

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko – technologická

Využití indoxylacetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu

Bc. Kristýna Votočková

Diplomová práce

2020

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Use of indoxylacetate as a substrate for acetylcholinesterase

Bc. Kristýna Votočková

Thesis

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna Votočková**  
Osobní číslo: **C18502**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Téma práce: **Využití indoxylacetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

#### Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se cholinesteráz, jejich struktury a funkce.
2. Shrnout poznatky o Alzheimerově chorobě a možnostech její léčby.
3. Uvést přehled analytických metod stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

#### Experimentální část:

1. Testovat různé reakční podmínky za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity acetylcholinesterázy s využitím indoxylacetátu jako substrátu.
2. Stanovit kinetické parametry  $K_M$  a  $V_m$ .
3. Nově zavedenou metodou využívající indoxylacetát stanovit inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů acetylcholinesterázy a porovnat je se standardními látkami. Získané výsledky porovnat s Ellmanovou metodou.
4. Stanovit rozdělovací koeficient testovaných inhibitorů v systému n-oktanol:voda.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

.....

Bc. Kristýna Votočková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení mé experimentální práce v laboratoři, cenné rady, a především za vstřícnost a trpělivost, které mi pomohly práci napsat.

## **ANOTACE**

Teoretická část se týká cholinesteráz, jejich struktury, funkce, inhibitorů, metod stanovení a také uplatnění inhibitorů cholinesteráz při léčbě Alzheimerovy choroby. Experimentální část je věnována optimalizaci podmínek pro stanovení inhibice a následně samotnému stanovení inhibiční účinnosti, toto vše s použitím dvou různých substrátů – acetylthiocholinu a indoxylacetátu. Práce obsahuje také stanovení rozdělovacího koeficientu spolu s polární povrchovou plochou molekuly.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Cholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, Alzheimerova choroba, Ellmanova metoda, indoxylacetát

## **ANNOTATION**

The theoretical part deals with cholinesterases, their structure, function, inhibitors, methods of determination and also using of cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. The experimental part is devoted to the optimization of conditions for the determination of inhibition and subsequently to the determination of the inhibitory efficacy, all with the possibility of two different substrates – acetylthiocholine and indoxylacetate. It also includes the determination of the partition coefficient along with the polar surface area of the molecule.

## **KEYWORDS**

Cholinesterase, inhibitors of cholinesterases, Alzheimer's disease, Ellman's method, indoxylacetate

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Struktura aktivního místa ACHE .....	15
Obrázek 2	Rozklad acetylcholinu .....	16
Obrázek 3	Strukturní vzorce vybraných inhibitorů .....	19
Obrázek 4	Obecná struktura organofosfátu .....	20
Obrázek 5	Mechanismus inhibice ACHE působením OF .....	21
Obrázek 6	Závislost reakční rychlosti na koncentraci acetylthiocholinu a aktivitě enzymu ....	42
Obrázek 7	Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace acetylthiocholinu při aktivitě ACHE 0,2 U .....	43
Obrázek 8	Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace acetylthiocholinu při aktivitě ACHE 0,5 U .....	44
Obrázek 9	Závislost reakční rychlosti na koncentraci indoxylacetátu a aktivitě enzymu .....	46
Obrázek 10	Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,2 U .....	47
Obrázek 11	Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,5 U .....	48
Obrázek 12	Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,8 U .....	48
Obrázek 13	Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru SAG1 při inhibici ACHE .....	52
Obrázek 14	Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru SAG5 při inhibici ACHE .....	54
Obrázek 15	Typ inhibice - graf podle Lineweavera a Burka.....	55

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	Přehled testovaných inhibitorů .....	34
Tabulka 2	Saturace enzymu ATCH – hodnoty kinetických parametrů $K_M$ a $V_{max}$ .....	44
Tabulka 3	Saturace enzymu IA – hodnoty kinetických parametrů $K_M$ a $V_{max}$ .....	49
Tabulka 4	Hodnoty $IC_{50}$ testovaných inhibitorů stanovené Ellmanovou metodou .....	51
Tabulka 5	Hodnoty $IC_{50}$ testovaných inhibitorů stanovené s IA jako substrátem.....	53
Tabulka 6	Typ inhibice - kinetické parametry $K_M$ a $V_{max}$ .....	55
Tabulka 7	Hodnoty logP a tPSA testovaných inhibitorů.....	57



## **SEZNAM ZKRATEK**

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesteráza
ATCH	acetylthiocholin
BCHE	butyrylcholinesteráza
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
IA	indoxylacetát
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
OF	organofosfáty
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina

# OBSAH

ÚVOD.....	13
1 CHOLINESTERÁZY.....	14
1.1 Acetylcholinesteráza.....	14
1.1.1 Struktura.....	14
1.1.2 Funkce.....	16
1.2 Butyrylcholinesteráza.....	16
2 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ.....	18
2.1 Reverzibilní inhibitory.....	18
2.2 Pseudoreverzibilní inhibitory.....	19
2.3 Ireverzibilní inhibitory – organofosfáty.....	20
2.4 Detoxikace cholinesterázových inhibitorů.....	22
3 CHOLINESTERÁZY A ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	24
3.1 Změny v molekule acetylcholinesterázy při Alzheimerově chorobě.....	24
3.2 Inhibitory cholinesteráz při terapii Alzheimerovy choroby.....	25
3.2.1 Takrin a jeho deriváty.....	25
3.2.2 Donepezil.....	26
3.2.3 Rivastigmin.....	26
3.2.4 Galantamin.....	27
4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ.....	28
4.1 Spektrofotometrické metody.....	28
4.1.1 Ellmanova metoda.....	28
4.1.2 Fluorimetrie.....	28
4.2 Radiometrické metody.....	29
4.3 Metody založené na formování kyseliny.....	29
4.3.1 Warburgova manometrická technika.....	29
4.3.2 Michelova metoda.....	29

4.3.3	Acholestova metoda .....	30
4.3.4	Titrační stanovení .....	30
4.4	Biosenzory.....	30
4.4.1	Elektrochemické biosenzory .....	30
4.4.2	Optické biosenzory .....	31
4.4.3	Piezelektrické a plasmonové rezonanční biosenzory .....	31
5	CÍL PRÁCE.....	32
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
6.1	Použité chemikálie a přístroje .....	33
6.2	Stanovení aktivity acetylcholinesterázy .....	34
6.2.1	Postup stanovení aktivity ACHE.....	34
6.2.2	Postup stanovení rychlosti saturace enzymu acetylthiocholinem .....	35
6.2.3	Postup stanovení rychlosti saturace enzymu indoxylacetátem.....	36
6.3	Stanovení IC <sub>50</sub> .....	37
6.3.1	Postup stanovení IC <sub>50</sub> s acetylthicholinem jako substrátem .....	37
6.3.2	Postup stanovení IC <sub>50</sub> s indoxylacetátem jako substrátem .....	39
6.4	Stanovení typu inhibice.....	39
7	VÝSLEDKY.....	41
7.1	Stanovení rychlosti saturace enzymu acetylthiocholinem .....	41
7.1.1	Stanovení reakční rychlosti .....	41
7.1.2	Stanovení kinetických parametrů .....	43
7.2	Stanovení rychlosti saturace enzymu indoxylacetátem.....	45
7.2.1	Stanovení reakční rychlosti .....	45
7.2.2	Stanovení kinetických parametrů .....	47
7.3	Stanovení IC <sub>50</sub> Ellmanovou metodou pomocí ATCH jako substrátu.....	49
7.4	Stanovení IC <sub>50</sub> s indoxylacetátem jako substrátem .....	52
7.5	Stanovení typu inhibice.....	54

7.6	Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA.....	55
8	DISKUZE.....	58
8.1	Rychlosti saturace enzymu substrátem .....	58
8.2	Stanovení IC <sub>50</sub> .....	58
8.3	Stanovení typu inhibice.....	59
8.4	Rozdělovací koeficient a tPSA.....	59
9	ZÁVĚR.....	61
10	CITACE .....	62

## ÚVOD

Do skupiny cholinesteráz se řadí acetylcholinesteráza (ACHE) a butyrylcholinesteráza (BCHE). Butyrylcholinesteráza je plazmový enzym, který nemá žádný význam v nervovém systému. Naproti tomu ACHE hraje důležitou roli při přenosu nervového vzruchu. Rozkládá totiž acetylcholin (ACH) v synapsích a nervosvalových ploténkách, který funguje jako neurotransmitter a tím ukončuje přenos nervového signálu [1, 2].

Existuje řada přírodních i syntetických látek, které inhibují cholinesterázy v místě jejich působení a zabraňují tak rozkladu ACH. Tyto látky se proto velmi často používají pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba (AD) [3].

Alzheimerova choroba je onemocnění nervového systému, které se objevuje především po 65. roce života. Důležitým znakem je dysfunkce cholinergního systému a snížená produkce acetylcholinu. Tomu lze předejít působením inhibitorů ACHE, což vede ke zlepšení kognitivních funkcí jako je paměť, učení a orientace. Stále je řeč pouze o zmírnění symptomů a zpomalení průběhu onemocnění, úplné vyléčení zatím není možné [3].

Pro stanovení aktivity ACHE a jejích inhibitorů se používá široké spektrum metod – spektrofotometrické, fluorimetrické, založené na změně pH, biosenzory a další. Nejvíce používanou metodou na spektrofotometrické bázi je však tzv. Ellmanova metoda. Metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz mají využití nejen v medicíně, ale i farmakologii, zemědělství či armádě [4].

# 1 CHOLINESTERÁZY

Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza jsou enzymy, které si jsou vzájemně příbuzné – sdílejí až 65% homologii v sekvenci aminokyselin. V lidském těle primárně katalyzují svalovou kontrakci a přenos vzruchu v nervové soustavě, mají ale i další funkce, jako je ovlivňování proliferace a diferenciacie buněk nebo reakce na stresové situace [1, 2].

Oba tyto enzymy pocházejí z nadřazené rodiny karboxylesteráz. Vyšší obratlovci mají po jednom genu ACHE a BCHE. Nižší druhy však mohou exprimovat více genů těchto enzymů [5].

## 1.1 Acetylcholinesteráza

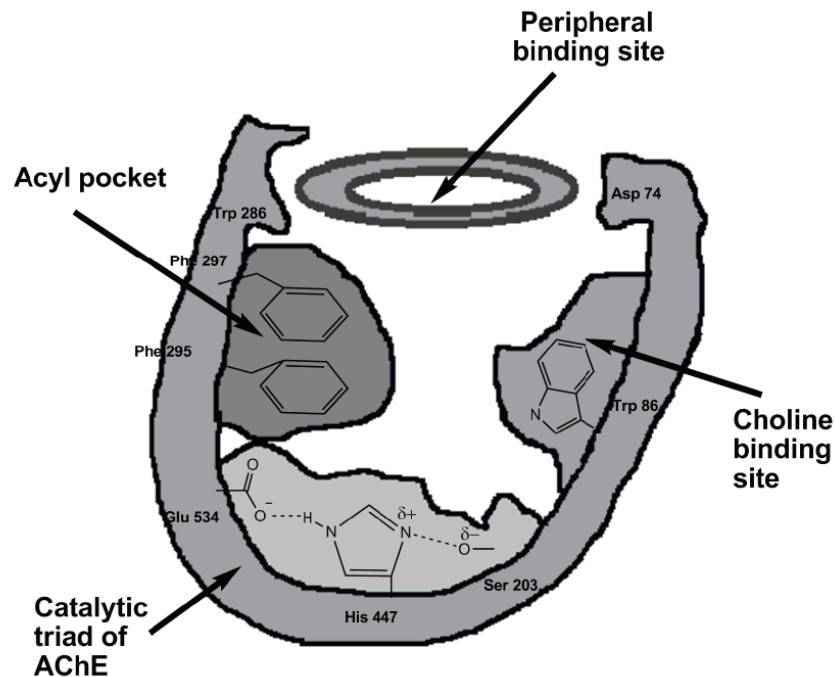
Acetylcholinesteráza je primárně lokalizovaná v cytoplazmě a na buněčných membránách. Nachází se v cholinergních nervových buňkách centrální nervové soustavy (CNS) a nervosvalových spojeních, ale i necholinergních, motorických i senzorických vláknech. Motorická vlákna se vyznačují několikanásobně vyšší aktivitou ACHE než senzorická vlákna. V malém množství je obsažena také na membránách erytrocytů [2, 6].

### 1.1.1 Struktura

Molekula ACHE má elipsoidní tvar a její molekulová hmotnost činí asi 60 000. Acetylcholinesteráza je serinová hydroláza typu alfa/beta. Skládá se ze 14 alfa-helixů, které jsou navázány na 12 beta-skládaných listů. Ty obsahují katalytickou doménu s katalytickou triádou, která je kódována různým počtem exonů [6–8].

Jádro ACHE sestává z 543 aminokyselin kódovaných exony E2, E3 a E4 (E1 je nekódující exon) genu ACHE, který je lokalizován na chromozomu 7q22 [3].

Aktivní místo ACHE leží na dně dlouhé úzké prohlubně o hloubce 20 Å. Vstup do aktivního místa skrze tuto prohlubeň zajišťuje vyšší selektivitu pro ACH. Toto aktivní místo se skládá z esteratického a anionického místa. Esteratické místo obsahuje výše zmíněnou katalytickou triádu s aminokyselinami serin203-histidin447-glutamát334 (pro savčí typ ACHE). Anionické místo se nachází blízko esteratické části a obsahuje aminokyseliny tryptofan86, tyrosin337 a fenylyalanin338. Funkcí esteratického místa je hydrolyza esterových vazeb, kdežto anionické místo interaguje s ACH (konkrétně s jeho kvartérním amoniovým atomem) a je zodpovědné za jeho správnou orientaci. Periferní anionická část je navíc zodpovědná i za nekatalytickou funkci enzymu, která mimo jiné usnadňuje tvorbu beta-amyloidových plaků [3, 7, 9]. Struktura aktivního místa je ukázána na obr. 1.



Obrázek 1 Struktura aktivního místa AChE [3]

Přestože je u savců AChE kódována jediným genem, dochází v důsledku alternativních sestřihů messengerové ribonukleové kyseliny (mRNA) a posttranslačních modifikací na karboxylovém konci ke vzniku tří různých isoform AChE [2]. Jedná se o synaptickou, erytrocytární a tzv. read through isoformu. Všechny tři isoformy se vyznačují stejnými katalytickými vlastnostmi, ale liší se oligomerním sestavením a způsobem přichycením na buňku [3, 6].

Synaptická isoforma se nachází v nervech a svalech a působí jako hlavní transkript neuronů. Je známa rozpustná i nerozpustná forma. Vzniká spojením exonu 4 s exonem 6, což poskytuje transkript E1-E2-E3-E4-E6. Překladem této mRNA dochází k prodloužení jádra o C-koncový peptid (skládající se ze 40 aminokyselinových zbytků), jenž obsahuje cystein a může díky němu dojít k dimerizaci. Jsou známy případy polymerace synaptické isoformy – např. čtyři monomery AChE agregují s proteinem podobným kolagenu a vytváří tetramer. Konce tři z nich navíc hybridizují do trojšroubovice a vytváří tak asymetrický dodekamer [3].

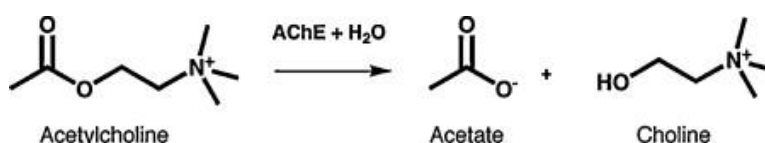
Isoforma erytrocytární je dimer glykofosfatidylinositolového typu a je exprimována primárně v erytrocytech, kde asociuje s jejich membránami. Tímto sestřihem vzniká transkript E1-E2-E3-E4-E5-E6, který kóduje peptid na C-konci o 43 aminokyselinách [3].

Třetí varianta se objevuje v embryonálních a nádorových buňkách a vyvolává psychický, chemický a fyzický stres. Vzniká začleněním normálně sestřiženého intronu 4, čímž vznikne

transkript E1-E2-E3-E4-I4-E5-E6. Překladem tohoto transkriptu dojde ke kratšímu prodloužení jádra (pouze 26 aminokyselinových zbytků) bez cysteinu, a proto se tento typ ACHE vyskytuje pouze jako monomer [3, 10, 11].

### 1.1.2 Funkce

Hlavní úlohu hraje ACHE při nervovém a nervosvalovém přenosu. Nervový přenos je zprostředkován pomocí tzv. mediátorů, přičemž jedním z nich je ACH. Ten vzniká reakcí cholinu s acetátem a je uložen v presynaptických nervových zakončeních. Acetylcholinesteráza je v cholinergní neurotransmisi důležitá především v závěru, protože zakončuje nervosvalový přenos hydrolyzou ACH na acetyl a cholin [12, 13], jak můžeme vidět na obr. 2.



Obrázek 2 Rozklad acetylcholinu [12]

Mimo to však byly objeveny vyšší hladiny ACHE v krevních buňkách, megakaryocytech a při vývinu oocytů a spermií. Také v některých místech v mozku (např. *cerebellum* či *hypothalamus*) existuje málo cholinergních synapsí, a přesto zde byla naměřena vysoká hladina ACHE. To vše vedlo k nalezení i vedlejší necholinergní funkce ACHE, což zahrnuje vylepšení růstu neuronů, adheze a proliferace buněk a zvýšení přenosu excitační aminokyseliny [3, 14].

## 1.2 Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza je známá také pod názvem pseudocholinesteráza či plazmová cholinesteráza. To proto, že vzniká v ribozomech jaterních buněk a poté je vylučována do krve. Lze ji lokalizovat v játrech, plazmě a gliových buňkách CNS a v porovnání s ACHE vykazuje nižší specifitu vůči acetylcholinu [2, 3, 6].

Aminokyselinová sekvence BCHE zahrnuje 28 aminokyselin v signálním peptidu a 574 aminokyselinových zbytků ve zralém, sekventovaném proteinu. Stejně jako u ACHE zahrnuje aktivní místo BCHE serin a její katalýza využívá katalytické triády: serin198, glutamin325 a histidin438 (platí pro savčí typ BCHE). Navíc obsahuje aktivní místo BCHE tzv. acylovou kapsu, do které zapadá acylová skupina substrátu, a aniontové místo, které je tvořeno aminokyselinou tryptofanem. Substráty jsou vedeny dolů prohlubní aktivního místa interakcí se zbytky kyseliny asparagové a tyrosinu, které se nacházejí na okrajích prohlubně. Ve srovnání s aktivním místem ACHE je aktivní místo BCHE značně širší a umožňuje tak vazbu i větších substrátů, jako je např. kokain. [15–17]. BCHE katalyzuje hydrolyzu butyrylcholinu a nemá



žádnou důležitou roli v nervovém systému. Předpokládá se, že hraje hlavní úlohu v metabolismu dietních esterů, ale nejspíše pouze ve vybraných druzích [15].

