

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Inhibitory cholinesteras využívané ve zdravotnictví

Michaela Klepeštová

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Klepeštová**
Osobní číslo: **C14282**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Inhibitory cholinesteras využívané ve zdravotnictví**
Zadávací 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 :

1. Úvod do problematiky enzymů
2. Porovnání obou typů cholinesteras
3. Inhibitory cholinesteras, jejich vlastnosti a rozdělení
4. Popis chorob využívající k terapii inhibitorů cholinesteras
5. Diagnostika funkce cholinergního systému

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce:

Mgr. Adam Kostelník

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

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. 7. 2017

Michaela Klepeštová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Alexandru Čeganovi, CSc. a konzultantovi Mgr. Adamu Kostelníkovi za cenné rady a pomoc při zpracování této práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá inhibitory cholinesteras využívaných ve zdravotnictví. Jedná se o teoretickou část, která zahrnuje charakteristiku enzymů, cholinesteras, a především se zabývá jednotlivými cholinesterasovými inhibitory. Dále se zaměřuje i na jednotlivé nemoci, kde jsou tyto inhibitory využívány.

KLÍČOVÁ SLOVA

inhibitory cholinesteras, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesteasa, Alzheimerova choroba, myasthenia gravis

TITLE

Inhibitors of cholinesterases using in healthcare

ANNOTATION

This work deals with inhibitors using in healthcare. It is a theoretical part, which includes the basic characteristics of enzymes and cholinesterases. Main part deals with cholinesterases inhibitors and it is also focuses on diseases, where these inhibitors are used for treatment.

KEY WORDS

cholinesterase inhibitors, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, myasthenia gravis

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 11 |
| 1. ENZYMY..... | 12 |
| 1.1. Struktura enzymů..... | 13 |
| 1.2. Kinetika enzymových reakcí..... | 14 |
| 2. CHOLINESTERASY | 20 |
| 2.1. Acetylcholinesterasa | 20 |
| 2.2. Butyrylcholinesterasa | 21 |
| 3. INHIBITORY ENZYMŮ | 23 |
| 3.1. Jednotlivé typy inhibice..... | 23 |
| 3.1.1. Inhibice kompetitivní..... | 23 |
| 3.1.2. Inhibice nekompetitivní (alosterická) | 24 |
| 3.1.3. Inhibice akompetitivní..... | 24 |
| 4. INHIBITORY CHOLINESTERAS | 25 |
| 4.1. Historie | 25 |
| 4.2. Rozdělení inhibitorů cholinesteras | 25 |
| 4.2.1. Reversibilní inhibitory..... | 26 |
| 4.2.2. Pseudo-reversibilní inhibitory | 26 |
| 4.2.3. Ireversibilní inhibitory | 26 |
| 4.3. Inhibitory cholinesteras využívané ve zdravotnictví | 27 |
| 4.3.1. Karbamátové deriváty..... | 27 |
| 4.3.1.1. Fyzostigmin | 27 |
| 4.3.1.2. Eptastigmin | 27 |
| 4.3.1.3. Rivastigmin | 28 |
| 4.3.1.4. Pyridostigmin..... | 28 |
| 4.3.2. Akridinové deriváty..... | 28 |
| 4.3.2.1. Takrin..... | 28 |
| 4.3.2.2. Velnakrin | 29 |
| 4.3.2.3. Amiridin | 29 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.3. | Piperidinové deriváty | 30 |
| 4.3.3.1. | Donepenzil..... | 30 |
| 4.3.4. | Alkaloidy..... | 30 |
| 4.3.4.1. | Huperzin A..... | 30 |
| 4.3.4.2. | Galantamin | 31 |
| 4.3.5. | Organofosfáty..... | 32 |
| 4.3.5.1. | Metrifonát | 32 |
| 4.4. | Ostatní inhibitory cholinesteras | 33 |
| 4.4.1. | Organofosfáty..... | 33 |
| 5. | ALZHEIMEROVA CHOROBA | 34 |
| 5.1. | Makroskopické změny mozku při Alzheimerově nemoci | 34 |
| 5.2. | Mikroskopické změny mozku při Alzheimerově nemoci | 34 |
| 5.2.1. | Neurony | 34 |
| 5.2.2. | Neuronální klubka | 35 |
| 5.2.3. | Senilní plaky | 35 |
| 5.2.4. | A- β -protein | 35 |
| 5.2.5. | Apolipoprotein E..... | 36 |
| 5.3. | Příznaky Alzheimerovy nemoci..... | 36 |
| 5.4. | Léčba Alzheimerovy nemoci..... | 37 |
| 6. | MYASTHENIA GRAVIS | 38 |
| 7. | STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERAS | 39 |
| 7.1. | Ellmanova metoda | 40 |
| 7.2. | Biosenzory | 41 |
| 7.2.1. | Optické biosenzory | 42 |
| 7.2.2. | Kvantové tečky | 44 |
| 7.2.3. | Elektrochemické biosenzory | 44 |
| 8. | ZÁVĚR | 46 |
| 9. | POUŽITÁ LITERATURA..... | 47 |

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

| | |
|---|----|
| OBRÁZEK 1: ZÁVISLOST POČÁTEČNÍ RYCHLOSTI REAKCE NA KONCENTRACI ENZYMU | 16 |
| OBRÁZEK 2: ZÁVISLOST POČÁTEČNÍ RYCHLOSTI REAKCE NA KONCENTRACI SUBSTRÁTU | 16 |
| OBRÁZEK 3: SATURAČNÍ KŘIVKA | 17 |
| OBRÁZEK 4: LINEARIZACE DLE LINEWEAVERA-BURKA | 19 |
| OBRÁZEK 5: FYZOSTIGMIN | 27 |
| OBRÁZEK 6: EPTASTIGMIN | 27 |
| OBRÁZEK 7: RIVASTIGMIN | 28 |
| OBRÁZEK 8: PYRIDOSTIGMIN | 28 |
| OBRÁZEK 9: TAKRIN | 29 |
| OBRÁZEK 10: VELNAKRIN | 29 |
| OBRÁZEK 11: AMIRIDIN | 30 |
| OBRÁZEK 12: DONEPEZIL | 30 |
| OBRÁZEK 13: HUPERZIN A | 31 |
| OBRÁZEK 14: GALANTAMIN | 32 |
| OBRÁZEK 15: METRIFONÁT | 32 |
| OBRÁZEK 16: AKTIVNÍ FORMA METRIFONÁTU DDVP | 32 |
| OBRÁZEK 17: REAKČNÍ SCHÉMA ELLMANOVY METODY | 40 |
| OBRÁZEK 18: ZJEDNODUŠENÉ SCHÉMA BIOSENZORU S CHOLINESTERASOU PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOXICKÝCH SLOUČENIN | 42 |
| OBRÁZEK 19: HYDROLÝZA 2-NITROACETANILIDU NA 2-NITROANILIN | 43 |
| OBRÁZEK 20: PRINCIP HYDROLÝZY INDOXYLACETÁTU CHOLINESTERASOU S NÁSLEDNOU OXIDACÍ NA INDIGO | 43 |
| | |
| TABULKA 1: SHRNU TÍ TŘÍ POUŽÍVANÝCH LÉČIV K TERAPII AD - DONEPEZILU, RIVASTIGMINU A GALANTAMINU (ŠTĚPÁNKOVÁ, 2008, UPRAVENO) | 37 |

SEZNAM ZKRATEK

AD – Alzheimerova choroba

AChE – acetylcholinesterasa

AChR – nikotinový acetylcholinový receptor

ALT – alaninaminotransferasa

APP – amyloidové prekurzorové proteiny

AST – aspartátaminotransferasa

BuChE – butyrylcholinesterasa

DDVP – 2,2-dichlorvinyl dimethylfosfát

DN – dibukainové číslo

DTNB – 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

EOMG – myasthenia gravis s časným nástupem (early-onset myasthenia gravis)

FDA – US Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických)

FET – Field -Effect Transistor (tranzistor řízený elektrickým polem)

LOMG – myasthenia gravis s pozdním nástupem (late-onset myasthenia gravis)

LRP4 – nízkodenzitní lipoprotein (low-density lipoprotein receptor related protein 4)

MuSK – svalově specifická tyrosinkinasa (muscle specific tyrosin kinase)

OMG – oční myasthenia gravis

TAMG – myasthenia gravis s karcinomem thymu (thymoma asociated myasthenia gravis)

TBN⁻ – 5-sulfonyl-2-nitrobenzoový anion

ÚVOD

Alzheimerova choroba je nejčastěji se vyskytujícím typem demence, tvoří 50-60 % případů všech senilních demencí. Jedná se o nebezpečnou neurodegenerativní poruchu, jejímž vlivem jedinec ztrácí krátkodobou paměť a zhoršují se u něj kognitivní funkce. Průběh nemoci je postupný, zpočátku nenápadný, nemoc se nemusí projevit i několik let. Problémem terapie Alzheimerovy nemoci je, že ačkoliv jsou degenerační procesy probíhající v mozku známy, neexistuje zatím žádné léčivo, které by je zvrátilo nebo alespoň zastavilo. Ke zmírnění příznaků a zpomalení postupu nemoci se tedy používají alespoň symptomatická léčiva, zejména inhibitory cholinesteras, které alespoň jistou měrou posilují kognitivní funkce jedince.

Další nemocí, k jejíž léčbě jsou využívány inhibitory cholinesteras je myasthenia gravis, což je autoimunitní onemocnění, při kterém tělo vytváří protilátky působící převážně proti acetylcholinovým receptorům, následkem čehož se snižuje svalový tonus.

Mezi inhibitory cholinesteras patří mnoho sloučenin s různým dopadem na lidský organismus, přičemž tato práce je zaměřena zejména na inhibitory cholinesteras využívaných k terapii výše zmíněných nemocí.

1. ENZYMY

Enzymy jsou bílkoviny, které v organismu plní velice specifickou funkci – slouží jako biologické katalyzátory. Nacházejí se ve všech živých organismech a i nejjednodušší buňky mohou obsahovat až 3000 různých enzymů. Ty umožňují uskutečnit množství specifických metabolických reakcí tím, že snižují jejich aktivační energii a ovlivňují jejich rychlost, a to za velmi mírných podmínek (teplota 37 °C, tlak 101 325 Pa, pH většinou okolo 7). Reakce jsou velmi specifické a se specifickými substráty, organismus může jejich aktivitu regulovat dle svých fyziologických potřeb. [1-5]

Substrát je sloučenina, jejíž přeměnu enzym katalyzuje. Jednotkou enzymové aktivity, tedy míry jeho katalytické účinnosti, je katal (kat). Enzymatická aktivita 1 kat odpovídá přeměně 1 mol substrátu za 1 sekundu při dodržení definovaných podmínek (nasycení enzymu substrátem, daná teplota a pH). [1, 2]

Enzymy jsou rozděleny do šesti hlavních tříd dle katalyzované reakce. Následně se dělí do podtříd podle substrátu, jehož přeměnu katalyzují a dále do podpodtříd podle akceptoru. Každému enzymu jsou přidělena čtyři čísla (čtvrté číslo je pořadovým číslem enzymu v podpodtřídě). K pojmenování se v češtině používají jednoslovné doporučené názvy s koncovkou -asa. [2]

Enzymy jsou do tříd rozděleny následovně:

1. Oxidoreduktasy

Jsou nejpočetnější třídou enzymů. Mají povahu složených bílkovin. Katalyzují intermolekulové oxidačně-redukční reakce (často s kofaktorem NAD^+), jejich koenzymy mění své oxidační číslo. Přenášejí vodíkové ionty, elektrony nebo zabudovávají atom nebo molekulu kyslíku do substrátu. Dělí se na podtřídy podle funkčních skupin, které jsou donory vodíkových iontů nebo elektronů. Patří sem např.: dehydrogenasy, peroxidasy nebo oxidasy.

2. Transferasy

Jde o složené bílkoviny, které katalyzují přenos skupin (např. $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COCH}_3$) v aktivované formě z jejich donoru na akceptor. Dělí se na podtřídy podle charakteru přenášených skupin. Např. aminotransferasy přenášejí aminoskupinu z aminokyseliny na oxokyselinu, kinasy zbytek kyseliny fosforečné z ATP na substrát.

3. Hydrolasy

Homoproteiny hydrolyticky štěpící vazby, které vznikly kondenzací (např. peptidové, glykosidové, esterové). Na podtřídy se dělí podle typu štěpné vazby.

4. Lyasy

Tvoří málo početnou skupinu enzymů. Mají povahu složených bílkovin, které katalyzují nehydrolytické štěpení vazeb (C-C, C-O, C-N, C-S apod.). Lyasy také často katalyzují i energeticky nenáročnou opačnou reakci, kdy ze dvou menších molekul vznikne jedna větší za vytvoření výše uvedených vazeb. V tomto případě se používá termín synthasa. Na podtřídy se dělí podle typu štěpených, nebo syntetizovaných vazeb.

5. Isomerasy

Málo početná skupina enzymů, které mohou být homo- i heteroproteiny. Katalyzují intramolekulární přesuny atomů a jejich skupin, tedy vzájemné přeměny izomerů. Podle typu izomerie se rozdělují do podtříd.

