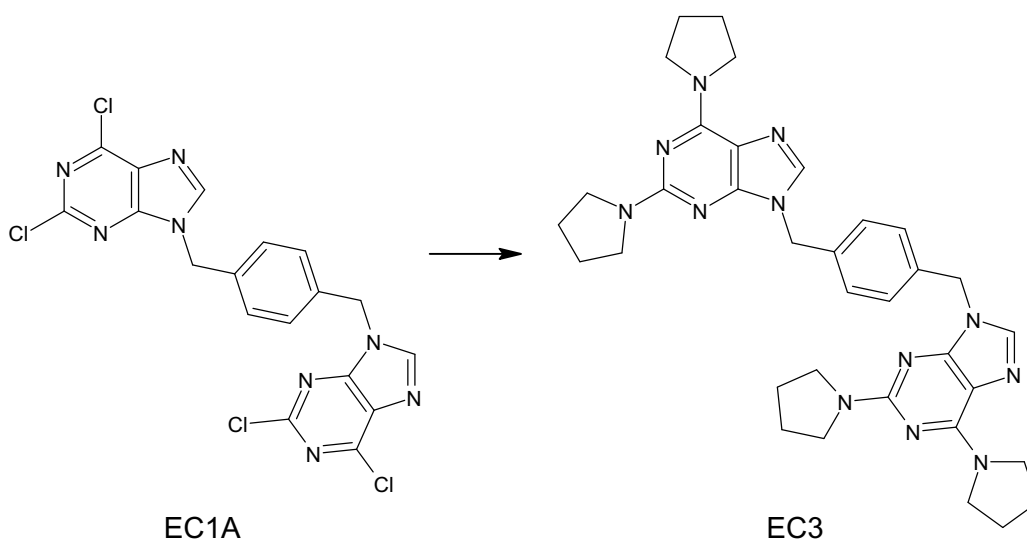


Obr. 10: Syntéza látek EC2A a EC2B

3.1.2.4 Syntéza látky EC3

K látce **EC1A** (81 mg, 0,17 mmol) byl přidán pyrrolidin (3 ml) a směs byla pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za teploty 160 °C (Obr. 11). Pro přečištění produktu sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 2% methanol v chloroformu. Výtěžek byl 68 g **EC3** (65 %).

1,4-Bis((2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)methyl)benzen (EC3): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,90-2,03 (m, 16H); 3,56-3,59 (m, 8H); 3,77 (bs, 4H); 4,03 (bs, 4H); 5,18 (s, 4H); 7,25 (s, 4H); 7,37 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 25,62 (8×C); 45,97 (2×C); 46,69 (4×C); 47,12 (4×C); 113,67 (2×C); 128,16 (4×C); 135,34 (2×C); 136,65 (2×C); 152,91 (2×C); 153,11 (2×C); 158,14 (2×C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{N}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 619,3734; nalezeno 619,3728.

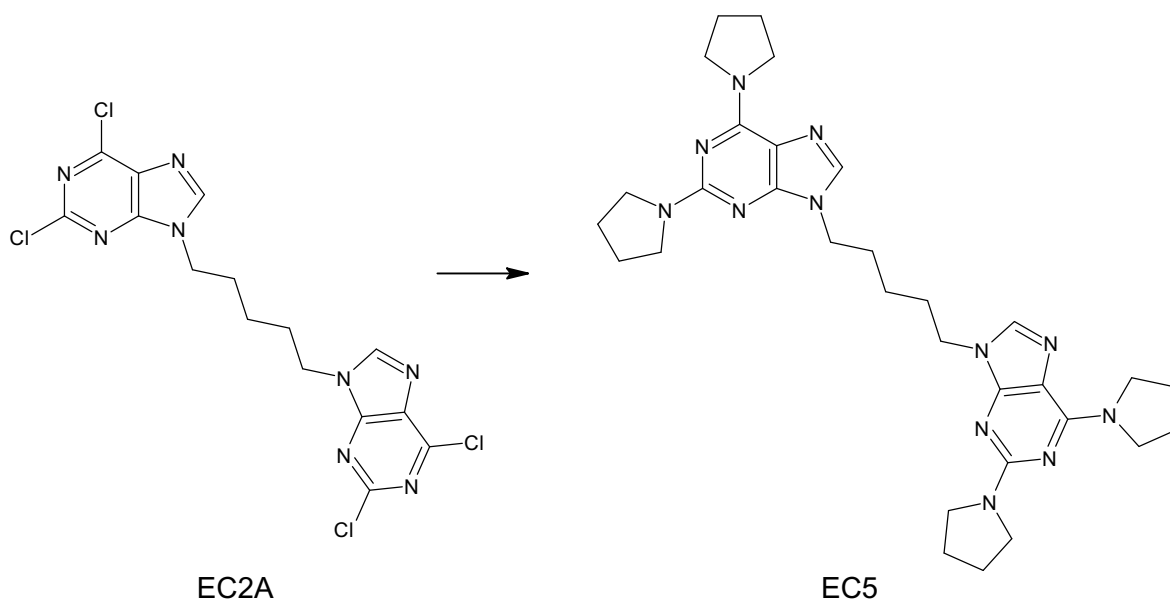


Obr. 11: Syntéza látky EC3

3.1.2.5 Syntéza látky EC5

K látce **EC2A** (72 mg, 0,16 mmol) byl přidán pyrrolidin (3 ml) a směs byla pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za teploty 160 °C (Obr. 12). Po ukončení reakce byl produkt přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze 2% až 3% methanolu v chloroformu. Následně byl produkt promyt heptanem. Výtěžek byl 30 mg **EC5** (32 %).

1,5-Bis(2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)pentan (EC5): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,33 (m, 2H); 1,87-2,06 (m, 20H); 3,56 (m, 8H); 3,77 (bs, 4H); 4,01 (t, 4H, $J = 7,0$ Hz); 4,04 (bs, 4H); 7,38 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 23,47; 24,50 (4×C); 25,61 (4×C); 29,10 (2×C); 42,54 (2×C); 46,67 (4×C); 47,95 (4×C); 113,85 (2×C); 135,60 (2×C); 152,85 (2×C); 153,06 (2×C); 158,00 (2×C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{N}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 585,3890; nalezeno 585,3885.



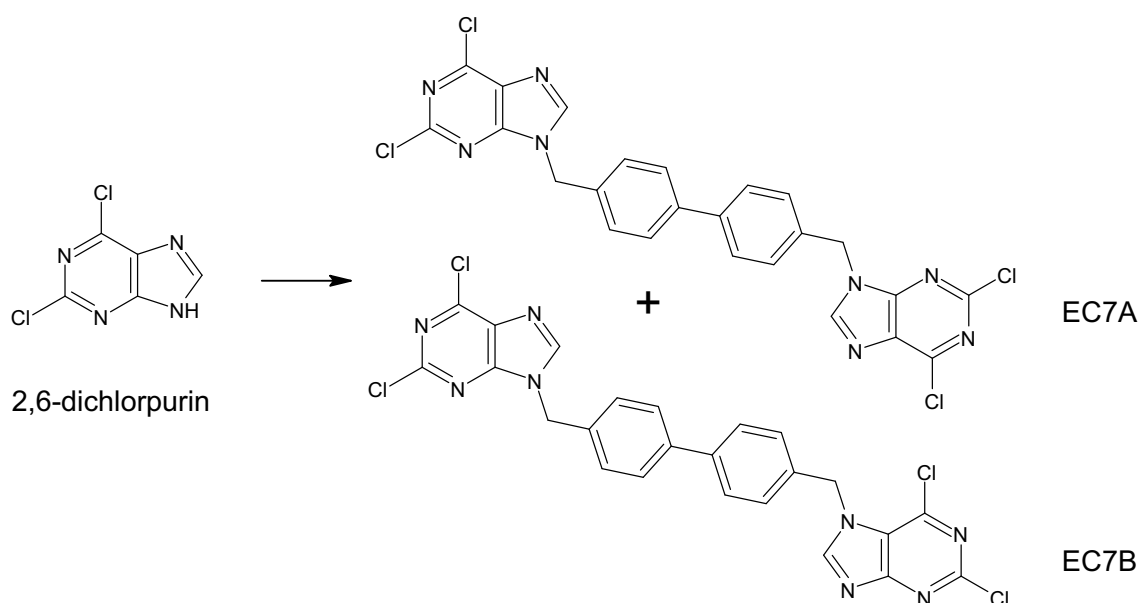
Obr. 12: Syntéza látky EC5

3.1.2.6 Syntéza látek EC7A a EC7B

K 2,6-dichlorpurinu (100 mg, 0,53 mmol) byl přidán 4,4'-bis(bromomethyl)-bifenyl (90 mg, 0,26 mmol) a uhličitan draselný (110 mg, 0,80 mmol) (Obr. 13). Směs byla rozpuštěna v dimethylformamidu (3 ml) a pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Pro přečištění produktů sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 2% methanol v chloroformu. Výtěžek byl 120 mg směsi **EC7A a EC7B** (41 %). Směs izomerů se nepodařilo chromatografií rozdělit, a proto byla použita v dalším kroku. (Pozn. $^1\text{H-NMR}$ signály vypsány ze spektra směsi, $^{13}\text{C-NMR}$ signály pouze pro **EC7A**.)

4,4'-Bis((2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)methyl)-1,1'-bifenyl (EC7A): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,47 (s, 4H); 7,40 (d, 4H, $J = 8,5$ Hz); 7,58 (d, 4H, $J = 8,5$ Hz); 8,11 (s, 2H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 47,66 (2×C); 127,59 (2×C); 128,02 (4×C); 128,65 (4×C); 128,67 (2×C); 133,50 (2×C); 140,87 (2×C); 145,46 (2×C); 150,31 (2×C); 153,12 (2×C).

2,6-dichloro-9-((4'-((2,6-dichloro-7H-purin-7-yl)methyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)methyl)-9H-purine (EC7B): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5,47 (s, 2H); 5,71 (s, 2H); 7,25 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,40 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz); 7,58 (d, 4H, $J = 8,5$ Hz); 8,11 (s, 1H); 8,29 (s, 1H).

