Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Využití 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu

Bc. Barbora Šimková

Diplomová práce

2021

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Using of 2,6-dichloroindophenol acetate as a substrate for acetylcholinesterase

Bc. Barbora Šimková

Thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Barbora Šimková**
Osobní číslo:	**C19594**
Studijní program:	**N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Studijní obor:	**Analýza biologických materiálů**
Téma práce:	**Využití 2,6-dichloroindofenol acetátu 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, funkce a mechanismu působení.
2. Popsat význam změněné aktivity cholinesteráz při rozvoji neurodegenerativních onemocnění (se zaměřením na Alzheimerovu chorobu).
3. Shrnout poznatky o inhibitorech cholinesteráz a jejich využití v terapii Alzheimerovy choroby.
4. Uvést přehled metod používaných ke stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

Experimentální část:

1. Testovat různé reakční podmínky za účelem získaní optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity acetylcholinesterázy s využitím 2,6-dichloroindofenol acetátu jako substrátu.
2. Stanovit kinetické parametry K_M a V_m.
3. Nově zavedenou metodou využívající 2,6-dichloroindofenol acetát 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: **35 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: **doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem využití 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu pro acetylcholinesterázu 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne Barbora Šimková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. a panu doc. Ing. Vladimíru Pejchalovi, Ph.D. za odborné vedení mé experimentální práce v laboratoři, trpělivost a za cenné a užitečné rady při tvorbě této práce. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za trpělivost a podporu během mého navazujícího studia.

ANOTACE

Teoretická část popisuje strukturu, funkci cholinesteráz a metody jejich stanovení. Dále se věnuje inhibitorům a jejich uplatnění při léčbě Alzheimerovy choroby. Experimentální část se týká optimalizace podmínek pro stanovení inhibice. Věnuje se také stanovení inhibiční účinnosti s použitím 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu. Poslední část práce se zabývá určením rozdělovacího koeficientu a polární povrchové plochy molekuly.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, Ellmanova metoda, 2,6-dichlorindofenol acetát

ANNOTATION

The theoretical part describes the structure, function of cholinesterases and methods of their determination. It also deals with inhibitors and their application in the treatment of Alzheimer's disease. The experimental part concerns the optimization of condition for the determination of inhibition. It also deals with the determination of inhibitory efficacy using 2,6-dichlorindophenol acetate as substrate. The last part of the work is devoted with determining the partition coefficient and the polar surface area of the molecule.

KEYWORDS

Cholinesterase, inhibitors of cholinesterases, Ellman's method, 2,6-dichlorindophenol acetate

SEZNAM POUŽÍVANÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer´s disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
ATCh	acetylthiocholin
ChAT	cholinacetyltransferáza
BCh	butyrylcholin
BChE	butyrylcholinesteráza
ChE	cholinesteráza
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
ChEs	cholinesterázy
IFA	2,6-dichlorindofenol acetát
IChE	inhibitor cholinesteráz
NMDA	N-methyl-D-aspartát
OF	organofosfáty
QCM	křemenné krystalové mikrovážky (quartz crystal microbalance)
QDs	kvantové tečky (quantum dots)
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PSA	polárním povrch molekuly
TcAChE	Torpedo californica AChE
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
tPSA	topologická molekulární polární povrchová plocha

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura AChE 15
Obrázek 2 Funkce AChE 16
Obrázek 3 Struktura BChE 19
Obrázek 4 Porovnání mozku zdravého člověka a mozku člověka s AD 22
Obrázek 5 Strukturní vzorec donepezilu 25
Obrázek 6 Strukturní vzorec galantaminu 26
Obrázek 7 Strukturní vzorec organofosfátu 27
Obrázek 8 Strukturní vzorec rivastigminu 29
Obrázek 9 Struktura biologicky aktivních karbamátů 29
Obrázek 10 Princip Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE 32
Obrázek 11 Reakční schéma přípravy 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)amino)fenyl acetátu 43
Obrázek 12 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)amino)fenyl acetát 50
Obrázek 13 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu pro aktivity AChE 0,2; 0,5 a 1 U 51
Obrázek 14 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 0,2 U 52
Obrázek 15 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 0,5 U 52
Obrázek 16 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 1 U 53
Obrázek 17 Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované a inhibované na koncentraci inhibitoru 1 s použitím substrátu ATCh 55
Obrázek 18 Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované a inhibované na koncentraci inhibitoru 7 s použitím substrátu IFA 56
Obrázek 19 Typ inhibice - nelineární regrese, inhibitor 1 57
Obrázek 20 Typ inhibice - graf podle Lineweavera a Burka, inhibitor 1 58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled testovaných inhibitorů 42
Tabulka 2 Hodnoty kinetických parametrů K_M a Vm 53
Tabulka 3 Hodnoty IC_{50} testovaných inhibitorů stanovené Ellmanovou metodou 54
Tabulka 4 Hodnoty IC_{50} testovaných inhibitorů stanovené s IFA jako substrátem 56
Tabulka 5 Typ inhibice - kinetické parametry K_M a V_m 58
Tabulka 6 Hodnoty logP a tPSA testovaných inhibitorů 60

