

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Vliv aktivity enzymu na inhibiční účinnost vybraných inhibitorů

Bc. Adéla Špásová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

The effect of enzyme activity on inhibitory efficiency of selected inhibitors

Adéla Špásová

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Špášová**
Osobní číslo: **C16464**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Vliv aktivity enzymu na inhibiční účinnost vybraných inhibitorů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši na téma "cholinesterázy a jejich inhibitory".
2. Popsat strukturu, funkci a mechanismus katalytického působení cholinesteráz a možnosti ovlivnění jejich aktivity na různých úrovních.
3. Shrnout poznatky o Alzheimerově chorobě se zaměřením na nové možnosti léčiv.

Experimentální část:

1. V první části stanovit aktivitu acetylcholinesterázy.
2. Stanovit inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů ze skupiny bispyridiniových solí, a to při různých aktivitách enzymu.
3. Stanovit typ inhibice a výsledky porovnat se standardními látkami.
4. Vypočítat kinetické parametry.
5. Stanovit rozdělovací koeficient v systému n-oktanol:voda.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Katarína Vorčáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

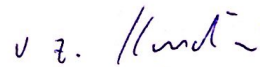
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 3. 5. 2018

Bc. Adéla Špášová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat své vedoucí práce Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a odborné rady při práci v laboratoři i při zpracování této diplomové práce. Mé díky patří rovněž Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za pomoc při psaní této teze. Nakonec bych chtěla poděkovat i své rodině, která mě plně podporovala po celou dobu mého studia.

SOUHRN

Acetylcholinesteráza je enzym, jenž hraje důležitou roli v ukončení přenosu nervového vzruchu prostřednictvím hydrolyzy acetylcholinu. Porucha přenosu signálu pomocí tohoto neuromediátoru může být příčinou mnohých onemocnění. Proto je v takovém případě nutno zamezit jeho rozkladu, k čemuž lze využít inhibitory cholinesteráz, vystupující tedy jako léčiva. Inhibitory cholinesteráz se mimo jiné používají i jako pesticidy či dokonce chemické bojové prostředky.

Ve své práci jsem se zaměřila na testování inhibičního účinku vybraných inhibitorů acetylcholinesterázy. Sledováním poklesu aktivity enzymu byla stanovena inhibiční koncentrace, kinetické parametry enzymatické reakce, míra a typ inhibice, a to pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody. Pro inhibitory byly vypočteny hodnoty rovnovážné disociační konstanty, rozdělovací koeficient a polární povrchová plocha molekuly. Kinetické parametry a typ inhibice byly vyhodnoceny pomocí grafického znázornění dle Lineweavera a Burka a dle Dixona.

KLÍČOVÁ SLOVA

acetylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, inhibitory, kinetické parametry

SUMMARY

Acetylcholinesterase is an enzyme which plays an important role in ending the transmission of nerve impulse by hydrolysis of acetylcholine. Failure of transmission signal with this neuromediator may be the cause of many illnesses. Therefore, in this case it is necessary to prevent its decomposition, for which the cholinesterase inhibitors can be used as drugs. Cholinesterase inhibitors are also used as pesticides or even chemical weapons.

I focused on testing the inhibitory effect of selected acetylcholinesterase inhibitors in this thesis. By monitoring the decrease in enzyme activity the inhibitory concentration, kinetic parameters of the enzymatic reaction, rate and type of inhibition were determined by spectrophotometric Ellman's method. Values of equilibrium dissociation constant, partition coefficient and polar surface area of the molecule were calculated for all of inhibitors. Kinetic parameters and type of inhibition were evaluated using Lineweaver-Burk and Dixon graphical addictions.

KEYWORDS

acetylcholinesterase, Alzheimer's Disease, inhibitors, kinetic parameters

SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease)
APP	amyloidní prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein)
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesteráza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CE-1, 2, 3	karboxylesteráza-1, 2, 3
ChEs	cholinesterázy
DMSO	dimethylsulfoxid
DN	dibukainové číslo (Dibucaine Number)
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina
E	enzym
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva
I	inhibitor
IC ₅₀	střední inhibiční koncentrace
IU	mezinárodní jednotka (International Unit)
K _i	rovnovážná disociační konstanta
K _M	Michaelisova konstanta
K _{ow}	rozdělovací koeficient
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
P	produkt
PAS	periferní aniontové místo (Peripheral Anionic Site)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PSA	polární povrchová plocha molekuly (Polar Surface Area)
PSEN-1, 2	gen pro presenilin 1, 2 (Presenilin Gene-1, 2)
S	substrát
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
tPSA	topologická polární povrchová plocha molekuly (Topological Polar Surface Area)
UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast světla
V _{max}	mezní (limitní) rychlost

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 Závislost aktivity enzymu na pH.....	18
Obr. č. 2 Saturační křivka.....	20
Obr. č. 3 Stanovení IC_{50}	23
Obr. č. 4 3D struktura AChE z bakterie <i>Acidaminococcus fermentans</i>	28
Obr. č. 5 3D struktura BChE z parejnoka kalifornského.....	29
Obr. č. 6 Mechanismus Ellmanovy metody	31
Obr. č. 7 Obecná struktura biologicky aktivního karbamátu.....	36
Obr. č. 8 Obecný strukturní vzorec organofosfátů.....	39
Obr. č. 9 Schéma inhibice acetylcholinesterázy organofosfátem	40
Obr. č. 10 Příklad vyhodnocení aktivity enzymu (závislost absorbance na čase).....	51
Obr. č. 11 Vyhodnocení inhibiční účinnosti testovaného inhibitoru č. 8.....	53
Obr. č. 12 Závislost IC_{50} na aktivitě enzymu (pro inhibitor č. 1, 3 a 5).....	55
Obr. č. 13 Příklad stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,2 U.....	56
Obr. č. 14 Stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,1 U.....	57
Obr. č. 15 Stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,05 U.....	57
Obr. č. 16 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 8 dle Lineweavera a Burka (0,1 U)....	59
Obr. č. 17 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 8 dle Dixona (0,1 U).....	60
Obr. č. 18 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 5 dle Lineweavera a Burka (0,1 U)....	61
Obr. č. 19 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 5 dle Dixona (0,1 U).....	62
Obr. č. 20 Určení typu inhibice AChE rivastigminem dle Lineweavera a Burka (0,1 U).....	63
Obr. č. 21 Určení typu inhibice AChE rivastigminem dle Dixona (0,1 U).....	63
Obr. č. 22 Určení typu inhibice AChE galantaminem dle Lineweavera a Burka (0,1 U).....	64
Obr. č. 23 Určení typu inhibice AChE galantaminem dle Dixona (0,1 U).....	64

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 Přehled testovaných inhibitorů	44
Tab. č. 2 Výpočet objemu enzymu v reakční směsi.....	52
Tab. č. 3 Příklad výpočtu IC_{50} pro inhibitor 8	53
Tab. č. 4 Výsledky inhibiční koncentrace bispyridiniových solí pro aktivitu acetylcholinesterázy 0,2 U, 0,1 U a 0,05 U.....	54
Tab. č. 5 Příklad výpočtu kinetických parametrů K_M a V_{max}	58
Tab. č. 6 Výsledky kinetických parametrů K_M a V_{max} pro všechny testované aktivity AChE	58
Tab. č. 7 Výpočet hodnot K_M a V_{max} pro inhibitor č. 8	60
Tab. č. 8 Vypočítané hodnoty K_i jednotlivých inhibitorů	65
Tab. č. 9 Hodnoty rozdělovacího koeficientu v logaritmicke formě pro testované inhibitory	66
Tab. č. 10 Vypočtené hodnoty tPSA	67

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Enzymy	16
1.1.1 Aktivita enzymu	16
1.1.2 Kinetika enzymatických reakcí	19
1.1.3 Inhibice enzymů	21
1.1.3.1 Kompetitivní inhibice.....	21
1.1.3.2 Nekompetitivní inhibice.....	22
1.1.3.3 Akompetitivní inhibice.....	22
1.1.3.4 Smíšená inhibice	22
1.1.4 Index IC ₅₀ , rovnovážná konstanta K _i	22
1.2 Esterázy.....	24
1.3 Cholinergní systém	25
1.4 Cholinesterázy.....	26
1.4.1 Struktura cholinesteráz.....	26
1.4.2 Acetylcholinesteráza	27
1.4.2.1 Struktura	27
1.4.2.2 Funkce acetylcholinesterázy.....	28
1.4.3 Butyrylcholinesteráza	28
1.4.3.1 Druhy butyrylcholinesteráz	30
1.4.4 Stanovení aktivity cholinesteráz.....	30
1.4.4.1 Ellmanova metoda.....	31
1.4.4.2 Elektrochemická detekce.....	31
1.5 Alzheimerova choroba	32
1.5.1 Příznaky.....	32
1.5.2 Příčiny	32
1.5.3 Diagnostika.....	33
1.5.4 Terapie	33
1.6 Inhibitory cholinesteráz	34

1.6.1	Reverzibilní inhibitory	34
1.6.2	Pseudo-ireverzibilní inhibitory (karbamáty)	36
1.6.3	Přírodní alkaloidy s anti-AChE aktivitou.....	37
1.6.4	Další přírodní látky s anti-AChE aktivitou	38
1.6.5	Ireverzibilní inhibitory AChE.....	39
1.6.5.1	Organofosfáty	39
2	CÍL PRÁCE	42
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1	<i>Přístrojová technika a pomůcky</i>	43
3.2	<i>Chemikálie a látky</i>	43
3.3	<i>Metody</i>	45
3.3.1	Stanovení aktivity enzymu.....	45
3.3.2	Stanovení IC ₅₀	45
3.3.3	Stanovení kinetických parametrů	47
3.3.4	Stanovení typu inhibice.....	47
3.3.5	Stanovení rovnovážné disociační konstanty	48
3.3.6	Stanovení rozdělovacího koeficientu (K _{ow})	49
3.3.7	Stanovení molekulární polární povrchové plochy (PSA)	49
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	51
4.1	<i>Stanovení aktivity enzymu</i>	51
4.1.1	Výpočet aktivity enzymu	51
4.1.2	Výpočet objemu enzymu v reakční směsi.....	51
4.2	<i>Stanovení IC₅₀</i>	52
4.2.1	Výpočet IC ₅₀	53
4.3	<i>Stanovení kinetických parametrů</i>	56
4.3.1	Výpočet kinetických parametrů K _M , V _{max}	58
4.4	<i>Stanovení typu inhibice</i>	58
4.5	<i>Stanovení rovnovážné disociační konstanty</i>	65
4.6	<i>Stanovení rozdělovacího koeficientu</i>	66

4.7	<i>Stanovení polární povrchové plochy</i>	67
5	ZÁVĚR	69
6	ZDROJE	70

ÚVOD

Nejčastější příčinou demence je v současné stárnoucí populaci Alzheimerova choroba (AD). Zákeřnost nemoci spočívá v doposud zcela neobjasněném mechanismu patogeneze. Je sice známo mnoho rizikových faktorů, které v kombinaci s určitými patologickými procesy či genetickými mutacemi mohou vyvolat počátek nemoci, ale konkrétní marker k definitivní diagnóze prozatím nebyl objeven. Další problém nastává při snaze o terapii AD, a to i přes pokroky ve farmakoterapii, které bortí představu o nevléčitelnosti tohoto onemocnění [1, 2].

Správná funkce ChEs je nezbytná pro životně důležité procesy v organismu. Napomáhají regulovat ukončení cholinergní neurotransmise, jejíž porucha je hlavním patologickým procesem při AD, a signální transdukce, mají protizánětlivé účinky a jiné aktivity. Porucha těchto enzymů provází mnohé patologie, kromě AD např. i Parkinsonovu nemoc, úzkostné stavy, ischemické mrtvice či kardiovaskulární a autoimunitní onemocnění [1, 2].

Průlomovou technikou stanovení aktivity ChEs je dodnes využívaná spektrofotometrická Ellmanova metoda. Při ní se aktivita enzymu měří nepřímo skrze koncentraci iontů kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), vzniklých v reakci Ellmanova činidla s thiocholinem [3].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Enzymy

Hlavní funkcí enzymů je zvýšit míru reakcí probíhajících v živých organismech. Většina těchto reakcí pro svůj průběh potřebuje optimální podmínky (určité pH, teplotu, tlak apod.), avšak buňka všechny tyto podmínky nesplňuje. K uskutečnění biologických reakcí tedy slouží enzymy. Pokud je enzym tvořen pouze bílkovinou, označuje se jako jednoduchý enzym. Kromě bílkovinné složky však může obsahovat i nebílkovinnou část a v takovém případě se jedná o složený enzym neboli holoenzym. Bílkovinná část se nazývá apoenzym, zatímco ta nebílkovinná kofaktor. Apoenzym přitom rozhoduje o substrátové specifitě, tzn., která látka se přemění a která nikoliv. Podle typu katalyzovaných reakcí se enzymy dělí do 6 tříd:

- oxidoreduktázy – účastní se intermolekulových redoxních reakcí, tedy přenosu atomu vodíku nebo elektronů,
- transferázy – podílí se na přenosu aktivované skupiny z donoru na akceptor,
- hydrolázy – účastní se hydrolytického štěpení vazeb vzniklých kondenzací,
- lyázy – katalyzují nehydrolytické štěpení vazeb a energeticky nenáročný vznik vazeb (C-C, C-O, C-N),
- izomerázy – umožňují intramolekulární přesun atomů a jejich skupin, a tím vznik izomerů,
- ligázy – podílí se na vzniku energeticky náročných vazeb za současného rozkladu látky a spotřeby energie [4].

1.1.1 Aktivita enzymu

Rychlost enzymatické reakce neboli aktivita enzymu závisí na podmínkách reakčního prostředí. Pro porovnání rychlosti jednotlivých katalyzovaných reakcí slouží jednotka katal (kat), která udává množství enzymu potřebného pro přeměnu 1 molu substrátu za 1 s. V praxi se však častěji používá jednotka IU (international unit), přičemž platí

$$1 \text{ IU} = 16,67 \text{ nkat} \quad (1)$$

a zároveň [4]:

$$1 \text{ IU} = \mu\text{mol}/\text{min} \quad (2)$$

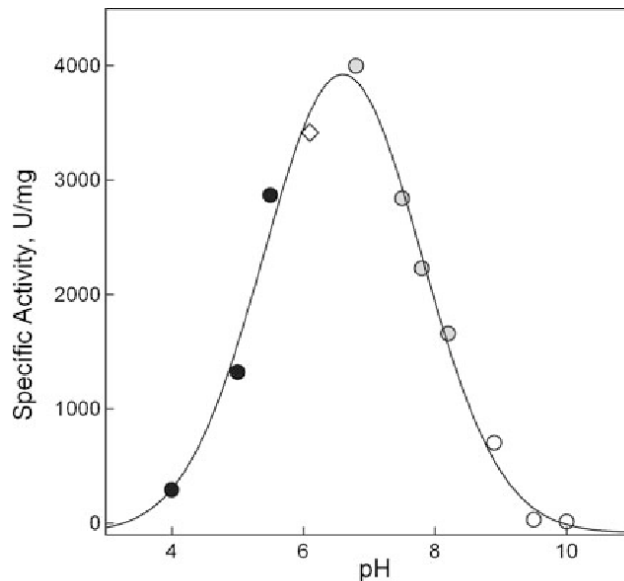
Jak už bylo řečeno, většina enzymů jsou proteiny, tudíž jejich aktivita je ovlivněna faktory narušujícími strukturu proteinu. Mezi takové patří pH, teplota a iontová síla. Na aktivitu

enzymu působí rovněž faktory ovlivňující katalyzátory, což je koncentrace enzymu a substrátu. Při stanovení jeho aktivity je proto nutno na všechny tyto aspekty brát zřetel. Výhodou enzymů je, že nemusí být detekovány přímo, ale lze je stanovit prostřednictvím jimi katalyzovaných reakcí. Nejjednodušší metodou je sledování barevné změny při enzymatické reakci, přičemž může buď vznikat barevný produkt, nebo naopak mizet barevný substrát. Zachycení této změny zajišťuje kolorimetr či fotometr. S výhodou lze však použít i spektrofotometr s detekcí v UV oblasti, v níž absorbuje většina enzymů, proteinů atd. Vzhledem k širokému uplatnění a nízké citlivosti na rušivé vlivy jsou fotometrické testy využívány nejčastěji [5, 6].

Fluorimetrické stanovení je asi 100x citlivější než klasická fotometrie. Podmínkou však je, aby reaktanty emitovaly fluorescenční záření [5].

Kromě optických metod se využívají i metody elektrochemické, zejména pak měření pH u enzymově katalyzovaných reakcí se změnou pH. Jak je vidět na obrázku č. 1, aktivita enzymu má v závislosti na pH zvonovitý tvar křivky, která se od nuly v oblasti silné kyseliny zvedá na maximální hodnotu a poté zase klesá k nule v silně alkalické oblasti. Tento průběh ovlivňuje jednak stav protonace funkčních skupin aminokyselin a kofaktorů zapojených do reakce a jednak trojrozměrná struktura enzymu. Zatímco protonace je reverzibilní, změna struktury enzymu je nevratný proces [5].

Maximální hodnota, které zvonovitá křivka dosáhne, se nazývá pH optimum. Je to vlastně pH, při němž má enzym nejvyšší aktivitu. Většinou se jeho hodnota pohybuje ve fyziologickém rozmezí, tzn. 7-8. Existují však i extrémní pH optima, např. pro pepsin je vhodné pH = 2 či naopak pro alkalickou fosfatázu pH = 10,5 [5].



Obr. č. 1 Závislost aktivity enzymu na pH [7]

Závislost aktivity enzymu na teplotě je podobná závislosti na pH: s rostoucí teplotou jeho aktivita stoupá, až dosáhne teplotního optima a posléze opět klesá. Nízké teploty totiž nevedou k vytvoření dostatečné energie pro aktivaci reakce katalyzované enzymem. Se zvyšující se teplotou naopak vzniká kinetická energie, která vede k častějším kolizím mezi enzymem a substrátem. Teplota však enzym ovlivňuje dvojím způsobem. S rostoucí teplotou se rychlost enzymatické reakce zvyšuje, a to 2-3x s každými 10 °C. Naproti tomu je struktura enzymu citlivá na vysoké teploty a může dojít až k jeho denaturaci vlivem narušení vodíkových vazeb [5, 8].

Kromě parametrů týkajících se samotného enzymu jsou důležité také substráty a kofaktory, konkrétně jejich stabilita, čistota a koncentrace. Platí, že rychlost enzymatické reakce se zvyšuje se vzrůstající koncentrací substrátu až do obsazení všech aktivních míst enzymu. Za předpokladu dostatečného množství substrátu také rychlost reakce stoupá společně s koncentrací enzymu [4, 5].

Enzymy mohou mít různou specifitu k substrátům. U těch méně specifických může být aktivita různá právě v závislosti na určitém substrátu. V otázce na volbu správného substrátu pak rozhoduje hodnota K_M , která by měla být co nejnižší, ale také jeho dostupnost, stabilita aj. [4, 5].

Na aktivitu enzymu má rovněž vliv přítomnost efektorů, tj. aktivátorů či inhibitorů. V případě, že dojde ke zrychlení enzymatické reakce, jedná se o aktivaci a efektozem je tedy

aktivátor (nejčastěji ionty kovů: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}). V opačném případě, tedy dojde-li ke zpomalení reakce, je efektoem inhibitor (např. ionty těžkých kovů). Buňka samotná je schopna prostřednictvím katalýzy nebo naopak inhibice regulovat průběh enzymatických reakcí [4, 5].

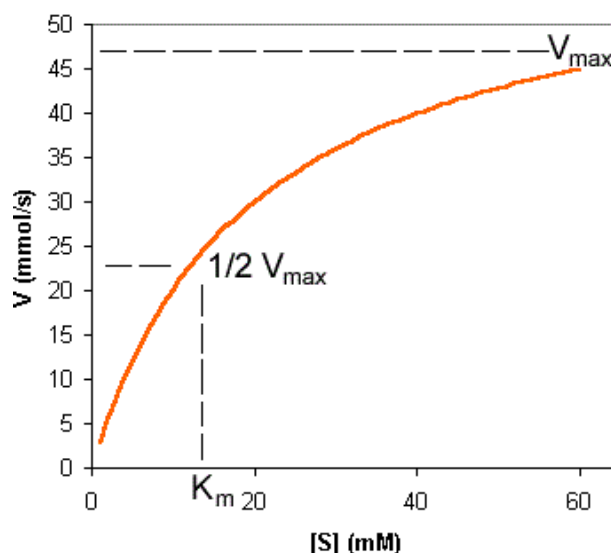
1.1.2 Kinetika enzymatických reakcí

Leonor Michaelis a Maud L. Mentenová se zabývali mechanismem enzymatických reakcí již v roce 1913. Za katalytickou aktivitu je zodpovědná malá část molekuly enzymu (E), tzv. aktivní místo. To obsahuje skupinu schopnou reagovat s daným substrátem (S). Dojde-li ke srážce enzymu se substrátem ve vhodné orientaci, je substrát navázán v aktivním místě a vzniká komplex enzym-substrát (ES). Při vzniku komplexu ES se mění struktura aktivního místa i substrátu samotného. To vyvolá další strukturní změny a substrát je přeměněn na produkt (P). Vzniklý produkt již není schopen vázat se na enzym a po jeho uvolnění se aktivní místo vrátí do původního stavu. Pro vznik komplexu ES a poté i produktu navrhli výše uvedení vědci následující schéma,



kde je vynechána rychlostní konstanta k_{-2} , jelikož přeměna produktu zpět na ES je tak pomalá, že ji lze zanedbat [9].