6. Ligasy

Katalyzují vznik energeticky náročných vazeb za současné hydrolýzy nukleosidtrifosfátů, nejčastěji ATP. Ligasy jsou málo početná skupina enzymů, mají charakter složených enzymů a v triviálních názvech se pro ně používá název synthetasa. Do podtříd se dělí podle typu vytvářených vazeb. [1, 2, 5]

1.1. Struktura enzymů

Enzymy se ve většině případů skládají ze dvou důležitých částí (tzv. heteroproteiny či složené enzymy), a to apoenzymu a kofaktoru. Apoenzym je bílkovinná část enzymu, kofaktor nízkomolekulární nebílkovinná část enzymu. Kofaktor je velmi důležitou součástí enzymu, bez kterého by jinak vůbec nefungoval. Slouží k přenosu elektronů, atomů, či funkčních skupin. Jedná se o deriváty vitamínů rozpustných ve vodě, často jsou tvořeny heterocyklickou sloučeninou. Navíc často vážou molekuly kovů, či jsou samy těmito kovy (stopovými prvky) tvořeny (např. Mn, Ni, Fe, Cu, Co, Zn, Mo). Kofaktory lze rozdělit do dvou skupin podle síly vazby na apoenzym: koenzymy, které se vážou na apoenzym volně, reverzibilně (mají charakter substrátu) a prostetické skupiny, které se vážou na apoenzym pevně kovalentní vazbou. Komplex apoenzymu s koenzymem se nazývá holoenzym. Enzymy tvořené pouze bílkovinným řetězcem jsou homoproteiny. [1, 2, 6]

Některé enzymy tvoří kvarterní struktury (skládají se z více podjednotek), patří tedy mezi oligomery. Tyto podjednotky mohou být identické nebo mohou mít různou strukturu. Na každé této podjednotce může být vazebné místo jak pro substrát, tak i pro efektor, nebo mohou tyto podjednotky být rozdělené na tzv. katalytické podjednotky s vazebným místem pouze pro substrát a na regulační podjednotky, které vážou pouze efektor (vazebná místa pro aktivátor a inhibitor mohou být různá). [2]

Veškeré enzymatické reakce probíhají v aktivním centru enzymu, neboli v aktivním místě, což je poměrně malá část enzymu v podobě prohlubně či štěrbin. V aktivním místě jsou uloženy funkční skupiny vedlejších řetězců aminokyselin tvořících polypeptidový řetězec enzymu. Katalyticky aktivní skupiny tvoří tzv. katalytické centrum. Vazebné centrum je tvořeno skupinami, které specificky váží substrát. Funkční skupiny vytváří vhodné chemické prostředí pro reakci (např. jiným hydrofilním/hydrofobním prostředím oproti roztoku, či jinými elektrostatickými silami) a svým prostorovým uspořádáním ovlivňují druh reakce, která proběhne. V aktivním centru je dále přítomen kofaktor. V blízkosti vazebného místa pro substrát je, u enzymů povahy složených bílkovin, vazebné místo pro koenzym, který má povahu druhého reaktantu. Toto vazebné místo bývá na povrchu molekuly enzymu. [1, 2, 6]

Jsou známy tři základní typy prostorového uspořádání aktivních center:

- a) tvar štěrbin: tento typ se nachází například u hydroláz, které štěpí dlouhé řetězce biopolymerů, tyto řetězce se do štěrbin vsunou a jsou přerušeny, řetězce musí být ve formě jednotlivých vláken
- b) mělká povrchová prohlubeň: touto formou aktivního centra disponují např. trávicí enzymy, které štěpí molekuly ve formě svazků řetězců či několikavláknových pásů aniž by se musely předem rozbalit
- c) forma jamky: je součástí enzymů odštěpujících koncové struktury řetězců (např. karboxypeptidasa odštěpující aminokyseliny z karboxylových konců peptidových řetězců) [1, 6]

Na enzymech se nacházejí další vazebná místa mimo aktivní centrum enzymu, na která se mohou vázat další sloučeniny ovlivňující jeho aktivitu. Tyto sloučeniny se nazývají efekty. Efekty se dělí na aktivátory, které reakci urychlují a inhibitory, které ji zpomalují či znemožňují. Aktivátory jsou nízkomolekulární látky (většinou dvojmocné kationty kovů), které vazbou poblíž aktivního centra mění jeho prostorovou strukturu, a tím usnadňují reakci. Problematika inhibitorů bude popsána níže v textu. Látky ovlivňující aktivitu oligomerních enzymů se nazývají allosterické efekty a vážou se na allosterická centra. Tyto efekty vyvolají změnu konformace celé molekuly. [1, 2]

1.2. Kinetika enzymových reakcí

Enzymy obecně fungují jako katalyzátory a zvyšují rychlost chemických reakcí. První základní poznatky o kinetice enzymových reakcí byly získány Leonorem Michaelisem a Maud L. Mentenovou v roce 1913, přičemž první měření bylo provedeno již v roce 1902. [1]

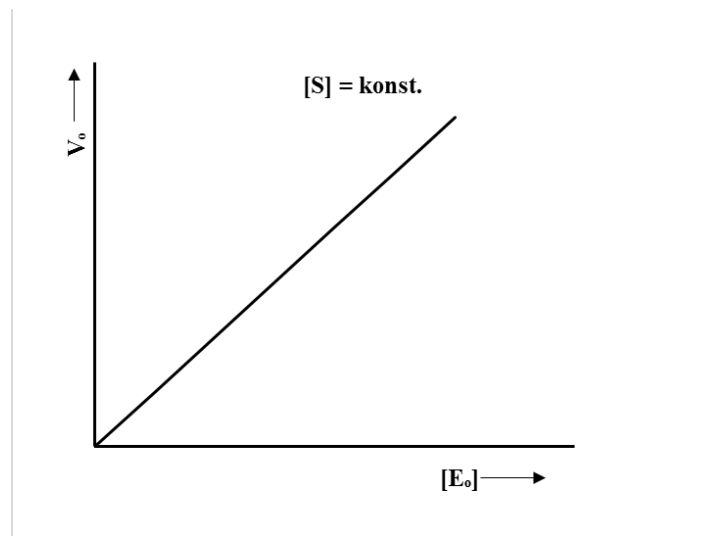
Jedinečnost katalytické účinnosti enzymů spočívá v reakční specifitě, enzym katalyzuje pouze jeden typ reakce u různých substrátů (např. skupinu kyseliny fosforečné z různých

substrátů odštěpují fosfatasy), nebo pak v substrátové specifitě, což znamená, že enzym katalyzuje přeměnu pouze jedné sloučeniny a s žádnými jinými molekulami reakce neprobíhá (příkladem je glukosaoxidasa, která nereaguje s jinou molekulou než s glukosou). Tato schopnost je vysvětlována tak, že substrát musí mít vhodné vlastnosti, aby se mohl na enzym nekovalentně vázat, a zároveň musí mít k této interakci náležitě prostorové uspořádání. Aby enzym reagoval pouze s určitým substrátem, musí k tomu mít uzpůsobenou strukturu, jedná se tedy o strukturní specifitu. U strukturní specifity lze hovořit o třech typech. Prvním z nich je absolutní strukturní specifita, kdy enzym katalyzuje reakci pouze u jediného substrátu, jediné molekuly. Příkladem je již zmíněná glukosaoxidasa, či ureasa, která rozkládá močovinu na amoniak a oxid uhličitý. Tento typ strukturní specifity je ale spíše výjimečný. Častějším případem je skupinová specifita, kdy enzym katalyzuje přeměnu strukturně podobných substrátů, ale s různou afinitou, tedy různou rychlostí. Například cholinesterasy hydrolyzují škálu esterů cholinu. Třetí skupinou je relativní strukturní specifita. V tomto případě enzym dává přednost určité skupině substrátů, ale je schopen katalyzovat přeměnu ještě u jiné skupiny sloučenin, ovšem s nižší afinitou. Dalším parametrem nutným pro splnění substrátové specifity je průběh reakce v určité oblasti substrátu, ačkoliv by mohla probíhat i jinde (fosfolipasa A₁ odštěpuje mastnou kyselinu z uhlíku C1 glycerolu u fosfatidátů, kdežto fosfolipasa A₂ ji odštěpuje z uhlíku C2). Tato enzymatická schopnost se nazývá regiospecifita. Třetí podmínkou je dodržení enzymatické katalýzy pouze u určitým způsobem uspořádané molekuly, tedy u její určité konfigurace. Jedná se o tzv. stereospecifitu, která se dále rozlišuje. O enantiomerní specifitu jde v případě, že enzym reaguje pouze s jedním z enantiomerů. Tedy pokud bude vytvořena racemická směs, ke konci reakce dojde po spotřebování příslušného enantiomeru. Prochirální specifita spočívá v tvorbě pouze jediného enantiomeru při syntéze chirální molekuly z achirální, např. při přeměně pyruvátu na laktát. [5-7]

Na reakční specifitě se u složených enzymů podílí jak bílkovinný řetězec, tak i kofaktor (ten může mít odlišné katalyzační vlastnosti v závislosti na bílkovinném řetězci, na kterém je navázán). Kdežto na substrátové specifitě se podílí pouze bílkovinná část enzymu. [4]

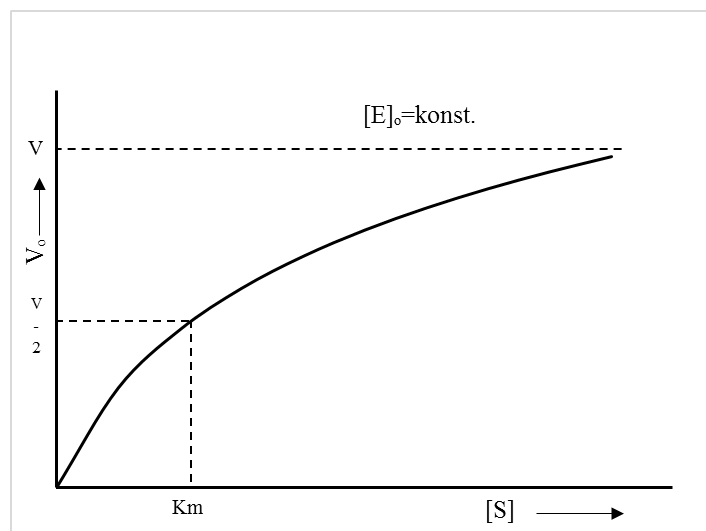
Michaelisem a Mentenovou byla studována rychlost reakce v závislosti na:

- a) změně koncentrace enzymu, přičemž koncentrace substrátu se nemění – v tomto případě byla závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci enzymu lineární (Obr. 1)



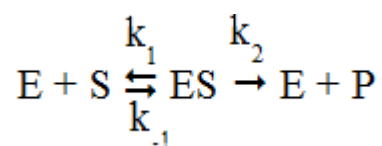
Obrázek 1: Závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci enzymu

- b) změně koncentrace substrátu, přičemž koncentrace enzymu zůstávala konstantní – za této situace byla závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu hyperbolická, protože po sléze dochází k obsazení všech aktivních míst enzymu (Obr. 2).

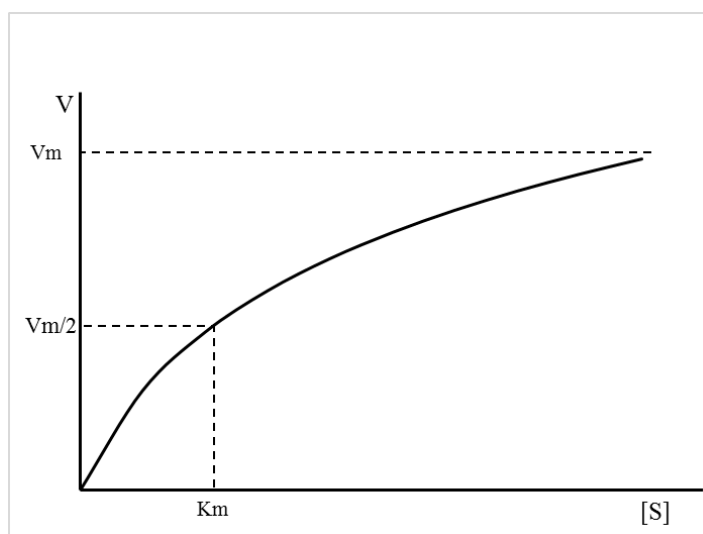


Obrázek 2: Závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu

Pro jednosubstrátovou enzymovou reakci bylo vytvořeno schéma:



Za předpokladu, že substrát (S) se nejprve naváže na aktivní místo enzymu (E) a společně tak vytvoří komplex enzym – substrát (ES) jako meziprodukt, a teprve poté dojde k reakci a vytvoření produktu (P) a jeho uvolnění z enzymu. Koeficienty k_i značí rychlostní konstanty reakcí. Schéma zobrazuje pouze počátek reakce, kdy není produkt teoreticky přítomen a jeho koncentrace je nízká, což znamená, že reakce probíhá v jeho prospěch a zpětná tvorba komplexu ES z produktu enzymu je zanedbatelná – toto lze ovšem zajistit pouze *in vitro*, v živých systémech obvykle nenastává situace, kdy by koncentrace produktů na počátku reakce byla nulová. Z křivky b) je patrné, že pokud je koncentrace substrátu nízká, je nízká i koncentrace komplexu enzym-substrát a většina molekul enzymu je volná, platí: $[E] \gg [ES]$. Rychlost reakce (která je prvního řádu) je úměrná koncentraci substrátu a je tedy nízká. Když je ale koncentrace substrátu v roztoku vysoká, veškeré molekuly enzymu jsou vyvázané substrátem a volný enzym se v systému téměř nevyskytuje: $[E] \ll [ES]$. Dosáhne se tak mezni (maximální) rychlosti ($v = V_m$), která už bez volného enzymu nemůže dále stoupat a stává se reakcí nultého řádu. Tato křivka vyjadřující závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu se nazývá saturační křivka (Obr. 3).



Obrázek 3: Saturační křivka

Pokud je koncentrace komplexu enzym – substrát v průběhu celé reakce konstantní ($[ES]_n = konst.$), je dosaženo tzv. ustáleného stavu, na jehož základě bylo vytvořeno matematické vyjádření saturační křivky Briggsem a Haldanem v roce 1925:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \cdot [ES] = \frac{k_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Byly vytvořeny nové kinetické parametry:

$$V_m = k_2 \cdot [E]_0 \text{ a } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Konečný tvar rovnice Michaelis – Mentenové tedy je:

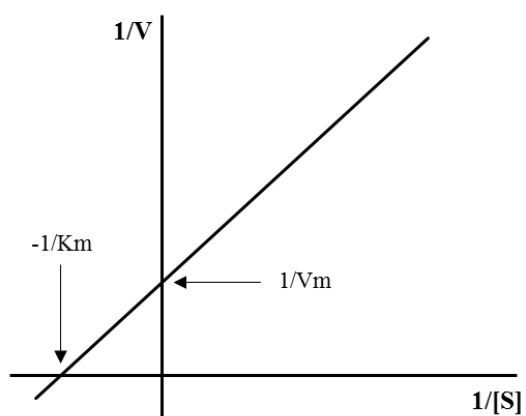
$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Předpokládalo se, že $k_2 \ll k_1$, tedy k_2 je zanedbatelné, a tedy $K_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$. K_M je tzv.

Michaelisova konstanta, která má rozměr koncentrace a vyjadřuje míru afinity enzymu pro substrát a je rovna koncentraci substrátu při dosažení přesně poloviny mezní rychlosti. Při nízkých koncentracích probíhá reakce podle kinetické reakce I. řádu, při vysokých koncentracích už ale rychlost reakce na koncentraci substrátu závislá není a stává se konstantní. Tyto části křivky závislosti rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu rozděljuje hodnota K_M . Při dostatečně vysoké koncentraci substrátu se tedy množství vznikajícího produktu mění s časem lineárně, směrnice přímky je ekvivalentní koncentraci (aktivitě) daného enzymu, což lze využít ke kinetickému určení množství enzymu. Michaelisova konstanta je charakteristickým údajem katalytické vlastnosti enzymu k danému substrátu. Je nezávislá na koncentraci enzymu, ale je ovlivňována podmínkami okolního prostředí, jako je teplota, pH či přítomnost efektorů. Její hodnoty se pohybují v rozmezí 10^{-1} až 10^{-6} mol/l. Platí, že čím nižší je hodnota Michaelisovy konstanty, tím je vyšší afinita enzymu k substrátu. Při zachování podmínky $k_2 \ll k_{-1}$ je Michaelisova konstanta rovna disociační konstantě komplexu enzym-substrát. [1, 5]

Parametry K_M a V_m se nejčastěji zjišťují pomocí tzv. metody počátečních rychlostí, která spočívá v měření série časových závislostí průběhu enzymové reakce pro různé koncentrace substrátu při konstantní koncentraci enzymu za stejných podmínek. U jednotlivých reakcí se zjistí hodnoty počátečních rychlostí a následně se provede linearizace.