OBSAH

ÚVOD 12
1 CHOLINESTERÁZY 13
1.1 Acetylcholinesteráza 14
1.1.1 Struktura 14
1.1.2 Funkce 16
1.1.3 Syntéza acetylcholinu 17
1.2 Butyrylcholinesteráza 18
1.2.1 Struktura 18
1.2.2 Funkce 19
2 ROLE CHOLINESTERÁZ U ALZHEIMEROVY CHOROBY 21
3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ 24
3.1 Reverzibilní inhibitory 24
3.1.1 Donepezil 24
3.1.2 Galantamin 25
3.2 Ireverzibilní inhibitory 27
3.2.1 Organofosfáty 27
3.3 Pseudoreverzibilní inhibitory 28
3.3.1 Rivastigmin 28
3.3.2 Další karbamáty 29
3.4 Ostatní inhibitory cholinesteráz při léčbě Alzheimerovy choroby 30
3.4.1 Takrin 30
4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ 32
4.1 Spektrofotometrické metody 32
4.1.1 Ellmanova metoda 32
4.1.2 Fluorimetrické metody 33
4.2 Difraktometrické metody 34
4.3 Radiometrické metody 34
4.4 Kalorimetrické metody 35
4.5 Metody založené na stanovení pH 35
4.5.1 Michelova metoda 35
4.5.2 Titrační stanovení 35
4.5.3 Acholestova metoda 36
4.6 Biosenzory 36
4.6.1 Elektrochemické biosenzory 37

4.6.2 Optické biosenzory 38
4.6.3 Piezoelektrické biosenzory 38
4.7 Mikročipy 39
5 CÍL PRÁCE 40
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 41
6.1 Použité chemikálie, roztoky, přístroje a pomůcky 41
6.2 Syntéza 2,6-dichlorindofenol acetátu 42
6.3 Charakterizace 2,6-dichlorindofenol acetátu 43
6.4 Stanovení aktivity acetylcholinesterázy 44
6.5 Stanovení závislosti rychlosti reakce na koncentraci 2,6-dichlorindofenol acetátu 45
6.6 Stanovení IC_{50} 45
6.6.1 Postup stanovení IC_{50} s acetylthiocholinem jako substrátem 46
6.6.2 Postup stanovení IC_{50} s 2,6-dichlorindofenol acetátem jako substrátem 47
6.7 Stanovení typu inhibice 48
7 VÝSLEDKY 49
7.1 Syntéza 2,6-dichlorindofenol acetátu 49
7.2 Charakterizace 2,6-dichlorindofenol acetátu 49
7.3 Stanovení závislosti rychlosti reakce na koncentraci 2,6-dichlorindofenol acetátu 50
7.3.1 Stanovení reakční rychlosti 50
7.3.2 Stanovení kinetických parametrů 51
7.4 Stanovení IC_{50} s acetylthiocholinem jako substrátem 53
7.5 Stanovení IC_{50} s 2,6-dichlorindofenol acetátem jako substrátem 55
7.6 Stanovení typu inhibice 57
7.7 Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA 59
8 DISKUZE 61
8.1 Rychlost saturace enzymu 2,6-dichlorindofenol acetátem 61
8.2 IC_{50} 61
8.3 Typ inhibice 62
8.4 Rozdělovací koeficient a tPSA 62
9 ZÁVĚR 63
10 CITACE 64

