

UNIVERZITA PARDUBICE

**Fakulta chemicko - technologická
Katedra biologických a biochemických věd**

**Studium kinetiky a mechanismu inhibice
cholinesteras inhibitory na bázi benzothiazolů**

(Diplomová práce)

Bc.Ondřej Hejnar

Pardubice 2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE

**Faculty of Chemical Technology
Department of Biological and Biochemical
Sciences**

**Study of kinetics and mechanism of
cholinesterases inhibition by benzothiazoles**

(Thesis)

Bc.Ondřej Hejnar

Pardubice 2012

Supervisor: Mgr. Šárka Štěpánková, PhD.

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne: 26. 4. 2012

Ondřej Hejnar

Chtěl bych poděkovat všem, kteří se na vzniku této práce jakkoliv podíleli, zvláště pak paní Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za neocenitelnou a obětavou pomoc v průběhu měření, vyhodnocení výsledků i za trpělivost a ochotu při konzultacích zpracování diplomové práce.

Souhrn

Inhibitory cholinesteras jsou v současnosti prakticky jediné účinné látky, které zmírňují důsledky Alzheimerovy choroby i četných dalších onemocnění souvisejících s cholinergním deficitem. Práce je zaměřena na hledání nových inhibitorů cholinesteras s převahou působení v mozkové tkáni. Byla testována inhibiční schopnost dvanácti nových inhibitorů na bázi benzothiazolů dvěma na sobě nezávislými in vitro metodami (Ellmanovou metodou a pH-stat metodou), dále byl ověřen kinetický model neinhibovaných hydrolys. Pro posouzení účinnosti inhibitorů byl stanoven index IC_{50} . Jako substrát pro pH-stat metodu byl užit acetylcholin, v případě Ellmanovy metody poté acetylthiocholin, použitými enzymovými preparáty pro obě zmíněné metody pak byly acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. Pro posouzení prostupnosti studovaných látek skrz hematoencefalickou bariéru byl změřen rozdělovací koeficient K_{ow} .

Nejperspektivnějšími látkami využitelnými pro klinickou praxi se jeví na základě vysoké inhibiční účinnosti a dobré rozpustnosti v nepolárních roztocích zejména inhibitory (S)-1-((L-leucinethyl)-1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)butylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamát a (S)-1-((L-phenylalaninethyl)-1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)propylkarbamoyl)-2-methylpropylkarbamát.

Klíčová slova: Cholinesterasy, inhibitory cholinesteras, enzymová kinetika, Alzheimerova choroba

Summary

Nowadays, cholinesterases inhibitors are practically the only effective substances mitigating the impacts of Alzheimer's disease as well as of many other diseases related to cholinergic deficit. This piece of work focuses on the search for new cholinesterases inhibitors that effect mainly the brain tissue. The inhibition ability of twelve new inhibitors based on benzothiazole was tested by means of two mutually independent in vitro methods (the Ellman's method and the pH-stat method), the kinetic model of uninhibited hydrolysis was verified. To judge the effectiveness of the inhibitors the IC_{50} index was determined. The pH-stat method used acetylcholine as its substrate, the Ellman's method used acetylthiocholine. Both of the aforementioned methods used acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as its enzymatic preparations. To judge the permeability of the researched substances through the blood-brain barrier the partition coefficient K_{ow} was determined.

The most promising substances usable in clinical practice seem to be especially the (S)-1-((L-leucinethyl)-1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)butylkarbamoyl)-2-methyl propyl carbamate and (S)-1-((L-phenylalanin ethyl)-1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl) propyl karbamoyl)-2-methyl propyl carbamate inhibitors, for their high inhibition efficiency and good solubility in nonpolar solutions.

Keywords: Cholinesterases, cholinesterases inhibitors, enzymatic kinetic, Alzheimer's disease

Seznam použitých zktatek

| | |
|------------|--|
| acetyl-CoA | Acetylkoenzym A |
| ACH | Acetylcholin |
| ACHE | Acetylcholinesterasa |
| AIDS | Syndrom získaného selhání imunity |
| ALT | Alaninaminotransferasa |
| AMK | Aminokyselina |
| ATCH | Acetylthiocholin |
| BCHE | Butyrylcholinesterasa |
| Bu | Butyl |
| CNS | Centrální nervová soustava |
| CT | Počítačová tomografie |
| DLB | Demence s Lewyho tělísky |
| DTNB | 2,2' - dinitro- 5,5' - dithiobenzoová kyselina |
| E | Enzym |
| EI | Komplex enzym - inhibitor |
| EMG | Elektromyografie |
| ES | Komplex enzym - substrát |
| ESI | Komplex enzym - substrát - inhibitor |
| Et | Ethyl |
| GGT | γ -glutamyltransferasa |
| Glu | Glutamin |
| HA | Kyselina octová |
| His | Histidin |
| HLA Ag | Human Leukocyte Antigen |
| CH | Cholin |
| CHE | Cholinesterasa |
| CHEI | Inhibitory cholinesteras |
| iBu | Isobutyl |
| iPro | Isopropyl |
| kat | Katal |
| KCl | Chlorid draselný |
| k_i | Rychlostní konstanta |
| K_M | Michaelisova konstanta |
| KOH | Hydroxid draselný |
| Leu | Leucin |

| | |
|------------------|---|
| MAO-B | Inhibitor monoaminoxidasy |
| Me | Methyl |
| MG | Myasthenia gravis |
| MID | Multiinfarktová demence |
| MMSE | Minimental State Examination |
| MR | Magnetická resonance |
| MuSK | Svalová specifická tyrosin kinasa |
| NL | Nelineární regrese |
| NMR | Nukleární magnetická resonance |
| P | Produkt |
| PET | Pozitronová emisní tomografie |
| Phe | Phenylalanin |
| Pro | Propyl |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| S | Substrát |
| Ser | Serin |
| SPECT | Jednofotonová emisní počítačová tomografie |
| SSRI | Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu |
| TEPP | Tetraethylpyrofosfát |
| TCH | Thiocholin |
| TNB ⁻ | 5-merkaptο-2-nitrobenzoan |
| Trp | Tryptofan |
| Tyr | Tyrosin |
| U | Unit |
| V _M | Mezná rychlost |

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 Úvod..... | 11 |
| 2 Teoretická část..... | 12 |
| 2.1 Enzymy..... | 12 |
| 2.2 Enzymová kinetika..... | 13 |
| 2.3 inhibitory a kinetika inhibovaných reakcí..... | 15 |
| 2.3.1 Kompetitivní inhibice | 16 |
| 2.3.2 Nekompetitivní inhibice..... | 17 |
| 2.3.3 Akompetitivní inhibice..... | 18 |
| 2.3.4 Smíšená inhibice..... | 19 |
| 2.4 Kinetika hydrolysy acetylcholinu cholinesterasami..... | 19 |
| 2.5 Acetylcholin a jeho úloha v organismu..... | 20 |
| 2.6 Cholinesterasy..... | 21 |
| 2.6.1 Acetylcholinesterasa..... | 23 |
| 2.6.2 Butyrylcholinesterasa..... | 26 |
| 2.7 Inhibitory cholinesteras..... | 28 |
| 2.8 Index IC ₅₀ | 30 |
| 2.9 Rozdělovací koeficient..... | 31 |
| 2.10 Modelování studovaných hydrolys..... | 31 |
| 2.11 Možnosti klinického využití inhibitorů cholinesteras..... | 32 |
| 2.11.1 Neurodegenerativní choroby..... | 32 |
| 2.11.2 Demence | 33 |
| 2.11.2.1 Alzheimerova choroba..... | 36 |
| 2.11.2.2 Demence s Lewyho tělísky..... | 37 |
| 2.11.3 Myasthenia gravis..... | 38 |
| 2.11.4 Glaukom..... | 40 |
| 3 Experimentální část..... | 42 |
| 3.1 Použité chemikálie a roztoky | 42 |
| 3.2 Analytické metody použité při stanovení aktivity studovaných enzymů a při jejich inhibici..... | 44 |
| 3.2.1 Ellmanova metoda | 45 |
| 3.2.1.1 Přístroje..... | 46 |
| 3.2.1.2 Stanovení specifické aktivity enzymového preparátu..... | 46 |
| 3.2.1.3 Pracovní postup..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2 Stanovení IC_{50} | 47 |
| 3.2.2.1 Přístroje..... | 47 |
| 3.2.2.2 Pracovní postup..... | 47 |
| 3.2.3 pH-statová metoda..... | 48 |
| 3.2.3.1 Přístroje..... | 48 |
| 3.2.3.2 Pracovní postup..... | 49 |
| 3.2.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů studovaných inhibitorů v soustavě n-oktanol : voda..... | 49 |
| 3.2.4.1 Přístroje..... | 49 |
| 3.2.4.2 Pracovní postup..... | 49 |
| 4 Výsledky | 51 |
| 4.1 Stanovení aktuální katalytické aktivity enzymových preparátů Ellmanovou metodou..... | 51 |
| 4.2 Kinetika neinhibovaných reakcí..... | 52 |
| 4.3 Kinetika inhibovaných reakcí..... | 58 |
| 4.3 Index IC_{50} | 64 |
| 4.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu pro soustavu n-oktanol/voda | 66 |
| 5 Diskuse..... | 67 |
| 5.1 Neinhibované reakce..... | 67 |
| 5.2 Inhibované reakce..... | 68 |
| 5.3 Index IC_{50} | 69 |
| 5.4 Rozdělovací koeficient K_{ow} | 69 |
| 6 Závěr..... | 71 |
| 7 Seznam užití literatury..... | 72 |

1 Úvod

V současné době nelze kvalitativně léčit příčiny vzniku většiny chorob s cholinergním deficitem, které se, v důsledku stárnutí populace ve vyspělých státech světa, stávají čím dál frekventovanějšími. Vyrůstá zejména počet pacientů s různými typy demencí a s Alzheimerovou chorobou. Jak již bylo řečeno, v současnosti nelze vyléčit příčiny těchto chorob, které tkví v mutaci genetické informace, následné tvorbě chybného proteinu a jeho hromadění v mozkové tkáni, proto se medikamentosní léčba zaměřila pouze na potlačení projevu těchto onemocnění zvýšením množství cholinu v nervových zakončeních. Nejsnazší cestou k dosažení tohoto cíle je inhibice enzymů acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy, které mají za úkol cholin štěpit, čímž dojde k prodloužení jeho účinku. [1]

Inhibitory cholinesteras jsou nesourodou skupinou látek, které různými mechanismy inhibují enzym cholinesterasu. Většina těchto látek je toxická a má silné vedlejší účinky na organismus, konec konců některé látky, jako třeba Sarin, nebo Soman byly zneužity armádou a teroristy k válečným účelům a některé jsou dosud používanými pesticidy. V případě farmaceutického využití jde o to, aby toxicita daného preparátu byla co nejnižší a vedlejší účinky takřka nulové, proto jsou vyvíjeny pro člověka méně toxické varianty těchto léčiv, které by v nízkých koncentracích vyvolávaly silný účinek. Zároveň je důležité, aby taková látka byla rozpustná v krvi a dobře prostupovala přes hematoencefalickou bariéru. [2]

Cílem této práce bylo objasnění inhibičního mechanismu dvanácti látek, které se profilují jako možná léčiva onemocnění s cholinergním deficitem. Důležitou součástí měření je také ověření průchodnosti testovaných preparátů skrz fázové rozhraní, které je modelováno pomocí dvou vzájemně nemísitelných kapalin, *n*-oktanolu a vody.

2 Teoretická část

2.1 Enzymy

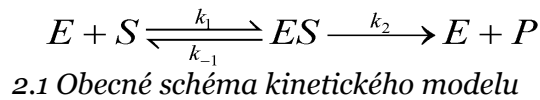
Enzym je látka bílkovinné povahy¹, která urychluje chemické přeměny v buňce a zvyšuje rychlost reakce oběma směry. Směr průběhu reakce není ovlivněn enzymem, ale koncentrací reaktantů a jejich energetickými poměry. Látky, které jsou účinkem enzymu měněny, jsou nazývány substrát. Enzymy jsou přítomny ve všech živých systémech, přičemž jsou pro každý organismus druhově specifické. Enzym může obsahovat pouze bílkovinnou složku, ale většinou obsahuje také nebílkovinnou složku, která se nazývá kofaktor, bílkovinná část přitom rozhoduje o substrátové specifitě, tzn. která látka se přemění a která nikoliv. [4, 5, 6, 7] Enzymy se dělí do šesti hlavních tříd, podle typu katalysované reakce:

- oxidoreduktasy - katalysují oxidačně redukční děje a to buď přenosem atomu vodíku a nebo elektronů
- transferasy - podílejí se na přenosu aktivované skupiny, např. $-NH_2$, z donoru na akceptor
- hydrolasy - hydrolyticky štěpí vazby vzniklé kondensací, např. peptidové, do této skupiny patří i cholinesterasy
- lyasy - katalysují štěpení substrátů, nebo naopak jejich spojování
- isomerasy - realizují přesun molekulových skupin a tím vznik isomerů
- ligasy - katalysují vznik energeticky náročných vazeb za současného rozkladu substrátu a uvolnění energie

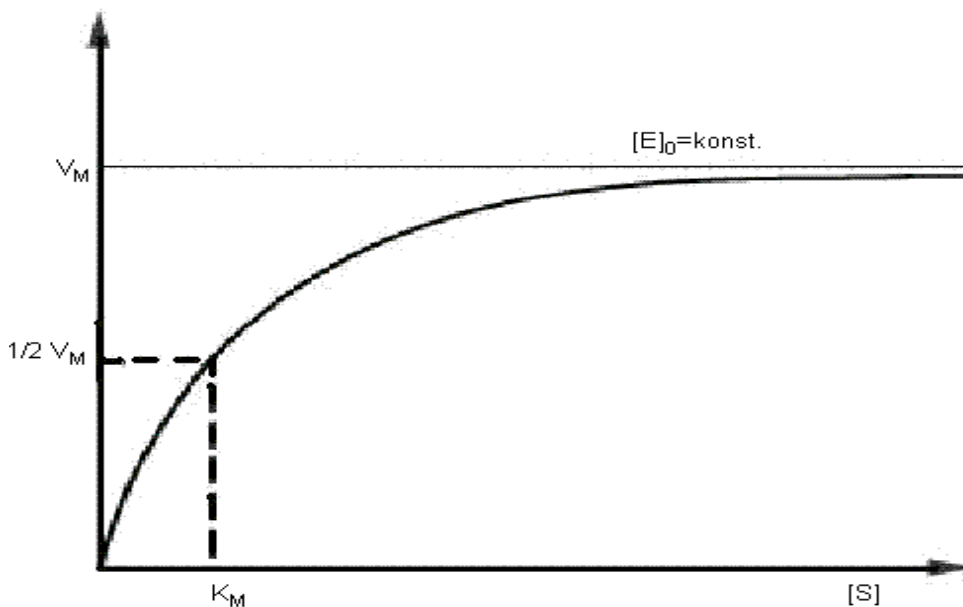
¹ Byly objeveny i enzymy, které jsou tvořeny molekulou RNA [3].

2.2 Enzymová kinetika

Enzymová kinetika se zabývá reakční rychlostí, tedy přeměnou určitého množství substrátu za jednotku času. Tento děj je popsán obecným schématem 2.1,



kde enzym (E) reaguje se substrátem (S) za vzniku komplexu enzym-substrát (ES), který se rozpadá na enzym a produkt (P). Rychlostní konstanty k_1 a k_2 určují rychlost tvorby produktu, zatímco konstanta k_{-1} posouvá reakční rovnováhu směrem k výchozím látkám. Pokud při daném množství enzymu zvyšujeme koncentraci substrátu, převádí se stále větší množství enzymu do komplexu ES, reakční rychlost stoupá, až prakticky veškerý enzym je přítomen jako ES, enzym je tedy nasycen a reakční rychlost dosahuje maximální hodnoty. Schéma popisuje počátek reakce, kde je prakticky nulová koncentrace produktu a neprobíhá zpětná tvorba komplexu ES. Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při konstantní koncentraci enzymu popisuje obr. 2.1. [4, 6]



Obr. 2.1 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při konstantní koncentraci enzymu

Závislost rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu dle schématu (2.1) řeší rovnice Michaelise a Menteové vztah 2.2a

$$v_0 = \frac{V_M [S]}{K_M + [S]} \quad (2.2a)$$

v_0 - počáteční rychlost

V_M - mezná rychlost

K_M - Michaelisova konstanta

Rovnici Michaelise a Menteové modifikovali Briggse a Haldane na tvar 2.2b

$$V_M = k_2 [E]_0; K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.2b)$$

Michaelisova konstanta K_M je rovna disociační konstantě ES a je definována jako koncentrace substrátu, při níž je dosažena polovina maximální rychlosti V_M , což plyne z Guldberg Waagova zákona (2.3), kdy $[E] = [ES]$.

$$\frac{[ES][S]}{[E][S]} = K_s \quad (2.3)$$

Jelikož koncentrace enzymů je v biologických materiálech velmi malá, prakticky neměřitelná, zatímco jejich katalytická účinnost a substrátová specifita je vysoká, byl zaveden termín aktivita enzymu. Jednotkou aktivity enzymu je katal, který je definován jako množství enzymu, potřebné pro přeměnu 1 molu substrátu na produkt za sekundu ($1 \text{ kat} = 1 \text{ mol} \cdot \text{s}^{-1}$). V praxi se používají spíše menší jednotky, μkat či nkat . Dříve bylo užíváno též jednotky unit ($1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$).

Stanovení hodnoty koncentrace, nebo lépe řečeno aktivity je možné několika způsoby, přičemž nejjednodušší způsob vychází z rovnice Michaelise a Mentenové (2.2a). Jak plyne z obr. 2.1, lze graf závislosti rychlosti reakce na [S] rozdělit na dvě části.

Pro oblast, kde $[S] < K_M$ platí rovnice 1. řádu 2.4a

$$v_0 \approx \frac{V_M [S]}{[S]} \approx V_M \quad (2.4a)$$

Pro oblast, kde $[S] > K_M$ platí rovnice 0. řádu 2.4b

$$v_0 \approx \frac{V_M [S]}{[S]} \approx V_M \quad (2.4b)$$

Při vysokých koncentracích S je proto, jak vyplývá z rovnice 2.4b, rychlost reakce konstantní a není závislá na [S]. Množství vznikajících produktů se tedy mění s časem lineárně a směrnice této přímky je ekvivalentní koncentraci, resp. aktivitě enzymu. [4, 5, 6, 8]

2.3 inhibitory a kinetika inhibovaných reakcí

Kinetika katalysovaných reakcí je závislá na koncentraci substrátu, množství enzymu, fyzikálně chemických vlastnostech prostředí (pH, iontová síla, teplota, tlak, ...) a také na přítomnosti určitých modifikátorů reakce. Do poslední jmenované skupiny patří různé aktivátory a inhibitory. Inhibitor je látka, která způsobuje snížení aktivity enzymu, z chemické podstaty se může jednat prakticky o cokoliv, ať už kovový iont, bílkovinu, nebo vysokomolekulární organickou, či nízkomolekulární anorganickou látku. Inhibice může probíhat několika různými mechanismy, inhibitor může vyvolávat

změnu struktury molekuly enzymu, následkem čehož pak enzym ztrácí svoji katalytickou schopnost, nebo může konkurovat substrátu o vazbu v aktivním centru, čímž snižuje rychlost přeměny, nebo neaktivují volný enzym, nýbrž až jeho komplex se substrátem. [5, 6, 7, 8, 9]

Dle kinetického působení se rozlišují čtyři základní typy inhibicí:

- a) Kompetitivní - inhibitor neovlivňuje meznou rychlost ($V_M = V'_M$), ale zvyšuje Michaelisovu konstantu ($K_M < K'_M$)
- b) Nekompetitivní - inhibitor nepůsobí změnu Michaelisovy konstanty ($K_M = K'_M$), zato snižuje meznou rychlost ($V_M > V'_M$).
- c) Akompetitivní - inhibitor snižuje meznou rychlost i Michaelisovu konstantu, avšak platí rovnice 2.5.

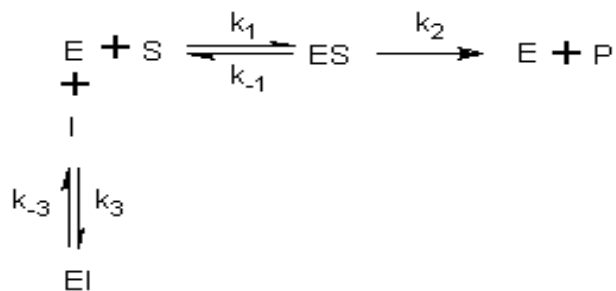
$$\frac{K'_M}{K_M} = \frac{V'_M}{V_M} \quad (2.5)$$

- d) Smíšená - inhibitor mění Michaelisovu konstantu, meznou rychlost i jejich poměr.