Ze závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci S pak lze získat kinetické parametry enzymové reakce – Michaelisovu konstantu (K_M) a mezní rychlost (V_{max}). Na počátku reakce totiž není ve směsi žádný produkt a tyto parametry tudíž odpovídají pouze přeměně S na P. Křivka závislosti v vs. $[\text{S}]$ na obrázku č. 2 se nazývá jako saturační křivka a podle teorie Michaelise a Mentenové vyjadřuje sycení E substrátem [9].



Obr. č. 2 Saturační křivka [10]

Reakční rychlost neboli rychlost tvorby produktu (také rychlost úbytku substrátu) je úměrná koncentraci komplexu ES podle vztahu:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] \quad (4)$$

Podle schématu č. 3 vyplývá:

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (5)$$

Z rovnice č. 5 a s předpokladem, že koncentrace komplexu ES je v průběhu celé reakce konstantní a její součet s koncentrací volného enzymu se rovná původní koncentraci enzymu $[E]_0$, lze získat:

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_{-1} + k_2 + k_1 \cdot [S]} \quad (6)$$

Rychlostní rovnice má pak tvar:

$$v = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad (7)$$

Po dosazení V_{max} a K_M již vzniká konečná podoba rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Podle definice je Michaelisova konstanta taková koncentrace S, která je při dané koncentraci E nutná k dosažení poloviny mezní rychlosti. K_M je úměrná disociační konstantě komplexu ES, z čehož vyplývá, že čím vyšší je hodnota K_M , tím slabší je vazba mezi E a S. K_M

je v závislosti na okolním prostředí (teplota, pH, iontová síla apod.) typická pro každou dvojici E-S, tudíž jakákoliv změna její hodnoty za standardních podmínek vypovídá o přítomnosti efektoru. Pro většinu enzymů nabývá K_M hodnot v rozmezí 10^{-1} – 10^{-7} mol/l [9, 11, 12].

Mezní (limitní) rychlost je počet molekul S převedených na P enzymem, jenž je plně saturován substrátem, a to za jednotku času (s^{-1}). V_{max} bývá také označována jako číslo přeměny [12].

1.1.3 Inhibice enzymů

Inhibitory lze rozdělit na reverzibilní, které se na E váží nekovalentně, a ireverzibilní, které modifikují funkční skupiny E, a tím ho inaktivují. Při reverzibilní inhibici je možné aktivitu E plně obnovit po odstranění inhibitoru (I) ze systému enzym-inhibitor (E-I). Reverzibilní inhibici popisuje následující schéma:



Podle toho, zda lze zvýšením koncentrace S eliminovat inhibiční vliv, se pak reverzibilní inhibitory dále dělí na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené. Znalost mechanismu inhibice je důležitá pro definici vztahu mezi koncentrací I potřebného pro vznik inhibice a hladinou S v reakční směsi. Například vysoká koncentrace S snižuje účinek kompetitivního I, zatímco akompetitivní I je potencován [13, 14, 15].

1.1.3.1 Kompetitivní inhibice

Kompetitivní (konkurenční) inhibitor je strukturním analogem substrátu. Při reakci tedy dochází k soutěžení S a I o vazebné místo na enzymu. Pak mohou nastat 2 situace:



V případě schématu 11 je I po vazbě do aktivního místa nereaktivní, tj. nepřeměňuje se na produkt. Pokud je koncentrace I vysoká, může zcela vytěsnit S z reakce. Naopak zvýšení koncentrace S vytěsňuje I. Inhibitory tohoto typu nemají prakticky žádnou afinitu ke komplexu ES, protože S již zabírá všechna vazebná místa na E. Díky tomu I zvyšuje K_M a nemění V_{max} [14, 15].

1.1.3.2 Nekompetitivní inhibice

Nekompetitivní inhibitor nenesou žádnou strukturní podobnost k S a na E se váže v místě odlišném od vazebného místa pro S. Mechanismus vazby je založen na allosterickém efektu. Mezi S a I nepanuje žádná konkurence a inhibiční vliv nemůže být ovlivněn zvýšením koncentrace S. I se může navázat buď na volný E, nebo na komplex ES, avšak v obou případech je nově vzniklý komplex inaktivní vlivem konformační změny E po vazbě I:



Hodnota V_{max} je inhibičně snížena kvůli snížení koncentrace aktivního E. K_M ovlivněna není, jelikož afinita E k S není změněna [14, 15].

1.1.3.3 Akompetitivní inhibice

Akompetitivní inhibitor se váže pouze na komplex ES, jelikož vazba S na E zprostředkovává vznik vazebného místa pro inhibitor. Vzniká inaktivní komplex ESI, jenž se nepřeměňuje na P. Za těchto okolností je snížena hodnota V_{max} i K_M . Zvláštním případem je inhibice substrátem, kdy příliš vysoká koncentrace S blokuje enzymovou aktivitu. Tato situace nastává v případě, že se na aktivní místo E naváže více než jedna molekula S, např. pokud se na různé části vazebného centra naváží různé části molekuly S [15].

1.1.3.4 Smíšená inhibice

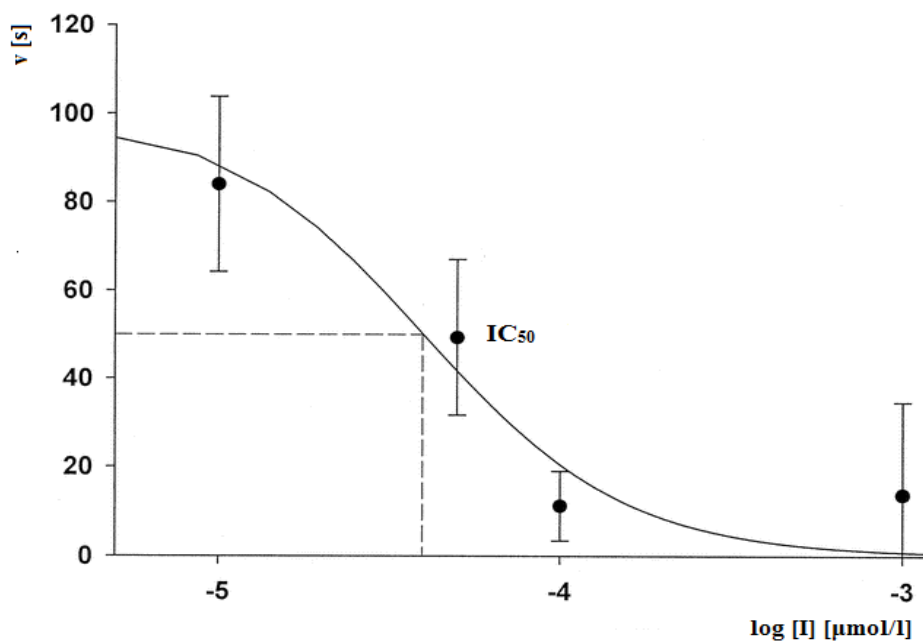
Smíšené inhibitory mají odlišnou afinitu pro volný E a pro komplex ES. Při vazbě I na komplex ES se díky přítomnosti S mění afinita I k E. Většinou se při tomto typu inhibice I váže do allosterického místa, tedy místa odlišného od aktivního centra. I narušují vazbu S k E, čímž se zvyšuje K_M , a také brání katalýze, čímž se snižuje V_{max} [15].

1.1.4 Index IC_{50} , rovnovážná konstanta K_i

Existují celkem 2 hodnoty, jimiž lze kvantifikovat účinnost inhibitoru: střední inhibiční koncentrace (IC_{50}) a rovnovážná disociační konstanta (K_i) [16].

IC_{50} je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu nebo také pokles aktivity enzymu na 50 %. Někdy se uvádí jako záporný dekadický logaritmus molární koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu: $pIC_{50} = -\log IC_{50}$. Například pokud je hodnota $IC_{50} = 1 \mu\text{mol/l}$, neboli 10^{-6} mol/l , pak $pIC_{50} = 6,0$ [17, 18].

Hodnoty IC_{50} se určují několika způsoby, přičemž při každém experimentu se množství inhibitoru neustále zvyšuje a pozorovaná rychlost reakce tím pádem klesá. Vždy je přitom vynesena závislost rychlosti reakce (v) na logaritmu koncentrace inhibitoru ($\log [I]$) a vzniklá křivka má sigmoidální tvar. Závislost je vyznačena na obrázku č. 3. Inflexní bod křivky pak odpovídá logaritmu koncentrace inhibitoru, která snižuje rychlost reakce o 50 % [16].



Obr. č. 3 Stanovení IC_{50} – převzato a překresleno podle [19]

Hodnota K_i , neboli rovnovážné disociační konstanty komplexu E-I, se rovněž určuje několika experimenty s různým množstvím inhibitoru. Zároveň lze pro tyto jednotlivé koncentrace stanovit i K_M , jejíž hodnota v přítomnosti inhibitoru stoupá, jelikož afinita enzymu k substrátu se snižuje. Čím nižší je přitom K_i , tím vyšší je vazebná afinita inhibitoru k enzymu. Dobrý inhibitor má hodnotu K_i v řádech 10^{-9} mol/l a níže [16, 20].

Přestože jsou IC_{50} i K_i měřítkem účinnosti inhibitoru, nejsou totožné. Hodnota K_i je považována za spolehlivější údaj, protože se jedná o skutečnou rovnovážnou konstantu. Naproti tomu hodnota IC_{50} závisí na koncentraci substrátu, tudíž provedení několika měření IC_{50} u stejného inhibitoru nemusí být přesné. Podle rovnice Cheng-Prusoffa však lze hodnotu IC_{50} převést na K_i , a to při známé K_M neinhibovaného enzymu pro daný substrát, IC_{50} inhibitoru a koncentraci substrátu, při níž bylo měření IC_{50} provedeno. Níže uvedené rovnice platí pro kompetitivní (č. 14), akompetitivní (č. 15) a nekompetitivní (č. 16) inhibici, a to za předpokladu,

že reakce jsou reverzibilní a mají jednotkovou stechiometrii – proto není uveden vztah pro smíšený typ inhibice [16, 20, 21]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (14)$$

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad (15)$$

$$K_i = IC_{50} \quad (16)$$

1.2 Esterázy

Esterázy jsou obecně vzato enzymy, které katalyzují adici molekuly vody na ester za vzniku kyseliny a alkoholu. Tímto způsobem mohou hydrolyzovat estery karboxylových kyselin, thioestery a některé z nich dokonce amidy. Lipázami nazýváme ty esterázy, jež tvoří esterovou vazbu s mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Naopak esterázy, které se váží na peptidové vazby, se nazývají jako proteázy [22, 23].

Prvními esterázami, které byly sekvenovány, klonovány a krystalizovány, byly cholinesterázy. V roce 1994 byla vytvořena esterová databáze, ve které rodina α/β hydroláz obsahovala pouze 5 proteinů. Tato databáze přitom zahrnovala všechny proteiny strukturně podobné cholinesterázám, a to bez ohledu na jejich funkci, katalytický mechanismus či původ. V současné době do rodiny α/β hydroláz patří cholinesterázy s různou substrátovou specifitou, karboxylesterázy (CE-1, 2, 3) s širokou substrátovou specifitou, hormonální esterázy specifické pro hormony, esteráza D účastnící se detoxikace formaldehydu a také lipázy [22, 24].

V lidském organismu se nachází celkem 31 druhů esteráz. Jedná se o 4 karboxylesterázy, 2 paraoxonázy, 14 thioesteráz, 6 lipáz, 2 cholinesterázy, 1 methylesterázu, 1 acetylhydrolázu, což je aktivační faktor krevních destiček, a 1 *o*-acetylerázu [22].

Ve významnějším množství lidská plazma obsahuje pouze 2 typy esteráz: butyrylcholinesterázu a paraoxonázu. Ve stopovém množství je přítomna také acetylcholinesteráza, ale většina jejích funkcí je zanedbatelná. Analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie bylo zjištěno, že albumin má rovněž esterázovou aktivitu, avšak pouze na poloviční úrovni. Oproti lidské plazmě obsahuje plazma některých zvířat ještě karboxylesterázy [22].

V červených krvinkách se nachází 2 typy esteráz: acetylcholinesteráza, navázaná na vnější straně povrchové membrány prostřednictvím glykolipidové kotvy, a esteráza D uvnitř erytrocytu. Esteráza D bývá někdy nazývána také jako S-formylglutathion hydroláza [22].

Lidská karboxylesteráza se vyskytuje především v tenkém střevě a v játrech, zatímco paraoxonáza v krevní plazmě a gastrointestinálním traktu [22].

1.3 Cholinergní systém

Neurotransmitter je obecně látka uvolněná neuronem ke specifickým buňkám, v nichž vyvolá specifickou odezvu. Neurotransmise je cílená na buňky v blízkosti zakončení neuronu, který tuto látku uvolňuje [25].

Acetylcholin (ACh) je látka, která tvoří základ cholinergního systému. Je neurotransmiterem všech nervosvalových plotének obratlovců, presynaptických neuronů v autonomním nervovém systému i postgangliových neuronů parasymptatiku. ACh je syntetizován přenosem acetylu z acetyl-CoA na cholin, a to za katalýzy cholinacetyltransferázou. Cholin je syntetizován játry trojnásobnou methylací ethanolaminu, jenž vzniká dekarboxylací serinu. Cholin je pak uvolňován do krve, přičemž převážná část putuje do mozkové tkáně [25, 26].

V nervovém systému ACh působí prostřednictvím 2 typů receptorů. Prvním z nich je skupina celkem 5 muskarinových receptorů spřažených s G-proteinem, které řídí iontové kanály:

- M_1 – podílí se na snížení permeability membrány pro K^+ ionty a porucha jeho funkce bývá spojována s rozvojem demence,
- M_2 – jeho aktivací se snižuje tvorba cAMP a otevřou se K^+ kanály, což vede k hyperpolarizaci tkáně,
- M_3 – stimuluje sekreci exokrinních žláz a také se podílí na zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů, výsledkem čehož je pak kontrakce hladkého svalstva,
- M_4 – má podobnou funkci jako M_2 receptor,
- M_5 – jeho funkce dosud nebyly řádně prozkoumány [25, 26].

Druhým typem jsou nikotinové receptory, což jsou vlastně kationové kanály propustné hlavně pro Na^+ a K^+ , v závislosti na druhu receptoru i pro Ca^{2+} ionty. Existují celkem 2 typy nikotinových receptorů:

- muskulární – přítomen zejména na nervosvalové ploténce,
- neuronální – nachází se ve vegetativních gangliích a na postsynaptické membráně a je propustný pro výše zmíněné Ca^{2+} ionty [25, 26].

Cholinergní neurony se podílejí na upevňování paměťových stop, ovlivňují bdělost, spánkový cyklus a účastní se také iniciace žádaného pohybu [25, 26].

1.4 Cholinesterázy

Cholinesterázy jsou sekreční enzymy patřící do skupiny serinových hydroláz, které v plazmě katalyzují hydrolýzu esterů cholinu a některých dalších substrátů. Jsou děleny na 2 druhy: acetylcholinesteráza (AChE; EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesteráza (BChE; EC 3.1.1.8) [27, 28].

Funkcí AChE neboli specifické cholinesterázy je hydrolýza acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou na postsynaptické membráně v nervosvalové ploténce. Funkce BChE nebyla doposud zcela objasněna, a proto bývá označována jako nespecifická cholinesteráza či jako plazmatická cholinesteráza anebo také pseudocholinesteráza [27, 28].

1.4.1 Struktura cholinesteráz

Obě cholinesterázy jsou polymery složené z různého počtu podjednotek. Tyto polymery existují buď v kulovité formě G1, G2 a G4, které obsahují 1, 2 či 4 podjednotky. Druhá forma má podlouhlý tvar, je nazývána jako asymetrická a obsahuje 1-3 podjednotky. G1 forma AChE existuje výhradně v rozpustné podobě, zatímco G4 AChE může být rozpustná anebo membránově vázaná. V lidském mozku se AChE vyskytuje v G1 a G4 formě, přičemž jejich poměr se v různých částech mozku liší. G4 forma BChE v plazmě představuje až 95 % aktivity cholinesteráz. Tento tetramer se skládá z 2 dimerů spojených nekovalentními hydrofobními interakcemi, přičemž oba dimery jsou tvořeny vždy 2 podjednotkami vázanými disulfidickým můstkem. Aktivní centrum polymeru, jenž se nachází na každé ze 4 podjednotek, obsahuje aminokyselinu serin. V plazmě se mohou také nacházet monomery či dimery, které jsou pravděpodobně degradačním produktem zmíněných tetramerů [28, 30].

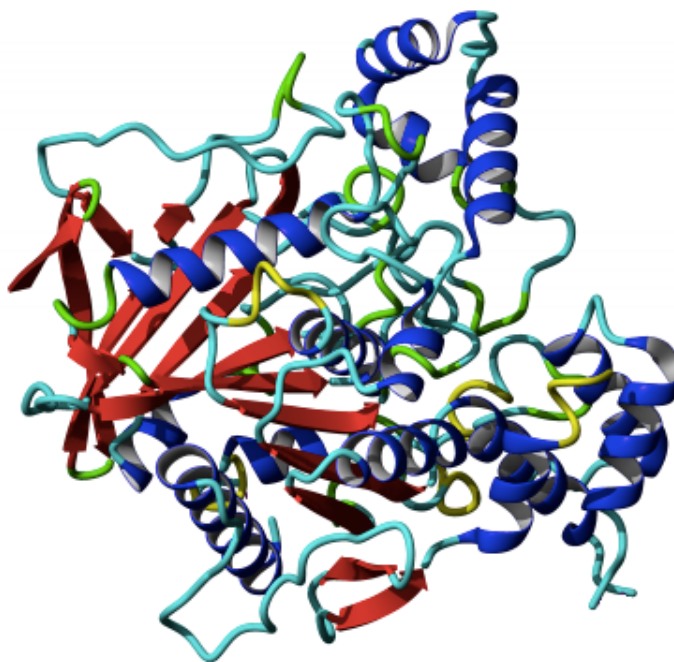
Převážná část AChE v centrální nervové soustavě organismu má hydrofilní i hydrofobní oblast. Jedná se tedy o amfifilní molekulu. G4 tetramer navíc obsahuje nekatalytickou podjednotku P, neboli glykosylfosfatidylinositolovou kotvu (GPI kotva). V lidské AChE je lipofilní částí GPI kotvy palmitát [28, 30].

1.4.2 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza je exprimována cholinergními neurony. Vysoká aktivita enzymu se objevuje ale i v krevních buňkách, které jsou odpovědné za degradaci plazmatického acetylcholinu. AChE má také mnoho sekvencí shodných s řadou proteinů účastnících se buněčné adheze či sloužících jako signální molekuly. Mezi takové proteiny patří neurotaktin, glutaktin, gliotaktin, neuroligin a thyroglobulin [27, 29, 31].

1.4.2.1 Struktura

Na obrázku č. 4 je ilustrována 3D struktura AChE. Hluboko uvnitř molekuly je místo její katalytické aktivity, které se nachází v jakési propasti složené ze 14 aromatických zbytků. Díky této propasti se zvyšuje selektivita enzymu k ACh. Aktivní místo enzymu obsahuje aminokyselinu histidin, glutamát a serin, na něž se přímo váže ACh, a probíhá zde hydrolyza esterové vazby. V nitru molekuly se dále nachází tzv. aniontové místo obsahující aminokyselinu tryptofan, tyrosin a fenylalanin. Aniontové místo má za úkol zajistit správnou orientaci substrátu. To je umožněno interakcí mezi kvartérním amoniovým atomem ACh, který je odhalen předchozí hydrolyzou esterové vazby v aktivním místě enzymu, a π -elektrony aromatických jader fenylalaninu, tyrosinu a tryptofanu. Periferní aniontové místo (PAS) se nachází v podstatě na povrchu AChE a obklopuje vstup do aromatické propasti enzymu. PAS obsahuje aminokyselinu tryptofan, tyrosin a aspartát. Jeho funkcí je v první řadě vazba acetylcholinu s následnou allosterickou modifikací molekuly, ale také vazba specifických inhibitorů. Rovněž bylo zjištěno, že se PAS podílí i na non-cholinergních procesech, jako je buněčná adheze, vývoj nervových buněk, ale i na rozvoji Alzheimerovy choroby prostřednictvím interakce s β -peptidem amyloidu, což vede k tvorbě amyloidních plaků a následnému poškození cholinergních neuronů [27, 29, 31].