ÚVOD

Cholinesterázy (ChEs), které patří do skupiny serinových hydroláz, se nachází především v centrálním nervovém systému a jsou důležité pro jeho správné fungování. Do této skupiny enzymů se řadí acetylcholinesteráza (AChE), jejímž hlavním úkolem je hydrolýza acetylcholinu (ACh) na cholin a kyselinu octovou. Tato reakce je potřebná k umožnění cholinergního neuronu se po aktivaci vrátit do klidového stavu. Druhým enzymem, který se řadí do skupiny ChE, je butyrylcholinesteráza (BChE), avšak nemá žádný fyziologický význam v nervovém systému. [1, 2]

Inhibitory cholinesteráz (IChE) jsou látky, které se používají především pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD), potom dále pro léčbu myasthenia gravis a glaukomu. Jedná se o přírodní a syntetické látky, které narušují rozpad ACh a tím prodlužují jeho činnost. [3]

Alzheimerova choroba, která byla popsána v roce 1907 německým lékařem Aloisem Alzheimerem, se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění nervového systému. Jedná se o nejrozšířenější typ demence na celém světě. Nemoc se nejčastěji objevuje po 65. roce života a hlavním příznakem je porucha paměti. Příčinou AD je kromě přítomnosti β-amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek také snížená produkce ACh a ztráta cholinergních neuronů, což vede ke kognitivním poruchám. AD patří v současné době k nevyléčitelným onemocněním. Ke zmírnění symptomů a zpomalení průběhu se používají právě zmíněné inhibitory, mezi které patří především donepezil, rivastigmin a galantamin. [4]

Pro stanovení aktivity AChE se používá mnoho metod, například spektrofotometrické, metody založené na změně pH, fluorimetrické a mnoho dalších. Nejvíce rozšířenou a používanou metodou je metoda spektrofotometrická, tzv. Ellmanova metoda. Stanovení aktivity a inhibice ChEs má široké spektrum v oblasti zahrnující farmaceutický průmysl, potravinářský průmysl, zemědělství, zdravotnictví a armádě. [5]

1 CHOLINESTERÁZY

Cholinesterázy patří do skupiny enzymů zvané serinové hydrolázy. Jsou přítomné v centrálním nervovém systému, zejména v nervové tkáni, svalech a červených krvinkách. ChEs katalyzují hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, což je reakce nezbytná k umožnění cholinergního neuronu se po aktivaci vrátit do klidového stavu. Cholinergní systém je založen na neurotransmiteru acetylcholinu, který byl poprvé objeven v roce 1914 anglickým farmakologem a fyziologem Henrym Hallett Dalem. Později v roce 1926 byl ACh potvrzen německým farmakologem Ottem Loewim jako neurotransmiter. ACh je široce rozšířen v centrálním i periferním nervovém systému. Při hydrolýze ACh pomocí acetylcholinesterázy představuje důležité místo hydroxylová skupina serinu, která umožňuje nukleofilní atak na elektrofilní uhlíkový atom substrátu. Dochází tak k esterovému spojení mezi cholinem a acylovou skupinou a tím k dočasné kovalentní vazbě mezi enzymem a substrátem a enzym se stává neaktivní. Poté dojde k hydrolýze této vazby za vzniku cholinu a zbytku kyseliny octové za současného „odkrytí“ esterového místa, a tedy i k obnovení aktivity enzymu. [1, 2, 6]

ChE je jeden z mnoha důležitých enzymů potřebných pro správné fungování nervového systému člověka. Je známo, že obratlovci mají dvě cholinesterázy, a to acetylcholinesterázu (EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterázu (EC 3.1.1.8). AChE se primárně nachází v mozku, v krvi na membránách erytrocytů a nervových synapsích, zatímco BChE je produkována v játrech a nachází se primárně v krevní plazmě. [1]

Hlavní funkcí AChE je hydrolýza ACh, kde u nervových synapsí přeruší přenos nervových impulzů hydrolýzou tohoto neurotransmiteru. BChE však nemá žádnou známou fyziologickou funkci, ale je prokázán její toxikologický význam. BChE působí jako tzv. záchranný enzym (scavenger) vázající toxické látky, které by mohly inhibovat AChE. Tyto dvě cholinesterázy byly historicky diferencovány na základě jejich substrátové selektivity. AChE hydrolyzuje acetylcholin rychleji, zatímco BChE hydrolyzuje butyrylcholin (BCh) rychleji. Předpokládá se, že tento rozdíl v selektivitě k substrátu vyplývá z rozdílů ve struktuře acylové kapsy, která v případě BChE umožňuje přístup větších substrátů k aktivnímu místu. Na molekulární úrovni mají AChE a BChE společnou sekvenční homologii aminokyselin z 65 % a jsou kódovány různými geny na chromozomu 7 pro AChE a na chromozomu 3 pro BChE. O vzniku odlišných molekulárních forem těchto enzymů rozhoduje vždy jediný gen, a to v důsledku alternativního sestřihu kódovací oblasti původního transkriptu. [7, 8]