2.3.1 Kompetitivní inhibice

Pokud je molekula inhibitoru strukturně velmi podobná substrátu, může s ním soutěžit o vazbu na aktivním centru enzymu. Kompetitivní inhibice je proto nazývána jako soutěživá, nebo též konkurenční. Pokud je koncentrace takového inhibitoru dostatečně vysoká, může být substrát zcela vytěsněn a bude reakci zcela blokovat. Naopak zvýšení koncentrace substrátu vede k vytěsnění inhibitoru. Soutěž probíhá dle Guldberg Waagova zákona 2.6 a lze popsat schématem 2.7, výpočet zvýšení K'_M popisuje vztah 2.8. [4, 5, 7]

$$K' = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (2.6)$$

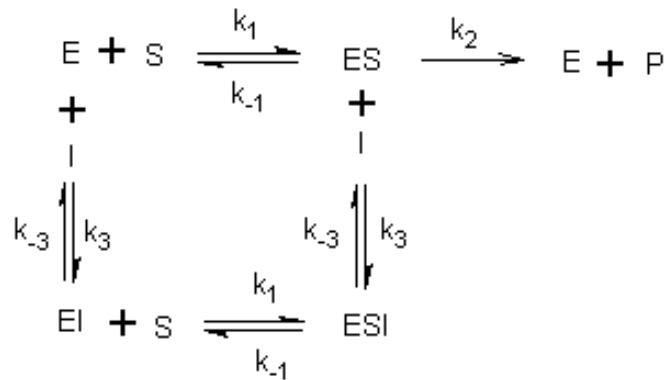


2.7 Schéma kompetitivní inhibice

$$v_0 = \frac{V_M [S]}{K'_M + [S]} ; K'_M \left(1 + \frac{[I]}{k_3} \right) \quad (2.8)$$

2.3.2 Nekompetitivní inhibice

Mechanismus účinku nekompetitivních inhibitorů je založen na allosterickém efektu. Vážou se mimo aktivní centrum enzymu a mění jeho konformaci na inaktivní prostřednictvím šířící se změny struktury, kterou vazbou vyvolávají. Neovlivňují tedy vazbu substrátu na enzym, ale snižují rychlost jeho přeměny, proto nedochází ke změně hodnoty Michaelisovy konstanty, nýbrž se snižuje mezná rychlost reakce. Proto nelze zmírnit účinek inhibice zvýšením koncentrace substrátu. Nekompetitivní inhibice je nazývána také nesoutěživá, nebo nekonkurenční. Jde o v přírodě nejrozšířenější způsob inhibice, ovlivňuje řadu procesů v buňkách. Reakční schéma má tvar 2.9 a platí pro něj rovnice 2.10. [4, 5, 6]



2.9 Schéma nekompitivní inhibice

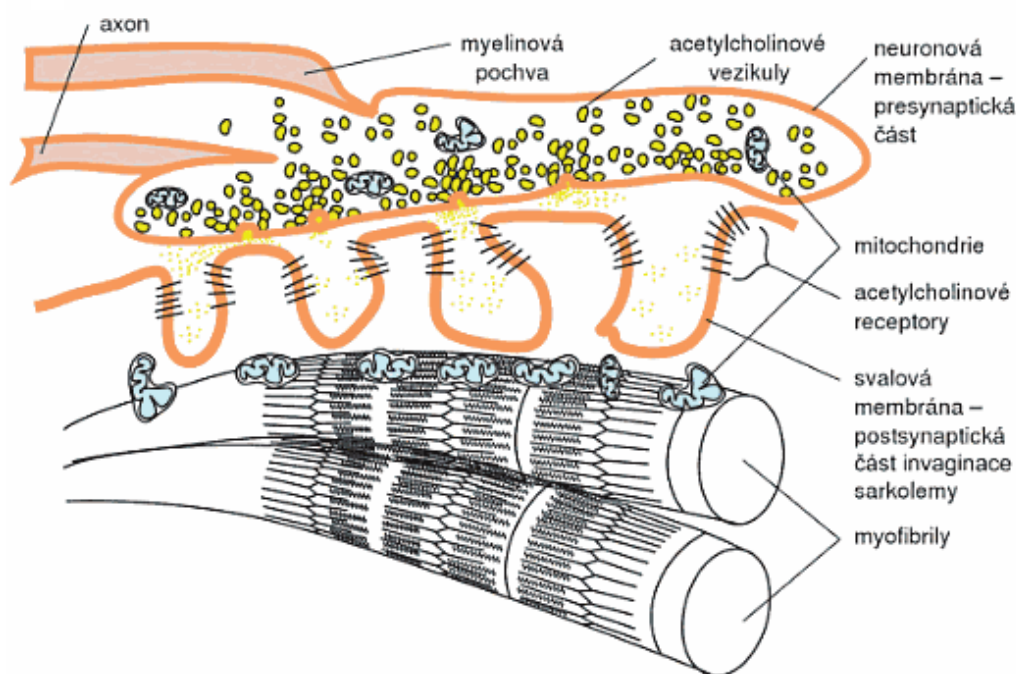
$$K'_M = K_M; V'_M = \frac{V_M}{1 + \frac{[I]}{k_2}} \quad (2.10)$$

2.3.3 Akompetitivní inhibice

Typ inhibice, při které se inhibitor může vázat pouze na komplex enzym-substrát, ale přitom není schopný vazby se samotným enzymem. Vazba inhibitoru znemožňuje přeměnu substrátu na produkt. Klesá mezní rychlost reakce i Michaelisova konstanta. Hodnoty obou veličin klesají stejnou měrou, takže je dodržen jejich vzájemný poměr viz (2.5).

2.5 Acetylcholin a jeho úloha v organismu

Acetylcholin je ester kyseliny octové a cholinu. Je syntetizován v cytoplasmě neuronů z acetyl-CoA a cholinu, uchováván je v malých kulovitých synaptických váčcích, z kterých se, při podráždění neuronu akčním potenciálem uvolní acetylcholin mechanismem exocytosis. Acetylcholin reguluje uvolnění dalších neurotransmiterů a to hlavně v oblasti kůry předního mozku, ovlivňuje sekreci glutamátu, glycinu a dopaminu, což vede k rozpadu osobnosti při Alzheimerově chorobě. Jako neurotransmitter působí na dva základní druhy membránových receptorů, na muskarinový receptor a nikotinový receptor, (jejich název je odvozen dle přírodních látek, které na ně působí). Muskarinový receptor (aktivovaný muskarinem z muchomůrek) zprostředkovává především funkce parasympatické části autonomního nervového systému. Zpomaluje frekvenci srdečních stahů, podporuje činnost žláz s vnitřní i vnější sekrecí a ovlivňuje stahy hladké svaloviny v cévách, v močovém a dýchacím systému i jinde. Známé je pět podtypů tohoto receptoru, z nichž M_1 , M_3 a M_5 mají excitační vliv na neuronální aktivitu, zatímco M_2 a M_4 mají vliv inhibiční.



Obr. 2.13 Schématické znázornění nervosvalové ploténky [11]

Nikotinový typ acetylcholinového receptoru přenáší signál mezi motorickým nervem a svalovým vláknem. Jeho funkcí je přenos impulzu z nervu na sval, otevřením iontových kanálků pro Na^+ , v důsledku čehož dochází k lokální depolarizaci sarkolemy, což vyvolá akční potenciál. [11, 12, 13, 14, 15]

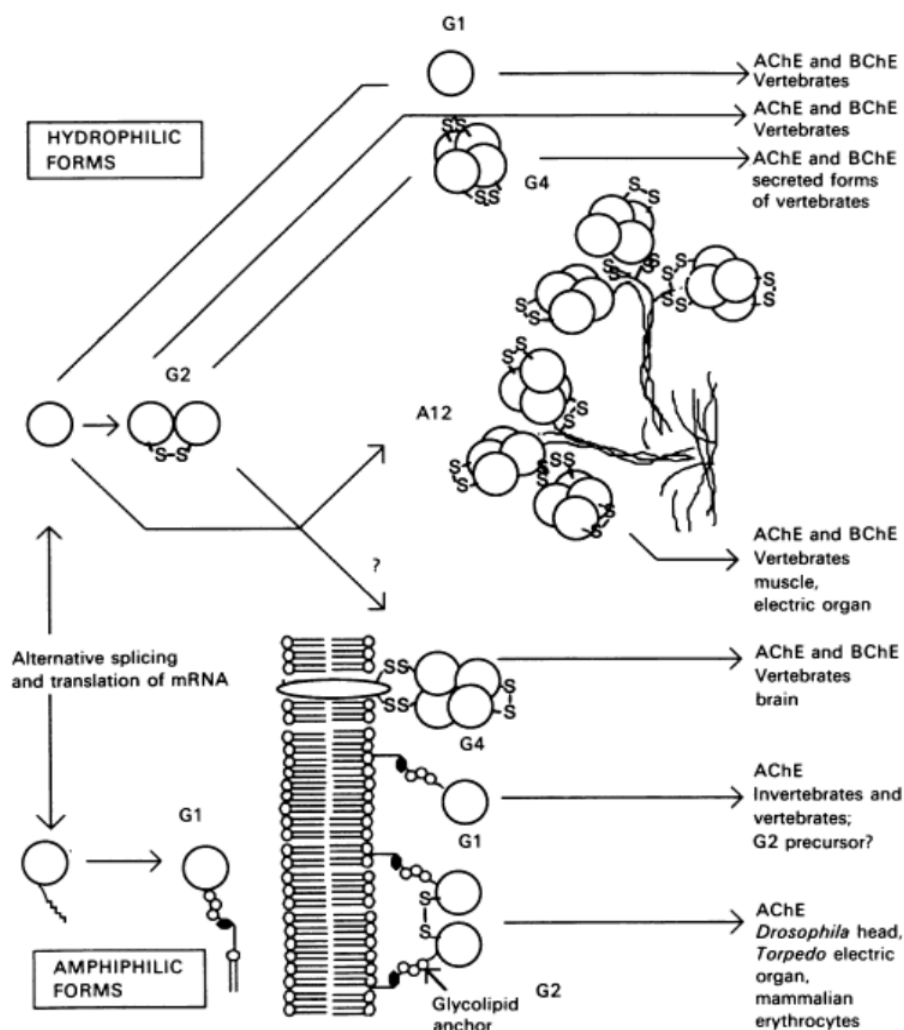
2.6 Cholinesterasy

Název cholinesterasa zahrnuje dva enzymy s rozdílným zastoupením v jednotlivých tkáních organismu, afinitou k substrátu i inhibitorům, rozdílnou biologickou funkcí, avšak oba katalysují hydrolysu ACH. Nazývají se acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. Patří mezi serinové hydrolasy, přičemž jejich hlavním úkolem je katalýza přeměny cholinových esterů na cholin a příslušnou karboxylovou kyselinu (BCHE obvykle hydrolysuje objemnější molekuly, např. butyrylcholin, nebo benzoylcholin). Rychlost takové přeměny je velmi vysoká, probíhá řádově v rozmezí několika milisekund. V případě obratlovců jsou oba enzymy kódovány vždy jedním genem (gen pro ACHE je umístěn na chromozomu 7 a gen pro BCHE je lokalizován na chromozomu 3) a jejich syntéza probíhá na ribozomech hepatocytů. Jsou druhově specifické, přičemž stupeň shody těchto enzymů u jednotlivých druhů je úměrný jejich vzdálenosti v průběhu evoluce. Odlišné bývá pořadí jednotlivých aminokyselin, avšak aktivní místo obou enzymů, důležité pro katalytickou funkci, bývá stejné [16, 17, 18].

Cholinesterasy se chemicky řadí mezi glykoproteiny. ACHE i BCHE jsou tvořeny polymery katalytických podjednotek. V kvartérních strukturách se rozlišují globulární formy (G1, G2, G4), tvořené jednou, dvěma či čtyřmi podjednotkami, a asymetrické formy, jež obsahují jednu až tři podjednotky tetramerů spojené disulfidovými vazbami. Označují se jako A4, A8 a A12, kde A12 je složena ze tří tetramerových podjednotek. Jednotlivé formy lze charakterizovat dle jejich rozpustnosti v polárních a nepolárních rozpouštědlech. Mají amfifilní povahu a lze je rozdělit do pěti skupin:

- Amfifilní dimery I. typu - jsou umístěné na zevní straně cytoplazmatické membrány svalových buněk, erytrocytů a leukocytů savců. V této formě se běžně vyskytuje ACHE. Rozpouští se pouze účinkem detergentů, v jejich nepřítomnosti tvoří shluky.

- Amfifilní monomery a dimery II. typu - narozdíl od I. typu netvoří shluky v nepřítomnosti detergentu, jelikož postrádají glykolipidovou vazbu. V této formě se vyskytuje BCHE i ACHE v buňkách mozku, střeva a svalů.
- Hydrofobní tetramery - tato forma je typická pro ACHE v buňkách CNS. Molekuly enzymu jsou vázány na cytoplazmatickou membránu hydrofobní, asi 20 kDa velikou polypeptidovou podjednotkou.
- Asymetrická forma (s vazbou na kolagen) - je tvořena třemi kolagenovými podjednotkami uspořádanými do struktury trojšroubovice, na které se váže jeden (A_4), dva (A_8) nebo tři (A_{12}) tetramery cholinesterasy. Je typickou formou spíše pro ACHE, než BCHE, přítomna je hlavně na nervosvalové ploténce.



Obr. 2.14 Schématické znázornění polymorfních forem ACHE a BCHE [17]

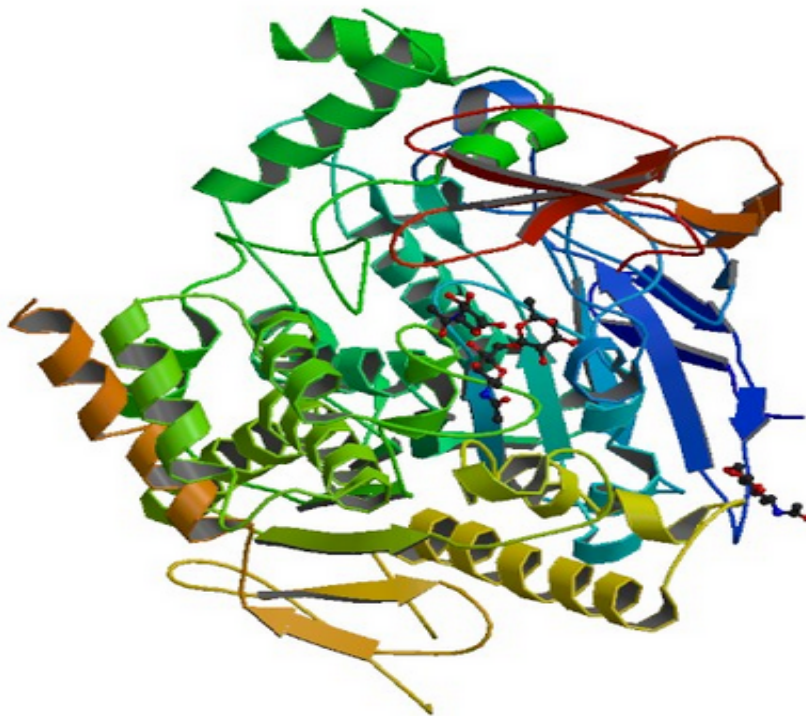
- Rozpustná tetramerní forma (G4) - je tvořena čtyřmi identickými monomery, které jsou stabilizovány hydrofobními interakcemi aminokyselin C-konce jednotlivých monomerů. Tato forma je typická pro BCHE. [17, 18]

Jednotlivé varianty cholinesteras jsou tkáňově specifické. Asymetrické formy ACHE a BCHE se nacházejí jen v periferním nervstvu a ve svalech obratlovců, membránově vázaný G4 ACHE a G4 BCHE se nacházejí v mozku a membránově vázaný G2 ACHE se nachází v erytrocytech.

Nejdůležitější oblastí obou enzymů je jejich aktivní místo. Zde dochází ke štěpení ACh. Rozdíly mezi ACHE a BCHE jsou v primární struktuře daných enzymů, např. v místě vazby substrátu ("Acyl pocket") se nacházejí v případě ACHE dvě molekuly fenylalaninu, zatímco v případě BCHE jde o molekuly aminokyselin valinu a leucinu. [19, 20]

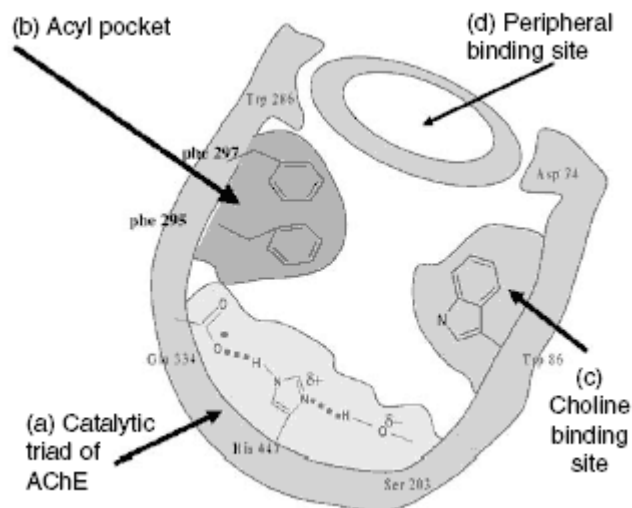
2.6.1 Acetylcholinesterasa

ACHE (E.C. 3.1.1.7), dle systematického názvu acetylcholinacetylhydrolasa, nazývaná též jako pravá cholinesterasa, specifická cholinesterasa nebo cholinesterasa I hydrolyzuje acetylcholin, který byl uvolněn, při nervovém vzruchu do synaptické štěrbině. Cholinergní synapse lze nalézt v CNS, periferním nervstvu, na nervosvalové ploténce a také v elektrických orgánech některých ryb, kde se aktivně podílejí na tvorbě náboje. [19]



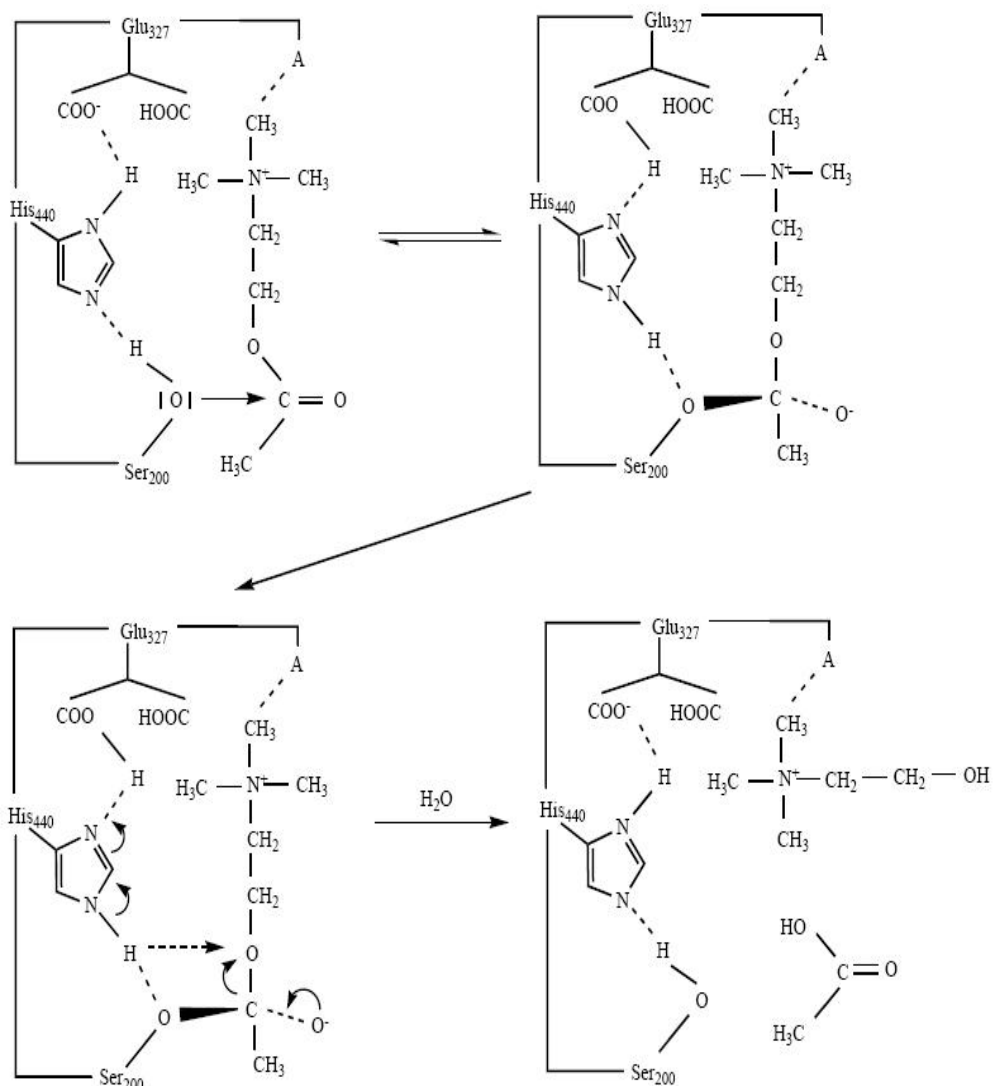
Obr. 2.15 Řetězec molekuly ACHE, uprostřed molekuly je patrné ústí prolákliny katalytické podjednotky a také katalytická triáda a periferní vazebné místo.