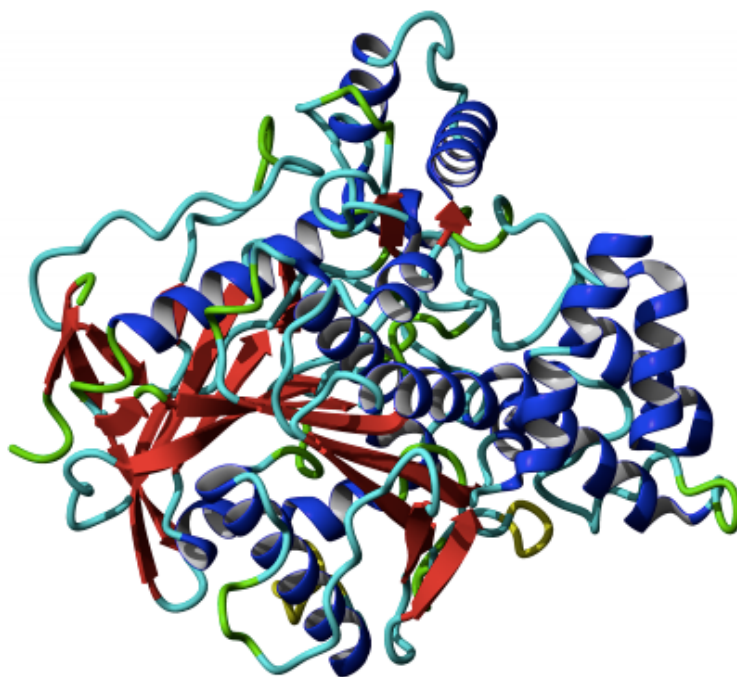
Obr. č. 4 3D struktura AChE z parejnoka kalifornského [32]

1.4.2.2 *Funkce acetylcholinesterázy*

Jak již bylo řečeno, neurotransmitter ACh přenáší signál z nervových buněk do svalových. Zde ACh aktivuje receptory a umožňuje tak kontrakci svalu. Po předání tohoto signálu je třeba starý neurotransmitter odstranit, což zajišťuje právě enzym AChE. Hlavním úkolem tohoto enzymu je tedy ukončení přenosu signálu na cholinergních synapsích, a to rychlou hydrolýzou ACh. Rychlost hydrolýzy jedné molekuly neurotransmiteru se pohybuje okolo 80 μ s, čímž se řadí mezi nejrychlejší enzymy lidského organismu [33].

1.4.3 *Butyrylcholinesteráza*

Butyrylcholinesteráza je syntetizována jaterními buňkami a vylučována do krve. Nemá specifický substrát a díky podjednotkám, z nichž se skládá, má širokou substrátovou specifitu – struktura enzymu je na obrázku č. 5. Dalším rozdílem od AChE je odolnost vůči inhibici přebytkem substrátu. Naopak je tento enzym vysoce citlivý k tetraisopropylpyrofosforamidu, díky němuž může být rychlým způsobem určeno, zda je ve vzorku přítomna AChE či BChE [27].



Obr. č. 5 3D struktura lidské BChE [34]

Gen pro BChE je umístěn na chromozomu 3q26.1 – q26.2 a skládá se ze 4 exonů oddělených 3 introny. Důsledkem mutací genu je vznik enzymů s různou katalytickou aktivitou. Při mutaci, u níž vzniká atypická forma enzymu, dochází k substituci kyseliny asparagové za glycinový zbytek. Tyto anomálie mohou být detekovány pomocí testu aktivity plazmatické cholinesterázy s různými substráty anebo pomocí stupně inhibice této aktivity známým inhibítorem, jako je dibukain, což je lokální anestetikum, či fluorid. Principem prvního typu testování je fakt, že atypická BChE hydrolyzuje substráty výrazně nižší rychlostí. Při ověřování stupně inhibice aktivity enzymu je známo, že atypická forma je poměrně rezistentní vůči dibukainu, zatímco ta normální je až 20x citlivější. Tato metoda se využívá ke kvantifikaci esterázové aktivity – výsledkem je hodnota, která představuje procentuální inhibici dibukainem za normalizovaných podmínek a s použitím benzoylcholinu jako substrátu a dibukainu o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ [35].

Dibukainové číslo (DN) je tedy procento enzymové aktivity BChE, která je inhibována právě dibukainem. Výsledek DN společně s aktivitou BChE mohou pomoci identifikovat osoby ohrožené prodlouženou paralýzou po podání sukcinylcholinu. Snížená aktivita BChE ve spojení s DN <30 naznačuje vysoké riziko vzniku paralýzy. Normální až snížená aktivita BChE s DN mezi 30-79 značí na proměnlivé riziko. Snížená aktivita BChE spolu s DN ≥ 80 naznačuje na

mírné riziko, ale příčinou může být i expozice organofosfátům, jaterní onemocnění či těhotenství [36].

I přes nejasnou fyziologickou funkci má BChE v lidském těle převládající esterázovou aktivitu. Osoby s deficitem či mutací tohoto enzymu jsou však zdravé, bez zjevných známek onemocnění. U takto postižených je pozorována pouze vyšší citlivost k myorelaxanciím jako je např. výše zmíněný sukcinylcholin, což je krátkodobě působící inhibitor acetylcholinového receptoru. BChE je přitom zodpovědná za hydrolyzu sukcinylcholinu a v případě zpomalené hydrolyzy u některých genetických variant BChE může dojít až k prodloužené zástavě dechu při chirurgických výkonech s anestézií [29].

1.4.3.1 Druhy butyrylcholinesteráz

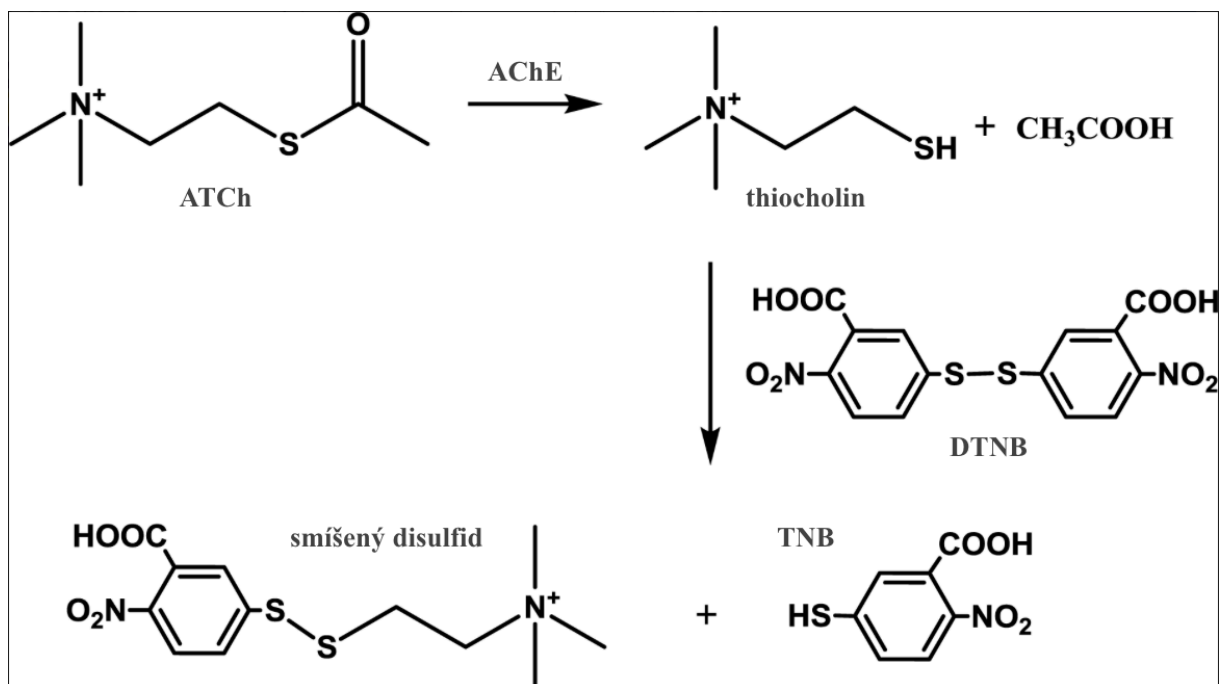
Existuje celkem 7 alel kódujících BChE: U, A, S, F, H, J, K. Normální gen U (usual) řídí syntézu klasické plazmatické BChE. Atypický gen A (atypical) řídí syntézu takové BChE, která má na svědomí pokles aktivity enzymu v séru až o 30 %. Zároveň je prokazatelně odolnější k inhibici dibukainem. Gen F (fluoride resistant) řídí syntézu varianty se zvýšenou rezistencí k inhibici fluoridem, ale inhibice dibukainem je zachována. Gen S (silent) produkuje variantu BChE, u níž chybí struktura nezbytná pro esterázovou aktivitu, tudíž nedochází k hydrolyze cholinesterových vazeb. Geny H, J a K kódují enzym s normální katalytickou aktivitou, avšak problém nastává při poruše syntézy či nestabilitě molekuly, kdy může dojít ke vzniku nedostatku enzymu v plazmě [29, 35].

1.4.4 Stanovení aktivity cholinesteráz

Pro stanovení aktivity ChEs byla studována kinetika hydrolyzy ACh a acetylthiocholinu (ATCh) pomocí AChE i BChE. K testování enzymatické hydrolyzy ACh *in vitro* se používá právě zmíněný ATCh, jelikož mechanismus jejich rozkladu je kvalitativně podobný. Průběh reakce může být kvantitativně zaznamenáván 2 nezávislými metodami: spektrofotometricky (stanovení thiocholinu jako produktu hydrolyzy ATCh pomocí Ellmanovy metody) a elektrochemicky (stanovení kyseliny octové jako produktu hydrolyzy ATCh pomocí pH-statu). Testované hydrolyzy přitom odpovídají rovnici Michaelis-Mentenové s druhým nevratným krokem až do vyčerpání substrátu [37].

1.4.4.1 Ellmanova metoda

Nejvíce využívanou metodou stanovení aktivity/inhibice ChEs je spektrofotometrická metoda s acetylthiocholinem nebo propionylthiocholinem jako substráty. Uvolněný thiocholin z reakce substrátu s AChE se váže na chromogen DTNB (kyselinu 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou)) neboli Ellmanovo činidlo a měří se aktivita cholinesterázy jako zvýšení absorpance při 412 nm. Na obrázku č. 6 je uveden průběh celé reakce [38, 39].



Obr. č. 6 Mechanismus Ellmanovy metody – převzato a překresleno podle [40]

Navzdory užitečnosti této metody nastává problém, je-li koncentrace DTNB vyšší než je koncentrace ATCh. Bylo zjištěno, že poměr koncentrací DTNB:ATCh je důležitým parametrem pro průběh hydrolyzy substrátu. Přebytek DTNB ji totiž zpomaluje, a to vede i k nižší naměřené aktivitě enzymu [39].

1.4.4.2 Elektrochemická detekce

Titrační metody sledují protony uvolněné z ACh, a to buď změnou pH pomocí pH elektrody, fotometrickou detekcí tvorby barevného komplexu s cholinem nebo titrací roztokem NaOH na fenolovou červeň. Titrace se změnou pH může být automatizovaná, kdy se k uvolňovaným protonům přidává báze pro jejich neutralizaci. Při konstantním pH je spotřeba báze přímo úměrná množství hydrolyzovaného ACh. Výhodou metody s pH-statem je na rozdíl

od Ellmanovy metody možnost určení absolutní enzymové aktivity bez použití exogenních činidel. Naopak nevýhodou této metody je vysoká citlivost na udržování teploty a pH [38, 41].

1.5 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je chronické progresivní neurodegenerativní onemocnění, které je nejčastější příčinou vzniku demence. AD představuje až 60-80 % demencí. Významným rizikem rozvoje choroby je rostoucí věk a genetická predispozice. Nemoc má charakter postupného zhoršování stavu, přičemž celková velikost mozku se neustále snižuje kvůli úbytku nervových buněk a spojení. Při pitvě mozku u pacientů s AD bývá zjištěna typická přítomnost neurofibrilárních spleť a amyloidních plaků [42].

1.5.1 Příznaky

Symptomy AD lze rozdělit do 3 stádií, jež na sebe v průběhu onemocnění navazují:

- počáteční fáze – počínají problémy s krátkodobou pamětí, tzn. potíží s vybavením si známých slov či zapomenutí umístění běžně používaných předmětů,
- mírná AD – jedná se o nejdélší období nemoci, v němž se příznaky postupně zhoršují,
- těžká AD – nemocný má poškozenou i dlouhodobou paměť až dochází ke změně jeho osobnosti [43].

1.5.2 Příčiny

Všechny výše popsané příznaky AD jsou výsledkem změn probíhajících v mozkové tkáni vlivem rostoucího věku. Tyto změny zahrnují zmenšování určitých částí mozku (atrofie) následkem ztráty funkce mozkových buněk a jejich následným odumíráním, ale rovněž tvorbu nebezpečných volných radikálů. Míra postižení kognitivních funkcí odpovídá u AD nedostatku acetylcholinové neurotransmise vlivem neurodegenerace a také působením ChEs. Zatímco pro AChE je ACh přirozeným substrátem, afinita BChE k ACh je poměrně nízká. S postupem nemoci však aktivita AChE klesá a naopak u BChE stoupá. BChE dokáže zastoupit funkci AChE a podílí se tak na snižování hladiny ACh [30, 44].

Jak už bylo řečeno, u AD je typická tvorba tzv. plaků a spleť. Plaky jsou zbytky bílkoviny beta-amyloidu, jež vzniká mezi nervovými buňkami. V mozku pacientů s AD je v některých oblastech snížena hladina membránově vázané G4 AChE až o 90 %, zatímco hladina G1 AChE zůstává nezměněna. Tyto změny exprese jsou pravděpodobně příčinou

vzniku beta-amyloidu. Spleti jsou naopak zkroucená vlákna proteinu tau, který vzniká uvnitř nervových buněk. Prozatím nebylo přesně dokázáno, jakou roli tyto útvary u onemocnění hrají, ale většina odborníků je názoru, že brání komunikaci mezi buňkami, což má za následek poruchu jejich funkce a posléze i jejich smrt [30, 42].

V mnoha studiích bylo prokázáno, že u většiny pacientů s AD se vyskytuje mutace alespoň u jednoho z 3 genů. Prvním z nich je gen pro APP (amyloid precursor protein), který se nachází na chromosomu 21. Tento gen ovlivňuje produkci beta-amyloidu a jeho zvýšená koncentrace v mozku je považována za příčinu rozvoje nemoci. Nejčastěji postižený je však gen PSEN-1 (presenilin gene-1), lokalizovaný na chromosomu 14. Mutace na tomto genu je příčinou až 80 % případů AD, s počínajícími příznaky již po 30. roku věku. Řídce bývá postižen i gen PSEN-2 (presenilin gene-2), jenž se nachází na chromosomu 1. Rozvoj AD v tomto případě není tak časný jako u PSEN-1 [45].

1.5.3 Diagnostika

Při podezření na AD se první řadě provádějí nespecifické testy. Mezi ně patří sepsání anamnézy pacienta, testy na posuzování poruch paměti a identifikace typických změn v chování [46].

Ačkoliv je magnetická rezonance biomarkerů AD teprve ve výzkumu, už nyní je důležitou součástí diagnostiky AD. Doposud se jako nejprínosnější biomarker projevil objem hippocampu, jenž je součástí velkého mozku, dále se studuje amygdala, což je párová struktura lokalizovaná ve střední části spánkového laloku, mozkové komory a mozek jako takový. Další studium biomarkerů zahrnuje měření tloušťky kortikální tkáně, hodnocení tvaru a vzdálenosti mozkových struktur apod. Nevýhodou této techniky je různá lokalizace biomarkerů, což má za následek rozdílnou citlivost na jednotlivá stádia onemocnění [47].

1.5.4 Terapie

Choroba je spojena se ztrátou cholinergních neuronů a se snížením hladiny ACh v mozku, tudíž hlavním léčebným krokem je podávání inhibitorů cholinesteráz. Protože AD zatím nelze zcela vyléčit, je možné pomocí těchto látek alespoň mírnit příznaky a jejich dopady. Inhibitory jsou namířeny proti enzymům AChE a BChE, čímž je zajištěno zvýšení hladiny ACh. V současné době jsou pro léčbu AD využívány reverzibilní a pseudo-ireverzibilní inhibitory. Mimo ně jsou oblíbené také látky přírodního původu, např. alkaloidy [48].

Kromě inhibitorů ChEs se k léčbě AD využívají také antagonisté NMDA (kyselina *N*-methyl-*D*-asparagová) receptorů. Tyto receptory patří mezi tzv. ionotropní glutamátové receptory, které po aktivaci glutamátem fungují jako iontové kanály. Jedním z iontů, které tímto receptorem procházejí, je apoptózu indukující Ca^{2+} . Prostup vápenatých iontů do neuronu je považován za jeden z mechanismů patogeneze u AD. V současné době se z této skupiny používá memantin, což je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, jenž blokuje jejich chronickou hyperaktivaci [49, 50].

1.6 Inhibitory cholinesteráz

Inhibitory ChEs mají za následek pozastavení hydrolýzy ACh, což vede k jeho hromadění a také k zesilování neurotransmise. Podle účinku mohou být rozděleny na reverzibilní (vratné), pseudo-ireverzibilní (karbamáty) a ireverzibilní (nevratné). Reverzibilní inhibitory bývají využívány v terapeutických procesech, zatímco ireverzibilní mají spíše toxické účinky [48].

1.6.1 Reverzibilní inhibitory

Tyto látky se využívají pro diagnostiku či léčbu některých závažných onemocnění jako je např. AD, myasthenia gravis či glaukom. Jsou to sloučeniny s různými funkčními skupinami, např. terciární či kvartérní amoniovou skupinou. Existuje několik reverzibilních inhibitorů využívaných v běžné praxi [48]:

- Donepezil je reverzibilní nekompetitivní inhibitor, jenž má asi 1000x silnější účinek na AChE než na BChE. Váže se na periferní aniontové místo AChE a díky tomu má nejen symptomatologické, ale i kauzální účinky, které zpomalují ukládání amyloidních plaků. Využívá se zejména k léčbě mírné až středně závažné AD, ale některé klinické studie prokazují, že dokáže výrazně zlepšit kognitivní funkce i při těžkém průběhu nemoci. Donepezil je dostupný jako perorální tableta či roztok a jeho poločas rozpadu se pohybuje okolo 70 hodin. Maximální denní dávka léku je 23 mg, jelikož při užití vyššího množství se objevují vedlejší příznaky, jako je nevolnost, bolest břicha, průjem a také bradykardie [48, 51].
- Rivastigmin je silný karbamátový inhibitor vážící se přímo na aktivní místo enzymu. Na rozdíl od donepezilu dokáže rivastigmin inhibovat nejen AChE, ale i BChE. Lék je opět dostupný ve formě perorální tablety či roztoku anebo jako transdermální náplast.

Nejvýhodnější je podávání inhibitoru přítomného v náplasti, protože u této formy byl zaznamenán až 3x nižší výskyt nevolnosti a zvracení jako vedlejších účinků. Kromě AD může být rivastigmin využit i pro léčbu Parkinsonovy choroby či demence s Lewyho tělísky [48, 51].

- **Galantamin** je alkaloid izolovaný z rostliny *Galanthus woronowii*, který má poločas rozpadu okolo 10 hodin a aplikuje se při léčbě mírné až středně závažné AD. Jedná se o selektivní a rychle reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE, který se váže na aniontové místo a také na zbytky aromatických jader tvořících propast, v níž se nachází aktivní místo enzymu. Tento inhibitor je schopen interagovat také s vazebným místem na nikotinovém receptoru, které je odlišné od vazebného místa pro ACh. Tato vazba přitom zvyšuje aktivitu receptoru v přítomnosti ACh a vzhledem k tomu, že závažnost AD souvisí s množstvím nikotinových receptorů, je galantamin vysoce účinný při léčbě poruch kognitivních funkcí. Ze všech uvedených inhibitorů je galantamin snášen nejhůře, obzvláště co se gastrointestinálních příznaků týče. Na druhou stranu však dokáže pozitivně ovlivnit nejen cholinergní přenos, ale také další neurotransmisní systémy, jako je glutamát či kyselina γ -aminomáselná. To může mít za následek zlepšení kognitivních dysfunkcí, depresí či psychiatrických onemocnění (např. schizofrenie) [48, 51].

Kromě inhibitorů schválených pro symptomatologickou léčbu AD byly syntetizovány a studovány také další látky s podobnými účinky. Jednou z nich je **takrin** (1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin), který se vyznačuje až 4x silnějším inhibičním působením na BChE než na AChE. Avšak vzhledem k jeho hepatotoxickým účinkům byl studován jeho derivát **7-methoxytakrin**. Bylo zjištěno, že tato „náhražka“ za takrin je ještě silnějším inhibitorem a navíc s mnohonásobně nižší toxicitou [48, 52].

