



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Syntéza N9-pyridyl 2,6-disubstituovaných derivátů purinu a jejich biologická aktivita na neuronální buněčné linii SH-SY5Y**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Eva Hradečná</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2024

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Hradečná
Název práce	Syntéza N9-pyridyl 2,6-disubstituovaných derivátů purinu a jejich biologická aktivita na neuronální buněčné linii SH-SY5Y
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	<b>RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.</b>
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	Puriny jsou heterocyklické látky běžně vyskytující se v organismu. V této bakalářské práci byl využit jejich potenciál léčby neurodegenerativních onemocnění. Mezi ty se řadí Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, Parkinsonova choroba a další. Patofyziologickými znaky onemocnění jsou amyloidózy a tauopatie. V experimentální části byly připraveny purinové deriváty a byla testována jejich neuroprotektivní aktivita v <i>in vitro</i> modelu Huntingtinovy choroby. Ke studiu byla použita buněčná linie SH-SY5Y a model 3-nitropropionovou kyselinou indukované buněčné smrti.
Klíčová slova	Huntingtonova choroba, 3-nitropropionová kyselina, buněčná linie SH-SY5Y, neuroprotektce, 2,6disubstituované puriny
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eva Hradečná
Title of thesis	Synthesis of N9-pyridyl 2,6-disubstituted purine derivatives and their biological activity in the neuronal cell line SH-SY5Y
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	<b>RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.</b>
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Purines are heterocyclic substances commonly found in the body. In this bachelor thesis their potential for the treatment of neurodegenerative diseases was exploited. These include Alzheimer's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease and others. The pathophysiological features of the diseases are amyloidosis and tauopathy. In the experimental part, purine derivatives were prepared and their neuroprotective activities were tested in an in vitro model of Huntingtin's disease. The SH-SY5Y cell line and the 3-nitropropionic acid-induced cell death model were used for the study.</p>
Keywords	Huntington's disease, 3-nitropropionic acid, SH-SY5Y cell line, neuroprotection, 2,6-disubstituted purines
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne .....

.....

Eva Hradečná



## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval nejen v laboratoři, ale především při sepisování mé bakalářské práce a za trpělivost. Poděkování patří také mému školiteli Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi, Ph.D. za rady při biologickém testování látek. Velké díky patří také Mgr. Heleně Kordinové a Mgr. Kristýně Šomodiové za cenné rady a podporu při biologickém testování.

## Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	10
2 Teoretická část	11
2.1 Neurodegenerativní onemocnění	11
2.1.1 Alzheimerova choroba	11
2.1.2 Parkinsonova choroba	13
2.1.3 Huntingtonova choroba	14
2.1.4 Amyotrofická laterální skleróza	15
2.2 Buněčná linie SH-SY5Y	16
2.3 3-nitropropionová kyselina	17
2.4 Léčiva	19
2.4.1 Heterocyklické sloučeniny	19
2.4.2 Mechanismus účinku některých léčiv	21
3 Experimentální část	23
3.1 Chemická část	23
3.1.1 Chemikálie	23
3.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky	23
3.1.4 Syntéza	24
3.1.5 Syntéza látky EH2	25
3.1.6 Syntéza látky EH4	26
3.1.7 Syntéza látky EH5	27
3.1.8 Syntéza látky EH6	28
3.1.9 Syntéza látky EH7	29
3.1.10 Syntéza látky EH8	30
3.1.12 Syntéza látky EH9	31
3.1.13 Syntéza látky EH10	32
3.1.14 Syntéza látky EH11	33
3.2 Biologická část	34
3.2.1 Chemikálie a biologický materiál	34
3.2.2 Použité přístroje a zařízení	34
3.2.3 Použité programy – Software	34
3.2.4 Biologická aktivita na neuronální buněčné linii SH-SY5Y	34
3.2.5 Příprava koncentrační řady syntetizovaných látek	34
3.2.6 Testování látek na 96-jamkové mikrotitrační destičce	35
3.3 Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu	36

3.4	Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia.....	36
3.5	Test životaschopnosti a morfologie buněk .....	36
3.6	Testování cytotoxicity .....	36
4	Výsledky a diskuze .....	38
4.1	Syntéza látek.....	38
4.2	Biologické testování.....	40
4.2.1	Testování buněčné smrti.....	40
4.2.2	Testování oxidativního stresu .....	42
4.2.3	Testování cytotoxicity .....	43
4.2.4	Test životaschopnosti a morfologie buněk SH-SY5Y .....	44
5	Závěr .....	47
6	Citace.....	48

## Seznam zkratek

3-NP	3-nitropropionová kyselina
A $\beta$	$\beta$ -amyloidní protein
AD	Alzheimerova choroba
ALS	Amyotrofická laterální skleróza
ATRA	All- <i>trans</i> retinová kyselina
CAG	Sekvence cytosin-adenin-guanin
CB1	Kanabinoidní receptor 1
CB2	Kanabinoidní receptor 2
DA	Dopamin
DHE	Dihydroethidium
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium živin F12
DMSO	dimethylsulfoxid
EOAD	Alzheimerova choroba s časným nástupem
FAD	Dominantně dědičná familiární Alzheimerova choroba
HD	Huntingtonova choroba
LOAD	Alzheimerova choroba s pozdním nástupem
mtDNA	Mitochondriální DNA
NAC	<i>N</i> -acetylcystein
nAChR	Nikotinové acetylcholinové receptory
NFT	Neurofibrilární klubka
NMDA	N-methyl-D-aspartátové receptory
NMR	Nukleární magnetická rezonance

PBS	Fosfátový pufr
PD	Parkinsonova choroba
PI	Propidium jodid
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
SDH	Enzym sukcinátdehydrogenáza
SFN	Sulfopharane
TDP-43	TAR DNA-binding protein
VMAT2	Vezikulární monoaminový transportér 2

# 1 Úvod a cíle práce

## Úvod

Mezi časté choroby patří neurodegenerativní onemocnění, která jsou charakterizována úbytkem populace neuronů. Zároveň jsou často provázeny poruchami jako jsou amyloidózy a tauopatie. Huntingtonova choroba se řadí k poměrně častým neurodegenerativním onemocněním. Prevalence v Evropě jsou 3 pacienti na 100 000 obyvatel a průměrný věk nástupu je mezi 55-65 lety. Klinickými příznaky jsou motorické příznaky, emoční poruchy (deprese, podrážděnost) a kognitivní poruchy. Nejčastějším motorickým příznakem je chorea, při které dochází k abnormálním, mimovolným a nepřetržitým pohybům. V časných fázích onemocnění je chorea výraznější, naopak v pozdních fázích ustává. Huntingtonova choroba je způsobena genem *huntingtinem* nesoucím trinukleotidové repetice CAG. Normální alela *huntingtinu* obsahuje 6 až 35 CAG tripletových repetic. Zatímco *huntingtin* nemocných pacientů nese 36 a více tripletových repetic. Může docházet k shlukování mutovaného *huntingtinu* do proteinových agregátů, způsobovat poškození proteazomu a narušení mitochondrií.

## Cíle práce:

1. Rešerše literatury na téma neurodegenerativní onemocnění
2. Syntéza N9-pyridyl 2,6-disubstituovaných derivátů purinu
3. Testování neuroprotektivní aktivity připravených derivátů na neuronálních buňkách SH-SY5Y

## 2 Teoretická část

### 2.1 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění patří mezi onemocnění centrálního nervového systému. Jsou charakterizována progresivní ztrátou selektivně zranitelných populací neuronů a úbytkem neuronů v důsledku metabolických nebo toxických poruch. Mezi nejčastější příznaky patří demence, mozková atrofie a molekulární abnormality. Nejčastějšími neurodegenerativními poruchami jsou amyloidózy, synucleinopatie a tauopatie (Dugger a Dickson, 2017). Mezi neurodegenerativní onemocnění řadíme Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, Huntingtonovu chorobu, amyotrofickou laterální sklerózu a další (Chi *et al.*, 2018). Vzhledem k prodlužující se délce života dochází i ke zvýšení počtu starých lidí v populaci, a tím i počtu pacientů trpících neurodegenerativními onemocněními (Si *et al.*, 2021).

Existují dvě základní hypotézy, jak neurodegenerativní onemocnění vznikají. První je hypotéza amyloidní kaskády, druhou je hypotéza mitochondriální kaskády. Hypotéza amyloidní kaskády předpokládá, že prvotně dochází k tvorbě  $\beta$ -amyloidních plaků a až sekundárně k poškození mitochondrií. Zatímco hypotéza mitochondriální kaskády předpokládá prvotní poškození mitochondrií a vznik ostatních patologických znaků až sekundárně (Cenini a Voos, 2019). Hypotézu mitochondriální kaskády podporuje také fakt, že dědičnost mtDNA (mitochondriální DNA) je výhradně mateřská a riziko rozvoje AD v případě rodinné anamnézy onemocnění z matčiny strany je zvýšeno. Naopak hypotézu amyloidní kaskády podporuje fakt, že podávání amyloidního proteinu do kultivovaných buněk ovlivňuje mitochondriální funkci, a to inhibicí respiračního řetězce, depolarizací mitochondriální membrány a snížením spotřeby kyslíku (Monzio Compagnoni *et al.*, 2020).

Z hlediska patofyziologie je základním rysem synaptická dysfunkce a ztráta synapse z lidských mozkových tkání. Na patogenezi onemocnění se podílí nadměrné množství reaktivních forem kyslíku (ROS). Avšak zároveň je nízký obsah ROS kritický pro udržení funkce neuronů. Zvýšený oxidační stres přispívá k neurodegeneraci, mitochondriální dysfunkci a apoptickým procesům (Chen *et al.*, 2017).

#### 2.1.1 Alzheimerova choroba

Nejčastějším neurodegenerativním onemocněním je Alzheimerova choroba (AD), která je již od počátku zodpovědná za malé, pro jedince nepostřehnutelné, změny v mozku. Zhruba po 20 letech dochází k projevu prvních příznaků (Alzheimer's diseases facts and figures, 2019). Většina nemocných s AD je diagnostikována ve věku nad 65 let. Včasná AD se

vyskytuje u zhruba 10 % z celkového počtu pacientů (Hou a Hong, 2008). Prevalence onemocnění je zhruba 10 % u osob nad 65 let a 40 % u jedinců nad 80 let (Deture a Dickson, 2018).

Mezi prvotní znaky onemocnění se řadí zhoršení paměti, které však nemusí být postřehnutelné v každodenním životě. Poté se mohou projevit časné poruchy chůze, záchvaty, změny chování a motorické příznaky (Reith, 2018). Později se příznaky zhoršují a pacient se stává závislý na péči. Smrt nastává v průměru 8,5 roku po diagnostice onemocnění (Lane *et al.*, 2018).

AD může být dominantně dědičná familiární (FAD), s časným nástupem (EOAD) nebo s pozdním nástupem (LOAD). FAD může být způsobena mutacemi v genech pro amyloidní prekurzorový protein, presenilin 1 nebo presenilin 2. Pacienti s EOAD jsou diagnostikováni před 65. rokem života, u pacientů s LOAD je považován nástup za sporadický (Deture a Dickson, 2019).

Z hlediska hypotézy amyloidní kaskády mezi změny mozku spojené s AD patří akumulace proteinového fragmentu  $\beta$ -amyloidu mimo neurony a akumulace abnormální formy proteinu tau uvnitř neuronů. Amyloidy jsou vláknité nerozpustné proteiny bohaté na strukturu  $\beta$ -listu, které se obvykle vyskytují v podobě agregátů v cytoplazmě neuronů a glií a v podobě plaků v mozkovém parenchymu nebo ve stěnách krevních cév. Nejčastějším amyloidním proteinem je  $\beta$ -amyloid, jehož genový prekurzor se nachází na 21. chromozomu. Ten je označován také jako A $\beta$  (Dugger a Dickson, 2017).  $\beta$ -amyloidní plaky mohou být zodpovědné za buněčnou smrt tím, že ovlivňují komunikaci mezi neurony na synapsích. Hladina  $\beta$ -amyloidního proteinu se zvyšuje už 22 let před prvotním projevem symptomů (Alzheimer's disease facts and figures, 2019).

Za normálních podmínek je struktura proteinu tau podporována mikrotubuly. Při jeho patogenní formě se protein od mikrotubulů odděluje a tím narušuje cytoskelet neuronu. Tau se mohou akumulovat do neurofibrilárních klubek (NFT) nebo být přítomny v neuritických placích. Patogenní tau v cytosolu jsou náchylné k tvorbě proteinových agregátů a dalšímu vývoji v NFT, které nemohou být proteazomovým ani autofagickým systémem degradovány (Chi *et al.*, 2018). Mnohé experimenty také ukazují, že tvorba A $\beta$  je spouštěčem patologie tau (Gao *et al.*, 2018). Tau proteiny u pacientů s AD jsou hyperfosforylované, mají abnormální složení a ztrácí svou schopnost vázat se a stabilizovat mikrotubuly. Abnormální tau mají tedy větší sklon k agregaci. Také dochází k tvorbě párových helikálních filament,



kteře se skládají z izoforem se 3 opakováními (3R tau) a se 4 opakováními (4R tau) ve vazebné doméně mikrotubulů (Deture a Dickson., 2019).

Prvním důkazem podporujícím hypotézu mitochondriální kaskády byl snížený metabolismus glukózy a kyslíku v mozcích pacientů. Studie také poukazují na zhoršenou spotřebu kyslíku v mozcích pacientů, což značí bioenergetickou dysfunkci a mitochondriální poškození (Monzio Compagnoni *et al.*, 2020). Neurony jsou závislé na přítomnosti mitochondrií, kde dochází k produkci adenosintrifosfátu a regulaci koncentrace vápenatých iontů, které jsou klíčové pro synaptickou signalizaci. U AD dochází k narušení mitochondriální morfologie, oxidativní fosforylaci, produkci ROS, oxidaci a mutaci mitochondriální DNA, mitochondriální biogenezi a mitofágií. Právě mutace v mitochondriální DNA mohou vést ke zvýšené produkci ROS. Dochází k snížení aktivity enzymů, které se zapojují do produkce mitochondriální energie. Mezi enzymy, jejichž aktivita se snižuje, se řadí cytochrom c oxidáza (komplex IV), pyruvátdehydrogenázový komplex, mitochondriální isocitrátdehydrogenáza a komplex ATP syntázy. Naopak aktivita enzymů sukcinátdehydrogenázy (komplex II) a malátdehydrogenázy se zvyšuje, což může vést k dalším dysfunkčním procesům mitochondrií. Dochází k významnému snížení počtu mitochondrií v lidském hypokampu a ke snížení hladiny proteinu regulujícího mitochondriální biogenezi (Cenini a Voos, 2019).

U pacientů s AD byla prokázána fragmentace DNA. Amyloidní prekurzorový protein se nachází v neuronech a při jeho štěpení vzniká C31, což je peptid indukující apoptózu.  $\beta$ -amyloid zvyšuje oxidační stres a snižuje dostupnost energie, čímž se zvyšuje náchylnost buněk k apoptóze (Erekat, 2022). Vliv na apoptózu u pacientů s AD má také deregulace proteinu p53 a tvorba nitrátu (Steffan *et al.*, 2000). Protein p53 se za normálních okolností zapojuje do kontrolních mechanismů proti buněčnému stresu a do obrany proti degeneraci neuronů. Proto jeho deregulace může přispět k neuronální dysfunkci a neurodegeneraci (Clark *et al.*, 2022).