Tvořena je dvěma peptidovými řetězci α a β , přičemž řetězec α je nositelem aktivního místa. Aktivní místo se nachází na globulární katalytické podjednotce a má tvar prolákliny. V případě ACHE se na jejím dně nacházejí zbytky tří aminokyselin, které jsou stěžejní pro vlastní katalysu reakce (Ser200, His440 a Glu327 tzv. katalytická triáda). Substrát je stabilizován dalšími částmi katalytické podjednotky, přičemž jejich substitucí jinými fragmenty AMK může dojít ke ztrátě katalytické aktivity (např. substitucí Ser226). V ústí prolákliny katalytické podjednotky se nachází periferní vazebné místo (Tyr70, Tyr121 a Trp279), na kterém dochází k vazbě s aromatickými a kationtovými inhibitory, které nepronikají až k aktivnímu centru (galantamin, fascikuliny, dekamethonium dibromid, bis-huperziny) [19, 20].



Obr. 2.16 *Struktura aktivního místa ACHE*
[19]

Samotný průběh katalýzy je velmi složitý a probíhá v několika stupních. V aktivním místě enzymu dochází k interakci mezi pozitivním nábojem dusíku ACH a negativním nábojem karboxylové skupiny ACHE, čímž vzniká komplex enzym - substrát. Acetylace hydroxylové skupiny serinu je katalysována imidazolovou částí histidinu a kyselou složkou hydroxylové skupiny tyrosinu, což vede k acetylaci enzymu. Deacetylace pak probíhá velmi rychle, v řádu milisekund. [21, 22]



Obr 2.17 Schéma průběhu štěpení ACH v aktivním centru ACHE

2.6.2 Butyrylcholinesterasa

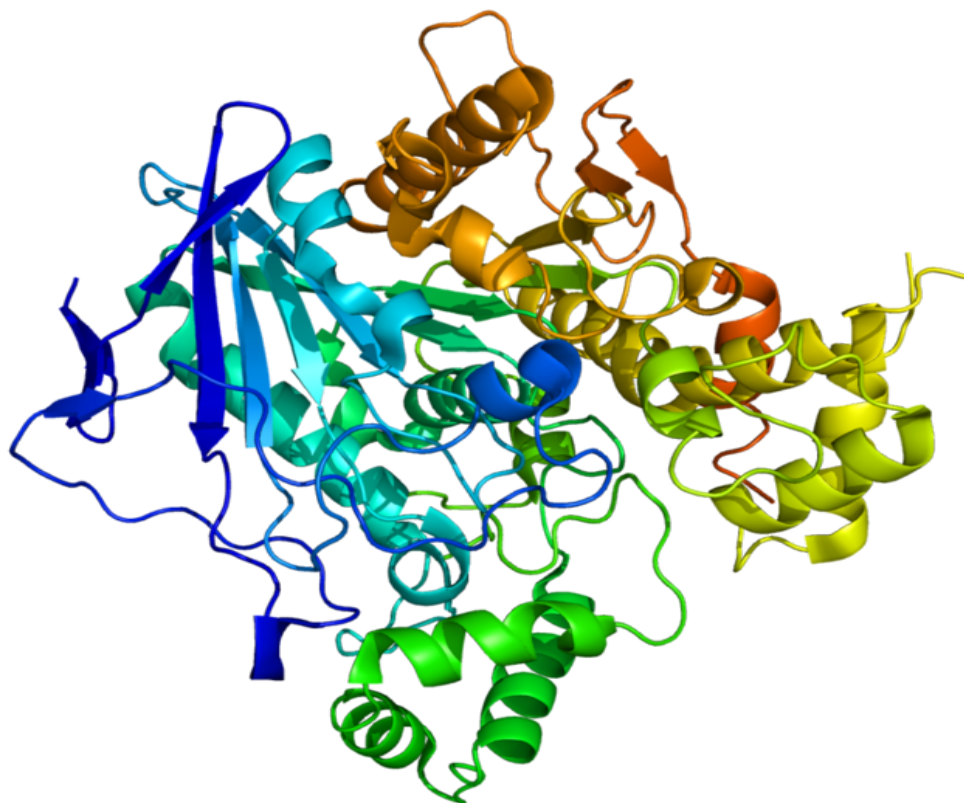
BCHE (E.C. 3.1.1.8), nazývaná jako pseudocholinesterasa, nespecifická cholinesterasa, cholinesterasa II, butyrylcholinesterasa, benzoylcholinesterasa nebo cholinesterasa S-typu, je strukturně velmi podobná ACHE. Shoda v sekvenci jejich

AMK činí téměř 65%. Strukturně podobné je i jejich aktivní centrum, které v případě BCHE obsahuje aminokyseliny Glu325, His438 a Ser198. Molekula BCHE je tvořena čtyřmi identickými podjednotkami, z nichž každá je tvořena devíti sacharidovými řetězci a 574 AMK, molekulová hmotnost činí 348 000 g mol⁻¹. Oba enzymy se liší ve specifitě k některým substrátům. Zatímco např. ACHE hydrolyzuje acetyl- β -methylcholin a neštěpí benzoylcholin, u BCHE je tomu opačně. [18, 19]

Je známo 7 alel, které kódují BCHE - U, A, S, F, H, J, K, avšak ze všech možných genotypů se jich projevuje pouze 11. Nejrozšířenějším genem je U (usual), který řídí syntézu normální cholinesterasy. Ostatní geny řídí syntézu forem BCHE, které se vzájemně liší aktivitou a rezistencí k inhibitorům. Tato variabilita nabývá velkého významu v anesteziologii, kde může dojít k dechovým potížím po podání myorelaxans sukcinylcholinu. [18, 19]

BCHE lze nalézt ve většině buněk organismu, výjimku tvoří erytrocyty. Její úloha tkví v regulaci buněčné proliferace a také podporuje růst neuritů v embryonálním stádiu. Z hepatocytů, kde je syntetizována je vyplavena do krve, kde v plazmě katalyzuje hydrolýzu ACH a některých dalších substrátů. V krvi a v CNS je BCHE zastoupena mnohem četněji, než ACHE. Její význam v krevní plazmě zatím není zcela prozkoumán. [19]

Zajímavou úlohu hraje BCHE jako marker poškození jaterního parenchymu. V případě poškození hepatocytů se aktivita cholinesteras v séru znatelně snižuje. Lze jednak dlouhodobě monitorovat hladinu BCHE, (což se provádí v případě monitorování např. léčby alkoholismu), nebo se porovnává množství BCHE v poměru s dalšími analyty, jak jsou např. albumin, ALT, nebo GGT, na základě čehož lze určit diagnózu jaterního onemocnění. [16]



Obr. 2.18 Řetězec molekuly BCHE

2.7 Inhibitory cholinesteras

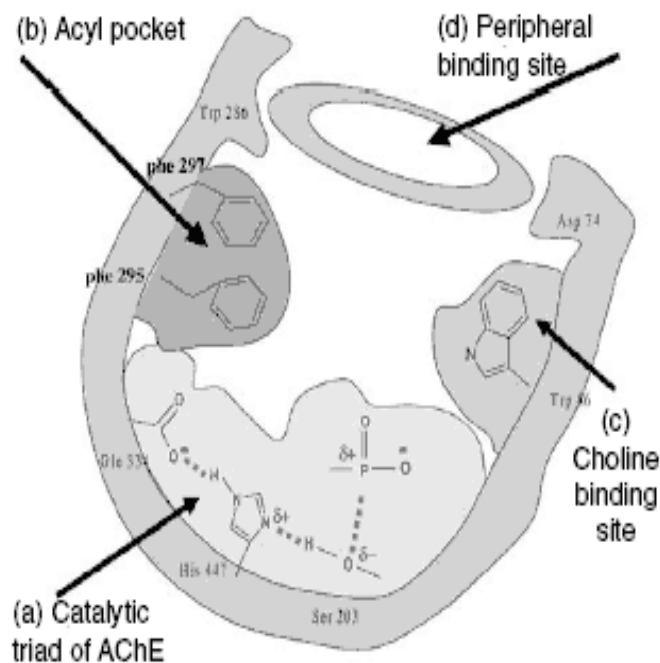
Inhibitory cholinesteras jsou látky, které zpomalují, nebo úplně zastavují reakci katalysovanou cholinesterasami, přičemž zabraňují přeměně substrátu na cholin. Z chemické podstaty se může jednat o rozličné skupiny látek, z nichž k nejrozšířenějším patří organofosfáty. [21, 23]

První známý cholinesterasový inhibitor na bázi organofosfátu byl syntetizován v polovině 19. století na pařížské Sorboně týmem chemika Philippe de Clermont. Objev je konkrétně připisován ruskému studentu Vladimíru Mošninovi a jím syntetizovanou látkou byl tetraethylpyrofosfát (TEPP), jeho toxicita však byla objevena až mnohem později, ve třicátých letech minulého století. Do dnešní doby bylo syntetizováno mnoho organofosfátových látek s inhibičními účinky na cholinesterasy, z nichž některé našly uplatnění jako pesticidy (především thioorganofosfáty, které mají nižší inhibiční účinky, než oxoorganofosfáty, nicméně atom síry je v metabolické přeměně nahrazen

atomem kyslíku a proto thioorganofosfáty reagují pomaleji, příznaky otravy se projeví později, ale přetrvávají déle) a některé jako bojové látky (sarin, cyklosarin, tabun, soman, VX). [21, 24]

Druhou početnou skupinou cholinesterasových inhibitorů jsou karbamáty. Inhibice karbamáty má částečně reversní charakter, poločas rozpadu komplexu enzymu s běžným karbamátem je 20 - 60 minut. Nejdéle známým přírodním karbamátem inhibujícím CHE je eserin (fysostigmin). Karbamáty jsou používány především jako pesticidy (hlavně lipofilní karbamáty jako dimetan, karbaryl, isolan, moban), nebo jako léčiva (rivastigmin, fysostigmin, která způsobují kompetitivní inhibici, jelikož jejich molekula obsahuje, stejně jako acetylcholin, kvartérní dusík, pyridostigmin, neostigmin, miotin). [25]

Cholinesterasy jsou inhibovány i dalšími skupinami látek, např. některými alkaloidy a toxiny. Neurotoxin cyanobakterií anatoxin-(s), toxický peptid hadího jedu mamby zelené fasciculin a mírnou inhibici způsobují i některá antibiotika, např. penicilin, nebo streptomycin. Pro farmaceutický průmysl jsou poté velkým příslibem některé deriváty piperazinů a benzothiazolů. [26]



Obr. 2.19 Ireversibilní inhibice ACHE organofosfátem. [19]

Inhibitory ACHE lze dále rozdělit dle způsobu, kterým inhibitor působí:

- Inhibitory, které cholinesterasy acylují - tyto látky reagují s esterickým místem ACHE či BCHE a tento enzym ireversibilně inhibují. Do této skupiny patří organofosfáty i karbamáty (viz obr 2.17).
- Inhibitory, které cholinesterasy neacylují - tyto látky se váží na α -, β - a γ -anionické místo, přičemž tato vazba má reversibilní charakter.

Enzymy lze reaktivovat pomocí některých nukleofilních činidel, např. oximů. Tyto látky mohou rozbít vazbu mezi enzymem a organofosfátem a tím obnovit enzymovou aktivitu. Při nukleofilním ataku na fosforylovaný, či fosfonylovaný serin na aktivním centru molekuly ACHE se uvolňuje aktivní enzym. [2, 27]

Příznaky otravy organofosfáty lze rozdělit dle lokalizace nahromadění ACH na:

- muskarinové
- nikotinové
- centrální

Jedinec zasažený organofosfáty je postižen poruchou akomodace oční čočky, překrvením sliznic s edémem, zvýšenou sekrecí slinných, slzných, potních a bronchiálních žlázek, zvýšenou střevní peristaltikou často spojenou až s kolikou, poruchami srdečního rytmu a záškuby jednotlivých skupin příčně pruhovaného svalstva. Nebezpečnost těchto látek spočívá v kombinaci bronchokonstrikce, paralýzy dýchacích svalů a útlumu dýchacího centra v prodloužené míše, které společně vedou k udušení intoxikovaného jedince. [23]

2.8 Index IC_{50}

Index IC_{50} je definován, jako množství inhibitoru, které zpomalí enzymatickou reakci, za daných reakčních podmínek, na polovinu. Hodnota indexu tedy vypovídá o inhibiční síle daného inhibitoru a slouží k porovnání jejich účinnosti. Někdy je udávána formou záporného logaritmu jako pI_{50} , viz vztah 2.18. [23, 28]

$$pI_{50} = -\log[I]_{50} \quad (2.20)$$

2.9 Rozdělovací koeficient

Rozdělovací koeficient je definován jako poměr rovnovážných koncentrací analytu ve dvoufázovém prostředí. V experimentu byly, jako fáze, použity rozpouštědla voda jako polární prostředí a *n*-oktanol jako nepolární prostředí a jako testovaná látka jednotlivé inhibitory. Toto rozhraní má simulovat, ve velmi zjednodušeném případě, hematoencefalickou bariéru, kde nepolární složka představuje lipofilní membránu. Poměr mezi koncentrací inhibitoru ve vodném prostředí a v *n*-oktanolu popisuje distribuční konstanta K_{ow} . Distribuční konstanta závisí na podmínkách experimentu, ovlivněna je hlavně teplotou. [29, 30]

$$K_{OW} = \frac{c_{okt}}{c_{voda}} \quad (2.21)$$

2.10 Modelování studovaných hydrolys

Cílem práce bylo hledání kinetického modelu hydrolysy, mechanismu reakce a stanovení kinetických parametrů inhibovaných i neinhibovaných reakcí dvěma nezávislými metodami, spektrofotometricky Ellmanovou metodou a pH-statovou metodou. Pro všechna měření byly dodrženy stejné reakční podmínky (teplota, tlak, pH, iontová síla, počáteční aktivita enzymových preparátů). Zkoumána byla křivka aktuální koncentrace produktů hydrolyzy v závislosti na čase. Křivky neinhibovaných reakcí byly zkoumány na platnost rovnice 2.2b, modifikace rovnice Michaelise a Menteové dle Briggse a Haldene. Výsledky byly získány za pomoci programu GEPASI. Úspěšnost reakce byla hodnocena na základě změřených a vypočítaných parametrů (Michaelisova konstanta K_M , maximální rychlost V_M , rychlostní konstanty k_{-1} , k_1 , k_2 , k_3 a koncentrace substrátu i enzymu). V případě inhibovaných hydrolys se porovnávaly hodnoty mezní rychlosti a Michaelisovy konstanty těchto reakcí vůči hodnotám neinhibovaných hydrolys, díky čemuž mohl být dokázán mechanismus inhibice, tzn. jestli se jedná o inhibici kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní, či smíšenou. Poté byla také stanovena rychlostní konstanta k_3 , která je určující rychlostní konstantou reakce. Toto srovnání bylo opět provedeno pomocí počítačového programu GEPASI. [31]

2.11 Možnosti klinického využití inhibitorů cholinesteras

Inhibitory cholinesterasy jsou v poslední době zkoumány nejen kvůli svým toxickým účinkům zneužitelným ve vojenském průmyslu, či využitelným k hubení hmyzu, ale nacházejí čím dál větší uplatnění též ve farmakochemickém průmyslu. Jelikož v nervových zakončeních prodlužují účinek ACH, je jejich využití výhodné pro léčbu symptomů neurodegenerativních onemocnění. Nicméně mnoho současných farmak má také řadu negativních dopadů způsobených cholinergní stimulací v mozku a periferním nervstvu. Často jsou také hepatotoxické, dráždivé, mutagenní, teratogenní, karcinogenní, neurotoxické a pneumotoxické. Proto se hledají nové inhibitory CHE, které tyto vedlejší účinky nemají, účinkují ve velké terapeutické šíři, v terapeutické dávce jsou co nejméně toxické. Jako výhodná léčiva se jeví některé benzothiazoly a piperaziny. [32]

2.11.1 Neurodegenerativní choroby

V rozvinutých státech Evropy i Ameriky dochází k neustálému zvyšování průměrné doby života a s narůstajícím věkem roste riziko neurodegenerativního onemocnění. Jejich společným rysem je zánik některých populací nervových buněk, který se projevuje jak neurologickými, tak psychickými příznaky. K těm prvním patří poruchy koordinace pohybu, změny svalového napětí, poruchy hybnosti a mimovolní pohyby. K druhým pak poruchy paměti, poruchy kognitivních funkcí přecházející postupně v demenci, poruchy vědomí, poruchy nálad či změny osobnosti. [1]

Molekulární podstatou valné většiny neurodegenerativních chorob je chyba v konformaci některých proteinů, které jsou tvořeny na základě mutace některého genu, což vede k zařazení chybné AMK. Tyto bílkoviny nejsou metabolizovány a dochází k jejich ukládání v buňkách CNS. [1] Druhou možností vzniku těchto onemocnění jsou vaskulární příčiny. Obě varianty nemocí se mohou vzájemně prolínat a manifestují se syndromem smíšené demence. [33]

2.11.2 Demence

Syndrom demence je možné definovat jako ireversibilní poškození mozku, které se projevuje postupnou ztrátou paměti, výrazným zhoršením orientace v prostoru a čase, zhoršením myšlení, chápání, počítání, učení, komunikace a racionálního úsudku, ztrátou motivace. Postiženy jsou také nekognitivní funkce, dochází k poruchám chování, ztrátě soběstačnosti a v konečném důsledku ke smrti. [1, 34]

Tab. 2.22 Klasifikace demencí

| |
|---|
| 1. Primární degenerativní demence |
| <ul style="list-style-type: none">• Frontotemporální převaha: Pickova nemoc, frontotemporální demence, Pickova nemoc bez přítomnosti Pickových tělísek, amyotrofická laterální skleróza s demencí, syndrom kortikobazální degenerace, primární progresivní afázie• Parietotemporální převaha: Alzheimerova nemoc• Subkortikální převaha: Huntingtonova nemoc, Parkinsonova nemoc s demencí, demence s Lewyho tělísky (DLB), některá onemocnění ze skupiny „Parkinson plus“ – např. progresivní supranukleární paralýza. |
| 2. Vaskulární demence |
| <ul style="list-style-type: none">• Multiinfarktová demence (MID)• Strategicky umístěné infarkty• Onemocnění malých cév s demencí• Ischemicko-hypoxická demence• Hemorhagická demence• Jiné mechanismy – kombinace několika faktorů |

3. Sekundární demence

- Normotenzní hydrocefalus (triáda demence, inkontinence, porucha stoje a chůze)
- Metabolické poruchy (např. hypotyreóza, hypoparatyreóza, Wilsonova choroba, získaná hepatocerebrální degenerace, demence při dialýze)
- Poruchy výživy (nedostatek vitamínu B12, B1, B6, folátu, vitamínu E)
- Intoxikace (alkohol, CO, těžké kovy, organofosfáty, jiné průmyslové jedy a kovy, některé léky)
- Záněty CNS (neurosyfilis, neuroborelióza, sclerosis multiplex, AIDS, prionové infekce: Creutzfeldtova-Jacobova nemoc, Gerstmannova-Sträusslerova-Scheinkerova nemoc, fatální familiární insomnie)
- Nádory mozku (lokální a difúzní příznaky, neoplastické meningitidy, progresivní multifokální)
- Úrazy (např. chronický subdurální hematom, „dementia pugilistica“)

Diagnostika kognitivního deficitu se provádí pomocí několika neuropsychologických testů, kde se hodnotí funkce frontálních laloků, paměť a kognitivní tempo. Často užívaným testem je MMSE (Minimal State Examination). [35] Nedílnou součástí vyšetřovacího procesu u každého pacienta s kognitivním deficitem by mělo být zobrazovací vyšetření - CT, magnetická rezonance a u pacientů s hraničními hodnotami vyšetření funkční - SPECT, NMR volumetrie nebo PET. [33]

Pokud je demence indikována, je nutné neodkladně zahájit farmakochemickou léčbu, která má v časných stádiích velmi dobré výsledky a pomáhá zlepšit kvalitu života pacientů i jejich pečovateli. [36] Postupy doporučené k léčbě kognitivních příznaků demence dle American Academy of Neurology pro diagnostiku a léčbu demencí z dubna 2011 [35, 37, 38]:

- Inhibitory cholinesteras - velmi dobře účinkují v případě mírných a středních forem demence, lze je považovat za standardní léčiva Alzheimerovy choroby a také za jedinou účinnou medikamentózní léčbu. Dostupná léčiva tohoto typu jsou donepezil, rivastigmin a galantamin.
- Vitamin E - v teoretické rovině by měl zpomalit nástup demence, nicméně v testu neovlivnil kognitivní funkce.
- Selegilin - jde o alternativu ke klasickým medikamentům, nicméně v testu neovlivnil kognitivní funkce.
- Další antioxidanty, např. ginkgo biloba a protizánětlivé látky - alternativní léčebné látky vhodné zejména u pacientů se smíšenými formami demence.
- Estrogen - účinek na zlepšení klinických projevů demence nebyl zjištěn. Nedoporučuje se.