Hodnoty lze získat ale i linearizací dle Lineweavera-Burka (Obr. 4). [1, 8]



Obrázek 4: Linearizace dle Lineweavera-Burka

2. CHOLINESTERASY

Základem cholinergního systému je neurotransmitter acetylcholin, který byl poprvé objeven Loewim ve dvacátých letech minulého století a bylo zjištěno, že je hojně produkován jak centrálním, tak i periferním nervovým systémem. Cholinesterasy jsou skupinou enzymů, které katalyzují hydrolýzu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, což je základní proces umožňující obnovu cholinergního receptoru. Mezi cholinesterasy řadíme butyrylcholinesterasu (BuChE) a acetylcholinesterasu (AChE). AChE a BuChE mají z 65 % stejnou sekvenční homologii aminokyselin a jsou kódovány různými geny na lidských chromozomech (AChE chromozom 7, BuChE chromozom 3). O vzniku odlišných, avšak příbuzných molekulárních forem AChE a BuChE rozhoduje jediný gen v důsledku alternativního sestřihu kódovací oblasti původního transkriptu. Vzniká tak série AChE a BuChE s podobnými katalytickými vlastnostmi, které ale mají odlišnou buněčnou a mimobuněčnou distribuci a nekatalytické vlastnosti. [3, 9, 10]

2.1. Acetylcholinesterasa

AChE se účastní cholinergní neurotransmise hydrolyzováním acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, čímž se ruší jeho působení. K acetylcholinu má na rozdíl od BuChE vysokou afinitu. Je rozšířena v mozku, erytrocytech a neuromuskulárních spojích. AChE existuje ve třech globulárních formách, které obsahují buď jednu (monomerní G1), dvě (dimerní G2) nebo čtyři (tetramerní G4) katalytické podjednotky. G1 existuje výhradně v rozpustné formě, kdežto G4 existuje jak v rozpustné formě, tak i ve formě vázané na membránu buněk. Ve zdravém lidském mozku představuje AChE 80 % cholinesterasové aktivity a je tvořena G1 a G4 formou, přičemž jejich vzájemný poměr se v jednotlivých oblastech mozku liší. [3, 10]

Aktivní místo AChE se skládá ze tří hlavních oblastí: esterového vazebného místa, anionického vazebného místa a hydrofobní oblasti. Esterové vazebné místo tvoří tři aminokyseliny: glutamát, histidin a serin, které jsou také známé jako katalytická triáda. Glutamát a histidin jsou donory elektronů serinu, čímž ho činí reaktivním. Serin je pak schopen s acetylcholinem tvořit kovalentní vazbu, čímž rozváže jeho dvojnou vazbu uhlíku s kyslíkem a vytvoří tetrahedrální meziprodukt. Tento oxyanion je stabilizován interakcí s amidovými skupinami v oblasti označované jako "oxyanionová díra". U tohoto meziproduktu se přeruší

acetylcholinová vazba, uvolní se cholin a zůstane pouze komplex acetyl-serin. Serinacetátová vazba následně podléhá hydrolyze, tím se uvolní acetát a enzym se regeneruje. Anionická vazebná místa jsou dvě. Anionická se nazývají proto, že vážou kladně nabitý substrát, ale samy nejsou záporně nabitá, kdežto jsou tvořena skupinou aromatických zbytků, převážně tryptofanu. Periferní anionické vazebné místo leží u ústí aktivního místa. Acetylcholin vytváří interakci π -kationtu s π -elektrony aromatického kruhu tryptofanu a karbonyl acetylové skupiny tvoří slabou vodíkovou vazbu s tyrosinem hlouběji v jamce aktivního místa. Na dně jamky aktivního místa hraje klíčovou roli v katalytickém anionickém místě druhý tryptofan. Opět platí, že acetylcholin tvoří π -kationtovou interakci mezi svým kvarterním aminem a tryptofanovým kruhem. Acetylová skupina je vázána v acylové kapse, která je tvořena dalšími aromatickými zbytky, které lemují dno aktivního místa. Hydrofobní oblast se nachází vedle esterového a anionického vazebného místa a je důležitá pro vazbu arylových substrátů. [11, 12]

2.2. Butyrylcholinesterasa

Je to nespecifická cholinesterasa hydrolyzující mnoho různých esterů cholinu. Její název je odvozen od butyrylcholinu, což je syntetická látka, která se používá k odlišení aktivity acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy (jinak se také nazývá pseudocholinesterasa). BuChE je přítomna v plasmě, pankreatu a játrech (kde je syntetizována). Hraje ale také důležitou roli v cholinergní neurotransmisi a může být zapojena v dalších funkcích nervového systému, neurobiologických nemocech a nespecifických detoxikačních procesech. Stejně jako AChE existuje v monomerní, dimerní a tetramerní formě. U některých lidí je aktivita BuChE geneticky snížena. Tito jedinci mohou být více ohroženi expozicí pesticidy či suxamethioninem (myorelaxans využívané v anesteziologii). BuChE je citlivá k dibukainu, který inhibuje její funkci na rozdíl od AChE a K typu BuChE (kterou kóduje alela K), které jsou k inhibici dibukainem rezistentní. Míru inhibice cholinesteras dibukainem udává tzv. dibukainové číslo (DN), které vyjadřuje procento inhibice cholinesterasy po padání dibukainu. Lidé s klasickou BuChE v plasmě mají dibukainové číslo vysoké ($DN > 75$), heterozygoti mají DN kolem 40 – 70 a homozygoti s K typem BuChE mají cholinesterasovou aktivitu téměř bez inhibice ($DN < 20$). Míra aktivity BuChE může sloužit jako marker funkce jater, protože při nekróze jater její hladina klesá. Je ale omezena nízkou citlivostí. Genetické predispozice uvedené výše a expozice některými sloučeninami může způsobit falešně pozitivní nález. Proto se doporučuje vyhodnocení zároveň s dalšími jaterními enzymy jako je alaninaminotransferasa (ALT) a aspartátaminotransferasa (AST). [3, 13, 14]

V plasmě je nejvíce zastoupena tetramerní forma BuChE a to z 95 %, dimerní a monomerní formy přítomné v plasmě vznikly její degradací. Tento tetramer je tvořen dvěma dimerními jednotkami, které drží silné hydrofobní interakce. Podjednotky dimerů jsou spojeny disulfidickým můstkem. [15-17]

3. INHIBITORY ENZYMŮ

Na enzymy může mít vliv spousta různých látek, které ovlivňují jejich katalytickou účinnost. Tyto látky se nazývají efekty či modifikátory. Mohou na enzymy působit buď jako pozitivní efekty neboli aktivátory, kdy katalytickou účinnost enzymů zvyšují, nebo jako negativní efekty, tedy inhibitory, které katalytickou účinnost enzymů snižují nebo úplně ruší. Efekty lze rozdělit na přirozené a nepřirozené. Mezi přirozené patří veškeré látky tělu vlastní, tedy složky buněk jako např. jejich metabolity. Mezi nepřirozené efekty patří všechny látky ovlivňující činnost enzymu dodané do těla zvenčí, tedy nejčastěji léky, dále pak jedy, drogy či exhaláty. [1, 6]

Jako inhibitory může působit velké množství látek různé povahy – ionty, anorganické i organické látky ať už nízko či vysokomolekulární. Tyto látky mohou způsobit změnu konformace, soutěžit o vazebné místo se substrátem nebo mohou inhibovat až komplex enzym-substrát, aniž by měly nějaký vliv na samotný enzym. [6]

Inhibitory hrají důležitou roli v diagnostice, dále poskytují informace o uspořádání molekuly enzymu, umístění aktivního místa, specifitě enzymatické katalýzy a jejím mechanismu. Také lze díky nim sledovat různé metabolické dráhy a zasahovat do látkové přeměny organismů. [6]

Inhibitory se dělí na reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory lze z molekuly enzymu odstranit a nezpůsobují tedy trvalou změnu. Některé inhibitory se ale na enzymy váží tak pevně, že už je odstranit nelze, a to jsou inhibitory ireverzibilní. Tyto inhibitory se mohou vázat kovalentní vazbou. Všechny přirozené inhibice enzymů jsou reverzibilní. [2, 8]

3.1. Jednotlivé typy inhibice

3.1.1. Inhibice kompetitivní

Princip této inhibice je v tom, že inhibitor je strukturně velmi podobný substrátu a soutěží s ním o vazbu na aktivní místo enzymu. Inhibitor tvoří s enzymem komplex enzym-inhibitor (EI) analogicky ke komplexu enzym substrát (ES). Inhibitor se ale po vazbě na enzym nepřemění na produkt (může se akorát vyvázat zpět z enzymu), a tak funkci enzymu blokuje. Výsledný rozsah inhibice závisí na afinitě inhibitoru a substrátu k enzymu a dále také na poměru jejich koncentrací. Účinek inhibitoru tedy lze kompenzovat zvýšením koncentrace substrátu. Maximální rychlost u tohoto typu inhibice se nemění, ale zvyšuje se hodnota

Michaelisovy konstanty. Spousta léčiv působí jako kompetitivní inhibitory, nazývají se antimetabolity (např. sulfonamidy k léčbě bakteriálních infekcí).

3.1.2. Inhibice nekompetitivní (alosterická)

Tento typ inhibitorů nemá podobnou strukturu jako substrát a váže se jinam, než na aktivní místo enzymu. Touto vazbou způsobí alosterickou změnu konformace enzymu, tedy i aktivního místa a zde nastanou dvě možnosti. Buď je změna v takovém rozsahu, že znemožní vazbu substrátu na aktivní místo enzymu, anebo je tato vazba stále možná a znemožní se pouze přeměna substrátu na produkt. Účinek nekompetitivních inhibitorů není možné ovlivnit zvýšením koncentrace substrátu. Michaelisova konstanta, u takto inhibované reakce, zůstává stejná, avšak maximální rychlost klesá.

Jako nekompetitivní inhibitory se váží ionty těžkých kovů (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+), které se váží ireverzibilně, a proto se jim také říká enzymové jedy. Tyto ionty se váží na skupiny $-\text{SH}$ v bílkovinném řetězci enzymů, které jsou pro katalytický účinek enzymů velmi důležité. Nacházejí se i v aktivních místech enzymů, proto se ionty těžkých kovů mohou vázat i tam.

3.1.3. Inhibice akompetitivní

O tento typ inhibice se jedná, pokud se inhibitor váže až na komplex ES, tedy vazba inhibitoru na enzym je možná, až po navázání substrátu na aktivní místo. Poté se změní konformace enzymu, čímž se znemožní přeměna substrátu na produkt. Poměr Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti zůstává stejný, k jejich snížení dochází stejnou měrou. [1, 2, 6]

4. INHIBITORY CHOLINESTERAS

Inhibitory cholinesteras jsou širokou skupinou sloučenin schopných inhibovat cholinesterasy a rušit tak jejich schopnost hydrolyzovat estery cholinu. Acetylcholinesterasa je velmi důležitým fyziologickým enzymem, a proto její inhibitory hrají významnou roli v biochemických procesech lidského těla. Specifické inhibitory BuChE jako je iso-OMPA mají spíše diagnostický význam. Jednotlivé inhibitory se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi, mechanismem účinku, reversibilitou a selektivitou pro AChE či BuChE. Inhibice účinku cholinesteras je hlavním principem léčby Alzheimerovy choroby (AD) či také myasthenia gravis (MG). Mezi inhibitory cholinesteras patří insekticidy, které jsou neurotoxické, a nervové plyny, využívané jako bojové chemické látky. Léčiva Alzheimerovy choroby (AD) jsou převážně inhibitory AChE, selektivní inhibitory BuChE se využívají v minimální míře. [18-22]

4.1. Historie

Prvním známým inhibitorem cholinesteras byl fyzostigmin, což je alkaloid obsažený v semenech puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*). Inhibitory cholinesteras jsou nejpoužívanějšími a zároveň i historicky prvními léčivy AD. Hlavní účinek inhibitorů cholinesteras je v prodloužení účinku a zvýšení koncentrace acetylcholinu na synapsích, což vede k potenciaci aktivace cholinergních receptorů, které jsou při AD snižené. Inhibitory cholinesteras byly objeveny před dávnou dobou, ale jejich užívání k léčbě AD začalo až v osmdesátých letech, a to orálním a intravenózním podáváním fyzostigminu. Výsledky prvních pokusů léčby fyzostigminem byly slibné a vykazovaly potenciální potlačení snižování kognitivních funkcí. Velkou nevýhodou fyzostigminu ale byla jeho velmi krátká doba účinku a výrazné vedlejší účinky. Následně se k léčbě AD začal používat takrin. [23-27]

4.2. Rozdělení inhibitorů cholinesteras

Inhibitory cholinesteras lze rozdělit dle chemického složení:

- Karbamátové deriváty
- Akridinové deriváty
- Piperidinové deriváty
- Alkaloidy
- Organofosfáty

Tyto inhibitory se na molekulu enzymu mohou vázat reversibilně, pseudo-ireversibilně či ireversibilně.