Další takovou látkou je **huperzin**, což je přírodní alkaloid z rostliny *Huperzia serrata*. Tato rostlina byla dříve využívána v lidové medicíně jako antipyretikum a antiflogistikum, a to díky obsahu chinolizidinových alkaloidů. Huperzin však tyto účinky ve skutečnosti postrádá. V rostlině je přítomen ve 2 formách: A a B. Huperzin A se prokázal jako mnohem účinnější inhibitor AChE, ale také jako antagonist NMDA receptorů. Má inhibiční působení na periferní aniontové místo AChE a díky tomu dokáže léčit nejen symptomy, ale i příčinu vzniku poruchy stejně jako je tomu u donepezilu. Tento inhibitor je dokonce součástí regulace oxidačního stresu, jelikož je schopen zvýšit hladinu antioxidantů v krvi a v nervové soustavě. Jeho poločas

rozpadu se pohybuje okolo 12 hodin. Ve srovnání s jinými inhibitory vykazuje huperzin A lepší průnik hematoencefalickou bariérou i delší inhibici enzymu. Zajímavá je i velmi nízká terapeutická dávka, která se pohybuje v řádech setin mg na den. Předmětem studia je i huperzin B, jenž má sám o sobě inhibiční aktivitu nižší než galantamin, ovšem jeho deriváty mohou být až o 2 řády účinnější [48, 51, 53].

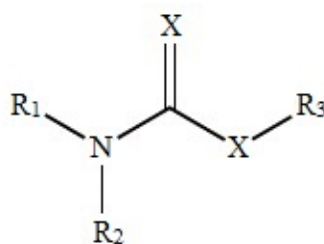
Fascikulin 2 je toxin izolovaný z jedu mamby zelené, ale ukázal se i jako účinný inhibitor AChE. Molekula fascikulinu má dipólový charakter, tj. většina kladných nábojů je koncentrována v centrální části molekuly, zatímco záporné náboje jsou v C–koncové oblasti. Tento inhibitor se váže do PAS enzymu a brání tak jeho katalytické činnosti. Dalším inhibitorem, který se váže do PAS AChE, je **propidium**. Ten dokonce konkuruje fascikulinu 2 v boji o místo na enzymu [54, 55].

Výsledkem neustálého testování jsou konjugované deriváty inhibitorů působící současně na 2 vazebná místa – na periferní a katalytické místo enzymu. V tomto případě se hodnoty IC_{50} pohybují řádově až v nanomolárních koncentracích. Příkladem takových konjugovaných inhibitorů mohou být donepezil-takrinové deriváty [48].

V současné době jsou však základem léčby AD inhibitory přírodního původu, konkrétně rivastigmin, galantamin a huperzin A [48].

1.6.2 Pseudo-ireverzibilní inhibitory (karbamáty)

Karbamáty jsou estery kyseliny karbaminové nebo karbamidové. Obecná struktura je znázorněna na obrázku č. 7 [56].



Obr. č. 7 Obecná struktura biologicky aktivního karbamátu [48]

R_1 a R_2 je většinou organický substituent, ale může se jednat rovněž o vodík. R_3 bývá organický substituent, nebo méně často také kov. Skupina $-X$ pak může být buď kyslík, nebo síra. V případě, že se jedná o síru, je řeč o thiokarbamátu [48].

Mimo jejich použití jako léčiv v humánní medicíně (léčba např. AD, myasthenia gravis, demence s Lewyho tělísky) jsou karbamáty také známy pro hubení parazitů ve veterinární medicíně, nebo slouží jako prevence před otravou organofosfáty [48].

Druh inhibice závisí na stabilitě vzniklého komplexu karbamát-cholinesteráza. Karbamáty jsou schopny se vázat přímo na serin v aktivním místě enzymu. Po navázání nastává proces karbamoylace a protože karbamoylový zbytek lze snadno oddělit od karbamoylovaného serinového zbytku spontánní hydrolyzou, řadí se tyto inhibitory mezi pseudo-ireverzibilní [48, 51].

Přírodním karbamátem využívaným při léčbě myasthenia gravis je **fysostigmin (eserin)**, jenž je získáván při metabolismu rostliny *Fysostigma venenosum*. Je silným inhibitorem AChE, díky čemuž v konečném důsledku zlepšuje přenos nervových impulzů. Dalším karbamátem je **pyridostigmin**, který je schopen zabránit nevratné vazbě organofosfátu na AChE, anebo již zmíněný **rivastigmin** [48, 51].

1.6.3 Přírodní alkaloidy s anti-AChE aktivitou

Byla prozkoumána řada alkaloidů získaných z rostlin, které mají vysokou inhibiční aktivitu proti enzymu AChE [57].

Rostliny z rodu *Corydalis*, čeledi *Papaveraceae*, se v lidové medicíně využívají k léčbě paměťové dysfunkce. Výzkum ukázal na přítomnost benzylisocholinových alkaloidů, které mají inhibiční účinky vůči AChE. Pro získání jednotlivých alkaloidů byla provedena jejich izolace z *C. turtchaninovii*. U nejméně aktivních z nich, pseudokopitinu a pseudoberberinu, byly navíc objeveny účinky potlačující amnézii. Rovněž bylo zjištěno, že nejsilnějšími jsou ty anti-AChE alkaloidy, jež mají ve své struktuře aromatické methyldioxy skupiny a kvartérní atom dusíku [57].

Indolové alkaloidy získané z rodu *Ervatamia hainanensis*, čeledi *Apocynaceae*, vykazují inhibiční aktivitu blízkou aktivitě galantaminu. Příkladem je koronaridin nebo voakangin, které se od sebe liší pouze methoxyskupinou vázanou na aromatickém kruhu. Stejný druh alkaloidů produkuje i rod *Tabernaemontana*, jenž je znám navíc produkcí bisindolových alkaloidů. Ty mají dokonce vyšší inhibiční účinnost než samotný galantamin [57].

Po izolaci huperzinu A z *Huperzia serrata*, čeledi *Lycopodiaceae*, byly prozkoumávány další alkaloidy z této čeledi ve snaze nalézt další s anti-AChE aktivitou. Podobné hodnoty IC₅₀

byly zjištěny u karinatuminu A a B, které vykazují inhibici AChE z bovinních erytrocytů. Lykoparin C je alkaloid izolovaný z *L. casuarinoides* a na rozdíl od lykoparinu A a B, které nevykazují žádnou inhibici, má střední inhibiční aktivitu vůči AChE [57].

Významná inhibice AChE byla objevena také u rostlin čeledi *Amaryllidaceae*. Alkaloid zvaný sanguinin z cibulek rostlin *Eucharis grandiflora* a *Galanthus nivalis* má inhibiční účinek mnohonásobně vyšší než galantamin. Jedná se vlastně o jeho derivát (9-*O*-desmethylgalantamin). Protože se tento alkaloid vyskytuje pouze ve stopovém množství, byl izolován mnohem později než galantamin a jeho studie probíhají až v posledních letech [53].

V tradiční indické medicíně se využívají drogy obsahující β -karbolinové alkaloidy k léčbě očních onemocnění a střevní malnutrice. Byly však prokázány i další účinky těchto látek, především na svalstvo, kardiovaskulární a centrální nervový systém. Takto široká aktivita je dána jejich schopností vázat se na benzodiazepinové, serotoninové, dopaminové a imidazolinové receptory. Nelze opomenout ani jejich inhibiční aktivitu vůči AChE, která je srovnatelná s galantaminem. S ohledem na vedlejší účinky těchto alkaloidů se však k léčbě AD nevyužívají [53].

Chinazolinokarbolinový alkaloid rutaekarpin izolovaný z rostliny *Evodia rutaecarpa*, čeledi *Rutaceae*, vykazuje vysokou selektivitu a inhibiční aktivitu vůči AChE. Mimo to má také protizánětlivé působení a slouží jako vazodilatancium a antitrombotikum [53].

Značná inhibice enzymu byla nalezena i u steroidních alkaloidů. Ty produkují rostliny z rodu *Sarcococca* a *Buxus*, čeledi *Buxaceae*, přičemž podrobněji byly prozkoumány alkaloidy z druhu *S. saligna* a *S. hookeriana*. V případě *S. saligna* byly izolovány látky vysoce inhibující AChE a zároveň některé z nich jsou selektivní i pro BChE. Stejně je tomu i u *S. hookeriana*, jehož produkty rovněž inhibují oba enzymy [57].

Významná inhibice byla objevena i v extraktu z rostliny *B. natalensis*, kterou využívali šamani ke zlepšení paměti u starších lidí v afrických zemích [57].

1.6.4 Další přírodní látky s anti-AChE aktivitou

I jiné produkty rostlin, než alkaloidy, mohou být silnými inhibitory AChE. Mezi takové patří např. terpenoidy, steroly, fenolické sloučeniny, flavonoidy apod [57].

Rostlina rodu *Ajuga bracteosa*, čeledi *Lamiaceae*, má léčivé účinky využívané v tradiční pákistánské medicíně. Diterpenoid izolovaný z této rostliny má inhibiční působení

jak na AChE, tak na BChE. Významná inhibice je přitom způsobena přítomností methoxyskupiny ve struktuře rostlinného produktu [57].

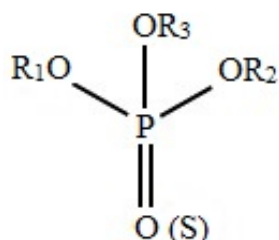
Extrakce rostliny *Knema laurina*, čeledi *Myristicaceae*, poskytla 5 derivátů alkenylfenolu a kyseliny salicylové. Ukázalo se, že všechny deriváty obsahující kyselou karboxylovou skupinu jsou velmi dobrými inhibitory AChE a při methylaci této skupiny inhibiční aktivita výrazně klesla [57].

Testováním extraktu z kořenů rostliny *Morus lhou*, čeledi *Moraceae*, byla zjištěna produkce několika flavonoidů, přičemž u většiny z nich byla prokázána anti-AChE aktivita. Flavonoidy se substituenty patří mezi nekompetitivní inhibitory, zatímco ty nesubstituované mezi smíšené inhibitory. Většina z nich inhibuje navíc i BChE [57].

1.6.5 Ireverzibilní inhibitory AChE

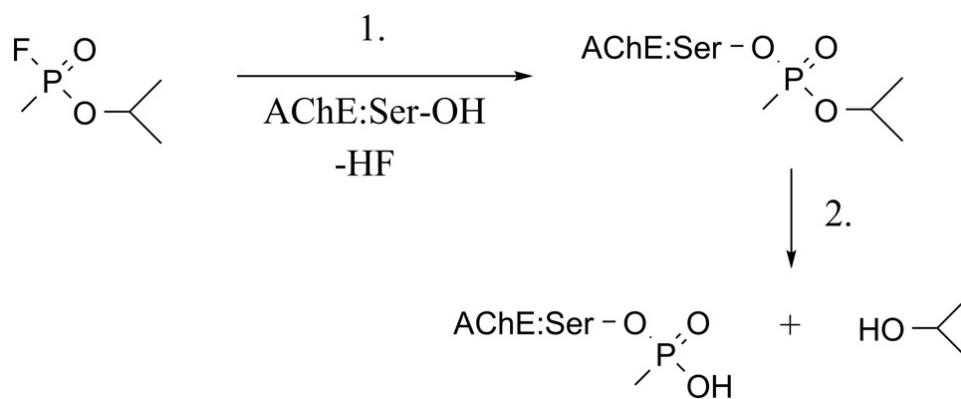
1.6.5.1 Organofosfáty

Organofosfáty jsou estery kyseliny ortho-, thio- a pyro-fosforečné, které se používají jako pesticidy [56]. Obecná struktura je znázorněna na obrázku č. 8.



Obr. č. 8 Obecný strukturní vzorec organofosfátů – převzato a překresleno podle [48]

R₁ a R₂ jsou alkylové nebo arylové skupiny navázané na atom fosforu přímo, nebo přes atom kyslíku či síry. Skupina R₃ se na atom fosforu váže přes atom kyslíku či síry a může se jednat o halogenovou, alifatickou, aromatickou či dokonce heterocyklickou skupinu. Při hydrolýze daného organofosfátu je právě tato skupina uvolněna z atomu fosforu. Na obrázku 9 je zjednodušené schéma reakce organofosfátu (sarinu) s enzymem [27, 48].



Obr. č. 9 Schéma inhibice acetylcholinesterázy organofosfátem [27]

Ser-OH je hydroxylová skupina serinu v aktivním místě acetylcholinesterázy, na kterou se inhibitor váže. Ireverzibilní inhibice probíhá ve 2 krocích. V prvním kroku dochází k rychlé a reverzibilní inaktivaci enzymu – v tomto případě k inhibici AChE nervovým činidlem sarinem. V druhém pomalém a nevratném kroku pak vzniká velmi stabilní komplex enzym-inhibitor, tedy fosforylovaný enzym [27, 58, 59].

Toxicita organofosfátů tedy spočívá hlavně v nevratné fosforylaci esteráz v centrální nervové soustavě. Vazbou přímo do aktivního místa cholinesteráz (na serin) je jim umožněn přestup přes hematoencefalickou bariéru. Za normálních okolností acylový enzym rychle hydrolyzuje pro regeneraci volného enzymu, zatímco defosforylace enzymu je velice pomalá a fosforylovaný enzym tedy není schopen neurotransmitter hydrolyzovat. Porucha funkce AChE způsobuje hromadění ACh v synaptické šterbině, který nadměrně stimuluje muskarinové i nikotinové receptory, a dochází tak k zábraně neurotransmise. Tím nastávají všechny typy příznaků otravy:

- centrální znaky otravy vychází ze stimulace AChE přímo v centrální nervové soustavě, kdy se objevují příznaky jako úzkost, zmatenost, neklid, bolesti hlavy, třes, porucha soustředění až netečnost či dokonce křeče a bezvědomí,
- tzv. muskarinové příznaky se objevují při inhibici AChE ve žlázách a hladké svalovině a výsledkem je např. slzení, slinění, mióza, bradykardie nebo průjem,
- nikotinové příznaky vznikají při inhibici AChE v autonomních gangliích a kosterním svalstvu a projevují se bledostí, tachykardií a svalovými záškuby [48, 51].

Léky obsahující oximovou skupinu, např. obidoxim či trimedoxim, jsou však schopny oddělit organofosfát od aktivního místa, čímž ho opět aktivují. To lze ale uskutečnit jen po

určitý časový interval, který je pro každý organofosfát jiný – pohybuje se v rozmezí minut až hodin. Po uplynutí této doby inhibitor podléhá dealkylaci, tzv. stárnutí, kdy již enzym nelze reaktivovat [27].

Příkladem organofosfátového inhibitoru, jenž se dříve využíval k léčbě AD, je metrifonát. Tento inhibitor snadno prochází hematoencefalickou bariérou, čímž zaručuje dlouhodobou inhibici AChE i BChE. Kvůli nežádoucím účinkům, které vyvolával, se však již k léčbě AD nepoužívá [51].

Kromě výše zmíněných toxických účinků se látky z této skupiny někdy využívají i k terapeutickým účelům, zejména při léčbě glaukomu. Konkrétně se jedná o echothiofát, jenž snižuje nitrooční tlak, a diisopropylfluorofosfát, který způsobuje především miózu a mezi jeho vedlejší účinky patří inhibice AChE [48].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo ověření inhibičního účinku vybraných inhibitorů na aktivitu AChE. Pro testování bylo vybráno celkem osm bispyridiniových solí, které byly porovnány se standardními sloučeninami rivastigminem a galantaminem. Prostřednictvím spektrofotometrické Ellmanovy metody byly určeny koncentrace jednotlivých inhibitorů, které způsobí 50% inhibici enzymu (IC_{50}), dále hodnoty kinetických parametrů (V_{max} , K_M) pro různé aktivity enzymu (0,2, 0,1 a 0,05 U) a také byl určen typ inhibice u vybraných inhibitorů. Pro všechny soli byla stanovena hodnota rozdělovacího koeficientu (K_{ow}) v soustavě *n*-oktanol:voda a nakonec byly spočteny hodnoty inhibičních konstant (K_i) a topologické polární povrchové plochy (tPSA).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístrojová technika a pomůcky

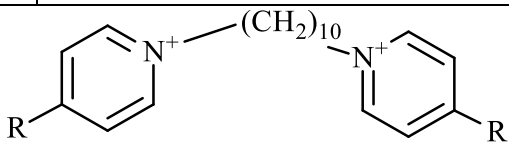
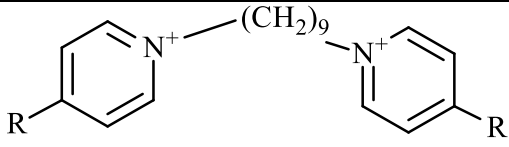
- UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Německo)
 - software – UV/VIS ChemStation
- kyvety skleněné – měrná tloušťka 1 cm
- jednokanálové mikropipety (Eppendorf, Německo)
- kádinky, odměrné baňky

3.2 Chemikálie a látky

- acetylcholinesteráza z paúhoře elektrického (Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR)
 - Navážka přibližně 10 mg enzymového preparátu byla rozpuštěna ve fosfátovém pufru (PBS) (0,1 mol/l, pH 7,4). Takto připravený roztok byl pak uchováván v uzavíratelných zkumavkách při -20 °C.
- fosfátový pufr PBS (phosphate buffered saline) (0,1 mol/l, pH 7,4)
 - Fosfátový pufr byl připraven navážením 4 g NaCl, 0,1 g KH₂PO₄·2H₂O, 1,45 g Na₂HPO₄·12H₂O, 0,1g KCl (všechny Penta, ČR) a rozpuštěním těchto látek v 500 ml redestilované vody.
- Ellmanovo činidlo (Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR)
 - Navážka 0,099 g DTNB byla rozpuštěna v 500 ml destilované vody za použití ultrazvukové lázně při 40 °C ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol/l).
- acetylthiocholin-jodid (Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR)
 - Navážka 2,892 mg ATCh byla rozpuštěna v 1 ml PBS. Takto připravený roztok (0,1 mol/l) byl podle potřeby měření dále ředěn pomocí PBS.
- standardy: galantamin hydrobromid, rivastigmin tartrát (Sigma-Aldrich spol. s.r.o., Praha, ČR)
 - Rozpuštěním testovaných inhibitorů v destilované vodě byly připraveny roztoky o koncentraci 0,01 mol/l, které byly podle potřeby dále ředěny.

- inhibitory: 1-8
 - Rozpuštěním testovaných bispyridiniových solí v dimethylsulfoxidu (DMSO) byly připraveny roztoky o koncentraci 0,01 mol/l, které byly podle potřeby dále ředěny destilovanou vodou. Přehled testovaných inhibitorů je uveden v tabulce 1. Látky byly připraveny a jejich čistota byla ověřena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové pod vedením Dr. Krátkého.

Tab. č. 1 Přehled testovaných inhibitorů

Označení	R	Mr [g/mol]
		
1.	OH	330,46
2.	Et	354,57
3.	CH ₂ C ₆ H ₅	478,71
4.	COOMe	414,54
5.	Me	326,52
		
6.	OH	316,44
7.	COOH	372,46
8.	COMe	368,51

3.3 Metody

3.3.1 Stanovení aktivity enzymu

Pro měření aktivity AChE byla využita tzv. Ellmanova metoda. Princip tohoto spektrofotometrického stanovení je popsán v kapitole 1.4.4.1.

V prvním kroku byl v kyvetě připraven srovnávací roztok smícháním:

- 1192 μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 800 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 8 μl ATCh (0,1 mol/l).

V druhém kroku byly pro vlastní stanovení aktivity enzymu pipetovány následující objemy:

- 1184 μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 800 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 8 μl ATCh (0,1 mol/l),
- 8 μl AChE.

Přídavek enzymu okamžitě odstartoval reakci, tudíž byl pipetován do směsi jako poslední, těsně před vložením kyvety do spektrofotometru. Následně byla měřena závislost absorbance A (při 412 nm) na čase t po dobu 70 s. Z rovnice regrese lineární závislosti pak byla získána hodnota y , kdy $x = 60$ podle definice katalytické aktivity 1 U. Výsledná aktivita enzymu byla získána vynásobením hodnoty y pomocí korekčního faktoru 17,67, jenž zahrnuje molární absorpční koeficient ($\epsilon = 14150 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), celkový objem reakční směsi (2 ml) a objem enzymového preparátu (0,008 ml). Celý popsaný postup pro měření aktivity enzymu byl opakován 5x a pro další aplikace byl použit průměrný výsledek těchto měření. Na základě aktuální naměřené aktivity enzymu pak bylo spočítáno, kolik je ho třeba přidat do reakční směsi, aby byla získána požadovaná aktivita (0,2 U, 0,1 U či 0,05 U).

3.3.2 Stanovení IC_{50}

Pro stanovení IC_{50} daného inhibitoru lze použít závislost, která platí mezi poměrem rychlostí neinhibované a inhibované hydrolýzy a koncentrací inhibitoru (v_0/v_i vs. $[I]$). Zde byla pro stanovení použita spektrofotometrická Ellmanova metoda.

V prvním kroku byl připraven srovnávací roztok pipetováním:

- 1520 μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 80 μl ATCh (0,001 mol/l).

V druhém kroku bylo provedeno vlastní měření roztoku bez inhibitoru, a to smícháním:

- x μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 80 μl ATCh (0,001 mol/l),
- y μl AChE.