Postupy doporučené k léčbě nekognitivních příznaků demence dle American Academy of Neurology pro diagnostiku a léčbu demencí z dubna 2011 [35, 38, 39]:

- neuroleptika - v případě pacientů, kteří trpí psychotickými stavy, které lze zvládnout nefarmakologicky. Standardní postup léčby.
- Tricyklická antidepresiva, MAO - B inhibitory, SSRI (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu) - jsou doporučeny pro zvládnání depresí. Jde o doporučený postup.

Základem současné farmakoterapie demencí je tedy snaha o zvýšení úrovně hladiny acetylcholinu v mozku a zlepšení cholinergního přenosu. Tohoto cíle je zatím dosaženo pouze prostřednictvím inhibice cholinesterasy. Zkoumány jsou také další možnosti terapie, které se snaží zasáhnout do metabolismu β -amyloidu, jehož patologické ukládání v mozku je považováno za příčinu Alzheimerovy choroby. [37]

- Antiamyloidní terapie
- Imunoterapie
- Plazmaferéza

2.11.2.1 Alzheimerova choroba

Jde o nejčastější formu demence, tvoří až 70 % všech demencí. V České republice jí trpí okolo 70 až 100 tisíc pacientů. Některé zdroje uvádějí i 150 tisíc případů. Juvenilní forma této nemoci začíná mezi 35. až 50. rokem věku, přičemž prevalence po 65. roku narůstá exponenciálně a v populaci žen starších 85 let dosahuje takřka 50%. [33]

Nástup choroby je pomalý avšak její projevy se stále zhoršují až dojde k takovému zhoršení kognitivních funkcí, že člověk ztrácí schopnost se o sebe postarat a není schopen komunikovat s okolím. [33, 40]

Juvenilní forma bývá nejčastěji rodově dědičná s autozomálně dominantní dědičností. Bylo nalezeno několik genetických mutací na chromozomech 21, 14 a 1 (v podezření jsou i geny na chromozomech 10 a 12 a 19), v důsledku čehož dochází k tvorbě defektních proteinů β -amyloidu a proteinu *tau*, které jsou následně ukládány v mozku. Předmětem sporu zatím zůstává, který ze dvou zmiňovaných proteinů skutečně spouští propuknutí Alzheimerovy choroby a který je pouze doprovodným faktorem, v mozku postižených jsou přítomny oba. Pozdní forma po 65. roce může být také geneticky podmíněna, ale častěji propuká bez známé rodinné incidence. V souvislosti se spouštěcími faktory Alzheimerovy choroby se spekuluje o virech, prionech, toxinech, špatné výživě, stresu a kovech. [1, 41]

Zpočátku se nemoc projevuje zapomnětlivostí, zmateností, poruchou krátkodobé paměti a poruchou časové i prostorové orientace. Nemocný neví, který je den, kde je a z toho pramení výkyvy nálad a pocit úzkosti. Demenci, provázející Alzheimerovu chorobu lze zařadit do tří stupňů [41]:

- Mírná demence se projevuje hlavně poruchou krátkodobé paměti, pacient si uvědomuje úbytek paměti, který je zároveň již měřitelný. Může mít problémy s orientací v místech, kam nechodil příliš často, nedokáže dobře vyhodnotit některé složitější logické úkoly.
- Střední demence se projevuje výrazným zhoršením paměti ve všech sférách, častá je dezorientace v prostoru i čase.

- Těžká demence se vyznačuje velmi špatným stavem krátkodobé paměti. Postižený člověk nerozezná, zda je noc, či den, netrefí na WC, není schopen si zapamatovat, kde má lůžko a nepoznává osoby ze svého nejbližšího okolí, rodinu, ani své pečovatele.

Potvrzení diagnózy lze provést histopatologicky. Demence se rozvíjí na základě úbytku mozkové tkáně. Pro postiženou tkáň je charakteristický vysoký výskyt neurofibrilárních klubek a neuritických plaků tvořených jádrem z β -amyloidových vláken. Ty se vyskytují i ve zdravém stárnoucím mozku, ale jejich množství je výrazně nižší. U Alzheimerovy demence jsou postiženy převážně mechanismy vedoucí k tvorbě ACH, čímž jsou z funkce vyřazeny hipokampus a další části spánkového laloku, které jsou podstatné pro uložení paměťové stopy. [1]

Léčba je symptomatická, cílem je zvýšit množství acetylcholinu v nervových zakončeních, léčebné postupy viz kap. 2.11.2. Prognóza onemocnění se pohybuje mezi sedmi až deseti lety života od vypuknutí nemoci.

2.11.2.2 Demence s Lewyho tělísky

Demence s Lewyho tělísky (DLB) se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění na pomezí Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, někteří odborníci dokonce zastávají názor, že se nejedná o samostatné onemocnění, přičemž DLB je pouze demencí u Parkinsonovy choroby. Spojuje příznaky obou poruch, ale zároveň má i svá specifika, především zrakové halucinace lidských postav a zvířat, nemoc má kolísavý průběh. Incidence DLB je dosti vysoká, dosahuje 10 - 20 % všech demencí. Také jejich četnost stoupá s věkem. [33, 42, 43]

Příčina onemocnění je nejasná, nicméně v důsledku choroby dochází k tvorbě vadného proteinu α -synukleinu, který vytváří Lewyho tělíska uvnitř nervových buněk a indukuje jejich apoptózu. DLB je velmi často spojena i s alzheimerovskými změnami, tautopatií. Výrazně narušena je tvorba acetylcholinu v nervových zakončeních. [41, 43]

Diagnostika onemocnění je velmi složitá, daří se zatím jen asi ve 4 % případech, ostatní jsou zaměňovány za demenci u Parkinsonovy nemoci. Hranice pro odlišení jednotlivých nemocí je neostrá.

Vyčleněny byly čtyři typické klinické symptomy: kolísavý průběh kognitivních poruch, vizuální halucinace, motorické příznaky parkinsonismu a progredující demence.

Pro přesné stanovení diagnózy byla vypracována kritéria McKeitha a jeho spolupracovníků z university v Newcastleu. [33, 42, 43]

DLB je nemocí vyššího věku, obvykle propuká mezi 75 - 80 roky života. K léčbě jsou užívány hlavně inhibitory cholinesteras, avšak postup musí být obezřetný, jelikož léčba demence může zhoršit příznaky parkinsonismu. [43]

2.11.3 Myasthenia gravis

Myasthenia gravis (MG) je typickým autoimunitním onemocněním, které postihuje nervosvalový přenos, v důsledku čehož kolísá výkonnost svalstva a po fyzické zátěži se projeví abnormální únavou. Prevalence onemocnění je 80 - 190 případů na milion obyvatel, přičemž charakteristickými skupinami pacientů jsou ženy mezi 20. až 30. rokem života a muži v období 60. až 70. let. [44, 45]

MG lze, dle přítomnosti autoprotilátek rozdělit do čtyř variant [45]:

- Séropositivní MG s autoprotilátkami proti nikotinovým ACH receptorům
- Séropositivní MG s autoprotilátkami proti ACH receptorům asociovaná s nádorovým onemocněním thymu a s autoprotilátkami proti titinu.
- Séronegativní MG s autoprotilátkami proti svalové specifické tyrosin kinase (MuSK)
- MG bez autoprotilátek proti ACH receptorům a proti MuSK

Příčina a mechanismus vzniku autoimunitní reakce při MG není známa, v případě séropositivních typů MG hraje významnou úlohu thymus, který za normálních okolností eliminuje potenciálně autoreaktivní klony T buněk. MG je polygenní onemocnění, které je asociováno s HLA Ag, přičemž je zřejmě výrazně ovlivněno vnějšími vlivy. [44, 45, 46]

V diagnostice onemocnění je důležité neurologické a myologické vyšetření, EMG, vyšetření protilátek proti ACHR, MuSK a titinu a také CT, nebo MR vyšetření hrudníku. [46]

MG se většinou manifestuje plíživým nástupem, přičemž intenzita příznaků kolísá. Postupně bývá postižena funkčnost většiny svalů, která může vyvrcholit myasthenickou krizí, při které může dojít k zástavě dechu. Pokud je však MG včas diagnostikována a správně léčena, je mortalita v důsledku tohoto onemocnění velmi nízká. [45, 46] Prvními postiženými svaly zpravidla bývají:

- Okohybné svaly, kde je vyšší frekvence nervových spojení a zároveň nižší denzita ACH receptorů, proto se zde projevuje MG nejdříve v případě téměř 60 % postižených. Snížena je frekvence mrkání a pacient má velké potíže se zavřením víček.
- Porucha artikulace, slabost měkkého patra a jazyka se projevuje asi u 15 - 20 % postižených.
- Slabost mimického svalstva u 5 - 10 % pacientů.
- Postižení končetinového svalstva u 5 - 10 % pacientů.
- Slabost některé izolované skupiny svalů u 10 % postižených.

Terapie MG se provádí pomocí imunosupresiv, thymektomie, krátkodobé intervence v podobě plazmaferézy a také pomocí inhibice cholinesteras. Inhibitory cholinesteras (CHEI) brzdí enzymatickou hydrolysu ACH na nervosvalové ploténce, kde zvyšují jeho množství a tím prohlubují jeho efekt. Tato léčba je prospěšná v případě valné většiny pacientů s MG, není vhodná pouze pro většinu případů séronegativní MG s autoprotilátkami proti MuSK, kteří reagují na léčbu jen omezeně anebo vůbec. CHEI ovlivňují onemocnění jen symptomatically, avšak nemají žádný vliv na imunopatogenezi onemocnění. Je vhodné je kombinovat s imunosupresivy. Nejčastěji předepisovaným lékem MG na bázi CHEI je MESTINON, který má prolongovaný účinek a je pacienty dobře snášen. Dalšími variantami jsou SYNTOSTIGMIN, MYTELASE a UBRETID. [45, 47]

2.11.4 Glaukom

Glaukom, nazývaný též lidově jako zelený zákal je onemocnění, které vede k výraznému poškození zraku. Dochází k významnému poškození terče zrakového nervu, jakož i gangliových buněk v sítnici, což má za následek zmenšení zorného pole a v pokročilých stádiích ochorení i úplnou ztrátu zraku. Incidence tohoto onemocnění stoupá s věkem. [48, 49]

Pokud není známa příčina vzniku glaukomu, hovoříme o něm jako o primárním glaukomu, pokud je spojen s jiným onemocněním, jde o sekundární glaukom (příčinou může být diabetes mellitus, jiná oční vada, nebo poranění). Pokud jsou dále při gonoskopickém vyšetření úhlu viditelné všechny jeho struktury, jedná se o glaukom s otevřeným úhlem, pokud je viditelná jen část, hovoří se o glaukomu s úzkým, nebo uzavřeným úhlem. [49]

Diagnostika je prováděna hlavně měřením nitroočního tlaku, perimetrickým měřením a vyšetřením očního pozadí. [48, 50]

Příznaky onemocnění v počáteční fázi jsou nulové a nebo jen nepatrné a proto je běžné, že se pacient dostaví k lékaři až v momentě, kdy je zrakový nerv ireversibilně poškozený. K častým subjektivním příznakům patří zvýšená únava očí, pocit tlaku v očích a bolestivost očí na dotek. Rizikovými faktory pak jsou vysoký nitrooční tlak, kardiovaskulární onemocnění, migréna, hypotenze, nebo krátkozrakost. [48, 49, 50]

Přístupy k léčbě glaukomu lze rozdělit do tří kategorií:

- Medikamentosní
- Laserové
- Chirurgické

Medikamentosní přístup k léčbě glaukomu byl v minulosti jedinou možností léčby, přičemž šlo o snahu snížit nitrooční tlak, o kterém se dříve soudilo, že je hlavní příčinou vzniku choroby. Dnes je však zřejmé, že glaukom je multifaktoriální onemocnění, při kterém je rizikovým faktorem vysoký nitrooční tlak, který brání průtoku krve terčem zrakového nervu. K léčbě jsou proto vhodné přípravky, které snižují nitrooční tlak a zlepšují průtok krve zrakovým nervem. Dříve se k léčbě užívaly

i inhibitory cholinesterasy, které pozitivním způsobem ovlivňovaly odtok nitrooční tekutiny a tím snižovaly nitrooční tlak. Dnes jsou však již úspěšně nahrazeny léky na bázi prostaglandinů, lokálních inhibitorů karboanhydrasy, blokátorů kalciových kanálů či inhibitorů endothelinu 1. Stále častěji jsou však užívány laserové, nebo chirurgické metody. [42, 48, 51]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

Acetylcholinesterasa (ACHE)

- Sigma – Aldrich Praha, ČR; typ VI-S: z úhoře elektrického
- rozpuštěním ve vodě byly připraveny zásobní roztoky ACHE o aktivitě mezi 6 - 25 U/ml, které byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -6°C

Butyrylcholinesterasa (BCHE)

- Sigma – Aldrich Praha, ČR; z koňské krevní plazmy
- rozpuštěním ve vodě byly připraveny zásobní roztoky BCHE o aktivitě mezi 6 - 25U/ml, které byly uchovávány v mrazícím boxu při teplotě -6°C

Fosfátový pufr

- složení:
 - Na₂HPO₄·12H₂O (Lach-Ner Neratovice, ČR)
 - KH₂PO₄ (Lach-Ner Neratovice, ČR)
- pufr je připraven v deionizované vodě, pH je upraveno na hodnotu 8,0
- uchováván v lednici
- roztok se používá jako pufr při stanovování aktivity enzymových preparátů a hodnoty IC₅₀ testovaných inhibitorů

2,2' -dinitro- 5,5' -dithiobenzoová kyselina (DTNB)

- Sigma-Aldrich Praha, ČR
- koncentrace 5 · 10⁻⁴ M
- jedná se o thiol-selektivní reagens pro Ellmanovu reakci, která tvoří s volnými SH skupinami barevný produkt
- použito jednak pro stanovení enzymové aktivity i pro stanovení hodnoty IC₅₀

Acetylcholin chlorid (ACH)

- 99%, Sigma-Aldrich Praha, ČR
- 0,1M roztok užit při pH-statové metodě

Acetylthiocholin jodid (ATCH)

- Sigma-Aldrich Praha, ČR
- 10^{-3} M roztok užit při Ellmanově metodě pro stanovení hodnoty IC_{50}
- 0,1 M roztok užit při stanovení aktivity enzymu

Demineralizovaná voda

Dioxan p.a.

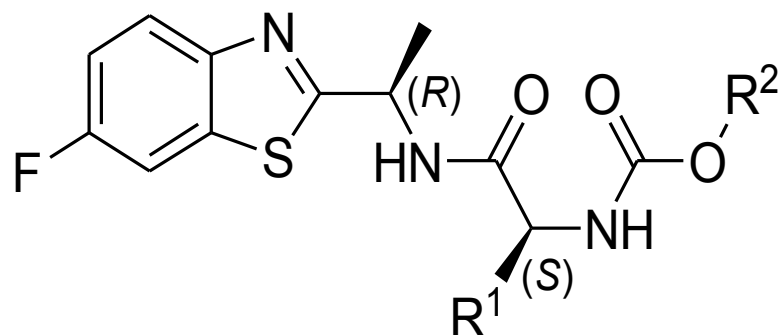
- Lach-Ner Neratovice, ČR
- rozpouštědlo pro karbamáty

***n*-oktanol p.a.**

- Sigma-Aldrich Praha, ČR
- pro stanovení rozdělovacích koeficientů

testované inhibitory

- jejich syntéza, ověření struktury a čistoty bylo provedeno na Ústavu organické chemie a technologie, Univerzita Pardubice, ČR
- inhibitory patří do skupiny benzothiazolů, pro jednotlivá měření byly dodávány jako dioxanové roztoky o koncentraci 0,02 M, dále pak byly ředěné demineralizovanou vodou dle požadavků měření



Obr. 3.1 Skelet studovaných inhibitorů

Názvy jednotlivých inhibitorů:

(S)-1-((R₁-ethyl)-1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)R₂karbamoyl)-2-methylpropylkarbamát

Tab.3.2 Přehled studovaných inhibitorů

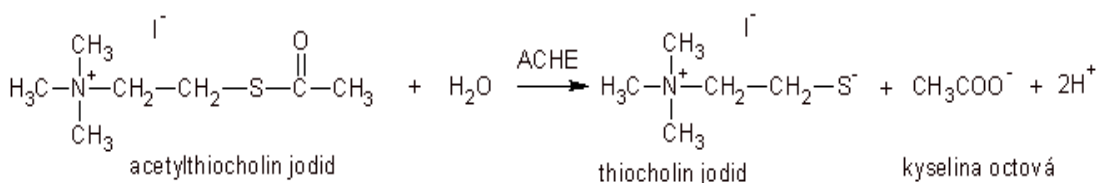
| označení | R ₁ / R ₂ | Mr |
|----------|---------------------------------|--------|
| 1 | L-Leu / Me | 367,43 |
| 2 | L-Leu / Et | 381,46 |
| 3 | L-Leu / Pro | 395,49 |
| 4 | Leu / i-Pro | 395,49 |
| 5 | Leu / Bu | 409,52 |
| 6 | Leu / i-Bu | 409,52 |
| 7 | L-Phe / Me | 401,45 |
| 8 | L-Phe / Et | 415,48 |
| 9 | L-Phe / Pro | 429,5 |
| 10 | L-Phe / i-Pro | 429,5 |
| 11 | L-Phe / Butyl | 443,53 |
| 12 | L-Phe / i-Butyl | 443,53 |

3.2 Analytické metody použité při stanovení aktivity studovaných enzymů a při jejich inhibici

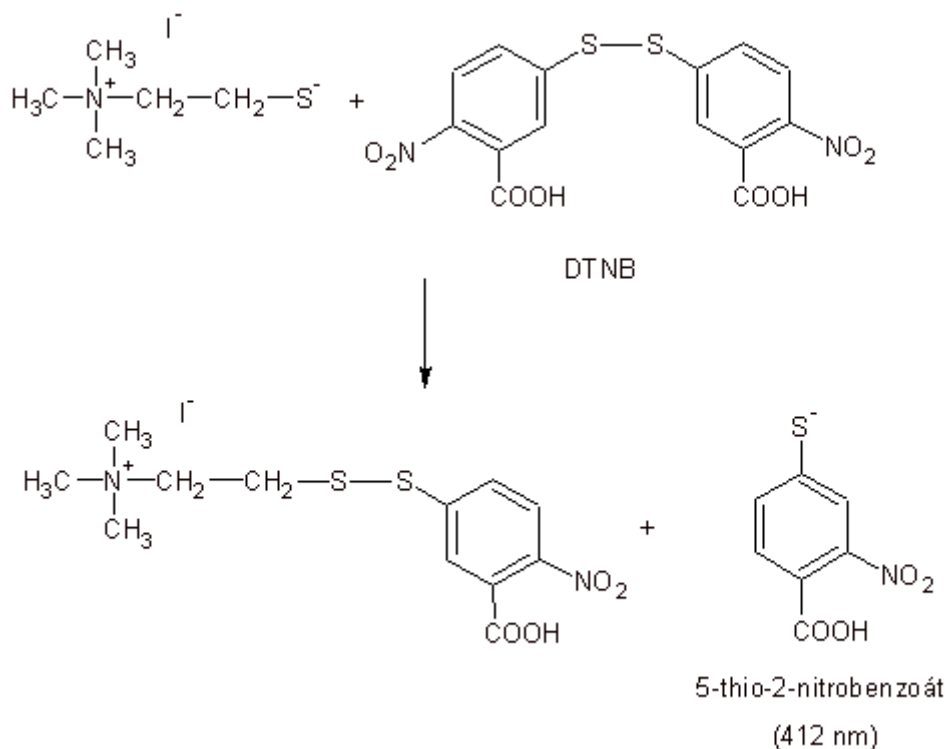
Stanovení aktivity enzymů může být provedeno hned několika možnými způsoby. S úspěchem lze využít metod elektrochemických, polarografických, titračních, kolorimetrických, spektrofotometrických, metod využívajících změnu pH s využitím indikátoru, fluorimetrických, radiometrických a enzymových. [52]

3.2.1 Ellmanova metoda

Jedná se o kolorimetrickou metodu, přičemž princip této metody je založen na hydrolyse thiocholinu (acetylthiocholinu pro ACHE, butyrylthiocholinu pro BCHE). Po enzymové hydrolyse je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule skupinu SH je detekován pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) tím, že po reakci s thiocholinem dochází k uvolnění 5-merkapto-2-nitrobenzoového aniontu (TNB⁻) (obr. 3.3 a 3.4). Tento anion je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. [52, 53, 54]



Obr. 3.3 Štěpení acetylcholinu na kyselinu octovou a thiocholin



Obr. 3.4 Štěpení DTNB a vznik chromoforu

Koncentrace TNB poté odpovídá aktivitě enzymu a dá se vypočítat pomocí Lambert-Beerova zákona

$$A = \varepsilon \cdot d \cdot [TNB] \quad (3.5)$$

- A - absorbance
- ε - molární absorpční koeficient
- d - optická dráha monochromatického záření

Z provedeného experimentu lze, při znalosti hodnoty molárního absorpčního koeficientu ε (412 nm) = 14150 l.mol⁻¹.cm⁻¹, na základě závislosti absorbance A (412 nm) na času t vypočítat hodnotu koncentrace [TCH] v závislosti na času t [25].