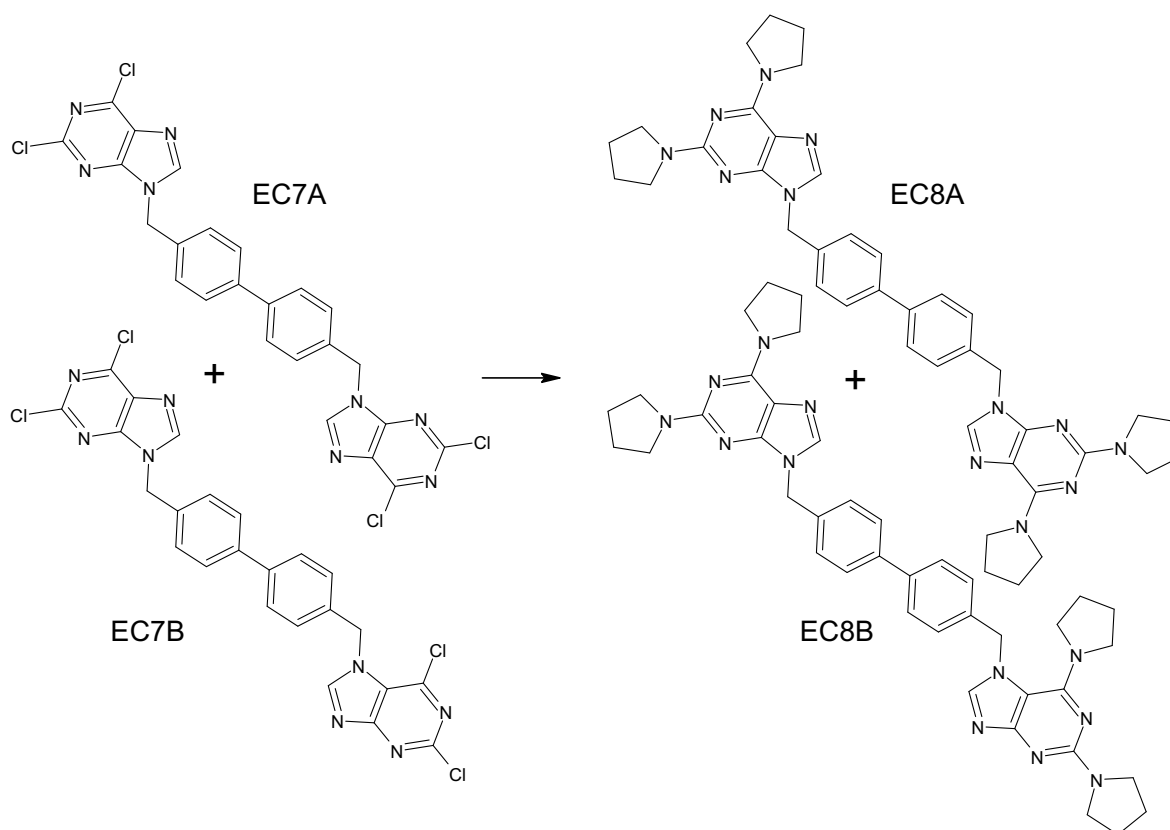


Obr. 13: Syntéza látek EC7A a EC7B

3.1.2.7 Syntéza látek EC8A a EC8B

Ke směsi látek **EC7A** a **EC7B** (61 mg, 0,11 mmol) byl přidán pyrrolidin (3 ml) a směs byla pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za teploty 160 °C (Obr. 14). Pro oddělení a přečištění produktů **EC8A** a **EC8B** sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 1% až 5% methanol v chloroformu. Ze směsi byl izolován pouze derivát **EC8A** ve výtěžku 29 % po dvou reakčních krocích (52,5 mg).

4,4'-Bis((2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)methyl)-1,1'-bifenyli (EC8A): ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 1,88-1,94 (m, 16H); 3,50-3,55 (m, 8H); 3,82 (bs, 8H); 5,23 (s, 4H); 7,42 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz); 7,57 (d, 4H, $J = 8,3$ Hz); 7,72 (s, 2H). Z důvodu velmi nízké rozpustnosti ^{13}C NMR spektrum nezměřeno. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 695,4047; nalezeno 695,4039.



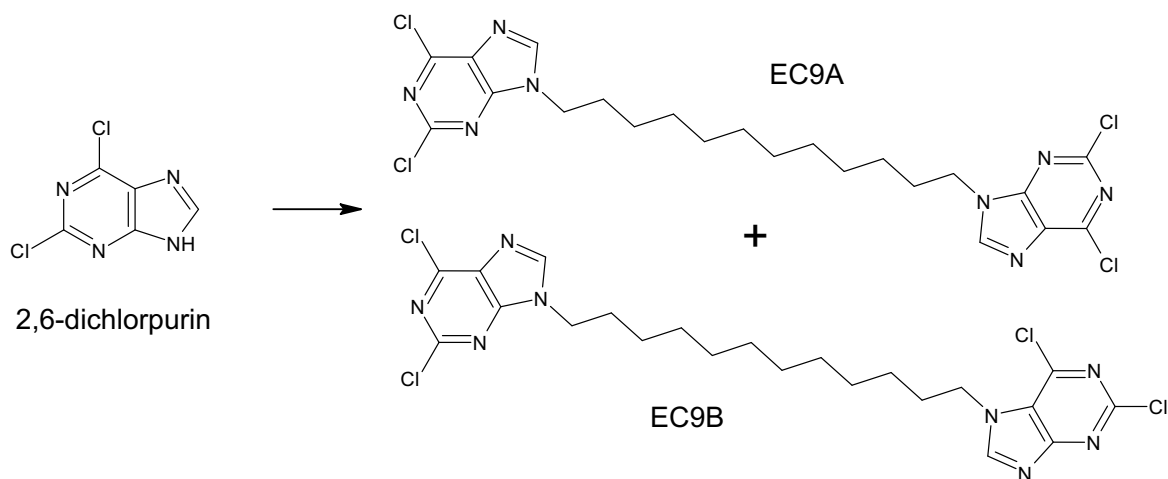
Obr. 14: Syntéza látek EC8A a EC8B

3.1.2.8 Syntéza látek EC9A a EC9B

K 2,6-dichlorpurinu (100 mg, 0,53 mmol) byl přidán 1,12-dibromdodekan (87 mg, 0,27 mmol) a uhličitan draselný (146 mg, 1,06 mmol) (Obr. 15). Směs byla rozpuštěna v dimethylformamidu (3 ml) a pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Pro oddělení a přečištění produktů **EC9A** a **EC9B** sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 1% methanol v chloroformu, 30% cyklohexan v ethylacetátu a 20% cyklohexan v ethylacetátu. Výtěžek byl 30,5 mg **EC9A** (21 %) a 11 mg **EC9B** (8 %).

1,12-Bis(2,6-dichlor-9H-purin-9-yl)dodekan (EC9A): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,18-1,34 (m, 16H); 1,90 (pentet, 4H, $J = 7,2$ Hz); 4,25 (t, 4H, $J = 7,2$ Hz); 8,11 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26,43 (2×C); 28,80 (2×C); 29,21 (2×C); 29,26 (2×C); 29,67 (2×C); 44,60 (2×C); 130,65 (2×C); 145,74 (2×C); 151,62 (2×C); 152,77 (2×C); 153,10 (2×C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,1113; nalezeno 543,1111.

2,6-Dichlor-9-(12-(2,6-dichlor-7H-purin-7-yl)dodecyl)-9H-purin (EC9B): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,20-1,36 (m, 16H); 1,88-1,94 (m, 4H); 4,27 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 4,45 (t, 2H, $J = 7,2$ Hz); 8,12 (s, 1H); 8,23 (s, 1H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 26,26; 26,45; 28,83; 28,88; 29,24 (2×C); 29,28; 29,30; 29,71; 31,48; 44,63; 47,69; 121,53; 130,70; 145,76; 150,20; 151,71; 152,85; 153,09; 153,14; 163,59; 165,02. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{N}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 543,1113; nalezeno 543,1110.

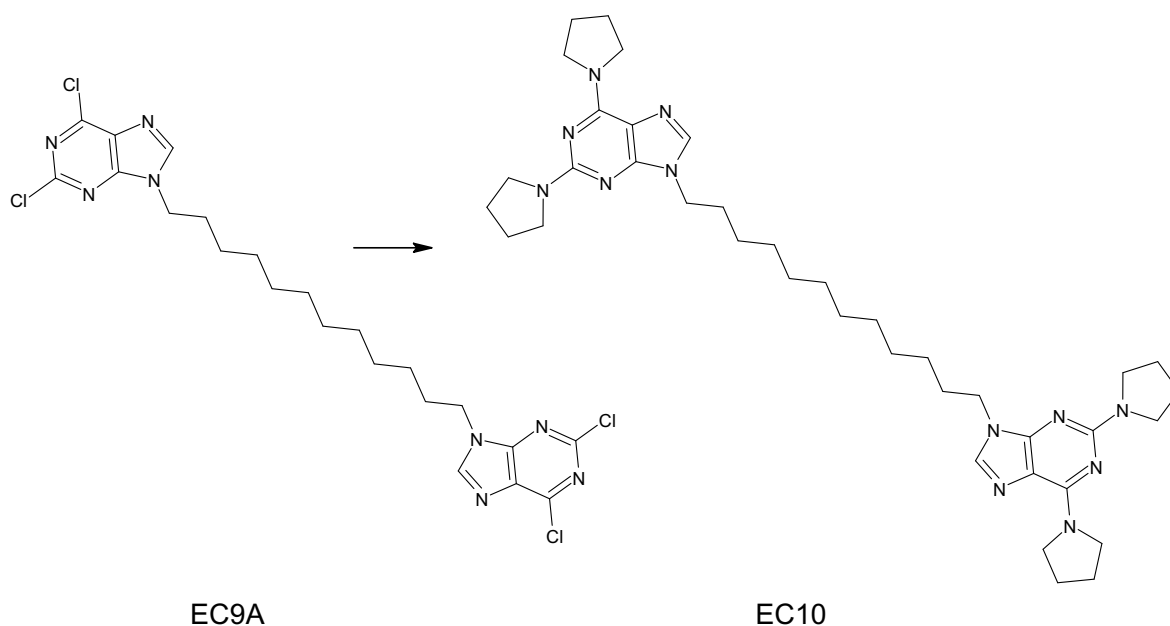


Obr. 15: Syntéza látek EC9A a EC9B

3.1.2.9 Syntéza látky EC10

K látce **EC9A** (25 mg, 0,05 mmol) byl přidán pyrrolidin (3 ml) a směs byla pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za teploty 160 °C (Obr. 16). Pro přečištění produktu **EC10** sloupcovou chromatografií byla použita mobilní fáze 2% až 3% methanol v chloroformu. Výtěžek byl 31 mg **EC10** (100 %).

1,12-Bis(2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)dodekan (EC10): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,20-1,34 (m, 16H); 1,83 (pentet, 4H, $J = 7,1$ Hz); 1,92-2,02 (m, 16H); 3,57-3,60 (m, 8H) 3,91 (bs, 8H); 4,02 (t, 4H, $J = 7,1$ Hz); 7,40 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 24,60 (4×C); 25,63 (4×C); 26,56 (2×C); 29,06 (2×C); 29,44 (2×C); 29,53 (2×C); 29,69 (2×C); 42,87 (2×C); 46,68 (4×C); 47,25 (4×C); 113,89 (2×C); 135,76 (2×C); 152,90 (2×C); 153,10 (2×C); 158,05 (2×C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{59}\text{N}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 683,4986; nalezeno 683,4974.

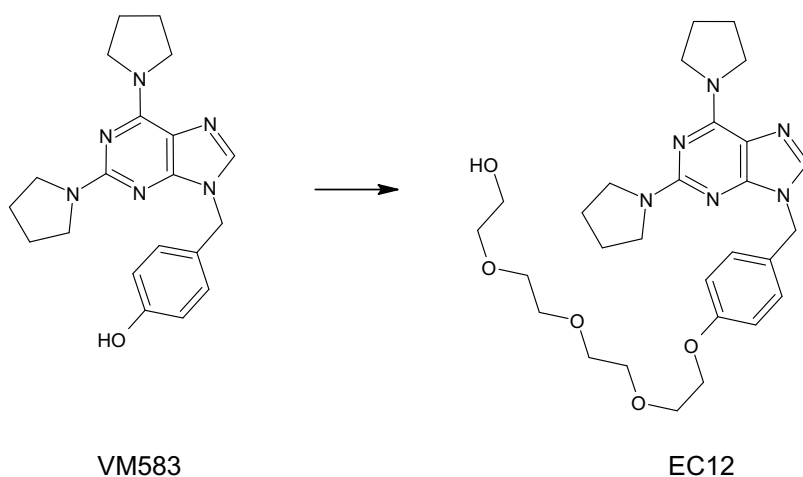


Obr. 16: Syntéza látky EC10

3.1.2.10 Syntéza látky EC12

K látce VM583 (25 mg, 0,07 mmol) byl přidán bis(2-(2-chloroethoxy)ethyl) ether (8 mg, 0,03 mmol) rozpuštěný v dimethylformamidu (3 ml) a uhličitan draselný (14,3 mg, 0,10 mmol) (Obr. 17). Směs byla pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Produkt **EC12** byl přečištěn pomocí preparativní TLC za použití mobilní fáze 2% methanolu v chloroformu a lyofilizován v 1,4-dioxanu. Výtěžek byl 2,4 mg **EC12** (8 %).