Bylo dokázáno, že u některých jedinců nezpůsobuje úplná absence BCHE žádnou patologii [15].

## 2 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ

Inhibitory cholinesteráz jsou látky, které zpomalují nebo úplně zabraňují cholinesterázám plnit jejich funkci, tedy blokují rozpad ACH, čímž dochází ke zvýšení úrovně i doby trvání působení neurotransmiteru. Inaktivace enzymu indukovaná jeho inhibitorem vede k nahromadění substrátu hyperstimulací nikotinových a muskarinových receptorů a narušení neurotransmise. Podle způsobů účinku můžeme tyto inhibitory dělit do dvou skupin: reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní inhibitory se častěji používají pro terapeutické aplikace, kdežto ireverzibilní jsou spojovány spíše s toxickými účinky [3, 18].

### 2.1 Reverzibilní inhibitory

Reverzibilní inhibitory zahrnují sloučeniny s různými funkčními skupinami (karbamáty a terciární a kvartérní amoniové skupiny) a jak již bylo zmíněno, reverzibilní inhibitory hrají důležitou roli ve farmakologickém ovlivňování cholinesteráz. Jsou používány při diagnostice i léčbě závažných chorob jako je např. myasthenia gravis, glaukom a v neposlední řadě také Alzheimerova choroba [3], které se budu více věnovat v samostatné kapitole.

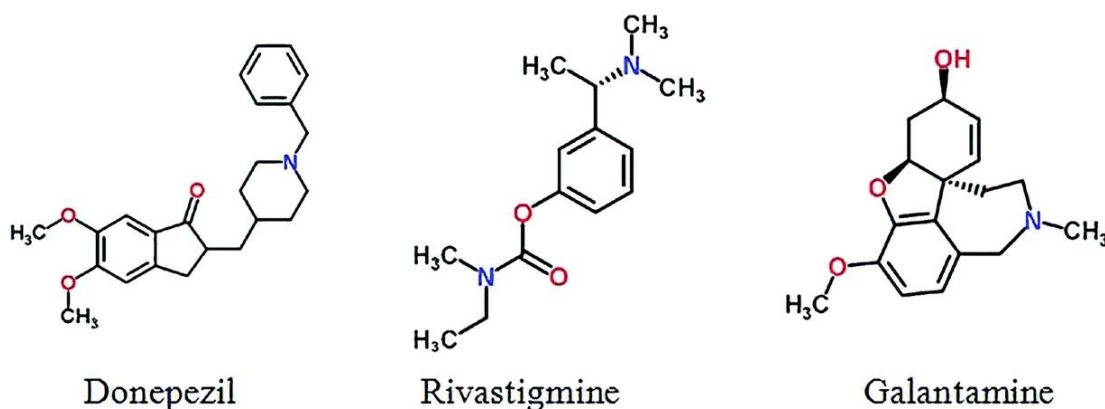
Dostí používaným inhibitorem je **donepezil** (nebo také donepezil-hydrochlorid, obr. 3), který patří mezi selektivní inhibitory s primárně nekompetitivní aktivitou. Váže se na anionické místo ACHE, má velmi vysokou afinitu k tomuto enzymu (disociační konstanta popisující interakci mezi donepezilem a ACHE se pohybuje v rozmezí 4–13 nmol/l) a výsledky testů ukazují, že je vysoce selektivní vůči ACHE ve srovnání s BCHE. Donepezil inhibuje téměř stejně ACHE získanou z paúhořů elektrických, homogenátů potkaních mozků a lidských erytrocytů, což vede k myšlence, že inhibice nezávisí na zdroji enzymu. Přesto má donepezil, stejně jako jiné inhibitory cholinesteráz, sníženou aktivitu pro ACHE, která je solubilizována ze senilních plaků. Jelikož je jeho vazba s enzymem během několika minut hydrolyzována, řadíme donepezil mezi inhibitory s krátkodobými účinky. Jeho hlavní terapeutické využití je právě pro léčbu AD [3, 18, 19].

**Galantamin** (obr. 3) je alkaloid, který se získává z rostliny s názvem *Galanthus woronowii*, a působí jako selektivní, kompetitivní a krátkodobě působící reverzibilní inhibitor. Mechanismus jeho působení je založen na interakci s anionickým místem a aromatickou prohlubní enzymu. Navíc je alosterickým ligandem nikotinových cholinergních receptorů. To znamená, že je schopen reagovat s těmi vazebnými místy nikotinových receptorů, která jsou oddělená od vazebných míst pro ACHE, a způsobuje tak zvýšení sensibilizace nikotinových receptorů pro ACHE v její přítomnosti. Kromě cholinergního přenosu ovlivňuje i jiné transmitery jako jsou

monoaminy, glutamát a kyselina gama-aminomáselná. Tyto schopnosti mají pozitivní účinky při léčbě nejen AD, ale i schizofrenie, alkoholismu, bipolární poruchy a v případě velkých depresí [3, 20, 21].

## 2.2 Pseudoreverzibilní inhibitory

Mezi pseudoreverzibilní inhibitory patří **rivastigmin** (obr. 3), který je nekompetitivní, ale narozdíl od donepezilu se váže na esteratickou část aktivního místa, a je klasifikován jako dlouhodobě působící inhibitor. Do skupiny pseudoreverzibilních inhibitorů byl zařazen díky jeho poměrně dlouhé době působení, která se pohybuje kolem deseti hodin. Biochemické studie ukázaly, že rivastigmin indukuje větší inhibici cholinesteráz v CNS než v periferní nervové soustavě. Inhibiční aktivita je však u ACHE podobná jako u BCHE. Stejně jako donepezil je v současnosti používán pro léčbu AD, ale také demence s Lewyho tělísky a Parkinsonovy choroby [3, 22].



Obrázek 3 Strukturální vzorce vybraných inhibitorů [23]

Významnými pseudoreverzibilními inhibitory ACHE jsou vedle rivastigminu také další karbamáty, tedy organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové. Kromě využití v medicíně (AD, Parkinsonova choroba, glaukom, demence s Lewyho tělísky, myasthenia gravis) mají své uplatnění jako pesticidy, ve veterinární medicíně je lze využít k léčbě parazitárních infekcí a při léčbě otrav organofosfátovými sloučeninami [24].

Karbamáty mají stejně jako ireverzibilně působící organofosfáty (OF), které zmiňuji v následující kapitole, toxické účinky pro člověka, a otrava těmito sloučeninami se projevuje i podobnými symptomy. Rozdíl mezi nimi je ve stabilitě komplexu ACHE – karbamát/OF. Organofosfáty fosforylují serinové zbytky ACHE nevratným způsobem, a proto je řadíme mezi ireverzibilní inhibitory (viz níže). Naopak karbamoylovaný serinový zbytek je méně stabilní a karbamoylová skupina může být z enzymu odtržena spontánní hydrolyzou (během cca 30–40

minut). Dalším rozdílem je, že karbamáty jsou na rozdíl od OF schopné dealkylovat a nedochází tak k tzv. stárnutí inhibovaného enzymu. Jinými slovy lze říci, že karbamáty nejsou zpožděnými induktory neuropatie, kdežto OF ano. Bylo dokonce zjištěno, že karbamáty mohou zabránit OF indukované neuropatii. Neuropatické OF totiž nejsou schopné inhibovat cílovou esterázu, která byla předtím reverzibilně inhibována karbamáty. Na druhou stranu karbamáty mohou stimulovat zpožděnou neuropatii, nebo ji alespoň zintenzivnit, pokud jsou podány po předchozí dávce neuropatických OF. Na základě tohoto jsou i karbamátové pesticidy používané v zemědělství považovány za méně nebezpečné než pesticidy vyrobené z OF [3, 25, 26].

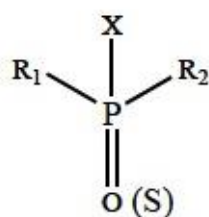
Otrava karbamáty může záviset na psychické kondici jedince. U zdravých lidí brání difúzi karbamátů do mozku hematoencefalická bariéra. Vědecké studie však prokázaly, že ve stresových stavech dochází ke zvýšenému pronikání karbamátů do CNS [27].

I přesto, že vykazují poměrně vysokou toxicitu, patří karbamáty mezi významné látky při léčbě a diagnostice závažných poruch. Například přírodní karbamátový derivát fysostigmin je široce užíván při léčbě onemocnění myasthenia gravis. Jako účinný inhibitor ACHE totiž snižuje rychlost hydrolyzy ACH a zvyšuje tak jeho hladinu v poškozených neurosynaptických štěrbinách a podporuje tak přenos nervových impulzů [28].

Dále najdou v medicíně uplatnění i rivastigmin, který jsem již zmínila výše, a pyridostigmin. Ten zabraňuje ireverzibilní vazbě OF na cílový enzym, a proto se aplikuje jako lék při intoxikaci těmito sloučeninami [29].

### 2.3 Ireverzibilní inhibitory – organofosfáty

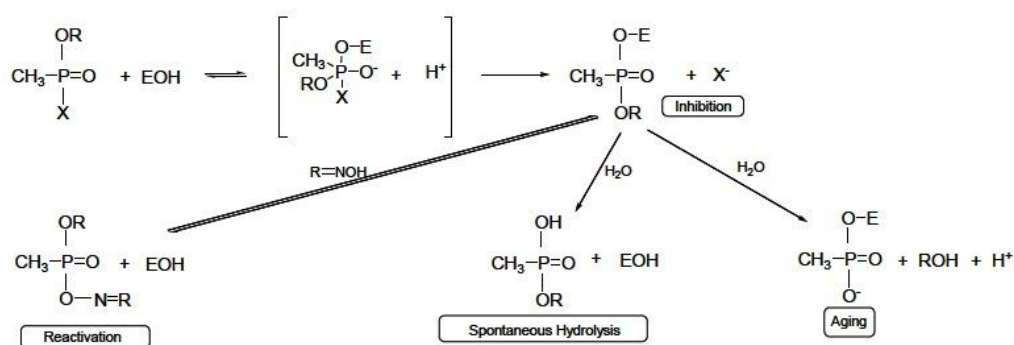
Hlavní skupinu ireverzibilních inhibitorů ACHE tvoří OF. Jedná se o estery nebo thioly odvozené od kyseliny fosforečné, fosfonové, fosfinové nebo fosfoamidové. Mezi neurotoxické OF, které inhibují ACHE, patří např. chlorpyrifos, diatinnon, malathion, ethyl- a methylparathion a trichlorfon. Konkrétně mají efektivní OF tyto strukturní rysy: terminální kyslík připojený k fosforu dvojnou vazbou (tzv. oxo forma), dvě lipofilní skupiny  $R_1$  a  $R_2$  a odstupující skupinu X, to vše vázané na fosfor [3, 30]. Obecný strukturní vzorec OF je uveden na obr. 4.



Obrázek 4 Obecná struktura organofosfátu [21]

Díky tomu mohou vstoupit jako aktivní substrát do aktivního místa, kde jsou kovalentně vázány na serinovou -OH skupinu. Dochází tak k rozdělení OF a fosforylaci enzymu. Fosforylovaný enzym pak ztrácí schopnost hydrolýzy neurotransmiteru, což vede k akumulaci ACH v synaptické šterbině, nadměrné stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů a blokaci nervového přenosu [3, 31].

Nevratná inhibice nastává ve dvou krocích. Prvním z nich je reverzibilní inhibice, která je rychlá a je dominantní především na počátku procesu. Poté následuje druhá, pomalejší a již ireverzibilní inhibice, která vede ke vzniku komplexu enzym-inhibitor (jinými slovy vzniká fosforylovaný enzym), přičemž inhibitor je zde vázán kovalentními vazbami. Následně může dojít ke třem možnostem: reaktivaci, spontánní hydrolýze či stárnutí fosforylovaného enzymu [30, 31]. Mechanismus celého procesu je znázorněn na obr. 5.



Obrázek 5 Mechanismus inhibice ACHE působením OF [3]

Schopnost OF nevratně inhibovat ACHE vede k akutním toxickým účinkům, které se projevují typickými příznaky: agitace, svalová slabost a fascikulace, mióza, hypersalivace a pocení. Těžké otravy mohou navíc vést k respiračnímu selhání, bezvědomí, zmatenosti, křečím a v konečném stádiu až ke smrti [3].

Některé OF mohou u lidí vyvolat opožděný neurotoxický efekt, který je obecně označován jako opožděná neuropatie indukovaná OF. Dochází zde opět k fosforylaci a následně stárnutí tzv. esterázy cílené na neuropatii, což vede k syndromu, jehož příznaky jako paralýza a ataxie se objevují dva až čtyři týdny po otravě [32].

I přes jejich vysokou toxicitu, lze OF v některých případech využít jako terapeutická činidla. V oftalmologii se používají při léčbě chronického glaukomu – onemocnění oka, které je spojeno se zvýšeným tlakem tekutin v oku a může vést k jeho trvalému poškození. Diisopropylfluorofosfát a echothiofát patří mezi parasymptomimetika a podávají se za účelem navození opožděné periferní neuropatie. Léčba je lokální a účinky působení mohou trvat i déle

než týden. Stejně jako ostatní ACHE inhibitory našly OF uplatnění při léčbě závažných neurologických poruch jako je Parkinsonova choroba a AD [3, 33, 34]. Této problematice se však budu věnovat v samostatné kapitole.

## 2.4 Detoxikace cholinesterázových inhibitorů

Karbamátové a OF otravy jsou závažným problémem, a proto je důležité zaměřit se na možnosti jejich detoxikace. Používání OF jako insekticidů využívá toho, že inhibují ACHE v těle hmyzu, zabraňují nervovému přenosu, což nakonec vede až ke smrti. Tento mechanismus ovšem není selektivní pouze pro hmyz, ale i pro teplokrevné živočichy včetně člověka, který může být taktéž intoxikován. Organofosfáty inhibují ACHE v serinu<sup>203</sup>, což vede k cholinergní krizi. Ta se projevuje tzv. muskarinovými (slzení, slinění, mióza), nikotinovými (nervosvalová blokáce) nebo centrálními (dechová deprese) symptomy, které jsou v případě neléčené otravy OF následovány smrtí [3, 35].

Otravu OF lze léčit farmakologickou i nefarmakologickou cestou. Nefarmakologická léčba zahrnuje resuscitaci, okysličování a dekontaminaci vstupních částí těla (např. kůže, oko, žaludek). Farmakologická léčba spočívá v podávání symptomatických a kauzálních léčiv. Mezi symptomatická řadíme parasymptolytika, z nichž nejpoužívanějším je atropin, která snižují účinky akumulovaného ACH na cholinergní receptory, dále pak antikonvulziva jako například diazepam, která snižují nervosvalové záchvaty [36].

Kauzální léčba je založena na podávání tzv. reaktivátorů, které dokážou regenerovat nativní funkci enzymu štěpením OF skupiny z aktivního místa ACHE serinu. Mechanismus této reaktivity je založen na nukleofilním působení hydroxyiminomethylu (oximu) na OF skupinu fosforylované ACHE. Dochází tak ke štěpení kovalentní vazby mezi OF a ACHE serinem, reaktivátor nahrazuje místo enzymu v komplexu a ACHE tak může být uvolněna. V případě inaktivovaného enzymu však může dojít k dealkylaci, ale tento starý komplex již nelze regenerovat pomocí oximových reaktivátorů. Je třeba proto dbát na to, aby byly reaktivátory podány co nejdříve po kontaktu s OF [3, 37, 38].

Existuje řada látek, které řadíme mezi oximové reaktivátory. Většina z nich byla vyvinuta během 50. let 20. století primárně pro snížení intoxikace nervovými látkami, později však bylo zjištěno, že některé z nich vykazují dobré účinky při reaktivaci inhibovaných cholinesteráz. Vůbec první syntetizovanou látkou z této skupiny byl pralidoxim, jehož regenerující schopnosti však nejsou dostatečné. Velmi dobře se ale ujaly biskvartérní oximy, trimedoxim a obidoxim.

Obidoxim lze navíc kombinovat s diazepamem a atropinem, což přineslo pozitivní výsledky v řadě klinických studií [39, 40].

K odstranění OF a karbamátů ze tkání lze využít toho, že jsou to nepolární sloučeniny kumulující se v tukových tkáních a lze je přeměnit na sloučeniny rozpustné ve vodě. Nejúčinnější je hydrolýza na více metabolitů rozpustných ve vodě, které tělo může vyloučit močí. Oba typy insekticidů jsou sice schopny samovolné hydrolýzy (například při zvýšeném pH), ovšem za působení enzymů hydroláz vznikají metabolity méně toxické. Karbamáty můžeme nejlépe rozložit karboxylesterázami, které hydrolyzují karboxylové estery. Serinový zbytek v aktivním místě proteinu je reverzibilně acylován a dochází k uvolnění acylovaného enzymu a alkoholové části esteru. Následně je acylovaný meziproduct nukleofilně rozložen na odpovídající karboxylovou kyselinu a karboxylový ester, který se pak účastní dalšího katalytického cyklu. Hydrolýzy OF se účastní karboxylesterázy, ale navíc fosfotriesterázy [3, 41].

U savců existuje skupina tzv. B-esteráz (mezi které se řadí i ACHE a BCHE). Tyto esterázy jsou schopny hydrolyzovat karboxylové estery a jsou inhibovány OF. Tím se liší od A-esteráz, které sice také hydrolyzují karboxylové estery, ale OF je neinhibují. B-esterázy tak mohou být zapojeny do procesu detoxikace OF a karbamátů. Mechanismus inhibice B-esteráz je podobný mechanismu indukovaném karbamáty, ale liší se v posledním kroku: fosforylovaný enzym nemůže být reaktivován vodou a nemůže uvolnit volný aktivní enzym. Mnohem účinnější je však hydrolýza OF pomocí fosfotriesteráz, které štěpí vazbu mezi atomem fosforu a odstupující skupinou (-X) OF. Vzniklé metabolity jsou méně toxické než samotné OF, nehromadí se v tukové tkáni a odcházejí močí ven z těla [3, 42].

### **3 CHOLINESTERÁZY A ALZHEIMEROVA CHOROBA**

Celosvětově nejrozšířenější formou demence je AD, která je charakterizována především ztrátou paměti a jiných kognitivních funkcí. Společným znakem u všech případů této nemoci je kromě přítomnosti beta-amyloidových plaků a neurofibrilárních spleť i nedostatek ACH [43].

Během progresu AD se zhoršuje mnoho různých typů nervových buněk. Dochází k velké ztrátě cholinergních neuronů předního mozku se současným úbytkem ACH z důvodu ovlivnění jak ACH-syntetizujícího enzymu cholinacetyltransferázy, tak ACHE [43].