3.2.1.1 Přístroje

- spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA

3.2.1.2 Stanovení specifické aktivity enzymového preparátu

Pro ACHE i BCHE byly užity stejné podmínky stanovení. Byla připravena reakční směs v objemu 2 ml, která byla řádně promíšena a poté předložena k spektrofotometrickému stanovení. Měřena byla závislost A (412 nm) proti t (v 5 s intervalech, cca 70 s). Tato změřená závislost posloužila k výpočtu aktuální aktivity daného enzymu dle rovnice 3.5.

$$y * 17,67 \quad (3.6)$$

- y - koeficient parametrické rovnice dané závislosti vypočítaný pro $x=60$ (plyne z definice 1U)
- 17,67 - konstanta, která zahrnuje celkový objem vzorku, objem enzymu a molární absorpční koeficient ϵ (412 nm) = $14150 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

3.2.1.3 Pracovní postup

Smícháním 0,8 ml fosfátového pufru o pH 8, 0,8 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$), 0,392 ml deionizované vody a 0,008 ml ATCH (0,1M) byl připraven blank, poté byly připraveny roztoky pro stanovení aktivity ACHE, případně BCHE a to smícháním 0,8 ml fosfátového pufru o pH 8, 0,8 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$), 0,384 ml deionizované vody a 0,008 ml ATCH (0,1M), reakce byla odstartována přidáním 0,008 ml ACHE (BCHE). Spektrofotometricky byla změřena závislost absorbance A (412nm) na čase t v časovém rozmezí 70 s. Aktivita enzymu byla ověřena šesti na sobě nezávislými reakcemi, z nichž byla vypočítána průměrná hodnota aktivity enzymu.

3.2.2 Stanovení IC_{50}

- Byla použita modifikace Ellmanovy metody.

3.2.2.1 Přístroje

- spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA

3.2.2.2 Pracovní postup

Nejprve bylo nutné připravit a změřit blank a to napipetováním 0,8 ml fosfátového pufru o pH 8, 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) a 0,72 ml deionizované vody.

Poté byla měřena neinhibovaná reakce a to vždy v tripletu. Do měrné kvyety bylo napipetováno 0,8 ml fosfátového pufru o pH 8, 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$), 0,08 ml ATCH ($1 \cdot 10^{-3}\text{M}$), množství enzymového preparátu dle aktuální aktivity tak, aby jeho

aktivita v reakční směsi byla přesně 0,14 U/ml a poté byla přidána deionizovaná voda do celkového objemu 2 ml.

V dalším kroku byly změřeny inhibované reakce pro různé koncentrace inhibitoru ve vzorku, které byly měřeny vždy v dubletu. Do měrné kyvety bylo napipetováno 0,8 ml fosfátového pufru o pH 8, 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4} \text{M}$), 0,08 ml ATCH ($1 \cdot 10^{-3} \text{M}$), množství enzymového preparátu dle aktuální aktivity tak, aby jeho aktivita v reakční směsi byla přesně 0,14 U/ml, čtyři různě volené objemy inhibitoru (v rámcové koncentraci ve směsi $2 \cdot 10^{-6}$ – $6 \cdot 10^{-5} \text{M}$) a poté byla přidána deionizovaná voda do celkového objemu 2 ml. Poté byla měřena závislost absorbance A (412nm) na čase t v časovém rozmezí 120 s. Ze změny absorbance v čase poté byla vypočtena reakční rychlost ($v = \Delta A / \Delta t$) a byl sestaven graf závislosti v_0/v_i na c (l), který poskytl rovnici parametrické přímky, ze které byla dále vypočtena hodnota x , pro $y = 2$ (dle definice IC_{50} : IC_{50} je taková koncentrace inhibitoru, která sníží reakční rychlost inhibované reakce oproti rychlosti reakce neinhibované na polovinu).

3.2.3 pH-statová metoda

Tato metoda využívá neutralizační děj při hydrolyse ACH na kyselinu octovou, která je titrována roztokem silné zásady (v našem případě KOH). Skleněná-argentschloridová elektroda sloužila ke kontinuálnímu měření pH roztoku, přičemž, díky jejímu propojení s automatickou byretou, bylo možné přesně měřit objem přidaného roztoku KOH, který lze přepočítat na závislost koncentrace kyseliny octové v čase. [55]

3.2.3.1 Přístroje

- automatický titrátor 799 GPT Metrohm, Švýcarsko
- reakce probíhala ve dvouplášťové nádobce o objemu 50ml
- reakční směs byla míchána elektromagnetickým míchadlem

3.2.3.2 Pracovní postup

Do reakční nádoby bylo napipetováno 5,5 ml 0,5 M KCl, 1 ml 0,1 M ACH a takový objem H₂O, aby celkový objem reakční směsi po přidání všech zbývajících komponent byl 25 ml. U inhibovaných reakcí obsahoval analyt ještě vhodné množství inhibitoru o koncentraci 10⁻² M. Po vytemperování na 25°C byla provedena pretitrace roztokem KOH (0,1 M) pro nastavení pH analyzovaného roztoku na hodnotu 8. V nulovém čase byl přidán takový objem enzymu, aby jeho aktivita v reakční směsi o celkovém objemu 25 ml byla 0,14 U. Poté byla zahájena titrace vznikající kyseliny octové pomocí 0,1 M KOH. Byla získána závislost objemu KOH na čase. Tato závislost byla následně přepočítána na závislost koncentrace kyseliny octové v čase.

3.2.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů studovaných inhibitorů v soustavě *n*-oktanol : voda

3.2.4.1 Přístroje

- spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA
- třepačka
- centrifuga

3.2.4.2 Pracovní postup

Ke 2 ml *n*-oktanolu bylo přidáno 15 µl oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci 1*10⁻² M, směs byla intenzivně protřepávána 15 min. Do kyvety bylo odpipetováno 1,5 ml této směsi a byla změřena její absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Tak byla získána hodnota absorbance, která odpovídá 100 % daného inhibitoru v *n*-oktanolu.

Ke směsi *n*-oktanolu a destilované vody (poměr 1:1, celkový objem 4 ml) bylo přidáno 15 μl oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ M, směs byla intenzivně protřepávána 15 min. a poté centrifugována při 3000 ot./min. po dobu 10 min. Do květy bylo odpipetováno 1,5 ml oktanolové vrstvy a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Srovnávacím prostředím byl vždy *n*-oktanol. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě (%)₁ a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě 100-(%)₁. Následně byly vypočteny rozdělovací koeficienty jednotlivých inhibitorů v soustavě *n*-oktanol : voda podle vztahu 3.6

$$K_{OW} = \frac{(\%)_1}{100 - (\%)_1} = \frac{c_{okt}}{c_{voda}} \quad (3.7)$$

kde c_{okt} a c_{voda} jsou molární koncentrace daného inhibitoru v *n*-oktanolu a ve vodě.

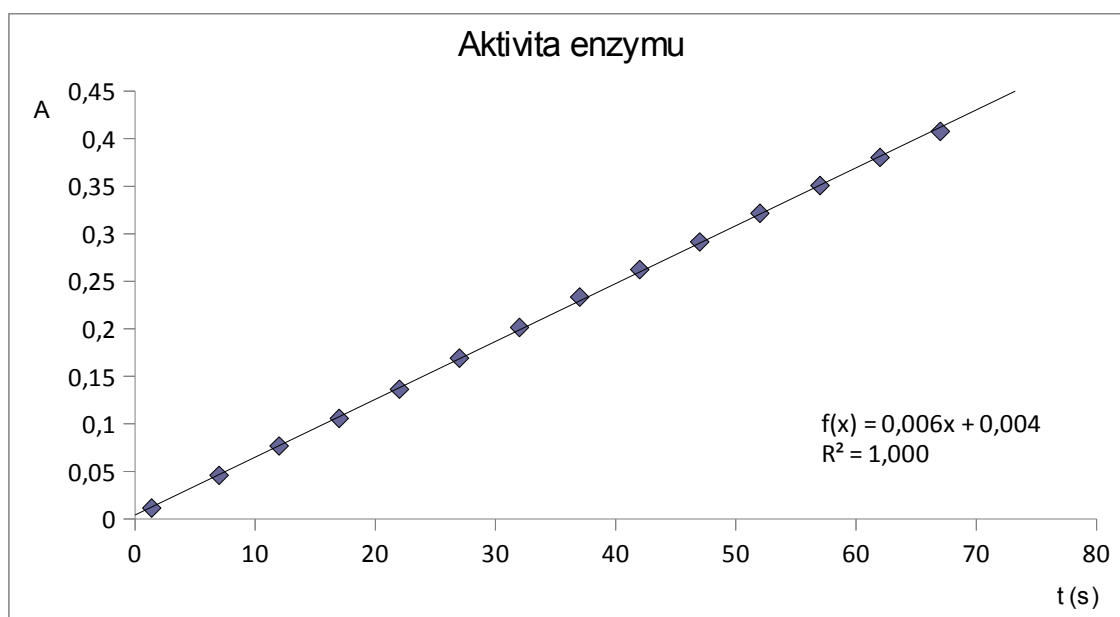
4 Výsledky

Cílem práce bylo objasnění mechanismu a popis kinetického modelu inhibovaných hydrolyz ATCH a ACH jako substrátů, katalysovaných enzymy ACHE a BCHE. Jednotlivé varianty reakcí enzym - substrát tedy tvořily kombinace:

- ACH + ACHE
- ACH + BCHE
- ATCH + ACHE
- ATCH + BCHE

4.1 Stanovení aktuální katalytické aktivity enzymových preparátů Ellmanovou metodou

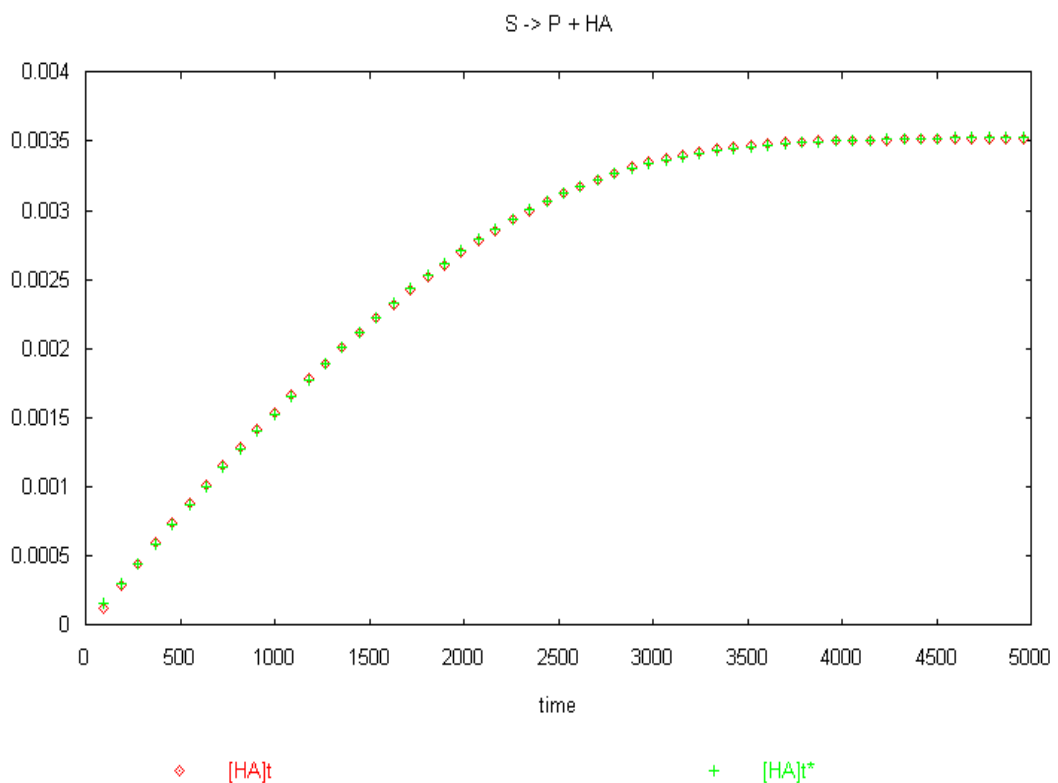
Vždy, těsně před vlastním zahájením experimentu, bylo nutné stanovit hodnotu aktuální katalytické aktivity ACHE, případně BCHE. Stanovení byla provedena Ellmanovou metodou šesti nezávislými měřeními, z nichž byla, po vyloučení případných odlehlých bodů vypočítána průměrná hodnota.



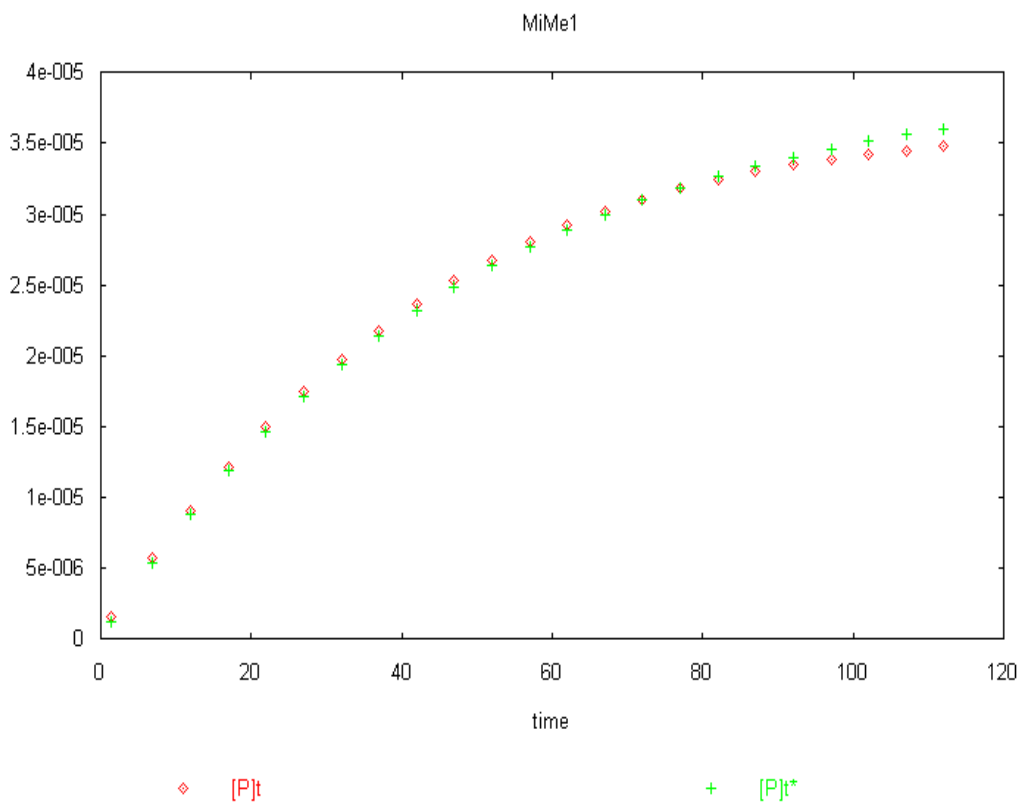
Obr. 4.1 Graf stanovení enzymatické aktivity

4.2 Kinetika neinhibovaných reakcí

Pro ověření kinetického modelu Michaelise a Mentenové v modifikaci Briggs a Haldane byly změřeny závislosti koncentrace produktu hydrolysy $[HA]$ na čase t . Pro substrát ATCH byly tyto závislosti měřeny Ellmanovou metodou, pro substrát ACH byly měřeny pH-statovou metodou, měření byla provedena pro oba enzymové preparáty. Jednotlivé křivky jsou znázorněny na obrázcích 4.2, 4.3, 4.4 a 4.5.



Obr. 4.2 Závislost $[HA]$ na čase t , pro kombinaci ACH - ACHE. Měřeno pH-stat metodou (pokus P150611a). V grafu je znázorněna experimentální závislost $[HA]_t$ a teoretická (modelová) závislost $[HA]_t^*$, která se významně neliší.



Obr. 4.5 Závislost $[HA]$ na čase t , pro kombinaci ATCH - BCHE. Měřeno Ellmanovou metodou (pokus e130511b). V grafu je znázorněna experimentální závislost $[HA]_t$ a teoretická (modelová) závislost $[HA]_t^*$, která se významně neliší.

Metodou GEPASI byly vypočítány hodnoty konstant rovnice Michaelise a Mentenové K_M a V_M , dále pak počáteční koncentrace substrátu (v prvním řádku optimální vypočítaná, ve druhém experimentální) $[S]_o$, směrodatná odchylka s.o., rychlostní konstanty enzymové reakce k_i a optimální odhad počáteční molarity enzymu pro daný experiment $[E]_o$. Hodnoty K_M a V_M v posledních dvou sloupcích byly vypočítány dle rovnic 2.2b z hodnot k_i a $[E]_o$. Všechna data jsou označena dle data měření. Takto bylo postupováno v případě každé varianty enzym - substrát a získané výsledky jsou uvedeny v tabulkách Tab 4.6, 4.7, 4.8 a 4.9.