4.2.1. Reversibilní inhibitory

Reversibilní inhibitory, nebo také krátce-působící inhibitory, se na enzym váží blízko jeho aktivního místa bez toho, aby se vytvořila kovalentní vazba. Místo toho se vytváří slabé ne vazebné molekulové interakce podobně jako mezi substrátem a enzymem. Tyto vazby se velmi rychle tvoří a stejně rychle i zanikají. Proto je nástup účinku těchto inhibitorů velmi rychlý, ale doba jejich působení je velmi krátká (v řádech minut). Reversibilně se váže například takrin či donepezil. [18, 28]

4.2.2. Pseudo-reversibilní inhibitory

Pseudo-ireversibilní (středně-působící) inhibitory se na enzym váží kovalentně. Tyto vazby zanikají velmi pomalu. Tato skupina inhibitorů zahrnuje skupinu karbamátů, které tvoří karbamoylátovaný komplex se serinovým zbytkem katalytické triády AChE, který je hydrolyzován pomaleji než acylovaná forma, která je výsledkem interakce s acetylcholinem. Příkladem této třídy inhibitorů je fyzostigmin, který byl první sloučeninou klinicky studovanou k léčbě AD. Byla studována spousta dalších karbamátů (např. eptastigmin, tolserin, fenserin, quilostigmin), ale pouze rivastigmin byl schválen úřady FDA (US Food and Drug Administration) jako léčivo pro AD. [18]

4.2.3. Ireversibilní inhibitory

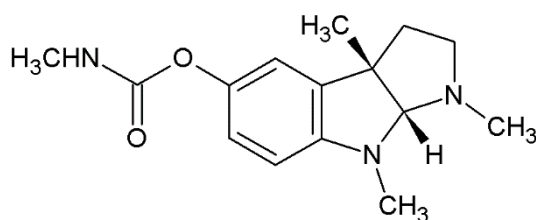
Tyto dlouho-působící inhibitory jsou známé také jako inaktivátory enzymů. To této skupiny inhibitorů patří některé organofosfáty, jejichž mechanismus účinku je založen na fosforylaci či fosfonylaci hydroxyskupiny serinu v aktivním místě enzymu. Fosforylovaný enzym podléhá dvěma různým reakcím. Jedna z nich je spontánní reaktivace. Druhá je dealkylace, též nazývaná stárnutí. Stárnoucí enzym již nemůže spontánní reaktivaci podléhat. Defosforylace je pomalejší než dekarbamoylace. Ireversibilní inhibitory s enzymem tvoří velmi silnou kovalentní vazbu, což způsobí, že je enzym trvale neschopný účinku. Oproti rychlému účinku reversibilních inhibitorů, ireversibilní inhibitory potřebují delší čas k navázání na enzym, protože vytvoření kovalentní vazby je pomalé. Ireversibilní inhibitory tedy vykazují časovou závislost a stupeň inhibice vzrůstá s časem. Jedním takovým zkoumaným léčivem byl metrifonát, který už ale není součástí klinických studií. [18, 28-31]

4.3. Inhibitory cholinesteras využívané ve zdravotnictví

4.3.1. Karbamátové deriváty

4.3.1.1. Fyzostigmin

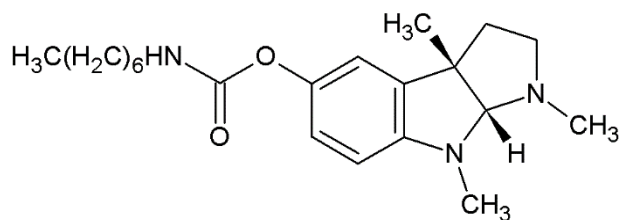
Fyzostigmin ($[(3aR, 8bS)-3,4,8b\text{-trimethyl-2,3a-dihydro-1}H\text{-pyrrolo [2,3-b]indol-7yl] N\text{-methylkarbamát}$; Obr. 5), také nazývaný eserin, je terciární amin, který působí jako reverzibilní inhibitor AChE. Tento inhibitor cholinesteras byl objeven Pfizerem. Zlepšení kognitivních funkcí bylo prokázáno u pěti studií při parenterálním podání a u čtyřech z pěti při orálním podání. Další studie ukázaly, že jde o krátkodobě působící inhibitor AChE a pro nedostatečnou účinnost se k léčbě AD nepoužívá. [32, 33]



Obrázek 5: Fyzostigmin

4.3.1.2. Eptastigmin

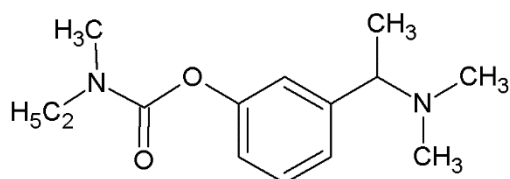
Eptastigmin (heptylfyzostigmin; Obr. 6) je derivát alkaloidu fyzostigminu, ve kterém je karbamoylmethylová skupina v poloze 5' indolového kruhu nahrazena karbamoylheptylovou skupinou. Je silným inhibitorem AChE a BuChE *in vitro*, má čtyřnásobně větší afinitu k BuChE a má významný kognitivní a funkční přínos pro pacienty s AD. Bylo zjištěno, že eptastigmin inhibuje AChE červených krvinek v závislosti na dávce. Průměrný čas regenerace AChE byl přibližně 10 hodin, přičemž průměrná reziduální inhibice byla 13 % po 24 hodinách po dávce 30 mg. Studie ukázaly, že dávky 40-60 mg denně jsou relativně bezpečné a dobře tolerované a že mírná inhibice AChE (30-40%) je spojena s maximální kognitivní účinností. V dalších studiích se ukázala dobře tolerovaná dávka do 15 mg třikrát denně po dobu 25 týdnů, která měla stále pozitivní vliv na kognitivní a funkční výkonnost pacientů s AD. Eptastigmin patří mezi perspektivní látky. [33-35]



Obrázek 6: Eptastigmin

4.3.1.3. Rivastigmin

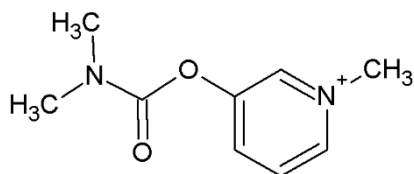
Rivastigmin ((S)-N-ethyl-N-methyl-3-[1-(dimethylamino) ethyl] fenyلكarbamat-(2R, 3R)-tartarát; Obr.7) patří do řady derivátů miotinu, který působí na AChE jak *in vitro*, tak i *in vivo*. V porovnání s jinými klinicky účinnými karbamáty má delší dobu působení *in vivo* a přednostně inhibuje AChE a BuChE hipokampu a kortexu. Rivastigmin je dlouhodobě působící pseudo-ireverzibilní, nekompetitivní karbamátový inhibitor cholinesterasy, který selektivně působí v CNS. Váže se v esterovém místě enzymu a tvoří karbamoylátový komplex se serinovým zbytkem aktivního místa enzymu. Studie prokázaly zlepšení u pacientů s AD, 25 % z nich vykazovalo nežádoucí účinky, jako je nevolnost, zvracení, průjem, ztráta chuti k jídlu, závratě a únava. Rivastigmin je schválen FDA ve více než třiceti zemích po celém světě pod obchodním názvem Exelon® od roku 2000. Nedávná studie s použitím transdermální náplasti zaznamenala snížení výskytu nežádoucích účinků a pozitivních výsledků po podání rivastigminu pacientům s mírnou až středně závažnou AD. Tyto studie prokázaly ve srovnání se skupinou s placebem lepší výsledky v bránění poklesu kognitivních funkcí a u každodenních aktivit. [28, 33, 36-41]



Obrázek 7: Rivastigmin

4.3.1.4. Pyridostigmin

Dalším karbamátovým derivátem je pyridostigmin (Obr. 8), který se používá k léčbě myasthenia gravis. [84]



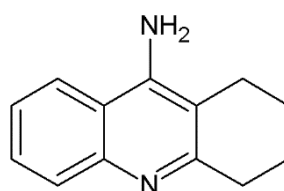
Obrázek 8: Pyridostigmin

4.3.2. Akridinové deriváty

4.3.2.1. Takrin

Aminoakridin takrin (1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin; Obr.9) byl prvním léčivem, které bylo v roce 1993 schváleno FDA speciálně pro léčbu mírné až středně závažné AD.

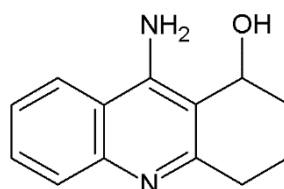
Ovšem bylo brzy jasné, že má takrin nežádoucí vlastnosti, které omezily jeho využití. Hlavní takovou nevýhodou je jeho hepatotoxicita, která byla prokázána zvýšenou koncentrací (ALT) v séru. Takrin je nekompetitivní, reverzibilní inhibitor cholinesteras, který se váže v aniontové části enzymu, má průměrný poločas eliminace 2-4 h. Díky jeho rozpustnosti v lipidech se koncentruje v mozku. Takrin je účinnějším inhibítorem BuChE než AChE. Pro jeho pozitivní výsledky ve zlepšení kognitivních funkcí byl použit jako referenční léčivo pro vývoj dalších inhibitorů AChE, některá jeho analoga jsou v klinických studiích. Byl stažen z trhu v roce 2013. [33, 36, 42-46]



Obrázek 9: Takrin

4.3.2.2. Velnakrin

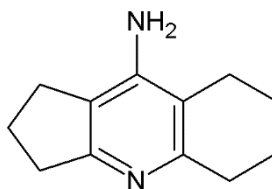
Velnakrin (Obr. 10) je hydroxymetabolit takrinu s kratším poločasem eliminace. Tato sloučenina biochemicky působí jako silný AChE inhibitor. Farmakodynamické studie s jednorázovými dávkami této sloučeniny u zdravých mladých jedinců a u pacientů s AD prokázaly statisticky významné zlepšení kognitivních funkcí ve srovnání s placebem, ale až u 20-30 % pacientů vystavených tomuto léku byla prokázána hepatotoxicita. [33, 47]



Obrázek 10: Velnakrin

4.3.2.3. Amiridin

Amiridin (Obr.11) je dalším inhibítorem AChE, který je derivátem takrinu. Klinická studie byla provedena u skupiny 88 pacientů s AD. U 30-40 % z nich měl dobře definovatelné terapeutické výsledky, kdy se kognitivní funkce a obecný duševní stav zlepšil po 14 měsících, řeč o něco dříve. Lepší výsledky byly prokázány u pacientů s neoznačenou demencí, než u pacientů s pokročilejším stadiem onemocnění. [33, 48]

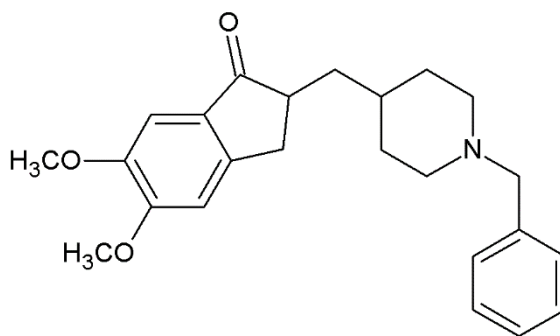


Obrázek 11: Amiridin

4.3.3. Piperidinové deriváty

4.3.3.1. Donepezil

Donepezil (2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on; Obr. 12) je na trhu od roku 1996 pod názvem Aricept®, patří mezi nejrozšířenější léčiva k terapii AD. Je vysoce selektivní, inhibuje zejména AChE, kdežto BuChE téměř nikoli, a to v poměru 405:1. Donepezil se váže v anionickém místě enzymu. Kromě reverzibilní inhibice cholinesteras způsobuje donepezil nepřímou stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů zvýšením hladiny acetylcholinu na synapsích v CNS a zvýšením extraneuronové koncentrace acetylcholinu, noradrenalinu a dopaminu. V porovnání s ostatními inhibitory AChE je podobně účinný ve zmírnění poklesu kognitivních funkcí při AD, se srovnatelnou toxicitou a snášenlivostí. Může ale způsobovat vedlejší účinky jako je nauzea, zvracení a průjem. Jeho výhodou, na rozdíl od ostatních léčiv, je nižší potřebná dávka (5-10 mg/den), což je výhodné vzhledem ke zmírnění nežádoucích účinků. Jeho další výhodou je dlouhý biologický poločas rozpadu (okolo 70 hod.), a proto ho lze podávat pouze jednou denně. [33, 45, 49-53]



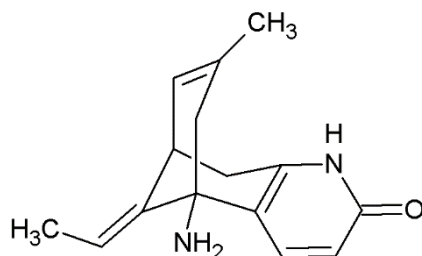
Obrázek 12: Donepezil

4.3.4. Alkaloidy

4.3.4.1. Huperzin A

Huperzin A ((1R,9S,13E)-1-amino-13-ethyliden-11-methyl-6-azatricyklo [7.3.1.0] trideka-2(7),3,10-trien-5-on; Obr.13) a huperzin B jsou alkaloidy izolované z byliny *Huperzia serrata*, která se využívá v čínské medicíně. Obě sloučeniny jsou silnými, selektivními,

reverzibilními inhibitory AChE. Jeho farmakologické vlastnosti a relativně nízká toxicita z něho činí vhodnou sloučeninu pro léčbu AD. Bylo prokázáno, že Huperzin A snižuje neuronální smrt způsobenou glutamátem a inhibicí cholinesteras zvyšuje hladinu acetylcholinu v mozku. Huperzin A byl již schválen jako léčivo pro symptomatickou léčbu AD v Číně. [33, 54-57]



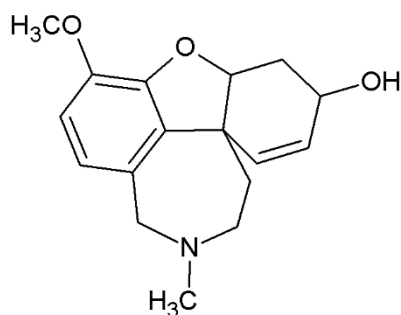
Obrázek 13: Huperzin A

4.3.4.2. Galantamin

Galantamin ((4a*S*,6*R*,8a*S*)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-4a*H*-[1]benzofuro[3a,3,2-*ef*] [2]benzazepin-6-ol; Obr. 14) je fenantrenový alkaloid (podobný kodeinu) izolovaný ze sněženky (*Galanthus nivalis*). V padesátých letech minulého století byl používán bulharskými a ruskými vědci k přerušení účinku tubokurarinu používaného k navození relaxace svalů při operacích, dále k léčbě svalové dystrofie a traumatického poranění mozku. V roce 1960 se povedla chemická syntéza této látky. Teprve v roce 1986 byla testována účinnost této látky k terapii AD. Schválen a uveden na trh k léčbě AD byl v roce 2001 pod obchodním názvem Razadyne®. [28]

Galantamin vykazuje dva mechanismy účinku. Chová se jako reversibilní kompetitivní inhibitor cholinesteras s mnohonásobně větší selektivitou k AChE než k BuChE. Dále alostericky moduluje nikotinové acetylcholinové pre- i postsynaptické receptory, váže se na jiná vazebná místa než acetylcholin, cholin, či karchol a působí jako jejich agonista. [44, 49]

Další nadějnou sloučeninou galantaminu je jeho derivát memogain, který funguje jako jeho prekurzor. Je více hydrofobický, takže lépe prochází hematoencefalickou bariérou a jeho koncentrace je v mozku vyšší než v krvi. Memogain se na galantamin mění enzymatickým štěpením. [58]