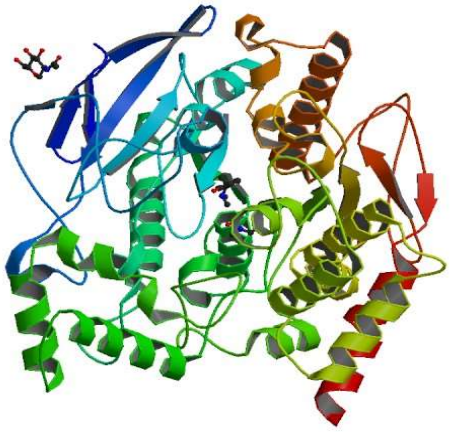
Mnoho chemických sloučenin s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou např. organofosfátové (OF) a karbamátové pesticidy, bojové látky, přírodní toxiny a léky, projevuje svou akutní toxicitu inhibicí ChE. Inhibitory ChE jsou látky přírodní nebo umělé a narušují rozpad ACh a prodlužují jeho činnost. Inhibice tohoto enzymu má tedy toxikologické i farmakologické uplatnění. Inhibitory ChEs mají také velké uplatnění pro léčbu myasthenia gravis, glaukomu a Alzheimerovy nemoci. Stanovení aktivity a inhibice ChEs má široké spektrum v oblasti zahrnující farmaceutický průmysl, potravinářský průmysl, zemědělství, životní prostředí a zdravotnictví. [1, 8]

1.1 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza je známá také jako pravá cholinesteráza, erytrocytová cholinesteráza nebo acetycholinová acetylhydroláza. Jak už bylo řečeno, AChE se nachází především v mozku, v krvi na membránách erytrocytů a její funkcí je katalýza hydrolýzy acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Inhibitory AChE se používají při léčbě různých neuromuskulárních poruch a poskytly první generaci léčiv pro léčbu Alzheimerovy choroby. Znalost 3D struktury AChE je proto nezbytná pro pochopení její pozoruhodné katalytické účinnosti, pro racionální návrh léčiv a pro vývoj terapeutických přístupů k intoxikaci OF. [1, 9]

1.1.1 Struktura

První krystalová struktura, struktura TcAChE (Torpedo californica AChE), byla stanovena v roce 1991. Poté následovala řada 3D struktur TcAChE v komplexu se širokým repertoárem inhibitorů, včetně léků proti Alzheimerově chorobě. Stanovení zmíněné krystalové struktury u parejnoka TcAChE umožnilo vizualizovat vázající kapsu pro ACh. Také umožnila identifikaci aktivního místa, které se nachází na dně hluboké rokle lemované převážně aromatickými aminokyselinovými zbytky. AChE má vysokou specifickou katalytickou aktivitu a její struktura je zobrazena na obrázku 1. [3, 9]



Obrázek 1 Struktura AChE [10]

Katalytická jednotka enzymu se skládá z periferního aniontového místa, z prohlubně aktivního místa a z katalytického aktivního místa. Periferní aniontové místo slouží jako selektivní brána pro ACh. Vazbou substrátu na periferní aniontové místo začíná počáteční krok v katalytické dráze. [9]