2-(2-(2-(2-(4-((2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)methyl)phenoxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol (EC12): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,90-1,97 (m, 8H); 3,56-3,60 (m, 6H); 3,65-3,72 (m, 6H); 3,82 (dd, 2H, $J = 5,0, 4,6$ Hz), 4,10 (t, 2H, $J = 4,6$ Hz); 5,13 (s, 2H); 6,84 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,24 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,36 (s, 1H). Z důvodu velmi nízkého výtěžku ^{13}C NMR spektrum nezměřeno. HRMS vypočteno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 541,3133; nalezeno 541,3134.



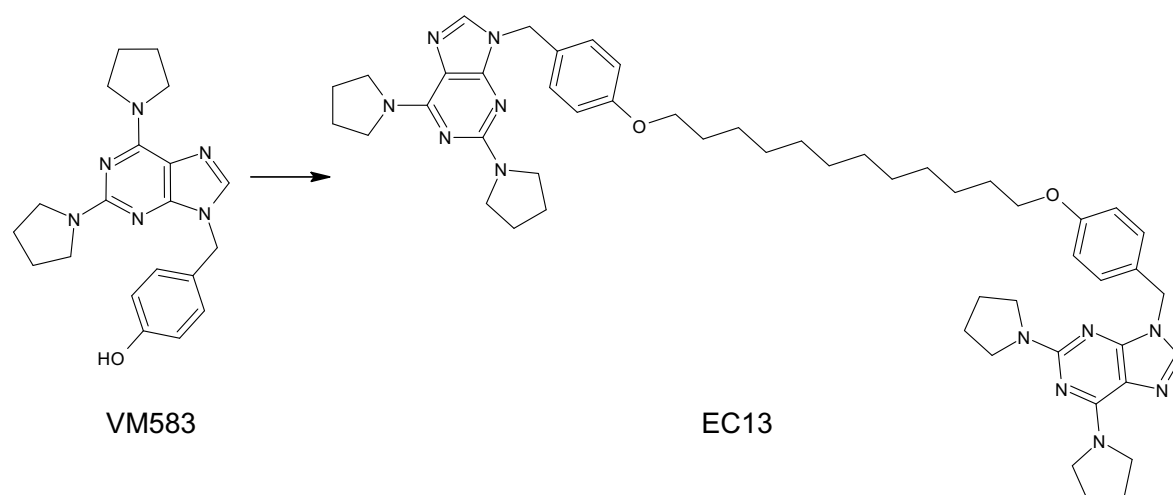
Obr. 17: Syntéza látky EC12

3.1.2.11 Syntéza látky EC13

K látce VM583 (25 mg, 0,07 mmol) byl přidán 1,12-dibromdodekan (11,3 mg, 0,03 mmol) a uhličitan draselný (14,3 mg, 0,10 mmol) (Obr. 18). Směs byla rozpuštěna v dimethylformamidu (3 ml) a pod argonovou atmosférou míchána 24 hodin za laboratorní teploty. Nejprve byl produkt **EC13** přečištěn sloupcovou chromatografií za použití mobilní fáze 2% methanolu v chloroformu. Následně byl dvakrát přečištěn pomocí preparativní TLC s mobilní fází 2% methanolem v chloroformu a lyofilizován v 1,4-dioxanu. Výtěžek byl 16,9 mg **EC13** (55 %).

1,12-Bis(4-((2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purin-9-yl)methyl)fenoxy)dodekan

(EC13): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 1,26-1,34 (m, 12H); 1,43 (m, 4H); 1,75 (m, 4H); 1,93-1,97 (m, 16H); 3,59-3,61 (m, 8H); 3,91 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz); 3,93 (bs, 8H); 5,14 (s, 4H); 6,82 (d, 4H, $J = 8,7$ Hz); 7,25 (d, 4H, $J = 8,7$ Hz); 7,37 (s, 2H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 25,63 (8 \times C); 25,99 (2 \times C); 29,19 (2 \times C); 29,35 (2 \times C); 29,52 (4 \times C); 45,91 (2 \times C); 46,70 (4 \times C); 47,16 (4 \times C); 67,99 (2 \times C); 113,71 (2 \times C); 114,56 (4 \times C); 128,85 (2 \times C); 129,31 (4 \times C); 135,45 (2 \times C); 152,89 (2 \times C); 153,11 (2 \times C); 158,13 (2 \times C); 158,74 (2 \times C). HRMS vypočteno pro $\text{C}_{52}\text{H}_{71}\text{N}_{12}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 895,5823; nalezeno 895,5815.



Obr. 18: Syntéza látky EC13

3.2 Biologická část

3.2.1 Materiál

3.2.1.1 Chemikálie

3-nitropropionová kyselina (3NP), *all-trans* retinová kyselina (ATRA), caspase 3 apopain substrát, dihydroethidium (DHE), dimethylsulfoxid (DMSO), dithiothreitol (DTT), Dulbeccoho modifikované Eagleho médium obohacené o směs živin F12 (DMEM/F12), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), fosfátový pufr (PBS), kaspasový pufr, N-acetylcystein (NAC), propidium jodid (PI), triton X-100 – vše od firmy Sigma-Aldrich. Kalcein AM, YO-PROTM-1 jodid (YO-PRO-1) – vše od firmy Invitrogen. VM583 – z knihovny Laboratoře růstových regulátorů.

3.2.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Analytické váhy (Sartorius), automatické pipety (Eppendorf), blokový termostat (Fischer Scientific), centrifuga Eppendorf (Sigma-Aldrich), CO₂ inkubátor (PHC), destičkový reader Infinite M200 Pro (Tecan), konfokální mikroskop (Leica), laminární box (Thermo Scientific), mikroskop s inverzním fázovým kontrastem (Olympus CKX41), třepačka (Biosan).

3.2.1.3 Buněčná linie SH-SY5Y

K testování biologické aktivity připravených látek byla použita buěčná linie SH-SY5Y (ECACC 94030304). Jedná se o lidskou neuroblastomovou buněčnou linii hojně využívanou pro studium biologie neuronů (Lopez-Suarez et al., 2022).

Buňky byly v koncentraci 20 000 buněk na jamku v 10% DMEM/F12 (100 µl) nasazovány do 96jamkové destičky. Byly nasazovány ve sloupcích 2 až 12 a v řadách B až G, v ostatních jamkách bylo pouze médium bez buněk. Po 24hodinové inkubaci bylo přidáno 100 µl 20µM ATRA v 1% DMEM/F12 za účelem

navození diferenciaci buněk. Následovala 48hodinová inkubace v 37 °C a při 5% CO₂.

3.2.2 Metody

3.2.2.1 Obecný postup testování biologické aktivity

Byl připraven 10mM zásobní roztok látek **EC12** a **EC14** v DMSO. Z látek **EC5**, **EC10** a **EC13** byl připraven 5mM zásobní roztok z důvodu horší rozpustnosti těchto látek. Kvůli rozpustnosti musely být z testování zcela vyřazeny látky **EC3** a **EC8A**.

Jako toxin byl použit 20mM roztok 3NP v 1% DMEM/F12. Látky byly testovány ve třech koncentracích (10 μM, 1 μM a 0,1 μM) v připraveném roztoku média s toxinem.

Pro kontrolní buňky byl použit 0,1% roztok DMSO v 1% DMEM/F12 a 20mM roztok 3NP v 1% DMEM/F12. K ovlivnění pozitivních kontrolních buněk byl použit NAC v 1% DMEM/F12 o koncentracích 1000 μM, 100 μM a 10 μM. Dále byla pro srovnání použita látka VM583 ve stejných koncentracích jako testované látky.

Ovlivnění buněk probíhalo tak, že bylo z 96jamkové desky s buňkami SH-SY5Y odstraněno staré médium a nahrazeno 100 μl média nového s obsahem příslušných látek. První sloupec neobsahoval buňky a byl tedy využit jako tzv. slepý vzorek v řadě B až G pouze s DMEM/F12 s DMSO a v řadě E až G s DMEM/F12 s 3NP. Ve druhém sloupci byly v řadě B až D kontrolní neovlivněné buňky a v řadě E až G buňky ovlivněné pouze 3NP. Ve třetím až pátém sloupci byly buňky ovlivněny testovanými látkami v tripletech. V šestém sloupci byly, ve stejném uspořádání jako ve sloupci druhém, kontrolní buňky. V sedmém až devátém (případně dvanáctém podle počtu testovaných látek) sloupci byly opět buňky ovlivněny testovanými látkami v tripletech.

3.2.2.2 Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu

Ke stanovení buněčné smrti se využívá PI, což je fluorescenční interkalační činidlo vmezeřující se pouze do DNA mrtvých buněk s narušenou permeabilitou membrány (Dengler et al., 1995).

Po 48hodinové inkubaci ovlivněných buněk byl připraven 500× ředěný roztok PI (zásobní koncentrace 1 mg/ml) v 1× PBS a do každé jamky bylo přidáno 100 µl takto připraveného roztoku. Buňky byly inkubovány 15 minut ve tmě za laboratorní teploty. Následně byla destička stočena v centrifuze po dobu 1 min při 1400 RPM. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometru za použití vlnových délek 535 nm (excitace) a 617 nm (emise).

3.2.2.3 Stanovení oxidativního stresu pomocí dihydroethidia

Ke stanovení oxidativního stresu buněk se využívá DHE, které se v buňce oxiduje, produkt této oxidace se váže na DNA a následně vykazuje detekovatelnou fluorescenci (Peshavariya et al., 2007).

Po 24hodinové inkubaci ovlivněných buněk byla destička stočena v centrifuze po dobu 5 minut při 1000 RPM. Z destičky bylo následně odstraněno staré médium a nahrazeno 100 µl 10µM roztoku DHE v PBS. Buňky byly inkubovány 30 minut ve tmě za laboratorní teploty. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometru za použití vlnových délek 500 nm (excitace) a 580 nm (emise).

3.2.2.4 Stanovení aktivity kaspasy 3

Stanovení aktivity kaspasy 3 se využívá pro studium apoptosy, protože kaspasy jsou enzymy, které se při ní uplatňují. Cytoplazmatická membrána má pro kaspasy špatnou propustnost, a proto musí být buňky lyzovány pomocí kaspasového pufru (Kaufmann et al., 2008).

Ovlivněné buňky byly inkubovány 24 hodin a následně k nim bylo přidáno 50 µl kaspasového pufru obsahujícího 75µM kaspasový substrát, 30mM DTT a 3mM PMSF. Buňky byly inkubovány 2 hodiny ve tmě za teploty 37 °C a 5% CO₂. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometru za použití vlnových délek 400 nm (excitace) a 505 nm (emise).

3.2.2.5 Stanovení apoptosy pomocí YO-PRO™-1 jodidu

YO-PRO-1, fluorescenční barvivo, se využívá pro stanovení umírajících či mrtvých buněk, protože může pronikat pouze porušenou cytoplazmatickou membránou a až poté se vázat na DNA (Idziorek et al., 1995).