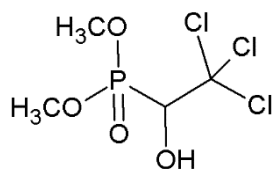


Obrázek 14: Galantamin

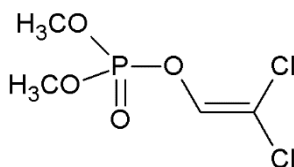
4.3.5. Organofosfáty

4.3.5.1. Metrifonát

Metrifonát (Obr. 15) je organofosfátová sloučenina, která se původně používala jako anthelmintikum (látka působící proti helmitům – červům). Metrifonát není inhibítoem AChE sám o sobě, ale jeho neaktivním prekurzorem. Ten je neenzymaticky transformován *in vivo* na fyziologicky aktivní inhibitor AChE – 2,2-dichlorvinyldimethylfosfát (DDVP) – dehydrochlorací. Ukázalo se, že DDVP (Obr. 16) zvyšuje hladiny acetylcholinu stabilní vazbou na aktivní místo enzymu AChE, což vede k trvalé inhibici enzymu. Metrifonát má krátký plazmatický poločas, ale dlouhou dobu působení v mozku. Již malé množství DDVP je dostatečné k inhibici AChE, ale také BuChE, *in vivo* po několik týdnů. Jedná se tedy o inhibitor cholinesteras s nejdelším trváním účinku. Studie prováděné na laboratorních zvířatech ukazují, že metrifonát zlepšuje kognitivní výkony zvířat. V důsledku AChE inhibice zvyšuje metrifonát extracelulární hladiny acetylcholinu v mozku, lokální využití glukózy v mozku a kortikální aktivitu EEG u myších modelů. Při studiích na pacientech s AD bylo zjištěno, že metrifonát zlepšuje kognitivní funkce při dávce 30-60 mg jednou denně. Další studie ale ukázaly, že metrifonát způsobuje sice reverzibilní, ale významné potíže u některých pacientů jako svalovou slabost a respirační depresi. Proto byla žádost o schválení u FDA stažena. [18, 33, 59-61]



Obrázek 15: Metrifonát



Obrázek 16: Aktivní forma metrifonátu DDVP

4.4. Ostatní inhibitory cholinesteras

4.4.1. Organofosfáty

Organofosfátové sloučeniny jsou různorodou skupinou chemikálií používaných v domácích i průmyslových podmínkách. Kromě výše zmíněného metrifonátu lze organofosfáty využít v oftamologii (echothiofát, isoflurofát), ale velká část se využívá jako insekticidy (malathion, parathion, diazinon, fenthion), nervové plyny (tabun, sarin, soman, VX) a jsou obsaženy i v herbicidech. První organofosfátové sloučeniny byly syntetizovány již počátkem 19. století, v třicátých letech minulého století byly v Německu zkoumány pro použití jako insekticidy. Německá armáda ale měla s organofosfáty jiné úmysly a vytvořila chemické zbraně, a to tabun, sarin a soman. O deset let později byl v Anglii vytvořen nervový plyn VX.

Organofosfáty inaktivují AChE fosforylací serinové hydroxylové skupiny v aktivním místě enzymu. Tím se acetylcholin akumuluje v celém nervovém systému, což vede k nadměrné stimulaci muskarinových a nikotinových receptorů. To má za následek komplikace jako je bronchorrhoea, křeče, slabost a neuropatie. Nejčastější důvod úmrtí je zástava dechu následkem křečí. Otravy nejčastěji způsobují pesticidy, jako je např. insekticid malathion, kterým jsou nejčastěji vystaveni zemědělní pracovníci. Při otravě organofosfáty je důležité zabránit jeho další expozici, organofosfáty se vstřebávají i kůží, je tedy třeba sundat oblečení, důležité je okysličení, případně se podá antidotum. [62]

5. ALZHEIMEROVA CHOROBA

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní degenerativní onemocnění mozku s charakteristickými klinickými a patologickými rysy, ale také s individuálními variacemi podle věku pacienta při vzniku nemoci a typu kognitivního poškození. Její etiologie však není dobře známa a žádná léčba neumožňuje obnovu duševních schopností. AD je nejčastější příčinou demence u starších osob. Při této nemoci postupně dochází k poklesu krátkodobé paměti a ztrátě kognitivních funkcí. Tato choroba tvoří 50-60 % případů senilní demence. [45, 63]

5.1. Makroskopické změny mozku při Alzheimerově nemoci

Během stárnutí dochází fyziologicky k makroskopickým změnám mozku. S věkem se snižuje jak jeho hmotnost, tak i velikost, a to zejména po 55. roce života. S věkem se snižuje i tloušťka mozkové kůry. Šedá hmota mozková ubývá rychleji mezi dvacátým a padesátým rokem, poté rychleji ubývá hmota bílá. Po šedesátém roce života se rozšiřují mozkové komory.

Podobné změny probíhají i při AD, přičemž jsou nápadnější u presenilních onemocnění. V těchto případech může hmotnost mozku klesnout o 200 až 300 g oproti kontrolním mozkům. Dochází tedy ke globální atrofii mozku, pozdní demenci doprovází atrofie temporálního laloku. Bylo zjištěno, že objem mozku před propuknutím nemoci může do jisté míry určit odolnost jedince vůči poklesu kognitivních funkcí. [64-68]

5.2. Mikroskopické změny mozku při Alzheimerově nemoci

5.2.1. Neurony

Během stárnutí dochází k poklesu počtu neuronů. Tento pokles je v průběhu AD vyšší. Pokles počtu neuronů při AD převyšuje pokles u přirozeného stárnutí o 40-78 % ve spánkové kůře. Nejvíce jsou postihnuty neurony s plochou nad $90 \mu\text{m}^2$, jejichž velikost se zmenšuje nebo úplně mizí. Dále je prokázáno, že se selektivně zmenšuje počet neuronů obsahujících somatostatin. Numerická atrofie se již v raných stádiích objevuje v entorhinální kůře, která je těžce poškozena. Úměrně tomu odpovídá stupeň poškození kognitivních funkcí. Navíc při AD na rozdíl od normálního stárnutí klesá počet pyramidových neuronů hipokampálního sektoru CA1, což má za následek poruchy paměti. Dochází také ke ztrátám cholinergních neuronů v bazální oblasti velkého mozku, následkem čehož klesá množství korové AChE a cholinacetyltransferasy. Součástí postupu AD jsou změny v dendritických systémech včetně synapsí, s čímž souvisí pokles kognitivních funkcí. Poškozeny jsou dendritické systémy jak

telencefalu (koncového mozku), tak i neokortexu (mozkové kůry). Mechanismus zániku neuronů je však nejasný. [68]

5.2.2. Neuronální klubka

Po impregnaci solemi stříbra lze pozorovat útvary připomínající chomáče silnějších vláken, tzv. neuronální klubka, kterým se také říká „náhrobní kameny neuronů“, protože vznikají po jejich rozpadu. Za použití elektronového mikroskopu bylo zjištěno, že se jedná o párová spirální vlákna, která se kolem sebe spirálovitě stáčí. Pomocí imunocytochemických metod bylo zjištěno, že hlavní složkou těchto párových spirálních vláken je tzv. τ -protein. Je to nízkomolekulární protein, který se váže na tubulin mikrotubulů, a tak startuje jejich polymerizaci a po jeho defosforylaci se podílí na jejich stabilizaci. Ve zdravém mozku se τ -protein vyskytuje v šesti izoformách. Ve spirálových vláknecích se vyskytuje ve své jednodušší formě, která má vlivem nadměrné fosforylace vyšší molekulovou hmotnost. Na vzniku klubek se kromě hyperfosforylace může podílet také glykosylace a ubikvitinizace. Na ubikvitinaci se podílí ubikvitin, což je malý protein s cytoprotektivním významem. Kovalentně se váže na cílový protein, který je poté rozštěpen proteasami a tím se podílí na odbourávání poškozených proteinů. V důsledku hyperfosforylace se τ -protein odděluje od mikrotubulů a mění se na párová spirální vlákna. Ta se následně štěpí na menší zlomky, redistribuují se v neuronu, následně dojde k ubikvitinaci a polymerizací vznikají nerozpustná párová spirální vlákna. [68-70]

5.2.3. Senilní plaky

Dalším nálezem významným pro diagnostiku AD jsou senilní plaky. Jde o útvary, které jsou v histologických řezech nepravidelně okrouhlé, heterogenní, velké asi 10-200 μm , obsahují amyloid. Během normálního stárnutí mozku se plaky vyskytují v malém počtu, během AD je jejich výskyt mnohem větší. Zobrazují se různými druhy barvení, díky kterému lze rozlišit celkem osm typů senilních plak. [68, 71]

5.2.4. A- β -protein

Jedná se o proteiny se stejnými či podobnými fyzikálními vlastnostmi, poskytující většinou stejné chemické reakce, avšak nemusí mít nutně stejné chemické složení. Jev, při kterém se tyto abnormální vláknité proteiny chronicky ukládají jak extracelulárně, tak intracelulárně, se obecně nazývá amyloidóza. Všechny tyto proteiny mají sekundární β -strukturu (skládaný list), jsou špatně rozpustné v běžných rozpouštědlech a vyskytují se

v podobě nevětvených vláknec o průměru 9 nm. Tyto proteiny tvoří jádro senilních plak a ukládají se i ve stěnách tepének. Jsou tvořeny 39-43 aminokyselinami. β -amyloid vzniká z mnohem větších proteinů, tzv. amyloidových prekurzorových proteinů (APP). Tyto proteiny mají několik forem lišících se molekulovou hmotností, jejich fyziologická funkce v organismu není známa. APP je degradován sekretasami na fragmenty různých délek. Jádra senilních plak jsou tvořeny amyloidy složenými ze 42 až 43 aminokyselin, kdežto amyloid vyskytující se v cévních stěnách je tvořen 39-40 aminokyselinami. Produkty vytvořené α -sekretasou jsou zcela neškodné, kdežto amyloid vzniklý štěpením APP β a γ -sekretasami, tvořený 42 aminokyselinami se podílí na tvorbě senilních plak největší měrou. Jeho množství se zvětšuje ve všech formách AD a je klíčovým patogenetickým článkem neurodegenerativních procesů při AD. Zvýšená tvorba amyloidu A- β 42 je mimo jiné podmíněna mutací genu APP na 21. chromozomu, v důsledku čehož se AD u lidí s Downovým syndromem objevuje již v nízkém věku z důvodu přítomnosti nadbytečného 21. chromozomu. [72-77]

5.2.5. Apolipoprotein E

Apolipoprotein E je protein tvořený 299 aminokyselinami, kóduje ho polymorfní gen na 19. chromosomu, který se vyskytuje ve třech alelách, které kódují tři různé izoformy tohoto proteinu – ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Tyto izoformy se liší dvěma aminokyselinami. Isoforma ApoE3 je nejčastěji se vyskytující izoformou, ApoE2 je velmi vzácná. Bylo zjištěno, že izoforma ApoE4 má souvislost s výskytem AD. Jedinci, kteří jsou homozygoti a nesou v alelách ApoE4 jsou ohroženi rizikem vývoje AD mnohem více než lidé, kteří jsou heterozygoti nebo alely pro ApoE4 vůbec nenesou. Navíc se u těchto jedinců může AD projevit v nižším věku. Paradoxně bylo také zjištěno, že průběh Alzheimerovy choroby je u nosičů ApoE4 méně agresivní než u jedinců, kteří tuto alelu nenesou. [68, 78-82]

5.3. Příznaky Alzheimerovy nemoci

Příznaky Alzheimerovy choroby přicházejí velmi pomalu, zpočátku nejsou téměř zřetelné. Předpokládá se, že preklinické stádium trvá i několik let. Jedním z prvních příznaků bývá porucha recentní epizodické paměti, jedinec zapomíná, co přesně se v daný den dělo. Krátkodobá paměť však v raných stádiích nemoci bývá zachována. Následně se začnou objevovat poruchy vybavování čerstvě uložených dat a porucha konfrontačního pojmenování (schopnost vybavit si a říci určité slovo pod situačním tlakem), řeč je obsahově prázdná, sic plynulá. Poté se začíná objevovat zmatenost, nemocní bloudí, nemohou nalézt cestu ani na místa, která pravidelně dlouhodobě navštěvovali (jako je např. pošta), nebo cestu domů.

Nastávají problémy s plánováním, ženy často zaměňují pořadí běžně prováděných domácích prací. U přibližně 40 % pacientů se začne objevovat deprese, halucinace a agresivita. Bývají přesvědčeni, že jsou naprosto v pořádku a odmítají léčbu. [68]

5.4. Léčba Alzheimerovy nemoci

Farmakoterapii Alzheimerovy nemoci lze rozdělit do dvou skupin:

- a) kognitivní farmakoterapie
- b) nekognitivní, symptomatická farmakoterapie

Podstatná část léčby je zaměřena na kognitivní funkce (paměť, intelekt apod.), které jsou hlavní poruchou u Alzheimerovy nemoci. Jednou z možností je léčba prekursorů acetylcholinu, z nichž nejpoužívanější jsou lecitiny, což jsou deriváty glycerolu se substituovaným fosfatidylcholinem a mastnými kyselinami. Z něho se postupně uvolňuje cholin, který je následně využit k syntéze acetylcholinu. Podání samotného acetylcholinu není možné z důvodu jeho velmi krátkého poločasu. Tato léčba se nejčastěji používá v kombinaci s inhibitory cholinesteras, podávání lecitinu samo o sobě nemá v léčbě AD valný efekt. [68]

Současná léčba AD se zaměřuje zejména na inhibitory cholinesteras, díky kterým se zvýší hladina acetylcholinu vázajícího se na receptory cholinergního systému. Jednotlivé inhibitory byly popsány výše. Zde je tabulka shrnující tři v současnosti na trhu dostupná léčiva:

Tabulka 1: Shrnutí tří používaných léčiv k terapii AD: donepezilu, rivastigminu a galantaminu (Štěpánková, 2008, upraveno)

| Léčivo | Donepezil | Rivastigmin | Galantamin |
|---|--------------|---------------------|--------------|
| obchodní název | Aricept® | Exelon® | Razadyne® |
| chemická třída | piperidin | karbamát | alkaloid |
| AChE inhibitor | ano | ano | ano |
| BuChE inhibitor | nepatrně | ne | nepatrně |
| typ inhibice | reverzibilní | pseudo-reverzibilní | reverzibilní |
| modulátor nikotinových receptorů | ne | ne | ano |
| počet denních dávek | jedna | dvě | dvě |
| doporučená denní dávka | 5-10 mg | 6-12 mg | 16-24 mg |
| čas k dosažení maximální sérové koncentrace [h] | 3-4 | 1-1,4 | 1-2 |

| | | | |
|-----------------------|----------------|---------|----------------|
| poločas eliminace [h] | 50-70 | 0,6-2 | 5-7 |
| místo eliminace | játra, ledviny | ledviny | játra, ledviny |

Dalším způsobem léčby je použití agonistů muskarinových a nikotinových acetylcholinergních receptorů. Zejména stimulace muskarinových receptorů se ukázala být úspěšná. Také se hledají látky, které by inhibovaly GABA-receptory, protože GABAergní systém (systém kyseliny gamaaminomáselné) inhibuje acetylcholinergní systém. Další možnosti ovlivnění cholinergního systému se zkoumají. Dále se farmako terapie zaměřuje na: potlačení snížení neuronálního metabolismu (zejména oxidativního metabolismu glukózy a buněčné proteosyntézy), likvidaci volných kyslíkových radikálů, léčbu poruch spánku, deprese a dalších faktorů nemoci. Jedná se tedy o komplexní léčbu zahrnující i kognitivní trénink a rehabilitaci tělesných funkcí. [68]

6. MYASTHENIA GRAVIS

Myasthenia gravis (MG) je autoimunitní onemocnění, při kterém se protilátky váží na acetylcholinové receptory nebo na funkčně příbuzné molekuly v postsynaptické membráně v neuromuskulárním spoji, což způsobuje slabost kosterních svalů. Tato slabost může být generalizovaná nebo lokalizovaná, ale téměř vždy postihuje oční svaly s diplopií a ptózou (pokles očního víčka). Postižení postihuje svaly obvykle symetricky, kromě očních svalů, jejichž postižení obvykle bývá silně asymetrické. Svalová slabost se obvykle zvyšuje cvičením a opakovaným používáním svalů, mění se v průběhu dne i den ode dne. Síla svalů obvykle bývá na normální úrovni ráno. Oční myasthenie postihuje výhradně vnější okulární svaly, za generalizovanou myasthenii se považuje slabost postihující jakékoliv jiné svaly než oční. [83, 84]

Na základě klinických, epidemiologických, imunologických a genetických nálezů byla MG dále klasifikována:

- oční MG (OMG)
- generalizovaná MG s časným nástupem (MG s časným nástupem – před 45 rokem života, EOMG – early-onset MG)
- generalizovaná MG s pozdním nástupem (MG s pozdním nástupem – po 45 roce života, LOMG – late-onset MG).