Každá molekula AChE degraduje asi 25 000 molekul acetylcholinu za sekundu, což se blíží rychlosti difúzně řízené reakce. Molekula AChE má elipsoidní tvar s rozměry přibližně 45 Å na 60 Å na 65 Å. Monomer enzymu se skládá z dvanácti β skládaných listů obklopených čtrnácti α helixy. Charakteristickým rysem struktury AChE je hluboká a úzká rokle, tzv. rokle aktivního místa. Tato rokle je dlouhá asi 20 Å, je lemována 14 aromatickými kruhy aminokyselin Phe, Trp a Tyr a proniká do poloviny enzymu. Přítomnost aromatických hydrofobních zbytků pomáhá k zavedení ACh do katalytického aktivního místa. Katalytické aktivní místo AChE je umístěno 4 Å od dna prohlubně aktivního místa a zahrnuje 2 „podjednotky“, a to esterové a aniontové místo. V esterové podjednotce je umístěno vazebné místo pro acyl, tzv. acylová kapsa, která slouží k zachycení acylové skupiny ACh během katalýzy. V této podjednotce je také umístěna oxyaniontová jamka. Esterová podjednotka TcAChE obsahuje triádu tří aminokyselin, mezi které patří Ser 200, His 440 a Glu 327. Aniontová podjednotka slouží k vazbě s kladně nabitou kvartérní skupinou cholinu. Tato podjednotka váže také oba kvarterní ligandy (edrofonium, N-methylacridinium), které působí jako kompetitivní inhibitory a kvarterní oximy, které slouží jako účinné reaktivátory AChE inhibované OF. [11, 12]

AChE existuje ve třech globulárních formách obsahujících jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky. Tyto různé formy jsou dány alternativním sestřihem, transkripčními, post-transkripčními a post-translačnímu modifikacemi. Monomer G1 má velikost přibližně 69 kDa, dimer G2 o velikosti 131 kDa, kde jsou dva monomery spojené disulfidickou vazbou

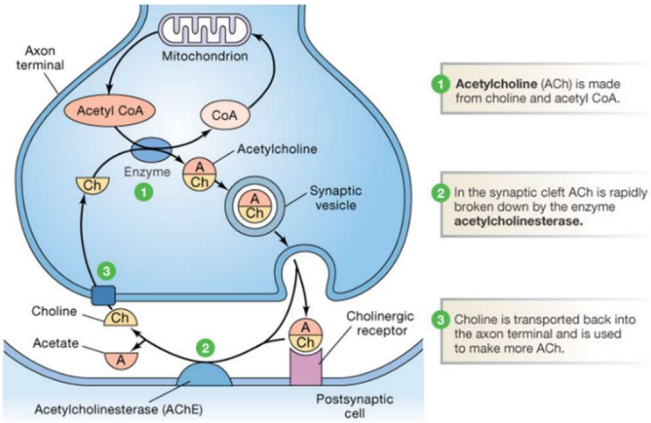
Cys-Cys a tetramer G4 o velikosti 275 kDa, kde jsou dva G2 dimery spojené hydrofobními interakcemi. G1 AChE existuje výhradně jako rozpustná entita, zatímco G4 AChE existuje jak v rozpustné, tak v membránově vázané formě. V lidském mozku se AChE vyskytuje v G1 a G4 formě, přičemž se jejich poměr v různých oblastech mozku liší. G4 forma převládá v centrální nervové soustavě. Tyto různé formy AChE jsou transportované mechanismy aktivního neuronového transportu v retrográdních a anterográdních směrech. [13]

V mozku pacientů s AD je v některých oblastech hladina membránově vázané G4 formy snížena až o 90 %, zatímco hladiny G1 formy zůstávají nezměněny. Tyto změny exprese jsou pravděpodobně přímým následkem β-amyloidu. Účinnost inhibice ChE jednotlivými typy IChE je v různých oblastech mozku odlišná, v důsledku rozdílné selektivity vůči molekulárním isoformám. [13, 14]

Znalost struktury AChE je nezbytná pro pochopení její vysoké katalytické účinnosti a molekulárního základu pro rozpoznávání ACh jinými proteiny vázajícími ACh (receptory ACh). Také pro objasnění mechanismu účinku, který je základem farmakologického a toxikologického účinku těchto látek za účelem racionálního designu léků. [12]

1.1.2 Funkce

Hlavní funkcí AChE je ukončení nervového přenosu na cholinergních receptorech rychlou hydrolýzu neurotransmiteru ACh. Během neurotransmise se ACh uvolňuje z presynaptického neuronu do synaptické štěrbiny a váže se na acetylcholinové receptory na postsynaptické membráně, čímž přenáší signál. Neurotransmiter je zachycen AChE a rychle vtahován do aktivního místa. Katalytická reakce AChE nejdříve probíhá nukleofilním atakem na karbonylový uhlík ACh, a poté následuje acylace enzymu za vzniku volného cholinu. V poslední řadě dochází k hydrolýze acylovaného enzymu, uvolnění kyseliny octové a obnovení aktivního místa. Funkce AChE je znázorněna na obrázku 2. [15]