Tab. 4.6 Neinhibovaná hydrolysa ACH pomocí ACHE, pH-stat metoda. Popis viz předchozí text.

| PHS | model Michaelis-mentenové | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
|---------------|---------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| ACH-ACHE | Gepasi (model: MM.gps) | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
| pokus | $K_M \cdot 10^3$ | $V_m \cdot 10^6$ | $[S]_0 \cdot 10^3$ | s.o. $\cdot 10^5$ | $k_1 \cdot 10^4$ | k_{-1} | k_2 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | $[S]_0 \cdot 10^3$ | s.o. $\cdot 10^5$ | $K_M \cdot 10^3$ | $V_m \cdot 10^6$ |
| | [M] | [M/s] | [M] | [M] | [1/(M*s)] | [1/s] | [1/s] | [M] | [M] | [M] | [M] | [M/s] |
| P250511a | 2,2510 4,3470 | 1,8550 2,4040 | 4,0000 4,4140 | 0,9085 0,5225 | 1,4880 1,1330 | 11,6000 22,2500 | 21,9000 27,0200 | 0,8468 0,8898 | 4,0000 4,4140 | 0,9311 0,5356 | 2,2513 4,3486 | 1,8545 2,4042 |
| P270511a | 2,2470 5,3500 | 1,9850 2,8660 | 4,0000 4,5020 | 1,7270 1,3320 | 1,5440 1,0340 | 11,9000 24,3500 | 22,8000 31,4600 | 0,8704 0,9109 | 4,0000 4,5020 | 1,7700 1,3660 | 2,2474 5,3975 | 1,9845 2,8657 |
| P300511a | 2,3920 2,4630 | 1,9560 1,9780 | 4,0000 4,0120 | 1,0120 1,0180 | 1,4360 1,4270 | 11,2800 11,5900 | 23,0700 23,5700 | 0,8478 0,8395 | 4,0000 4,0120 | 1,0310 1,0390 | 2,3921 2,4639 | 1,9559 1,9787 |
| P310511a | 2,0350 2,7340 | 1,7260 1,9260 | 4,0000 4,1420 | 1,1200 0,9051 | 1,3360 1,2570 | 4,6260 11,4900 | 22,5600 22,8700 | 0,7653 0,8421 | 4,0000 4,1430 | 1,1420 0,9229 | 2,0349 2,7335 | 1,7265 1,9259 |
| P010611a | 2,7410 3,8370 | 1,9580 2,2690 | 4,0000 4,1560 | 1,1610 0,9711 | 1,3040 1,0830 | 12,4000 15,0600 | 23,3300 26,5200 | 0,8391 0,8562 | 4,0000 4,1560 | 1,1840 0,9903 | 2,7400 3,8393 | 1,9576 2,2706 |
| P150611a | 2,6080 2,4920 | 2,0940 2,0560 | 4,0000 3,9820 | 1,0790 1,0820 | 1,4000 1,3810 | 12,3000 9,4860 | 24,2100 24,9400 | 0,8651 0,8243 | 4,0000 3,9820 | 1,1000 1,1030 | 2,6079 2,4928 | 2,0944 2,0558 |
| P200611a | 2,6490 3,9090 | 2,0300 2,4130 | 4,0000 4,1680 | 1,3270 1,0310 | 1,3610 1,2280 | 12,2600 19,8400 | 23,8100 28,1600 | 0,8528 0,8568 | 4,0000 4,1680 | 1,3530 1,0510 | 2,6503 3,9088 | 2,0305 2,4127 |
| P090112a | 17,8700 10,2000 | 10,9400 2,1120 | 4,0000 3,5320 | 11,1476 1,1542 | 0,8319 2,4840 | 56,0500 1,9740 | 91,9900 23,3600 | 1,1850 0,9040 | 4,0000 3,5320 | 11,3640 1,7700 | 17,7954 1,0199 | 10,9008 2,1117 |
| P100112a | 5,2470 | 2,6750 | 4,0000 | 2,8450 | 0,9553 | 19,8200 | 30,3400 | 0,8822 | 4,0000 | 2,9006 | 5,2507 | 2,6766 |
| P110112a | 13,7000 | 5,6330 | 4,0000 | 2,0277 | 0,6849 | 37,2000 | 56,7600 | 0,9937 | 4,0000 | 2,0673 | 13,7188 | 5,6402 |
| průměr | 3,0039 | 2,1083 | 4,0983 | 1,0854 | 1,3151 | 13,6023 | 24,7300 | 0,8505 | 4,0984 | 1,1085 | 3,0077 | 2,1084 |

x - nezapočítáno do průměru

Tab. 4.7 Neinhibovaná hydrolysa ACH pomocí BCHE, pH-stat metoda. Popis viz předchozí text.

| PHS | model Michaelis-mentenové | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
|----------|---------------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| ACH-BCHE | Gepasi (model: MM.gps) | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
| pokus | $K_m \cdot 10^3$ | $V_m \cdot 10^6$ | $[S]_0 \cdot 10^3$ | $s.o. \cdot 10^5$ | $k_1 \cdot 10^4$ | k_{-1} | k_2 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | $[S]_0 \cdot 10^3$ | $s.o. \cdot 10^5$ | $K_m \cdot 10^3$ | $V_m \cdot 10^6$ |
| | [M] | [M/s] | [M] | [M] | [1/(M*s)] | [1/s] | [1/s] | [M] | [M] | [M] | [M] | [M/s] |
| P110411a | 11,9600 3,2170 | 8,6660 3,7590 | 4,0000 3,7220 | 3,4860 0,2717 | 0,9739 1,6730 | 45,4700 18,1800 | 70,9700 35,6800 | 1,2210 1,0540 | 4,0000 3,7220 | 3,5720 0,2783 | 11,9561 3,2194 | 8,6654 3,7607 |
| P130411a | 3,3374 2,1830 | 3,6420 2,9950 | 4,0000 3,8760 | 1,9510 0,5517 | 1,5820 1,8410 | 19,2600 14,5800 | 34,1200 25,6100 | 1,0670 1,1690 | 4,0000 3,8760 | 1,9990 0,5654 | 3,3742 2,1831 | 3,6406 2,9938 |
| P270411a | 1,3980 1,0750 | 1,7860 1,6710 | 4,0000 3,8730 | 1,5740 1,4060 | 1,5900 2,3020 | 6,6200 4,8530 | 20,7700 19,9000 | 0,8597 0,8398 | 4,0000 3,8730 | 1,6130 1,4410 | 1,7226 1,0753 | 1,7856 1,6712 |
| P110511a | 4,0180 1,9370 | 3,6160 2,6080 | 4,0000 3,7700 | 2,7210 0,8822 | 1,3954 1,9670 | 21,4500 13,1700 | 34,5600 24,9300 | 1,0460 1,0460 | 4,0000 3,7700 | 2,7880 0,9042 | 4,0139 1,9370 | 3,6150 2,6077 |
| P120511a | 8,1450 3,1990 | 6,6680 3,8200 | 4,0000 3,7880 | 3,2450 1,3650 | 1,1400 1,7160 | 36,6500 18,9300 | 56,0800 35,9600 | 1,1880 1,0620 | 4,0000 3,7880 | 3,3250 1,3990 | 8,1342 3,1987 | 6,6623 3,8190 |
| P130511a | 7,5190 3,2700 | 5,7860 3,5650 | 4,0000 3,7870 | 2,3410 0,2398 | 1,1170 1,6160 | 33,8100 18,4100 | 50,3600 34,4300 | 1,1510 1,0350 | 4,0000 3,7870 | 2,3990 0,2456 | 7,5354 3,2698 | 5,7964 3,5635 |
| P180511a | 9,2050 2,6030 | 7,5680 3,5800 | 4,0000 3,7340 | 4,3140 0,2972 | 1,1170 1,8760 | 40,2200 15,1600 | 62,4300 33,6700 | 1,2110 1,0630 | 4,0000 0,3734 | 4,4210 0,3043 | 9,1898 2,6029 | 7,5603 3,5791 |
| P120112a | 9,4220 2,7340 | 5,6450 2,7110 | 4,0000 3,7120 | 3,6355 0,7745 | 0,9119 1,5700 | 32,6100 12,7100 | 52,9000 30,2200 | 1,0630 0,8971 | 4,0000 3,7120 | 3,7060 0,7901 | 9,3771 2,7344 | 5,6233 2,7110 |
| průměr | 4,7014 | 4,2554 | 3,8914 | 1,8160 | 1,5243 | 22,0052 | 38,9119 | 1,0608 | 3,6813 | 1,8594 | 4,7202 | 4,2534 |

Tab 4.8 Neinhibovaná hydrolyza ATCH pomocí ACHE, Ellmanova metoda. Popis viz předchozí text.

| ELM | model Michaelis-mentenové | | | | | | | | | | | |
|-----------|---------------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| ATCH-ACHE | Gepasi (model: MM.gps) | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
| pokus | $K_M \cdot 10^5$ | $V_m \cdot 10^6$ | $[S]_0 \cdot 10^5$ | s.o. $\cdot 10^7$ | $k_1 \cdot 10^5$ | k_{-1} | k_2 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | $[S]_0 \cdot 10^5$ | s.o. $\cdot 10^7$ | $K_M \cdot 10^5$ | $V_m \cdot 10^6$ |
| | [M] | [M/s] | [M] | [M] | [1/(M*s)] | [1/s] | [1/s] | [M] | [M] | [M] | [M] | [M/s] |
| e250511a | 3,346 | 3,590 | 3,821 | 1,69 | 1,927 | 3,1000 | 5,6 | 0,6500 | 4,070 | 1,83 | 3,2174 | 3,6368 |
| | 2,686 | 3,242 | 4,000 | 1,90 | 2,155 | 2,5311 | 4,29 | 0,6750 | 4,000 | 2,05 | 2,3490 | 2,8931 |
| e250511b | 4,638 | 4,341 | 3,715 | 0,54 | 1,662 | 4,3124 | 6,79 | 0,6440 | 4,112 | 0,56 | 5,1894 | 4,3702 |
| | 3,146 | 3,559 | 4,000 | 1,60 | 1,976 | 3,0144 | 5,25 | 0,6790 | 4,000 | 1,76 | 3,0510 | 3,5620 |
| e300511a | 4,495 | 7,150 | 3,825 | 6,20 | 2,136 | 4,4120 | 8,66 | 0,8300 | 4,108 | 0,63 | 4,1311 | 7,1895 |
| | 2,568 | 5,341 | 4,000 | 5,20 | 2,807 | 3,144 | 6,23 | 0,8590 | 4,000 | 5,73 | 2,2401 | 5,3550 |
| e300511b | 3,340 | 3,925 | 3,802 | 0,68 | 2,006 | 3,562 | 5,850 | 0,6800 | 4,112 | 0,73 | 3,5513 | 3,9780 |
| | 2,167 | 3,234 | 4,000 | 2,60 | 2,566 | 2,698 | 4,57 | 0,7090 | 4,000 | 2,82 | 2,1029 | 3,2415 |
| e310511a | 3,720 | 3,700 | 3,911 | 0,73 | 2,045 | 3,800 | 5,97 | 0,6220 | 4,156 | 0,83 | 3,7164 | 3,7152 |
| | 2,266 | 2,957 | 4,000 | 2,30 | 2,378 | 2,330 | 4,41 | 0,6730 | 4,000 | 2,54 | 1,9596 | 2,9652 |
| e310511b | 5,351 | 18,90 | 3,863 | 1,17 | 2,901 | 6,012 | 14,65 | 1,3000 | 3,964 | 1,17 | 4,1448 | 19,0450 |
| | 7,384 | 23,50 | 4,000 | 3,05 | 2,630 | 9,147 | 18,57 | 1,2750 | 4,000 | 3,11 | 6,9559 | 23,6768 |
| e010611a | 5,343 | 18,80 | 3,940 | 1,16 | 2,889 | 6,874 | 14,57 | 1,3100 | 3,964 | 2,70 | 4,7587 | 19,0867 |
| | 7,371 | 23,47 | 4,000 | 3,05 | 2,726 | 8,994 | 19,23 | 1,2300 | 4,000 | 3,12 | 6,5984 | 23,6529 |
| e010611b | 5,084 | 29,53 | 3,946 | 0,64 | 5,914 | 8,087 | 22,41 | 1,3300 | 3,946 | 0,72 | 2,7349 | 29,8053 |
| | 8,108 | 40,59 | 4,000 | 5,03 | 3,448 | 12,354 | 27,55 | 1,5000 | 4,000 | 5,51 | 7,1659 | 41,3250 |
| e150611a | 1,721 | 16,20 | 3,973 | 1,87 | 6,809 | 3,885 | 10,90 | 1,5000 | 3,973 | 2,04 | 1,1411 | 16,3500 |
| | 2,069 | 17,50 | 4,000 | 3,12 | 6,687 | 2,216 | 11,74 | 1,5000 | 4,000 | 3,40 | 0,6628 | 17,6100 |
| e150611b | 3,337 | 23,05 | 3,880 | 1,75 | 4,873 | 4,888 | 15,55 | 1,5000 | 3,993 | 1,32 | 2,0062 | 23,3250 |
| | 3,511 | 23,69 | 4,000 | 1,85 | 4,771 | 5,147 | 15,91 | 1,5000 | 4,000 | 1,41 | 2,1576 | 23,8650 |
| průměr | 4,0826 | 13,8135 | 3,9337 | 2,3065 | 3,2653 | 5,0254 | 11,4345 | 1,0483 | 4,0199 | 2,1990 | 3,4917 | 13,9324 |

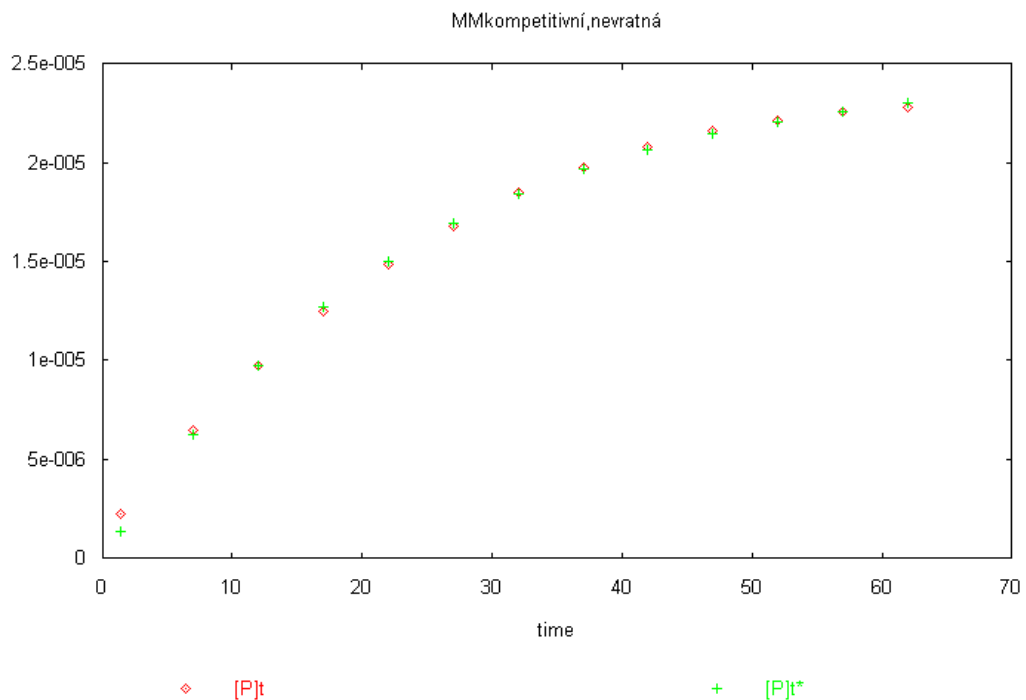
Tab. 4.9 Neinhibovaná hydrolyza ATCH pomocí BCHE, Ellmanova metoda. Popis viz předchozí text.

| ELM | model Michaelis-mentenové | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
|-------------------|---------------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|
| ATCH-BCHE | Gepasi (model: MM.gps) | | | | Gepasi (model: MM1.gps) | | | | | | | |
| pokus | $K_M \cdot 10^5$ | $V_m \cdot 10^6$ | $[S]_0 \cdot 10^5$ | s.o. $\cdot 10^7$ | $k_1 \cdot 10^5$ | k_{-1} | k_2 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | $[S]_0 \cdot 10^5$ | s.o. $\cdot 10^7$ | $K_M \cdot 10^5$ | $V_m \cdot 10^6$ |
| | [M] | [M/s] | [M] | [M] | [1/(M*s)] | [1/s] | [1/s] | [M] | [M] | [M] | [M] | [M/s] |
| e290411a | 5,4630 | 1,463 | 3,825 | 4,44 | 2,413 | 0,1003 | 13,15 | 1,128 | 3,825 | 4,84 | 5,4912 | 1,4833 |
| | 3,9610 | 1,206 | 4,000 | 5,55 | 2,691 | 0,1000 | 10,62 | 1,141 | 4,000 | 6,03 | 3,9836 | 1,2117 |
| e290411b | 3,1140 | 3,105 | 3,735 | 1,39 | 2,540 | 0,1000 | 10,30 | 1,244 | 3,735 | 1,57 | 4,0945 | 1,2813 |
| | | | 4,000 | | | | | | 4,000 | | | |
| e110511a | 6,4790 | 2,319 | 3,923 | 1,96 | 2,670 | 1,5580 | 17,86 | 1,336 | 3,923 | 2,12 | 7,2727 | 2,3861 |
| | 5,6320 | 3,545 | 4,000 | 4,49 | 2,542 | 0,2470 | 15,20 | 1,221 | 4,000 | 5,02 | 6,0767 | 1,8559 |
| e110511b | 3,2440 | 5,040 | 3,714 | 1,15 | 2,461 | 0,2449 | 12,36 | 0,900 | 3,714 | 1,45 | 5,1219 | 1,1122 |
| | 2,2560 | 3,719 | 4,000 | 2,33 | 2,610 | 0,1716 | 15,20 | 1,234 | 4,000 | 2,61 | 5,8895 | 1,8757 |
| e120511a | 1,3040 | 3,380 | 3,863 | 0,90 | 2,331 | 0,5194 | 11,20 | 1,120 | 3,863 | 0,91 | 5,0276 | 1,2544 |
| | 5,1140 | 1,719 | 4,000 | 8,06 | 2,863 | 0,1150 | 10,63 | 1,171 | 4,000 | 8,93 | 3,7531 | 1,2448 |
| e120511b | 3,9650 | 4,742 | 3,854 | 1,74 | 2,429 | 0,1368 | 11,26 | 1,223 | 3,854 | 1,85 | 4,6911 | 1,3769 |
| | 4,3680 | 3,679 | 4,000 | 2,35 | 2,510 | 0,1000 | 12,63 | 1,254 | 4,000 | 2,56 | 5,0725 | 1,5841 |
| e130511a | 5,1770 | 5,427 | 3,998 | 1,38 | 2,433 | 0,1000 | 12,41 | 1,195 | 3,998 | 1,41 | 5,1418 | 1,4830 |
| | 6,8250 | 2,455 | 4,000 | 7,06 | 2,848 | 0,1296 | 13,88 | 1,273 | 4,000 | 7,67 | 4,9191 | 1,7669 |
| e130511b | 7,1140 | 4,006 | 3,874 | 2,17 | 2,481 | 0,1000 | 11,01 | 1,223 | 3,874 | 2,30 | 4,4780 | 1,3465 |
| | 6,3250 | 5,941 | 4,000 | 2,38 | 2,421 | 0,5397 | 12,89 | 1,178 | 4,000 | 3,05 | 5,5463 | 1,5182 |
| průměr | 4,6894 | 3,4497 | 3,9241 | 3,1567 | 2,5495 | 0,2842 | 12,7065 | 1,1894 | 3,9241 | 3,4882 | 5,1040 | 1,5187 |
| prům. odchylka | 1,4152 | 1,1335 | 0,0852 | 1,8422 | 0,1246 | 0,2353 | 1,5918 | 0,0665 | 0,0852 | 2,0065 | 0,6416 | 0,2500 |

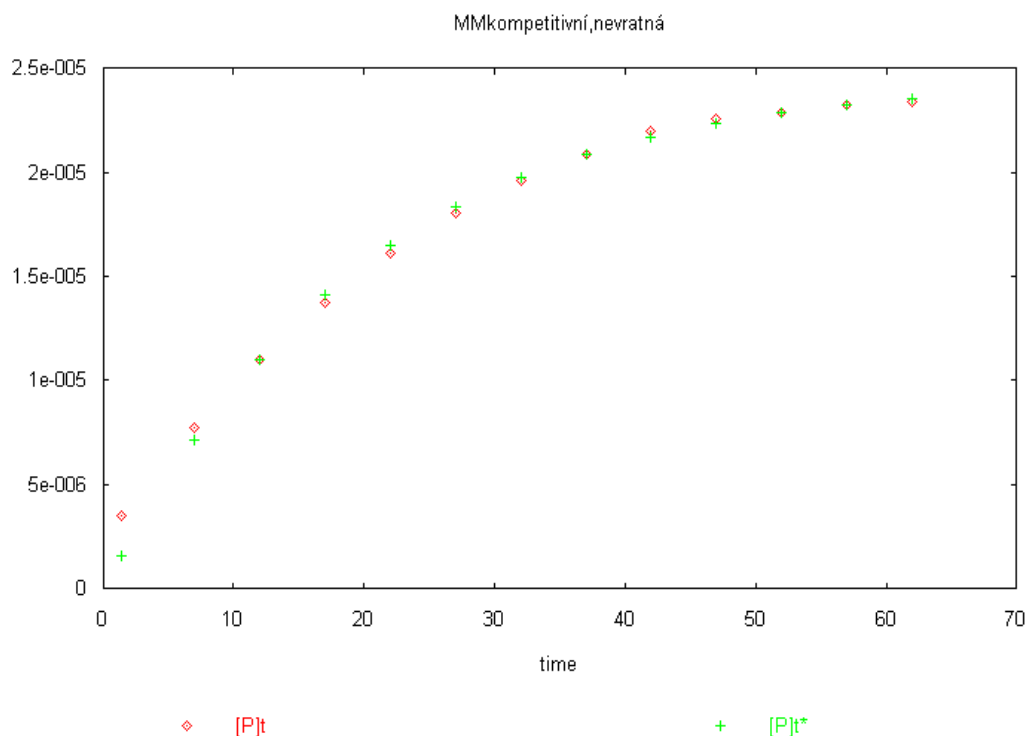
4.3 Kinetika inhibovaných reakcí

Pro všechny zmiňované varianty reakcí enzym - substrát bylo testováno dvanáct inhibitorů, přičemž bylo sledováno kinetické ovlivnění hydrolysy a také mechanismus reakce. Reakce byly provedeny oběmi zmíněnými metodami. Koncentrace inhibitoru byla volena dle jeho účinnosti tak, aby byl rozeznatelný inhibiční efekt a zároveň tak, aby reakce probíhala.

Byly vyhodnoceny grafy závislosti [HA] na t (Obr. 4.10, 4.11, 4.12, 4.13) a bylo sledováno splnění rovnice Michaelise a Mentenové v modifikaci Briggse a Haldeneho dle rovnic 2.2b byla ověřena platnost reakčního schématu kompetitivní nevratné inhibice (2.7). Potvrzením daného mechanismu byla získána hodnota rychlostní konstanty k_3 .