### **2.1.2 Parkinsonova choroba**

Parkinsonova choroba (PD) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním. Mezi hlavní klinické znaky se řadí svalová tuhost, klidový třes, posturální nestabilita (schopnost zajistit vzpřímené držení těla) a další motorické i nemotorické příznaky (Monzio Compagnoni *et al.*, 2020). Hlavními patologickými rysy jsou zmenšená signální soustava a snížená hladina dopaminu (DA) v důsledku ztráty nigrálních neuronů, které ho produkují. Nedostatek DA způsobuje zvýšenou regulaci inhibičních signálů řídících pohyb těla, což vede k symptomům souvisejícím s pohybem těla (Chi *et al.*, 2018).

Riziko PD je dvakrát vyšší u mužského pohlaví, nicméně ženské pohlaví projevuje vyšší úmrtnost a rychlejší progres onemocnění. V závislosti na pohlaví se liší symptomy onemocnění (Cerri *et al.*, 2019). Počet nemocných na celém světě se odhaduje mezi 7 až 10 miliony, v Americe je to zhruba milion nemocných a každý rok je diagnostikováno téměř 60 000 nových případů (Beitz, 2014). Prevalence onemocnění je 1-2 % u lidí nad 50 let (Xie *et al.*, 2010).

Hlavním patogenním proteinem PD je  $\alpha$ -synuklein, jehož agregáty tvoří jádro Lewyho tělísek. Není známo, jak  $\alpha$ -synuklein na molekulární úrovni vyvolává smrt neuronů, ale bylo zjištěno, že po kultivaci  $\alpha$ -synukleinu s DA neurony jsou buňky náchylnější k apoptóze za přítomnosti minimálního množství proteazomových toxinů (Chi *et al.*, 2018).

U PD dochází k významnému zapojení mitochondrií. V některých studiích byly zaznamenány delece a bodové mutace mtDNA. Některé z genů, jejichž patogenní mutace způsobují autozomálně recesivní formy PD s časným nástupem, jsou přímo zapojeny do mitochondriální biologie. Mezi tyto geny patří *Parkin* a *PINK1*, které se podílejí na mitofagickém aparátu, přispívají tedy ke směřování poškozených mitochondrií k degradaci. *PINK1* při poškození mitochondrií získává a aktivuje *Parkin*. Po jeho přijetí konjuguje ubikvitin na proteiny vnější mitochondriální membrány a tím podporuje pohlcení mitochondrií autofagosomem. *Parkin* se spolu s *PINK1* podílejí na mitochondriálním štěpení a fúzi (Monzio Compagnoni *et al.*, 2020).

### **2.1.3 Huntingtonova choroba**

Huntingtonova choroba (HD) je autozomálně dominantní dědičné neurodegenerativní onemocnění. Prevalence onemocnění v kavkazské populaci je 5-17,2 případů na 100 000 obyvatel, v japonské 0,5 případů na 100 000 obyvatel (Sun *et al.*, 2017). Průměrný věk nástupu onemocnění je mezi 55 a 65 lety. Pouze 5-10 % případů je diagnostikováno ve věku méně než 40 let (Hou a Hong, 2008). Mezi klinické příznaky HD patří motorické příznaky, emoční poruchy, jako jsou deprese a podrážděnost, a kognitivní poruchy. Nejvýraznějším motorickým příznakem je chorea (McColgan a Tabrizi, 2018), která je charakterizována abnormálními, mimovolnými, nepřetržitými a náhodnými pohyby (Baizabal-Carvallo a Cardaso, 2020). Chorea se většinou v časných fázích onemocnění zvyšuje, ve středních fázích onemocnění dojde k ustálení a v konečných fázích obvykle ustává (Reilmann, 2019). V konečném stádiu onemocnění je nutná 24hodinová péče o nemocného (McColgan a Tabrizi, 2018).

HD je charakterizována ztrátou GABAergních středních trnitých neuronů a cholinergních neuronů nejen v *corpus striatum*, ale v celém mozkovém kortexu (Chi *et al.*, 2018). Onemocnění je způsobeno genem *huntingtinem* umístěným na chromozomu 4, který nese zděděné trinukleotidové repetice sekvence cytosin-adenin-guanin (CAG) (McColgan a Tabrizi, 2018). Normální alela *huntingtinu* nese mezi 6 a 35 CAG tripletovými repeticemi. Alela *huntingtinu* u nemocných nese 36 a více CAG tripletových repetit (Sun *et al.*, 2017). U pacientů nesoucích více než 39 opakování CAG se onemocnění rozvine, u pacientů nesoucích mezi 36 a 39 opakováními se onemocnění rozvinout může, ale nemusí (McColgan a Tabrizi, 2018). U HD se může mutantní huntingtinový protein shlukovat do proteinových agregátů a způsobit poškození proteazomu, snížení neurotrofické transkripce a narušení mitochondrií (Chi *et al.*, 2018).

Biochemické testy naznačují, že při HD dochází k mitochondriální dysfunkci. Dochází také ke změnám v elektronovém transportním řetězci, ve kterém jsou ovlivněny komplexy II a III, to vede k snížení oxidace sukcinátu a syntézy ATP, v menší míře je ovlivněn komplex IV, tedy cytochromoxidáza. Právě mitochondriální dysfunkce je hlavním zdrojem ROS, které spouští excitotoxicitu. Excitotoxicita poté indukuje vstup vápenatých iontů z extracelulárního média, což vyvolává uvolnění vápenatého iontu z mitochondrií a endoplazmatického retikula do cytoplazmy. Tím je aktivována neuronální syntéza oxidu dusnatého. Oxid dusnatý se po reakci se superoxidovým aniontem přeměňuje na peroxynitrit. Důsledkem těchto dějů je nerovnováha mezi oxidačními a antioxidačními systémy, díky čemuž dochází ke zvýšené produkci ROS (Túnez *et al.*, 2010).

#### **2.1.4 Amyotrofická laterální skleróza**

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je charakterizována degenerací horních i dolních motorických neuronů, důsledkem je svalová slabost či paralýza (Chi *et al.*, 2018). Spolu se slabostí kosterních svalů, které se zapojují do pohybu končetin, patří mezi hlavní příznaky také porucha polykání, mluvení a poruchy respiračního systému. Dalšími příznaky jsou špatná pracovní paměť, podrážděnost, nedbání na hygienu a změna stravovacích návyků. Nejčastěji se vyskytuje u pacientů mezi 60-79 lety. Incidence v oblasti Evropy a Severní Ameriky se pohybuje mezi 1,71-1,89 pacientů na 100 000 obyvatel, zatímco v jižní Asii se incidence pohybuje kolem 0,73 na 100 000 obyvatel (Feldman *et al.*, 2022).

ALS může být familiární nebo sporadická. Zhruba 10-15 % případů je familiární ALS, která je dědičná, přičemž asi 70 % případů je způsobeno mutacemi v genech ALS. 85 % případů je tvořeno sporadickou ALS (Feldman *et al.*, 2022).

Mezi patologické znaky pacientů s ALS se řadí cytoplazmatická inkluze skládající se převážně z TAR DNA-binding proteinu 43 (TDP-43). Protein TDP-43 patří mezi patologické znaky frontálně-temporální demence, AD a demence s Lewyho tělisky. Za normálních podmínek se TDP-43 nachází v jádře, kde může dojít k jeho navázání na DNA a tím k účasti regulace genové exprese. Při patologických stavech dochází k přemístění TDP-43 do cytosolu a tvorbě agregátů (Chi *et al.*, 2018). Mezi další mutace genů řadíme *C9orf72*, *TARDBP*, *SOD1* či *FUS*. Některé geny, jako například *ANG*, *ATXN2*, *DCTN1*, nemusí nutně onemocnění vyvolat, ale mohou zvyšovat riziko vývoje ALS (Feldman *et al.*, 2022). Právě mutace repetice G4C2 v genu *C9orf72* patří mezi nejčastější genetické příčiny ALS (Lee *et al.*, 2019).

## 2.2 Buněčná linie SH-SY5Y

Buněčná linie SH-SY5Y je třikrát klonovaná sublinie buněk SK-N-SH, které pochází z kostní dřene pacienta s metastatickým neuroblastomem. Linie byla vytvořena počátkem 70. let 20. století. Buňky SH-SY5Y jsou odvozené z nezralých neoplastických buněk neuronální lišty, tudíž mají vlastnosti podobné kmenovým buňkám a jsou schopny proliferovat v kultuře delší dobu bez kontaminace. Z těchto důvodů je tato linie od počátku 80. let 20. století často používána v experimentálních neurologických studiích, včetně studiích neuroprotektce (Xie *et al.*, 2010).

Nedostatky tohoto modelu jsou ty, že při kontinuálně se dělicí buněčné linii se díky zvyšování počtu nediferencovaných buněk linie SH-SY5Y zvyšuje také obtížnost rozlišení, zda neuroprotektivní či neurotoxická činidla ovlivňují rychlost buněčné smrti nebo proliferace. Další nevýhodou je, že buňky linie SH-SY5Y nevykazují vždy typické markery zralých neuronů, to může vést k nejistotě v experimentech. Dalším problémem je, že nediferencované buňky SH-SY5Y nejsou tak citlivé k neurotoxinům a neuroprotektivním činidlům jako mezencefalické neurony (Xie *et al.*, 2010).

Na stárnutí buněk má velký vliv poškození DNA, které se zvyšuje spolu se zvyšujícím se věkem. Při stárnutí buněk dochází ke změnám v buněčné morfologii, v buněčném metabolismu, buněčné sekreci a genové regulaci. Může docházet také k tvorbě heterochromatinových ložisek, které jsou spojeny se stárnutím (Si *et al.*, 2021).

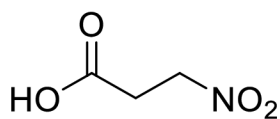
Předpokládanými hlavními důvody smrti neuronů u neurodegenerativních onemocnění jsou apoptóza a nekróza. Rozdíl mezi apoptózou a nekrózou spočívá především v morfologii buňky a v tom, jestli dochází k úniku buněčného obsahu či nikoli (Chi *et al.*, 2018). Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která se běžně vyskytuje během vývoje

a stárnutí. Mezi morfologické znaky apoptózy patří smršťování buněk a pyknóza, která je způsobena kondenzací chromatinu (Elmore, 2007). Apoptóza může být vyvolána vnitřními či vnějšími signály. Mezi vnější signály patří vazba extracelulárních ligandů, mezi vnitřní signály se řadí poškození DNA. Při nekróze dochází k otoku buňky, čímž dochází k narušení buněčné membrány a úniku intracelulárního obsahu. Nekrózu lze dále rozdělit na kontrolovanou a nekontrolovanou (Chi *et al.*, 2018).

Apoptóza u pacientů PD je charakterizována ztrátou dopaminergních neuronů, což je doloženo fragmentací DNA v *substantia nigra*. Dopaminergní neurony jsou zranitelné díky snížené aktivitě mitochondriálního komplexu I. Zároveň dopaminergní metabolismus vede ke zvýšené tvorbě ROS. Expozice dopaminu vyvolává aktivitu kaspázy 8, kaspázy 9 a kaspázy 3. Několik mitochondriálních toxinů, mezi které se řadí například 6-hydroxydopamin nebo rotenon, brání vzniku mitochondriálního komplexu I, čímž je narušena mitochondriální funkce. Následkem je zvýšená tvorba ROS vedoucí k apoptóze (Erekat, 2022).

### 2.3 3-nitropropionová kyselina

Kyselina 3-nitropropionová (3-NP) je neurotoxin, který je díky své schopnosti vyvolat podobné behaviorální, biochemické a morfologické změny, jako jsou pozorovány u pacientů s HD, často využíván při laboratorních testech (Chen *et al.*, 2017). Toxin 3-NP je obsažen v houbách (*Aspergillus flavus*, *Astralagus*, *arthrinium*) a rostlinách (*Indigofera endecapylla*) (Upadhayay *et al.*, 2023). Jelikož může způsobovat prostřednictvím oxidačního stresu neurodegeneraci, je často používán k pozorování molekulárních mechanismů buněčné smrti způsobené mitochondriální dysfunkcí (Chen *et al.*, 2017).



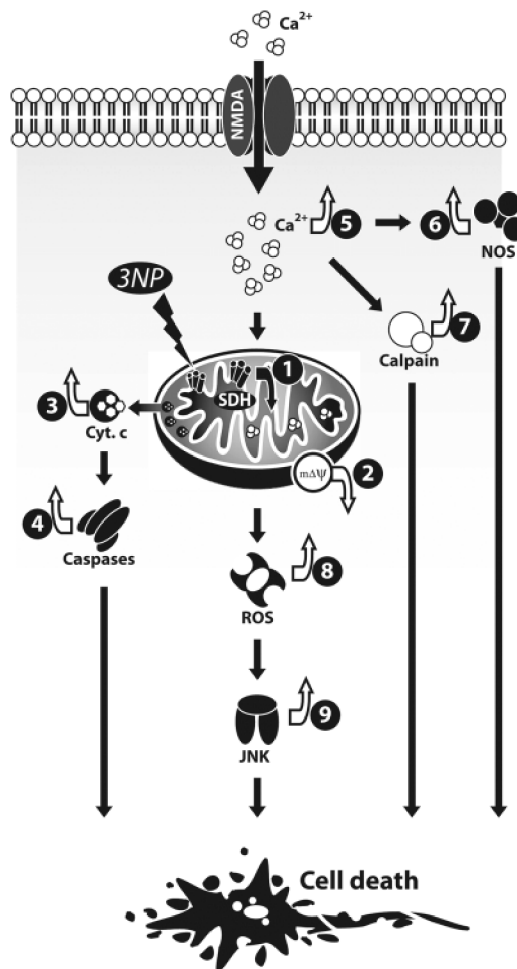
Obrázek 1: Kyselina 3-nitropropionová

Pokud je 3-NP podávána v malém množství (10mg/kg/den) po dobu 3-6 týdnů, je indukován stav metabolických změn a rysů podobný těm, které vykazují HD pacienti. Model 3-NP je schopný napodobení a reprodukce hyperkinetických a hypokinetických symptomů HD. Podle množství a času podané dávky je umožněno vyhodnocení počáteční a pozdní fáze HD. V případě, že je 3-NP podávána v jedné dávce, jsou vyvolány účinky podobné hypokinetickým symptomům. Pokud je 3-NP podávána ve dvou dávkách, jsou účinky podobné hyperkinetickým symptomům (Tunéz *et al.*, 2010). Mezi hyperkinetické příznaky

se řadí myoklonus, chorea a dystonie. Myoklonus je charakterizován prudkými záškuby svalů, naopak dystonie přetrvávajícími svalovými stahy. Důsledkem dystonie může být abnormální postavení postižených částí těla. Mezi hypokinetické znaky patří hypokineze (menší rozsah pohybů), bradykineze (zpomalený pohyb), akineze (ztížený začátek pohybu), třes, nestabilní chůze, kratší kroky a pomalá a monotónní řeč (Nevšímalová *et al.*, 2005).