Obrázek 2 Funkce AChE [16]

Přestože primární funkcí AChE je ukončení nervového přenosu, tak bylo zjištěno, že AChE hraje také roli v nervovém vývoji. AChE vykazuje také neenzymatické funkce. Týkají se většinou rozvoje a degenerace nervového systému a zahrnují podporování buněčné adheze a růstu neuritů, amyloidózu a apoptózu. Embryologicky je AChE složitě zapojena do vývoje nervového systému a je exprimována vyvíjejícími se neurony a během období axonálního růstu (doba, kdy se nezdá být nejdůležitější enzymatická aktivita). V periferním nervovém systému kuřat bylo zjištěno, že v gangliích dorzálních kořenů je lokálně přítomna přechodná aktivita AChE. Tato zjištění naznačují, že během vývoje plodu AChE přispívá k morfogenezi kromě své hlavní enzymatické funkce. AChE je také zapojena do mnoha dalších buněčných procesů včetně synaptogeneze, neuritogeneze, hematopoézy, adheze buněk, apoptózy a je také spojována s tvorbou amyloidních plaků u AD. [15, 17]

1.1.3 Syntéza acetylcholinu

Acetylcholin, který je neurotransmiter autonomního nervového systému sympatiku a parasympatiku, centrálního nervového systému a nervosvalové ploténky, je syntetizován jednostupňovou reakcí. ACh vzniká syntézou acetyl koenzymu A a cholinu za katalýzy enzymem cholin acetyltransferázou (ChAT). Acetyl koenzym A používaný pro syntézu ACh v mozku savců pochází z pyruvátu tvořeného z glukózy. Stejně jako v případě všech nervových terminálních proteinů je ChAT produkována v těle cholinergních buněk a transportována dolů axonem k nervovým zakončením. Jak ChAT, tak ACh lze nalézt v celém neuronu, ale jejich nejvyšší koncentrace je v axonových oblastech. [18]

Během nervového přenosu je ACh uvolněn z presynaptické membrány axonu do synaptické štěrbiny a váže se na acetylcholinové receptory nikotinové či muskarinové postsynaptické membrány dendritu. AChE, nacházející se také na postsynaptické membráně, ukončí nervový přenos hydrolýzou ACh. Volný cholin, který pochází z hydrolyzovaného neurotransmiteru, je opět přijat presynaptickým neuronem, aby mohl být ACh resyntetizován z cholinu a acetyl koenzymu A za katalýzy ChAT. Cholin, který je uvolňován z acetylcholinu acetylcholinesterázou, je zpětně přenesen do cholinergních oblastí pomocí vysoce afinitního transportéru a znovu použit v syntéze neurotransmiteru. Hemicholin-3 silně a reverzibilně inhibuje transport cholinu, což má za následek výrazné snížení tvorby acetylcholinu. [3]

V nervovém systému se předpokládá, že ChAT existuje primárně v nervové terminální cytoplazmě. V kapilárních endotelových buňkách je nosný systém, který je zodpovědný za transport cholinu ve svých volných a fosfolipidových formách do mozku. Hydrolýza

fosfolipidů obsahujících cholin může také uvolňovat cholin, který se používá při syntéze acetylcholinu. [19]

Mezi kroky omezující rychlost v syntéze ACh patří dostupnost cholinu a acetyl-CoA. Během zvýšené neuronální aktivity je dostupnost acetyl-CoA z mitochondrie zvýšená, stejně jako absorpce cholinu do nervu končícího synaptickou štěrbinou. Ionty Ca^{2+} jsou zapojeny do obou těchto regulačních mechanismů. Většina cholinu používaného pro syntézu ACh pochází z recyklace cholinu z metabolizovaného ACh. Dalším zdrojem je rozklad fosfolipidu, fosfatidylcholinu. [19]

Neexistují žádné velmi specifické a silné inhibitory enzymu a je třeba poznamenat, že farmakologická blokáda tohoto kroku (např. naftylvinylpyridinem) v životním cyklu acetylcholinu způsobuje méně výrazný účinek na zvýšení než inhibici transportu cholinu. [18]