Obr. 4.12 Závislost $[HA]$ na čase t pro kombinaci ATCH - ACHE, měřeno Ellmanovou metodou. Přidán inhibitor č. 7 (e300511d_1). V grafu je znázorněna experimentální závislost $[HA]_t$ a teoretická (modelová) závislost $[HA]_t^*$, která se významně neliší.



Obr. 4.13 Závislost $[HA]$ na čase t pro kombinaci ATCH - BCHE, měřeno Ellmanovou metodou. Přidán inhibitor č. 5 (e290411f_1). V grafu je znázorněna experimentální závislost $[HA]_t$ a teoretická (modelová) závislost $[HA]_t^*$, která se významně neliší.

Metodou GEPASI byla získána následující data. Každý inhibitor je označen číslem, c (l) M vyjadřuje koncentraci použitého inhibitoru v květetě a popsán je datem měření. Výpočtu bylo dosaženo pomocí nelineární regrese (viz označení NL) a v případě, že inhibice probíhala daným mechanismem, byla vypočítána hodnota rychlostní konstanty k_3 . $[E]_0$ vyjadřuje optimální odhad počáteční molarity enzymu pro daný experiment a s.o. směrodatnou odchylku. Hodnoty jsou sestaveny v tab. 4.14, 4.15, 4.16 a 4.17.

Tab. 4.14 Inhibovaná hydrolysa ACH pomocí ACHE, pH-stat metoda. Popis viz předchozí text.

| inhibitor | c (l) M | PHS | | model kompetitivní nevratné inhibice | | |
|-----------|----------|----------|------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | | ACH-ACHE | graf | k_3 1/(M*s) | $[E]_0 * 10^7$ [M] | s.o.* 10^5 [M] |
| 1 | 2,40E-04 | P110112b | NL | 0,6094 | 0,6557 | 1,8602 |
| | 1,20E-04 | P110112c | NL | 1,2270 | 0,8623 | 2,6145 |
| 2 | 2,40E-04 | P090112d | NL | 0,7614 | 0,8414 | 1,7561 |
| | 1,60E-04 | P090112e | NL | 0,5373 | 0,9219 | 1,2548 |
| 3 | 8,00E-05 | P090112b | NL | 2,0740 | 1,1650 | 4,9317 |
| | 2,40E-04 | P090112c | NL | 1,0330 | 0,8980 | 1,9762 |
| 4 | 8,00E-05 | P200611c | NL | 0,7759 | 0,7426 | 2,5869 |
| | 1,20E-04 | P200611d | NL | 1,7380 | 0,6836 | 3,2204 |
| 5 | 2,40E-04 | P100112b | NL | 0,7493 | 0,5729 | 1,1680 |
| | 1,20E-04 | P100112c | NL | 1,3360 | 0,6829 | 1,6240 |
| 6 | 2,40E-04 | P100112d | NL | 0,8326 | 0,5948 | 1,6357 |
| | 1,20E-04 | P100112e | NL | 1,2960 | 0,6685 | 2,1060 |
| 7 | 2,40E-04 | P110112d | NL | 17,6700 | 0,6821 | 1,0310 |
| | 8,00E-05 | P110112e | NL | 3,5420 | 1,0660 | 2,9040 |
| 8 | 8,00E-05 | P120112b | NL | 13,7300 | 0,5148 | 2,8030 |
| | 3,50E-05 | P250511c | NL | 10,8800 | 0,8670 | 2,4941 |
| 9 | 3,50E-05 | P270511c | NL | 27,9000 | 0,9147 | 0,8081 |
| | 1,60E-05 | P270511b | NL | N | 0,9211 | 2,5288 |
| 10 | 1,60E-05 | P310511b | NL | N | 0,8203 | 2,9225 |
| | 3,50E-05 | P310511c | NL | 3,7070 | 0,7373 | 2,1938 |
| 11 | 1,60E-05 | P300511b | NL | N | 0,9175 | 2,4567 |
| | 3,50E-05 | P300511c | NL | 12,1400 | 0,6204 | 2,2325 |
| 12 | 1,60E-05 | P300511d | NL | 3,5600 | 0,8973 | 1,5520 |
| | 3,50E-05 | P300511e | NL | 12,0200 | 0,8538 | 3,2153 |

Tab. 4.15 Inhibovaná hydrolysa ACH pomocí BCHE, pH-stat metoda. Popis viz předchozí text.

| inhibitor | c (I) M | PHS | | model kompetitivní nevratné inhibice | | |
|-----------|----------|----------|------|---|---------------------------|---------------------|
| | | ACH-BCHE | graf | k_3 1/(M*s) | $[E]_0 \cdot 10^7$ [M] | s.o.* 10^5 [M] |
| 1 | 1,60E-05 | P200411d | NL | 5,9050 | 0,8372 | 0,9367 |
| | 3,20E-05 | P200411e | NL | 3,0080 | 0,7707 | 0,6246 |
| 2 | 1,60E-05 | P180511b | NL | 10,8300 | 1,0150 | 1,6056 |
| | 3,50E-05 | P180511c | NL | 5,4470 | 0,9063 | 0,5230 |
| 3 | 1,60E-05 | P130511c | NL | 9,3990 | 0,8714 | 0,2115 |
| | 3,50E-05 | P130511d | NL | 6,0820 | 0,7236 | 0,2666 |
| 4 | 1,60E-05 | P180511d | NL | 7,9200 | 1,0070 | 0,5673 |
| | 3,50E-05 | P180511e | NL | 5,5870 | 0,9303 | 0,2372 |
| 5 | 1,60E-05 | P290411b | NL | 2,7690 | 0,7338 | 1,4310 |
| | 3,20E-05 | P290411c | NL | 1,8320 | 0,6145 | 1,2022 |
| 6 | 3,20E-05 | P290411d | NL | | 0,7385 | 1,6318 |
| | 1,60E-05 | P290411e | NL | 14,4200 | 0,9927 | 0,7239 |
| 7 | 8,00E-05 | P120112b | NL | 2,6120 | 0,6211 | 0,2837 |
| | 1,20E-04 | P120112c | NL | 2,0580 | 0,5498 | 0,5192 |
| 8 | 1,60E-05 | P110511b | NL | 8,8970 | 0,9007 | 1,1371 |
| | 3,20E-05 | P110511c | NL | 6,2900 | 0,9483 | 0,8640 |
| 9 | 1,60E-05 | P110511d | NL | 16,3800 | 0,8953 | 0,4571 |
| | 3,20E-05 | P110511e | NL | 6,0580 | 0,7461 | 0,5692 |
| 10 | 1,60E-05 | P120511d | NL | 14,1800 | 0,8731 | 0,3094 |
| | 3,50E-05 | P130511b | NL | 4,1200 | 0,6491 | 0,1803 |
| 11 | 1,60E-05 | P120511b | NL | 11,1700 | 0,8505 | 0,5119 |
| | 3,20E-05 | P120511c | NL | 6,3120 | 0,8290 | 0,9057 |
| 12 | 8,00E-05 | P120112d | NL | 3,3820 | 0,6212 | 0,6203 |
| | 1,20E-04 | P120112e | NL | 3,1940 | 0,6351 | 1,0260 |

Tab. 4.16 Inhibovaná hydrolyza ATCH pomocí ACHE, Ellmanova metoda. Popis viz předchozí text.

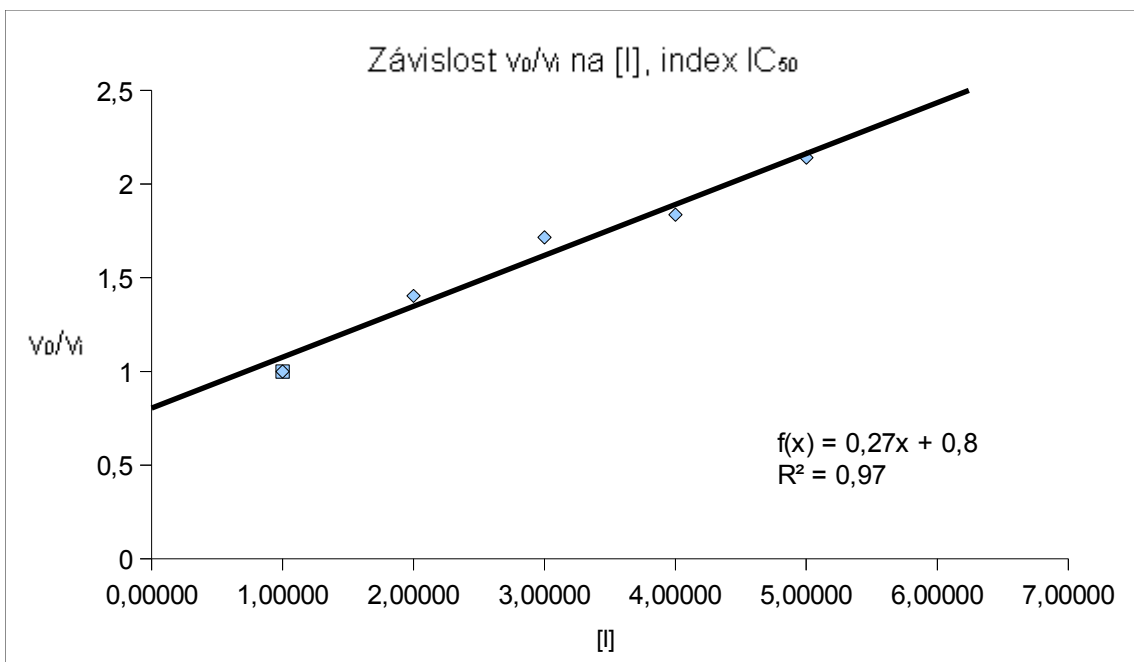
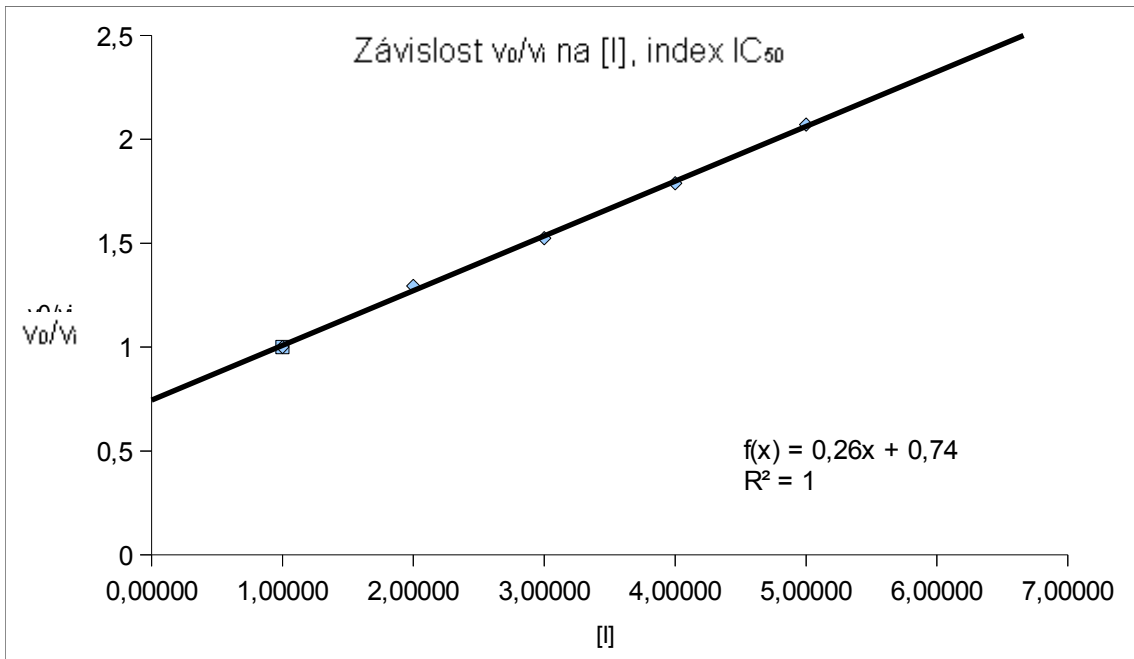
| inhibitor | c (I) M | ELM | graf | model kompetitivní nevratné inhibice | | |
|-----------|----------|------------|------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|
| | | ATCH-ACHE | | k_3 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | s.o. $\cdot 10^7$ |
| | | pokus | | $1/(M \cdot s)$ | [M] | [M] |
| 1 | 3,00E-05 | e310511f_2 | NL | 407,6 | 0,3811 | 2,36 |
| | 2,00E-05 | e310511d_2 | NL | 319,1 | 0,2415 | 3,27 |
| 2 | 3,00E-05 | e010611f_2 | NL | 148,5 | 0,3010 | 2,86 |
| | 2,00E-05 | e010611d_2 | NL | 111,4 | 0,2629 | 5,38 |
| 3 | 3,00E-05 | e010611f_1 | NL | 781,2 | 0,6977 | 1,52 |
| | 2,00E-05 | e010611d_1 | NL | 309,2 | 0,4830 | 8,86 |
| 4 | 3,00E-05 | e150611f_3 | NL | 299,4 | 0,3042 | 2,36 |
| | 2,00E-05 | e150611d_3 | NL | 289,2 | 0,2969 | 1,66 |
| 5 | 3,00E-05 | e150611f_1 | NL | 233,3 | 0,3754 | 2,75 |
| | 2,00E-05 | e150611d_1 | NL | 483,5 | 0,7410 | 4,95 |
| 6 | 3,00E-05 | e150611f_2 | NL | 550,2 | 0,4187 | 1,87 |
| | 2,00E-05 | e150611d_2 | NL | 445,2 | 0,3664 | 3,18 |
| 7 | 3,00E-05 | e300511f_1 | NL | 595,4 | 0,1090 | 1,08 |
| | 2,00E-05 | e300511d_1 | NL | 577,6 | 0,1019 | 9,46 |
| 8 | 3,00E-05 | e250511f | NL | 193,9 | 1,5300 | 1,74 |
| | 2,00E-05 | e250511d | NL | 182,7 | 0,6025 | 5,09 |
| 9 | 3,00E-05 | e300511f_3 | NL | 377,6 | 0,6198 | 5,44 |
| | 2,00E-05 | e300511d_3 | NL | 255,2 | 0,3879 | 2,68 |
| 10 | 3,00E-05 | e310511f_1 | NL | 199,3 | 0,2646 | 2,06 |
| | 2,00E-05 | e310511d_1 | NL | 138,2 | 0,2770 | 1,77 |
| 11 | 3,00E-05 | e300511f_2 | NL | 531,4 | 1,2980 | 5,84 |
| | 2,00E-05 | e300511d_2 | NL | 423,6 | 0,9907 | 6,01 |
| 12 | 3,00E-05 | e300511f_4 | NL | 228,8 | 0,7056 | 4,90 |
| | 2,00E-05 | e300511d_4 | NL | 138,2 | 0,2770 | 1,77 |

Tab. 4.17 Inhibovaná hydrolysa ATCH pomocí BCHE, Ellmanova metoda. Popis viz předchozí text.

| inhibitor | c (I) M | ELM | graf | model kompetitivní nevratné inhibice | | |
|-----------|----------|------------|------|--------------------------------------|--------------------|-------------------|
| | | ATCH-BCHE | | k_3 | $[E]_0 \cdot 10^7$ | s.o. $\cdot 10^7$ |
| | | pokus | | $1/(M \cdot s)$ | [M] | [M] |
| 1 | 3,00E-05 | e200611f_3 | NL | 818,40 | 0,6701 | 2,89 |
| | 2,00E-05 | e200611d_3 | NL | 623,30 | 0,7132 | 1,38 |
| 2 | 3,00E-05 | e130511f_1 | NL | 622,70 | 0,6036 | 1,48 |
| | 2,00E-05 | e130511d_1 | NL | 543,50 | 0,5244 | 3,45 |
| 3 | 3,00E-05 | e130511f_2 | NL | 661,90 | 0,3765 | 7,95 |
| | 2,00E-05 | e130511d_2 | NL | 565,40 | 0,3688 | 2,79 |
| 4 | 3,00E-05 | e180511f | NL | 512,50 | 0,3685 | 3,70 |
| | 2,00E-05 | e180511d | NL | 495,36 | 0,6214 | 2,58 |
| 5 | 3,00E-05 | e290411f_1 | NL | 747,60 | 1,3500 | 12,90 |
| | 2,00E-05 | e290411d_1 | NL | 645,30 | 1,1560 | 5,86 |
| 6 | 3,00E-05 | e290411f_2 | NL | 562,10 | 1,4160 | 7,98 |
| | 2,00E-05 | e290411d_1 | NL | 451,70 | 1,2350 | 5,35 |
| 7 | 3,00E-05 | e200611f_1 | NL | 344,90 | 1,0640 | 6,50 |
| | 2,00E-05 | e200611d_1 | NL | 286,60 | 1,1500 | 6,49 |
| 8 | 3,00E-05 | e110511f_1 | NL | 356,23 | 0,8523 | 2,14 |
| | 2,00E-05 | e110511d_1 | NL | 311,78 | 0,9210 | 3,65 |
| 9 | 3,00E-05 | e110511f_2 | NL | 444,88 | 0,8147 | 4,11 |
| | 2,00E-05 | e110511d_2 | NL | 399,54 | 0,8741 | 3,25 |
| 10 | 3,00E-05 | e120511f_2 | NL | 359,77 | 0,6523 | 1,52 |
| | 2,00E-05 | e120511d_2 | NL | 311,55 | 0,8825 | 2,36 |
| 11 | 3,00E-05 | e120511f_1 | NL | 435,25 | 1,3260 | 5,36 |
| | 2,00E-05 | e120511d_1 | NL | 412,78 | 1,1140 | 2,14 |
| 12 | 3,00E-05 | e200611f_2 | NL | 375,88 | 1,0140 | 5,70 |
| | 2,00E-05 | e200611d_2 | NL | 354,78 | 0,9850 | 2,31 |

4.3 Index IC₅₀

Index IC₅₀ byl stanoven modifikovanou Ellmanovou metodou. Byla vynesena grafická závislost podílu rychlostí neinhibované reakce a inhibované hydrolysy v_0/v_i vůči koncentraci přidaného inhibitoru (Obr. 4.18 a 4.19). Z parametrické rovnice takové křivky byla poté vypočítána hodnota indexu (viz tab. 4.20). Jednotlivé inhibitory jsou označeny číslem, tabulka 4.20 udává výsledek pro oba enzymové preparáty.



Obr. 4.19 Graf stanovení indexu IC_{50} pro kombinaci ATCH - BCHE při užití inhibitoru č. 2.

Tab. 4.20 Hodnoty IC_{50}

| označení | ACHE | BCHE |
|----------|----------------------|----------------------|
| 1 | $4,85 \cdot 10^{-5}$ | $4,58 \cdot 10^{-5}$ |
| 2 | $3,7 \cdot 10^{-5}$ | $4,49 \cdot 10^{-5}$ |
| 3 | $4,13 \cdot 10^{-5}$ | $3,77 \cdot 10^{-5}$ |
| 4 | $5,17 \cdot 10^{-5}$ | $2,89 \cdot 10^{-5}$ |
| 5 | $3,22 \cdot 10^{-5}$ | $2,55 \cdot 10^{-5}$ |
| 6 | $3,58 \cdot 10^{-5}$ | $5,92 \cdot 10^{-5}$ |
| 7 | $2,42 \cdot 10^{-5}$ | $6,72 \cdot 10^{-5}$ |
| 8 | $3,21 \cdot 10^{-5}$ | $3,34 \cdot 10^{-5}$ |
| 9 | $4,97 \cdot 10^{-5}$ | $3,51 \cdot 10^{-5}$ |
| 10 | $3,99 \cdot 10^{-5}$ | $3,53 \cdot 10^{-5}$ |
| 11 | $5,16 \cdot 10^{-5}$ | $2,81 \cdot 10^{-5}$ |
| 12 | $5,22 \cdot 10^{-5}$ | $7,59 \cdot 10^{-5}$ |

4.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu pro soustavu *n*-oktanol/voda

Rozhraní *n*-oktanol/voda sloužilo k simulaci hematoencefalické bariéry. Při případném testování nového léčiva je nutné, aby se jeho molekula rozpouštěla ve vodném prostředí a zároveň je důležité, aby byla schopná prostoupit hematoencefalickou bariéru. Se zvyšující se hodnotou koeficientu roste schopnost molekul inhibitoru procházet skrz toto lipofilní rozhraní. K vypočítání hodnot rozdělovacího koeficientu bylo užito vzorce 3.6. Hodnoty koeficientu K_{ow} udává tab. 4.21.