Stejně jako HD, tak 3-NP degeneruje GABAergické střední ostnaté neurony ve *striatu*, jelikož dochází ke změně aktivity mitochondriálního komplexu, aktivity N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů a zvyšuje neurozánět (Upadhayay *et al.*, 2023). 3-NP narušuje tok iontů a dochází ke zvýšení koncentrace glutamátu ve *striatu*. Inhibice zpětného vychytávání glutamátu způsobuje, že se nadměrné množství glutamátu váže na NMDA. Důsledkem je nerovnováha v hladinách neurotransmiterů v mozku, což způsobuje hyperkinetický motorický pohyb u pacientů. Nadměrná aktivace NMDA receptorů přispívá k formě ROS a reaktivních forem dusíku (RNS). ROS poté podporují aktivaci zánětlivých kaskád a oxidační stres v jádře (Brouillet *et al.*, 2005).

Toxin 3-NP inhibuje komplex II, tedy enzym sukcinátdehydrogenázu (SDH), který se nachází na vnitřní straně mitochondriální membrány. Inhibice SDH vede k neuronální smrti v jádrech *caudate* a *putamen* (Túnez *et al.*, 2010). 3-NP je strukturně podobná sukcinátu a navázáním na katalytické místo elektronového transportního řetězce v mitochondriální membráně nevratně inhibuje enzym komplexu II, který je odpovědný za katalýzu sukcinátu na fumarát v Krebsově cyklu. Nevratná inhibice mitochondriálního komplexu II vede k deficitu syntézy ATP v mitochondriální membráně a zvýšení koncentrace laktátu, což způsobuje neuronální smrt a spuštění dystonie. 3-NP narušuje také mitochondriální komplex a snižuje syntézu ATP, to ovlivňuje několik biochemických drah, důsledkem je apoptóza. Mitochondriální abnormality způsobují zvýšení hladiny reaktivních druhů dusíku tím, že je ovlivněn oxidační a nitrosativní stres změnou oxidačního metabolismu. Snížení produkce antioxidantních enzymů, jako jsou kataláza a superoxidodismutáza vedou ke zvýšené tvorbě ROS, což způsobuje oxidační stres (Upadhayay *et al.*, 2023). Důležitou roli hrají také vápenaté ionty, jejichž zvýšená koncentrace v důsledku otevření membránových kanálů vede k excitotoxicitě (Túnez *et al.*, 2010).



Obrázek 2: Obrázek znázorňující intracelulární mechanismy 3-NP indukované degenerace neuronů *striata*. Bílé šipky znázorňují změnu (zvýšení či snížení) způsobenou 3-NP. 3-NP inhibuje katalytické místo SDH. Dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu indukovaného blokadou dýchacího řetězce a Krebsova cyklu. Inhibice SDH má za důsledek relokizaci proteinů membránového prostoru (např. cytochrom c). Zároveň 3-NP indukuje nárůst vápenatých iontů aktivujících Ca<sup>2+</sup> depedentní enzymy, mezi které patří NO syntázy. Aktivace NO syntázy vede ke zvýšení RNS. Vlivem zvýšené produkce ROS dochází pravděpodobně také k aktivaci c-Jun N-koncové kinázy, která může vést k aktivaci genů podporujících buněčnou smrt (Brouillet *et al.*, 2005).

## 2.4 Léčiva

### 2.4.1 Heterocyklické sloučeniny

Na progresi HD se podílí purinerní signální systém, jehož základními ligandy jsou ATP a adenosin (Upadhayay *et al.*, 2023).

Klíčovou rolí při objevování nových léků mají heterocyklické sloučeniny obsahující dusík. Mezi ty se řadí například purin, pyridin, pyrazol či kondenzované dusíkaté heterocyklické sloučeniny (Kumari *et al.*, 2022).

Mezi heterocyklické sloučeniny se řadí také kofein, který se vyznačuje antioxidačními, protizánětlivými a antiapoptickými vlastnostmi. Proto je využíván při léčbě

AD, PD a několika dalších neurodegenerativních poruch (Ruggiero *et al.*, 2022). Nachází se v kávě, čaji, energetických nápojích a v kakau. Chronický příjem kofeinu je zodpovědný za snížení oxidačního stresu a zlepšení mitochondriální funkce v neurotoxických situacích. Kofein je schopný inhibovat narušení membrány červených krvinek a apoptózu. Studie, která trvala 21 let, a bylo při ní pozorováno 875 žen a 534 mužů ve věku 50 let při počátku experimentu, zjistila, že konzumace 3-5 šálků denně snížila riziko AD o 62-64 % a demence o 65-70 % (Kolahdouzan a Hamadeh, 2017). V další studii bylo zjištěno, že geneticky určená vyšší koncentrace kofeinu v plazmě snižuje riziko AD. Stejně tak byla prokázána souvislost mezi střední konzumací kofeinu a sníženým rizikem AD v pozdním věku. Dlouhodobá léčba kofeinem snižuje hladinu amyloidního proteinu (Tapias *et al.*, 2023). Jiná studie ukázala, že nejlépe účinný je kofein proti PD. V této studii bylo zjištěno, že mírný příjem kávy snižuje riziko rozvoje PD o 24-30 %. U mužů má vliv především množství užitého kofeinu, u žen má velký vliv hormonální stav. Bylo zjištěno, že u žen užívajících kofein za současného užívání perorální antikoncepce nebo jako doplněk při menopauze, je metabolismus kofeinu inhibován (Camandola *et al.*, 2019).

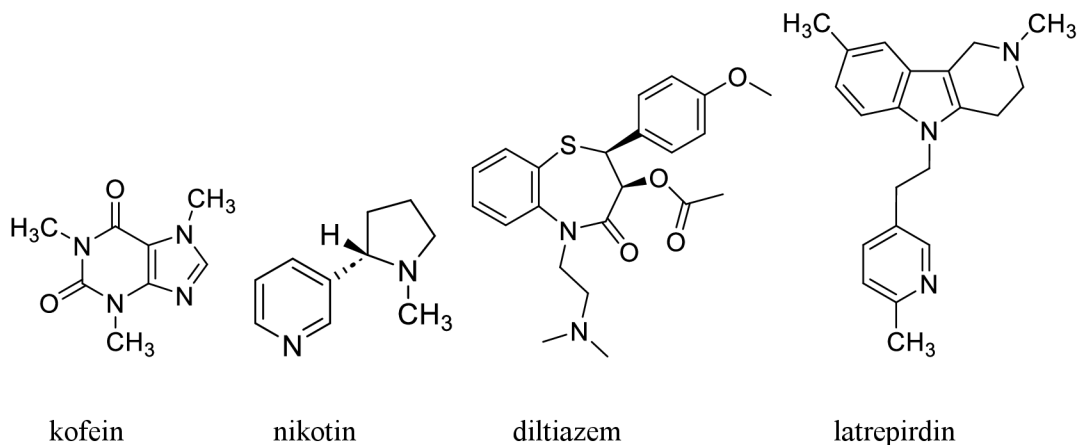
Vliv na neurodegenerativní onemocnění má také nikotin. Nikotin (1-methyl-2-[3-pyridyl]pyrrolidin) může ve své nenabité formě pronikat přes plazmatickou membránu a vstupovat tak do mozku. V mozku se pak může změnit na nabitou formu a navázat a spustit nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR). Receptory jsou schopny zprostředkovávat cholinergní protizánětlivou dráhu, která může omezit škodlivé fenotypy mikroglií. U pacientů s AD jsou nAChR výrazně sníženy, což vysvětluje cholinergní deficity spojené s AD. Zejména pak dochází ke snížení hladiny  $\alpha 7$  nAChR. Amyloidní peptid je schopen navázat se na  $\alpha 7$  nAChR a vytvářet tak komplex  $\alpha 7$  nAChR-A $\beta$ . Následná agregace A $\beta$  pak podporuje fosforylaci komplexu tau vedoucí k tvorbě neurofibrilárních klubek. Avšak kvůli vysoké toxicitě a nízké účinnosti zatím nebyl na trh uveden žádný lék spojený s nAChR (Vallés a Barrantes, 2023).

Nikotin má vliv i na PD, která bývá často léčena substituční terapií L-DOPA. Terapie L-DOPA však indukuje dyskinezi. Právě nAChR může zvýšit uvolňování DA z dopaminergních neuronů. Aktivace  $\alpha 7$  nAChR ve zvířecích modelech se ukázala jako účinná pro zmírnění symptomů spojených s PD, výhodou je inhibiční účinek na dyskinetické vedlejší účinky terapie L-DOPA (Vallés a Barrantes, 2023).

Dalšími dusíkatými heterocyklickými sloučeninami využívanými se při léčbě neurodegenerativních onemocnění jsou diltiazem a latrepirdin. Diltiazem působí jako kalciový blokátor. Latrepirdin blokuje aktivitu histaminového receptoru a je reverzibilním a



kompetitivním inhibítorem acetylcholinesterázy, což vede k zvýšenému množství acetylcholinu a současnému posílení kognitivní výkonnosti. Dále je latrepirdin schopný modulace několika neurotransmiterových receptorů, mezi které patří DA, serotonin, glutamát a NMDA (Tapias *et al.*, 2023).



Obrázek 3: Struktura vybraných heterocyklických sloučenin.

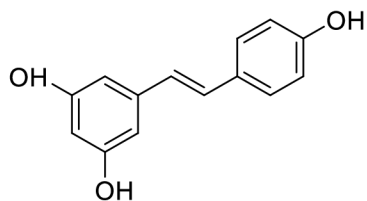
#### 2.4.2 Mechanismus účinku některých léčiv

Mezi syntetické léky využívající se při léčbě neurodegenerativních poruch patří deutetrabenazin. Deutetrabenazin je lék využívající se k léčbě chorey, která je spojená s HD. Jedná se o reverzibilní inhibitor vezikulárního monoaminového transportéru 2 (VMAT2), který transportuje monoaminy, jako je například dopamin, do nervového zakončení. Při inhibici VMAT2 je presynaptický dopamin vyčerpán, což způsobí snížení uvolněného dopaminu při uvolňování neuronů, to vede k menšímu počtu mimovolných pohybů (Tarakad *et al.*, 2018).

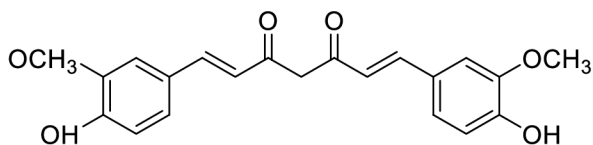
Sulfopharane (SFN) je isothiokyanát, který je přítomen v některých druzích klíčící brukvovité zeleniny. Bylo prokázáno, že SFN inhibuje agregaci amyloidního proteinu, hyperfosforylaci proteinu tau a snižuje oxidační stres. Navíc chrání před tvorbou amyloidních plaků, snižuje ztráty cholinergních neuronů a snižuje kognitivní deficity (Schepici *et al.*, 2020).

Přírodní látky s možnými účinky proti neurodegenerativním onemocněním jsou fenylypropanoidy. Mezi fenylypropanoidy se řadí stilbenoidy, flavonoidy, kurkuminoidy, fenolátové estery a lignany (Cenini a Voos, 2019). Mnoho fenylypropanoidů působí jako silné inhibitory amyloidního proteinu. Nejlépe proti amyloidnímu proteinu působí kurkumin. Fenylypropanoidy v rostlinách působí jako přímé antioxidanty, tudíž zachycují a zhašejí volné radikály a tím zabraňují oxidačnímu stresu (Kolaj *et al.*, 2018). Také resveratrol, kvercetin a wogonin podporují mitochondriální biogenezi a brání oxidačnímu stresu. Avšak zatím

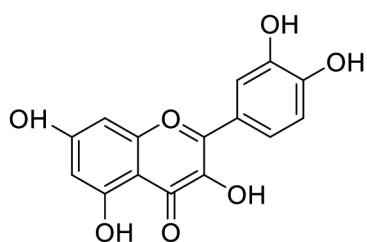
žádný z fenylpropanoidů není využíván ke skutečné terapii (Cenini a Voos, 2019). Ve studii, která trvala 5 let a při které bylo podáváno zvýšené množství pěti hlavních zdrojů flavonoidů, bylo zjištěno snížené riziko rozvoje PD o 40 %. U žen nebyla pozorována souvislost mezi množstvím zkonsumovaných flavonoidů a snížením rizika rozvoje PD (Maher, 2019).



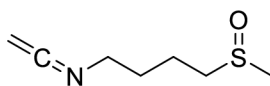
resveratrol



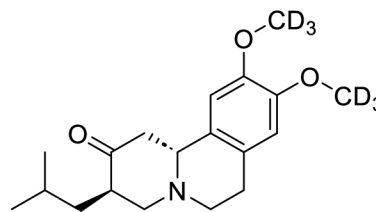
kurkumin



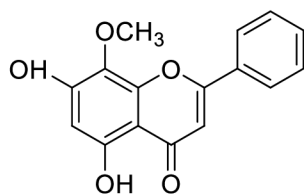
kvercetin



sulfopharan



deutetrabenazin



wogonin

Obrázek 4: Struktura vybraných léčiv.

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Chemická část**

#### **3.1.1 Chemikálie**

Aceton, 2-brommethylpyridin, 3-brommethylpyridin, 4-brommethylpyridin, cyklohexan (Penta), chloroform (Lach:Ner), diethylether (Lach:Ner), dichlormethan (Penta), dimethylformamid (DMF), 2,6-dichlorpurin (Fluorochem), diethylether, ethanol (Penta), ethylacetát (Lach:Ner), heptan, methanol (Penta), N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) (Alfa-Aesar), pyrrolidin, piperidin (Merck), toluen (Lach:ner), síran sodný (Lach:ner), uhličitan draselný (Penta).

#### **3.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky**

Chromatografická kolona, analytické váhy (Sartorius), magnetická míchačka s ohřevem (IKA), spektrometr nukleární magnetické rezonance (NMR) Joel ECA-500 (Joel), vakuová pumpa (VacuuBRAND), magnetická míchačka s ohřevem (IKA), rotační vakuová odparka (Heidolph), UV lampa s kolonou (Spectroline), lyofilizátor (Gregor instruments), hliníkové destičky potažené silikagelem (Merck), hmotnostní spektrometr Orbitrap Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific).

### 3.1.4 Syntéza

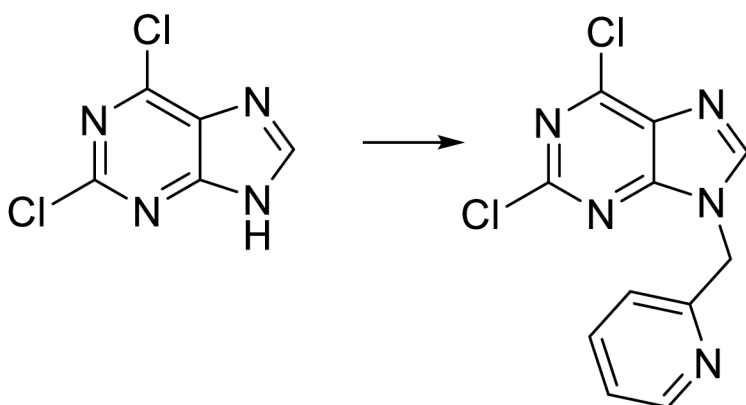
#### 3.1.4.1 Obecný postup při syntéze

Ke sledování průběhu reakce, čistoty produktu a určení mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii byla použita tenkovrstevná kapalinová chromatografie na hliníkové destičce s vizualizací pod UV lampou. Produkty byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze byly použity methanol/chloroform, cyklohexan/ethylacetát, methanol/ethylacetát. Všechny produkty byly lyofilizovány. Identifikace získaných látek byla provedena pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie. NMR spektra byla měřena na spektrometru JOEL JNM-ECA500 (JOEL, Tokyo, Japonsko;  $^1\text{H}$ , 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 125 MHz), vybaveném 5mm JOEL Royal sondou.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR chemické posuny ( $\delta$ ) byly kalibrovány za použití tetramethylsilanu (TMS,  $^1\text{H}$   $\delta=0$  ppm) nebo rozpouštědel:  $\text{CDCl}_3$  ( $^1\text{H}$   $\delta=7.27$  ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta=77.00$  ppm) nebo  $\text{DMSO-d}_6$  ( $^1\text{H}$   $\delta=2.46$  ppm,  $^{13}\text{C}$   $\delta=40.00$  ppm). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm ( $\delta$ -scale), vazebné konstanty (J) v Hz. Všechny hodnoty byly získány analýzou prvního řádu. NMR data byla zpracována pomocí ACD/NMR Processor Academic Edition (ver. 12.01). Následně byly všechny vzorky měřeny vysoko-rozlišujícím hmotnostním spektrometrem ionizací elektrosprejem metodou přímého nástřiku.