Od množství enzymu přidaného do směsi dle jeho požadované aktivity se odvíjí i množství pufru, přičemž celkový objem roztoku je 2 ml. Měření vzorku bez inhibitoru přitom bylo vždy pro každou aktivitu provedeno 3x.

Stejně jako u stanovení aktivity enzymu byla měřena závislost absorbance A (při 412 nm) na čase t po dobu 70 s. Ze změny absorbance v čase pak byla vypočtena rychlost neinhibované reakce:

$$v_0 = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (17)$$

Následně byl proměřen roztok, který obsahoval inhibitor (v požadované koncentraci) v následujících poměrech:

- x μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 80 μl ATCh (0,001 mol/l),
- y μl AChE,
- z μl inhibitoru.

Pro stanovení inhibice enzymu byly zvoleny 4 koncentrace inhibitoru pipetovaného do vzorku, přičemž pro každou z těchto koncentrací bylo provedeno dvojité měření. Množství přidávaného enzymu se opět odvíjelo od požadované aktivity ve vzorku a množství pufru se upravilo podle objemu přidávaného enzymu a inhibitoru, a to do celkového objemu směsi 2 ml.

Opět byla měřena závislost absorbance A (při 412 nm) na čase t po dobu 70 s. Ze změny absorbance v čase pak byla vypočtena rychlost inhibované reakce:

$$v_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (18)$$

Nakonec byla sestrojena grafická závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce na koncentraci inhibitoru (v_0/v_i vs. $[I]$). Z rovnice regrese pak byla vypočtena hodnota IC_{50} jako x , kdy $y = 2$ podle definice IC_{50} .

3.3.3 Stanovení kinetických parametrů

Kinetické parametry – Michaelisova konstanta K_M a mezní rychlost V_{max} – byly stanoveny spektrofotometrickou metodou pro všechny požadované aktivity AChE v reakční směsi (0,2, 0,1 a 0,05 U). Pro stanovení bylo vybráno 10 koncentrací substrátu v rozmezí 10^{-3} - 10^{-6} mol/l, přičemž pro každou z těchto koncentrací proběhlo dvojité měření. Ve srovnávacím roztoku byl tentokrát místo substrátu použit enzym, jelikož jeho množství bylo neměnné. Opět byla pro zjištění reakční rychlosti měřena absorbance A (při 412 nm) v čase t po dobu 70 s a ze získaných dat sestrojen graf závislosti A na t . Z rovnice regrese grafické závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu ($1/[S]$) pak byly určeny hodnoty K_M , kdy $y = 0$, a hodnoty V_{max} , kdy $x = 0$.

3.3.4 Stanovení typu inhibice

Typ inhibice není závislý na aktivitě enzymu ve vzorku, tudíž si lze zvolit libovolnou aktivitu ze tří výše uvedených. Pro naše testování byla zvolena aktivita AChE 0,1 U a 4 koncentrace substrátu: $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $4 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l a $8 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Následující poměry složek vzorku jsou uvedeny pro koncentraci substrátu $2 \cdot 10^{-5}$ mol/l. V kyvetě byl nejprve připraven srovnávací roztok pipetováním:

- 1560 μ l PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μ l DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 40 μ l ATCh (0,001 mol/l).

Na vlastní měření byl připraven roztok vzorku bez inhibitoru smícháním:

- x μ l PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μ l DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),

- 40 μl ATCh (0,001 mol/l),
- y μl AChE.

Množství přidaného enzymu bylo spočítáno na základě jeho cílové aktivity (0,1 U). Od toho se pak odvíjí i množství pufru, přičemž celkový objem roztoku je 2 ml. Měření vzorku bez inhibitoru přitom bylo vždy provedeno 3x.

Opět byla měřena závislost absorbance A (při 412 nm) na čase t po dobu 70 s. Ze změny absorbance v čase pak byla vypočtena rychlost neinhibované reakce podle rovnice č. 17.

Následně byl proměřen roztok vzorku s inhibitorem v poměrech:

- x μl PBS (0,1 mol/l, pH 7,4),
- 400 μl DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l),
- 40 μl ATCh (0,001 mol/l),
- y μl AChE,
- z μl inhibitoru.

Pro stanovení inhibice enzymu byly zvoleny 4 koncentrace inhibitoru pipetovaného do vzorku, přičemž pro každou z těchto koncentrací bylo provedeno dvojité měření. Množství přidávaného enzymu se opět odvíjelo od požadované aktivity ve vzorku a množství pufru se upravilo podle objemu přidávaného enzymu a inhibitoru, a to do celkového objemu směsi 2 ml. Opět byla měřena závislost absorbance A (při 412 nm) na čase t po dobu 70 s. Ze změny absorbance v čase pak byla vypočtena rychlost inhibované reakce podle rovnice č. 18.

Pro všechny výše zmíněné koncentrace substrátu byla sestrojena společná grafická závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu ($1/[S]$). Kromě grafických závislostí dle Lineweavera a Burka byly pro porovnání sestrojeny i závislosti dle Dixona. Z grafů pak bylo určeno, o jaký typ inhibice se jedná (viz kapitola 1.1.3).

3.3.5 Stanovení rovnovážné disociační konstanty

V kapitole 1.1.4 je zmínka o spolehlivějším vyjádření efektivity inhibitoru, než je IC_{50} . Řeč je o rovnovážné disociační konstantě, kterou lze získat na základě přepočtu z IC_{50} – viz kapitola 1.1.4, rovnice 14, 15, 16. Dalším způsobem vyhodnocení K_i je grafické zpracování dle Dixona. Jedná se o závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti ($1/v$) na koncentraci inhibitoru ($[I]$). Pro každou koncentraci substrátu ($[S]$) jsou přitom vyneseny body na přímce.

Extrapolací těchto přímk s různou [S] dojde k jejich protnutí v jednom bodě. Přenesením tohoto bodu na osu x se získá koncentrace inhibitoru rovná právě hodnotě K_i [60, 61].

3.3.6 Stanovení rozdělovacího koeficientu (K_{ow})

Rozdělovací koeficient je poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky v systému dvou omezeně mísitelných rozpouštědel,

$$K_{ow} = \frac{c_1}{c_2} \quad (19)$$

kde c_1 je koncentrace látky v organické fázi a c_2 je koncentrace látky ve vodné fázi. Stanovením jeho hodnoty lze určit lipofilitu látky, tedy její rozdělovací tendenci mezi vodou a organickým rozpouštědlem. Čím vyšší je přitom hodnota K_{ow} , tím větší je rozpustnost látky v organické fázi. Hodnota K_{ow} však závisí na okolních podmínkách jako je např. pH, teplota či iontová síla, a proto je vždy nutné definovat experimentální podmínky [62].

Pro stanovení K_{ow} bylo nejprve k 1,5 ml n -oktanolu přidáno 10 μ l roztoku daného inhibitoru (0,01 mol/l) a směs pak byla intenzivně protřepávána 15 min. Do kyvety byl odpipetován 1 ml této směsi a byla změřena její absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Tím byla získána absorbance, jejíž hodnota odpovídá 100 % inhibitoru v n -oktanolu.

V druhém kroku bylo ke směsi n -oktanolu s demineralizovanou vodou (v poměru 1:1 a celkovém objemu 3 ml) přidáno 10 μ l roztoku daného inhibitoru (0,01 mol/l), směs pak byla intenzivně protřepávána 15 min a poté centrifugována (při 3000 ot./min, po dobu 10 min). Do kyvety byl odpipetován 1 ml oktanolové vrstvy a následně změřena její absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě ($\%_o$) a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě ($\%_v$). Následně byly vypočteny hodnoty K_{ow} jednotlivých inhibitorů v soustavě n -oktanol:voda dle vztahu č. 19.

3.3.7 Stanovení molekulární polární povrchové plochy (PSA)

Pro docílení správného účinku orálně podávaného léčiva hrají významnou roli fyzikálně-chemické vlastnosti jeho molekuly. Těmito vlastnostmi je míněna především lipofilita (viz kapitola 3.3.6) a polární povrchová plocha (PSA) molekuly. Topologická PSA (tPSA) je vlastně novým přístupem ve výpočtu PSA (pouze na základě 2D struktury molekuly),

jelikož výpočet z 3D struktury je velice zdlouhavý a vyžaduje speciální počítačový program. V mnoha studiích přitom bylo dokázáno, že tPSA poskytuje téměř totožné výsledky jako 3D PSA – výjimku tvoří pouze makrocycly s velkým počtem polárních skupin, které jsou obvykle uprostřed kruhu a rozpouštědlo k nim tak nemá přístup [63, 64].

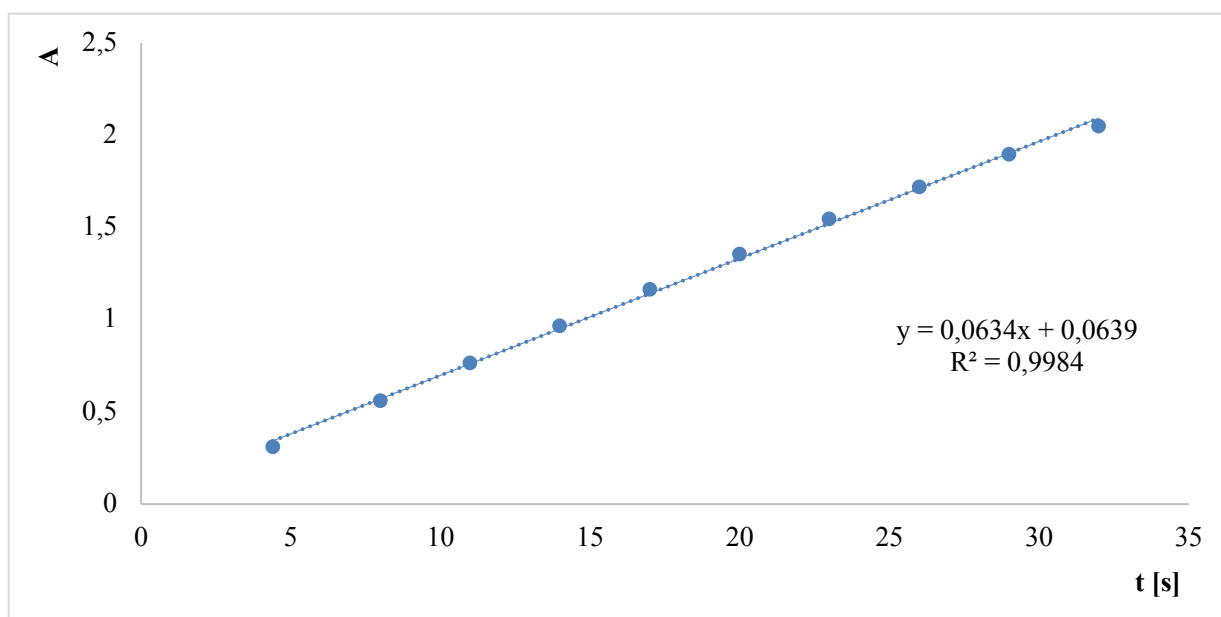
Vypočtením hodnoty tPSA lze zjistit její schopnost vytvářet vodíkové vazby a predikovat tak její střevní absorpci i penetraci hematoencefalickou bariérou. tPSA nižší než 70 Å² přitom znamená vyšší pravděpodobnost pro překonání hematoencefalické bariéry. Hodnota tPSA je závislá na konformaci molekuly a je definována jako součet povrchů polárních atomů v molekule. Těmito polárními atomy jsou obvykle atomy dusíku a kyslíku a na ně navázané vodíkové vazby. Při pohybu molekuly z vodného do lipofilního prostředí v membráně jsou polární skupiny zapojeny do desolvatace, tPSA tím pádem částečně představuje energii spojenou s membránovým transportem molekuly [63, 64].

Hodnoty tPSA jednotlivých inhibitorů byly stanoveny na základě analýzy struktury jejich molekuly pomocí počítačového programu ChemDraw.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení aktivity enzymu

Aktivita enzymu byla stanovena pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody a vypočtena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1. Příklad průběhu reakce je znázorněn na obrázku 10.



Obr. č. 10 Příklad vyhodnocení aktivity enzymu (závislost absorbance na čase)

4.1.1 Výpočet aktivity enzymu

Pro ilustraci výpočtu aktivity AChE byla použita rovnice regrese z přímkové závislosti absorbance na čase v předchozí kapitole (obr. 10).

$$y = 0,0634x + 0,0639$$

$$y = 0,0634 \cdot 60 + 0,0639$$

$$y = 3,8679$$

$$\text{aktivita AChE} = 3,8679 \cdot 17,67 \text{ (korekční faktor)}$$

$$\text{aktivita AChE} = 68,35 \text{ U/ml}$$

4.1.2 Výpočet objemu enzymu v reakční směsi

Na základě aktuální naměřené aktivity enzymu bylo vypočteno jeho množství potřebné pro dosažení požadované aktivity v reakční směsi (0,2 U, 0,1 U nebo 0,05 U) o objemu 2 ml.

Pro představu je v tabulce 2 uveden výpočet objemu enzymu pro dosažení aktivity 0,2 U v testovaném roztoku.

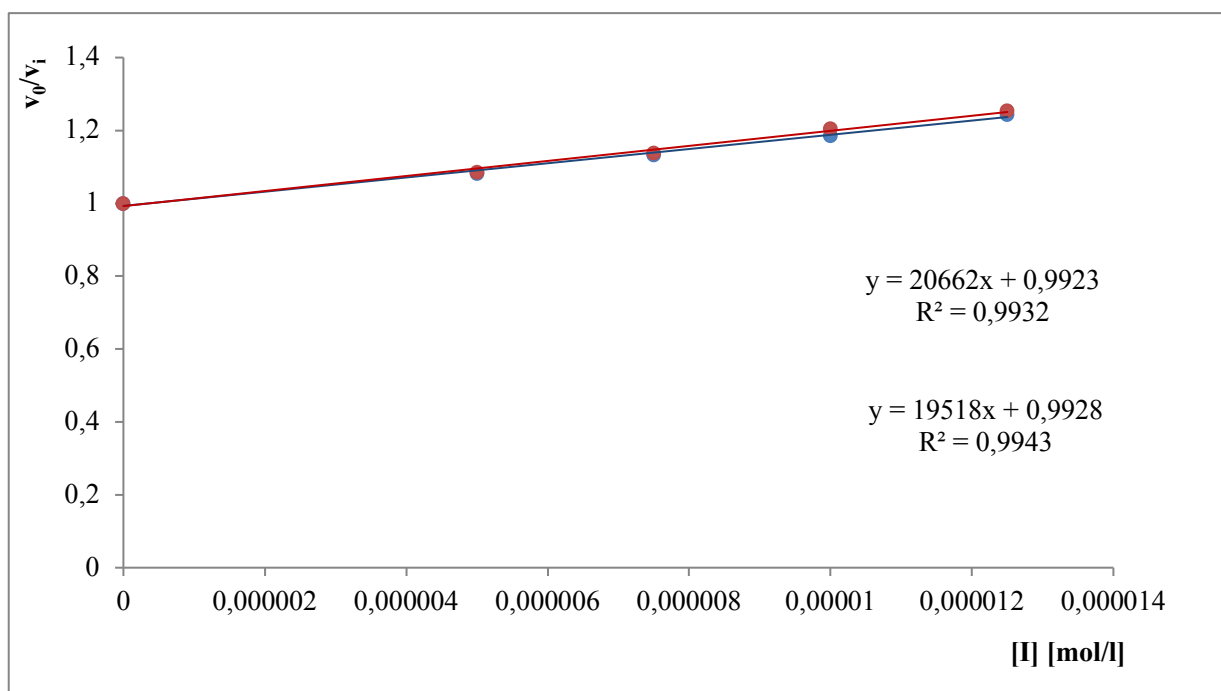
Tab. č. 2 Výpočet objemu enzymu v reakční směsi

Měření	Aktivita AChE [U/ml]	V_{AChE} [μl]
1.	68,35	$V_{\text{AChE}} = 0,2/66,81 \cdot 2000$ $V_{\text{AChE}} = 6 \mu\text{l}$
2.	62,43	
3.	66,43	
4.	68,14	
5.	68,68	
Průměr aktivity AChE = 66,81 U/ml		

4.2 Stanovení IC_{50}

Hodnota IC_{50} byla stanovena pomocí spektrofotometrické Ellmanovy metody a vypočtena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2.

Ze změny absorbance v čase byla vypočtena reakční rychlost pro neinhibovanou (v_0) a inhibovanou (v_i) reakci, přičemž inhibitory byly přidávány v různých koncentracích. Následně byla vždy sestrojena grafická závislost poměru těchto rychlostí na koncentraci inhibitoru (v_0/v_i vs. $[I]$) – příklad je znázorněn na obrázku 11. Z rovnice regrese této přímkové závislosti pak byla dopočtena hodnota IC_{50} jako x , kdy $y = 2$ podle definice IC_{50} .



Obr. č. 11 Vyhodnocení inhibiční účinnosti testovaného inhibitoru č. 8

4.2.1 Výpočet IC_{50}

V tabulce 3 jsou pro znázornění výpočtu IC_{50} rovnice regrese převzaty z grafu v předchozí kapitole (obr. č. 11).

Tab. č. 3 Příklad výpočtu IC_{50} pro inhibitor 8

Měření a	Měření b
$y = 20662x + 0,9923$	$y = 19518x + 0,9928$
$2 = 20662x + 0,9923$	$2 = 19518x + 0,9928$
$x = 4,8771 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$	$x = 5,1604 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$
Průměr $IC_{50} = 5,0188 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$	

Výsledky měření IC_{50} pro tři testované aktivity (0,2 U, 0,1 U a 0,05 U) u všech inhibitorů jsou spolu se směrodatnou odchylkou uvedeny v tabulce 4.

Tab. č. 4 Výsledky inhibiční koncentrace bispyridiniových solí pro aktivitu acetylcholinesterázy 0,2 U, 0,1 U a 0,05 U

Inhibitor	Aktivita AChE		
	0,2 U/ml	0,1 U/ml	0,05 U/ml
	IC ₅₀ [μmol/l]		
1.	2,47 ± 0,06	1,59 ± 0,02	1,04 ± 0,01
2.	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,10 ± 0,01
3.	0,52 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,10 ± 0,01
4.	4,25 ± 0,22	3,24 ± 0,11	0,16 ± 0,01
5.	0,12 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01
6.	14,44 ± 0,18	10,27 ± 0,03	7,23 ± 0,16
7.	17,28 ± 0,13	15,36 ± 0,21	10,37 ± 0,40
8.	50,19 ± 1,42	38,46 ± 0,79	32,63 ± 0,30
Rivastigmin	75,88 ± 0,43	34,88 ± 1,77	27,02 ± 0,27
Galantamin	2,12 ± 0,02	1,36 ± 0,02	1,33 ± 0,04

Podle definice IC₅₀ je nejúčinnější inhibitor ten, který dosahuje těch nejnižších hodnot IC₅₀. Při všech testovaných aktivitách enzymu se jako nejefektivnější jevil inhibitor č. **5** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methyl-1-pyridinium)).

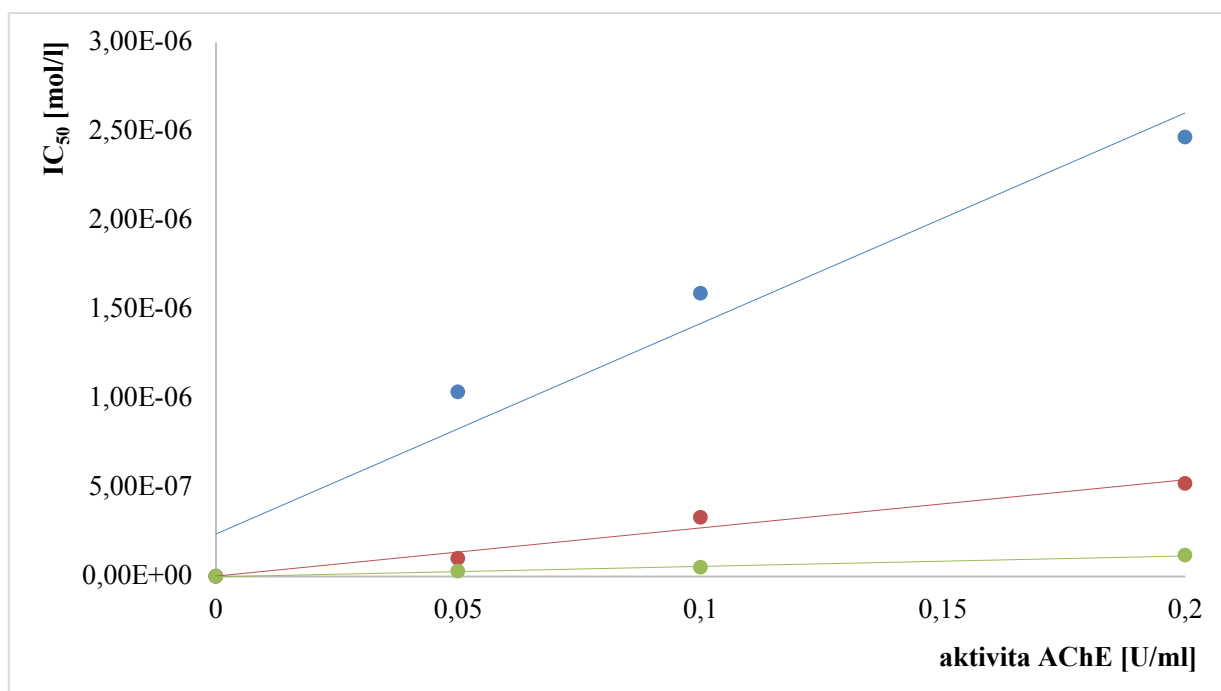
Naopak nejnižší účinnost při všech testovaných aktivitách AChE byla zaznamenána u inhibitoru č. **8** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetyl-1-pyridinium)).