#### **3.1 Změny v molekule acetylcholinesterázy při Alzheimerově chorobě**

Jak již bylo zmíněno výše, ACHE může existovat v několika různých molekulárních formách, které mají specifické vzorce exprese v jednotlivých typech buněk. Hlavní isoformou v mozku dospělých lidí bez AD je tetramer (G4), který je ukotven v buněčné membráně neuronů a představuje hlavní cholinergní druh. Další minoritní isoformy představují monomer (G1) a dimer (G2). Dříve se předpokládalo, že lehké formy ACHE slouží výlučně jako prekurzory pro stavbu oligomerů. Několik studií však dokázalo, že každá forma odráží jiné fyziologické funkce [44].

V mozku pacientů postižených AD pak dochází k selektivnímu snížení G4 formy, kdežto oba minoritní druhy jsou zachovány. V závažnějších případech se může jejich hladina dokonce zvýšit. Je zajímavé, že tento vzorec exprese se podobá spíše embryonálnímu stádiu jedince, kdy převažuje monomerní forma ACHE. Forma G4 se během zrání mozku postupně zvyšuje a její hladina je nejvyšší před 11. týdnem těhotenství. Postnatálně pak dochází ke změnám, které vedou k tomu, že převažuje monomerní forma ve všech gestačních obdobích. V případě BCHE nedochází k výrazným změnám ani během vývoje plodu, ani v patogenezi AD [43, 45].

Fyziologický význam časné exprese formy G1 není přesně znám, bylo však navrženo, že má roli při vývojové diferenciaci neuronů, regulaci růstu buněk a buněčné adhezi. Na tomto základě vznikla teorie, že v případě onemocnění AD může být ACHE podobná embryonální ACHE a odrážet aktivaci neuronální opravy v postiženém mozku [43, 44, 46].

Bez ohledu na celkové snížení aktivity ACHE u lidí s AD, je tento enzym trvale zvyšován v okolí beta-amyloidu a neurofibrilárních spleť, a to ve všech stádiích nemoci [41]. Acetylcholinesteráza zde asociuje zejména s jádry zralých amyloidů za tvorby vysoce



toxických komplexů a indukuje tak tvorbu amyloidových vláken. Důsledek neurotoxicity komplexů je přitom vyšší než u samotného beta-amyloidu, jak *in vitro*, tak *in vivo*. Beta-amyloid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu za působení enzymů sekretáz. V patogenezi AD mají roli zejména beta-sekretáza a gama-sekretáza. Aktivní proteolytická složka gama-sekretázy presenilin 1 je schopný interagovat s ACHE, čímž dochází ke zvyšování hladiny presenilinu 1 a zrychlené depozici beta-amyloidu [47].

Zvýšený výskyt ACHE v blízkosti neurofibrilárních spleť zatím není dokonale prozkoumán, víme však, že pravděpodobně souvisí s narušenou fosforylací tau-proteinu. Zásadní rozdíl oproti akumulaci ACHE v okolí beta-amyloidu je, že v přítomnosti tau-proteinu dochází ke zvýšení všech molekulárních forem ACHE, včetně tetramerní isoformy G4 [48, 49]. Znalost této korelace zvýšené hladiny ACHE v okolí beta-amyloidu a neurofibrilárních spleť nabízí možnost léčby AD v podobě podávání inhibitorů ACHE, které mají mírné a přechodné terapeutické účinky [47, 49].

### **3.2 Inhibitory cholinesteráz při terapii Alzheimerovy choroby**

Jak již bylo zmíněno výše, některé inhibitory cholinesteráz se v současné době používají k léčbě AD. Mezi oficiálně schválené patří např. takrinové deriváty, donepezil, rivastigmin a galantamin. Tato léčiva jsou účinná při potlačování symptomů AD, mají však pouze omezenou účinnost [50].

#### **3.2.1 Takrin a jeho deriváty**

Takrin byl v roce 1993 vůbec jako první schválen k léčbě AD. Protože však vykazoval závažné vedlejší účinky, především hepatotoxicitu, bylo nutné ho z trhu stáhnout. Několik výzkumných skupin se ale zabývalo změnami v jeho struktuře za účelem zlepšení jeho aktivity a eliminace toxicity, což vedlo k syntéze nových takrinových derivátů. Bylo zjištěno, že akridinová část takrinu se váže pouze na indolový kruh tryptofanu<sup>84</sup> aktivního místa enzymu ACHE. Skupině vedené panem Pangem se podařilo zavést takové změny, které umožnily vazbu i na jiná místa ACHE včetně periferního anionického místa [50, 51].

Deriváty takrinu lze rozdělit do tří skupin. První z nich zahrnuje deriváty s modifikacemi v kruhové struktuře takrinu, kdy se takrinový kruh nahradí např. pyrazolovým kruhem, který obsahuje fenylový substituent, nebo náhradou fenylového kruhu 4 pyridylovými skupinami a substitucí 4 - pyridylového kruhu v poloze C2 za jiné substituenty jako je chlor či brom. Účinnost všech nově syntetizovaných sloučenin byla však menší než u takrinu. Pro srovnání – neúčinnější sloučenina s bromovým substituentem byla desetkrát méně aktivní [52, 53].

Úspěšnější byla druhá skupina derivátů, do které se řadí tzv. deriváty duálního vazebného místa. Jedná se o dimery takrinu, které se vážou jak na aktivní, tak i na periferní místa ACHE a inhibují tak tvorbu amyloidu, čímž přispívají k léčbě AD. Tyto sloučeniny mají až 250x větší účinnost než samotný takrin [53].

Třetí skupina takrinových derivátů jsou látky, které mají navíc nějaké aditivní vlastnosti, např. antioxidační. Ty u pacientů s AD poskytují ochranu před oxidačním poškozením zprostředkovaném amyloidem-beta [53, 54].

Přestože jsou některé deriváty takrinu dostatečně účinné, stále zde zůstává problém s jejich toxicitou [51].

### **3.2.2 Donepezil**

Donepezil byl jako druhý schválen pro léčbu AD. Je potvrzeno, že jeho podávání zlepšuje kognitivní funkce u nemocných lidí a nebyly prokázány hepatotoxické účinky jako u předchozího takrinu. Oproti němu navíc donepezil vykazuje výrazně vyšší stupeň selektivity pro neuronální ACHE než pro BCHE [55].

Klinické výzkumy prokázaly příznivý farmakokinetický, farmakodynamický i bezpečnostní profil donepezilu. Významně zlepšuje kognitivní a globální funkce u lidí s mírnou a střední AD a vedl si dobře i u dlouhodobých studií, kdy jeho pozitivní účinek trval až jeden rok [56].

Obecně je dobře snášen, protože vykazuje pouze mírné a přechodné nežádoucí účinky jako je nauzea, zvracení a průjemy. Výhodou také je, že donepezil nevyvolává změny žádných laboratorních parametrů a u starších lidí nebo u pacientů se selháním jater či ledvin není třeba upravovat podávanou dávku [56].

### **3.2.3 Rivastigmin**

Rivastigmin je léčivo široce rozšířené při léčbě AD. Jak ukázaly předklinické i následné klinické studie, jeho hlavními výhodami je poměrně vysoká selektivita pro mozkovou ACHE (cca 40 % celkové inhibice) a dlouhotrvající účinek. Kromě toho přednostně inhibuje G1 formu ACHE, která převládá v mozcích u pacientů s AD, a navíc působí především v těch částech mozku, které jsou nejvíce postiženy touto chorobou, tedy v mozkové kůře a hipokampu [57].

Absorpce rivastigminu je více než 96 % podané dávky, má však rozsáhlý a saturovatelný metabolismus, což vede k biologické dostupnosti pouze 35 %. Hlavní cestou vylučování metabolitu rivastigminu jsou ledviny. Jeho koncentrace v plazmě u pacientů s AD je sice až o 50 % vyšší než u zdravých lidí, není však prokázáno, že by docházelo k akumulaci [58].

Inhibice v mozkomíšním moku je detekovatelná asi po 1,2 hodiny jak u zdravých, tak i nemocných lidí. Vrcholné aktivity se však u pacientů s AD (cca 6 hodin) dosahuje poněkud pomaleji než u zdravých jedinců (cca 2,4 hodin) a inhibiční účinky trvají o necelé čtyři hodiny déle [58, 59].

V souladu s farmakologickou kinetikou i dynamikou prokazují klinické studie, že je rivastigmin dobře tolerovanou a účinnou látkou pro léčbu AD [59].

### **3.2.4 Galantamin**

Galantamin je inhibitor ACHE s dvojitým účinkem. Kromě reverzibilní inhibice ACHE zvyšuje odpověď nikotinových receptorů na ACH, což je významné i z klinického hlediska. Aktivací presynaptických nikotinových receptorů totiž dochází ke zvýšenému uvolňování nejen ACH, ale i jiných neurotransmiterů, např. glutamátu, kterého je v mozku pacientů s AD nedostatek [60].

Jeho výhodami jsou relativně krátký poločas, vysoká biologická dostupnost a předvídatelná lineární farmakokinetika při dodržování doporučených dávek. Je metabolizován mnoha cestami, především však v játrech a má nízký potenciál pro klinicky významné lékové interakce [60, 61].

Většina dlouhodobých studií uvádí, že při podávání galantaminu lze udržet kognitivní i funkční schopnost na základní úrovni po dobu až jednoho roku [61]. S užíváním galantaminu nejsou spojeny žádné bezpečnostní obavy. Výskyt nežádoucích účinků, týkajících se především trávicího traktu, je stejně jako u donepezilu obecně nízký a lze ho minimalizovat pomocí pomalého zvyšování dávky [60].

Galantamin je díky svým vlastnostem a schopnosti snížit celkovou zátěž na pacienta další z nejperspektivnějších látek, které je možné používat při AD a demenci obecně [61].

## 4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ

Protože jsou cholinesterázy úzce spjaty s mnoha chorobami, klade se důraz na to, aby stanovení jejich aktivity i inhibice probíhalo rychlým, jednoduchým a přesným způsobem. Principy jednotlivých metod jsou rozmanité – využívají se např. spektrofotometrické, na pH závislé, histochemické, radiometrické, titrační metody a v neposlední řadě i biosenzory [4].

### 4.1 Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody vždy byly a dodnes zůstávají jedny z nejpoužívanějších metod pro stanovení cholinesteráz a jejich inhibitorů [4].

#### 4.1.1 Ellmanova metoda

Vůbec nejpoužívanější je metoda Ellmanova. Ta je založena na reakci mezi thioley a chromogenní kyselinou 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB), při níž vzniká žlutý iont kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB), jehož absorbance je měřena při 412 nm. Aktivita cholinesteráz je pak přímo úměrná měřené absorbanci [62].

Výhodou Ellmanovy metody je to, že splňuje požadované parametry jako je rychlost, jednoduchost, přesnost a také to, že ji lze provádět i mimo laboratoř. V porovnání s jinými kolorimetrickými metodami je Ellmanova metoda založena na měření vznikajícího produktu namísto zbývajícího substrátu, což jí činí citlivější. Dalšími pluses jsou stálost pH, flexibilita, krátké inkubační periody a kontinuální zvyšování intenzity barev v závislosti na inkubační době [62].

Reakční produkt však interferuje s hemoglobinem při 410 nm, což je hlavním problémem aplikace této metody při měření aktivity cholinesteráz v krvi. Řešením je použití alternativ DTNB, např. kyseliny 6,6'-dithionikotinové [62].

#### 4.1.2 Fluorimetrie

Fluorimetrické testy mají oproti klasickým UV/VIS metodám jisté výhody navíc. Kromě toho, že mají fluorescenční látky vysokou životnost, dosahují také mnohem vyšší citlivosti a mají nižší mez detekce. Jako substráty se používají resorufin butyrát či indoxylacetát. [63].

Bylo zjištěno, že kombinace cholinesterázy a cholinoxidázy podporuje degradaci benzoylcholinu za vzniku peroxidu vodíku. Ten lze následně stanovit fluorimetricky reakcí kyseliny 3-(*p*-hydroxyfenyl)propionové v přítomnosti peroxidázy. Tento způsob poskytl zlepšení selektivity a citlivosti oproti konvenčním metodám. Navíc se test podařilo provést

s dobrými výsledky i v sušených vzorcích krve na filtračním papíru, což přineslo možnost jeho praktického využití jako hromadného screeningového testu [64].

## **4.2 Radiometrické metody**

Mezi další často používané metody patří metody radiometrické. Jejich předností je vysoká citlivost, nelze je však uspokojivě použít mimo laboratoř [65].

Za zmínku stojí především metoda Winteringham-Disneyova. Ta je založena na inkubaci krve s acetylcholinem, který má acetylovou funkční skupinu značenou radionuklidem. Enzymová reakce je následně zastavena přidáním kyseliny a přebytkem inhibitoru [65].

Také byl popsán přímý test, kdy dochází ke vzniku radioaktivní kyseliny octové vytvořené cholinesterázovou aktivitou. Opět se využívá acetylcholinu jako substrátu s radioaktivním acetylem [65].

## **4.3 Metody založené na formování kyseliny**

Do této skupiny metod lze zařadit např. metody manometrické nebo založené na změně pH [65]. Níže upřesňuji pouze některé z nich.

### **4.3.1 Warburgova manometrická technika**

Manometrické metody se začaly používat pro stanovení cholinesteráz velmi brzy. V prvním kroku využívá Warburgova technika enzymatické hydrolýzy, při které vzniká kyselina octová. Ta následně reaguje s hydrogenuhličitanovým pufrem a vznikající oxid uhličitý se měří manometricky [66].

### **4.3.2 Michelova metoda**

Michelova metoda je v praxi hojně používaná pro rutinní stanovení cholinesteráz především díky jejímu jednoduchému principu: během daného časového období necháváme působit enzym cholinesterázu na ACH a zaznamenáváme pH na začátku a na konci měření. K tomu lze použít pH metr nebo stanovení provádět spektrofotometricky pomocí indikátoru. Míru enzymatické aktivity vyjadřuje rychlost změny pH [65, 67].

Protože je pH logaritmickou funkcí koncentrace kyseliny, nemá tato metoda tak vysokou citlivost a přesnost jako např. Warburgova manometrická technika. Je však vhodná pro použití v terénu a cenná je i možnost využití automatických analyzátorů [67].

### **4.3.3 Acholestova metoda**

Acholest vynalezl screeningovou metodu velmi snadno proveditelnou v terénu. Sestává ze dvou kroků, přičemž v prvním se nejdříve impregnuje kousek filtračního papíru cholinesterem a bromthymolovou modří. Po vysušení se pak přidá sérum – cholinesteráza zde přítomná hydrolyzuje substrát a vzniká kyselina, která mění barvu indikátoru od tmavě modré po žlutozelenou. Změna barvy se porovnává se vzorovým papírem bez cholinesteru. Aktivita enzymu pak odpovídá rychlosti, kterou vzorek dosáhne stejného odstínu jako kontrolní papír [68].

Jedinou komplikací této metody je to, že ze séra musí být odstraněny červené krvinky a nesmí dojít k hemolýze. Pro tento účel byla však vyvinuta speciální mikrocentrifuga, kterou lze použít i mimo laboratoř [65].

### **4.3.4 Titrační stanovení**

Kyselina uvolněná během hydrolyzy ACH může být stanovena titrací standardní alkálií při konstantním pH, přičemž lze využít indikátor nebo potenciometr [65].

Díky automatickým pH-statům je tato metoda jedním z nejpřesnějších a nejpohodlnějších způsobů stanovení cholinesteráz. Velkou výhodou je, že pH může být zaznamenáváno průběžně, nevýhodou zase nepoužitelnost v terénu [69].

## **4.4 Biosenzory**

Biosenzorem se rozumí analytické zařízení, které se skládá z převodníku a biologické rozeznávací části. Převodník měří jistou veličinu a převádí ji na veličinu výstupní, kterou lze vyjádřit číselně. Biologická rozeznávací jednotka (v případě cholinesterázových biosenzorů jde o enzym) je v kontaktu se vzorkem a zajišťuje selektivitu vůči stanovovanému analytu [70].

Cholinesterázové biosenzory, které jsou založeny na inhibici enzymu, se používají pro stanovení mnoha toxických látek, jako jsou např. pesticidy [70].

### **4.4.1 Elektrochemické biosenzory**

Principem elektrochemických biosenzorů je změna elektrických vlastností roztoku v důsledku přibývání nebo naopak ubývání iontů či elektronů. Ty vznikají, nebo se spotřebovávají v průběhu reakce enzymu se stanovovaným analytem. Dělíme je na několik typů, avšak v případě cholinesterázových biosenzorů jsou nejvýznamnější potenciometrické, amperometrické a konduktometrické [71].

Samotné cholinesterázové elektrochemické biosenzory můžeme dělit na monoenzymové, u kterých je biologická rozeznávací jednotka tvořena pouze cholinesterázou, a bienzymové, kde je na cholinesterázu vázána cholinoxidáza [72].

Potenciometrické biosenzory jsou založeny na detekci rychlosti změny pH média. Působením cholinesterázy na přidaný ACH dochází k tvorbě kyseliny octové a tím okyselení média [72].

Stanovení pomocí amperometrie může být provedeno dvěma způsoby. První z nich je založen na bienzymovém principu, kdy hydrolýzou ACH vzniká cholin, který je následně oxidován cholinoxidázou a je tak možné detekovat tvorbu kyslíku nebo peroxidu vodíku. Druhý způsob spočívá v nahrazení ACH jakožto nativního substrátu za jeho alternativu acetylthiocholin, přičemž jeho elektrochemická oxidace se zahajuje vložением napětí [71, 72].

Enzymatickou reakcí vznikají vodíkové ionty, které způsobují malou změnu vodivosti. Toho využívají biosenzory konduktometrické. Velkým plusem těchto senzorů je to, že není vyžadována referenční elektroda a převodník poskytuje možnost miniaturizace [71].

#### **4.4.2 Optické biosenzory**

V současné době využívají tyto senzory jak spektrofotometrických, kolorimetrických, tak i fluorimetrických detekcí. V porovnání s elektrochemickými biosenzory u nich lze pozorovat průběh reakce pouhým okem v případě poruchy zařízení. Na druhé straně je zde nebezpečí interference barevných sloučenin, jako je hemoglobin nebo potravinářská barviva [73].

#### **4.4.3 Piezoelektrické a plasmonové rezonanční biosenzory**

Vedle již výše zmíněných biosenzorů jsou piezoelektrické a plasmonové rezonanční biosenzory spíše vzácné [73].

Piezoelektrické biosenzory pracují s mikrovázkami a měří chemickou látku vázanou na jejich povrch. Jsou citlivější na látky s vysokou molekulární hmotností než pro nízkomolekulární látky. Některá zařízení tohoto typu jsou však dostatečně citlivá na to, aby změřila substráty nebo inhibitory s molekulovou hmotností menší než 1 kDa [74].

Plasmonové rezonanční biosenzory se často řadí mezi senzory optické. Protože ale jako jediné využívají magnetické vlny, které se šíří v kovové vrstvě a měří afinitní interakce, zmiňují je v samostatné sekci. Několik studií potvrdilo, že jsou schopné měřit jak vysoko, tak i nízkomolekulární analyty [73, 74].