### 3.1.5 Syntéza látky EH2

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (200 mg; 1,06 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán uhličitan draselný (400 mg; 2,9 mmol) a reakční směs byla míchána na magnetické míchačce v ledové lázni pod argonem po dobu 3 hodin. Následně byl přidán 2-brommethylpyridin (350 mg; 2,04 mmol) a směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 10-20 % cyklohexanu v ethylacetátu). Výtěžek činil 196 mg (66 %).

**9-(pyridin-2-ylmethyl)-2,6-dichloro-9H-purine (EH2):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 5,53 (s, 2H); 7,27 (m, 1H); 7,37 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz); 7,72 (td, 1H,  $J = 7,7; 1,7$  Hz), 8,38 (s, 1H); 8,55 (d, 1H,  $J = 4,9$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 48,88; 122,47; 123,63; 130,47; 137,37; 146,56; 150,03; 151,63; 152,95; 153,15; 153,24. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 280,0157; nalezeno 280,0160.

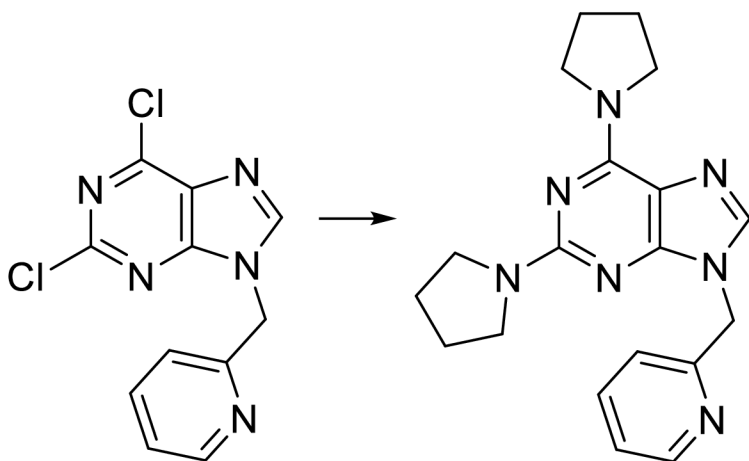


Obrázek 5: Schéma přípravy látky EH2.

### 3.1.6 Syntéza látky EH4

K roztoku látky EH2 (85 mg; 0,32 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán pyrrolidin (500  $\mu$ l; 5,45 mmol) a DIPEA (260  $\mu$ l; 1,49 mmol). Reakční směs byla míchána 3 hodiny při teplotě 160 °C v tlakové reakční nádobě. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 3-5 % methanolu v ethylacetátu). Výtěžek činil 95 mg (96,6 %).

**9-(pyridin-2-ylmethyl)-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purine (EH4):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,82-1,92 (m, 8H); 3,35-3,42 (m, 4H); 3,59 (bs, 2H); 3,98 (bs, 2H); 5,30 (s, 2H); 7,14 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz); 7,28 (m, 1H); 7,74 (td, 1H,  $J = 7,6, 1,8$  Hz); 7,78 (s, 1H); 8,50 (d, 1H,  $J = 4,6$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 23,73; 25,07 (2 $\times$ C); 25,89; 46,33 (3 $\times$ C); 46,54; 47,31; 113,14; 121,62; 122,70; 137,04; 137,12; 149,21; 152,43; 152,57; 156,52; 157,33. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 350,2093; nalezeno 350,2099.

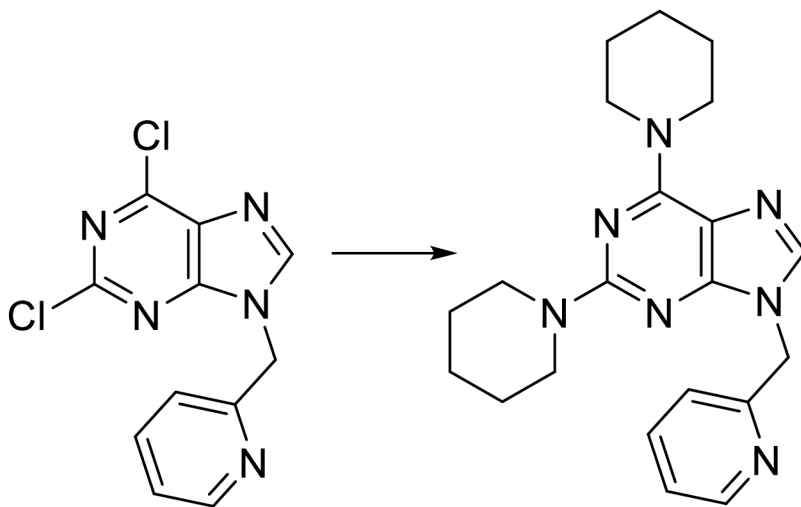


Obrázek 6: Schéma přípravy látky EH4.

### 3.1.7 Syntéza látky EH5

K roztoku látky EH2 (85 mg; 0,32 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán piperidin (500  $\mu$ l; 5,45 mmol) a DIPEA (260  $\mu$ l látky; 1,49 mmol). Reakční směs byla míchána 3 hodiny při teplotě 160 °C v tlakové reakční nádobě. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 1 % methanolu v chloroformu). Výsledek činil 65 mg (56,8 %).

**9-(pyridin-2-ylmethyl)-2,6-di(piperidin-1-yl)-9H-purine (EH5):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,41-1,46 (m, 4H); 1,51-1,56 (m, 6H); 1,61-1,65 (m, 2H); 3,60-3,62 (m, 4H); 4,09 (bs, 4H); 5,31 (s, 2H); 7,2 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz); 7,28 (m, 1H); 7,75 (td, 1H,  $J = 7,6, 1,8$  Hz); 7,85 (s, 1H); 8,49 (dd, 1H,  $J = 4,6, 0,8$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 24,42; 24,52; 25,24 (2 $\times$ C); 25,67 (2 $\times$ C); 44,82 (3 $\times$ C); 45,45; 47,39; 112,78; 121,78; 122,75; 137,02; 137,21; 149,25; 152,98; 153,22; 156,33; 158,07. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 378,2406; nalezeno 378,2397.

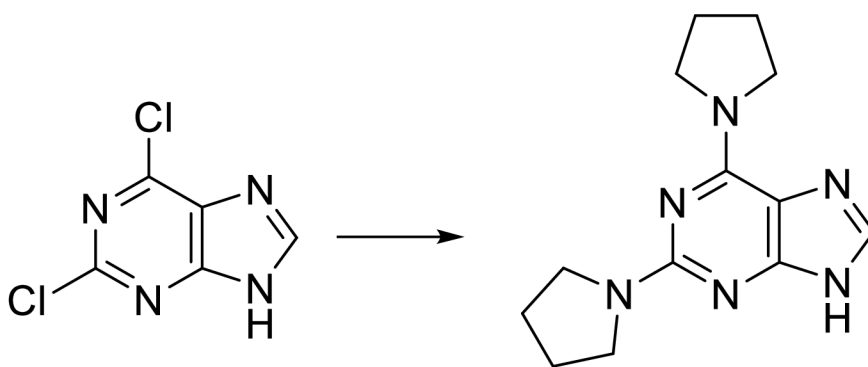


Obrázek 7: Schéma přípravy látky EH5.

### 3.1.8 Syntéza látky EH6

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (500 mg; 2,65 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán pyrrolidin (1,5 ml; 18,27 mmol) a DIPEA (1,5 ml; 8,61 mmol). Reakční směs byla míchána při 160 °C v tlakové reakční nádobě po dobu 3 hodin. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna extrakcí mezi chloroformem a vodou, organická fáze byla odpuštěná a byl přidán síran sodný k vysrážení. Směs byla odpařena na rotační vakuové odparce. Výtěžek činil 613 mg (89,9 %).

**2,6-di(piperidin-1-yl)-9H-purine (EH6):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,84-1,95 (m, 8H); 3,44 (t, 4H,  $J = 6,3$  Hz); 3,60 (bs, 2H); 3,97 (bs, 2H); 12,23 (bs, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 23,85; 25,14 ( $2\times\text{C}$ ); 25,88; 46,40 ( $3\times\text{C}$ ); 46,65; 113,09; 134,70; 152,49; 153,16; 157,40. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 259,1671; nalezeno 259,1671.



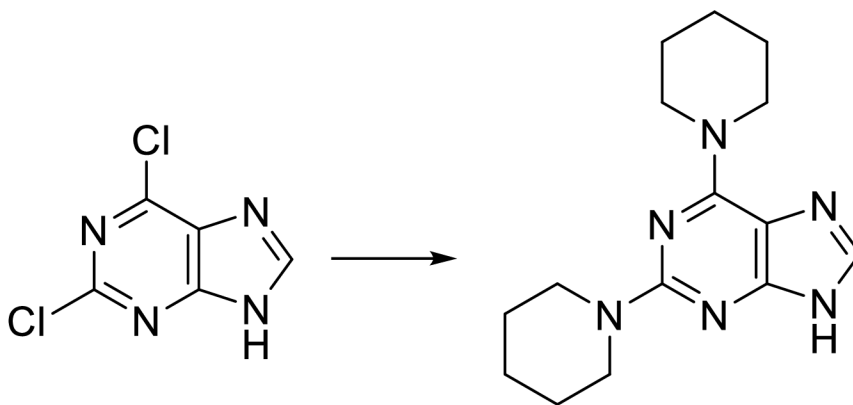
Obrázek 8: Schéma přípravy látky EH6.



### 3.1.9 Syntéza látky EH7

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (500 mg; 2,65 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán piperidin (1,5 ml; 15,16 mmol) a DIPEA (1 ml; 5,74 mmol). Směs byla míchána po dobu 3 hodin při 160 °C. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna extrakcí mezi chloroformem a vodou, organická fáze byla odpuštěná a byl přidán síran sodný k vysrážení. Výtěžek činil 548 mg (72,5 %).

**2,6-di(piperidin-1-yl)-9H-purine (EH7):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,46-1,50 (m, 4H); 1,51-1,58 (m, 6H); 1,61-1,66 (m, 2H); 3,62-3,64 (m, 4H); 4,09 (bs, 4H); 12,12 (bs, 1H, NH).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 24,44; 24,59; 25,25 (2 $\times$ C); 25,64 (2 $\times$ C); 44,99 (3 $\times$ C); 45,30; 112,79; 134,84; 153,12; 153,77; 158,15. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 287,1984; nalezeno 287,1977.

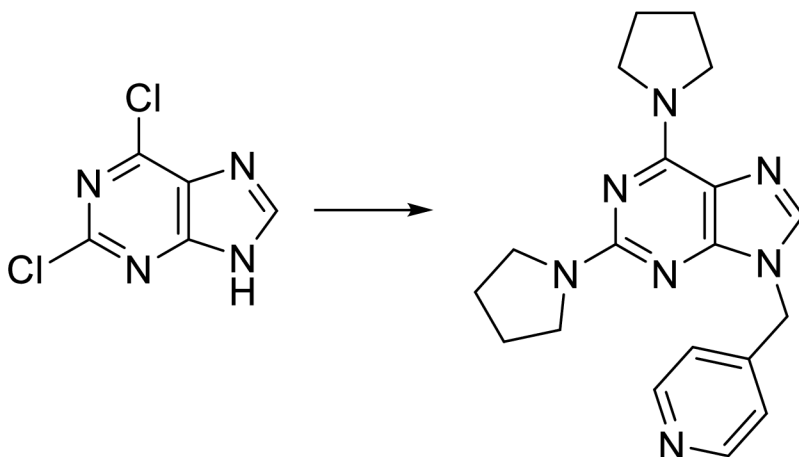


Obrázek 9: Schéma přípravy látky EH7.

### 3.1.10 Syntéza látky EH8

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (100 mg; 0,26 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán uhličitan draselný (200 mg; 1,45 mmol) a po 30 minutách míchání při laboratorní teplotě 4-brommethylpyridin (236 mg; 0,93 mmol). Po 16 hodinách míchání při laboratorní teplotě byl přidán pyrrolidin (1 ml; 12,18 mmol) a DIPEA (0,5 ml; 2,87 mmol) a směs byla míchána v tlakové reakční nádobě při 160 °C po dobu 3 hodin. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagenu (mobilní fáze: 2-4 % methanolu v chloroformu). Výtěžek činil 144 mg (78 %).

**9-(pyridin-4-ylmethyl)-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purine (EH8):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,90-2,05 (m, 8H); 3,55 (t, 4H,  $J = 6,1$  Hz); 3,75 (bs, 2H); 4,09 (bs, 2H); 5,23 (s, 2H); 7,15 (d, 2H,  $J = 5,2$  Hz); 7,42 (s, 1H); 8,54 (d, 2H,  $J = 5,2$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 24,35; 25,58 (2 $\times$ C); 26,26; 45,18; 46,67 (3 $\times$ C); 46,87; 113,62; 122,25 (2 $\times$ C); 135,05; 145,88; 150,12 (2 $\times$ C); 152,91; 153,13; 158,17. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 350,2093; nalezeno 350,2089.

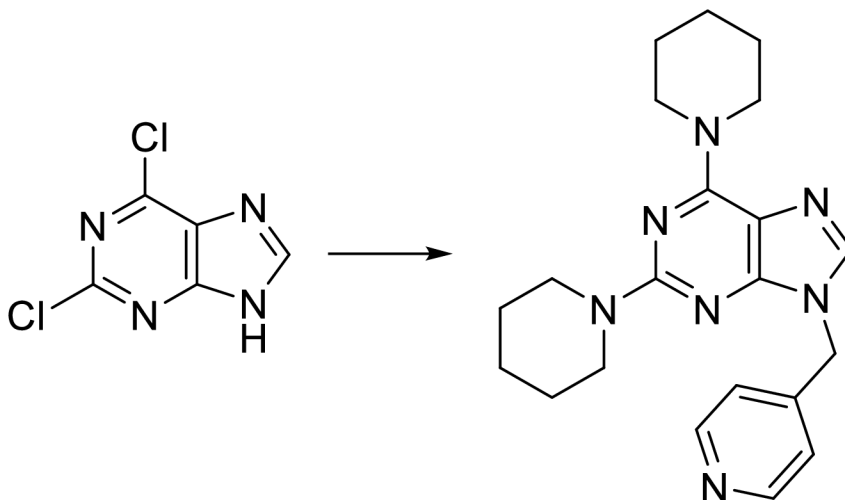


Obrázek 10: Schéma přípravy látky EH8.