Při všech aktivitách AChE byla stanovena střední inhibiční koncentrace také pro galantamin a rivastigmin. Pro všechny aktivity acetylcholinesterázy vykazoval rivastigmin nižší účinnost než testované látky, mimo inhibitor č. **8** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetyl-1-pyridinium)), který při aktivitách 0,1 U a 0,05 U měl o něco nižší účinnost než rivastigmin.

Naproti tomu galantamin měl vyšší účinnost při téměř všech testovaných aktivitách enzymu. Výjimku tvoří inhibitory č. **2** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-ethyl-1-pyridinium)), **3** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-benzyl-1-pyridinium)) a **5** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methyl-1-

pyridinium)), které vykazovaly vyšší inhibiční účinek. Při aktivitě AChE 0,05 U vykazovaly téměř všechny testované látky (mimo inhibitor č. **6** (1,1'-nonan-1,9-diyl)bis(4-hydroxy-1-pyridinium)), **7** (1,1'-nonan-1,9-diyl)bis(4-karboxy-1-pyridinium)) a **8** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetyl-1-pyridinium))) vyšší inhibiční účinek než standardní látka galantamin.

Z uvedeného vyplývá, že reakční podmínky včetně aktivity enzymu mají vliv na hodnotu IC_{50} , tedy na účinnost inhibitoru. Důkazem tohoto tvrzení je i grafická závislost na obrázku 12. U inhibitoru č. **1** (1,1'-dekan-1,10-diyl)bis(4-hydroxy-1-pyridinium)) – modře – je viditelné výrazné snížení jeho inhibiční účinnosti (tedy zvýšení hodnoty IC_{50}) se vzrůstající aktivitou AChE. Zároveň je z obrázku zřetelný i fakt, že u různých látek se pokles jejich inhibičního účinku liší. To může být způsobeno odlišnou afinitou jednotlivých inhibitorů k enzymu.



Obr. č. 12 Závislost IC_{50} na aktivitě enzymu (pro inhibitor č. 1, 3 a 5)

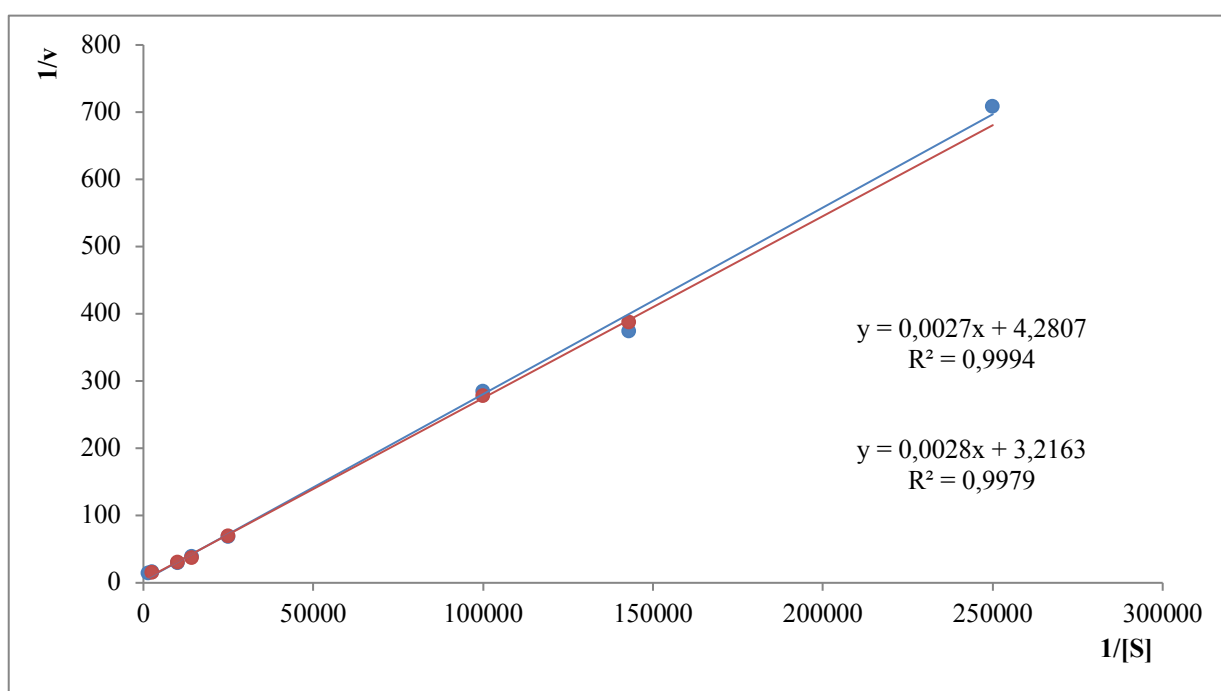
Aktivitu ChEs lze v mozku pacienta stanovit až po jeho smrti (post mortem analýza tkání). Pokud by se tento problém v budoucnu vyřešil a bylo by možné stanovit aktuální aktivitu ChEs v mozku u pacientů s neurodegenerativním onemocněním, testování nových látek by mohlo probíhat za přesně definované aktivity ChEs. V současné době si každá výzkumná skupina stanovuje vlastní reakční podmínky, tudíž je obtížné porovnání výsledků inhibičních koncentrací v širším měřítku.

4.3 Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení hodnot kinetických parametrů K_M a V_{max} bylo vybráno 10 koncentrací substrátu v rozmezí 10^{-3} - 10^{-6} mol/l, přičemž pro každou z těchto koncentrací proběhlo dvojité měření. Podrobný postup stanovení byl popsán v kapitole 3.3.3.

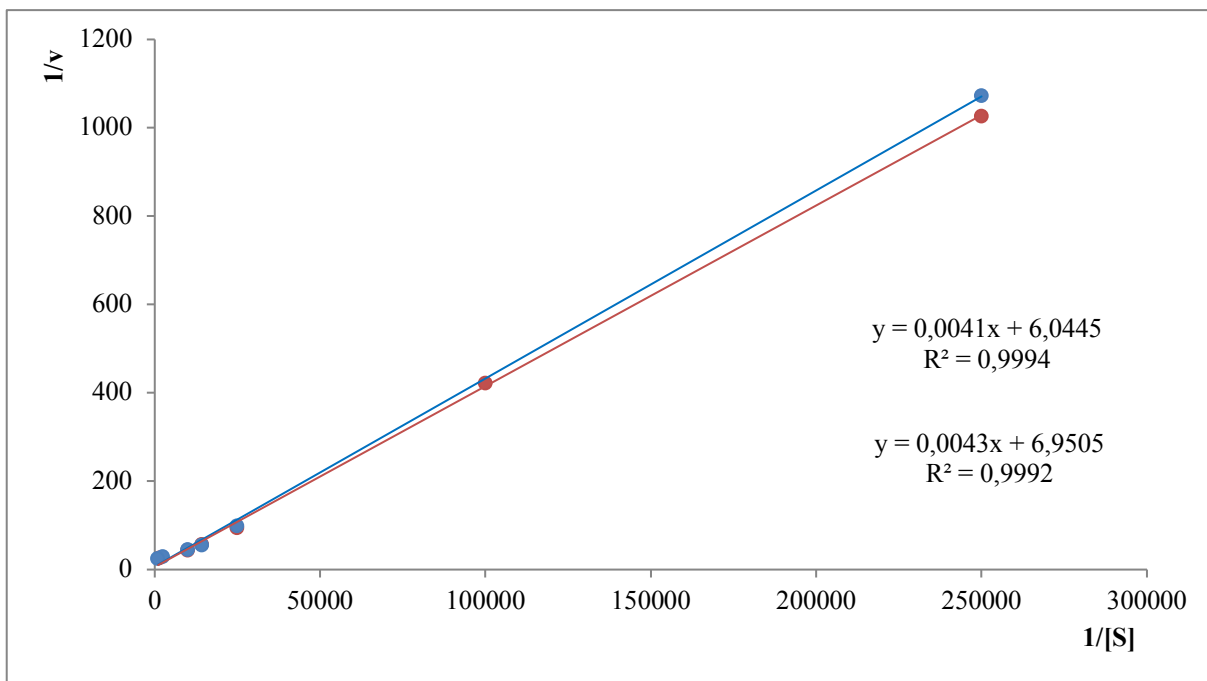
Pro zjištění rychlosti reakce (v) byla nejprve měřena změna absorbance v čase. Následně byl sestaven graf závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$ podle Lineweavera a Burka (příklad je znázorněn na obrázku č. 13) a z rovnice regrese pak byla spočtena hodnota K_M i V_{max} podle rovnice:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (20)$$

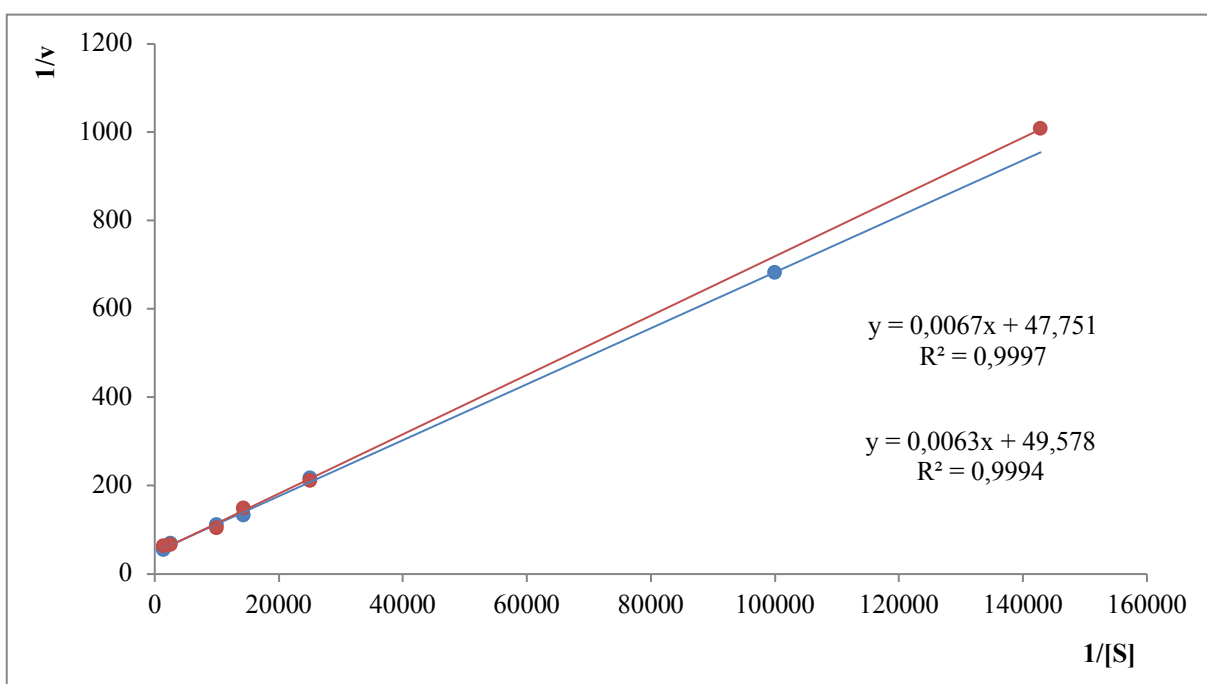


Obr. č. 13 Příklad stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,2 U

Grafické závislosti pro výpočet K_M a V_{max} při ostatních aktivitách enzymu (0,1 a 0,05 U) jsou zobrazeny na obrázcích č. 14 a 15.



Obr. č. 14 Stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,1 U



Obr. č. 15 Stanovení kinetických parametrů pro aktivitu AChE 0,05 U

4.3.1 Výpočet kinetických parametrů K_M , V_{max}

Znázornění výpočtu kinetických parametrů K_M a V_{max} je uveden v tabulce č. 5, přičemž byly použity rovnice regrese z grafu v předchozí kapitole (obr. 13).

Tab. č. 5 Příklad výpočtu kinetických parametrů K_M a V_{max}

Aktivita AChE = 0,2 U			
Výpočet K_M		Výpočet V_{max}	
Měření a	Měření b	Měření a	Měření b
$y = 0,0027x + 4,2807$	$y = 0,0028x + 3,2163$	$y = 0,0027x + 4,2807$	$y = 0,0028x + 3,2163$
$K_M/V_{max} = 0,0027$	$K_M/V_{max} = 0,0028$	$1/V_{max} = 4,2807$	$1/V_{max} = 3,2163$
$K_M = 0,0027 \cdot 0,2336$	$K_M = 0,0028 \cdot 0,3109$	$V_{max} = 0,2336 \text{ s}^{-1}$	$V_{max} = 0,3109 \text{ s}^{-1}$
$K_M = 6,3078 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$	$K_M = 8,7056 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$	Průměr $V_{max} = 0,2723 \text{ s}^{-1}$	
Průměr $K_M = 7,5067 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$			

Výsledky měření kinetických parametrů K_M a V_{max} při všech testovaných aktivitách enzymu spolu se směrodatnou odchylkou jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. č. 6 Výsledky kinetických parametrů K_M a V_{max} pro všechny testované aktivity AChE

Aktivita AChE [U]	K_M [mmol/l]	V_{max} [s^{-1}]
0,2	$0,75 \pm 0,12$	$0,2723 \pm 0,0387$
0,1	$0,65 \pm 0,03$	$0,1541 \pm 0,0113$
0,05	$0,13 \pm 0,01$	$0,0206 \pm 0,0004$

Z výsledných hodnot kinetických parametrů je vidět klesající tendence hodnot K_M i V_{max} s klesající aktivitou enzymu. Podle definice kinetických parametrů v kapitole 1.1.2 mezní rychlost klesá, protože méně aktivní enzym převede méně substrátu na produkt. Při nízké aktivitě enzymu zároveň klesá Michaelisova konstanta, jelikož pro dosažení poloviny mezní rychlosti postačí i menší koncentrace S.

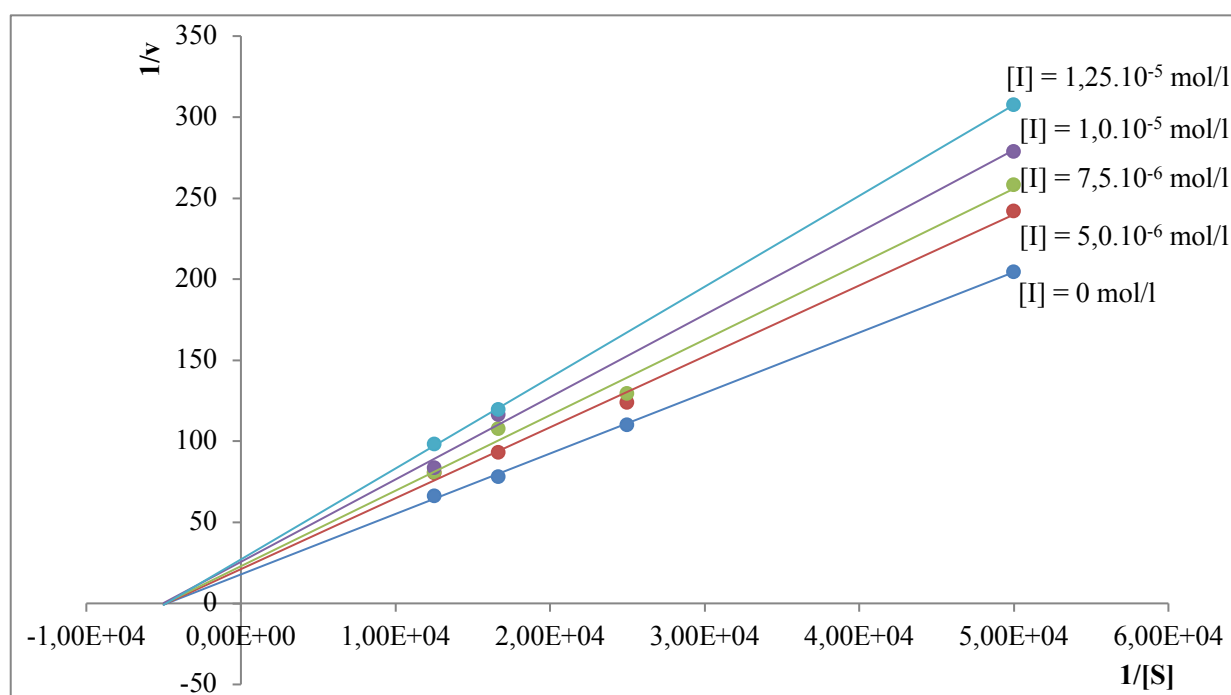
4.4 Stanovení typu inhibice

Určení typu inhibice bylo provedeno u inhibitoru č. 5, 8 a u standardních látek. Pro testování byly zvoleny 4 koncentrace substrátu: $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$ a $8 \cdot 10^{-5}$

mol/l a aktivita enzymu 0,1 U. Výsledná lineární závislost pro jednotlivé koncentrace substrátu je přitom vždy průměrem ze dvou měření. Podrobný postup spektrofotometrického stanovení typu inhibice byl uveden v kapitole 3.3.4.

Ze závislosti absorbance na čase byla zjištěna reakční rychlost neinhibované reakce (v_0) a inhibované reakce (v_i) při různých koncentracích inhibitoru. Pro všechny zvolené koncentrace substrátu byla pak sestrojena společná grafická závislost dle Lineweavera a Burka: závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu ($1/[S]$) a rovněž závislost dle Dixonova: $1/v$ vs. koncentrace inhibitoru ($[I]$).

Výsledné grafické závislosti se využívají k určení typu inhibice, přičemž z rovnic regrese je možné vypočítat kinetické parametry. Podle toho, jak se K_M a V_{max} mění, lze určit, o jaký typ inhibice se jedná. Příklad stanovení byl proveden pro inhibitor č. 8 a je znázorněn na obrázku 16.



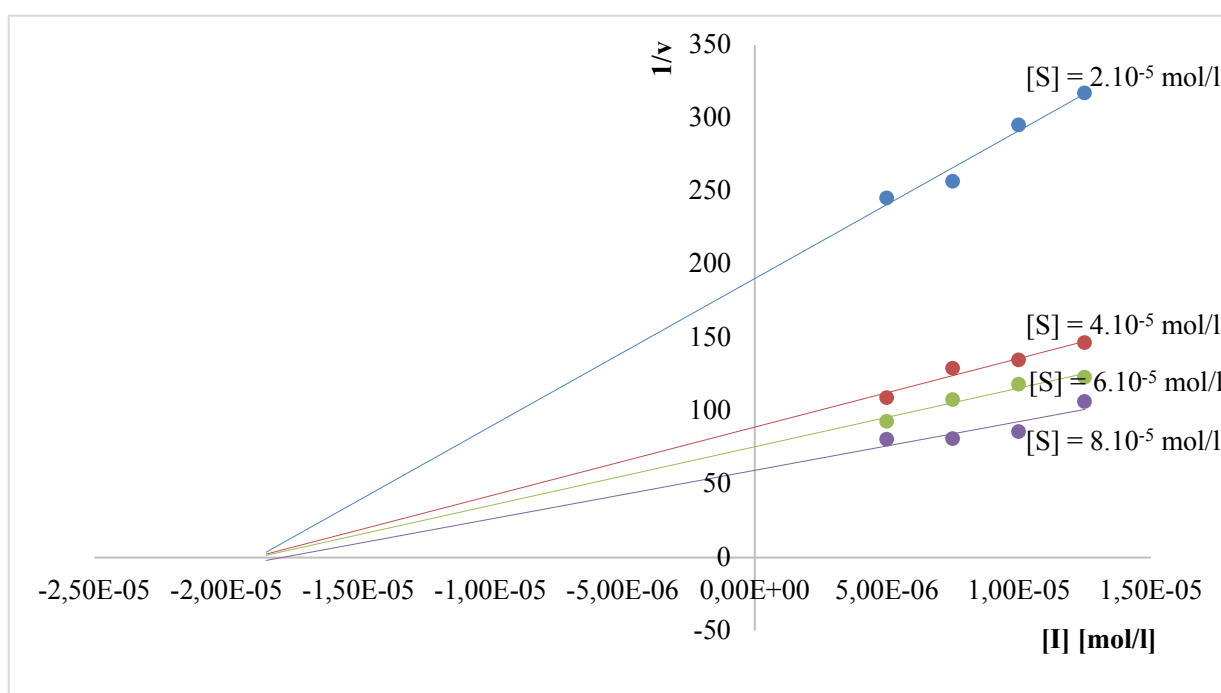
Obr. č. 16 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 8 dle Lineweavera a Burka (0,1 U)

V tabulce 7 jsou pro příklad uvedeny vypočtené hodnoty K_M a V_{max} z rovnic regrese převzatých z grafu uvedeného výše (obr. č. 16). S téměř neměnnou hodnotou K_M a zároveň klesající V_{max} se vzrůstající $[I]$ je potvrzen nekompetitivní typ inhibice AChE.