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo testování různých reakčních podmínek za účelem stanovit optimální podmínky pro měření inhibiční účinnosti, a to s použitím dvou různých substrátů – indoxylacetátu a acetylthiocholinu. Nejdříve stanovuji vhodnou koncentraci substrátu a aktivitu enzymu v reakční směsi tak, aby byla dostatečná odezva – tedy lineární stoupání saturační křivky. Dále se věnuji stanovení  $IC_{50}$  u jednotlivých standardů a vzorků, nejprve s acetylthiocholinem a poté indoxylacetátem jako substrátem. Poslední část této práce je věnována stanovení rozdělovacího koeficientu a polární povrchové plochy molekuly.



## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Použité chemikálie a přístroje

**Ellmanovo činidlo (DTNB)** (Sigma-Aldrich)

$5 \cdot 10^{-4}$  M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina – slouží pro detekci vzniklého žlutého produktu při reakci DTNB s –SH skupinami

**0,1 M fosfátový pufr (PBS)**

4 g NaCl, 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g KCl do 500 ml destilované vody, jehož hodnota byla upravena na pH 7,4 (všechno Penta)

**Acetylthiocholin jodid (ATCH)** (Sigma-Aldrich)

0,1 M roztok ATCH v PBS – substrát pro stanovení aktivity ACHE

$1 \cdot 10^{-3}$  M roztok ATCH v PBS – substrát pro stanovení  $\text{IC}_{50}$  a typu inhibice

**Acetylcholinesteráza z paúhoře elektrického** (Sigma-Aldrich)

ACHE rozpuštěná v 0,1 M PBS

**Dimethylsulfoxid (DMSO)** (Penta)

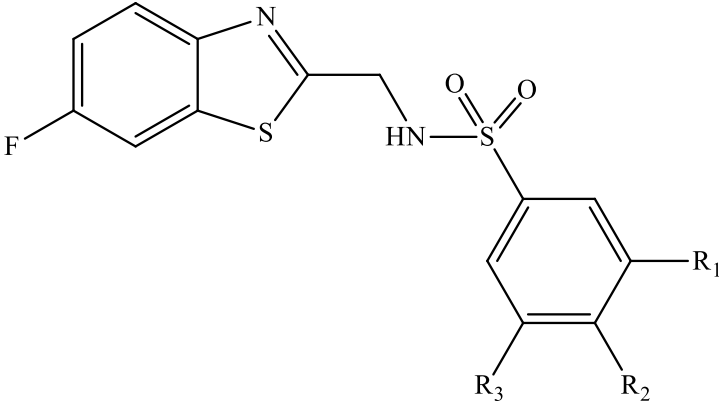
**Indoxylacetát (IA)** (Sigma-Aldrich)

$5 \cdot 10^{-3}$  M indoxylacetát rozpuštěný v 5% etanolu

**Inhibitory** (Tab. 1) rozpuštěné v DMSO na koncentraci 0,01 M

- testované látky byly poskytnuty Ústavem organické chemie a technologie (Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice)

Tabulka 1 Přehled testovaných inhibitorů

označení	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	obecná struktura
SAG1	F	CH <sub>3</sub>	H	 <p>The chemical structure shows a thiazole ring system. The 2-position of the thiazole is substituted with a benzene ring that has a fluorine atom at the para position. The 4-position of the thiazole is substituted with a methylene group (-CH<sub>2</sub>-), which is further substituted with an NH group. This NH group is part of a sulfonamide group (-NH-SO<sub>2</sub>-) attached to a benzene ring. This second benzene ring has three substituents: R<sub>1</sub> at the para position, R<sub>2</sub> at the meta position, and R<sub>3</sub> at the other meta position.</p>
SAG2	Cl	CH <sub>3</sub>	H	
SAG3	F	H	H	
SAG4	Cl	H	H	
SAG5	H	H	H	
SAG6	H	CH <sub>3</sub>	H	
SAG7	F	H	F	
SAG8	Cl	H	Cl	
SAG9	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	

### Rivastigmin (Sigma-Aldrich)

rivastigmin tartarát rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci  $1.10^{-3}$  M

### Galanthamin (Sigma-Aldrich)

galanthamin hydrobromid rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci  $2.10^{-3}$  M

### Přístroje a pomůcky

Spektrofotometr Agilent 8453

## 6.2 Stanovení aktivity acetylcholinesterázy

### 6.2.1 Postup stanovení aktivity ACHE

Stanovení aktivity ACHE bylo prováděno Ellmanovou metodou, jejíž princip je podrobněji popsán v kapitole 4.1.1.

Jako první byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank. Celková reakční směs o objemu 2 ml obsahovala:

- 1,192 ml PBS (0,1 M, pH 7,4),
- 0,8 ml DTNB ( $5.10^{-4}$  M),

- 0,008 ml ATCH (0,1 M).

Dále byly připraveny 2 ml roztoky pro proměření aktivity jednotlivých vzorků ACHE smícháním:

- 1,184 ml PBS (0,1 M, pH 7,4),
- 0,8 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- 0,008 ml ATCH (0,1 M),
- 0,008 ml ACHE.

K zahájení reakce dochází v okamžiku smíchání enzymu se substrátem, proto bylo nutné přidávat enzym jako poslední a opatrně, aby nešlo ke znehodnocení reakce předčasným smícháním.

Stanovení aktivity u každého vzorku bylo provedeno až třikrát.

Změna absorbance  $A$  (při vlnové délce 412 nm) v čase  $t$  byla měřena v intervalech po 3 s, přičemž celková doba měření trvala 70 s. Ze získaných hodnot byla následně vynesena závislost absorbance na čase do grafu a pomocí rovnice regrese byla vypočítána aktivita enzymu následujícím způsobem: pro hodnotu  $t$  bylo dosazeno číslo 60 (plyne z definice 1 U) a vypočítaná hodnota absorbance byla vynásobena přepočítávacím faktorem 17,67, který zahrnuje:

- délku kyvety 1 cm,
- celkový objem reakční směsi 2 ml,
- objem dávkovaného enzymu 0,008 ml,
- molární absorpční koeficient  $14\,150 \text{ mol.l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Jednotlivé hodnoty aktivit každého vzorku byly zprůměrovány a aktivita byla dále zohledněna při dalším měření. Tento postup stanovení aktivity byl opakován každý další den před začátkem měření.

### **6.2.2 Postup stanovení rychlosti saturace enzymu acetylthiocholinem**

Před každým měřením byla nejdříve stanovena aktuální aktivita ACHE podle postupu, který je uveden v kapitole 6.1.2. Takto změřené aktivity byly dále přepočítány, aby dávkovaný objem odpovídal zvoleným aktivitám enzymu ve výsledné reakční směsi, tedy postupně 0,09; 0,2 a 0,5 U.

Jako první byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank. Celková reakční směs o objemu 2 ml obsahovala:

- 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- 0,08 ml ATCH ( $1 \cdot 10^{-3}$  M),
- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Dále byly připraveny 2 ml roztoky pro stanovení reakčních rychlostí neinhibovaných reakcí při různých koncentracích ACHE a ATCH smícháním:

- 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- postupně dávkované objemy  $1 \cdot 10^{-3}$  M ATCH volené tak, aby koncentrace ATCH ve výsledné reakční směsi byla v rozmezí  $5 \cdot 10^{-5}$  –  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M,
- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity enzymu, aby aktivita ve výsledné reakční směsi byla 0,09 U (resp. 0,2 nebo 0,5 U),
- objem PBS (0,1 M, pH 7,4) dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

K zahájení reakce dochází v okamžiku smíchání enzymu se substrátem, proto bylo nutné přidávat enzym jako poslední a opatrně, aby nešlo ke znehodnocení reakce předčasným smícháním.

Změna absorbance A (při vlnové délce 412 nm) v čase t byla měřena v intervalech po 3 s, přičemž celková doba měření trvala 70 s. Pro každou koncentraci substrátu a enzymu bylo měření provedeno alespoň dvakrát. Ze získaných závislostí A vs. t byly vypočteny hodnoty reakčních rychlostí ( $v = \Delta A / \Delta t$ ) a byly vyneseny grafy závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu (ATCH) při dané koncentraci ACHE (tj. 0,09; 0,2; resp. 0,5 U) v reakční směsi.

### **6.2.3 Postup stanovení rychlosti saturace enzymu indoxylacetátem**

Před každým měřením byla nejdříve stanovena aktuální aktivita ACHE podle postupu, který je uveden v kapitole 6.1.2. Takto změřené aktivity byly dále přepočítány, aby dávkovaný objem odpovídal zvoleným aktivitám enzymu, tedy buď 0,2; 0,5 nebo 0,8 U v reakční směsi.

Následně byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank, který obsahoval:

- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- 0,1 ml 5% etanolu,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Poté byly připraveny roztoky o celkovém objemu 2 ml s rostoucí koncentrací indoxylactátu jako substrátu [75]:

- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- postupně dávkované objemy  $5 \cdot 10^{-3}$  M IA volené tak, aby koncentrace IA ve výsledné reakční směsi byla v rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-4} - 1,25 \cdot 10^{-3}$  M,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Reakce byla vždy odstartována přidáním enzymu k ostatním složkám směsi.

Změna absorbance A (při vlnové délce 670 nm) v čase t byla měřena v intervalech po 60 s, přičemž celková doba měření trvala 1400 s [76]. Pro každou koncentraci substrátu a enzymu bylo měření provedeno alespoň dvakrát. Ze získaných závislostí A vs. t byly vypočteny hodnoty reakčních rychlostí ( $v = \Delta A / \Delta t$ ) a byly vyneseny grafy závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu (IA) při dané koncentraci ACHE (tj. 0,2 U; 0,5 U; resp. 0,8 U) v reakční směsi.

### 6.3 Stanovení $IC_{50}$

$IC_{50}$  je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí pokles aktivity enzymu na 50 % a popisuje tedy účinnost daného inhibitoru. Často se uvádí jako záporný dekadický logaritmus molární koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu,  $pI_{50} = -\log IC_{50}$ .

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých inhibitorů byla použita závislost, která platí mezi poměrem rychlostí neinhibované ( $v_0$ ) a inhibované ( $v_i$ ) hydrolýzy ( $v_0/v_i$ ) a koncentrací inhibitoru [I]. Tato závislost je totiž pro všechny typy uni-uni enzymatických inhibovaných reakcí (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšená) přímková s úsekem rovným 1. Teoreticky tedy stačí na odhad jejího průběhu pouze jeden experimentálně stanovený poměr  $v_0/v_i$  pro danou koncentraci [I] a z rovnice regrese lze dosazením za hodnotu  $v_0/v_i = 2$  vypočítat  $IC_{50}$ , což vyplývá z její definice.

#### 6.3.1 Postup stanovení $IC_{50}$ s acetylthicholinem jako substrátem

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  daných inhibitorů byla opět použita Ellmanova metoda.

Aktivita ACHE v celkové reakční směsi 2 ml byla zvolena 0,2 U, proto bylo nutné nejprve přepočítat objem přidávaného enzymu na základě výsledků z předchozích měření aktivit podle rovnice:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Pro všechna měření byl určen objem celkové reakční směsi 2 ml, proto bylo podle množství přidávaného enzymu přepočítáváno doplňující množství PBS.

Jako první byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank. Celková reakční směs o objemu 2 ml obsahovala:

- 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- 0,08 ml ATCH ( $1 \cdot 10^{-3}$  M),
- objem PBS (0,1 M, pH 7,4) dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Dále byly připraveny roztoky bez inhibitoru pro získání  $v_0$  smícháním:

- 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- 0,08 ml ATCH ( $1 \cdot 10^{-3}$  M),
- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

K zahájení reakce dochází v okamžiku smíchání enzymu se substrátem, proto bylo nutné přidávat enzym jako poslední a opatrně, aby nešlo ke znehodnocení reakce předčasným smícháním. Závislost absorbance na čase při vlnové délce 412 nm byla měřena čtyřikrát.

Roztoky použité pro měření inhibovaných reakcí obsahovaly navíc přidávaný inhibitor v rozmezí koncentrací  $5 \cdot 10^{-6}$  –  $3,5 \cdot 10^{-5}$  M. Koncentrace se volila vždy tak, aby poměr  $v_0/v_i$  byl větší než 1. Složení celkové směsi bylo:

- 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M),
- 0,08 ml ATCH ( $1 \cdot 10^{-3}$  M),
- množství daného inhibitoru volené tak, aby bylo dosaženo výše uvedených koncentrací v reakční směsi,
- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- množství PBS dopočítané do celkového objemu 2 ml.

Enzym byl opět přidáván jako poslední a opatrně, aby nešlo ke znehodnocení reakce předčasným smícháním.

Změna absorbance  $A$  (při vlnové délce 412 nm) v čase  $t$  byla měřena v intervalech po 3 s, přičemž celková doba měření trvala 70 s. Pro každou koncentraci inhibitoru bylo měření závislosti  $A$  vs.  $t$  provedeno až třikrát. Ze získaných hodnot byla následně počítána rychlost reakce ( $v = \Delta A / \Delta t$ ). Poté byl sestaven graf závislosti  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru  $[I]$  a z rovnice regrese vypočítána hodnota  $IC_{50}$ .

### 6.3.2 Postup stanovení IC<sub>50</sub> s indoxylacetátem jako substrátem

Před každým měřením byla nejdříve stanovena aktuální aktivita ACHE podle postupu, který je uveden v kapitole 6.2.1. Takto změřené aktivity byly dále přepočítány, aby dávkovaný objem odpovídal zvolené aktivitě enzymu 0,5 U v reakční směsi podle rovnice:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Následně byl proměřen blank, který obsahoval:

- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- 0,4 ml 5% etanolu,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Dále byly připraveny roztoky bez inhibitoru pro získání  $v_0$  smícháním:

- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- 0,4 ml  $5 \cdot 10^{-3}$  M indoxylacetátu rozpuštěného v 5% etanolu,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Roztoky použité pro měření inhibovaných reakcí obsahovaly navíc přidání inhibitor v rozmezí koncentrací  $1,5 \cdot 10^{-5}$  –  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M. Složení celkové směsi bylo:

- objem ACHE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- 0,4 ml  $5 \cdot 10^{-3}$  M indoxylacetátu rozpuštěného v 5% etanolu,
- množství daného inhibitoru volené tak, aby bylo dosaženo výše uvedených koncentrací v reakční směsi,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Reakce byla vždy zahájena přidáním enzymu k ostatním složkám směsi.

Změna absorbance A (při vlnové délce 670 nm) v čase t byla měřena v intervalech 60 s, přičemž celková doba měření byla 1400 s [76]. Pro každou koncentraci inhibitoru bylo měření závislosti A vs. t provedeno až třikrát. Ze získaných hodnot byla následně počítána rychlost reakce ( $v = \Delta A / \Delta t$ ). Poté byl sestaven graf závislosti  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] a z rovnice regrese vypočítána hodnota IC<sub>50</sub>.

### 6.4 Stanovení typu inhibice

Typ inhibice byl určován u vzorku číslo 1 podle postupu uvedeném v kapitole 6.3.1. Pro stanovení byly použity čtyři různé koncentrace substrátu ATCH:  $2 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-5}$ ,  $6 \cdot 10^{-5}$

a  $8 \cdot 10^{-5}$  M, přičemž při každé koncentraci substrátu byly testovány čtyři různé koncentrace inhibitoru:  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-5}$  a  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M. Následně byl sestrojen graf podle Lineweavera a Burka, tedy závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti  $1/v$  na převrácené hodnotě koncentrace substrátu  $1/S$ . Z tohoto grafu byly poté vypočteny kinetické parametry Michaelisova konstanta ( $K_M$ ) a mezní rychlost ( $V_{max}$ ) a určen typ inhibice.



## 7 VÝSLEDKY

### 7.1 Stanovení rychlosti saturace enzymu acetylthiocholinem

#### 7.1.1 Stanovení reakční rychlosti

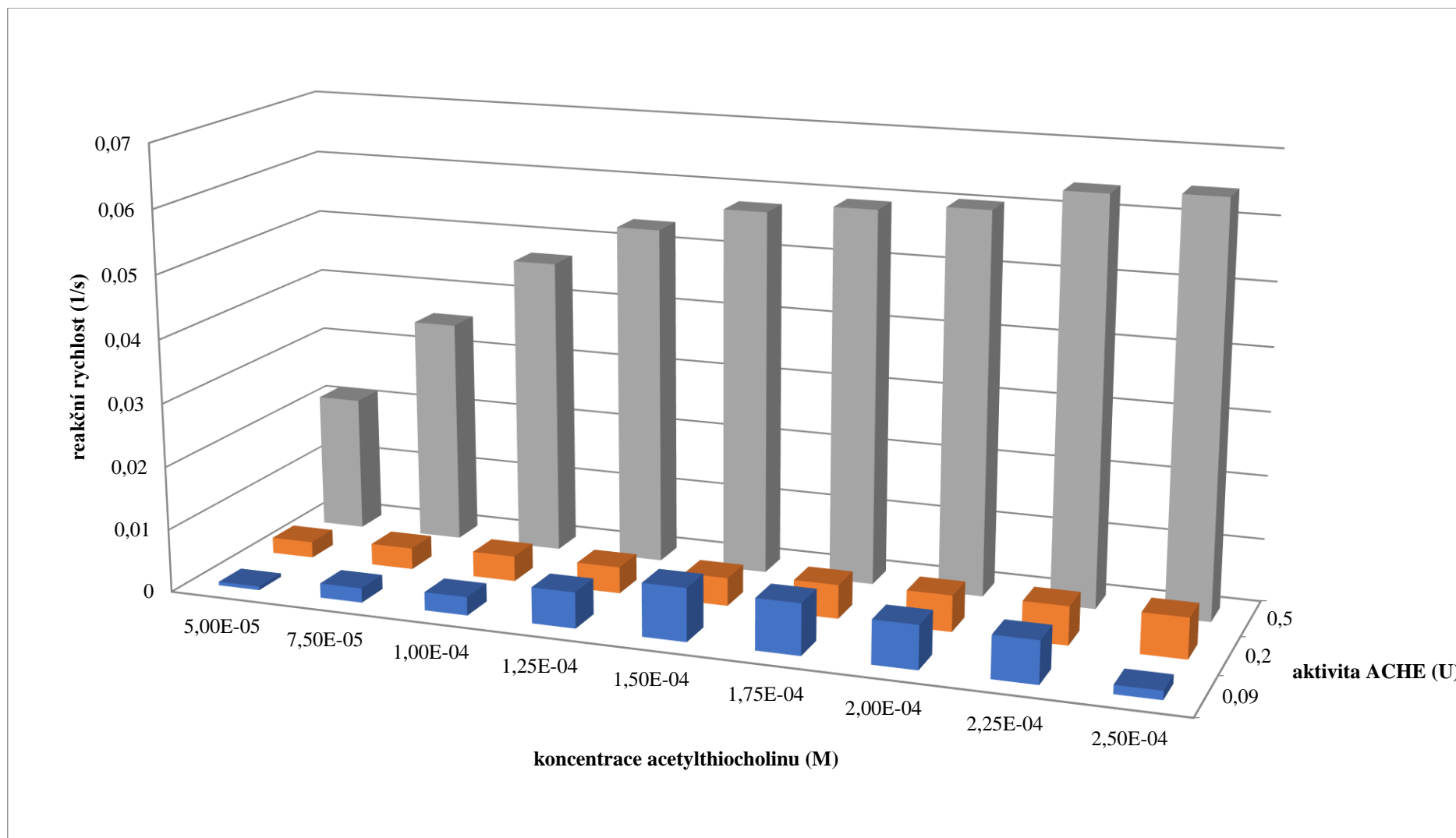
Stanovení rychlosti saturace enzymu ATCH je podrobně popsáno v kapitole 6.2.2.