Po 24hodinové inkubaci ovlivněných buněk byla 96jamková destička stočena v centrifuze po dobu 5 minut při 1000 RPM. Z destičky bylo následně odstraněno staré médium a nahrazeno 100 μ l 1 μ M roztoku YO-PRO-1 v PBS. Buňky byly inkubovány 15 minut ve tmě za laboratorní teploty. Detekce byla provedena pomocí spektrofotometru za použití vlnových délek 488 nm (excitace) a 530 nm (emise).

3.2.2.6 Stanovení cytotoxicity testovaných látek

Buňky byly ovlivněny obdobným způsobem jako u výše uvedených testů, ale bez toxinu 3NP. Jednalo se tedy o ovlivnění testovanými látkami v příslušných koncentracích v DMEM/F12. Pozitivní kontrolní buňky byly opět ovlivněny DMSO v DMEM/F12. Do sloupce 1 až 2, řádků E až G 96jamkové destičky bylo ale místo kontrolních buněk ošetřených 3NP nanášeno pouze 1% DMEM/F12.

Po 48hodinové inkubaci bylo z jamek obsahujících pouze 1% DMEM/F12 odebráno 50 μ l a nahrazeno 50 μ l tritonu X-100 s finální koncentrací 1 %. Následovala již výše popsaná detekce pomocí PI.

3.2.2.7 Vyhodnocení ovlivnění buněk testovanými látkami pomocí konfokálního mikroskopu

Barvení buněk pomocí kalceinu AM (acetoxymethyl), je účinnou metodou pro studium apoptosy v živých buňkách pomocí konfokální mikroskopie. Kalcein AM prochází cytoplazmatickou membránou do živých buněk, kde je esterasami přeměněn na fluorescenční kalcein (Gatti et al., 1998).

Pro pozorování buněk linie SH-SY5Y po ovlivnění testovanými látkami byla použita 8jamková destička s buňkami nasazenými v koncentraci 50 000 buněk na jamku v 10% DMEM/F12 s přídatkem 20 μ M roztoku ATRA v 1% DMEM/F12.

Po 48hodinové inkubaci buněk v 37 °C a při 5% CO₂ bylo odstraněno staré médium. První jamka byla určena pro kontrolní neovlivněné buňky a bylo do ní přidáno 200 µl 0,1% roztoku DMSO v 1% DMEM/F12, druhá jamka byla určena pro kontrolní buňky ovlivněné pouze toxinem a bylo do ní přidáno 200 µl 20mM roztoku 3NP v 1% DMEM/F12. Do dalších jamek bylo přidáno 200 µl 1µM a 10µM roztoků látek **EC12** a **EC14** v 20mM roztoku 3NP v 1% DMEM/F12. K ovlivnění pozitivních kontrolních buněk byl použit NAC v 1% DMEM/F12 o koncentraci 1000 µM. Dále byla pro srovnání použita látka VM583 o koncentraci 10 µM v 1% DMEM/F12.

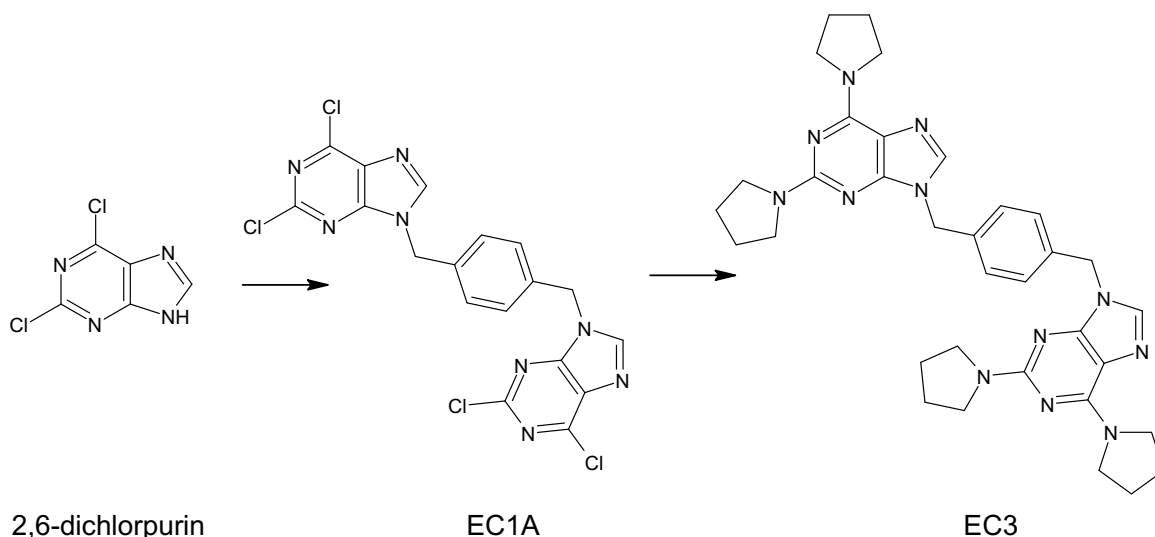
Po 48hodinové inkubaci ovlivněných buněk bylo z každé jamky odebráno 50 µl starého média a nahrazeno 150 µl roztoku kalceinu AM v PBS připraveného smícháním 1,2 µl kalceinu AM (o koncentraci 1 mg/ml) a 1600 µl PBS. Po 50minutové inkubaci v 37 °C a při 5% CO₂ následovalo samotné pozorování ovlivněných buněk pomocí konfokálního mikroskopu.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Syntéza látek

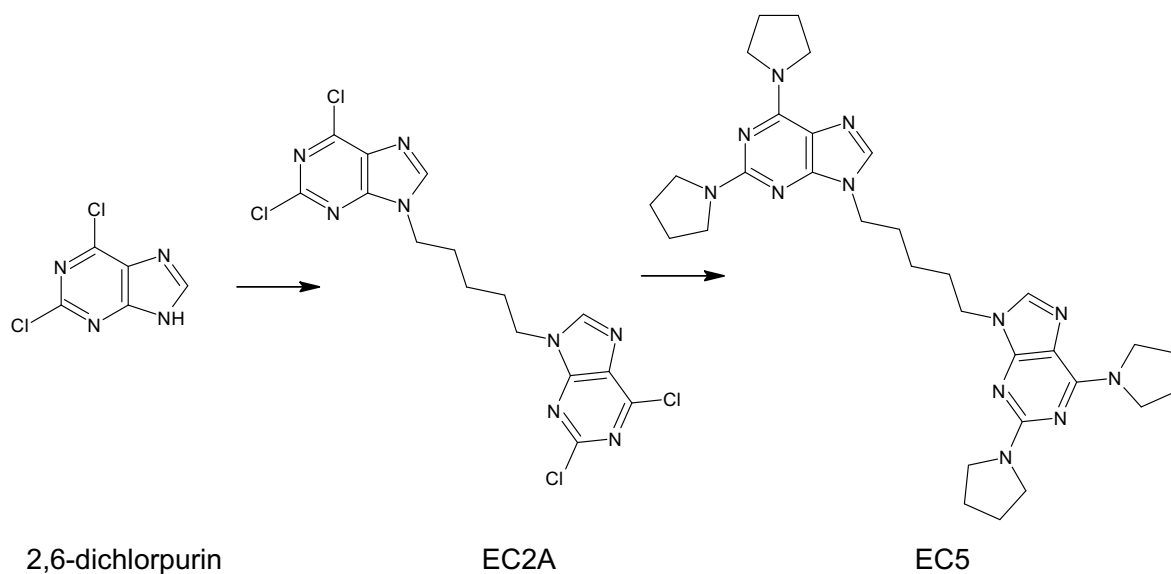
Byly připraveny dimerní purinové deriváty **EC3**, **EC5**, **EC8A**, **EC10**, **EC13** a **EC14** a monomer **EC12**. Dvoustupňovou syntézou byly připraveny látky **EC3**, **EC5**, **EC8A** a **EC10**. Jednostupňovou syntézou byly připraveny látky **EC12** (Obr. 17), **EC13** (Obr. 18) a **EC14** (Obr. 19). Využívány byly pouze symetrické produkty z toho důvodu, aby byla zachována vaznost podobná monomerům.

Výchozí látkou pro produkty dvoustupňových syntéz byl 2,6-dichlorpurin. Látka **EC3** byla připravena z látky **EC1A** substitucí atomů chloru v poloze C2, C6 a C2', C6' za pyrrolidin. Látka **EC1A** byla předtím připravena dimerizací 2,6-dichlorpurinu s linkerem dibromo-*p*-xylenem (Obr. 20).

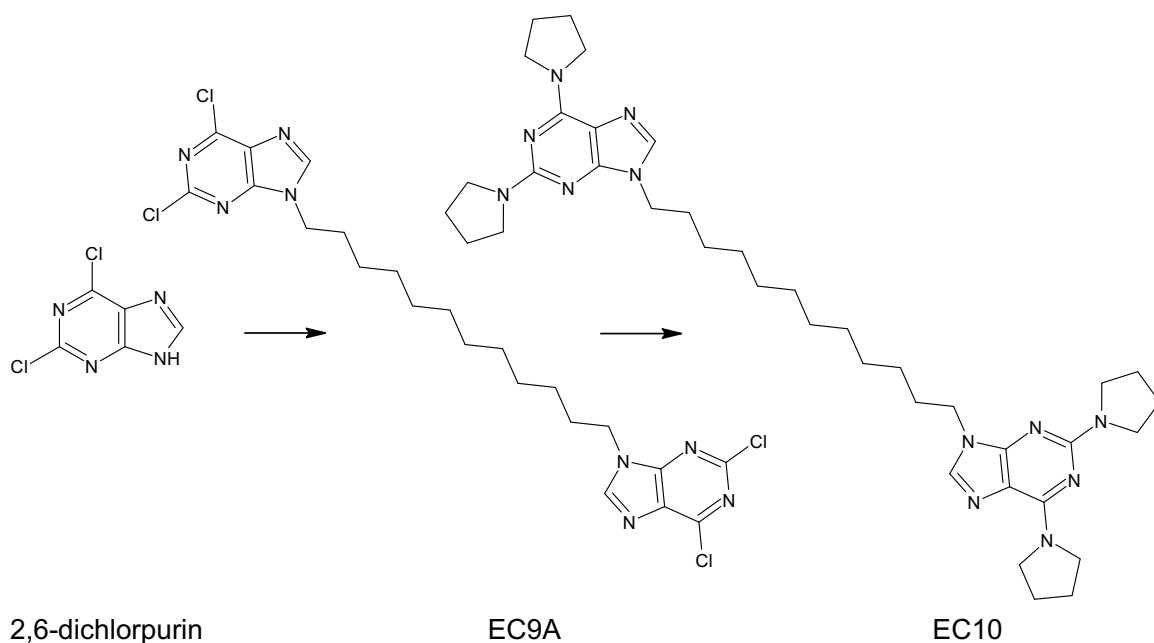


Obr. 20: Dvoustupňová syntéza látky EC3

Obdobným způsobem za použití rozdílných linkerů byly syntetizovány látky **EC5** (Obr. 21) a **EC10** (Obr. 22).