Tab. č. 7 Výpočet hodnot K_M a V_{max} pro inhibitor č. 8

[I] [mol/l]	K_M [mol/l]	V_{max} [s ⁻¹]
$1,25 \cdot 10^{-5}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$	0,0368
$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,99 \cdot 10^{-4}$	0,0390
$7,50 \cdot 10^{-6}$	$2,05 \cdot 10^{-4}$	0,0436
$5,00 \cdot 10^{-6}$	$2,08 \cdot 10^{-4}$	0,0473
0,00	$2,07 \cdot 10^{-4}$	0,0559

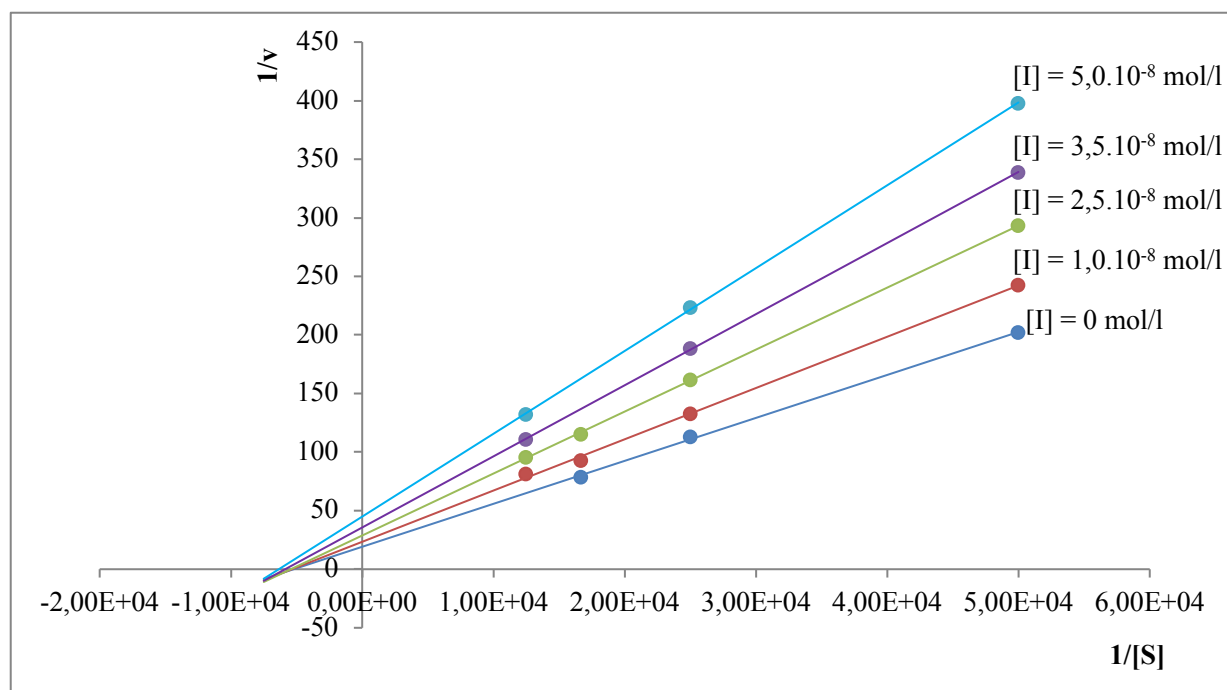
Grafické znázornění dle Dixona bylo sestrojeno i přes potvrzení typu inhibice výpočtem kinetických parametrů, neb je spolehlivějším ukazatelem typu inhibice. Zde je rovněž zřejmý nekompetitivní typ inhibice acetylcholinesterázy. Příklad stanovení byl proveden pro inhibitor č. 8 a je znázorněn na obrázku 17.



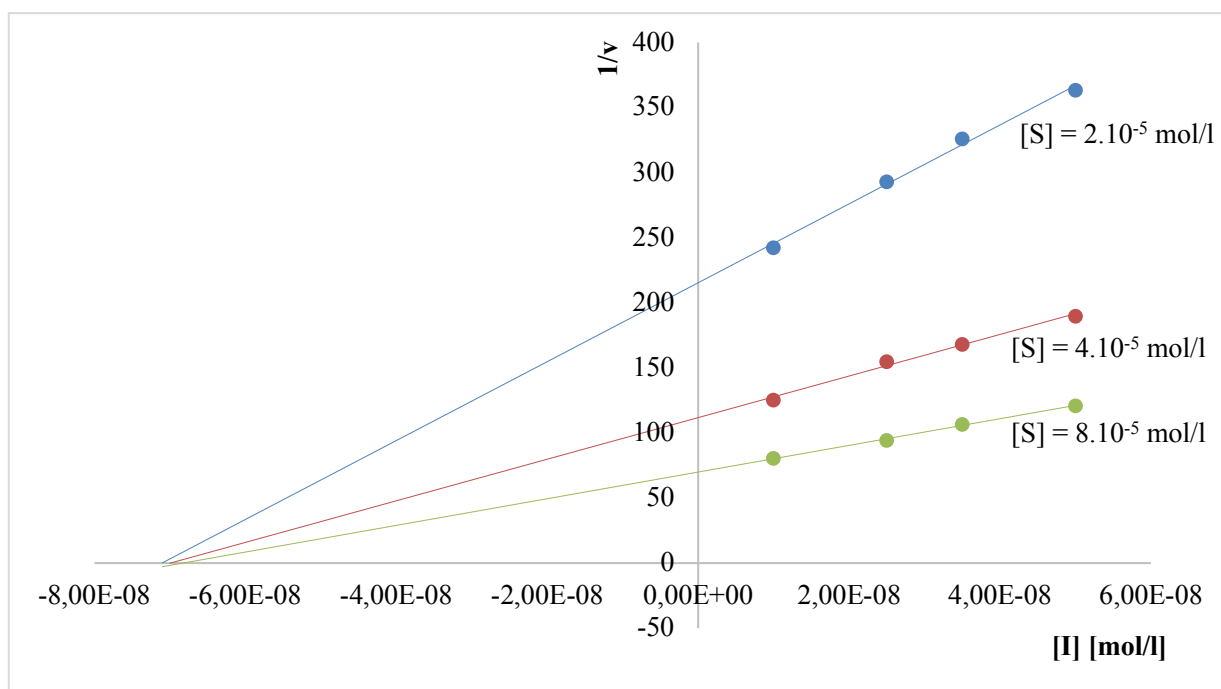
Obr. č. 17 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 8 dle Dixona (0,1 U)

Typ inhibice byl stanoven pomocí obou grafických závislostí i pro další látky, konkrétně pro inhibitor č. 5 a standardní látky (rivastigmin, galantamin). Výsledné závislosti jsou znázorněny na obrázcích níže.

Na obrázcích č. 18 a 19 níže jsou sestrojeny grafické závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$ dle Lineweavera a Burka a $1/v$ vs. $[I]$ dle Dixona. Takto byl ověřen typ inhibice AChE inhibitorem č. 5.



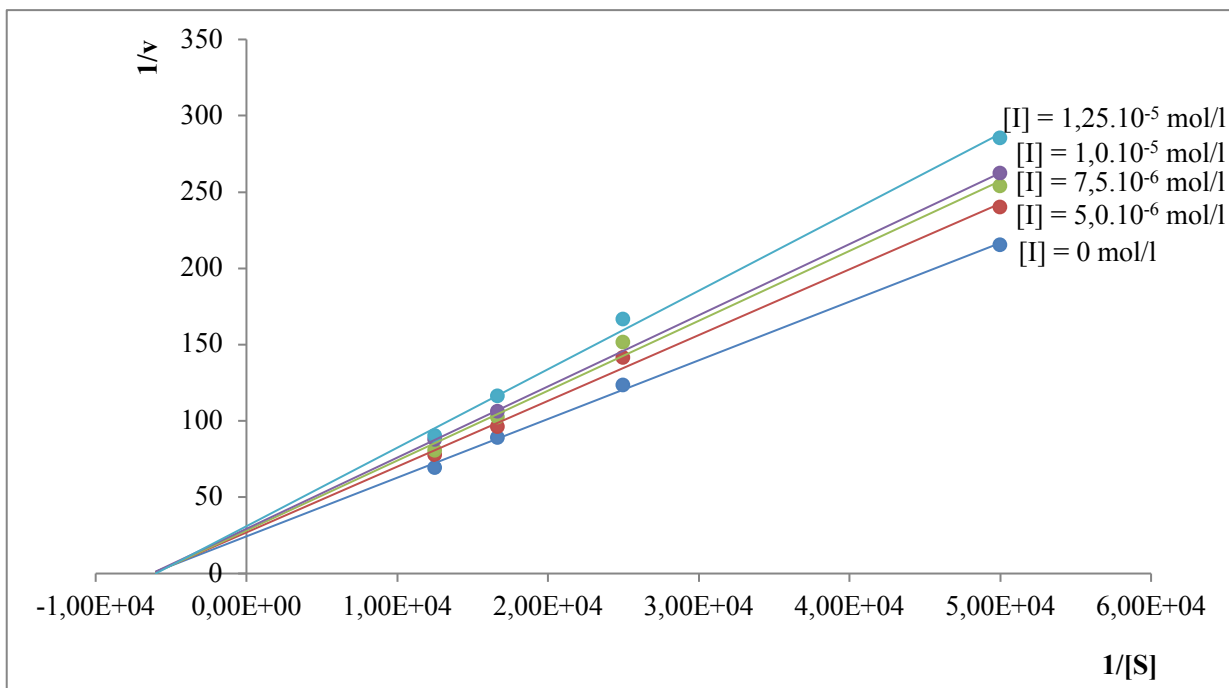
Obr. č. 18 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 5 dle Lineweavera a Burka (0,1 U)



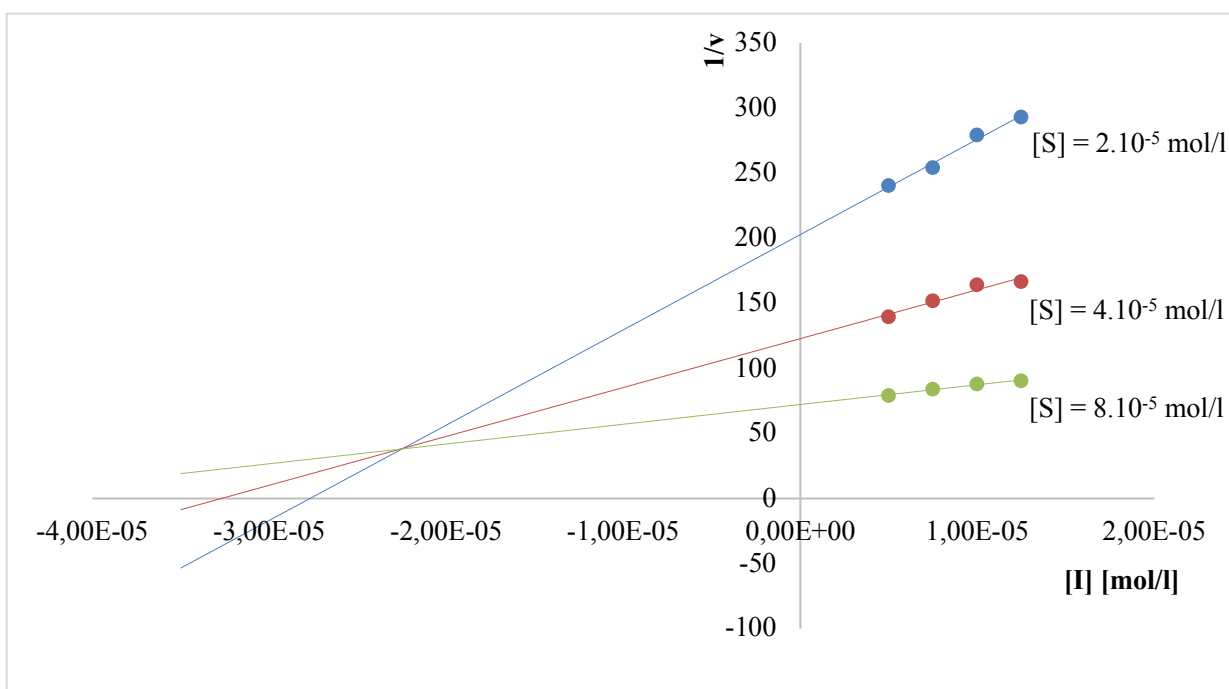
Obr. č. 19 Určení typu inhibice AChE inhibitorem č. 5 dle Dixona (0,1 U)

V grafické závislosti dle Lineweavera a Burka se hodnota K_M s proměnlivou koncentrací I nemění, zatímco hodnota V_{max} klesá se zvyšující se koncentrací I. V grafu dle Dixona se naopak rychlost reakce zvyšuje se vzrůstající koncentrací S. Z obou grafů je tedy patrné, že se jedná o nekompetitivní typ inhibice.

Na obrázcích č. 20 a 21 jsou sestaveny grafické závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$ dle Lineweavera a Burka a $1/v$ vs. $[I]$ dle Dixona. Tentokrát pro standardní látku rivastigmin.



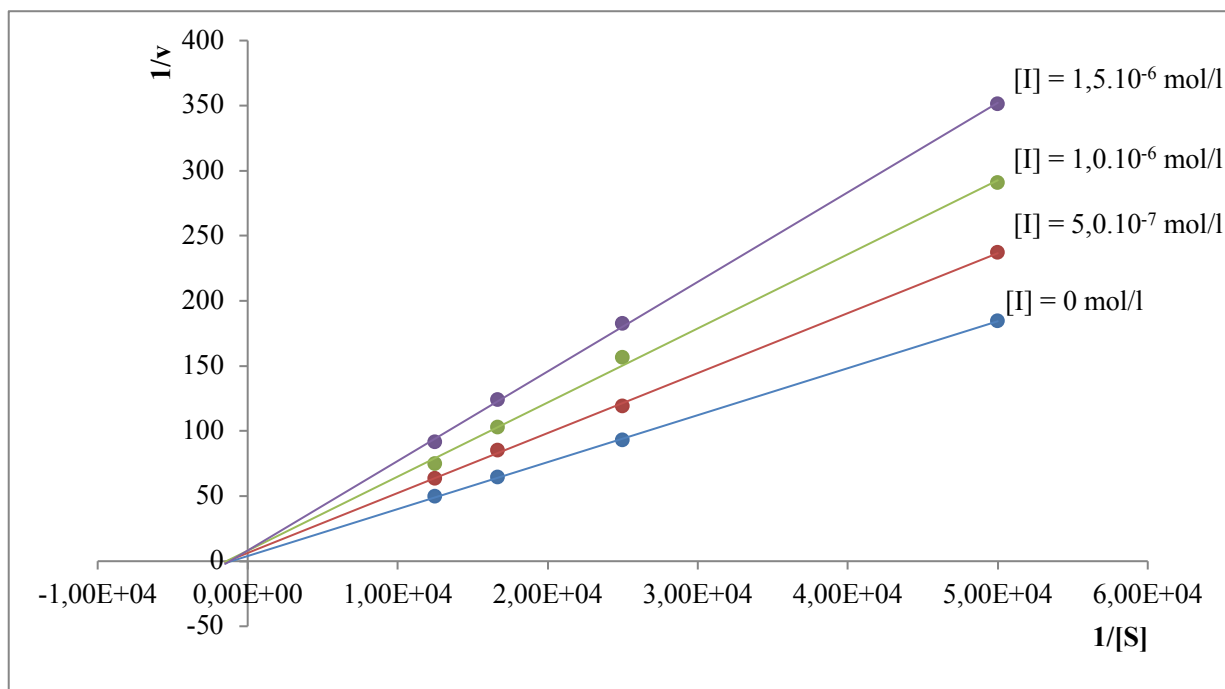
Obr. č. 20 Určení typu inhibice AChE rivastigminem dle Lineweavera a Burka (0,1 U)



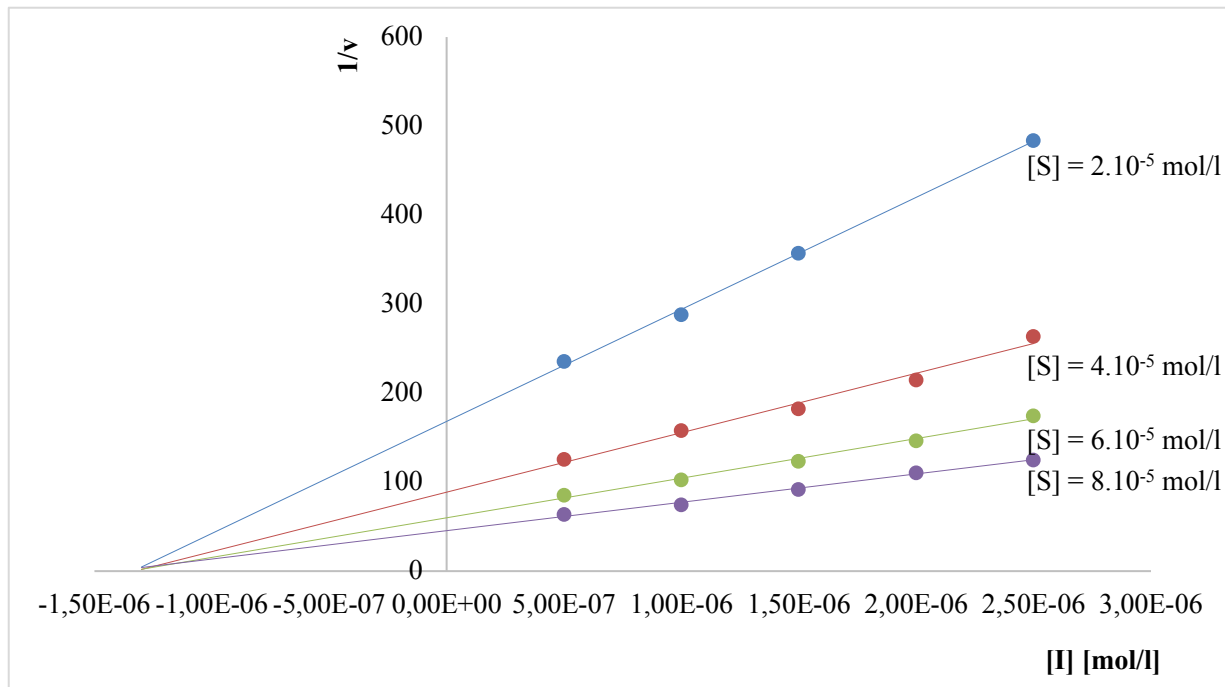
Obr. č. 21 Určení typu inhibice AChE rivastigminem dle Dixona (0,1 U)

Grafické znázornění dle Lineweavera a Burka ukázalo na jasně nekompetitivní typ inhibice. Přesnější určování typu inhibice však poskytuje Dixonův graf, podle kterého je typ inhibice rivastigminem smíšený. Jedná se tedy o smíšený nekompetitivní inhibitor.

Na obrázcích č. 22 a 23 jsou sestrojeny grafické závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$ dle Lineweavera a Burka a $1/v$ vs. $[I]$ dle Dixona, a to pro druhou standardní látku – galantamin.



Obr. č. 22 Určení typu inhibice AChE galantaminem dle Lineweavera a Burka (0,1 U)



Obr. č. 23 Určení typu inhibice AChE galantaminem dle Dixona (0,1 U)

Na základě obou grafických znázornění galantamin vykazuje nekompetitivní typ inhibice AChE.

Po zhodnocení všech výše zobrazených grafických závislostí dle Lineweavera a Burka a dle Dixonova a také na základě měnících se hodnot kinetických parametrů jsme usoudili, že u všech testovaných látek se uplatňuje nekompetitivní typ inhibice acetylcholinesterázy.

4.5 Stanovení rovnovážné disociační konstanty

U všech inhibitorů testovaných na typ inhibice (inhibitor č. 5, 8, rivastigmin, galantamin) byl zjištěn nekompetitivní typ inhibice – viz kapitola 4.4. Vzhledem ke strukturní podobnosti všech testovaných bispyridiniových solí je možné předpokládat, že všechny testované látky budou vykazovat nekompetitivní typ inhibice. Ze znalosti typu inhibice a hodnot IC_{50} je možné vypočítat K_i pro všechny testované látky, přičemž hodnota K_i se rovná hodnotě IC_{50} , jak je uvedeno v kapitole 1.1.4. Vypočítané hodnoty K_i pro všechny testované látky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. č. 8 Vypočítané hodnoty K_i jednotlivých inhibitorů

Inhibitor	K_i [mol/l]
1.	$1,59 \cdot 10^{-6}$
2.	$2,59 \cdot 10^{-7}$
3.	$3,32 \cdot 10^{-7}$
4.	$3,24 \cdot 10^{-6}$
5.	$5,08 \cdot 10^{-8}$
6.	$1,03 \cdot 10^{-5}$
7.	$1,54 \cdot 10^{-5}$
8.	$3,85 \cdot 10^{-5}$
Rivastigmin	$3,49 \cdot 10^{-5}$
Galantamin	$1,36 \cdot 10^{-6}$

Z výsledných hodnot v tabulce 8 je jasné, že nejvyšší inhibiční účinnost má inhibitor č. **5** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methyl-1-pyridinium)) s hodnotou $K_i = 5,08 \cdot 10^{-8}$ mol/l a naopak nejslabší inhibici AChE vykazuje inhibitor č. **8** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetyl-1-pyridinium)) s hodnotou $K_i = 3,85 \cdot 10^{-5}$ mol/l.