Pro každou koncentraci ATCH v reakční směsi byla vždy spočítána reakční rychlost. Vzorový výpočet pro koncentraci ATCH  $1 \cdot 10^{-4}$  M a aktivitu ACHE 0,2 U je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{17} - A_{4,4})}{\Delta t}$$
$$v = \frac{(0,125 - 0,067)}{12,6}$$
$$v = 4,60 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

Hodnoty  $A_{17}$  a  $A_{4,4}$  odpovídají hodnotám absorbance v časech 17 a 4,4 s. Proměnná  $t$  pak označuje čas 12,6 s mezi oběma hodnotami absorbance. Hodnoty všech měření k dané koncentraci ATCH byly zprůměrovány a pro všechny aktivity enzymu (tj. 0,09; 0,2 a 0,5 U) byla vytvořena saturační křivka, která znázorňuje závislost reakčních rychlostí na koncentraci substrátu ATCH.

Ze saturačních křivek byl sestaven 3D graf, který je uveden na obr. 6.

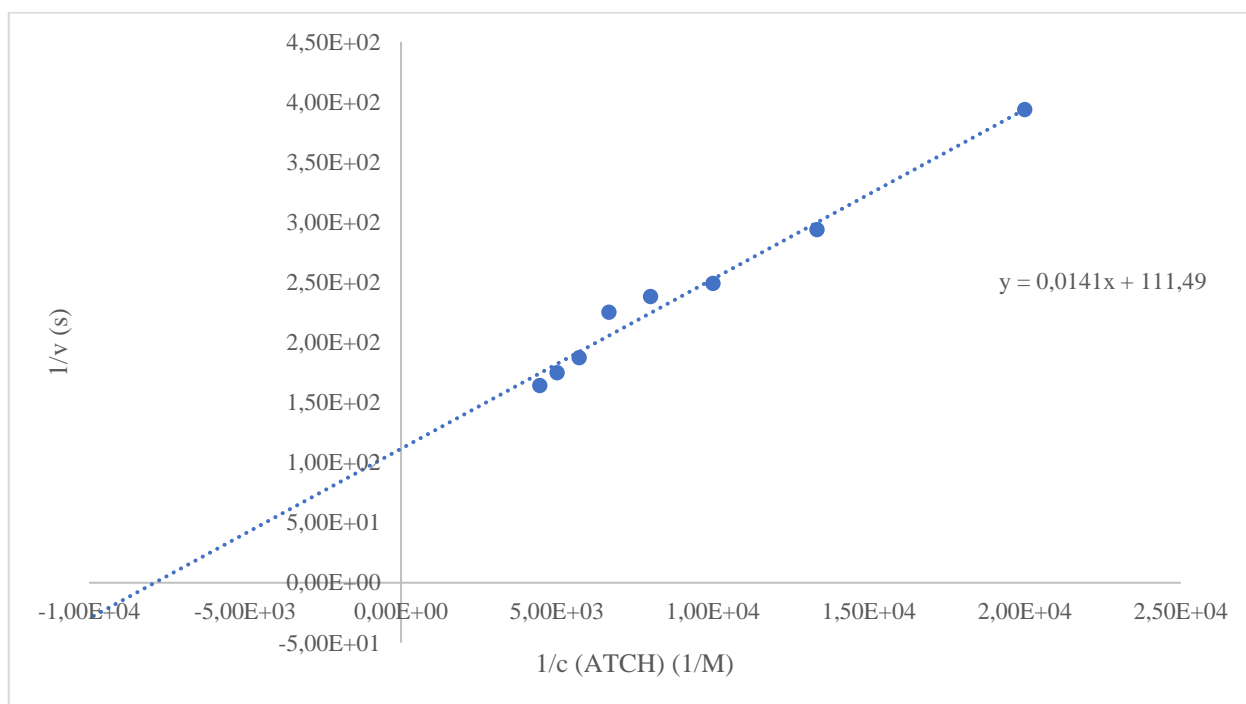


Obrázek 6 Závislost reakční rychlosti na koncentraci acetylthiocholinu a aktivitě enzymu (průměr alespoň ze 2 měření)

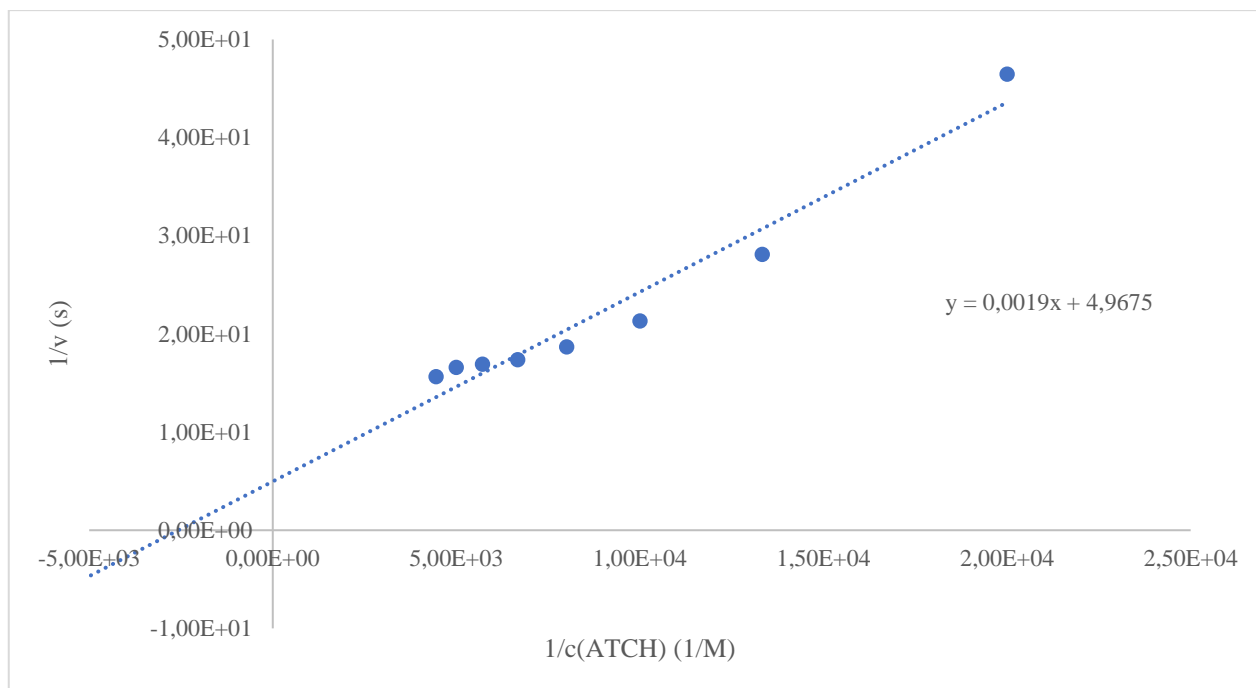
Při aktivitě ACHE 0,5 U v reakční směsi je samozřejmě dosaženo nejvyšší odezvy. Nicméně už při aktivitě ACHE 0,2 U v reakční směsi je odezva dostatečná, proto byla tato aktivita (i z ekonomických důvodů) použita i při stanovení  $IC_{50}$ . Při aktivitě ACHE 0,09 U v reakční směsi je z grafu patrná inhibice enzymu substrátem, a proto byla tato aktivita vyhodnocena jako nevhodná.

### 7.1.2 Stanovení kinetických parametrů

Ze saturačních křivek pro aktivitu 0,2 a 0,5 U byla provedena linearizace podle Lineweavera-Burka, která mimo jiné slouží k určení kinetických parametrů – mezní rychlosti ( $V_{max}$ ), tedy takové, při které dochází k přeměně substrátu na produkt maximální rychlostí, a Michealisovy konstanty ( $K_M$ ), která definuje koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny mezní rychlosti. Grafické znázornění linearizace ukazují obr. 7 a 8. Při zvolené aktivitě ACHE 0,09 U pravděpodobně dochází při vyšších koncentracích ATCH k inhibici substrátem (viz obr. 6) a linearizace podle Lineweaver-Burka provedena nebyla.



Obrázek 7 Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace acetylthiocholinu při aktivitě ACHE 0,2 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Obrázek 8 Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace acetylthiocholinu při aktivitě ACHE 0,5 U (průměr alespoň ze dvou měření)

Kinetické parametry lze spočítat z rovnice regrese:  $y = kx + q$ . Vzorový výpočet pro aktivitu ACHE 0,5 U je uveden níže:

$$\text{Rovnice regrese: } y = 0,0019x + 4,9675$$

$$V_{max} = \frac{1}{4,9675}$$

$$V_{max} = 20,13 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = k \cdot V_{max}$$

$$K_M = 0,0019 \cdot 20,13 \cdot 10^{-2}$$

$$K_M = 3,82 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Vypočtené hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé aktivity ACHE jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2 Saturace enzymu ATCh – hodnoty kinetických parametrů  $K_M$  a  $V_{max}$

Aktivita ACHE [U]	0,2	0,5
$K_M$ [mol/l]	$1,26 \cdot 10^{-4}$	$3,82 \cdot 10^{-4}$
$V_{max}$ [ $s^{-1}$ ]	$0,9 \cdot 10^{-2}$	$20,13 \cdot 10^{-2}$

Obecně platí, že oba kinetické parametry by měly stoupat s rostoucí aktivitou enzymu. Mezní rychlost by měla stoupat, protože aktivnější enzym převede více substrátu na produkt. Hodnota Michaelisovy konstanty taktéž vzroste, protože pro dosažení mezní rychlosti je nutná větší koncentrace substrátu. Tato skutečnost je splněna i u výsledků obou parametrů našeho měření.

## 7.2 Stanovení rychlosti saturace enzymu indoxylacetátem

### 7.2.1 Stanovení reakční rychlosti

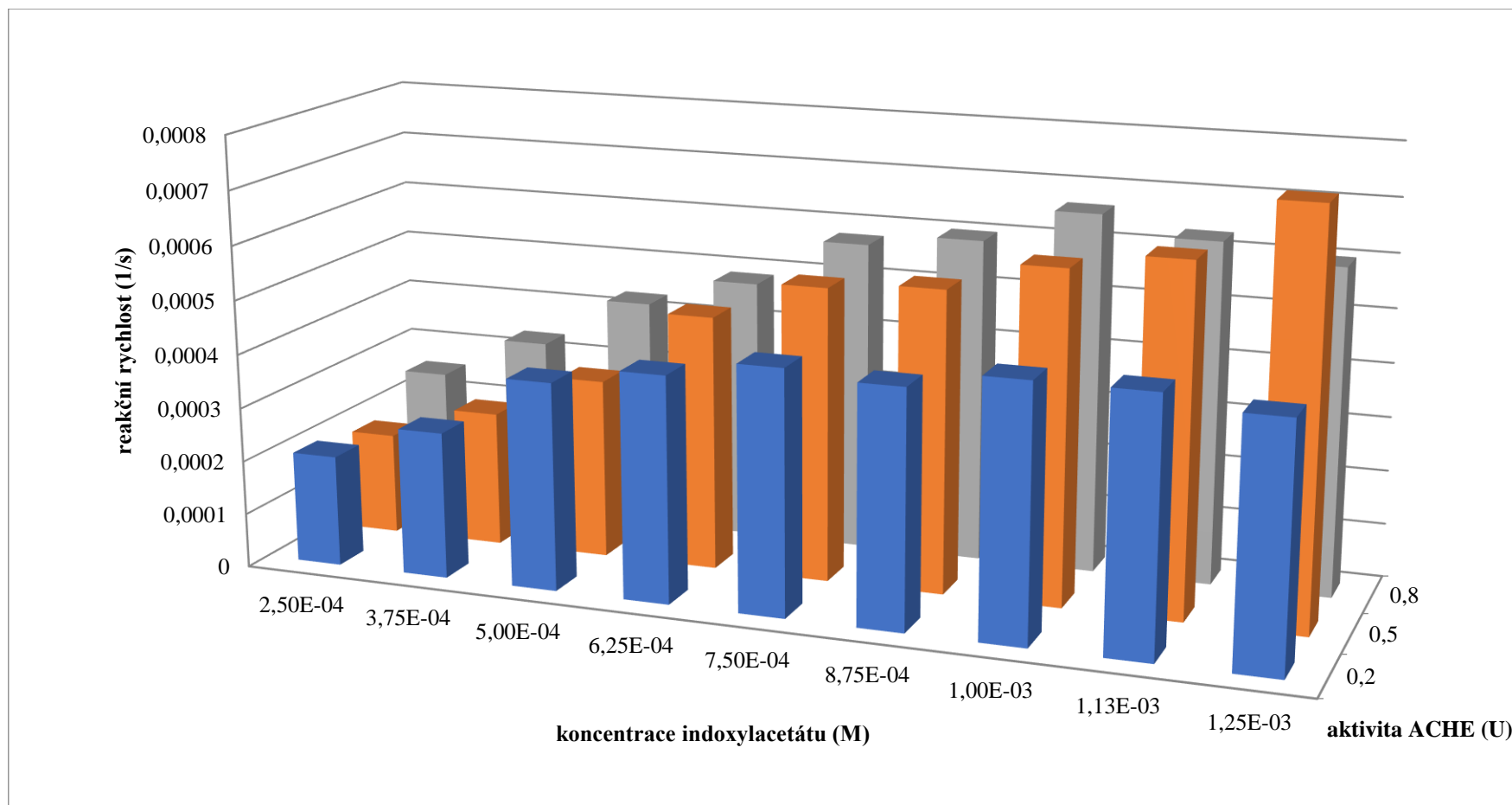
V kapitole 6.2.3 je uveden postup stanovení saturace enzymu IA, který byl prováděn za účelem zjištění vhodné aktivity enzymu a koncentrace substrátu.

Pro každou koncentraci IA v reakční směsi byla vždy spočítána reakční rychlost. Vzorový výpočet pro koncentraci IA  $1 \cdot 10^{-3}$  M a aktivitu ACHE 0,5 U je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{1392} - A_{192})}{\Delta t}$$
$$v = \frac{(0,898 - 0,088)}{1200}$$
$$v = 6,76 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Hodnoty  $A_{1392}$  a  $A_{192}$  odpovídají hodnotám absorbance v časech 1392 a 192 s. Proměnná  $t$  pak označuje čas 1200 s mezi oběma hodnotami absorbance. Hodnoty všech měření k dané koncentraci IA byly zprůměrovány a pro všechny aktivity enzymu (tj. 0,2; 0,5 a 0,8 U) byla vytvořena saturační křivka, která znázorňuje závislost reakčních rychlostí na koncentraci substrátu IA.

Ze saturačních křivek byl sestaven 3D graf, který je uveden na obrázku 9.

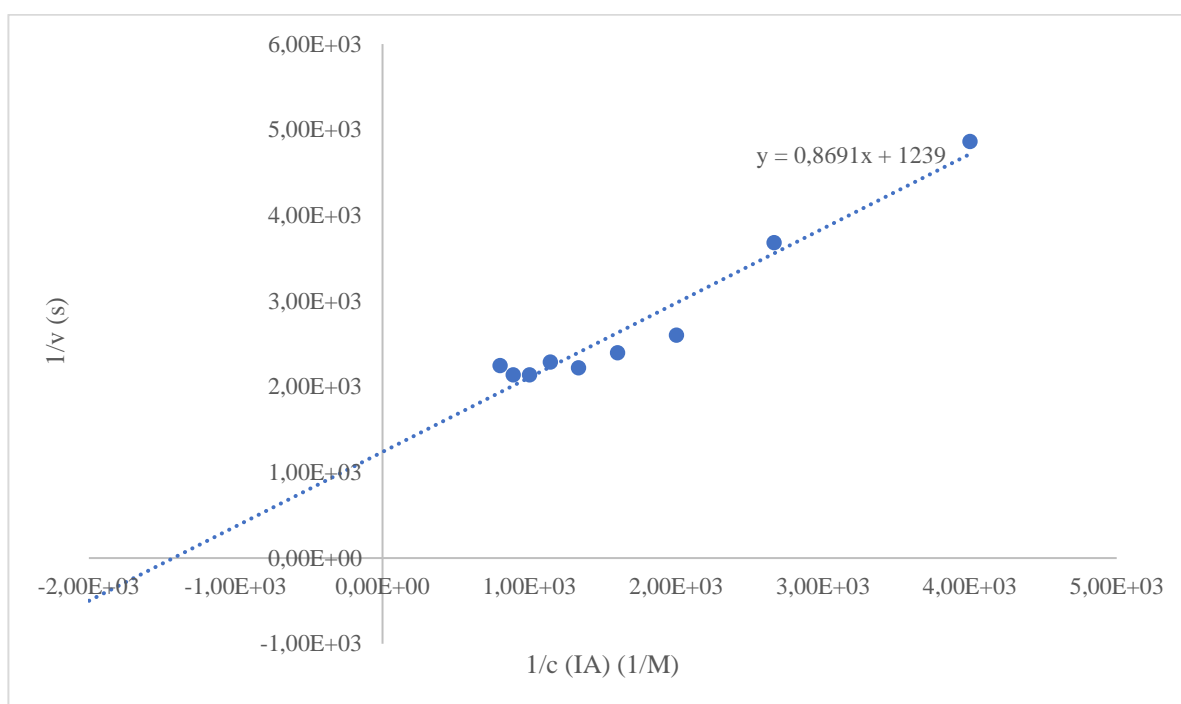


Obrázek 9 Závislost reakční rychlosti na koncentraci indoxylacetátu a aktivitě enzymu (průměr alespoň ze 2 měření)

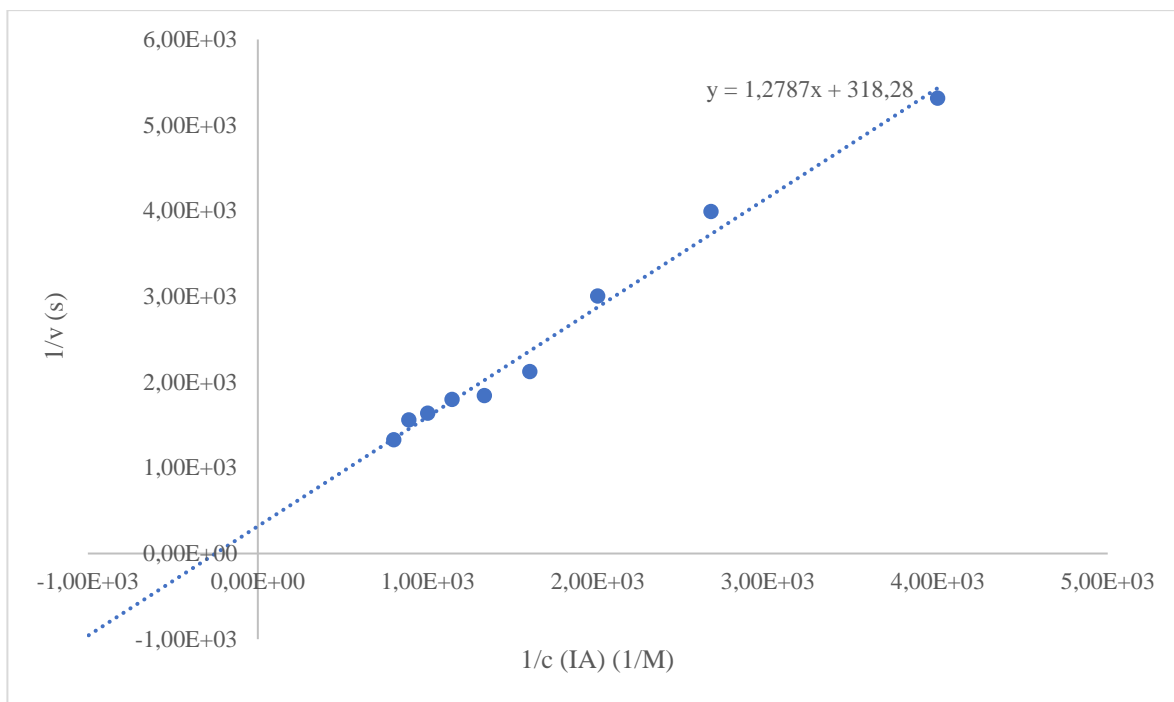
Na základě získaných výsledků byla pro stanovení  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů zvolena koncentrace substrátu  $1 \cdot 10^{-3}$  M a aktivita ACHE 0,5 U. Za těchto podmínek je odezva dostatečná.