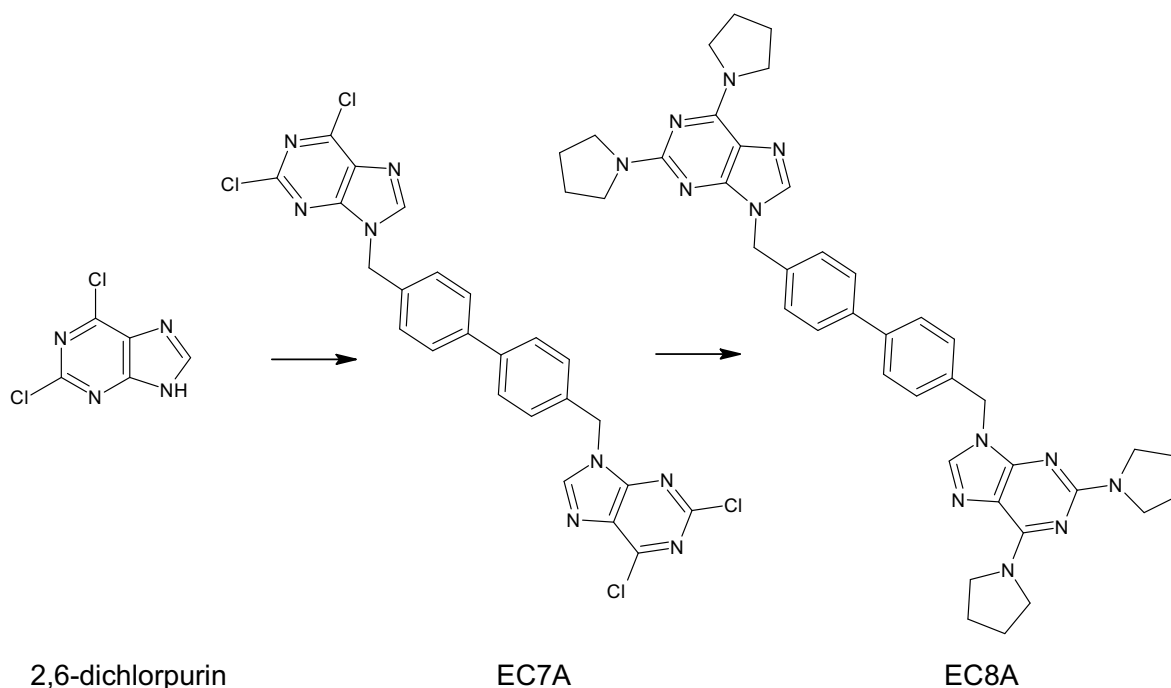


Obr. 21: Dvoustupňová syntéza látky EC5



Obr. 22: Dvoustupňová syntéza látky EC10

V syntéze látky **EC8A** byl ten rozdíl, že byla připravována ze směsi obou izomerů **EC7**, jak symetrického, tak asymetrického, z toho důvodu, že se je nepodařilo sloupcovou chromatografií rozdělit. Ze směsi symetrického a asymetrického derivátu **EC8A** a **EC8B** byl následně izolován pouze symetrický produkt **EC8A** (Obr. 23).



Obr. 23: Dvoustupňová syntéza látky EC8A

Výchozí látkou pro jednostupňovou syntézu **EC12** a **EC13** byla látka VM583. Principem reakcí byla dimerizace VM583 za využití příslušných linkerů. Pomocí HRMS ale bylo zjištěno, že látka **EC12** dimerem není a syntéza tedy nebyla úspěšná, protože byl izolován pouze monomer. Reakcí vznikla zřejmě směs produktů, z níž byla kvůli nízkému výtěžku obtížně izolována majoritní látka, monomer **EC12**.

Výchozí látkou pro syntézu **EC14** byla látka EH6, která byla podrobena dimerizaci s linkerem bis(2-(2-chloroethoxy)ethyl) etherem. Tento dimer byl původně připravován dvoustupňovou syntézou z 2,6-dichlorpurinu, ale již první krok této syntézy nebyl úspěšný a dimer se nevytvořil.

Produkty byly ve většině případů ve formě bílého prášku. Pouze látky **EC12**, **EC13** a **EC14** byly olejovité, a proto byly podrobeny lyofilizaci k převedení do pevného stavu.

Nejproblematictější vlastností připravených látek se ukázala být jejich rozpustnost. Zatímco **EC12** a **EC14**, které obě obsahují bis(2-(2-chloroethoxy)ethyl) ether, byly dobře rozpustné, tak látky **EC5**, **EC10** a **EC13**, u nichž byl jako linker použit uhlovodíkový řetězec, měly o poznání horší rozpustnost. Produkty **EC8A** a **EC3** obsahující linker bifenyl a xylen musely být kvůli své nerozpustnosti zcela vyřazeny z biologického testování.

4.2 Testování biologické aktivity

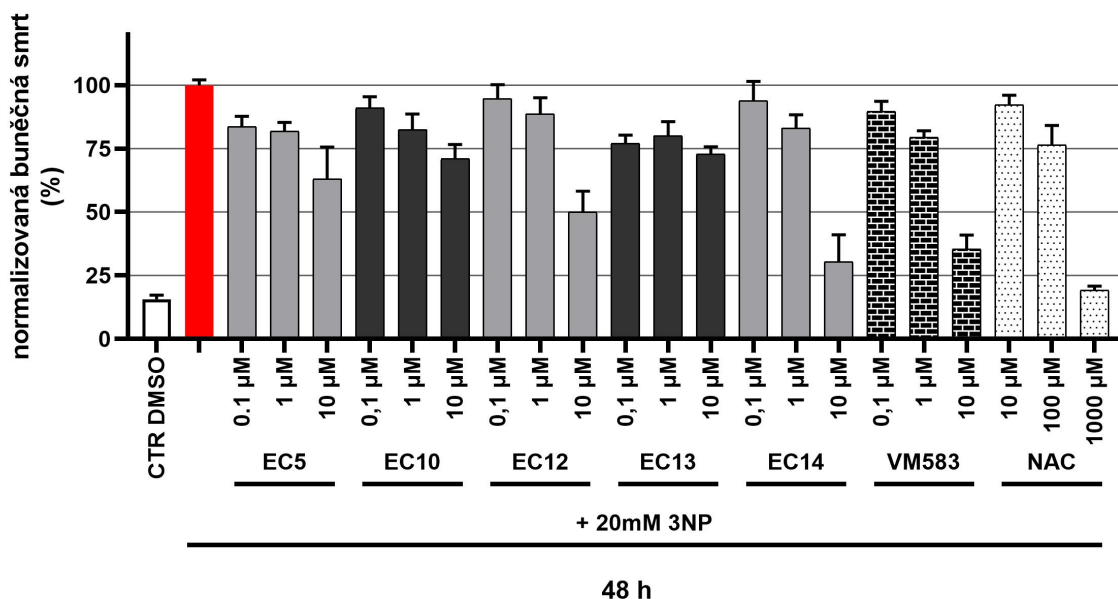
Již v předchozích pracích Laboratoře růstových regulátorů byla studována biologická a neuroprotektivní aktivita různých purinových derivátů. Například v rámci bakalářské práce Mgr. Heleny Kordinové byly syntetizovány 2,6,9-trisubstituované deriváty purinu a testovány rovněž v modelu 3NP pomocí kalceinu AM, kdy byl především u 2,6-di(azepan-1-yl)-9-benzyl-9H-purinu zjištěn významný cytoprotektivní účinek (Kordinová, 2020). Na tyto studie bylo navázáno v této bakalářské práci přípravou dimerních purinových derivátů.

V prvním testování bylo provedeno stanovení buněčné smrti pomocí PI (Graf 1). Cílem bylo zjistit, zda mají připravené látky protektivní účinky vzhledem k toxinu 3NP, který představuje model Huntingtonovy choroby, vyvolává neurodegenerativní změny a mitochondriální dysfunkci (Brouillet et al., 2005). Výsledky byly vztaženy ke kontrolním buňkám ovlivněným pouze 20mM 3NP a normalizovaným na 100% buněčnou smrt, což je o 84 % více než u buněk kontrolních ovlivněných pouze DMSO. Výsledky byly porovnány s účinkem NAC (pokles o 81 % v koncentraci 1000 μM), jakožto látkou s prokázaným neuroprotektivním efektem, a s účinkem látky VM583 (pokles o 65 % v koncentraci 10 μM), jejíž aktivita byla publikována v patentu č. 308800 (Gonzalez et al., 2021a).

Byla pozorována biologická aktivita všech testovaných látek. Nejvýraznější efekt byl pozorován u látky **EC14**, u níž došlo v koncentraci 10 μM k poklesu buněčné smrti o 70 %. Buňky ovlivněné látkou **EC12** (10 μM) zaznamenaly pokles o 50 %. Následovaly buňky ovlivněné **EC5** (10 μM) s poklesem o 37 %, **EC10** (10 μM) s poklesem o 29 % a **EC13** (10 μM) s poklesem o 27 %. Na rozdíl od NAC připravené látky vykazují účinek již v nízkých koncentracích (10 μM), zatímco NAC poskytuje srovnatelné hodnoty až v koncentraci 1000 μM .

Rozdílná oproti ostatním látkám se ukázala být látka **EC13**, která s rostoucí koncentrací nevykazuje rostoucí protektivní účinek proti buněčné smrti, a naopak ve všech testovaných koncentracích poskytla podobný výsledek. To může být způsobeno nižší rozpustností této látky.

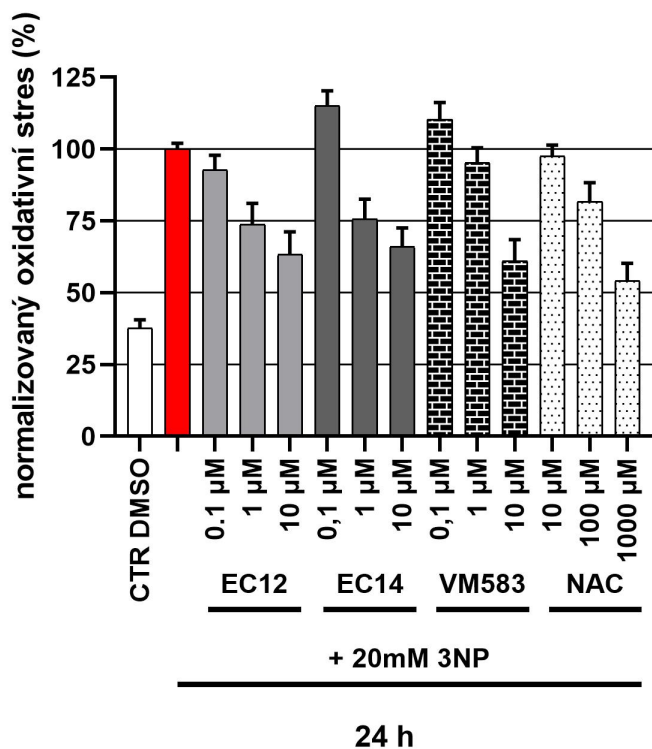
K dalšímu testování byly postoupeny pouze látky nejperspektivnější, tedy **EC12** a **EC14**.



Graf 1: Stanovení buněčné smrti pomocí PI po ovlivnění testovanými látkami společně s toxinem 20mM 3NP a po 48hodinové inkubaci. Buňky byly ovlivněny látkami **EC5**, **EC10**, **EC12**, **EC13**, **EC14** a VM583 v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Kontrolní buňky jsou ovlivněny 0,1% DMSO (CTR DMSO). Kontrolní buňky s pozitivním efektem jsou ovlivněny NAC v koncentracích 10, 100 a 1000 μM . Hodnoty vyjadřují normalizovanou buněčnou smrt (%) \pm SEM (standardní chyba průměru) vztahenou k toxinu 20mM 3NP. Hodnoty představují aritmetický průměr ze tří na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátu.