### 3.1.12 Syntéza látky EH9

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (100 mg; 0,26 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán uhličitan draselný (200 mg; 1,45 mmol) a po 30 minutách míchání za laboratorní teploty 4-brommethylpyridin (175 mg; 0,69 mmol). Po 16 hodinách míchání při laboratorní teplotě byl přidán piperidin (1 ml; 10,12 mmol) a DIPEA (0,5 ml; 2,87 mmol) a směs byla míchána v tlakové reakční nádobě při 160 °C po dobu 3 hodin. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 2-3 % methanolu v chloroformu, poté 4-7 % methanolu v ethylacetátu). Výtěžek činil 98 mg (64,5 %).

**9-(pyridin-4-ylmethyl)-2,6-di(piperidin-1-yl)-9H-purine (EH9):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,55-1,71 (m, 12H); 3,72 (m, 4H); 4,15 (bs, 4H); 5,22 (s, 2H); 7,15 (d, 2H,  $J = 5,2$  Hz); 7,45 (s, 1H); 8,55 (d, 2H,  $J = 5,2$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 24,90; 24,99; 25,71 (2 $\times$ C); 26,02 (2 $\times$ C); 45,21; 45,37 (3 $\times$ C); 46,02; 113,30; 122,28 (2 $\times$ C); 134,87; 145,96; 149,88 (2 $\times$ C); 153,43; 153,92; 159,03. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 378,2406; nalezeno 378,2402.

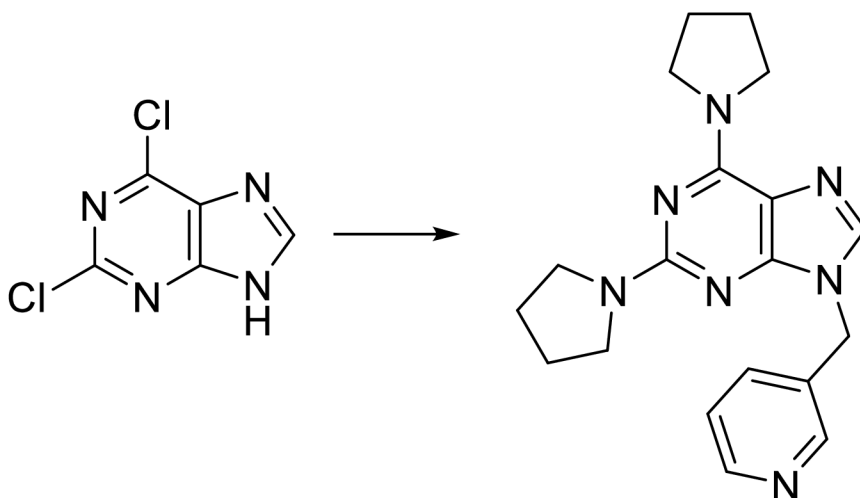


Obrázek 11: Schéma přípravy látky EH9.

### 3.1.13 Syntéza látky EH10

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (100 mg; 0,259 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán uhličitan draselný (200 mg; 1,45 mmol) a 3-brommethylpyridin (175 mg; 0,69 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 16 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl přidán pyrrolidin (1 ml; 12,18 mmol) a DIPEA (0,5 ml; 2,87 mmol) a směs byla míchána 3 hodiny při 160 °C v tlakové reakční nádobě. Poté bylo DMF odpařeno a surová směs byla přečištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 4 % methanolu v chloroformu, poté 4-9 % methanolu v ethylacetátu). Výtěžek činil 101,6 mg (55 %).

**9-(pyridin-3-ylmethyl)-2,6-di(pyrrolidin-1-yl)-9H-purine (EH10):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,91-2,02 (m, 8H); 3,58 (t, 4H,  $J = 6,7$  Hz); 3,73 (bs, 2H); 4,05 (bs, 2H); 5,22 (s, 2H); 7,22 (m, 1H); 7,42 (s, 1H); 7,65 (dt, 1H,  $J = 7,9, 1,8$  Hz); 8,52 (dd, 1H,  $J = 4,7, 1,8$  Hz); 8,69 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 24,68; 25,59 (2 $\times$ C); 26,23; 44,03; 46,67 (3 $\times$ C); 47,07; 113,70; 123,54; 132,61; 134,89; 135,76; 149,24; 149,36; 152,80; 153,08; 158,12. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 350,2093; nalezeno 350,2087.

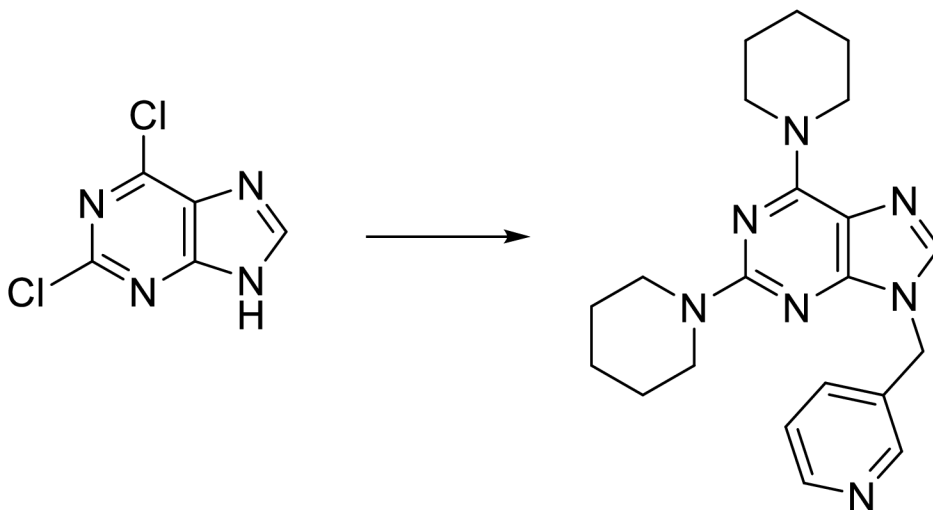


Obrázek 12: Schéma přípravy látky EH10.

### 3.1.14 Syntéza látky EH11

K roztoku 2,6-dichlorpurinu (100 mg; 0,259 mmol) v DMF (5 ml) byl přidán 3-brommethylpyridin (175 mg; 0,692 mmol) a uhličitan draselný (200 mg; 1,477 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu 16 hodin při laboratorní teplotě. Poté byl přidán piperidin (1 ml, 10,123 mmol) a DIPEA (0,5 ml, 2,87 mmol) a směs byla míchána po dobu 2 hodin v tlakové reakční nádobě při 160 °C. Poté bylo DMF odpařeno a surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze: 4-7 % methanolu v ethylacetátu). Výtěžek činil 104 mg (73,4 %).

**9-(pyridin-3-ylmethyl)-2,6-di(piperidin-1-yl)-9H-purine (EH11):**  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,56-1,70 (m, 12H); 3,75 (m, 4H); 4,13 (bs, 4H); 5,22 (s, 2H); 7,22 (ddd, 1H,  $J = 8,0; 4,8; 0,8$  Hz); 7,45 (s, 1H); 7,63 (dt, 1H,  $J = 8,0; 1,8$  Hz); 8,53 (dd, 1H,  $J = 4,7; 1,8$  Hz); 8,66 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 24,90; 25,01; 25,72 (2 $\times$ C); 26,01 (2 $\times$ C); 44,03; 45,43 (3 $\times$ C); 45,99; 113,47; 123,60; 132,54; 134,70; 135,75; 149,20; 149,22; 153,35; 153,88; 159,00. HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 378,2406; nalezeno 378,2400.



Obrázek 13: Schéma přípravy látky EH11.

## **3.2 Biologická část**

### **3.2.1 Chemikálie a biologický materiál**

Chemikálie použité k biologickému testování byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich: all-*trans*-retinová kyselina (ATRA), dihydroethidium (DHE), dimethylsulfoxid (DMSO), fosfátový pufr (PBS), *N*-acetylcystein (NAC) propidium jodid (PI), 3-nitropropionová kyselina, Dulbecco's Modified Eagle Medium živin F12 (DMEM/F12), Calcein-AM, 2% triton X-100.

Použitá neuroblastomová buněčná linie SH-SY5Y (ECACC 94030304) pochází z European Collection of Authenticated Cell Cultures.

### **3.2.2 Použité přístroje a zařízení**

Analytické váhy (Sartorius), automatické pipety (Eppendorf), centrifuga (Holm&Halby), inkubátor (Sanyo), konfokální mikroskop TCS SP2 (Leica), laminární flowbox s vertikálním prouděním vzduchu (MSC ADvantage), lasery Ar-Kr, He a Ne (Leica), lázeň Heat master (Heat), mikroskop cxx41 (Olympus), odsávačka (VWR), pipetor (Swiftpipet Pro), spektrofotometr Infinite M200 Pro (Tecan), ultrazvukový homogenizátor (Bandelin), vortex Minishaker MS2 (IKA).

### **3.2.3 Použité programy – Software**

GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, La Jolla California USA)

### **3.2.4 Biologická aktivita na neuronální buněčné linii SH-SY5Y**

Biologická aktivita N9-pyridyl 2,6-disubstituovaných derivátů purinu byla testována na neuronální buněčné linii SH-SY5Y. Na buňky byly nanесeny testované látky v koncentracích 0,1, 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Buňky byly nasazeny na dno 96-jamkové destičky, každá jamka obsahovala 20 000 buněk. Jako kultivační médium bylo použito 10% DMEM/F12, každá jamka obsahovala 100  $\mu\text{l}$ . Po 24 hodinách bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  20  $\mu\text{M}$  ATRA v 1% DMEM/F12 kultivačním médiu. Následně byly buňky inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>.

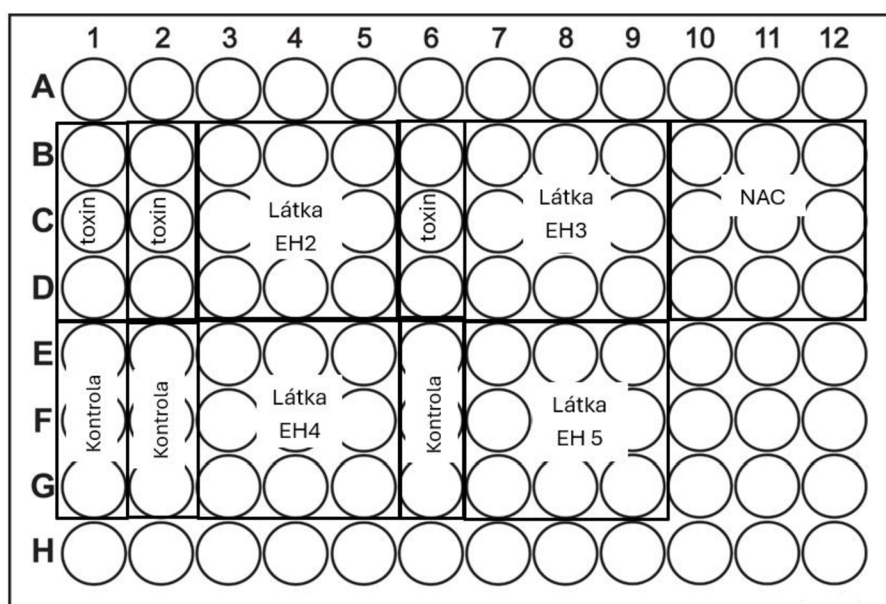
### **3.2.5 Příprava koncentrační řady syntetizovaných látek**

Pro každé testování byla vytvořena koncentrační řada syntetizovaných látek. Připravené látky byly rozpuštěny v DMSO v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace v mikrozkušavce byla 10 mM (skladovány v -20 °C). Byl připraven roztok 1% DMEM/F12

s 3-NP kyselinou, výsledná koncentrace 3-NP média byla 20 mM. Do 96-jamkové mikrotitrační destičky byla v laminárním boxu připravena koncentrační řada. Do zkumavky typu eppendorf bylo napipetováno 499  $\mu\text{l}$  20 mM 3-NP média a 0,5  $\mu\text{l}$  testované látky. Následně bylo 360  $\mu\text{l}$  této směsi napipetováno do řádku A mikrotitrační destičky. Do řady B a C v mikrotitrační destičce bylo napipetováno 315  $\mu\text{l}$  20 mM 3-NP média. Z řádku A bylo přeneseno 35  $\mu\text{l}$  látky do řádku B. Z řádku B bylo přeneseno 35  $\mu\text{l}$  látky do řáku C. Tím vznikla koncentrační řada. V řádku A byla tedy koncentrace 10  $\mu\text{M}$ , v řádku B 1  $\mu\text{M}$  a v řádku C 0,1  $\mu\text{M}$ . Obdobným způsobem vznikala koncentrační řada dalších látek v řádcích D až F. Koncentrace zásobního roztoku *N*-acetylcysteinu (NAC) činila 1000 mM. Jeho koncentrační řada byla připravena obdobným způsobem jako u testovaných látek. V řádku A byla tedy koncentrace 1000  $\mu\text{M}$ , v řádku B 100  $\mu\text{M}$  a v řádku C 10  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.6 Testování látek na 96-jamkové mikrotitrační destičce

Po přípravě koncentrační řady bylo prováděno samotné testování. Každá koncentrace byla testována v triplicátu. Nejprve bylo nutné odsát médium (řády B-G, sloupce 1–6). Následně bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  naředěných roztoků látek připravených v podkapitole 3.2.5. Jako toxin bylo připraveno 1,4 ml 20 mM 3-NP média s 1,4  $\mu\text{l}$  DMSO, z něhož bylo vždy přeneseno 100  $\mu\text{l}$  do příslušných jamek. Kontrola byla připravena z 1,4 ml čistého 1% DMEM/F12 média s 1,4  $\mu\text{l}$  DMSO. 100  $\mu\text{l}$  z připravené kontroly bylo napipetováno do příslušných jamek. Jako pozitivní kontrola sloužil NAC (Obr. 14).



Obrázek 14: Schéma 96-jamkové titrační destičky pro testování látek. Testovány byly vždy 4 látky v triplicátu v koncentracích 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Jako toxin sloužilo 20 mM 3-NP médium, jako

kontrola sloužilo médium DMEM/F12 s DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit NAC v koncentracích 1000  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

### **3.3 Stanovení buněčné smrti pomocí propidium jodidu**

PI funguje jako interkalační sonda, která je kladně nabitá a vmezeřuje se mezi DNA, které nesou záporný náboj. Proniká pouze přes poškozené membrány buněk. Po 48 hodinách inkubace testovaných látek s buňkami bylo odsáto staré médium. Do jamek bylo napipetováno 100  $\mu\text{l}$  1x PBS s PI o koncentraci 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Po 15 minutách inkubace ve tmě při laboratorní teplotě byla měřena fluorescence pomocí destičkového readeru při excitační vlnové délce 535 nm a emisní vlnové délce 617 nm.

### **3.4 Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia**

DHE je superoxidový indikátor, který je vhodný pro měření oxidativního stresu. Měření signálu je umožněno tvorbou ethidia, který je fluorescenčně kvantifikován. Po 24 hodinách inkubace testovaných látek s buňkami byly desky stočeny při 25 °C na 1400 rpm po dobu 5 minut a 30 sekund. Po stočení bylo odsáto z každé jamky médium. Ze zásobního 10 mM roztoku DHE byl připraveno 10  $\mu\text{M}$  roztok DHE v 1x PBS. Následně byly desky inkubovány po dobu 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Po uplynutí 30 minut byla měřena fluorescence pomocí destičkového readeru při excitační vlnové délce 500 nm a emisní vlnové délce 580 nm.