### 7.2.2 Stanovení kinetických parametrů

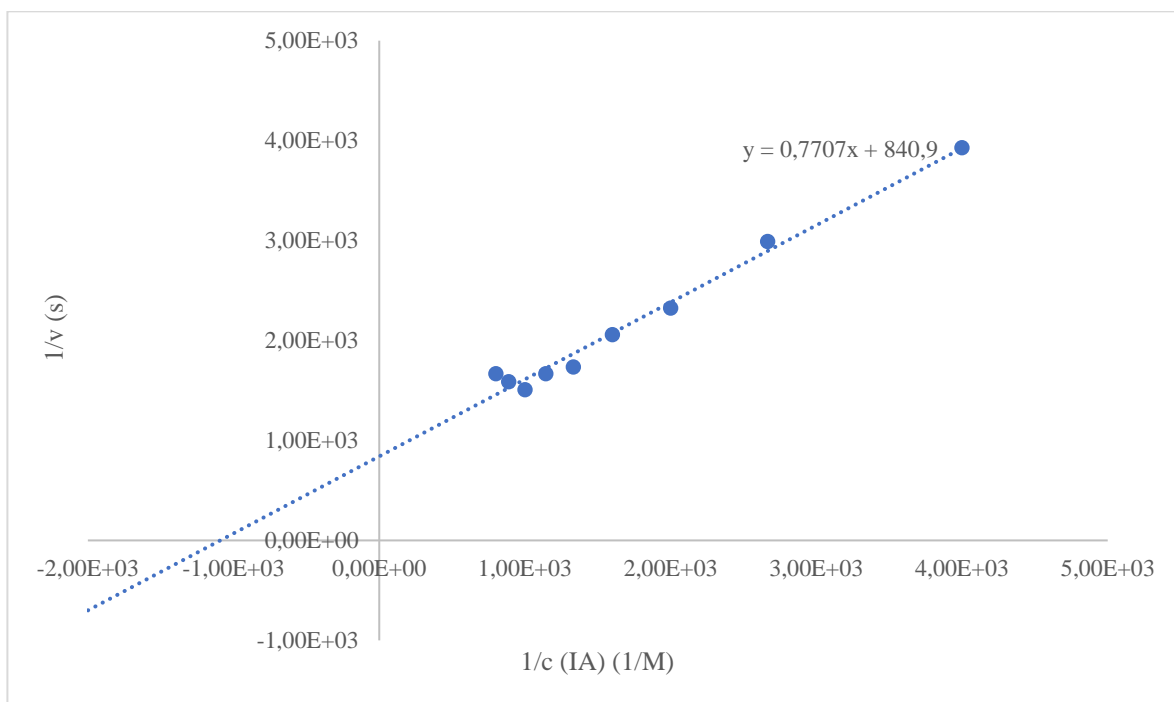
Ze všech tří saturačních křivek (tj. pro aktivitu 0,2; 0,5 a 0,8 U) byla provedena linearizace podle Lineweavera-Burka, která mimo jiné slouží k určení kinetických parametrů – mezní rychlosti ( $V_{max}$ ), tedy takové, při které dochází k přeměně substrátu na produkt maximální rychlostí, a Michealisovy konstanty ( $K_M$ ), která definuje koncentraci substrátu, při níž je dosaženo poloviny mezní rychlosti. Grafické znázornění linearizace ukazují obrázky 10–12.



Obrázek 10 Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,2 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Obrázek 11 Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,5 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Obrázek 12 Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace indoxylacetátu při aktivitě ACHE 0,8 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Kinetické parametry lze spočítat z rovnice regrese:  $y = kx + q$ . Vzorový výpočet pro aktivitu ACHE 0,2 U je uveden níže:

$$\text{Rovnice regrese: } y = 0,8691x + 1239$$

$$V_{max} = \frac{1}{q}$$

$$V_{max} = \frac{1}{1239}$$

$$V_{max} = 8,07 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = k \cdot V_{max}$$

$$K_M = 0,8691 \cdot 8,07103 \cdot 10^{-4}$$

$$K_M = 7,01 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$$

Vypočtené hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé aktivity ACHE jsou shrnuty v tabulce 3.

Tabulka 3 Saturace enzymu IA – hodnoty kinetických parametrů  $K_M$  a  $V_{max}$

Aktivita ACHE [U]	0,2	0,5	0,8
$K_M$ [mol/l]	$7,01 \cdot 10^{-4}$	$40,18 \cdot 10^{-4}$	$9,58 \cdot 10^{-4}$
$V_{max}$ [s <sup>-1</sup> ]	$8,07 \cdot 10^{-4}$	$31,42 \cdot 10^{-4}$	$12,42 \cdot 10^{-4}$

Obecně platí, že oba kinetické parametry by měly stoupat s rostoucí aktivitou enzymu. Mezní rychlost by měla stoupat, protože aktivnější enzym převede více substrátu na produkt. Hodnota Michaelisovy konstanty taktéž vzroste, protože pro dosažení mezní rychlosti je nutná větší koncentrace substrátu. Z uvedených hodnot je však patrné, že naše měření toto tvrzení nepotvrzuje a nejvyšších hodnot  $K_M$  i  $V_{max}$  je dosaženo u aktivity enzymu 0,5 U.

Z vyhodnocení 3D grafu i podle hodnot kinetických parametrů se jeví aktivita ACHE 0,5 U jako optimální pro použití indoxylacetátu jako substrátu, proto byla použita pro další měření.

### 7.3 Stanovení $IC_{50}$ Ellmanovou metodou pomocí ATCH jako substrátu

Stanovení inhibiční aktivity rivastigminu, galantaminu a inhibitorů **SAG1** – **SAG9** bylo provedeno Ellmanovou metodou. Pro každou koncentraci inhibitoru (včetně nulové

koncentrace) byla vždy spočítána reakční rychlost. Vzorový výpočet pro koncentraci inhibitoru  $5 \cdot 10^{-6}$  M je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{23} - A_8)}{\Delta t}$$
$$v = \frac{(0,327 - 0,157)}{15}$$
$$v = \mathbf{11,3 \cdot 10^{-3} s^{-1}}$$

Hodnoty  $A_8$  a  $A_{23}$  odpovídají hodnotám absorbance v časech 8 a 23 s. Proměnná  $t$  pak označuje čas 15 s mezi oběma hodnotami absorbance. Z hodnot všech rychlostí byly vytvořeny poměry  $v_0/v_i$ . Hodnoty poměrů k dané koncentraci inhibitoru byly zprůměrovány a tyto průměry byly použity k vytvoření závislosti poměru  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru. Z rovnice regrese byly vypočteny hodnoty  $IC_{50}$  dosazením za  $y = 2$ . Vzorový výpočet pro vzorek **SAG1** je uveden níže:

$$y = 19229x + 0,9931$$

$$2 = 19229x + 0,9931$$

$$x = \frac{2 - 0,9931}{19229}$$

$$x = \mathbf{5,236 \cdot 10^{-5} mol/l}$$

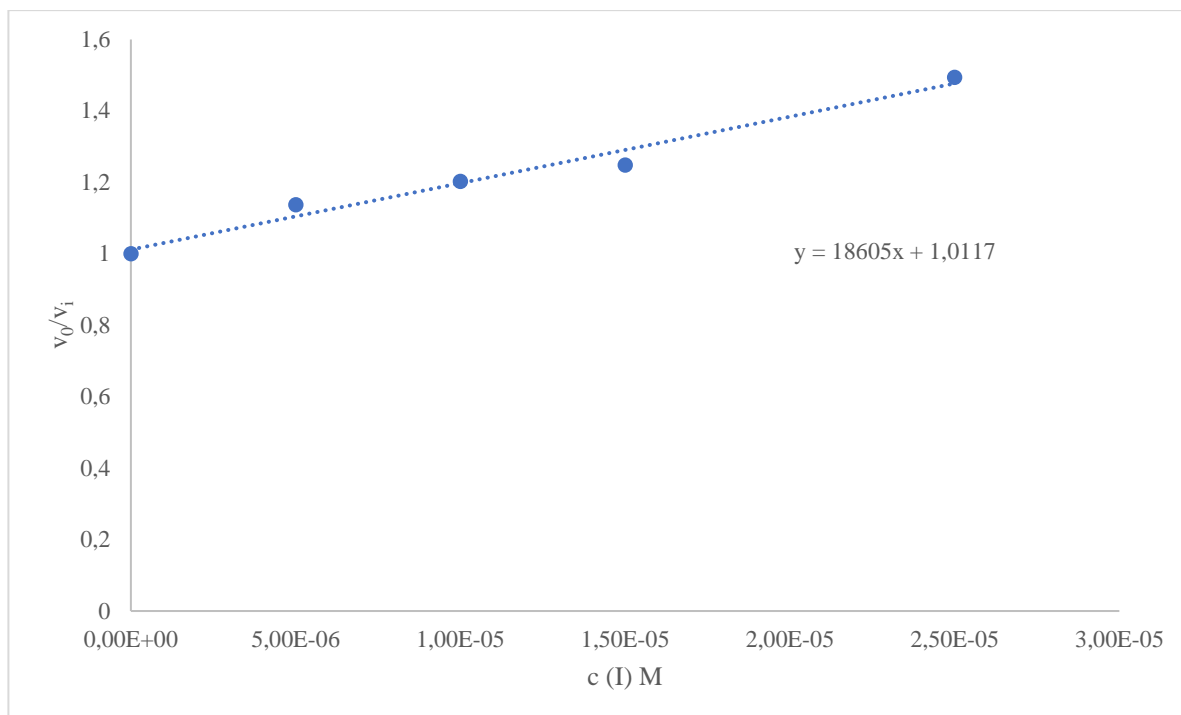
V tabulce 4 jsou shrnuty vypočtené hodnoty  $IC_{50}$  včetně hodnot směrodatné odchylky.

Tabulka 4 Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů stanovené Ellmanovou metodou

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
SAG1	53,15 $\pm$ 0,78
SAG2	70,58 $\pm$ 1,95
SAG3	68,20 $\pm$ 4,13
SAG4	93,92 $\pm$ 1,83
SAG5	78,76 $\pm$ 2,48
SAG6	106,01 $\pm$ 5,84
SAG7	67,09 $\pm$ 1,77
SAG8	96,55 $\pm$ 0,38
SAG9	70,45 $\pm$ 1,37
rivastigmin	56,10 $\pm$ 1,41
galantamin	1,11 $\pm$ 0,01

Z vypočtených hodnot je patrné, že inhibiční aktivita vzorků **SAG2 – 9** je oproti rivastigminu a galantaminu až řádově nižší. Výjimkou je vzorek **SAG1**, který je nepatrně účinnější než rivastigmin.

Grafický příklad závislosti  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru je uveden na obr. 13.



Obrázek 13 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru SAG1 při inhibici ACHE (průměr alespoň ze 2 měření)

#### 7.4 Stanovení $IC_{50}$ s indoxylacetátem jako substrátem

Stanovení inhibiční aktivity inhibitorů **SAG1 – SAG9** bylo provedeno s aktivitou ACHE 0,5 U, která byla zvolena na základě výsledků měření rychlosti saturace enzymu IA (kapitola 7.1). Pro každou koncentraci inhibitoru (včetně nulové koncentrace) byla vždy spočítána reakční rychlost. Vzorový výpočet pro koncentraci inhibitoru  $1,5 \cdot 10^{-5}$  M je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{1392} - A_{192})}{\Delta t}$$

$$v = \frac{(0,685 - 0,097)}{1200}$$

$$v = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Hodnoty  $A_{1392}$  a  $A_{192}$  odpovídají hodnotám absorbance v časech 1392 a 192 s. Proměnná  $t$  pak označuje čas 1200 s mezi oběma hodnotami absorbance. Z hodnot všech rychlostí byly vytvořeny poměry  $v_0/v_i$ . Hodnoty poměrů k dané koncentraci inhibitoru byly zprůměrovány a tyto průměry byly použity k vytvoření závislosti poměru  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru. Z rovnice regrese byly vypočteny hodnoty  $IC_{50}$  dosazením za  $y = 2$ . Vzorový výpočet pro vzorek **SAG5** je uveden níže.

$$y = 21397x + 1,1162$$

$$2 = 21397x + 1,1162$$

$$x = \frac{2 - 1,1162}{21397}$$

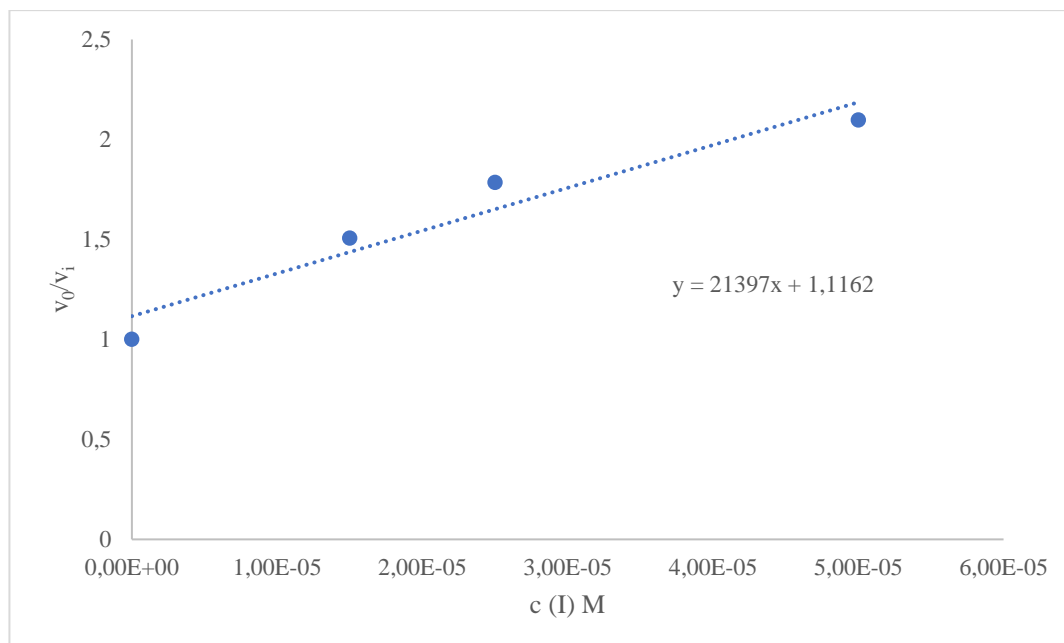
$$x = 4,13 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

Hodnoty  $IC_{50}$  jsou shrnuty v tabulce 5 včetně hodnot směrodatné odchylky.

Tabulka 5 Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů stanovené s IA jako substrátem

	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
SAG1	221,90 $\pm$ 17,25
SAG2	95,28 $\pm$ 8,53
SAG3	441,37 $\pm$ 23,40
SAG4	96,17 $\pm$ 6,01
SAG5	41,60 $\pm$ 3,52
SAG6	90,52 $\pm$ 2,75
SAG7	182,92 $\pm$ 4,47
SAG8	123,40 $\pm$ 17,07
SAG9	165,06 $\pm$ 9,71
rivastigmin	540,97 $\pm$ 45,62
galantamin	0,42 $\pm$ 0,01

Inhibitor je tím silnější, čím nižší je hodnota  $IC_{50}$ . Ze všech měřených vzorků **SAG1 – 9** se za daných reakčních podmínek jeví jako nejúčinnější vzorek **SAG5** (grafická závislost poměru  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru u tohoto vzorku je znázorněna na obr. 14). Ve srovnání se standardy jsou vzorky mnohonásobně účinnější než rivastigmin. Inhibiční účinnost galantaminu je však řádově vyšší než u všech vzorků.