Dalším provedeným testem bylo stanovení oxidativního stresu pomocí DHE (Graf 2). Výsledky byly vztaheny ke kontrolním buňkám ovlivněným pouze 20mM 3NP a normalizovaným na 100% oxidativní poškození, což je o 62 % více než u buněk kontrolních ovlivněných pouze DMSO. Výsledky byly porovnány s 46% poklesem oxidativního poškození u buněk ovlivněných NAC (1000 μM) a s 39% poklesem u buněk ovlivněných VM583 (10 μM).

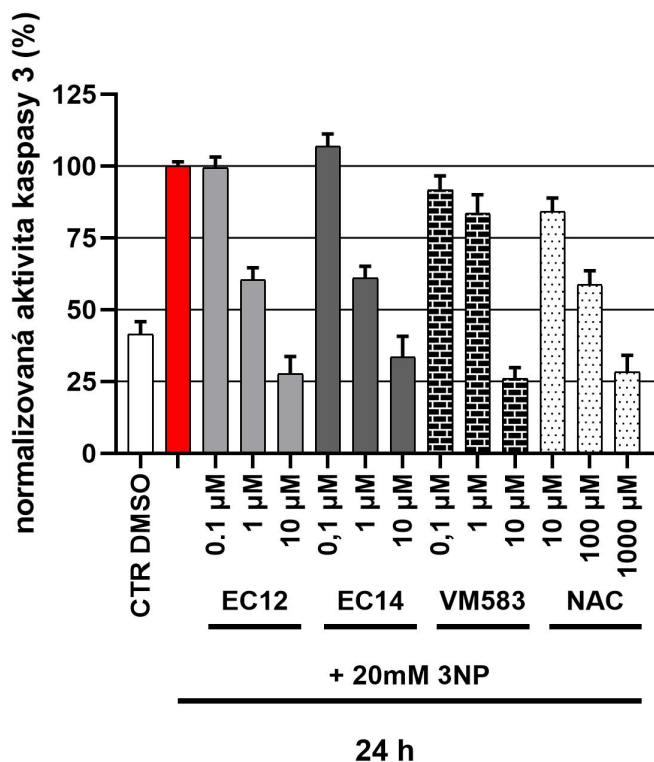
Všechny testované látky vykazují podobný efekt. Buňky ovlivněné látkou **EC12** (10 μM) snižují oxidativní poškození oproti kontrolním buňkám ovlivněným 3NP o 37 %, látkou **EC14** (10 μM) o 34 %. Jsou to tedy výsledky srovnatelné s efektem látky VM583 a také NAC, který v koncentraci 1000 μM vykazuje pouze o 9 až 12 % lepší účinek. Významný pokles oxidativního stresu vykazují již buňky ovlivněné 1 μM **EC12** a **EC14** – o 26 % a 24 %. Naopak v koncentraci 0,1 μM **EC14** a VM583 je oxidativní stres navýšen až nad úroveň toxinu 3NP, což může být způsobeno chybou v měření.



Graf 2: Stanovení oxidativního stresu pomocí DHE po ovlivnění testovanými látkami společně s toxinem 20mM 3NP a po 24hodinové inkubaci. Buňky byly ovlivněny látkami **EC12**, **EC14** a **VM583** v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Kontrolní buňky jsou ovlivněné 0,1% DMSO (CTR DMSO). Kontrolní buňky s pozitivním efektem jsou ovlivněny NAC v koncentracích 10, 100 a 1000 μM . Hodnoty vyjadřují míru oxidativního stresu (%) \pm SEM vztaženou k toxinu 20mM 3NP. Hodnoty představují aritmetický průměr z šesti na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátu.

Míra apoptosy byla testována pomocí stanovení aktivity kaspasy 3, jakožto apoptotického markeru (Graf 3). Výsledky byly vztaženy ke kontrolním buňkám ovlivněným pouze 20mM 3NP, pro které byla aktivita kaspasy 3 normalizována na 100 %. V kontrolních buňkách ovlivněných pouze DMSO byla aktivita kaspasy 3 o 58 % nižší. Výsledky byly porovnány se 72% poklesem aktivity kaspasy 3 v buňkách ovlivněných NAC (1000 μM) a se 74% poklesem v buňkách ovlivněných VM583 (10 μM).

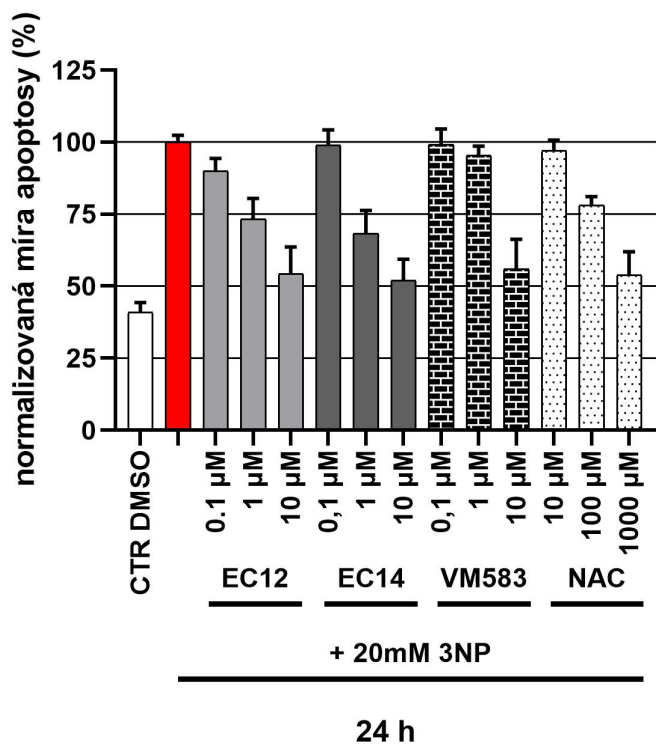
Obě testované látky prokázaly významný efekt na snížení aktivity kaspasy 3 a tedy apoptosy. Jak **EC12**, tak **EC14** (10 μM) snížily aktivitu kaspasy 3 až pod úroveň kontrolních neovlivněných buněk o 72, respektive 66 %. Buňky ovlivněné látkou **EC12** (10 μM) vykazují tedy shodnou kaspasovou aktivitu jako kontrolní buňky ovlivněné NAC. Naopak v koncentraci 0,1 μM **EC14** je kaspasová aktivita navýšena až nad úroveň toxinu 3NP a v koncentraci 0,1 μM **EC12** je s toxinem téměř shodná.



Graf 3: Stanovení aktivity kaspasy 3 po ovlivnění testovanými látkami společně s toxinem 20mM 3NP a po 24hodinové inkubaci. Buňky byly ovlivněny látkami **EC12**, **EC14** a VM583 v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Kontrolní buňky jsou ovlivněné 0,1% DMSO (CTR DMSO). Kontrolní buňky s pozitivním efektem jsou ovlivněny NAC v koncentracích 10, 100 a 1000 μM . Hodnoty vyjadřují aktivitu kaspasy 3 (%) \pm SEM vztaženou k toxinu 20mM 3NP. Hodnoty představují aritmetický průměr ze čtyř na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátu.

Ke stanovení míry apoptosy byl dále použit test pomocí YO-PRO-1 (Graf 4). Výsledky byly vztaženy ke kontrolním buňkám ovlivněným pouze 20mM 3NP, pro které byla apoptosa normalizována na 100 % buněk. Kontrolní buňky ovlivněné pouze DMSO podlely apoptose o 59 % méně. Výsledky byly porovnány se 46% poklesem míry apoptosy u buněk ovlivněných NAC (1000 μM) a se 44% poklesem u buněk ovlivněných VM583 (10 μM).

Vliv obou testovaných látek je srovnatelný s oběma typy kontrolních buněk, pro **EC12** (10 μM) se jedná o 46% rozdíl oproti buňkám ovlivněným pouze 3NP a pro **EC14** (10 μM) o 48%. Syntetizované látky tedy prokázaly shodný či dokonce lepší efekt než kontrolní látky.

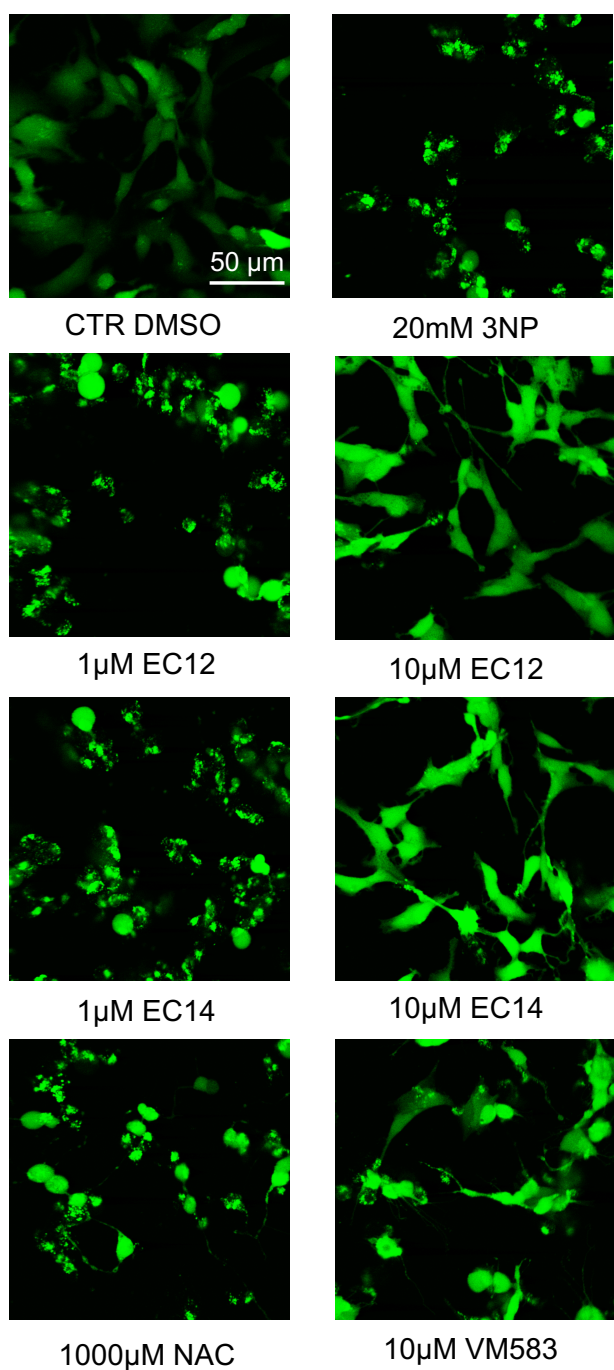


Graf 4: Stanovení míry apoptosy pomocí YO-PRO-1 jodidu po ovlivnění testovanými látkami společně s toxinem 20mM 3NP a po 24hodinové inkubaci. Buňky byly ovlivněny látkami **EC12**, **EC14** a VM583 v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Kontrolní buňky jsou ovlivněné 0,1% DMSO (CTR DMSO). Kontrolní buňky s pozitivním efektem jsou ovlivněny NAC v koncentracích 10, 100 a 1000 μM . Hodnoty vyjadřují míru apoptosy (%) \pm SEM vztaženou k toxinu 20mM 3NP. Hodnoty představují aritmetický průměr ze čtyř na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátu.

Ovlivnění buněk SH-SY5Y látkami **EC12** a **EC14** bylo pozorováno rovněž prostřednictvím konfokálního mikroskopu po obarvení kalceinem AM (Obr. 24). Jedná se o metodu vhodnou pro studium apoptosy ve stále živých buňkách (Gatti et al., 1998).