10-15 % pacientů je navíc postiženo thymomem (karcinomem thymu, TAMG – thymoma-associated MG). MG je způsobeno snížením funkčních nikotinových

acetylcholinových receptorů (AChR) v kosterním svalu a strukturálními změnami neuromuskulární koncové destičky kvůli účinkům různých autoprotilátek. U přibližně 85 % lze detekovat autoprotilátky proti samotnému AChR. Protilátky proti AChR jsou komplement vázající IgG1, jejichž hladina úzce souvisí se závažností onemocnění. Tyto protilátky mohou blokovat receptor a vést k jeho internalizaci, což snižuje počet dostupných receptorů na membráně. Navíc aktivace kaskády komplementu vede k destrukci koncové struktury receptoru a rozšíření synaptické štěrbin, což znamená, že se zvýší vzdálenost mezi presynaptickým místem, ze kterého se uvolňuje acetylcholin a postsynaptickým místem, kam se váže. [83, 84]

Protilátky proti svalově specifické tyrosinkinase (MuSK – muscle specific tyrosine kinase) jsou typu komplement nevázájícího IgG4, které zabraňují interakci nízkodenzitního lipoproteinu 4 (LRP4 – low-density lipoprotein receptor-related protein 4) s MuSK a tím se narušuje proteinová stavba neurosvalové ploténky. Dále se mohou vyskytovat protilátky proti LRP4, které jsou převážně typu IgG1 a 2, které vážou komplement a jsou schopné inhibovat interakci LRP4 a agrinu a tím narušit shlukování AChR ve svalových buňkách, které je důležité pro jejich správnou funkci. Protilátky proti agrinu jsou schopny inhibovat fosforylaci MuSK indukovanou agrinem a následně také shlukování AChR ve svalových buňkách. [84]

Za tuto autoimunitní poruchu je zodpovědná špatná regulace T i B buněk. T buňky stimulují produkci prozánětlivých citokinů autoreaktivní B buňky, které následně dozrávají v plasmatické buňky, které produkují protilátky zodpovědné za toto onemocnění. [85]

Myasthenia gravis se diagnostikuje prozkoumáním klinických projevů a dále pak vyšetřením protilátek proti AChR a MuSK. V 80 % bývají pozitivní protilátky proti AChR. Dále lze provést elektrofyziologické testy. Jako léčiva první volby slouží inhibitory cholinesteras, zejména pak pyridostigmin, což je léčivo ze skupiny karbamátů. Další možností je kortikosteroidová léčba v kombinaci s imunosupresivy, jako je např. azathioprin. [85]

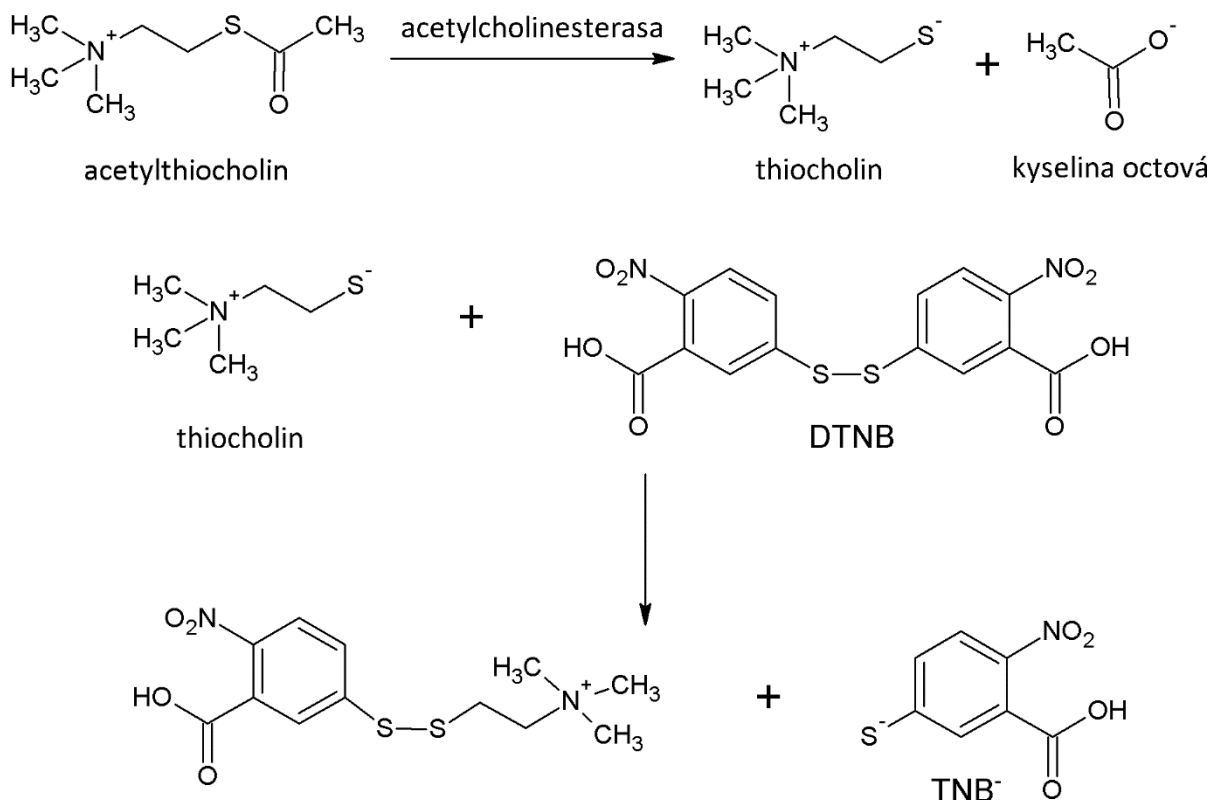
7. STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERAS

Stanovování aktivity cholinesteras v organismu je důležité pro sledování účinnosti terapie inhibitory cholinesterasa dále také pro včasnou diagnostiku při otravě organofosfátovými inhibitory využívanými například jako insekticidy, ale také jako bojové chemické látky. Nejčastěji se ke stanovení využívá erytrocytární AChE, protože je dobře dostupná a její inhibice výborně koresponduje s mírou otravy. Metod jak stanovit aktivitu

cholinesteras, a tím i nepřímo jejich inhibitorů je mnoho. Mezi ty nejčastěji využívané patří metody: elektrometrické, titrační, kolorimetrické, měření změny pH s využitím indikátoru, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické a enzymové. Tyto metody však vyžadují náročnou úpravu vzorku, měření trvá příliš dlouho nebo je enzym nedostatečně specifický k substrátu. Proto se také používá metoda vytvořená Ellmanem. Je velmi citlivá a vhodná pro běžné použití. Jedná se o kolorimetrickou metodu, která se v praxi používá k hodnocení zdravotního stavu lidí přicházejících často do styku s organofosfátovými inhibitory (např. zemědělstí pracovníci). [86]

7.1. Ellmanova metoda

Principem této metody je hydrolyza thiocholinu, přesněji tedy acetylthiocholinu pro AChE a butyrylthiocholinu pro BuChE. Produktem enzymové hydrolyzy je příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin ve své molekule obsahuje skupinu -SH a je detegován pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB). Po reakci thiocholinu s DTNB dojde k uvolnění 5-sulfanyl-2-nitrobenzoového aniontu (TNB⁻), který je následně detegován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm (Obr. 17). [86]



Obrázek 17: Reakční schéma Ellmanovy metody (Žďárová Karasová, 2010)

Tato metoda je velmi jednoduchá, rychlá a levná, ale má i své nevýhody. Jednorázová zařízení pro rychlou analýzu Ellmanovou metodou lze jednoduše sestavit. Zásadní nevýhodou ale je, že anion TNB- má absorpční maximum při 412 nm, což je vlnová délka, při které absorbuje záření také hemoglobin přítomný v krvi. Řešením tohoto problému je velké zředění vzorku. Měření mohou ovlivnit také -SH skupiny přítomné v roztoku, které pomalu reagují s Ellmanovým činidlem (DTNB). Původní Ellmanova metoda byla na základě těchto nedostatků modifikována. Byly například používány jiné vlnové délky, dvoupaprskové spektrofotometry nebo jiné chromogenní disulfidy (např. 4,4'-dithiopyridin ke snížení interference s hemoglobinem. Stanovení AChE v krvi lze také zlepšit použitím selektivních inhibitorů BuChE, jako je quinidin ((2-ethenyl-4-azabicyklo(2,2,2)oct-5-yl)-(6-methoxyquinolin-4-yl)-methanol) nebo fenothiazinové deriváty. Dále se v běžné medicíně a v toxikologii používá sledování změny aktivity BuChE. Diagnózy intoxikace organofosfátovými inhibitory pomocí BuChE se používají v praxi při automatickém stanovení cholinesteras v klinické chemii. Zařízení využívající AChE jako rozpoznávací složku se úspěšně používá k měření inhibice nervově paralytickými látkami jako je např. sarin, soman, tabun, cyklosarin, VX a R-33. Cholinesterasa může být inhibována na povrchu standardních 96-jamkových mikrodestiček a vyhodnocena čtečkou mikrodestiček. [86-89]

7.2. Biosenzory

Biosenzor je analytické zařízení, které obsahuje biologickou část (např. enzym, protilátku nebo imobilizované buňky) a fyzikálně chemický převodník. Analyt reaguje s biologickou komponentou a tím je generován elektrický nebo optický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo více stanovovaných látek v roztoku, dále je zesílen a následně zpracován. Nejvíce známé a běžně komerčně používané jsou biosenzory glukosaoxidasy pro stanovení glykémie. Tento typ biosenzoru je oblíbený zejména díky snadné praktické aplikaci a dobré dostupnosti enzymu. Jiné biorekogniční molekuly jsou ale také vhodné ke konstrukci biosenzorů. Samotné enzymy nebo buňky obsahující enzymy mohou být použity k testování látek jak s nízkou molekulovou hmotností, jako je například etanol, fenolické metabolity nebo mohou být také použity pro stanovení molekul s vysokou molekulovou hmotností, jako kyselina hyaluronová. Imunoenzymy se používají ke stanovení buď protilátek, nebo antigenů. [90-96]

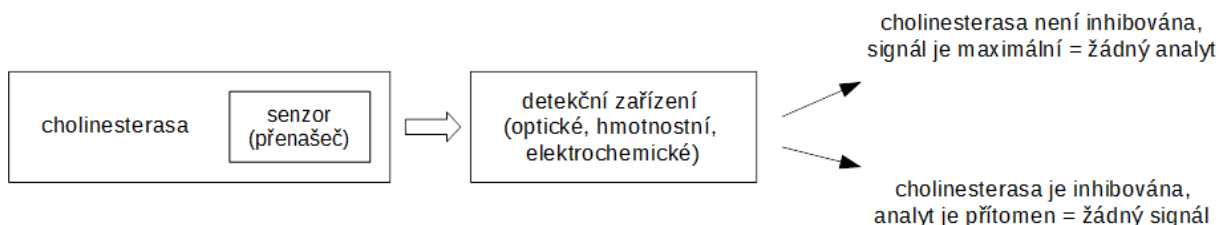
Jsou používány následující typy biosenzorů: povrchová plazmonová rezonance, piezoelektrické, optické a voltametrické (polarografické) biosenzory. Biosenzory a jiná zařízení zkonstruovaná za použití cholinesteras, mají jako rozpoznávací prvek enzym.