### **3.5 Test životaschopnosti a morfologie buněk**

Morfologie a životaschopnost buněk byla pozorována konfokálním mikroskopem pomocí barviva Calcein AM. Calcein AM je fluorescenční barvivo, které je po přidání do buněk hydrolyzováno esterázami na fluorescentní Calcein. Ta se váže na intracelulární vápenaté ionty, což způsobí emitaci zeleného fluorescenčního světla. Po 48 hodinách inkubace s testovanými látkami byl připraven roztok Calceinu AM (koncentrace zásobního roztoku 1 mg/ml) v 1x PBS (ředění 1300x). 200  $\mu\text{l}$  připraveného roztoku Calcein AM v 1x PBS byl aplikován na buňky. Po 50 minutách inkubace v inkubátoru byly buňky pozorovány pod konfokálním mikroskopem.

### **3.6 Testování cytotoxicity**

Cytotoxická aktivita testovaných látek byla určena pomocí testu cytotoxicity. Po odsátí média z připravené destičky bylo na buňky napipetováno 1% médium DMEM/F12 s testovanými látkami v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Po 48 hodinách od aplikace testovaných látek bylo z kontrolní jamky odsáto 50  $\mu\text{l}$  média a přidáno 50  $\mu\text{l}$  2% Tritonu X-100 (finální

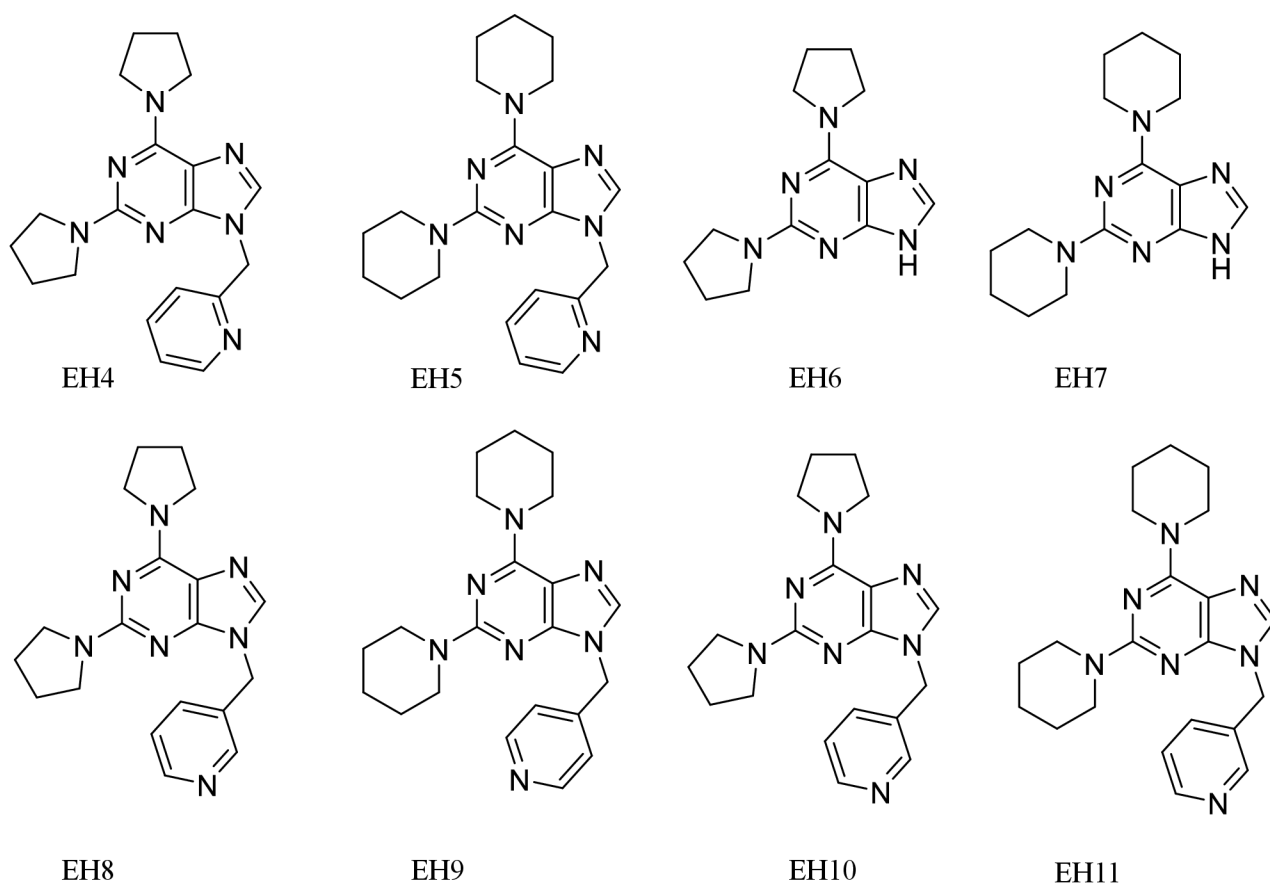


koncentrace Tritonu X-100 činila 1%). Buněčná smrt byla normalizována, přičemž aplikace 1% Tritonu X-100 byla považována za vyvolání 100% buněčné smrti. Do jamek bylo po odsátí média napipetováno 100  $\mu$ l 1x PBS s PI o koncentraci 1  $\mu$ g/mL. Po 15 minutách inkubace ve tmě byla změřena fluorescence s excitační vlnovou délkou 535 nm a emisní vlnovou délkou 617 nm.

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Syntéza látek

Chemickou syntézou byly připraveny látky **EH4-EH11**, přičemž výchozí látkou byl 2,6-dichlorpurin. Látky **EH4** a **EH5** byly syntetizovány přes meziprodukt **EH2**. Látky **EH6-EH11** byly připraveny stejným způsobem, s tím rozdílem, že u nich nebyl meziprodukt izolován. Látky byly testovány na neuronální buněčné linii SH-SY5Y, u níž byla navozena diferenciace na neuronální fenotyp buněk pomocí ATRA. Látky **EH4**, **EH6**, **EH8** a **EH10** obsahovaly v pozicích C2 a C6 substituovaný pyrrolidin. Látky **EH5**, **EH7**, **EH9** a **EH11** obsahovaly v pozicích C2 a C6 substituovaný piperidin. Pozice N9 purinu byla substituována pyridyl-methylem s dusíkem v pozicích ortho, meta či para. Mezi látkami obsahující piperidin a pyrrolidin však nebyly pozorovány žádné významnější rozdíly mezi neuroprotektivní aktivitou. Látky, které obsahovaly substituent v pozici ortho, tedy **EH4** a **EH5**, se jevily jako neúčinnější.



Obrázek 15: Látky EH4-EH11.

Laboratoř růstových regulátorů se zabývá již několik let výzkumem a hledáním přírodních látek a jejich derivátů s neuroprotektivní aktivitou.

Ve své bakalářské a diplomové práci se Kordinová zabývala syntézou 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinů. Věnovala se homosubstituci i heterosubstituci v pozici C2 a C6 purinu. Deriváty připravené homosubstitucí se jevily jako účinnější. Proto byla zvolena v mé bakalářské práci právě homosubstituce. Stejně jako v bakalářské a diplomové práci Kordinové, také v mé práci syntéza vycházela z 2,6-dichlorpurinu (Kordinová 2020; Kordinová, 2022).

Ve své diplomové práci se Gonzalez zabývá taktéž látkami s neuroprotektivní aktivitou. Diplomová práce byla zaměřena na syntézu 3,5,7-trisubstituovaných 3H-triazol[4,5-d]pyrimidinů, které byly testovány v *in vitro* modelu Parkinsonovy choroby. Na výsledky Gonzaleze navazovala ve své bakalářské práci také právě Kordinová, která pro jednoduchost syntézy zvolila jako svou výchozí látku 2,6-dichlorpurin (Gonzalez, 2016).

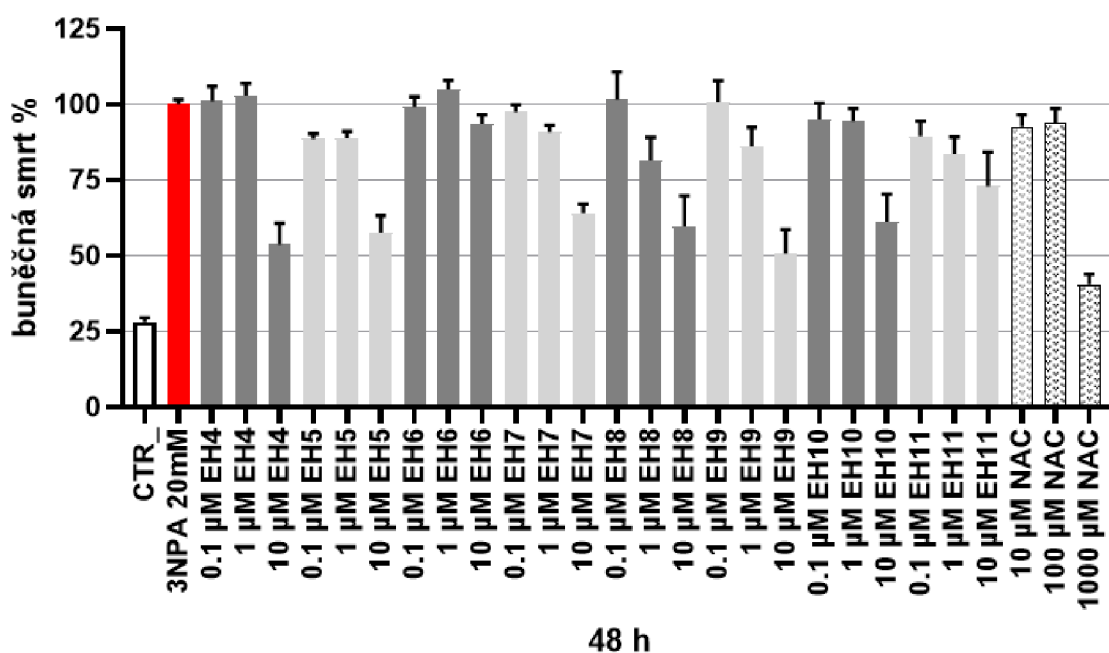
V roce 2021 byl udělen Univerzitě Palackého v Olomouci patent, který se zabýval heterocyklickými dusíkatými deriváty purinu, farmaceutickými přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití při neuroprotekcii (Gonzalez et al., 2021). Zmíněný patent se zabývá syntézou purinů se substituenty obsahujícími dusík, stejně jako má bakalářská práce. Předmětem vynálezu jsou C2,C6-disubstituované-9-benzyl-9H-purinové deriváty. Na C2 a C6 pozici byl v patentu substituován pyrrolidin a piperidin.

## 4.2 Biologické testování

Testování biologické aktivity bylo prováděno na neuronální buněčné linii SH-SY5Y, u které byla navozena neuronální diferenciací pomocí ATRA. Pomocí 3-NP byl indukován model Huntingtonovy choroby.

### 4.2.1 Testování buněčné smrti

Byl proveden test buněčné smrti s využitím modelu 3-NP a vizualizace pomocí barviva PI. PI je látka patřící mezi interkalační sondy, která projde pouze membránou poškozených či mrtvých buněk a váže se na fragmenty DNA. Buněčná smrt byla normalizována, přičemž aplikace 20 mM 3-NP byla považována za vyvolání 100% buněčné smrti. Při testování byl studován vliv syntetizovaných látek, které byly testovány v koncentracích 0,1, 1 a 10  $\mu\text{M}$  společně s toxinem 3-NP na buněčnou smrt (viz graf 1). Snížení buněčné smrti bylo považováno za neuroprotektivní aktivitu. Výrazná neuroprotektivní aktivita byla zaznamenána u látky **EH5**. Při koncentraci 0,1  $\mu\text{M}$  bylo zaznamenáno snížení buněčné smrti o 11,5 %, při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  snížení o 11 % a při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  snížení o 42 %. Látka **EH4** vykazovala při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  snížení buněčné smrti o 46 %. Látka **EH7** vykazovala snížení buněčné smrti při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  o 36 %, látka **EH9** v téže koncentraci o 49 % a látka **EH10** o 28 %. V koncentraci 1  $\mu\text{M}$  byla nejúčinnější látka **EH8** vykazující snížení buněčné smrti o 18 %. U látek **EH7-EH11** s rostoucí koncentrací klesala buněčná smrt. Dá se tedy říci, že výraznější účinky byly zaznamenány u většiny látek pouze při koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Oproti NAC v koncentraci 1000  $\mu\text{M}$  nebyla účinnější žádná z látek v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Avšak oproti NAC v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  byly účinnější v téže koncentraci všechny látky. Většinu z testovaných látek tedy lze považovat za neuroprotektivní. Zároveň z výsledků vyplývá, že nelze říci, zda jsou účinnější deriváty se substituovaným pyrrolidinem či piperidinem.



**Graf 1:** Hodnoty buněčné smrti buněk SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentracích 0,1, 1 a 10  $\mu\text{M}$ . Data odpovídají buněčné smrti v %  $\pm$  standardní chyba průměru. Měřeno ve třech různých dnech v triplicátech. Naměřené hodnoty jsou vztaženy k 20 mM 3-NP. Látky **EH4-EH11** byly testovány společně s 20 mM 3-NP.

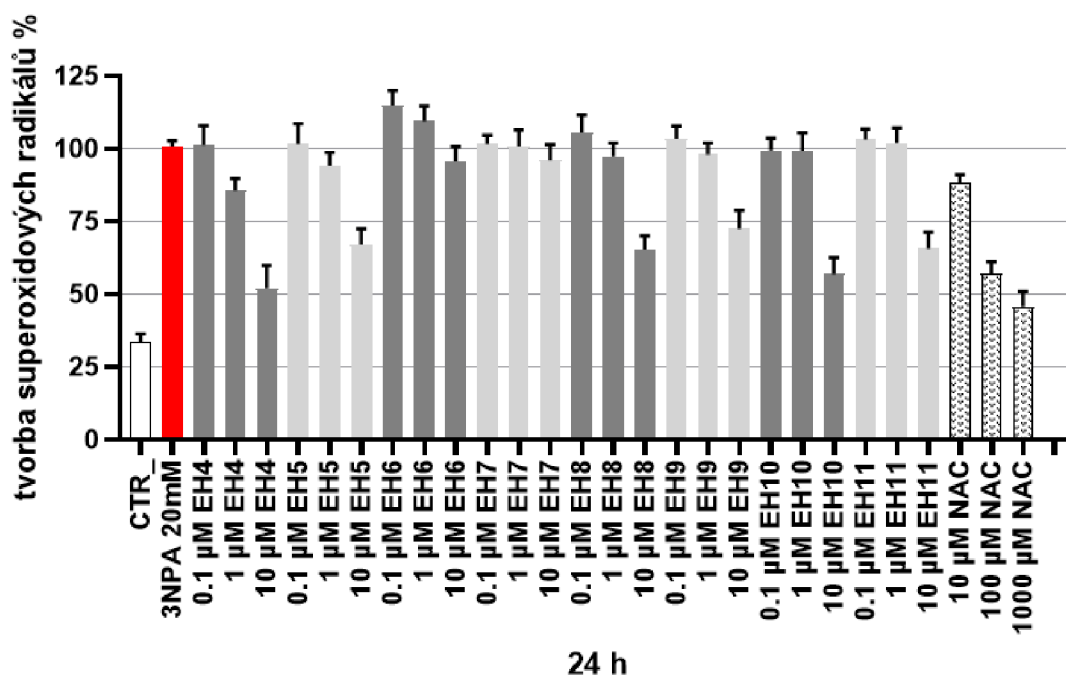
Ve své diplomové práci publikovala Kordinová výsledky purinových derivátů, přičemž některé z nich obsahovaly substituovaný piperidin a pyrrolidin. Látka obsahující v pozici C2 piperidin a v pozici C6 3,3-difluoropyrrolidin snižovala v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  buněčnou smrt o 64 %, takového výsledku nedosahovala žádná z mých látek. Derivát purinu lišící se pouze substituentem na pozici N9 snižoval buněčnou smrt o zhruba 26 %. Tyto odlišné hodnoty buněčné smrti poukazují na důležitost substituentu právě v pozici N9. Látka obsahující v pozici C2 piperidin a v pozici C6 3,3-difluoropyrrolidin snižovala v neúčinnější koncentraci (1  $\mu\text{M}$ ) buněčnou smrt o zhruba 75 %. Lepší výsledky u těchto látek mohly být způsobeny právě odlišnými substituenty v pozici N9 (Kordinová, 2022).