Pro zjištění hodnot rovnovážné disociační konstanty však lze využít i grafickou závislost dle Dixona. Zde jsou pro každou koncentraci substrátu vyneseny body na přímce a extrapolací těchto přímek dojde k jejich protnutí v jednom bodě. Přenesením tohoto bodu na osu x se získá koncentrace inhibitoru rovná právě hodnotě K_i . Příkladem takového vyhodnocení může být Dixonův graf pro standardní látku galantamin (viz obrázek č. 23, výše v textu), kde je hodnota K_i přibližně rovna $1,25 \cdot 10^{-6}$ mol/l.

4.6 Stanovení rozdělovacího koeficientu

Hodnoty K_{ow} byly stanoveny na základě postupu popsaného v kapitole 3.3.6. V tabulce č. 9 jsou uvedeny logaritmické hodnoty K_{ow} jednotlivých inhibitorů stanovené experimentálně a pomocí dvou počítačových programů (ChemDraw, ChemSketch). U experimentálních dat jsou navíc uvedeny směrodatné odchylky.

Tab. č. 9 Hodnoty rozdělovacího koeficientu v logaritmické formě pro testované inhibitory

Inhibitor	log K_{ow} (ChemDraw)	log K_{ow} (ChemSketch)	log K_{ow} (experiment)
1.	-3,44	-6,10	$-5,02 \pm 1,18$
2.	-2,80	-2,64	$-2,66 \pm 0,59$
3.	-0,73	-0,65	$-0,69 \pm 0,59$
4.	-4,92	-4,67	$-4,80 \pm 1,18$
5.	-3,86	-3,71	$-3,75 \pm 0,59$
6.	-3,97	-6,41	$-4,85 \pm 1,18$
7.	-4,99	-5,59	$-5,22 \pm 1,18$
8.	-5,45	-4,98	$-5,13 \pm 1,18$

Pomocí počítačových programů (ChemDraw, ChemSketch) a následně i experimentálně byly zjištěny hodnoty rozdělovacího koeficientu jednotlivých inhibitorů. Z výsledných záporných hodnot v tabulce č. 9 je zřejmé, že všechny inhibitory jsou hydrofilní. V takové podobě jsou dobře rozpustné ve vodném prostředí, přičemž některé z nich byly dokonce cíleně navrženy za využití molekulového modelování tak, aby dosáhly určité hydrofility. Ta je dána přítomností dvou kvartérních dusíků ve struktuře inhibitorů a chemicky se tedy jedná o soli (konkrétně bromidy). Zároveň lze říci, že experiment byl proveden správně, jelikož získané hodnoty jsou přibližně stejné jako z počítačového programu.

Podle tzv. Lipinského pravidla 5 lze orientačně určit, která látka projde buněčnou membránou a která nikoliv. Musí splňovat následující podmínky:

- hodnota K_{ow} je ideálně v rozmezí 4-5,
- molární hmotnost je nižší než 500 g/mol,
- musí obsahovat méně než 5 donorů H do vodíkové vazby (např. skupiny –NH, –NH₂, –OH),
- musí obsahovat méně než 10 akceptorů H za tvorby vodíkové vazby (např. atomy N₂, O₂) [65].

Dle struktury a molární hmotnosti inhibitorů v tabulce 1 i výsledných experimentálně stanovených hodnot K_{ow} lze říci, že testované látky splňují většinu těchto pravidel.

4.7 Stanovení polární povrchové plochy

Stanovením hodnoty tPSA lze zjistit schopnost molekuly vytvářet vodíkové vazby. Čím méně je přítom těchto vazeb na povrchu molekuly, tím méně hydrofilní bude. Hodnota tPSA závisí na konformaci molekuly, tudíž ji lze vypočítat na základě strukturní analýzy dané látky. Hodnoty tPSA pro jednotlivé inhibitory uvedené v tabulce 10 byly vypočteny pomocí počítačového programu ChemDraw.

Tab. č. 10 Vypočtené hodnoty tPSA

Inhibitor	tPSA [Å²]
1.	46,48
2.	6,02
3.	6,02
4.	58,62
5.	6,02
6.	46,48
7.	80,62
8.	40,16

Jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.7, stanovením hodnoty tPSA lze určit, do jaké míry se molekula léku bude vstřebávat v gastrointestinálním traktu, či zda bude naopak procházet hematoencefalickou bariérou. Porovnáním vypočtených hodnot tPSA a experimentálně

stanovených hodnot K_{ow} jsme usoudili, že testované inhibitory budou dobře absorbovány ve střevech. Nízké hodnoty tPSA u inhibitoru č. 2, 3 a 5 sice naznačují opak, ale směřodatnějším ukazatelem je právě hodnota rozdělovacího koeficientu, podle níž jsou i tyto látky hydrofilní.

Testované hydrofilní bispyridiniové soli působí především na periferní cholinesterázy, čímž se stávají potencionálními léčivy onemocnění zvaného myasthenia gravis. Patologie nemoci spočívá v tvorbě autoprotilátek, které se váží na proteiny (receptory pro ACh) zapojené do neuromuskulární signalizace. Díky vazbě ACh na tyto receptory v nervosvalové ploténce je nervový vzruch za normálních podmínek zpracován na svalovou kontrakci. Při blokaci této vazby autoprotilátkami tím pádem dochází k selhání neuromuskulárního přenosu následované svalovou slabostí jako jednoho z hlavních příznaků této choroby. Nejúčinnější symptomatologickou léčbou jsou tedy v současné době inhibitory AChE, které zabraňují rozkladu ACh v nervosvalové ploténce a dají mu tak prostor pro delší působení [66, 67].

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo experimentální stanovení celkového účinku vybraných bispyridiniových solí na aktivitu acetylcholinesterázy.

Testováním inhibičního účinku vybraných inhibitorů byly některé z nich shledány efektivnějšími než ty, které jsou běžně využívány pro léčbu Alzheimerovy choroby. Jako nejvíce účinný se projevil inhibitor č. **5** (1,1'-dekan-1,10-diyl)bis(4-methyl-1-pyridinium)) s hodnotou IC_{50} rovnou $0,12 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$ při aktivitě AChE 0,2 U. Zároveň bylo prokázáno ovlivnění inhibiční účinnosti nejen reakčními podmínkami, ale také aktivitou enzymu.

U všech látek testovaných na typ inhibice byl zjištěn nekompetitivní typ inhibičního působení na enzym. Znamená to, že inhibitory nejsou strukturními analogy substrátu a neovlivňují tak afinitu mezi ním a enzymem.

Závěrem lze říci, že testovanou látkou vhodnou pro další zkoumání je inhibitor č. **5** (1,1'-dekan-1,10-diyl)bis(4-methyl-1-pyridinium)). Důvodem je již zmíněná vysoká účinnost inhibice AChE, dále splnění téměř všech Lipinského pravidel, dobrá rozpustnost ve vodě i jeho účinná absorpce v gastrointestinálním traktu.

6 ZDROJE

- [1] WAISKOPF, N., SOREQ, H., *Cholinesterase Inhibitors: From Molecular Mechanisms of Action to Current and Future Prospects*. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, 2015, str. 761–778, ISBN: 978-0-12-800159-2.
- [2] MCGLEENON, B. M., DYNAN, K. B., PASSMORE, A. P., *Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1999, 48 (4): str. 471–480.
- [3] ŠINKO, G., ČALIĆ, M., BOSAK, A., KOVARIK, Z., *Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes*. Analytical Biochemistry, 2007, 370 (2): str. 223–227.
- [4] BŘÍŽĎALA, J., *Multimediální učebnice chemie: Enzymy*. E-ChemBook, 2017, [cit. 2017-09-19], dostupné online z: <http://e-chembook.eu/enzymy>.
- [5] BISSWANGER, H., *Enzyme assays*. Perspectives of Science, 2014, 1 (1–6): str. 41–55.
- [6] *The Basics of General, Organic, and Biological Chemistry - Enzyme Activity*. Saylor Academy, 2012, [cit. 2017-09-07], dostupné online z: https://saylordotorg.github.io/text_the-basics-of-general-organic-and-biological-chemistry/s21-07-enzyme-activity.html.
- [7] NAVARRO, F., RAMÍREZ-SARMIENTO, C. A., GUIXÉ, V., *Catalytic and regulatory roles of species involved in metal–nucleotide equilibriums in human pyridoxal kinase*. BioMetals, 2013, 26 (5): str. 805–812.
- [8] *Enzyme Activity*. BioNinja, 2016, [cit. 2017-09-07], dostupné online z: <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-2-molecular-biology/25-enzymes/enzyme-activity.html#previous-photo>.
- [9] BARTOVSKÁ, L., *Chemická kinetika*. Ver. 1.0: VŠCHT Praha, Praha, 2008, str. 207–215, ISBN: 978-80-7080-670-8.
- [10] *Enzyme Kinetics*. ChemPages, 2017, [cit. 2017-09-12], dostupné online z: <https://www.chem.wisc.edu/deptfiles/genchem/netorial/modules/biomolecules/modules/enzymes/enzyme4.htm>.
- [11] CHANG, R., *Physical Chemistry for the Biosciences - Enzyme Kinetics*. Chemistry LibreTexts, 2016, [cit. 2017-09-12], dostupné online z: [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_\(Chang\)](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Physical_Chemistry_for_the_Biosciences_(Chang)).

- [12] BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L., *The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes*. Biochemistry, 5th edition, 2002, str. 345-354, ISBN-10: 0-7167-3051-0.
- [13] *Enzymová kinetika při inhibici*. Institut Galenus, 2017, [cit. 2017-09-19], dostupné online z: <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-biokatalyza-enzymova-kinetika-inhibice>.
- [14] BHAGAVAN, N. V., HA, C.-E., *Enzymes and Enzyme Regulation*. Essentials of Medical Biochemistry, Elsevier, 2011, str. 63–84, ISBN: 978-0-12-416687-5.
- [15] KENAKIN, T. P., *Enzymes as Drug Targets*. Pharmacology in Drug Discovery and Development, Elsevier, 2012, str. 131-156, ISBN: 978-0-12-803752-2.
- [16] STEVENS, E., *Enzymes, Measuring Inhibition*. Davidson College: Medicinal Chemistry, 2017, [cit. 2017-09-13], dostupné online z: https://courses.edx.org/c4x/DavidsonX/001x/asset/Ch_4_clip_3_summary.pdf.
- [17] NEUBIG, R. R., SPEDDING, M., KENAKIN, T. P., CHRISTOPOULOS, A., *International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII: Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology*. Pharmacological Reviews, 2003, 55 (4): str. 597–606.
- [18] NAVRE, M., *Why using pIC50 instead of IC50 will change your life*. Collaborative Drug Discovery, 2017, [cit. 2017-09-11], dostupné online z: <https://www.collaborativedrug.com/buzz/2014/07/14/why-using-pic50-instead-of-ic50-will-change-your-life/>.
- [19] STRÜMPER, D., DURIEUX, M. E., HOLLMANN, M. W., TRÖSTER, B., BAKKER, C. G., MARCUS, M. A. E., *Effects of Antidepressants on Function and Viability of Human Neutrophils*. American Society of Anesthesiologists, 2003, 98 (6): str. 1356–1362.
- [20] KUZMIČ, P., *Why IC50's Are Bad for You And Other Surprises*. BioKin, Ltd., 2017, [cit. 2017-09-12], dostupné online z: <http://www.biokin.com/slides/1305-arqule.pdf>.
- [21] CER, R. Z., MUDUNURI, U., STEPHENS, R., LEBEDA, F. J., *IC50-to-Ki: a web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding*. Nucleic Acids Research, 2009, 37: str. 441-445.
- [22] LOCKRIDGE, O., QUINN, D. M., *Esterases*. Comprehensive Toxicology, 2010, 4: str. 243–273.

- [23] FUKAMI, T., YOKOI, T., *The emerging role of human esterases*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 2012, 27 (5): str. 466–477.
- [24] LIGHTNING, L., *Human esterases: Chemical and Biochemical Considerations*, 2013, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: <https://www.slideshare.net/lukelightning/human-esterases-chemical-and-biochemical-considerations>.
- [25] FONTANA, M., TRNKA, J., MAĎA, J., IVÁK, P., LAVRÍKOVÁ, P., NOVÁKOVÁ, P., PAVELKA, L., ŠAJDÍKOVÁ, M., *Neurotransmisní systémy*. Funkce buněk a lidského těla, 2017, [cit. 2017-06-28], dostupné online z: <http://fblt.cz/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/5-neurotransmisni-systemy/>.
- [26] ŠTEFELA, D., BÁČA, J., HERMA, V., FONTANA, T., KACHLÍK, J., KALIBA, D., MILETÍN, D., ŠMÍDA, J., LABOŠ, J., MRZÍLKOVÁ, M., KNĚNICKÝ, J., KRÝSL, J., *Neurotransmitery*. Úvod do centrální nervové soustavy, 2017, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: http://www.cnsonline.cz/?page_id=1456.
- [27] POHANKA, M., *Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology*. Biomedical Papers, 2011, 155 (3): str. 219–223.
- [28] CHATONNET, A., LOCKRIDGE, O., *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. Biochemical Journal, 1989, 260 (3): str. 625–634.
- [29] KVASNICOVÁ, V., *Cholinesterázy*, 2003, [cit. 2017-02-22], dostupné online z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/KVACD.htm>.
- [30] BRUNOVSKÝ, M., *Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci*. Neurologie pro praxi, 2007, 2: str. 112–117.
- [31] SILMAN, I., SUSSMAN, J. L., *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology*. Current Opinion in Pharmacology, 2005, 5 (3): str. 293–302.
- [32] HAREL, M., SUSSMAN, J. L., *Native monoclinc form of Torpedo acetylcholinesterase*. RCSB Protein Data Bank, 2008, [cit. 2018-05-03], dostupné online z: <https://www.rcsb.org/structure/2j3d>.
- [33] GOODSSELL, D. S., *Acetylcholinesterase*. RCSB Protein Data Bank, 2004, [cit. 2017-09-13], dostupné online z: <http://pdb101.rcsb.org/motm/54>.
- [34] NICOLET, Y., LOCKRIDGE, O., MASSON, P., FONTECILLA-CAMPS, J. C., NACHON, F., *Crystal structure of human butyryl cholinesterase*. RCSB Protein Data Bank, 2003, [cit. 2018-05-03], dostupné online z: <https://www.rcsb.org/structure/1p0i>.

- [35] FLOCKHART, D. A., DESTA, Z., *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. Clinical and Translational Science, 2009, str. 327–345, ISBN: 978-0-12-802101-9.
- [36] *Pseudocholinesterase, Dibucaine Inhibition*. ARUP Laboratories, 2017, [cit. 2017-09-20], dostupné online z: <http://ltd.aruplab.com/Tests/Pub/0020159>.
- [37] KOMERSOVÁ, A., KOMERS, K., ZDRAZILOVÁ, P., *Kinetics of hydrolysis of acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases*. Chemico-Biological Interactions, 2005, 157–158: str. 387–388.
- [38] ŠTERN, P., *Stanovení cholinesteráz*. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi, 2010, [cit. 2017-09-20], dostupné online z: <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/D/SZAAX.htm>.
- [39] KOMERSOVÁ, A., KOMERS, K., CEGAN, A., *New findings about Ellman's method to determine cholinesterase activity*. Zeitschrift fur Naturforschung C, 2007, 62 (1–2): str. 150–154.
- [40] ALI-SHTAYEH, M. S., JAMOUS, R. M., ZAITOUN, S. Y. A., QASEM, I. B., *In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease*. Functional Foods in Health and Disease, 2014, 4 (9): str. 381–400.
- [41] KAO, L. T.-H., GRATZL, M., *Serum cholinesterase assay using a reagent-free micro pH-stat*. Analytical Biochemistry, 2009, 389 (2): str. 93–96.
- [42] *What is Alzheimer's?*. Alzheimer's Association, 2017, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_what_is_alzheimers.asp.
- [43] *Stages of Alzheimer's and Symptoms*. Alzheimer's Association, 2017, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp#.
- [44] *What causes Alzheimer's disease?*. National Institute on Aging, 2017, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: <https://www.nia.nih.gov/health/what-causes-alzheimers-disease>.
- [45] *Genetics of dementia*. Alzheimer Society, 2016, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: https://www.alzheimers.org.uk/download/downloads/id/1759/factsheet_genetics_of_dementia.pdf.
- [46] *Diagnosing Alzheimer's - How Alzheimer's is diagnosed*. Mayo Clinic, 2016, [cit. 2017-09-05], dostupné online z: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers/art-20048075>.
- [47] SØRENSEN, L., IGEL, C., PAI, A., BALAS, I., ANKER, C., LILLHOLM, M.,

- NIELSEN, M., *Differential diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease using structural MRI cortical thickness, hippocampal shape, hippocampal texture, and volumetry*. *NeuroImage Clinical*, 2017, 13: str. 470–482.
- [48] COLOVIĆ, M. B., KRSTIĆ, D. Z., LAZAREVIĆ-PAŠTI, T. D., BONDŽIĆ, A. M., VASIĆ, V. M., *Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology*. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11 (3): str. 315–335.
- [49] SHEARDOVÁ, K., HORT, J., RUSINA, R., BARTOŠ, A., LÍNEK, V., RESSNER, P., REKTOROVÁ, I., *Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demenci*. *Neurologie pro praxi*, 2009, 10 (1): str. 28–31.
- [50] VYKLICKÝ, L., *Glutamátové receptory a excitační synaptický přenos*. Výzkumné projekty, 2017, [cit. 2017-09-20], dostupné online z: http://www2.biomed.cas.cz/d331/cz/glutamate_cz/glutamat_cz.html.
- [51] POHANKA, M., *Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present)*. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2012, 22 (8): str. 871–886.
- [52] MUSÍLKOVÁ, J., TUCEK, S., *The binding of cholinesterase inhibitors tacrine (tetrahydroaminoacridine) and 7-methoxytacrine to muscarinic acetylcholine receptors in rat brain in the presence of eserine*. *Neuroscience Letters*, 1991, 125 (2): str. 113–116.
- [53] MARTIN, J., KRŠKOVÁ, Z., DUŠEK, J., *Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby*. *Praktické lékárnictvo*, 2011, [cit. 2017-09-19], dostupné online z: http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=5061&magazine_id=14.
- [54] EASTMAN, J., WILSON, E. J., CERVEŇANSKY, C., ROSENBERY, T. L., *Fasciculin 2 binds to the peripheral site on acetylcholinesterase and inhibits substrate hydrolysis by slowing a step involving proton transfer during enzyme acylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (34): str. 19694–19701.
- [55] KARLSSON, E., MBUGUA, P. M., RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D., *Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps**. *Journal of Physiology (Paris)*, 1984, 79 (4): str. 232–240.
- [56] VLČEK, V., POHANKA, M., *Environmentální aspekty užití organofosforových a karbamátových pesticidů schválených k užití v české republice*. *Chemické Listy*, 2011, 105: str. 908–912.
- [57] MURRAY, A. P., FARAONI, M. B., CASTRO, M. J., ALZA, N. P., CAVALLARO,

- V., *Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy*. *Current Neuropharmacology*, 2013, 11 (4): str. 388–413.
- [58] FUKUTO, T. R., *Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides*. *Environmental Health Perspectives*, 1990, 87: str. 245–254.
- [59] POHANKA, M., *Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15 (6): str. 9809–9825.
- [60] CORNISH-BOWDEN, A., *A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors*. *Biochemical Journal*, 1974, 137 (1): str. 143–144.
- [61] DIXON, M., *The determination of enzyme inhibitor constants*. *Biochemical Journal*, 1953, 55 (1): str. 170–171.
- [62] BANNAN, C. C., CALABRÓ, G., KYU, D. Y., MOBLEY, D. L., *Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water*. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2016, 12 (8): str. 4015–4024.
- [63] VAN DE WATERBEEMD, H., *In Silico Models to Predict Oral Absorption*. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, 2006, str. 669–697.
- [64] ERTL, P., ROHDE, B., SELZER, P., *Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43 (20): str. 3714–3717.
- [65] SINGH, A. K., *Principles of Nanotoxicology*. *Engineered Nanoparticles*, Elsevier, 2016, str. 171–227.
- [66] CONTI-FINE, B. M., MILANI, M., KAMINSKI, H. J., *Myasthenia gravis: past, present, and future*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116 (11): str. 2843–2854.
- [67] GILHUS, N. E., VERSCHUUREN, J. J., *Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies*. *Lancet Neurology*, 2015, 14: str. 1023–1036.