Biorekogniční část biosenzoru lze rozdělit do dvou základních skupin:

- biokatalytické (enzym, buněčná organela, buňka, tkáň, orgán, organismus)
 - u tohoto typu má analyt obvykle charakter substrátu a biorekogniční část ho přeměňuje v průběhu chemické reakce
- bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor)
 - zde je analyt vázán ve vznikajícím afinitním komplexu

Fyzikálně-chemické převodníky jsou látky, které poskytují signál k dalšímu zpracování, tedy se zesílí a dále vyhodnotí. Lze je rozdělit následovně:

- optické
 - fotometrie, fluorimetrie, luminometrie, nelineární optika
- elektrochemické
 - potenciometrie, amperometrie, konduktometrie, voltametrie
- piezoelektrické a akustické
- kalorimetrické [95, 97]



Obrázek 18: Zjednodušené schéma biosenzoru s cholinesterasou pro testování neurotoxických sloučenin (Pohanka, 2014)

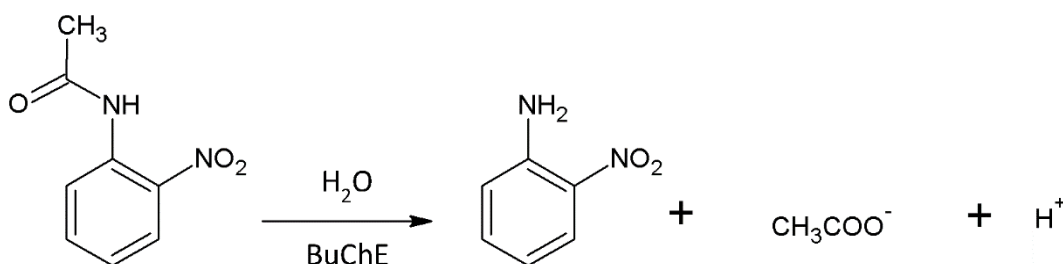
Na obrázku č. 18 je znázorněno zjednodušené schéma cholinesterasového biosenzoru. Tyto sensory jsou vhodné pro diagnostiku otravy organofosfátových inhibitorů cholinesteras, což jsou neurotoxické sloučeniny představující vážné riziko pro lidské zdraví nebo život, dále pak ke stanovení účinnosti léčby inhibitory cholinesteras při AD. Pro většinu inhibitorů cholinesterasa funguje jako biorekogniční element, který se znehodnocuje, což znamená, že je přítomnost analytu prezentována nevratným poklesem signálu poskytovaného aktivitou enzymu. Některé inhibitory, ty reversibilní, se však z enzymu snadno vyváží a aktivita cholinesterasy se tak snadno obnoví. Hlavními výhodami těchto biosenzorů je snadná komerční dostupnost cholinesteras a spolehlivost metod pro testování enzymové aktivity. [98]

7.2.1. Optické biosenzory

Optické přístroje využívající cholinesterasy jako biorekogniční složku jsou snadno a rychle sestavitelné díky snadné dostupnosti optických přístrojů vhodných pro konstrukci biosenzoru a zavedených protokolů prováděných testů. V současnosti se využívají všechny spektrofotometrické, kolorimetrické a fluorimetrické metody. Oproti elektronickým metodám

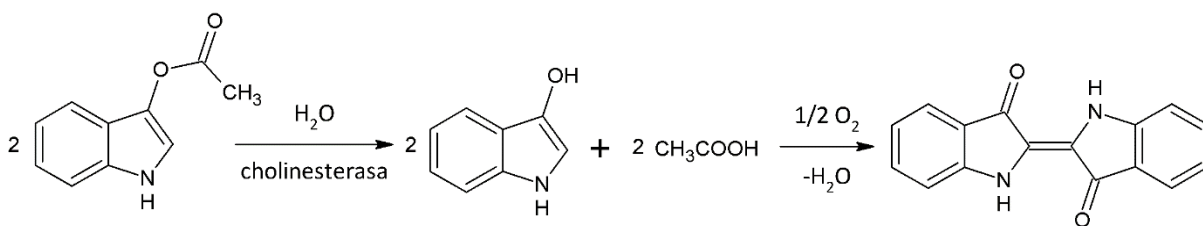
mají tyto optické metody výhodu v možnosti kontrolovat reakci pouhým okem zejména pro případ poruchy optického detektoru. Naproti tomu nevýhodou je možnost interference jinými barevnými sloučeninami, jako je hemoglobin či potravinářská barviva. [96]

Cholinesterasy štěpí estery a thioestery. BuChE navíc může účinně hydrolyzovat acylamidy. AChE je může za určitých podmínek štěpit také, ale není to běžný jev. Navíc tato hydrolyza probíhá mnohem pomaleji. Některé hydrolytické reakce jsou přímo viditelné, některé se však musí vizualizovat přidáním chromogenu. Příkladem může být konverze chromogenního 2-nitroacetanilidu na 2-nitroanilin pomocí BuChE. 2-nitroanilin poskytuje nažloutlé zbarvení, které lze měřit spektrofotometricky (Obr. 19).



Obrázek 19: Hydrolyza 2-nitroacetanilidu na 2-nitroanilin (Pohanka, 2014)

Aktivitu cholinesterasy lze snadno detekovat kolorimetricky, spektrofotometricky a fluorimetricky za použití indoxyl acetátu a jeho derivátů. Jedná se o dvoustupňovou reakci (Obr. 20), při níž se indoxyl acetát rozštěpí a uvolní kyselinu octovou a indol. V dalším kroku dochází spontánně k oxidaci na modré zbarvení (indigo). Této reakce bylo využito pro vytvoření biosenzoru s imobilizovanou AChE vhodného k vizuální i instrumentální analýze přítomnosti neurotoxických látek (např. chlorpyrifos, karbofuran a parathion). Jiný biosenzor využívající indoxyl acetát byl použit k vizuálnímu stanovení paraoxonu a neostigminu. Tato reakce je relativně odolná vůči interferenci, avšak rychlost konverze substrátu pro indoxyl acetát je mnohem nižší než u acetylcholinu při použití AChE. Vysoká stabilita reagensů u těchto metod využívajících indoxyl acetát a dalších indigo tvořících sloučenin je hlavní výhodou oproti Ellmanově metodě. [95, 96, 99-103]



Obrázek 20: Princip hydrolyzy indoxylacetátu cholinesterasou s následnou oxidací na indigo

7.2.2. Kvantové tečky

V posledních letech jsou hojně zkoumány kvantové tečky, díky možnosti jejich využití v mnoha různých oborech, ať už v technologii, medicíně či analytické chemii, pro jejich jedinečné fyzikální vlastnosti. Jsou to fluoreskující polovodičové monokrystaly. Elektrony atomů kvantových teček lze excitovat elektromagnetickým zářením, čímž přejdou na vyšší energetickou hladinu. Po určité době dojde k uvolnění energie a emisi elektronového záření o delší vlnové délce než při excitaci. Na jednoduchém principu funguje biosenzor pracující s CdTe (nanokrystaly telluridu kademnatého) kvantovými tečkami, s AChE a cholinoxidasou. AChE hydrolyzuje acetylcholin na acetát a cholin, cholin přechází na betain (přes betain aldehyd) a peroxid vodíku pomocí cholinoxidasy. Takto vytvořený peroxid vodíku pak zastíní CdTe kvantové tečky. [104-106]

7.2.3. Elektrochemické biosenzory

Existuje mnoho typů elektrochemických biosenzorů, pro které lze aplikovat jak potenciometrii, tak voltometrii. Potenciometrie je elektrochemická metoda založená na měření iontů, které zvyšují potenciál elektrod. Míru kyselosti či zásaditosti roztoku (aktivita/koncentrace H^+ nebo OH^- iontů) lze měřit pomocí pH senzitivních elektrod. Při analýzách s biosenzory lze potenciometrii využít, pokud během enzymatické reakce vzniká nebo zaniká kyselina. Na rozdíl od toho se při voltametii měří elektrický proud vzniklý při redoxní reakci. Napětí je dodáváno v pulsech (voltometrie se čtvercovou vlnou, diferenční pulsní voltometrie), lineárně se mění (cyklická voltometrie, lineární voltometrie) nebo je konstantní (chronoamperometrie). Elektrochemické biosenzory nejsou citlivé na rušení barevnými sloučeninami, což je oproti optickým metodám výhodou. Avšak antioxidanty s nízkou molekulovou hmotností mohou generovat signál, který pak působí rušivě při měření. Senzory pro tyto elektrochemické metody mohou být pouze v roztoku enzymu, avšak mikroelektrody, mohou být připojeny přímo k mozkové tkáni. Potenciometrický biosenzor s imobilizovanou cholinesterasou lze snadno připravit, protože během reakce se vytváří kyselina a lze tak snadno měřit aciditu média. V případě potenciometrie byl jako substrát pro AChE zvolen acetylcholin, okyselení média způsobuje kyselina octová. Reakce může být provedena pomocí tranzistoru řízeného elektrickým polem (FET – Field-Effect Transistor), který je vysoce citlivý na změny pH. FET však není jediným vhodným fyzikálně-chemickým převodníkem pro konstrukci potenciometrických biosenzorů s cholinesterasami. Podobných výsledků lze dosáhnout i s dalšími převodníky, jako je třeba snímač s heptakis (2,3,6-tri-*O*-

methyl)- β -cyklodextrinem fungujícím jako ionofor, kterým byla stanovována aktivita BuChE. Nevýhodou elektrochemických biosenzorů citlivých na pH je, že při přípravě neurotoxických sloučenin v kyselém nebo zásaditém roztoku může dojít ke zkreslení výsledků. [96, 107-115]

8. ZÁVĚR

Inhibitory cholinesteras jsou rozsáhlou skupinou sloučenin, které mohou mimo jiné sloužit k léčbě neurogenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba či myasthenia gravis. Jedná se o léčbu symptomatickou, jejíž principem je inhibování cholinesteras, převážně acetylcholinesterasy, a tím zvýšení hladiny acetylcholinu na neuronálních a neuromuskulárních spojích, a to zejména za účelem zlepšení kognitivních funkcí pacientů s Alzheimerovou chorobou a potlačení svalové únavy u pacientů s myasthenia gravis.

Existuje mnoho sloučenin, které by potenciálně mohly k tomuto účelu sloužit, nicméně se ve spoustě případech jeví jako nevhodné, ať už z důvodu nedostatečného účinku na cholinergní systém, nebo hlavně kvůli negativním vedlejším účinkům jako je nauzea až zvracení, průjem, ztráta chuti k jídlu, závratě, únava nebo dokonce hepatotoxicita.

První objevenou takto účinnou látkou byl karbamátový derivát fyzostigmin, který sice vykazoval pozitivní účinky na kognitivní funkce, nicméně z důvodu jeho krátké doby působení a vedlejším účinkům od něho bylo upuštěno. Prvním schváleným inhibitorem cholinesteras byl akridinový derivát takrin, který již byl ale stažen z trhu zejména kvůli své hepatotoxicitě.

V současnosti se k léčbě Alzheimerovy choroby využívají tři léčiva a to: donepezil (Aricept[®]), rivastigmin (Exelon[®]) a galantamin (Razadyne[®]). Z léčiv pro myasthenia gravis je to pyridostigmin. Další léčiva z řad inhibitorů cholinesteras jsou v klinických studiích.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KORECKÁ, L., Š. ŠTĚPÁNKOVÁ a A. ČEGAN. *Obecná biochemie: pro speciální chemicko-biologické obory*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012, 29-48. ISBN 9788073954703.
- [2] MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 9788072627028.
- [3] BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. 2004, **38**, 151-216.
- [4] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [5] ŠTERN, P. *Obecná a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 2., upr. vyd. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 9788024619798.
- [6] VODRÁŽKA, Z., P. RAUCH a J. KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-330-4.
- [7] KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2004. ISBN 80-7080-551-x.
- [8] BISSWANGER, H. *Enzyme kinetics: principles and methods*. Přeložil Leonie BUBENHEIM. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. ISBN 3-527-30343-X.
- [9] BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2007, **8**(2), 112-117.
- [10] POHANKA, M. Cholinesterases, a Target of Pharmacology and Toxicology. *Biomedical Papers*. 2011, **155**(3), 219-229.
- [11] QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chem. Rev.* 1987, **87**, 955-979.
- [12] Acetylcholinesterase: A gorge-ous enzyme. *Protein Data Bank in Europe: Bringing Structure to Biology* [online]. Hinxton, Cambridgeshire, UK: EMBL, 2012 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/quips?story=AChE>
- [13] FIELDS, R. D., D. J. DUTTA, J. BELGRAD a M. ROBNETT. Cholinergic signaling in myelination. *Glia*. 2017, **65**(5), 687-698.
- [14] KALOW, W. a K. GENEST. A Method for the Detection of Atypical Forms of Human Serum Cholinesterase. Determination of Dibucaine Numbers. *Biochemistry and Cell Biology*. 1957, **35**(6), 339-346.
- [15] LOCKRIDG, O., S. ADKINS a B. N. LA DU. Location of Disulfide Bonds within the Sequence of Human Serum Cholinesteras. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, **27**(262), 12945-12952.
- [16] LOCKRIDGE, O., H. W. ECKERSON a B. N. LA DU. Interchain Disulfide Bonds and Subunit Organization in Human Serum Cholinesterase*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1979, **17**(254), 8324-8330.
- [17] CHATONNET, A. a O. LOCKRIDG. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemistry Journal*. 1989, **3**(260), 625-636.
- [18] CAMPS, P. a D. MUNOZ-TORRERO. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimers Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2002, **2**(1), 11-25.

- [19] ADLER, M. a M. G. FILBERT. Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. *FEBS Letters*. 1990, **267**(1), 107-110.
- [20] VILLARROYA, M., A. GARCÍA a J. MARCO. New Classes of AChE Inhibitors with Additional Pharmacological Effects of Interest for the Treatment of Alzheimers Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2004, **10**(25), 3177-3184.
- [21] GIACOBINI, E. Selective inhibitors of butyrylcholinesterase: a valid alternative for therapy of Alzheimer's disease? *Drugs Aging*. 2001, **18**(12), 891-898.
- [22] GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological Research*. 2004, **50**(4), 433-440.
- [23] ZHAO, B., S. M. MOOCHHALA a S. THAM. Biologically active components of Physostigma venenosum. *Journal of Chromatography B*. 2004, **812**(1-2), 183-192.
- [24] BACHURIN, S. O. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*. 2003, **23**(1), 48-88.
- [25] THAL, L. J., P. A. FULD, D. M. MASUR a N. S. SHARPLESS. Oral physostigmine and lecithin improve memory in Alzheimer disease. *Annals of Neurology*. 1983, **13**(5), 491-496.
- [26] DAVIS, K. L. a R. C. MOHS. Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple- dose intravenous physostigmine. *American Journal of Psychiatry*. 1982, **139**(11), 1421-1424.
- [27] GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochemistry International*. 1998, **32**(5-6), 413-419.
- [28] JANN, M. W., K. L. SHIRLEY a Gary W. SMALL. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. 2002, **41**(10), 719-739.
- [29] KUČA, K., J. BIELAVSKÝ, J. CABAL aj. KASSA. Synthesis of a new reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003, **13**(20), 3545-3547.
- [30] WOREK, F., M. KOLLER, H. THIERMANN a L. SZINICZ. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology*. 2005, **214**(3), 182-189.
- [31] AMENTA, F., L. PARNETTI, V. GALLAI a A. WALLIN. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001, **122**(16), 2025-2040.
- [32] THAL, L. J., G. SCHWARTZ, M. SANO, et al. A multicenter double-blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer's disease. *Neurobiology*. 1996, **47**(6), 1389-1395
- [33] SUGIMOTO, H., Y. YAMANISHI, Y. IIMURA a Y. KAWAKAMI. Donepezil Hydrochloride (E2020) and Other Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*,. 2000, (7), 303-339.
- [34] SRAMEK, J. J., G. A. BLOCK, S. A. REINES, S. F. SAWIN, A. BARCHOWSKY a N. R. CUTLER. A multiple-dose safety trial of eptastigmine in Alzheimer's disease, with pharmacodynamic observations of red blood cell cholinesterase. *Life Sciences*. 1994, **56**(5), 319-326.