V roce 2021 byl publikován článek zabývající se neuroprotektivní aktivitou cytokininů. Cytokinininy obsahují ve své struktuře právě puriny, stejně jako látky syntetizované v mé bakalářské práci. Většina testovaných derivátů cytokininů snižovala buněčnou smrt maximálně o 25 %, zatímco dvě mnou testované látky snižovaly buněčnou smrt o zhruba 45 % (látky **EH4** a **EH5**). Menší neuroprotektivní aktivita v cytokininech

může být způsobena odlišnými substituenty a/nebo absencí substituentu v pozici C2 (Gonzales et al., 2021).

#### 4.2.2 Testování oxidativního stresu

Byl proveden test oxidativního stresu vizualizací pomocí barviva DHE s využitím 3-NP modelu. Aplikace 20 mM 3-NP byla považována za vyvolání 100% oxidativního stresu. Největší účinek při koncentraci 10  $\mu$ M vykazovala látka **EH4** (viz graf 2), procento tvorby superoxidových radikálů bylo sníženo o 48 %. Látky **EH5**, **EH8** a **EH11** vykazovaly při koncentraci 10  $\mu$ M podobnou účinnost, a to snížení oxidativního stresu zhruba o 35 %. Látka **EH10** při koncentraci 10  $\mu$ M vykazovala snížení oxidativního stresu o 43 %. Ostatní látky v této koncentraci vykazovaly podobný účinek. Všechny látky krom **EH6** byly v koncentraci 10  $\mu$ M účinnější než NAC v koncentraci 10  $\mu$ M. V koncentraci 10  $\mu$ M vykazovala látka **EH4** lepší účinek než NAC při koncentraci 100  $\mu$ M. Z výsledků nelze soudit, zda jsou účinnější látky se substituovaným pyrrolidinem či piperidinem. Avšak obě látky **EH4** i **EH5**, které lze považovat za neúčinnější, obsahují v pozici N9 purinu substituovaný pyridyl-methylem s dusíkem v pozicích ortho.

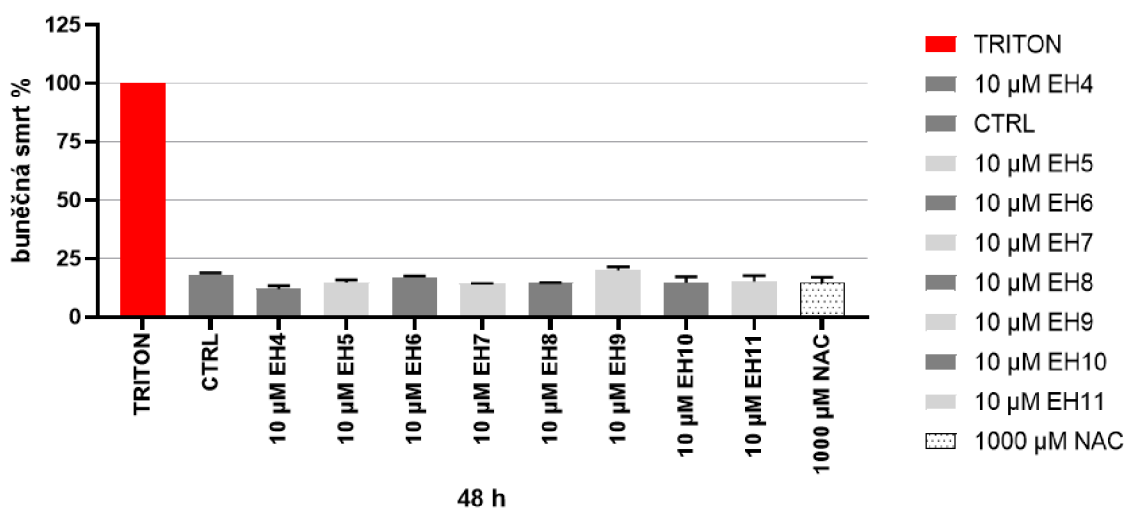


**Graf 2:** Hodnoty tvorby superoxidových radikálů buněk SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentracích 0,1, 1 a 10  $\mu$ M. Data odpovídají buněčné smrti v %  $\pm$  standardní chyba průměru. Měřeno v pěti různých dnech v triplicátech. Naměřené hodnoty jsou vztaženy k 20 mM 3-NP. Látky **EH4-EH11** byly testovány společně s 20 mM 3-NP.

V článku z roku 2021 byly testovány cytokinininy, které obsahují jako součást struktury purin, přičemž neúčinnější látky redukovaly množství superoxidových radikálů o průměrně 25 %. Látka **EH4** vykazovala snížení tvorby superoxidových radikálů o 66 %, ale lepších výsledků než snížení oxidativního stresu o 25 % vykazovala většina testovaných látek v rámci mé bakalářské práce. Navíc v článku byl použit toxin salsolinol se slabším efektem než vykazuje 3-NP. Menší schopnost cytokininů snižovat oxidativní stres mohla být způsobena absencí substituentů na pozici C2 (Gonzalez et al., 2021).

#### 4.2.3 Testování cytotoxicity

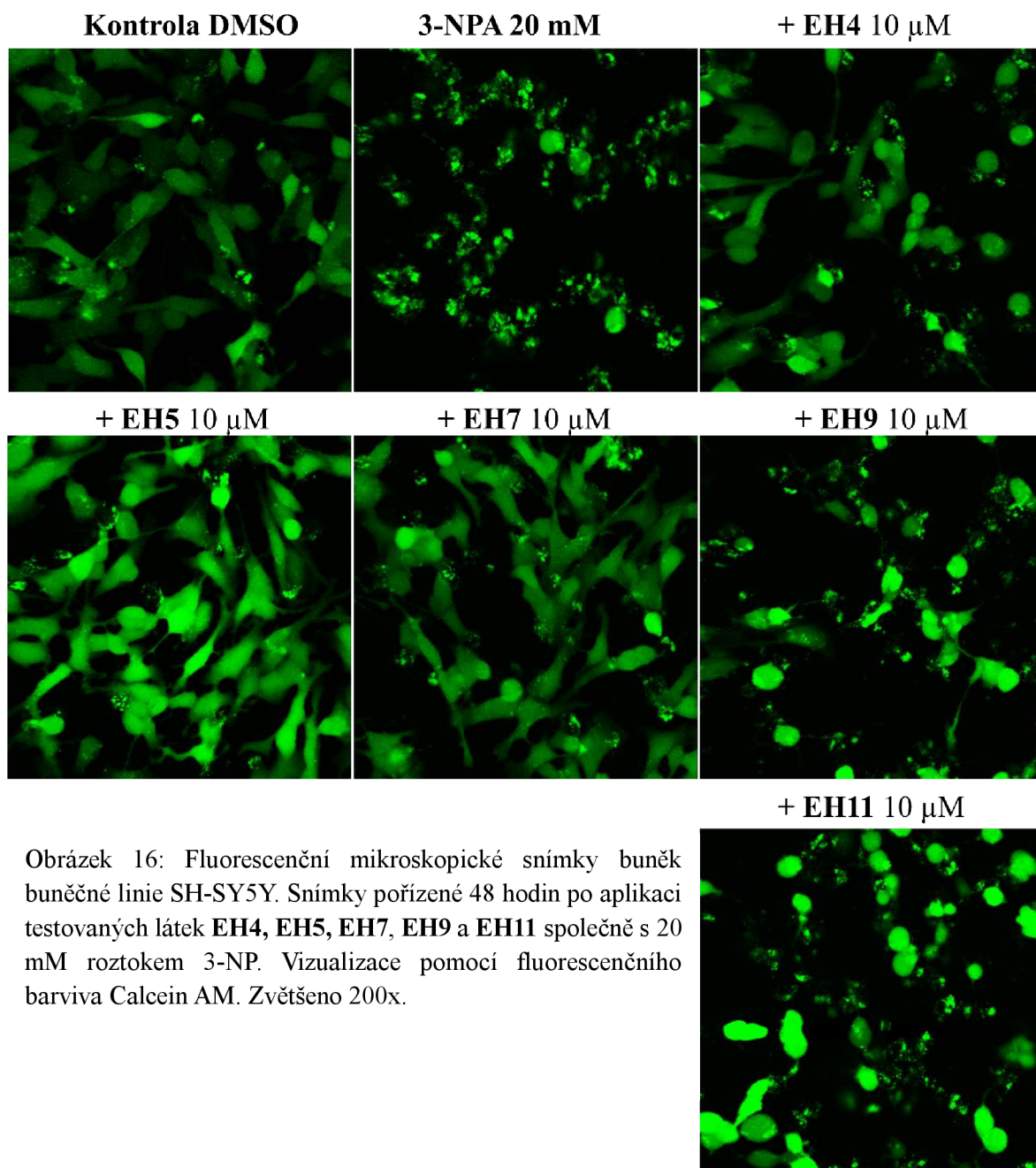
K zjištění cytotoxicity bylo použito fluorescenční barvivo propidium jodid. Aplikace 1% Tritonu X-100 byla považována za vyvolání 100% buněčné smrti. Jako nejvíce cytotoxická látka se jevila **EH9** (viz graf 3), která v žádném z předchozích testů nevykazovala příliš neuroprotektivní účinky, proto se dal výsledek očekávat. Nejméně cytotoxickými látkami v porovnání s kontrolou byly **EH4**, **EH5**, **EH7**, **EH8** a **EH10**. Kromě **EH9** nepřevyšovala žádná z látek hodnotu buněčné smrti kontroly, tudíž nejsou cytotoxické, podobně jako tomu bylo v literatuře (Kordinová 2020). Právě látky **EH4**, **EH5** a **EH7** byly v předchozích testech považovány za neúčinnější.



**Graf 3:** Hodnoty buněčné smrti buněk SH-SY5Y po 24 hodinové inkubaci. Látky byly testovány v koncentraci 10 μM. Data odpovídají buněčné smrti v % ± standardní chyba průměru. Měřeno ve 2 různých dnech v triplicátech. Naměřené hodnoty jsou vztaženy k 1% Tritonu X-100.

#### 4.2.4 Test životaschopnosti a morfologie buněk SH-SY5Y

Látky s největší neuroprotektivní aktivitou byly podrobeny pozorování konfokálním mikroskopem pomocí barvení cytoplasmatického barviva Calcein AM. Na sklíčko byly aplikovány látky **EH4**, **EH5**, **EH7**, **EH9** a **EH11** v koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , kontrola (DMSO v čistém médiu DMEM/F12, ředěno 1000x) společně s 20 mM roztokem 3-NP.



Obrázek 16: Fluorescenční mikroskopické snímky buněk buněčné linie SH-SY5Y. Snímky pořízené 48 hodin po aplikaci testovaných látek **EH4**, **EH5**, **EH7**, **EH9** a **EH11** společně s 20 mM roztokem 3-NP. Vizualizace pomocí fluorescenčního barviva Calcein AM. Zvětšeno 200x.

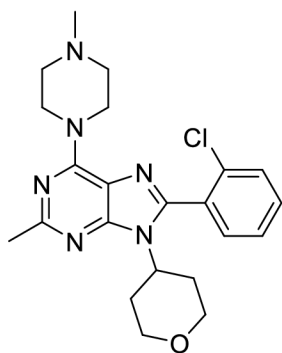
Na fluorescenčních snímcích (Obr. 16) lze pozorovat morfologii neuronálních buněk SH-SY5Y. Na snímku kontroly, tedy buněk ovlivněných pouze 1% médiem DMEM/F12 s DMSO, mají téměř všechny buňky zachované neurity. Na snímku s buňkami ovlivněnými 20 mM 3-NP nejsou pozorovány buňky s neurity. Buňky ovlivněné 20 mM 3-NP



a s aplikovanou látkou **EH4** zachovávaly morfologii a neurity u zhruba poloviny buněk. Na snímku buněk ovlivněných 20 mM 3-NP a s aplikovanou látkou **EH5** byla u většiny buněk zachována morfologie, včetně neuritů, stejně tomu bylo u buněk ovlivněných 20 mM 3-NP s aplikovanou látkou **EH7**. Na snímcích s buňkami ovlivněnými 20 mM 3-NP a s aplikovanými látkami **EH9** a **EH11** morfologie buněk nezůstala zachována, z hlediska neuroprotektivní aktivity tedy nejsou příliš účinné. Pozorování morfologie buněk odpovídá dosaženým výsledkům pomocí testů PI a DHE, kdy nejvíce účinné látky zachovaly morfologii buněk oproti slabším derivátům.

V mozcích pacientů trpících AD dochází ke změnám kanabinoidního systému, což naznačuje, že kanabinoidní sloučeniny by mohly působit jako potencionální farmakologické nástroje a interagovat s tímto systémem. Laboratoř růstových regulátorů se již delší dobu zabývá přípravou a testováním afinity látek s neuroprotektivní aktivitou. U látek je navíc silný předpoklad, že by mohly být agonisty právě kanabinoidního receptoru 2 (CB2).

Hollinshead a kolegové se věnovali syntéze řady purinů jakožto potencionálních agonistů kanabinoidního receptoru 2. Látky se ukázaly jako plně účinní agonisté lidského receptoru CB2. Nejlépe si vedla látka **SN26**, která vykazovala zvláště dobré biofarmaceutické vlastnosti. Ve studii bylo zjištěno, že výběr substituentu na pozici N9 purinu je klíčový pro selektivitu proti receptoru 1 (CB1). CB1 receptor je zodpovědný za nežádoucí vedlejší účinky, jako jsou euforie či hypotermie. Zaměněním substituentu na této pozici lze docílit přípravy selektivního agonisty receptoru CB2 (Hollinshead *et al.*, 2013). Aktivitu purinů jakožto agonistů CB2 receptoru ve své studii potvrdili také Guidetti a kolegové. Látky připravené a testované v rámci této studie vykazovaly taktéž vysokou selektivitu proti CB1, a to i v nejvyšších podávaných dávkách (Guidetti *et al.*, 2014). Studie tedy naznačují, že látky připravené v rámci bakalářské práce by mohly být potencionálními agonisty CB2.