Tab. 4.21 Rozdělovací koeficient

| označení | K_{ow} |
|----------|----------|
| 1 | 4,21 |
| 2 | 4,26 |
| 3 | 3,69 |
| 4 | 7,26 |
| 5 | 4,56 |
| 6 | 2,43 |
| 7 | 4,86 |
| 8 | 4,77 |
| 9 | 4,61 |
| 10 | 5,48 |
| 11 | 5,8 |
| 12 | 2,91 |

5 Diskuse

Všechny uskutečněné inhibované i neinhibované hydrolysy byly testovány na platnost rovnice Michaelise a Menteové. V případě, kdy byly podmínky této rovnice splněny mohlo být přikročeno k výpočtu jednotlivých kinetických parametrů studovaných hydrolyz a za těchto podmínek na základě naměřených dat bylo možné provést zhodnocení práce.

Výsledné hodnoty Ellmanovy metody se jen velmi obtížně porovnávají s výsledky získanými z pH-statu. Přeměnu ACH není možné měřit Ellmanovou metodou, jelikož jeho reakce s DTNB neposkytuje barevný produkt. Naopak v případě užití substrátu ATCH nelze za daných podmínek měřit pH-statem, jelikož jeho hydrolysa probíhá pouze v úzkém rozmezí pH, které v případě Ellmanovy reakce zajišťuje fosfátový pufr, zatímco při pH-statové metodě je prováděna titrace silným louhem.

Přes rozdílnosti obou metod a rozdílnosti ve schopnostech katalýzy obou enzymů, daných strukturou jejich aktivního místa bylo možné sledovat a vyhodnotit určité trendy.

5.1 Neinhibované reakce

- Nebyly pozorovány významné rozdíly mezi experimentálními hodnotami K_M a V_M a těmito parametry vypočítanými z optimálních kinetických konstant, což znamená, že reakce za daných podmínek probíhala dle kinetického modelu Michaelise a Menteové.
- Ze získaných výsledků je patrné, že za katalýzy cholinesterasami je hydrolysa ATCH rychlejší než hydrolysa ACH.
- Pomocí PC programu GEPASI byla vypočítána hodnota počáteční koncentrace enzymu v reakční směsi $[E_0]$.

5.2 Inhibované reakce

- Také všechny inhibované reakce byly testovány na platnost rovnice Michaelise a Mentenové, přičemž všechny provedené reakce splňovaly podmínky tohoto modelu.
- Byl testován způsob inhibice jednotlivých inhibitorů, přičemž bylo ověřeno, že ve většině případů mechanismus odpovídá nevratné kompetitivní inhibici, při kterém docházelo k nevratnému rozpadu komplexu enzym - inhibitor. V případě užití Ellmanovy metody byl model kompetitivní nevratné inhibice splněn pro všechny inhibované hydrolysy, v případě užití pH-statů byl model splněný pro všechny inhibované hydrolysy, kromě reakcí s přítomností inhibitorů 9, 10 a 11 kombinace ACH - ACHE a také reakce s přítomností inhibitoru 6 kombinace ACH - BCHE.
- Všechny křivky závislosti $[HA]$ na čase t jsou nelineární (NL), konvergují k limitní hodnotě, což odpovídá jejich teoretickému průběhu.
- O rychlosti inhibice vypovídá kvantitativní inhibiční konstanta k_3 , která udává rychlost, se kterou se váže daný inhibitor na konkrétní enzym. Inhibitory 1-6 obsahovaly jako R1 substituent L-Leucin (L-Leu), inhibitory 7-12 obsahovaly ve stejné poloze molekulu L-Fenylalaninu (L-Phe). Obě skupiny těchto inhibitorů obsahovaly dále, jako R2 substituenty, molekuly alkanů. Molekuly inhibitorů byly řazeny dle molekulové hmotnosti.
- Nebyl zjištěn žádný významný trend mezi konstantou k_3 a molekulovou hmotností inhibitoru.
- Pro pH-statovou metodu byly účinnější inhibitory, které obsahovaly L-Phe jako R1 substituent a to v případě účinku na oba studované enzymy. Největší inhibiční účinnost měl, v případě užití obou enzymů, inhibitor č. 9, který měl nejvyšší hodnotu inhibiční konstanty k_3 .
- Při pH-statové metodě byly pozorovány vyšší účinnosti inhibice leucinových inhibitorů na enzym BCHE, zatímco fenylalaninové lépe inhibovaly enzym ACHE.
- Pro Ellmanovu metodu byly účinnější inhibitory, které obsahovaly L-Leu jako R1 substituent a to v případě účinku na oba studované enzymy.

- V případě užití Ellmanovy metody byly změřeny vyšší hodnoty k_3 pro enzymový preparát BCHE téměř všech měřených inhibitorů. Lepší inhibiční účinky pro ACHE, než BCHE dosahovaly pouze inhibitory 7 a 11.
- V případě užití Ellmanovy metody se snižující se koncentrací inhibitoru klesá i hodnota inhibiční rychlostní konstanty k_3 , v případě metody pH-stat většinou hodnota konstanty k_3 se snižující se koncentrací inhibitoru roste.
- Nelze porovnat výsledné hodnoty získané pH-statem s výsledky, jichž bylo dosaženo Ellmanovou metodou. Obě metody se liší především způsobem udržení stálého pH v průběhu reakce, při Ellmanově metodě je užití pufru a v pH-statové metodě dochází k titraci vznikající kyseliny silným louhem. Inhibiční konstanta k_3 je v případě Ellmanovy metody cca o dva řády vyšší, než v případě pH-statové metody.

5.3 Index IC_{50}

V případě užití inhibitorů se substituentem L-Phe v R1 poloze byl pro enzym ACHE pozorován trend, kdy s rostoucí velikostí alkylového zbytku rostla i velikost IC_{50} a tím klesala účinnost inhibice. Aktivní místo ACHE má menší rozměry, než je tomu v případě enzymu BCHE, tudíž by zde mohla být souvislost s obtížnějším pronikáním větších molekul do menšího aktivního místa. V případě ostatních inhibicí žádný podobný významný trend pozorován nebyl.

Dle hodnoty IC_{50} se jeví být nejméně účinným inhibitorem látka č. 12 a to v případě účinku na oba studované enzymy. ACHE byla silně inhibována látkami č. 7, 8 a 5 v tomto pořadí a pro BCHE byly látkami se silnými inhibičními vlastnostmi sloučeniny 5, 11 a 4 v tomto pořadí.

Všechny hodnoty indexu IC_{50} ležely v relativně úzkém intervalu v řádech 10^{-5} , viz tab. 4.20.

5.4 Rozdělovací koeficient K_{OW}

Koeficient K_{OW} sloužil k představě o rozpustnosti daného inhibitoru v závislosti na polaritě rozpouštědla. Čím vyšší hodnota K_{OW} , tím více se látka rozpouští v lipofilním prostředí a obráceně, s klesající hodnotou K_{OW} roste rozpustnost v iontových roztocích.

Rozpustnost v iontovém prostředí je podstatná z důvodu orálního podávání případného léčiva a tím i rozpustnosti v krvi, jakožto transportním médiu, zatímco rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech je důležitá z hlediska prostoupení hematoencefalickou bariérou a tím pádem účinností v mozkové tkáni. Pro případné farmaceutické použití v léčbě mozkových onemocnění je tedy důležitý amfifilní charakter molekuly inhibitoru.

Všechny inhibitory měly relativně vysoké hodnoty K_{OW} , z čehož lze usuzovat, že by mohly mít vyšší afinitu k hematoencefalické bariéře. Nejvyšší hodnotu K_{OW} měla z testovaných látek sloučenina č. 4.

6 Závěr

Pomocí dvou nezávislých metod (Ellmanova metoda, pH-stat) byl ověřován kinetický model neinhibovaných a inhibovaných hydrolyz, v případě inhibovaných reakcí byl ověřován mechanismus inhibice, zda se jedná o kompetitivní ireversibilní inhibici. Testováno bylo dvanáct sloučenin na bázi benzothiazolů.

Účinnost inhibitorů byla dále posuzována také na základě indexu IC_{50} a testována byla i rozpustnost jednotlivých látek, která byla popsána hodnotou rozdělovacího koeficientu K_{ow} .

Z výsledku měření plyne, že velmi účinnými inhibitory CHE byly látky č. 5 (L-Leu/Bu) a 9 (L-Phe/Pro). Tyto látky mají vysoký inhibiční účinek při nízké koncentraci a zároveň by mohly snadno prostupovat hematoencefalickou bariérou, což naznačují výsledky K_{ow} a tudíž by bylo vhodné jejich další testování ohledně léčby demencí.

7 Seznam užité literatury

- [1] Jan, KONVALINKA a Jana, PEICHOVÁ. Neurodegenerace: aneb špatně sbalené a špatně rozštěpené proteiny. *Vesmír*. Praha: Euromedia Group, 2002, č. 1, s. 11-16.
- [2] Jiří, BAJGAR, Jiří, KASSA, Miroslav, POHANKA, Jana, Žďárová KARASOVÁ, Ladislav, NOVOTNÝ, Josef, FUSEK a Václav, BLÁHA. Inhibition of blood and tissue cholinesterases by soman in guinea pigs *in vivo*. *Journal of applied biomedicine online publ. by the Faculty of Health and Social Studies, University of South Bohemia*. 2011, č. 9. ISSN 1214-0287. DOI: 10.2478/v10136-009-0030-8.
- [3] Gabriel, ROSENBLUM, Chunlai, CHEN, Jaskiran, KAUR, Xiaonan, CUI, Yale, E. GOLDMAN a Barry, S. COOPERMAN. Real-time assay for testing components of protein synthesis. *Nucleic Acids Research*. 2012, s. -. ISSN 0305-1048. DOI: 10.1093/nar/gks232. Dostupné z: <http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gks232>
- [4] Peter, KARLSON. *Základy biochemie*. 3. vyd. Praha: Academia, 1981. 504 s. 88 - 109, ISBN 104-21-852.
- [5] Zdeněk, VODRÁŽKA. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002. 181 s. 120 - 157, ISBN 978-80-200-0600-4.
- [6] NORD. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. New York: Interscience Publishers, 1969. ISBN 47064961.
- [7] Arnošt, KOTYK a Jaroslav, HORÁK. *Enzymová kinetika*. Praha: Academia, 1974. 364 s
- [8] Daniel, PURICH. *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism: Reliable Lab Solutions*. London: Academic Press, 2009. ISBN 978-0-12-379608-1.
- [9] Sergio, ARMENTA a Marcelo, BLANCO. Ion mobility spectrometry: A valuable tool for kinetic studies in enzymology. *Analytica Chimica Acta*. 2011-01-24, roč. 685, č. 1, s. 1-8. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2010.10.025.
- [10] Cecilia, BARTOLUCCI, Jure, STOJAN, Yu, QIAN-SHENG, Dorian, LAMBA a Nigel, GREIG. Kinetics of Torpedo californica Acetylcholinesterase Inhibition by Bisnorcymserine and Crystal Structure of the Complex with its Leaving Group. *Biochemical Journal Immediate Publication*. 2012, 1 - 20. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/imps/pdf/BJ20111675.pdf>
- [11] Otomar, KITTNAR. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011, 790 s. ISBN 978-802-4730-684.
- [12] František, VYSKOČIL. Acetylcholin hodný a zlý. *Vesmír*. 2009, č. 3. Dostupné z: <http://vesmir.cz/clanek/acetylcholin-hodny-a-zly>
- [13] Věra, KLENEROVÁ a Sixtus, HYNIE. Existuje vztah mezi stresem, pamětí a silnými emocemi, jako jsou obavy a strach?. *Československá fyziologie*. 2007, roč. 56, č. 3. Dostupné z: <http://neurofarm.lf1.cuni.cz/teaching/2007/Existuje.pdf>

[14] Pavel, VERNER. Porovnání účinnosti a vedlejších účinků anticholinergik při léčbě OAB. *Urologie pro praxi*. 2010, č. 11.

[15] [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: http://thebrain.mcgill.ca/flash/a/a_06/a_06_m/a_06_m_mou/a_06_m_mou.html

[16] Jaroslav, RACEK. *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN 80-726-2324-9.

[17] Arnaud, CHATONNET a Oksana, LOCKRIDGE. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J*. 1989, č. 6. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138724/>

[18] Ayşe, NEŞE, Çokuğraş. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Türk biyokimya dergisi Turkish journal of biochemistry*. 2003, 54 - 61. ISSN 1303-829x. Dostupné z: http://www.turkjbiochem.com/2003/054_061.pdf

[19] ABOU-DONIA. Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity. *Archives of Environmental Health*. Dostupné z: <http://www.mindfully.org/Pesticide/2003/Organophosphorus-Neurotoxicity1aug03.htm>

[20] Reinaldo, T. DELFINO, José, D. FIGUEROA-VILLAR a Tatiana, S. RIBEIRO. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009, č. 3. ISSN 0103-5053. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532009000300003&script=sci_arttext

[21] Jiří, PATOČKA. Kdo syntetizoval první organofosfátový inhibitor acetylcholinesterasy?. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, č. 3, s. 126-128.

[22] Arie, ORDENTLICH, Dov, BARAK, Chanoch, KRONMAN, Naomi, ARIEL, Yoffi, SEGALL, Baruch, VELAN a Avigdor, SHAFFERMAN. The Architecture of Human Acetylcholinesterase Active Center Probed by Interactions with Selected Organophosphate Inhibitors. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1996, č. 1.

[23] Růžena, PAVLÍKOVÁ, Jan, MAREK, Kamil, MUSÍLEK, Josef, FUSEK, Kamil, KUČA a Jana, ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ. NOVÉ BISKVARTERNÍ INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY JAKOŽTO PROFYLAKTIKA PŘI OTRAVĚ ORGANOFOSFÁTŮ. *VOJENSKÉ ZDRAVOTNICKÉ LISTY*. 2010, č. 2.

[24] Kamil, KUČA, Daniel, TAE-HYUK, Jiří, CABAL a Jun, YOUNG-SIK. In vitro Evaluation of New Acetylcholinesterase Reactivators as Casual Antidotes against Tabun and Cyclosarin. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2006, č. 3, s. 395-398.

[25] Zuzana, KRŠKOVÁ, Jan, MARTIN a Jaroslav, DUSEK. The inhibition activity of selected beta-carboline alkaloids on enzymes of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Česká a slovenská farmacie*. 2011, č. 3, s. 125-131.

[26] Jennifer, M., BUI, Zoran, RADIC, Palmer, TAYLOR a J. Andrew, MCCAMMON. Conformational Transitions in Protein-Protein Association: Binding of Fasciculin-2 to Acetylcholinesterase. *Biophysical Journal*. 2006, roč. 90, č. 9, s. 3280-3287. ISSN 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.105.075564.

[27] NURULAIN, SM. Efficacious Oxime for Organophosphorus Poisoning: A Minireview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2011-07-14, roč. 10, č. 3, s. -. ISSN 1596-9827. DOI: 10.4314/tjpr.v10i3.10. Dostupné z: http://hermes.ajol.info/home/ajolco/public_html/tools/index.php/index/article/view/67946

[28] Pavla, ZDRAŽILOVÁ, Šárka, ŠTĚPÁNKOVÁ, Karel, KOMERS, Karel, VENTURA a Alexander, ČEGAN. Comparison of Index pI50 of New Cholinesterase Inhibitors with Rivastigmine and Galanthamine. Dostupné z: <http://www.eurostar-science.org/conferences/abstrsph7/zdrazilova.pdf>

[29] Zdeněk, FIŠAR a Radoslav, KRULÍK. Buněčné membrány a jejich interakce s antidepresivy. *Biologické listy*. 1995, 81 - 93.

[30] Pavel, KLOUDA. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.

[31] [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.gepasi.org/>

[32] Ümide, DEMIR-ÖZKAY a Özgür, Devrim, CAN. Acetylcholinesterase inhibitory effects of some benzothiazole-piperazine derivates. *Eskişehir*. 2009.

[33] Richard, KROMBHOLZ. Nejčastější demence a jejich léčba. *Neurologie pro praxi*. 2011, č. 12, s. 196-200.

[34] Roman, JIRÁK a Jaroslava, LAŇKOVÁ. Demence: Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. 2007, s. 1-9. Dostupné z: http://svl.cz/Files/nastenka/page_4766/Version1/Demence.pdf

[35] Irena, REKTOROVÁ. Terapie demencí. *Neurologie pro praxi*. 2002, č. 4, s. 260-263.

[36] Anna, STRUNECKÁ. Včasná léčba demence se vyplatí. *Medical tribune*. 2010, č. 2.

[37] Martin, VALIŠ a Dita, KALNICKÁ. Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi*. 2011, č. 12, s. 33-35.

[38] [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.aan.com/>

[39] Rupert, MCSHANE a Denise, TAYLOR. Drug treatments for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Society*. 2011.

[40] Yuen-Shan, HO, Kwok-Fai, SO a Raymond, CHANG. Drug discovery from Chinese medicine against neurodegeneration in Alzheimer's and vascular dementia. *Chinese Medicine*. 2011, roč. 6, č. 1, s. 15-. ISSN 1749-8546. DOI: 10.1186/1749-8546-6-15.

[41] Roman, JIRÁK, Iva, HOLMEROVÁ a Claudia, BORZOVÁ. *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 164 s. ISBN 978-802-4724-546.

- [42] Irena, REKTOROVÁ a Jan, ROTH. Demence s Lewyho tělísky a demence u Parkinsonovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2010, č. 11, s. 351-354. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2010/05/18.pdf>
- [43] Jiří, KONRÁD. Demence s Lewyho tělísky, diagnostika, klinický význam, možnosti léčby, kazuistika. *Psychiatrie pro praxi*. 2004, č. 1, s. 9-11.
- [44] Radka, KOBZANOVÁ. Myasthenia gravis. *Medireport*. 2011, č. 7, s. 28-29.
- [45] Peter, ŠPALEK. Myasthenia gravis. *Cesk Slov Nerol N*. 2008, č. 1, s. 7-24. Dostupné z: http://www.myastheniagravis.cz/images/nn_08_01_01.pdf
- [46] Jiří, PÍTHA. Myasthenia gravis na prahu 3. tisíciletí. *Postgraduální medicína*. 2002, č. 2, s. 189-200. Dostupné z: http://www.myastheniagravis.cz/images/mg_postgradual.pdf
- [47] Stanislav, VOHÁŇKA. Farmakoterapie myasthenia gravis. *Neurologie pro praxi*. 2010, č. 11. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2010/02/06.pdf>
- [48] [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://www.glaukom.cz/kategorie.asp?idk=133>
- [49] Andrej, ČERNÁK, Martin, ČERNÁK a Erika, VODRÁŽKOVÁ. Glaukóm – zelený zákal. *Via Practica*. 2008, roč. 5, 7/8, s. 314-318. Dostupné z: <http://www.solen.sk/pdf/4d476341f488b44c64a1d84639865c06.pdf>
- [50] [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://glaucoma.com/>
- [51] H. Leopold, IRVING, Narendra, KRISHNA a Robert, A. LEHMAN. The effects of anticholinesterase agents on the blood cholinesterases levels of normal and glaucoma subjects. *The American ophthal society*. 1959, č. 57.
- [52] Jana, ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Kamil, KUČA, Daniel, JUN a Jiří, BAJGAR. Užití ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104, s. 46-50. ISSN 0009-2770.
- [53] Miroslav, POHANKA, Vítězslav, VLČEK, Jana, ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Kamil, KUČA a Jiří, CABAL. Kolorimetrické detektory založené na acetylcholinesterase a jejich konstrukce. *Vojenské zdravotnické listy*. 2010, č. 1, s. 9-14.
- [54] Radka, MOURA a Ana, Luísa, SIMPLÍCIO. Electrophoretically mediated microanalysis for the evaluation of interspecies variation in cholinesterase metabolism. *ELECTROPHORESIS*. 2010, roč. 31, č. 14, s. 2374-2376. ISSN 01730835. DOI: 10.1002/elps.200900769.
- [55] Linus, T.-H., KAO, Hung-Yi, HSU a Miklós, GRATZL. Reagentless pH-stat for Microliter Fluid Specimens. *Analytical Chemistry*. 2008, roč. 80, č. 11, s. 4065-4069. ISSN 0003-2700. DOI: 10.1021/ac800161y.

| | |
|---------------|--|
| Název práce | Studium kinetiky a mechanismu inhibice cholinesteras inhibitory na bázi benzothiazolů |
| Autor práce | Bc. Ondřej Hejnar |
| Obor | Analýza biologických materiálů |
| Rok obhajoby | 2012 |
| Vedoucí práce | Mgr. Šárka Štěpánková, PhD. |
| Anotace | Byly studované kinetické konstanty neinhibovaných a inhibovaných enzymatických hydrolyz acetylcholinu a acetylthiocholinu. Dále byly stanoveny hodnoty indexu IC_{50} a rozdělovacího koeficientu K_{OW} studovaných inhibitorů. |
| Klíčové slova | Cholinesterasy, inhibitory cholinesteras, enzymová kinetika, Alzheimerova choroba |