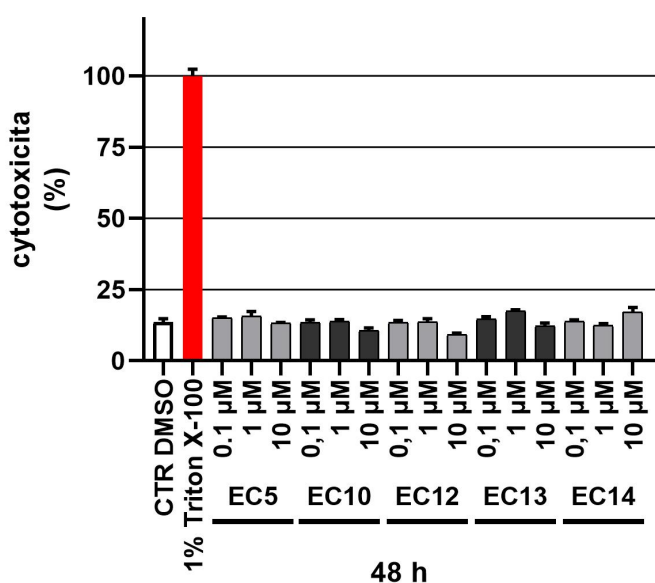
Kontrolní buňky s 0,1% DMSO vykazují morfologické rysy živých diferencovaných buněk, mají neurity, lze pozorovat i synapse. Kontrolní buňky ovlivněné pouze toxinem 3NP jsou naopak apoptotické, zakulacené, bez neuritů. Na buňkách ovlivněných 1 μM **EC12** a **EC14** není patrný žádný efekt, jsou apoptotické. Oproti tomu při vyšší koncentraci 10 μM **EC12** a **EC14** vykazují látky určitý účinek. Takto ovlivněné buňky jsou živé, mají jasně zřetelné neurity stejně jako srovnávací buňky ovlivněné 10 μM VM583. Jako pozitivní kontrolní buňky byly použity buňky ovlivněné 1000 μM NAC. Jako látka s prokázaným neuroprotektivním účinkem by NAC měl oddálit apoptosu, což ale při tomto experimentu nebylo patrné. Je tam pouze mírný rozdíl oproti ryze apoptotickým buňkám ovlivněným pouze 3NP.

To je způsobeno nedefinovanou chybou v experimentu. Z časových důvodů nebylo možné konfokální mikroskopii zopakovat, a chybu tedy napravit.



Obr. 24: Fluorescenční snímky buněk SH-SY5Y z konfokálního mikroskopu po ovlivnění testovanými látkami společně s toxinem 20mM 3NP a 48hodinové inkubaci. Zvětšení objektivu 20×, celkové zvětšení 200×, elektronické zvětšení 4×, měřítko odpovídá u všech snímků 50 μm. Buňky byly ovlivněny látkami **EC12** a **EC14** v koncentracích 1 a 10 μM a látkou VM583 v koncentraci 10 μM. Kontrolní buňky jsou ovlivněny 0,1% DMSO (CTR DMSO) nebo pouze toxinem 20mM 3NP. Kontrolní buňky s pozitivním efektem jsou ovlivněny NAC v koncentraci 1000 μM.

Byla testována také cytotoxicita připravených látek (Graf 5). Výsledky byly vztaženy ke kontrolním buňkám ovlivněným pouze tritonem X-100, pro které byl toxický efekt normalizován na 100 %, což je o 86 % více než pro buňky kontrolní ovlivněné DMSO. U připravených látek nebyl prokázán cytotoxický efekt. Nejvyšší cytotoxicita vyšla u látky **EC13** v koncentraci 1 μM a u látky **EC14** v koncentraci 10 μM , kdy byla pro obě shodně pouze o 3 % vyšší než u kontrolních buněk ovlivněných DMSO.



Graf 5: Stanovení cytotoxicity pomocí PI po ovlivnění testovanými látkami a po 48hodinové inkubaci. Buňky byly ovlivněny látkami **EC5**, **EC10**, **EC12**, **EC13** a **EC14** v koncentracích 0,1, 1 a 10 μM . Kontrolní buňky jsou ovlivněné 0,1% DMSO (CTR DMSO). Hodnoty vyjadřují cytotoxický efekt (%) \pm SEM vztaženou k toxinu 1% tritonu X-100. Hodnoty představují aritmetický průměr z jednoho experimentu provedeného v triplicátu.

Předpokládaná neuroprotektivní aktivita syntetizovaných látek byla do určité míry potvrzena. Jedná se o další rozvinutí již předchozích studií. Výsledky odpovídají prokázané neuroprotektivní aktivitě některých cytokininů, které nicméně nebyly testovány v modelu 3NP, ale v modelu salsolinolu a glutamátu (Gonzalez et al., 2021b), proto nelze studie blíže porovnávat. Testování protektivního účinku dimerních purinových derivátů proti toxicitě vyvolané jinými látkami představuje další studijní příležitost.

Z dosavadního výzkumu prováděného v Laboratoři růstových regulátorů a na Katedře experimentální biologie je známo, že purinové deriváty interagují s kanabinoidním receptorem 2 (CB2) a s butyrylcholinesterasou (BChE), ale zatím tyto poznatky nebyly publikovány (Gonzalez). V důsledku toho se předpokládá, že

by tyto molekulární cíle mohly být vhodné i pro dimerní purinové deriváty. V diplomové práci Mgr. Heleny Kordinové bylo zjištěno, že monomerní látky rovněž odvozené od purinu mají dobré vazebné parametry jak pro CB2, tak pro BChE, ale nebylo to v jejím rámci potvrzeno biologickým testováním (Kordinová, 2022). CB2 představuje slibnější terapeutický cíl než kanabinoidní receptor 1 (CB1), protože agonisté CB1 vykazují nežádoucí psychotropní účinky (Navarro et al., 2016). Příprava homodimerních látek při zachování aktivity obou částí umožňuje následné potvrzení potenciální aktivity dané látky nebo i látky odvozené od původního dimeru.

CB2 a kanabinoidy jsou v současnosti podrobovány mnoha studiím ve snaze optimalizovat léčbu neurodegenerativních onemocnění. Stanciu et al. např. publikovali vliv selektivního agonisty CB2, JWH-133, na zmírnění neurozánětlivé reakce a shlukování β -amyloidu u myši s fenotypem podobným Alzheimerově chorobě (Stanciu et al., 2024).

V provedených rešerších nebyla dohledána žádná jiná studie zabývající se konkrétně testováním dimerních purinových derivátů. Byly nicméně navrženy bitopické ligandy pro CB2 složené ze 2 stejných chromenopyrazolových derivátů spojených uhlovodíkovým řetězcem, u nichž byla prokázána selektivita pro CB2 oproti CB1. Jejich potenciál spočívá v možnosti současné interakce se dvěma vazebnými místy jednoho receptoru (Morales et al., 2020). Stejný potenciál se dá tedy předpokládat i u látek, jejichž syntéza a testování je předmětem této práce.

Jako vhodné inhibitory BChE se ukázaly být některé 5,6-dihydropyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-c]chinolinové deriváty, jejichž neuroprotektivní aktivita byla studována na buňkách SH-SY5Y jak v modelu 3NP, tak v modelu 1-methyl-4-fenylpyridinium (MPP+), kde v obou případech vykazovaly efekt snižování buněčné smrti. V modelu MPP+ jim byl mimo jiného prokázán také antiapoptotický efekt. Rovněž byl prokázán vztah mezi neuroprotektivní aktivitou těchto látek, a právě CB2 receptorem. V modelu 3NP tyto cholinové deriváty snižovaly buněčnou smrt o 20 až 50 % (Jena et al., 2024). V porovnání s našimi látkami tedy vykazovaly v tomto konkrétním modelu srovnatelnou či, v případě **EC14**, horší aktivitu.

Srovnání výše uvedených látek s připravenými dimery není ideální, ať už z důvodu strukturních odlišností nebo jiného testovacího modelu. Nicméně se dá u látek připravených v této bakalářské práci na základě těchto skutečností předpokládat molekulární cíl CB2 a BChE.

5 Závěr

V teoretické části bakalářské práce je kladen důraz na typické znaky neurodegenerativních onemocnění a na nejhojněji skloňovaná neurodegenerativní onemocnění s důrazem na Huntingtonovu chorobu, protože syntetizované látky byly testovány právě v jejím modelu. Dále jsou shrnuty současné terapeutické přístupy k vybraným neurodegenerativním onemocněním a neuroprotektivní aktivita heterocyklických, potažmo purinových derivátů.

V experimentální části bakalářské práce bylo syntetizováno šest dimerních purinových derivátů s rozdílnými linkery a jeden monomer. Dvoustupňovou syntézou to byly látky **EC3**, **EC5**, **EC8A** a **EC10**. Jednostupňovou syntézou monomer **EC12** a dimery **EC13** a **EC14**. Kromě látek **EC3** a **EC8A**, které musely být kvůli své nerozpustnosti vyřazeny, byla testována biologická aktivita připravených látek na buněčné linii SH-SY5Y v modelu 3NP. Prvním testem bylo stanovení buněčné smrti pomocí PI. Přestože všechny testované látky vykazovaly určitý efekt, tak nejúčinnější se ukázala být monomerní látka **EC12** (pokles o 50 %) a dimerní **EC14** (pokles o 70 %), a proto byly podrobeny dalším testům. To bylo stanovení oxidativního stresu pomocí DHE, kde jak **EC12** (37 %), tak **EC14** (34 %) prokázaly účinek srovnatelný s kontrolními látkami (46 a 39 %). Pomocí stanovení aktivity kaspasy 3 byla stanovena míra apoptosy ovlivněných buněk. Bylo zjištěno, že obě látky opět snižují aktivitu kaspasy 3 (o 72 a 66 %) srovnatelně s kontrolními látkami (o 72 a 74 %). Apoptosa byla také studována pomocí YO-PRO-1, kdy byly výsledky obdobné. **EC12** snížila počet apoptotických buněk o 46 %, **EC14** o 48 %, zatímco kontrolní látky o 46 a 44 %.

Nakonec byly pozorovány morfologické rozdíly mezi ovlivněnými a neovlivněnými buňkami pomocí konfokálního mikroskopu po obarvení kalceinem AM. Obě látky, **EC12** i **EC14** prokázaly protektivní účinek. Žádná z testovaných látek nevykazuje cytotoxický efekt.

Obecně lze říct, že testované látky, především **EC12** a **EC14**, vykazují neuroprotektivní účinek. Bylo prokázáno, že zabraňují buněčné smrti, snižují oxidativní stres a zabraňují apoptose. Na rozdíl od kontrolní látky NAC také působí již v nízkých koncentracích (10 μ M). Aktivita **EC12** potvrzuje neuroprotektivní vlastnosti látek tohoto typu i v monomerní formě.

Předmětem dalšího studia by mohl být přesný mechanismus účinku látek **EC12** a **EC14** nebo ověření jejich aktivity v modelu jiného toxinu. V navazující práci se počítá s přípravou dimerních purinových derivátů s dalšími druhy linkerů, např. dusíkatými, nebo s přípravou heterosubstituovaných derivátů.