Obrázek 17: Látka HS26

Laboratoř růstových regulátorů se dlouhodobě věnuje syntéze a testování látek, u kterých se předpokládá, že inhibují acetylcholinesterázu či butyrylcholinesterázu, jejichž aktivita je v mozcích s AD zvýšená. Proto by bylo perspektivní v budoucnu také otestovat látky připravené v rámci mé bakalářské práce právě jako jejich inhibitory. Jena a kolegové připravili řadu 5,6-dihydropyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-c]chinolinů a podrobili je testování inhibice butyrylcholinesteráz a acetylcholinesteráz. Ve studii byl prokázán jejich inhibiční účinek na butyrylcholinesterázu a acetylcholinesterázu pomocí modifikované Ellmanovy spektrofotometrické metody, přičemž větší efektivita byla pozorována proti butyrylcholinesteráze. Tato inhibice je spojena s pozitivními účinky na kognitivní funkce, zvýšením hladiny acetylcholinu, protizánětlivou aktivitou a prevencí agregace  $\beta$ -amyloidního proteinu. Experimenty rovněž ukázaly interakci s CB2 receptory. Interakce s CB2 receptory a současná inhibice butyrylcholinesterázy by mohla přispět k ochraně neuronů a zároveň ke zmírnění symptomů (Jena *et al.*, 2024). Syntetizované chinoliny ve své struktuře neobsahují purin, ale mohlo by být přínosné se pokusit zaměřit na současnou interakci purinů s CB2 receptory a inhibici butyrylcholinesterázy, stejně jako tomu bylo u syntetizované řady chinolinů. Zároveň jsou chinoliny i puriny heterocyklické sloučeniny obsahující dusík, proto je zde možná určitá podobnost v biologické aktivitě.

## 5 Závěr

Teoretická část se zabývala rešerší na téma neurodegenerativní onemocnění. Experimentální část byla zaměřena na syntézu 2,6-disubstituovaných derivátů purinu a testování jejich biologické aktivity v *in vitro* modelu Huntingtonovy choroby.

Organickou syntézou byly připraveny látky **EH4–EH11**. Výchozí látkou byl 2,6-dichlorpurin, přičemž na pozice C2 a C6 byl substituován pyrrolidin či piperidin. V N9 pozici byl u látek **EH4**, **EH5** a **EH8–EH11** substituován pyridil-metylem s dusíkem v pozicích ortho, meta a para.

Nasyntetizované látky byly v koncentracích 0,1, 1 a 10  $\mu\text{M}$  testovány na neuroblastomové buněčné linii SH-SY5Y. Pro vyhodnocení byly použity testy buněčné smrti pomocí propidium jodidu a měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia. Jako toxin byla použita kyselina 3-nitropropionová a jako pozitivní kontrola byl použit *N*-acetylcystein. Nejvýznamnější neuroprotektivní aktivitu v testu buněčné smrti vykazovala látka **EH5**. Při měření oxidativního stresu se jako nejúčinnější látky jevíly **EH4** a **EH5**. Látky byly podrobeny testu cytotoxicity, přičemž žádná z látek se nejevila jako cytotoxická. Látky **EH4**, **EH5**, **EH7**, **EH9** a **EH11** byly pozorovány pomocí fluorescenčního barviva Calcein AM konfokálním mikroskopem. Jako látky zachovávající nejlépe neuronální buňky byly vyhodnoceny látky **EH4**, **EH5** a **EH7**, což odpovídá celkové aktivitě látek v testech.

## 6 Citace

- Alzheimer's disease facts and figures, 2019. 15, 3, 321-387, DOI: 10.1016/j.jalz.2019.01.010
- BAIZABAL-CARVALLO, José Fidel a CARDOSO, Francisco, 2020. Chorea in children: etiology, diagnostic approach and management. *Journal of Neural Transmission*. 127, 10, 1323-1342. DOI: z: 10.1007/s00702-020-02238-3
- BEITZ, Janice M, 2014. Parkinson s disease a review. *Frontiers in Bioscience*. S6, 1, 65-74. DOI: 10.2741/S415
- BROUILLET, Emmanuel; JACQUARD, Carine; BIZAT, Nicolas a BLUM, David, 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. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x
- CAMANDOLA, Simonetta; PLICK, Natalie a MATTSON, Mark, 2019. Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. *Neurochemical Research*. 44, 1, 214-227. DOI: 10.1007/s11064-018-2492-0.
- CENINI, Giovanna a VOOS, Wolfgang, 2019. Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Frontiers in Pharmacology*. 10, 1. DOI: 10.3389/fphar.2019.00902
- CERRI, Silvia; MUS, Liudmila a BLANDINI, Fabio, 2019. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's Disease*. 9, 3, 501-515. DOI: 10.3233/JPD-191683
- CLARK, James.; KAYED, Rakez; ABATE, Giulia; UBERTI, Daniela; KINNON, Paul, 2022. Post-translational Modifications of the p53 Protein and the Impact in Alzheimer's Disease: A Review of the Literature. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 14, 1. DOI: 10.3389/fnagi.2022.835288
- DETURE, Michael a DICKSON, Dennis, 2019. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*. 14, 1. DOI: 10.1186/s13024-019-0333-5
- DUGGER, Brittany a DICKSON, Dennis, 2017. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 9, 7. DOI: 10.1101/cshperspect.a028035
- ELMORE, Susan, 2007. Programmed Cell Death: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35, 4, 495-516. DOI: 10.1080/01926230701320337

EREKAT, Nour S., 2022. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clinical Anatomy*. 35, 1, 65-78. DOI: 10.1002/ca.23792

FELDMAN, Eva; GOUTMAN, Stephen; PETRI, Susanne; MAZZINI, Letizia; SAVELIEFF, Masha; SHAW, Pamela a SOBUE, Gen., 2022. Amyotrophic lateral sclerosis. *The Lancet*. 400, 10360, 1363-1380. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01272-7

GAO, Yong-Lei; WANG, Nan; SUN, Fu-Rong; CAO, Xi-Peng; ZHANG, Wei, 2018. Tau in neurodegenerative disease. *Annals of Translational Medicine*. 6, 10, 175-175. DOI: 10.21037/atm.2018.04.23

GONZALEZ, Gabriel, 2016. Synthesis of 3,5,7-trisubstituted-3H-1,2,3-triazolo[4,5-d]pyrimidines with potential neuroprotective effect in in vitro model of Parkinson's disease. Diplomová práce, vedoucí RNDr. Marek Zatloukal, Ph.D. Olomouc: Univerzita Palackého.

GONZALEZ, Gabriel; MIK, Václav; BUCHAROVÁ, Noemi; GRÚZ, Jiří; KAŇOVSKÝ, Petr; STRNAD, Miroslav, 2021. Heterocyklické dusíkaté deriváty purinu, farmaceutické přípravky obsahující tyto deriváty a jejich použití při neuroprotekcii. WO: WO2020164648A1

GONZALEZ, Gabriel; GRÚZ, Jiří; D'ACUNTO, Cosimo Walter; KAŇOVSKÝ, Petr a STRNAD, Miroslav, 2021. Cytokinin Plant Hormones Have Neuroprotective Activity in In Vitro Models of Parkinson's Disease. *Molecules*. 26, 2. DOI: 10.3390/molecules26020361

GUIDETTI, Rossella; ASTLES, Peter; SANDERSON, Adam; HOLLINSHEAD, Sean; JOHNSON, Michael a CHAMBERS, Mark, 2014. The SAR development of substituted purine derivatives as selective CB2 agonists for the treatment of chronic pain. 24, 24, 5572-5575. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.11.006

HOLLINSHEAD, Sean; TIDWELL, Michael W.; PALMER, John; GUIDETTI, Rossella; SANDERSON, Adam; JOHNSON, Michael; CHAMBERS, Mark; OSKINS, Jennifer; STRATFORD, Robert a ASTLES, Peter, 2013. Selective Cannabinoid Receptor Type 2 (CB2) Agonists: Optimization of a Series of Purines Leading to the Identification of a Clinical Candidate for the Treatment of Osteoarthritic Pain. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56, 14, 5722-5733. DOI: 10.1021/jm400305d

HOU, LingLing a HONG, Tao, 2008. Stem cells and neurodegenerative diseases. *Science in China Series C: Life Sciences*. 51, 4, 287-294. DOI: 10.1007/s11427-008-0049-1

CHEN, Shang-Der; WU, Chia-Lin; HWANG, Wei-Chao a YANG, Ding-I, 2017. More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 3. DOI: 10.3390/ijms18030545

CHI, Hao; CHANG, Hui-Yun a SANG, Tzu-Kang, 2018. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 10, 3082. DOI: 10.3390/ijms19103082

JENA, Sushovan; GONZALEZ, Gabriel; VÍTEK, Dominik; KVASNICOVÁ, Marie; ŠTĚPÁNKOVÁ, Šárka; STRNAD, Miroslav; VOLLER, Jiří; CHANDA, Kaushik, 2024. Neuroprotective 5,6-Dihydropyrido[2',1':2,3]imidazo[4,5-c]quinoline Derivatives Acting Through Cholinesterase Inhibition and CB2 Signaling Modulation. Web: [https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=4749746](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4749746) (preprint). DOI: 10.2139/ssrn.4749746

KOLAHDOUZAN, Mahshad a HAMADEH, Mazen, 2017. The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neurosci Therapy*. 23, 4, 272-290. DOI: 10.1111/cns.12684

KOLAJ, Igri; IMINDU LIYANAGE, Shi. a WEAVER, Donald, 2018. Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: A potential therapeutic platform. *Neurochemistry International*. 120, 1, 99-111. DOI: doi.org/10.1016/j.neuint.2018.08.001

KORDINOVÁ, Helena, 2020. 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, vedoucí Mgr. Václav Mik, Ph.D. Olomouc: Univerzita Palackého

KORDINOVÁ, Helena, 2022. Syntéza 2,6,9-trisubstituovaných derivátů purinu s potencionálními neuroprotektivními účinky v in vitro modelu Parkinsonovy choroby. Bakalářská práce, vedoucí Mgr. Václav Mik, Ph.D. Olomouc: Univerzita Palackého

KUMARI, Shikha; MADDEBOINA, Krishnaiah; BACHU, Rinda Devi; BODDU, Sai; TRIPPIER, Paul a TIWARI, Amit, 2022. Pivotal role of nitrogen heterocycles in Alzheimer's disease drug discovery. *Drug Discovery Today*. 27, 10. DOI: 10.1016/j.drudis.2022.07.007

LANE, Carl; HARDY, John a SCHOTT, John, 2018. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology*. 25, 1, 59-70. DOI: 10.1111/ene.13439

LEE, Samuel; ASRESS, Seneshaw; HALES, Chadwick; GEARING, Marla a VIZCARRA, Juan, 2019. TDP-43 cytoplasmic inclusion formation is disrupted in C9orf72-associated amyotrophic lateral sclerosis/frontotemporal lobar degeneration. *Brain Communications*. 1, 1. DOI: 10.1093/braincomms/fcz014

MAHER, Pamela, 2019. The Potential of Flavonoids for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 12. DOI: 10.3390/ijms20123056

- MCCOLGAN, P. a TABRIZI, S. J., 2018. Huntington's disease: a clinical review. *European Journal of Neurology*. 25, 1, 24-34. DOI: 10.1111/ene.13413
- MONZIO COMPAGNONI, Giacomo; DI FONZO, Alessio; CORTI, Stefania; COMI, Giacomo; BRESOLIN, Nereo; MASLIAH, Eliezer, 2020. The Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: the Lesson from Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*. 57, 7, 2959-2980. DOI: 10.1007/s12035-020-01926-1
- NEVŠÍMALOVÁ, Soňa; RŮŽIČKA, Evžen a TICHÝ, Jiří, 2005. *Neurologie*. 30-35, Praha.: Galén, s. 30 – 35
- REILMANN, Ralf, 2019. Parkinsonism in Huntington's disease. *Parkinsonism Beyond Parkinson's Disease*. International Review of Neurobiology. 11, 299-306. DOI: 10.1016/bs.irm.2019.10.006
- REITH, Wolfgang, 2018. Neurodegenerative Erkrankungen. *Der Radiologe*. 58, 3, 241-258. DOI: 10.1007/s00117-018-0363-y
- RUGGIERO, Melania; CALVELLO, Rosa; PORRO, Chiara; MESSINA, Giovanni; CIANCIULLI, Antonia; PANARO, Maria Antonietta, 2022. Neurodegenerative Diseases: Can Caffeine Be a Powerful Ally to Weaken Neuroinflammation? *International Journal of Molecular Sciences*. 23, 21. DOI: 10.3390/ijms232112958
- SCHEPICI, Giovanni; BRAMANTI, Placido a MAZZON, Emanuela, 2020. Efficacy of Sulforaphane in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 21, 22. DOI: 10.3390/ijms21228637
- SI, Zizhen; SUN, Linlin a WANG, Xidi, 2021. Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother*. 137, 1. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111327
- STEFFAN, Joan; KAZANTSEV, Aleksey; SPASIC-BOSKOVIC, Olivera; GREENWALD, Marilee; ZHU, Ya-Zhen. 2000. The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97, 12, 6763-6768. DOI: 10.1073/pnas.100110097
- SUN, Yi-Min; ZHANG, Yan-Bin a WU, Zhi-Ying, 2017. Huntington's Disease: Relationship Between Phenotype and Genotype. *Molecular Neurobiology*. 54, 1, 342-348. DOI: 10.1007/s12035-015-9662-8
- TAPIAS, Victor; GONZÁLEZ-ANDRÉS, Paula; PEÑA, Laura F.; BARBERO, Asunción; NÚÑEZ, Lucía; VILLALOBOS, Carlos, 2023. Therapeutic Potential of Heterocyclic

Compounds Targeting Mitochondrial Calcium Homeostasis and Signaling in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Antioxidants*. 12, 6. DOI: 10.3390/antiox12061282

TARAKAD, Arjun a JIMENEZ-SHAHED, Joohee, 2018. VMAT2 Inhibitors in Neuropsychiatric Disorders. *CNS Drugs*. 32, 12, 1131-1144. DOI: 10.1007/s40263-018-0580-y

TÚNEZ, Isaac; TASSET, Inmaculada; PÉREZ-DE LA CRUZ, Verónica a SANTAMARÍA, Abel, 2010. 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future. *Molecules*. 15, 2, 878-916. DOI: 10.3390/molecules15020878

UPADHAYAY, Shubham; YEDKE, Narhari Gangaram; RAHI, Vikrant; SINGH, Surbhi; KUMAR, Sachin; ARORA, Anchal; CHANDOLIA, Priyanka; KAUR, Prabhsharan; KUMAR, Mandeep; KOSHAL, Prashant; JAMWAL, Sumit a KUMAR, Puneet, 2023. An Overview of the Pathophysiological Mechanisms of 3-Nitropropionic Acid (3-NPA) as a Neurotoxin in a Huntington's Disease Model and Its Relevance to Drug Discovery and Development. *Neurochemical Research*. 48, 6, 1631-1647. DOI: 10.1007/s11064-023-03868-1

VALLÉS, Ana Sofia a BARRANTES, Francisco, 2023. Nicotinic Acetylcholine Receptor Dysfunction in Addiction and in Some Neurodegenerative and Neuropsychiatric Diseases. *Cells*. 12, 16. DOI: 10.3390/cells12162051

XIE, Hong-rong; HU, Lin-sen; LI, Guo-yi, 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*. 123, 8, 1086-1092. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021