Obrázek 14 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru SAG5 při inhibici ACHE (průměr alespoň ze 2 měření)

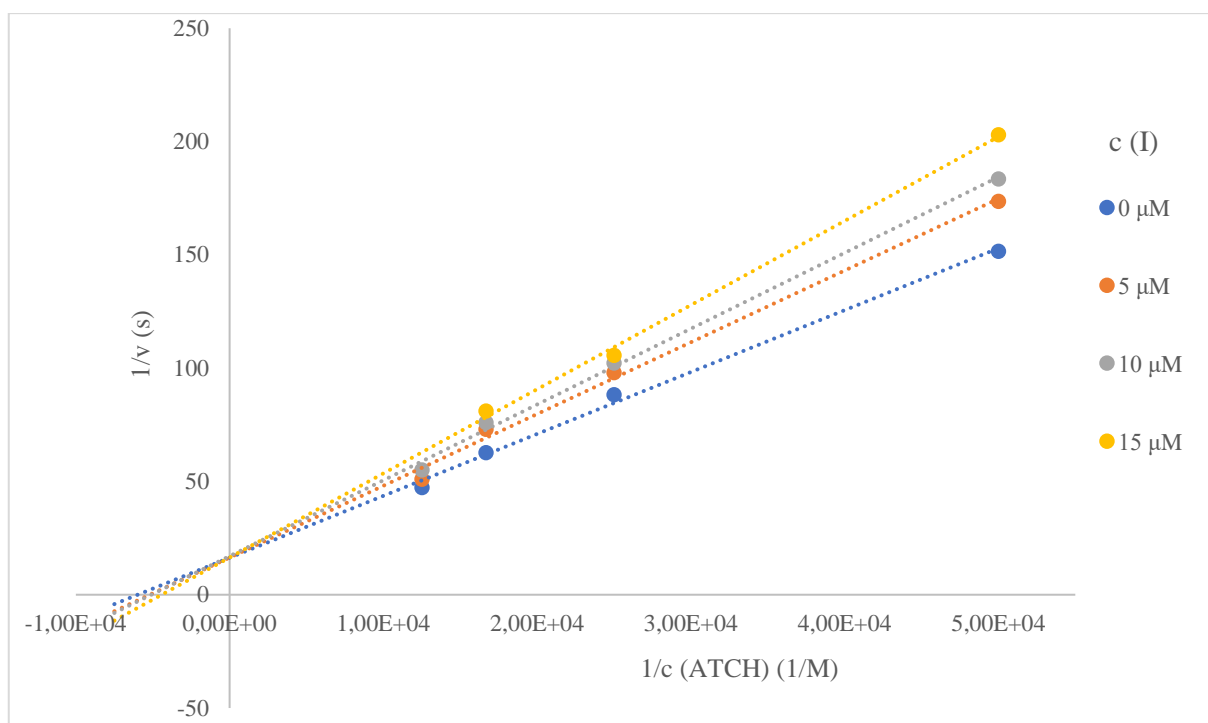
Za silné inhibitory lze považovat také vzorky **SAG2**, **SAG4** a **SAG6**. Inhibitor s nejnižší inhibiční aktivitou je pak vzorek **SAG3**, jehož hodnota  $IC_{50}$  je více než šestinásobně vyšší než u inhibitoru **SAG5**.

V porovnání se stanovením inhibiční aktivity Ellmanovou metodou s ATCH jako substrátem jsou hodnoty  $IC_{50}$  s IA u většiny vzorků vyšší.

## 7.5 Stanovení typu inhibice

Při kompetitivní inhibici, při které soutěží inhibitor a substrát o vazebné místo enzymu, se hodnota  $K_M$  zvyšuje, ale  $V_{max}$  se nemění. Naopak u nekompetitivní inhibice má inhibitor své vlastní vazebné místo a neovlivňuje tak vazbu substrátu na enzym. Hodnota  $K_M$  se tedy v tomto případě nemění,  $V_{max}$  se však snižuje. V případě akompetitivní inhibice se inhibitor váže na komplex enzym-substrát a oba kinetické parametry se tak snižují. Posledním typem je inhibice smíšená, při které se oba parametry taktéž mění,  $K_M$  se však v tomto případě zvyšuje,  $V_{max}$  naopak snižuje [79].

Na obrázku 15 je znázorněn graf podle Lineweavera a Burka, z něhož byly vypočítány kinetické parametry  $K_M$  a  $V_{max}$  (tabulka 6).



Obrázek 15 Typ inhibice - graf podle Lineweavera a Burka

Tabulka 6 Typ inhibice - kinetické parametry  $K_M$  a  $V_{max}$

<b>c(I) [M]</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
<b><math>K_M</math> [mol/l]</b>	$1,65 \cdot 10^{-4}$	$1,95 \cdot 10^{-4}$	$2,02 \cdot 10^{-4}$	$2,26 \cdot 10^{-4}$
<b><math>V_{max}</math> [<math>s^{-1}</math>]</b>	$6,13 \cdot 10^{-2}$	$6,09 \cdot 10^{-2}$	$6,00 \cdot 10^{-2}$	$6,09 \cdot 10^{-2}$

Hodnoty parametrů  $K_M$  se se zvyšující koncentrací inhibitoru zvyšují, změny hodnot  $V_{max}$  se prakticky nemění. V grafu podle Lineweavera a Burka lze vidět, že proložené přímky se setkávají na ose y, proto lze usuzovat, že se jedná o kompetitivní inhibici. Stejný typ inhibice byl potvrzen i jinými studiemi zkoumající inhibici cholinesteráz podobnými látkami [80, 81].

## 7.6 Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA

Rozdělovací koeficient je bezrozměrná veličina, která popisuje lipofilitu látky. Je definována jako poměr koncentrací chemické látky v systému dvou nemísitelných rozpouštědel (např. n-oktanol:voda) a jeho hodnota je přímo úměrná rozpustnosti dané látky v organické fázi (tzn. čím menší hodnota rozdělovacího koeficientu, tím méně je látka lipofilní) [82].

Nejčastěji je hodnota rozdělovacího koeficientu vyjádřena v logaritmickeém tvaru logP. Tato hodnota informuje o schopnosti látky prostupovat biologickými membránami a je závislá na okolních podmínkách jako je pH, teplota a iontová síla [82].

U látek, které jsou používány jako léčiva, je vedle membránové propustnosti důležitá i rozpustnost ve vodě. Neměla by být příliš nízká, protože jsou léčiva dopravována na místo účinku prostřednictvím krevního oběhu a zároveň při příliš vysoké rozpustnosti dochází ke zkracování jejich účinku [82, 83].

Lipinskému a jeho kolektivu, kteří studovali fyzikálně chemické vlastnosti léčiv, se podařilo určit fyzikálně chemické vlastnosti, díky kterým by měla látka snadno prostupovat jak buněčnou membránou, tak i hematoencefalickou bariérou. Jedná se o tzv. Lipinského pravidlo 5 a léčivo by podle něj mělo splňovat následující:

- molekulová hmotnost  $\leq 500$ ,
- $\log P \leq 5$ ,
- $\leq 5$  skupin v molekule, které jsou schopné předat atom vodíku (nejčastěji součet hydroxylových a aminových skupin v molekule),
- $\leq 10$  skupin v molekule, které přijmou vodíkové atomy za vzniku vodíkových vazeb (obvykle součet atomů dusíku a kyslíku) [83].

Hodnoty logP inhibitorů **SAG1 – 9** byly získány pomocí programu ChemDraw a jsou shrnuty v tabulce 6.

Topologická molekulární polární povrchová plocha (tPSA) je vedle rozdělovacího koeficientu dalším důležitým kritériem pro látky, které by měly být schopny procházet buněčnými membránami a hematoencefalickou bariérou. Oproti klasickému polárnímu povrchu molekuly (PSA), který udává součet povrchů všech polárních atomů v molekule (obvykle tedy atomy kyslíku a dusíku, včetně jejich navázaných atomů vodíku) a je nutné pro jeho výpočet nejdříve sestavit 3D model molekuly, je tPSA značně jednodušší. Pro její odhadnutí totiž stačí pouze 2D molekulový model [83, 84].

Zjištěním tPSA lze určit počet vodíkových můstků, které jsou důležité pro absorpci ve střevech a propustnost přes hematoencefalickou bariéru [84].

Rozměr tPSA se udává v jednotkách  $\text{Å}^2$ , kde  $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ . Pokud má látka hodnotu tPSA menší nebo rovnu  $70 \text{ Å}^2$  vykazuje i vysokou propustnost přes biologické membrány.



Zjednodušeně lze říci, že schopnost procházet membránami má molekula v tom případě, je-li součet atomů kyslíku a dusíku menší nebo roven 5 [84].

Stejně jako u rozdělovacího koeficientu byly hodnoty tPSA získány analýzou struktury molekul v programu ChemDraw. Výsledky jsou taktéž shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7 Hodnoty logP a tPSA testovaných inhibitorů

	Mr	ClogP	tPSA [ $\text{\AA}^2$ ]
SAG1	354,39	2,59	58,53
SAG2	370,85	3,16	58,53
SAG3	340,37	0,95	58,53
SAG4	356,82	1,52	58,53
SAG5	322,38	-0,64	58,53
SAG6	336,40	1,00	58,53
SAG7	358,36	2,34	58,53
SAG8	391,27	3,48	58,53
SAG9	350,43	2,65	58,53

Záporná hodnota u inhibitoru **SAG5** vypovídá o jeho vysoké hydrofilitě, což znamená, že je látka dobře rozpustná ve vodě a bude snadno distribuovatelná na místo působení. Bude mít tedy vysokou účinnost na periférii, naproti tomu její schopnost procházet do mozku bude nízká.

Jak bylo zmíněno výše, se zvyšující se hodnotou logP se zvyšuje lipofilita látky. Nejvyšší hodnoty logP mají vzorky **SAG8** a **SAG2**. Tyto dva budou velmi dobře procházet buněčnými membránami a hematoencefalickou bariérou. Naopak nejnižší hodnoty vykazují vzorky **SAG5**, **SAG3** a **SAG6** a jejich schopnost procházet membránami bude nižší.

Jak již bylo uvedeno výše, přes biologické membrány dobře procházejí ty látky, které mají hodnotu tPSA nižší nebo rovnu  $70 \text{ \AA}^2$ . Z našich inhibitorů tuto vlastnost splňují všechny vzorky.

## 8 DISKUZE

Je známo, že rychlost saturace enzymu je s použitím různých substrátů rozdílná. V experimentální části této diplomové práce byla stanovena rychlost saturace enzymu nejprve s použitím ATCH a následně IA jako substrátu. Druhá část se zabývá stanovením  $IC_{50}$  opět s použitím obou substrátů.

### 8.1 Rychlosti saturace enzymu substrátem

Stanovení rychlosti saturace enzymu substráty ATCH a IA bylo prováděno za účelem určení vhodné aktivity ACHE a koncentrace obou substrátů pro měření inhibiční aktivity vybraných inhibitorů ze skupiny substituovaných benzothiazolů.

K měření rychlosti saturace ACHE pomocí ATCH byla použita Ellmanova metoda, a to pro tři různé aktivity enzymu v reakční směsi: 0,09; 0,2 a 0,5 U v rozmezí koncentrace substrátu  $5 \cdot 10^{-5}$  až  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M.

Na základě výsledků saturačních křivek, jejichž průběh by měl mít stoupající ráz (znázorněno ve 3D grafu na obrázku 6) byla zvolena koncentrace ATCH  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M a vhodné aktivity enzymu 0,2 a 0,5 U v reakční směsi.

Stejně tak byla stanovena rychlost saturace ACHE pomocí IA, tentokrát s použitými aktivitami enzymu v reakční směsi 0,2; 0,5 a 0,8 U. Aktivity enzymu v reakční směsi bylo nutné zvolit jinak než při použití ATCH jako substrátu, protože u obou metod je rozdílná rychlost hydrolyzy substrátu. V případě Ellmanovy metody je navíc přítomna sloučenina DTNB v reakční směsi. Saturační křivka (obr. 9) měla trvale stoupající průběh pouze u aktivity ACHE v reakční směsi 0,5 U, proto byla zvolena jako optimální. Z rozmezí  $2,5 \cdot 10^{-4}$  až  $1,25 \cdot 10^{-3}$  M byla zvolena vhodná koncentrace substrátu  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

U obou použitých substrátů byly pro různé aktivity spočítány parametry  $K_M$  a  $V_{max}$ . Hodnoty  $K_M$  jsou u obou metod v rozmezí jednoho řádu, hodnoty  $V_{max}$  jsou však při použití ATCH jako substrátu o dva řády vyšší než při použití IA. Hodnoty kinetických parametrů by měly stoupat se zvyšující se aktivitou enzymu. Jak je vidět z výsledků uvedených v tabulkách 2 a 3, je toto u substrátu ATCH splněno, při použití IA ale nikoliv.

### 8.2 Stanovení $IC_{50}$

Dále byly s použitím obou výše zmiňovaných substrátů stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  vzorků **SAG1 – 9** i standardů rivastigminu a galantaminu.

Hodnoty (tab. 4) získané Ellmanovou metodou, tedy s použitím substrátu ATCH, ukazují, že pouze inhibiční aktivita vzorku **SAG1** je vyšší než u rivastigminu. U ostatních vzorků jsou hodnoty  $IC_{50}$  vyšší. Galantamin, který je považován za účinnější inhibitor, než rivastigmin má inhibiční aktivitu o celý řád vyšší než vzorky **SAG1 – 9**, v případě vzorku **SAG6** dokonce o dva.

V porovnání se stanovením inhibiční aktivity Ellmanovou metodou s ATCH jako substrátem, jsou hodnoty  $IC_{50}$  s IA (tab. 5) u většiny vzorků vyšší. Lze tedy říci, že se účinnost jednotlivých inhibitorů liší v závislosti na použitém substrátu a reakčních podmínkách, a že v případě vzorků **SAG1 – 9** je účinnost s použitím ATCH až několikanásobně vyšší než s použitím IA.

Studie zkoumající inhibiční aktivitu podobných látek jako jsou vzorky **SAG1 – 9** Ellmanovou metodou [77, 78] udávají výsledky hodnot  $IC_{50}$  shodné nebo jen o málo vyšší než výsledky z našeho měření. Tyto výsledky byly zhodnoceny jako vhodné pro použití jako léčiva AD. Proto lze soudit, že i naše inhibitory **SAG1 – 9** by se daly použít pro tento účel, přestože jsou naše hodnoty získané Ellmanovou metodou po většinou vyšší než u standardně používaných látek.

Pokud je nám známo z dostupné literatury, nebyla dosud publikována žádná studie, která by se zabývala stanovením inhibiční účinnosti rivastigminu a galantaminu s použitím IA jako substrátu. Z našich dat však vyplývá, že rivastigmin je méně účinný inhibitor než vzorky **SAG1 – 9**. Galantamin má naproti tomu o dva řády nižší hodnotu  $IC_{50}$ , než nejučinnější vzorek (**SAG5**).

Při použití IA jako substrátu se výrazně prodlužuje doba reakce a je nutná vyšší aktivita enzymu, proto IA není vhodným substrátem pro rutinní testování inhibiční účinnosti.

### 8.3 Stanovení typu inhibice

Na základě výsledků získaných z grafu dle Lineweavera a Burka, ve kterém se spojnice bodů setkávají na ose y a podle změny kinetických parametrů  $K_M$  a  $V_{max}$  lze usuzovat, že inhibitory **SAG1 – 9** fungují na principu kompetitivní inhibice.

### 8.4 Rozdělovací koeficient a tPSA

Látky používané pro léčbu AD by měli snadno prostupovat hematoencefalickou bariérou a mohly tak působit v mozku. Tato schopnost látky procházet buněčnými membránami je přímo úměrná zvyšující se hodnotě logP. Stejně tak mají látky dobrou membránovou propustnost, pokud splňují, že jejich hodnota tPSA je nižší nebo rovna  $70 \text{ \AA}^2$ .

V tabulce 7 je vidět, že hodnota tPSA je u všech vzorků stejná a nižší než 70 Å<sup>2</sup>. Hodnoty logP (tab. 6) jsou nejvyšší u vzorků **SAG2** a **SAG8**, proto mají z tohoto pohledu největší potenciál pro to být použity jako léčiva AD.

## 9 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo nejdříve určit optimální podmínky pro stanovení inhibiční účinnosti až devíti různých inhibitorů za použití dvou substrátů (ATCH a IA) a následně stanovit  $IC_{50}$  u těchto vzorků.

Za použití ATCH jako substrátu bylo dosaženo dostatečné odezvy u koncentrace substrátu  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M a aktivity enzymu 0,2 a 0,5 U v reakční směsi. V případě IA byla zvolena optimální aktivita enzymu 0,5 U v reakční směsi a vhodná koncentrace substrátu  $1 \cdot 10^{-3}$  M.

U obou substrátů byly spočítány kinetické parametry  $K_M$  a  $V_{max}$ , které by měli stoupat spolu se zvyšující se aktivitou enzymu. To je však splněno pouze u ATCH.

Podle hodnot  $IC_{50}$  stanovených Ellmanovou metodou (se substrátem ATCH) je inhibiční aktivita měřených vzorků řádově shodná s rivastigminem, který byl použit jako standart. V případě substrátu IA jsou hodnoty mnohonásobně vyšší než u ATCH. Z toho vyplývá, že účinnost inhibitoru se liší s použitím různých substrátů a že substrát ATCH je účinnější než IA.

Na základě výsledků z grafu podle Lineweavera a Burka a změn kinetických parametrů byl stanoven kompetitivní typ inhibice.

U všech vzorků byl taktéž stanoven rozdělovací koeficient a tPSA, které napovídají o tom, jak dobře bude látka procházet buněčnými membránami a hematoencefalickou bariérou. Z tohoto hlediska jsou nejvhodnější vzorky **SAG2** a **SAG8**.

## 10 CITACE

- [1] WILSON, B.W. Cholinesterase Inhibition. *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Elsevier, 2014, 942-951 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00116-0. ISBN 9780123864550. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543001160>.
- [2] ENGLISH, B. A. a WEBSTER, A.A. Acetylcholinesterase and its Inhibitors. *Primer on the Autonomic Nervous System* [online]. Elsevier, 2012, 631-633 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/B978-0-12-386525-0.00132-3. ISBN 9780123865250. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123865250001323>.
- [3] COLOVIC, M. B., KRSTIC, D.Z., LAZAREVIC-PASTI, T.D., BONDZIC, A.M. a VASIC, V.M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, 11(3), 315-335 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.2174/1570159X11311030006. ISSN 1570159X. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1570-159X&volume=11&issue=3&spage=315>.
- [4] DINGOVÁ, D. a HRABOVSKÁ A. Methods of determination of cholinesterase activity. *Ceskoslovenska fysiologie* [online]. 2015, 64 (2). 79-83 [cit. 2018-06-18]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26852525>.
- [5] POPE, C. N. a BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2018, 153, 205-216 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.044. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295218300509>.
- [6] SUSSMAN, J.L., HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I.: Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein., *Science* [online]. 1991, **253**(5022), 872-879 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1126/science.1678899. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1678899>.
- [7] POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers* [online]. 2011, 155(3), 219-223 [cit. 2018-12-08]. DOI: 10.5507/bp.2011.036. ISSN 12138118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.036.html>

- [8] DOCTOR, B. P. Structure and function of cholinesterases and related proteins. *New York: Plenum Press*, c1998. ISBN 0306460505.
- [9] NACHMANSOHN, D. a WILSON, I.B.: *The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine.*, John Wiley & Sons, Inc, 2009.
- [10] SOREQ, H. a SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2001, 2(4), 294-302 [cit. 2018-12-20]. DOI: 10.1038/35067589. ISSN 1471-003X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35067589>.
- [11] GRISARU, D., STERNFELD, M., ELDOR, A., GLICK, D. a SOREQ, H. (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1999, 264(3), 672-686 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00693.x. ISSN 0014-2956. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.1999.00693.x>.
- [12] GANONG, W. F. Přehled lékařské fyziologie. 1 vyd. Jinočany: H&H, 1995. ISBN 80-85787-36-9.
- [13] TROJAN, S. Lékařská fyziologie. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [14] COUSIN, X., STRÄHLE, U. a CHATONNET, A. Are there non-catalytic functions of acetylcholinesterases? Lessons from mutant animal models. *BioEssays* [online]. 2005, 27(2), 189-200 [cit. 2018-12-21]. DOI: 10.1002/bies.20153. ISSN 02659247. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.20153>.
- [15] LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, 148, 34-46 [cit. 2018-12-20]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814002113>.
- [16] FANG, L., PAN, Y., MUZYKA, J.L. a ZHAN, CH. Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, 115(27), 8797-8805 [cit. 2020-01-30]. DOI: 10.1021/jp112030p. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp112030p>.