- [35] IMBIMBO, B. P., P. MARTELLI, W. M. TROETEL, F. LUCHELLI, U. LUCCA a L. J. THAL. Efficacy and safety of eptastigmine for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999, **52**(4), 700-708.
- [36] CUMMINGS, J. L. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. *American Journal of Psychiatry*. 2000, **157**(1), 4-15.
- [37] ENZ, A., R. AMSTUTZ, H. BODDEKE, G. GMELIN a J. MALANOWSKI. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease.: Enz A, Amstutz R, Boddeke H, Gmelin G, Malanowski J. *Prog Brain Res*. 1993, **98**, 431-438.
- [38] ROSLER, M., R. ANAND, A. CICIN-SAIN, et al. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial Commentary. *BMJ*. 1999, **318**(7184), 633-640.
- [39] BALLARD, C. G. Advances in the Treatment of Alzheimer's Disease: Benefits of Dual Cholinesterase Inhibition. *European Neurology*. 2002-1-1, **47**(1), 64-70.
- [40] BIRKS, J., J. GRIMLEY EVANS, V. IAKOVIDOU a M. TSOLAKI. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1996.
- [41] BIRKS, J. S., J. GRIMLEY EVANS, V. IAKOVIDOU a M. TSOLAKI. Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2015, (4).
- [42] WATKINS, P. B. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1994, **271**(13), 992-998.
- [43] FREEMAN, S. E. a R. M. DAWSON. Tacrine: A pharmacological review. *Progress in Neurobiology*. 1991, **36**(4), 257-277.
- [44] UNZETA, M., G. ESTEBAN, I. BOLEA, W. A. FOGEL, R. R. RAMSAY, M. B. H. YAUDIM, K. F. TIPTON aj. MARCO-CONTELLI. Multi-Target Directed Donepezil-Like Ligands for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2016, **10**, 1-24.
- [45] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š. a K. KOMERS. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*. 2008, (4), 160-171.
- [46] LÓPEZ-CARILLO, L. a M. LÓPEZ-CERVANTES. Effect of Exposure to Organophosphate Pesticides on Serum Cholinesterase Levels. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1993, **48**(5), 359-363.
- [47] MURPHY, MICHAEL F., STEPHEN T. HARDIMAN, RALPH J. NASH, F. JACOB HUFF, JOHN J. DEMKOVICH, CRAIG DOBSON a URSULA E. KNAPPE. Evaluation of HP 029 (Velnacrine Maleate) in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991, **640**(1), 253-262.
- [48] SHIBANOKI, S., Y. ISHII, T. KUBO, M. KOGURE, S. ASAI a K. ISHIKAWA. Effect of 9-amino-2,3,5,6,7,8-hexahydro-1H-cyclopenta-(b)-quinoline monohydrate hydrochloride (NIK-247) on cholinergic enzyme activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991, **39**(2), 499-502.
- [49] JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin Farmakol Farm*. 2004, **18**, 212-214.

- [50] DOODY, R. S., P. N. TARIOT, E. PFEIFFER, J. T. OLIN a S. M. GRAHAM. Meta-analysis of six-month memantine trials in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*. 2007, **3**(1), 7-17.
- [51] SANTIAGO, L. A., P. J. O. PINEDA a L. G. GERONA. Preliminary Study on the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Ipomoea Muricata (Linnaeus) Jacquin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016, **7**(1), 108-114.
- [52] ROGERS a FRIEDHOFF. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following single oral doses. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1998, **46**(S1), 1-6.
- [53] SUGIMOTO, H., Y. IIMURA, Y. YAMANISHI a K. YAMATSU. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds. *J Med Chem*. 1995, **38**(24), 4821-4829.
- [54] GREENBLATT, H. M., H. DVIR, I. SILMAN aj. L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: A Multifaceted Target for Structure-Based Drug Design of Anticholinesterase Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2003, **20**(3), 369-384.
- [55] LAGANIÈRE, S., J. COREY, X. C. TANG a I. HANIN. Acute and chronic studies with the anticholinesterase Huperzine A: effect on central nervous system cholinergic parameters. *Neuropharmacology*. 1991, **30**(7), 763-768.
- [56] GEIB, S. J., W. TÜCKMANTEL a A. P. KOZIKOWSKI. Huperzine A – a potent acetylcholinesterase inhibitor of use in the treatment of Alzheimer's disease. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*. 1991, **47**(4), 824-827.
- [57] VED, H. S., M. L. KOENIG, J. R. DAVE a B. P. DOCTOR. Huperzine A – a potent acetylcholinesterase inhibitor of use in the treatment of Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 1997, **8**(4), 963-967.
- [58] BHATTACHARYA, S. a D. MONTAG. Acetylcholinesterase inhibitor modifications: a promising strategy to delay the progression of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research* [online]. 2015, **10**(1), 43-45.
- [59] HOLMSTEDT, B., M., I. NORDGREN a M. SUNDWALL. Metrifonate. Summary of toxicological and pharmacological information available. *Arch. Toxicol*. 1978, **41**(1), 3-29.
- [60] HINZ, V. C., S. GREWIG a B. H. SCHMIDT. Metrifonate induces cholinesterase inhibition exclusively via slow release of dichlorvos. *Neurochem. Res*. 1996, **21**(3), 331-337.
- [61] HINZ, V. C., S. GREWIG a B. H. SCHMIDT. Metrifonate and dichlorvos: effects of a single oral administration on cholinesterase activity in rat brain and blood. *Neurochem. Res*. 1996, **21**(3), 339-345.
- [62] KATZ, K. D. a D. E. BROOKS. Organophosphate Toxicity Follow-up. In: *Medscape* [online]. 2016 [cit. 2017-06-29]. Dostupné z: <http://emedicine.medscape.com/article/167726-overview>
- [63] POHANKA, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2012, **22**(8), 871-886.

- [64] DAVIS, P. J. M. a E. A. WRIGHT. A New Method for Measuring Cranial Cavity Volume and Its Application to the Assessment of Cerebral Atrophy at Autopsy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 1977, **3**(5), 341-358.
- [65] TERRY, Robert D., Richard DETERESA a Lawrence A. HANSEN. Neocortical cell counts in normal human adult aging. *Annals of Neurology*. 1987, **21**(6), 530-539.
- [66] HUBBARD, B M a J M ANDERSON. Age, senile dementia and ventricular enlargement. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1981, **44**(7), 631-635.
- [67] ANDERSON, J. M., B. M. HUBBARD, G. R. COGHILL a W. SLIDDERS. The effect of advanced old age on the neurone content of the cerebral cortex. Observations with an automatic image analyser point counting method. *J Neurol Sci*. 1983, **58**(2), 235-246.
- [68] KOUKOLÍK, F. a R. JIRÁK. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada, 1998, 27-224. ISBN 8071696153.
- [69] BUÉE-SCHERRER V., BUÉE L, HOF P. R., et al. Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins. *The American Journal of Pathology*. 1995;146(4):924-932.
- [70] CRYSTAL, H. A., D. W. DICKSON, M. J. SLIWINSKI, R. B. LIPTON, E. GROBER, H. MARKS-NELSON a P. ANTIS. Pathological markers associated with normal aging and dementia in the elderly. *Annals of Neurology*. 1993, **34**(4), 566-573.
- [71] DICKSON, D. W. The pathogenesis of senile plaques. *Neuropathol. Exp. Neurol*. 1997, **56**(4), 321-339.
- [72] GLENNER, G. G. Amyloid Deposits and Amyloidosis. *New England Journal of Medicine*. 1980, **302**(23), 1283-1292.
- [73] GLENNER, G. C. a C. W. WONG. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984, **120**(3), 885-890.
- [74] BLENNOW, K. a R. F. COWBURN. The neurochemistry of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1996, **94**, 77-86
- [75] MULLAN, M. a F. CRAWFORD. Genetic and molecular advances in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1993, **16**(10), 398-403.
- [76] MASTERS, C. L., G. SIMMS, N. A. WEINMAN, G. MULTHAUP, K. BEYREUTHER a B. L. MCDONALD. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1985, **82**(12), 4245-4249.
- [77] CITRON M. Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid β protein are generated from the β -amyloid precursor protein by different protease activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1996, **93**(23), 13170-13175.
- [78] GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie: dvacáté vydání*. 20. vydání. Praha: Galén, c2005, 278-279. ISBN 8072623117.
- [79] MAHLEY, R. W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988, **240**(4852), 622-630.

- [80] STRITTMATTER, W. J., A. M. SAUNDERS, D. SCHMECHEL, M. PERICAK-VANCE, J. ENGHILD, G. S. SALVESEN a A. D. ROSES. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, **90**(5), 1977–1981.
- [81] HIGGINS, G. A., C. H. LARGE, H. T. RUPNIAK a J. C. BARNES. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: a review of recent studies. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997, **56**(4), 675-685.
- [82] STERN, Y., J. BRANDT, M. ALBERT, et al. The absence of an apolipoprotein E4 allele is associated with a more aggressive form of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 1997, **41**(5), 615-620.
- [83] LONGO, D. L. a N. E. GILHUS. Myasthenia Gravis. *New England Journal of Medicine*. 2016, **375**(26), 2570-2581.
- [84] MELZER, N., T. RUCK, P. FUHR, et al. Clinical features, pathogenesis, and treatment of myasthenia gravis: a supplement to the Guidelines of the German Neurological Society. *Journal of Neurology*. 2016, **263**(8), 1473-1494.
- [85] PIŤHA, J. Myasthenia gravis. *Practicus*. 2015, **14**(11), 14-17.
- [86] ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, J., K. KUČA, D. JUN a J. BAJGAR. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chemické listy*. 2010, **104**, 46-50.
- [87] ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959, **82**(1), 70-77
- [88] ELLMAN, G. L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys*. 1958, **74**(2), 443-450.
- [89] LÓPEZ-CARILLO, L. a M. LÓPEZ-CERVANTES. Effect of Exposure to Organophosphate Pesticides on Serum Cholinesterase Levels. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1993, **48**(5), 359-363.
- [90] LANE, J. E., J. P. SHIVERS a H. ZISSER. Continuous glucose monitors. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity*. 2013, **20**(2), 106-111.
- [91] NICHOLS, S. P., A. KOH, W. L. STORM, J. H. SHIN a M. H. SCHOENFISCH. Biocompatible Materials for Continuous Glucose Monitoring Devices. *Chemical Reviews*. 2013, **113**(4), 2528-2549.
- [92] TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**, 3184-3196.
- [93] ŠEFČOVICOVÁ, J., J. FILIP, V. MASTIHUBA, P. GEMEINER a J. TKAC. Analysis of ethanol in fermentation samples by a robust nanocomposite-based microbial biosensor. *Biotechnol Lett*. 2012, **34**(6), 1033-1039.
- [94] MITCHELL, J. Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors*. 2010, **10**(8), 7323-7346.
- [95] POHANKA, M. Cholinesterases in Biorecognition and Biosensors Construction: A Review. *Analytical Letters*. 2013, **46**(12), 1849-1868.
- [96] POHANKA, M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers*. 2015-01-1, **69**(1), 1-13.
- [97] SKLÁDAL, P. *Biosensory*. Brno, 2002.

- [98] ANDREESCU, S. a J. L. MARTY. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*. 2006, **23**(1), 1-15.
- [99] MONTENEGRO, M. F., M. T. MORAL-NARANJO, E. MUÑOZ-DELGADO, F. J. CAMPOY a C. J. VIDAL. Hydrolysis of acetylthiocholine, o-nitroacetanilide and o-nitrotrifluoroacetanilide by fetal bovine serum acetylcholinesterase. *FEBS Journal*. 2009, **276**(7), 2074-2083.
- [100] MONTENEGRO, M. F., M. T. MORAL-NARANJO, M. PÁEZ DE LA CADENA, F. J. CAMPOY, E. MUÑOZ-DELGADO a C.J. VIDAL. The level of aryl acylamidase activity displayed by human butyrylcholinesterase depends on its molecular distribution. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, **175**(1-3), 336-339.
- [101] MONTENEGRO, M. F., T. M. MARÍA, M. P. DE LA CADENA, F. J. CAMPOY, E. MUÑOZ-DELGADO a C. J. VIDAL. Human butyrylcholinesterase components differ in aryl acylamidase activity. *Biol. Chem*. 2008, **389**(4), 425-432.
- [102] MASSON, P., M. T. FROMENT, E. GILLON, F. NACHON, S. DARVESH a L. M. SCHOPFER. Kinetic analysis of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetanilides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2007, **1774**(9), 1139-1147.
- [103] VILLATTE, F., T. T. BACHMAN, A. S. HUSSEIN a R. D. SCHMID. Acetylcholinesterase Assay for Rapid Expression Screening in Liquid and Solid Media. *Bio Techniques*. 2001, **30**(1), 81-86.
- [104] HLAVÁČEK, A. a P.r SKLÁDAL. Kvantové tečky: příprava, konjugace a využití v bioanalytické chemii a biologii. *Chemické listy*. 2011, 105, 611-615.
- [105] CHEKI, M., M. MOSLEHI a M. ASSADI. Marvelous applications of quantum dots. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2013, **17**(9), 1141-1148.
- [106] ZHENG, Z., Y. ZHOU, X. LI, S. LIU a Z. TANG. Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(6), 3081-3085.
- [107] SRINIVASAN, T. G. a P. R. VASUDEVA RAO. Free acidity measurement – A review. *Talanta*. 2014, **118**, 162-171.
- [108] BOBROWSKI, A. a J. ZAREBSKI. Review of the Catalytic Voltammetric Determination of Titanium Traces. *Acta. Chim. Slov*. 2012, **59**(2), 221-232.
- [109] HERZOG, G. a V. BENI. Stripping voltammetry at micro-interface arrays: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2013, **769**, 10-21.
- [110] ARDUINI, F., A. AMINE, D. MOSCONE a G. PALLESCHI. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides, nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchimica Acta*. 2010, **170**(3-4), 193-214.
- [111] DU, D., X. HUANG, Jie CAI a Aidong ZHANG. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007, **23**(2), 285-289.
- [112] XIN, Q. a R. M. WIGHTMAN. Transport of choline in rat brain slices. *Brain Research*. 1997, **776**(1-2), 126-132.

- [113] DZYADEVYCH, S. V., V. N. ARKHYPOVA, C. MARTELET, N. JAFFREZIC-RENAULT, J. M. CHOVELON, A. V. EL'SKAYA a A. P. SOLDATKIN. Potentiometric Biosensors Based on ISFETs and Immobilized Cholinesterases. *Electroanalysis*. 2004, **16**(22), 1873-1882.
- [114] ISHIGE, Y., S. TAKEDA a M. KAMAHORI. Direct detection of enzyme-catalyzed products by FET sensor with ferrocene-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010, **26**(4), 1366-1372.
- [115] KHALED, E., H. N. A. HASSAN, G. G. MOHAMED, F. A. RAGAB a A. E. A. SELEIM. Disposable potentiometric sensors for monitoring cholinesterase activity. *Talanta*. 2010, **83**(2), 357-363.