Seznam literatury

- Abrahams, S., Newton, J., Niven, E., Foley, J., & Bak, T. H. (2014). Screening for cognition and behaviour changes in ALS. *Amyotrophic Lateral Sclerosis And Frontotemporal Degeneration*, 15(1-2), 9-14. <https://doi.org/10.3109/21678421.2013.805784>
- Akhtar, A., Andleeb, A., Waris, T. S., Bazzar, M., Moradi, A. R., Awan, N. R., & Yar, M. (2021). Neurodegenerative diseases and effective drug delivery: A review of challenges and novel therapeutics. *Journal Of Controlled Release*, 330, 1152-1167. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.11.021>
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., & Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 351(3), 602-611. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.093>
- Arthur, K. C., Calvo, A., Price, T. R., Geiger, J. T., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2016). Projected increase in amyotrophic lateral sclerosis from 2015 to 2040. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12408>
- Ashrafian, H., Zadeh, E. H., & Khan, R. H. (2021). Review on Alzheimer's disease: Inhibition of amyloid beta and tau tangle formation. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 167, 382-394. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.192>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Bensimon, G., Lacomblez, L., Meininger, V., Bouche, P., Delwaide, C., Couratier, P., Blin, O., Viader, F., Peyrostopaul, H., David, J., Maloteaux, J. M., Hugon, J., Laterre, E. C., Rascol, A., Clanet, M., Vallat, J. M., Dumas, A., Serratrice, G., Lechevallier, B., et al. (1994). A Controlled trial of riluzole in amyotrophic-lateral-sclerosis. *New England Journal Of Medicine*, 330(9), 585-591. <https://doi.org/10.1056/NEJM199403033300901>

- Binder, L. I., Frankfurter, A., & Rebhun, L. I. (1985). The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *Journal Of Cell Biology*, 101(4), 1371-1378. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.4.1371>
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., & Blum, D. (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *Journal Of Neurochemistry*, 95(6), 1521-1540. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x>
- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Cummings, J. (2023). Anti-amyloid monoclonal antibodies are transformative treatments that redefine Alzheimer's disease therapeutics. *Drugs*, 83(7), 569-576. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01858-9>
- Dengler, W. A., Schulte, J., Berger, D. P., Mertelsmann, R., & Fiebig, H. H. (1995). Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs*, 6(4), 522-532. <https://doi.org/10.1097/00001813-199508000-00005>
- Drubin, D. G., & Kirschner, M. W. (1986). Tau-protein function in living cells. *Journal Of Cell Biology*, 103(6), 2739-2746. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.6.2739>
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavedo, E., Crutch, S., Dartigues, J. F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Genthon, R., et al. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers & Dementia*, 12(3), 292-323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Elobeid, A., Libard, S., Leino, M., Popova, S. N., & Alafuzoff, I. (2016). Altered proteins in the aging brain. *Journal Of Neuropathology And Experimental Neurology*, 75(4), 316-325. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw002>
- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- FDA approves treatment of amyotrophic lateral sclerosis associated with a mutation in the SOD1 gene. (2023). <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human->

drugs/fda-approves-treatment-amyotrophic-lateral-sclerosis-associated-mutation-sod1-gene. Citováno 11. 4. 2024

- Feldman, E. L., Goutman, S. A., Petri, S., Mazzini, L., Savelieff, M. G., Shaw, P. J., & Sobue, G. (2022). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, *400*(10360), 1363-1380. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01272-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01272-7)
- Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and Calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *Journal Of Histochemistry & Cytochemistry*, *46*(8), 895-900. <https://doi.org/10.1177/002215549804600804>
- Gonzalez, G., Grúz, J., D'Acunto, C. W., Kanovsky, P., & Strnad, M. (2021). Cytokinin plant hormones have neuroprotective activity in in vitro models of Parkinson's Disease. *Molecules*, *26*(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020361>
- Gonzalez, G., Mik, V., Bucharová, N., Grúz, J., Kaňovský, P., & Strnad, M. (2021) Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu, farmaceutické přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití při neuroprotektci. CZ 308800 B6
- Goutman, S. A., Hardiman, O., Al-Chalabi, A., Chió, A., Savelieff, M. G., Kiernan, M. C., & Feldman, E. L. (2022). Emerging insights into the complex genetics and pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurology*, *21*(5), 465-479. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00414-2)
- Heravi, M. M., & Zadsirjan, V. (2020). Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: an overview. *RSC Advances*, *10*(72), 44247-44311. <https://doi.org/10.1039/d0ra09198g>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, *38*(9), 1205-1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Idziorek, T., Estaquier, J., Debels, F., & Ameisen, J. C. (1995). YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell-death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal Of Immunological Methods*, *185*(2), 249-258. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00172-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00172-7)

- Jaiswal, M. K. (2019). Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*, 39(2), 733-748. <https://doi.org/10.1002/med.21528>
- Jena, S., Gonzalez, G., Vítek, D., Kvasnicová, M., Štěpánková, Š., Strnad, M., Voller, J., & Chanda, K. (2024). Novel neuroprotective 5,6-dihydropyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-c]quinoline derivatives acting through cholinesterase inhibition and CB2 signaling modulation. <https://ssrn.com/abstract=4749746>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, 386(9996), 896-912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kaufmann, S. H., Lee, S. H., Meng, X. W., Loegering, D. A., Kottke, T. J., Henzing, A. J., Ruchaud, S., Samejima, K., & Earnshaw, W. C. (2008). Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*, 44(3), 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.005>
- Kordinová, H. (2020). *Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potencionálními neuroprotektivními účinky v in vitro modelu Parkinsonovy choroby* [Bakalářská práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Kordinová, H. (2022). *Syntéza a biologická aktivita nových 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu jako potencionálních inhibitorů acetylcholin a butyrylcholinesteras s neuroprotektivní aktivitou v in vitro modelu Huntingtonovy choroby* [Diplomová práce]. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Liao, Y. Z., Ma, J., & Dou, J. Z. (2022). The Role of TDP-43 in neurodegenerative disease. *Molecular Neurobiology*, 59(7), 4223-4241. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02847-x>
- Lindwall, G., & Cole, R. D. (1984). Phosphorylation affects the ability of tau-protein to promote microtubule assembly. *Journal Of Biological Chemistry*, 259(8), 5301-5305.
- Lopez-Suarez, L., Al Awabdh, S., Coumoul, X., & Chauvet, C. (2022). The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. *Neurotoxicology*, 92, 131-155. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.008>
- Masters, C. L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C. C., Sperling, R. A., & Cummings, J. L. (2015). Alzheimer's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1-18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.56>

- McColgan, P., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington's disease: a clinical review. *European Journal Of Neurology*, 25(1), 24-34. <https://doi.org/10.1111/ene.13413>
- Miller, T. M., Cudkowicz, M. E., Genge, A., Shaw, P. J., Sobue, G., Bucelli, R. C., Chiò, A., Van Damme, P., Ludolph, A. C., Glass, J. D., Andrews, J. A., Babu, S., Benatar, M., McDermott, C. J., Cochrane, T., Chary, S., Chew, S., Zhu, H., Wu, F., et al. (2022). Trial of antisense oligonucleotide tofersen for SOD1 ALS. *New England Journal Of Medicine*, 387(12), 1099-1110. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2204705>
- Morales, P., Navarro, G., Gómez-Autet, M., Redondo, L., Fernández-Ruiz, J., Pérez-Benito, L., Cordoní, A., Pardo, L., Franco, R., & Jagerovic, N. (2020). Discovery of homobivalent bitopic ligands of the cannabinoid CB₂ Receptor**. *Chemistry-A European Journal*, 26(68), 15839-15842. <https://doi.org/10.1002/chem.202003389>
- Muñoz, S. S., Garner, B., & Ooi, L. (2019). Understanding the role of ApoE fragments in Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 44(6), 1297-1305. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2629-1>
- Navarro, G., Morales, P., Rodríguez-Cueto, C., Fernández-Ruiz, J., Jagerovic, N., & Franco, R. (2016). Targeting cannabinoid CB₂ receptors in the central nervous system. Medicinal chemistry approaches with focus on neurodegenerative disorders. *Frontiers In Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00406>
- Ohlmeier, C., Saum, K. U., Galetzka, W., Beier, D., & Gothe, H. (2019). Epidemiology and health care utilization of patients suffering from Huntington's disease in Germany: real world evidence based on German claims data. *Bmc Neurology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12883-019-1556-3>
- Ondo, W. G., Tintner, R., Thomas, M., & Jankovic, J. (2002). Tetrabenazine treatment for Huntington's disease – Associated chorea. *Clinical Neuropharmacology*, 25(6), 300-302. <https://doi.org/10.1097/00002826-200211000-00003>
- Paleacu, D., Anca, M., & Giladi, N. (2002). Olanzapine in Huntington's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 105(6), 441-444. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0404.2002.01197.x>

- Pardo-Moreno, T., González-Acedo, A., Rivas-Domínguez, A., García-Morales, V., García-Cozar, F. J., Ramos-Rodríguez, J. J., & Melguizo-Rodríguez, L. (2022). Therapeutic approach to Alzheimer's disease: Current treatments and new perspectives. *Pharmaceutics*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061117>
- Paulsen, J. S., Nopoulos, P. C., Aylward, E., Ross, C. A., Johnson, H., Magnotta, V. A., Juhl, A., Pierson, R. K., Mills, J., Langbehn, D., & Nance, M. (2010). Striatal and white matter predictors of estimated diagnosis for Huntington disease. *Brain Research Bulletin*, 82(3-4), 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.04.003>
- Periquet, M., Fulga, T., Myllykangas, L., Schlossmacher, M. G., & Feany, M. B. (2007). Aggregated α -synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *Journal Of Neuroscience*, 27(12), 3338-3346. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0285-07.2007>
- Peshavariya, H. M., Dusting, G. J., & Selemidis, S. (2007). Analysis of dihydroethidium fluorescence for the detection of intracellular and extracellular superoxide produced by NADPH oxidase. *Free Radical Research*, 41(6), 699-712. <https://doi.org/10.1080/10715760701297354>
- Pfeiffer, R. F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 22, S119-S122. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.004>
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., & Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *Journal Of Neuroscience*, 26(27), 7212-7221. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006>
- Rajan, K. B., Weuve, J., Barnes, L. L., McAninch, E. A., Wilson, R. S., & Evans, D. A. (2021). Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020-2060). *Alzheimers & Dementia*, 17(12), 1966-1975. <https://doi.org/10.1002/alz.12362>
- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Reviews In The Neurosciences*, 29(6), 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>

- Richard, A., & Frank, S. (2019). Deutetrabenazine in the treatment of Huntington's disease. *Neurodegenerative Disease Management*, 9(1), 31-36. <https://doi.org/10.2217/nmt-2018-0040>
- Rodrigues, F. B., Abreu, D., Damásio, J., Goncalves, N., Correia-Guedes, L., Coelho, M., & Ferreira, J. J. (2017). Survival, mortality, causes and places of death in a European Huntington's disease prospective cohort. *Movement Disorders Clinical Practice*, 4(5), 737-742. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12502>
- Selkoe, D. J. (2000). Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease hypothesis: Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *Alzheimers disease: A Compendium of Current Theories*, 924, 17-25.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). A-synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 95(11), 6469-6473. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6469>
- Stanciu, G. D., Ababei, D. C., Solcan, C., Uritu, C. M., Craciun, V. C., Pricope, C. V., Szilagyi, A., & Tamba, B. I. (2024). Exploring cannabinoids with enhanced binding affinity for targeting the expanded endocannabinoid system: A promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease treatment. *Pharmaceuticals*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ph17040530>
- Stefanis, L. (2012). α -synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, 2(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Stimming, E. F., Claassen, D., Kayson, E., Goldstein, J., Mehanna, R., Zhang, H., Liang, G. S., & Haubenberger, D. (2023). Safety and efficacy of valbenazine for the treatment of chorea associated with Huntington's disease (KINECT-HD): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurology*, 22(6), 494-504. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(23\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(23)00127-8)
- Wilson III, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., & Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 186(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>