- [17] DARVESH, S., HOPKINS, D., GEULA, Ch. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2003, 4(2), 131-138 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1038/nrn1035. ISSN 1471 - 003X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrn1035>.
- [18] BRYSON, H.M. a BENFIELD, P. Donepezil. *Drugs & Aging* [online]. 1997, 10(3), 234-239 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.2165/00002512-199710030-00007. ISSN 1170-229X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.2165/00002512-199710030-00007>.
- [19] SUGIMOTO, H., OGURA, H., ARAI, Y., IIMURA Y. a YAMANISHI, Y. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. *The Japanese Journal of Pharmacology* [online]. 89(1), 7-20 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1254/jjp.89.7. ISSN 00215198. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jjp/89.7?from=CrossRef>.
- [20] BARTOLUCCI, C., PEROLA, E., PILGER, C., FELS, G. a LAMBA, D. Three-dimensional structure of a complex of galanthamine (Nivalin) with acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: Implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Proteins*. 2001, 42, 182–191.
- [21] WESSLER, I. a KIRKPATRICK, C.J. Acetylcholine beyond neurons the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal. of Pharmacology*. 2008, 154, 1558–1571.
- [22] JANN, M.W. Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmacotherapy* [online]. 2000, 20(1), 1-12 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1592/phco.20.1.1.34664. ISSN 0277-0008. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1592/phco.20.1.1.34664>.
- [23] GUPTA, R.C. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. *Amsterdam: Academic Press/Elsevier*; 2006.
- [24] LIU, Z., ZHANG, A., SUN, H., HAN, Y., KONG, L. a WANG, X. Two decades of new drug discovery and development for Alzheimer's disease. *RSC Advances* [online]. 2017, 7(10), 6046-6058 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1039/C6RA26737H. ISSN 2046-2069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA26737H>.
- [25] KUHR, R.J. a DOROUGH, H.W. Mode of action. In: Kuhr RJ, Dorough HW, editors. *Carbamate Insecticides Chemistry Biochemistry and Toxicology. Cleveland: CRC Press*; 1976. 41–70.



- [26] DARVESH, S., DARVESH, K.V., MCDONALD, R.S., MATAIJA, D., WALSH, R., MOTHANA, S., LOCKRIDGE, O. a MARTIN, E. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, 51(14), 4200-4212 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1021/jm8002075. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm8002075>.
- [27] FRIEDMAN, A., KAUFER, D., SHEMER, J., HENDLER, I., SOREQ, H. a TURKASPA, I. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nature Medicine*. 1996, 2, 1382–1385.
- [28] ANDERSEN, J.B., ENGELAND, A., OWE, J.F. a GILHUS, S. N.E.. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *European Journal of Neurology*. 2010, 17, 1445–1450.
- [29] HERKERT, N.M., THIERMANN, H. a WOREK, F. In vitro kinetic interactions of pyridostigmine physostigmine and soman with erythrocyte and muscle acetylcholinesterase from different species. *Toxicology Letters*. 2011, 206, 41–46.
- [30] SHIEH, J.-Y. a WANG, C.-S.. Effect of the organophosphate structure on the physical and flame-retardant properties of an epoxy resin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2002, 40(3), 369-378 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1002/pola.10121. ISSN 0887-624X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.10121>.
- [31] CADET, J.L. a BOLLA, K.I. Environmental toxins and disorders of the nervous system. *Neurology and Clinical Neuroscience* [online]. Elsevier, 2007, 1477-1488 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/B978-0-323-03354-1.50115-2. ISBN 978-0-323-03354-1. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323033541501152>.
- [32] BARDIN, P.G. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Archives of Internal Medicine* [online]. 1994, 154(13) [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1001/archinte.1994.00420130020005. ISSN 0003-9926. Dostupné z: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.1994.00420130020005>.
- [33] KATZ, F.S., PECIC, S. a SCHNEIDER, L., ZHU, Z., HASTINGS, A., LUZAC, M., MACDONALD, J., LANDRY D.W. a STOJANOVIC, M.N. New therapeutic approaches and novel alternatives for organophosphate toxicity. *Toxicology Letters* [online]. 2018, 291, 1-10 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2018.03.028. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427418301152>.

- [34] EDDLESTON, M. a CHOWDHURY, F.R. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2016, 81(3), 462-470 [cit. 2019-03-19]. DOI: 10.1111/bcp.12784. ISSN 03065251. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.12784>.
- [35] SAXENA, A., MAXWELL, D.M., QUINN, D.M. RADIĆ, Z., TAYLOR, P. a DOCTOR, B.P. Mutant acetylcholinesterases as potential detoxification agents for organophosphate poisoning. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1997, 54(2), 269-274 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/S0006-2952(97)00180-9. ISSN 00062952. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295297001809>.
- [36] BALALI-MOOD, M. a SHARIAT, M. Treatment of organophosphate poisoning. Experience of nerve agents and acute pesticide poisoning on the effects of oximes. *Journal of Physiology-Paris* [online]. 1998, 92(5-6), 375-378 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/S0928-4257(99)80008-4. ISSN 09284257. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928425799800084>.
- [37] BAJGAR, J., FUSEK, J., KUČA, K., BARTOSOVA, L. a JUN, D. Treatment of Organophosphate Intoxication Using Cholinesterase Reactivators: Facts and Fiction. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2007, 7(5), 461-466 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.2174/138955707780619581. ISSN 13895575. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=7&issue=5&spage=461>.
- [38] JOKANOVIC, M. a PROSTRAN, M. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009, 16(17), 2177-2188 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.2174/092986709788612729. ISSN 09298673. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=17&spage=2177>.
- [39] VALE, A. a LOTTI, M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. *Occupational Neurology* [online]. Elsevier, 2015, 149-168 [cit. 2019-04-06]. Handbook of Clinical Neurology. DOI: 10.1016/B978-0-444-62627-1.00010-X. ISBN 9780444626271. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044462627100010X>.

- [40] MILATOVIĆ, D. a JOKANOVIĆ, M. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators in the Treatment of OP Poisoning. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* [online]. Elsevier, 2009, 985-996 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/B978-012374484-5.00065-1. ISBN 9780123744845. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123744845000651>.
- [41] HEGARTY, A.F. a FROST, N. L.. Elimination–addition mechanism for the hydrolysis of carbamates. Trapping of an isocyanate intermediate by an o-amino-group. *Journal of Chemical Society, Perkin Trans. 2* [online]. 1973, (12), 1719-1728 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1039/P29730001719. ISSN 0300-9580. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=P29730001719>.
- [42] ESPINOZA, M., RIVERO OSIMANI, V., SÁNCHEZ, V., ROSENBAUM, E. a GUIÑAZÚ, N. B-esterase determination and organophosphate insecticide inhibitory effects in JEG-3 trophoblasts. *Toxicology in Vitro* [online]. 2016, 32, 190-197 [cit. 2019-04-06]. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.01.001. ISSN 08872333. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233316300017>.
- [43] GARCÍA-AYLLÓN, M.-S. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross - talk with P-tau and  $\beta$ -amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2011, 4 [cit. 2019-09-21]. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00022. ISSN 16625099. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2011.00022/abstract>.
- [44] GIACOBINI, E. *Neurochemical Research* [online]. 28(3/4), 515-522 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.1023/A:1022869222652. ISSN 03643190. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022869222652>.
- [45] GEULA, Ch. a MESULAM, M. -Marsel. Cholinesterases and the Pathology of Alzheimer Disease. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* [online]. 1995, 9, 23-28 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.1097/00002093-199501002-00005. ISSN 0893-0341. Dostupné z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00002093-199501002-00005>.
- [46] TALESÁ, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 2001, 122(16), 1961-1969 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00309-8. ISSN 00476374. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0047637401003098>.

- [47] MORÁN, M.A., MUFSON, E.J. a GÓMEZ-RAMOS, P. Colocalization of cholinesterases with? Amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathologica* [online]. 1993, 85(4), 362-369 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.1007/BF00334445. ISSN 0001-6322. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00334445>.
- [48] INESTROSA, N.C., DINAMARCA, M.C. a ALVAREZ, A. Amyloid-cholinesterase interactions. *FEBS Journal* [online]. 2008, 275(4), 625-632 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x>.
- [49] GARCÍA-AYLLÓN, M.-S. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross - talk with P-tau and  $\beta$ -amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2011, 4 [cit. 2019-09-24]. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00022. ISSN 16625099. Dostupné z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2011.00022/abstract>.
- [50] ANAND, P. a SINGH, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2013, 36(4), 375-399 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1007/s12272-013-0036-3. ISSN 0253-6269. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0036-3>.
- [51] PANG, Y.P., QUIRAM, P, JELACIE, T., HONG, F., a BRIMIJOIN, S.. 1996. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry* 271: 23646–23649.
- [52] EAGGER, S.A., LEVY, R. a SAHAKIAN, B.J. Tacrine in Alzheimer's disease. *The Lancet* [online]. 1991, 337(8748), 989-992 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1016/0140-6736(91)92656-M. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014067369192656M>.
- [53] WATKINS, P.B. Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* [online]. 1994, 271(13) [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1001/jama.1994.03510370044030. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1994.03510370044030>.

- [54] TUMIATTI, V., MINARINI, A., BOLOGNESI, M.L., MILELLI, A., ROSINI, M. a MELCHIORRE, C. Tacrine Derivatives and Alzheimers Disease. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2010, 17(17), 1825-1838 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.2174/092986710791111206. ISSN 09298673. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=17&issue=17&spage=1825>.
- [55] SHINTANI, E.Y. a UCHIDA, K.M. Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. 1997, 54(24), 2805-2810 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1093/ajhp/54.24.2805. ISSN 1079-2082. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajhp/article/54/24/2805/5158531>.
- [56] SHIGETA, M. a HOMMA, A. Donepezil for Alzheimer's Disease: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic, and Clinical Profiles. *CNS Drug Reviews* [online]. 2001, 7(4), 353-368 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00204.x. ISSN 1080563X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1527-3458.2001.tb00204.x>.
- [57] POLINSKY, R.J. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics* [online]. 1998, 20(4), 634-647 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1016/S0149-2918(98)80127-6. ISSN 01492918. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291898801276>.
- [58] *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1996 [cit. 2019-10-21].
- [59] FELDMAN, H.H., FERRIS, S. a WINBLAD, B., SFIKAS, N., MANCIONE, L., HE, Y., TEKIN, S., BURNS, A., CUMMINGS, J., DEL SER, T., INZITARI, D., ORGOGOZO, J.M., SAUER, H., SCHELTENS, P., SCARPINI, E., HERRMANN, N., FARLOW, M., POTKIN, S., CHERLES, H.C., FOX, N.C. a LANE, R. Effect of rivastigmine on delay to diagnosis of Alzheimer's disease from mild cognitive impairment: the InDDEx study. *The Lancet Neurology* [online]. 2007, 6(6), 501-512 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70109-6. ISSN 14744422. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442207701096>.
- [60] WILCOCK, G. K., LILIENFELD, S. a GAENS, E. Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *British Medical Journal* [online]. 2000, 321(7274), 1445-1445 [cit. 2019-10-21]. DOI:

10.1136/bmj.321.7274.1445. ISSN 0959-8138. Dostupné z:  
<http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.321.7274.1445>.

[61] LILIENFELD, S. Galantamine - a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Reviews* [online]. 2002, 8(2), 159-176 [cit. 2019-10-21]. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x. ISSN 1080563X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1527-3458.2002.tb00221.x>.

[62] ŠINKO, G., ČALÍČ, M., BOSAK, A. a KOVARIK, Z. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry* [online]. 2007, 370(2), 223-227 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.1016/j.ab.2007.07.023. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326970700471X>.

[63] SADAR, M. H., KUAN, S.S., GUILBAULT, G.G. Trace analysis of pesticides using cholinesterase from human serum, rat liver, electric el, bean leaf beetle, and white fringe beetle. *Analytical Chemistry*. 1970, 42(14), 1770-1774.

[64] KUSU, F., TSUNETA, T. a TAKAMURA, K. Fluorometric determination of serum cholinesterase activity. *Bunseki kagaku* [online]. 1990, 39(2), 115-121 [cit. 2020-01-19]. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.39.2\_115. ISSN 0525-1931. Dostupné z: [http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bunsekikagaku1952/39.2\\_115?from=CrossRef](http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/bunsekikagaku1952/39.2_115?from=CrossRef).

[65] HHOLMSTEDT, B. Distribution and determination of cholinesterases in mammals. *Bull World Health Organ*. 1971, 44(1-3), 99-107.

[66] ZAMECNIK, P.C., BREWSTER, L.E. a LIPMANN, F. A manometric method for measuring the activity of the cl. welchii lecithinase and a description of certain properties of this enzyme. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 1947, 85(4), 381-394 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1084/jem.85.4.381. ISSN 1540-9538. Dostupné z: <https://rupress.org/jem/article/85/4/381/5041/A-MANOMETRIC-METHOD-FOR-MEASURING-THE-ACTIVITY-OF>.

[67] PICKERING, R.G. a PICKERING, C.E. Methods for the estimation of acetylcholinesterase activity in the erythrocytes of laboratory animals given carbamates or organophosphorus compounds. *Archiv fur Toxikologie* [online]. 1974, 31(3), 197-216 [cit.

2020-01-24]. DOI: 10.1007/BF00311053. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00311053>.

[68] REINER, E., BUNTIĆ, A., TRDAK, M. a SIMEON, V. Effect of temperature on the activity of human blood cholinesterases. *Archives of Toxicology* [online]. 1974, 32(4), 347-350 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1007/BF00330117. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00330117>.

[69] AUGUSTINSSON, K.-B. A Titrimetric Method for the Determination of Plasma and Red Blood Cell Cholinesterase Activity Using Thiocholine Esters as Substrates. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [online]. 2010, 7(4), 284-290 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.3109/00365515509134665. ISSN 0036-5513. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00365515509134665>.

[70] POHANKA, M., MUSILEK, K. a KUČA, K. Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009, 16(14), 1790-1798 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.2174/092986709788186129. ISSN 09298673. Dostupné z: <http://www.eurkaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=14&spage=1790>.

[71] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š. a VORČÁKOVÁ, K. Cholinesterase-based biosensors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, 31(3), 180-193 [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.1080/14756366.2016.1204609. ISSN 1475-6366. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2016.1204609>.

[72] POHANKA, M. Cholinesterase based amperometric biosensors for assay of anticholinergic compounds. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2009, 2(2) [cit. 2020-01-24]. DOI: 10.2478/v10102-009-0011-5. ISSN 1337-9569. Dostupné z: <http://content.sciendo.com/view/journals/intox/2/2/article-p52.xml>.

[73] POHANKA, M. (2015). Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers*. 69. 10.2478/s11696-014-0542-x.

[74] MARRAZZA, G. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. *Biosensors* [online]. 2014, 4(3), 301-317 [cit. 2020-01-24]. DOI:

10.3390/bios4030301. ISSN 2079-6374. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2079-6374/4/3/301>.

[75] POHANKA, M., HRABINOVA, M., KUCA K. A SIMONATO, J.-P. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2011, 12(4), 2631-2640 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.3390/ijms12042631. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/4/2631>.

[76] WU, Z.-L., PODUST, L.M. a GUENGERICH, F.P. Expansion of Substrate Specificity of Cytochrome P450 2A6 by Random and Site-directed Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2005, 280(49), 41090-41100 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1074/jbc.M508182200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M508182200>.

[77] PEJCHAL, V., ŠTĚPÁNKOVÁ, Š. a DRABINA, P. Synthesis of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl) ethyl]-3-substituted phenyl ureas and their inhibition activity to acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Heterocyclic Chemistry* [online]. 2011, 48(1), 57-62 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1002/jhet.502. ISSN 0022152X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jhet.502>.

[78] PEJCHAL, V., ŠTĚPÁNKOVÁ Š., PEJCHALOVÁ M., KRÁLOVEC K., HAVELEK R., RŮŽIČKOVÁ Z., AJANI H., LO R. a LEPŠÍK M. Synthesis, structural characterization, docking, lipophilicity and cytotoxicity of 1-[(1R)-1-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)ethyl]-3-alkyl carbamates, novel acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase pseudo-irreversible inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2016, 24(7), 1560-1572 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.02.033. ISSN 09680896. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089616301249>.

[79] KODÍČEK, M. Biochemické pojmy výkladový slovník; Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, 2004; ISBN 9788070805510.

[80] SVRČKOVÁ, K., ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., IMRAMOVSKÝ, A. (2014). Benzothiazoles as effective inhibitors of cholinesterases: Kinetics and mechanism of inhibition. *Scientific papers of the University of Pardubice. Series A, Faculty of Chemical technology* [online]. 2014, 21. 31-43 [cit. 2020-06-16]. ISSN 1211-5541. Dostupné z



[https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/75408/S\\_31-43\\_Vorcakova\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/75408/S_31-43_Vorcakova_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

[81] ABBASI, M. A., HASSAN, M., AZIZ-UR-REHMAN, SIDDIQUI, S. Z., SHAH, S. A. A., RAZA, H. a SEO, S. Y. Synthesis, enzyme inhibitory kinetics mechanism and computational study of N -(4-methoxyphenethyl)- N -(substituted)-4-methylbenzenesulfonamides as novel therapeutic agents for Alzheimer' s disease. *PeerJ* [online]. 2018, 6 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.7717/peerj.4962. ISSN 2167-8359. Dostupné z: <https://peerj.com/articles/4962>.

[82] CHIOU, C.T., FREED, V.H., SCHMEDDING, D.W. a KOHNERT, R.L. Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals. *Environmental Science & Technology* [online]. 1977, **11**(5), 475-478 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1021/es60128a001. ISSN 0013-936X. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es60128a001>.

[83] LIPINSKI, Ch. A., Lead – and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. 2004, **1**(4), 337-341 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007. ISSN 17406749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674904000551>.

[84] PRASANNA, S. a DOERKSEN, R. Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **16**(1), 21-41 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.2174/092986709787002817. ISSN 09298673. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=16&issue=1&spage=21>.