1.2 Butyrylcholinesteráza

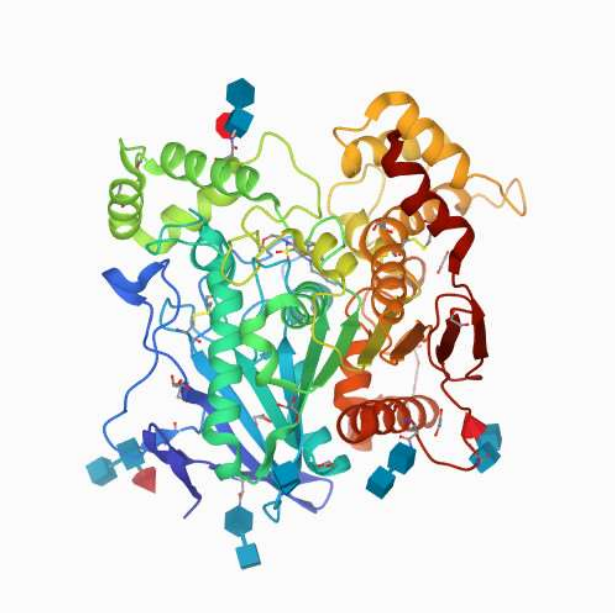
Butyrylcholinesteráza je známá také jako pseudocholinesteráza, nespecifická cholinesteráza nebo plazmatická cholinesteráza. BChE patří stejně jako AChE do skupiny α/β serinových hydroláz. Jak už bylo zmíněno, BChE je produkována v játrech a vyskytuje se především v krevní plazmě. [8]

1.2.1 Struktura

Molekulární struktura BChE je podobná struktuře AChE, avšak tento enzym má odlišné spektrum substrátových specifit. Zatímco AChE hydrolyzuje nejprve acetylcholin, BChE přednostně hydrolyzuje butyrylcholin. Katalytická jednotka enzymu se skládá z periferního aniontového místa nacházejícího se na povrchu enzymu, z úzké prohlubně, která je lemována aromatickými zbytky aminokyselin a z aktivního místa na dně prohlubně enzymu. U mnoha druhů je monomer tvořen přibližně 574 aminokyselinami. Nejčastěji se však BChE vyskytuje jako tetramer a celková hmotnost jedné podjednotky se blíží 85 kDa. Zbytky aminokyselin Asp 70 a Tyr332 jsou zapojeny do počáteční vazby pozitivně nabitého substrátu, jako je kvartérní amonium obsahující estery cholinu. Acylové kapsy AChE a BChE obsahují různé aminokyselinové zbytky. V acylové kapse BChE se nachází Leu 286 a Val 288 a nahrazení fenylalaninů alifatickými zbytky umožňuje katalýzu větší acylové skupiny nacházející se v substrátu, jako je butyrylcholin. Krystalová struktura lidské BChE je znázorněna na obrázku 3. [6, 20, 21]

Aktivní místo lidské BChE obsahuje katalytickou triádu Ser 198, Glu 325 a His 438, která určuje katalytickou aktivitu enzymu. Šest ze čtrnácti aromatických aminokyselinových

zbytků, které lemují aktivní místo prohlubně AChE, jsou nahrazeny alifatickými aminokyselinovými zbytky v BChE. To způsobuje, že je objem aktivní rokliny BChE větší než u rokliny aktivního místa AChE. Náhrada aromatických aminokyselin alifatickými aminokyselinami je také zodpovědná za selektivní citlivost vůči různým inhibitorům těchto dvou enzymů. BChE může katalyzovat hydrolýzu velkého množství esterů, zatímco AChE je velmi specifická pro ACh. [7, 21]



Obrázek 3 Struktura BChE [22]

1.2.2 Funkce

Přesná funkce BChE zůstává prozatím nejasná. Byly však navrženy četné potenciální role BChE, od metabolismu lipoproteinů po buněčnou adhezi a etiologii určitých neurodegenerativních chorob. Byl však prokázán její toxikologický význam. BChE působí jako tzv. záchranný enzym vázající toxické látky, které by mohly inhibovat AChE. BChE hraje roli při detoxikaci jedů, které mohou být konzumovány nebo inhalovány. Například organofosfátové pesticidy, nervově paralytické látky a neurotoxické látky zvané anatoxiny jsou vychytány a zničeny BChE, proto se tento enzym využívá jako potenciální terapeutikum při otravě např. organofosfátovými pesticidy a slouží také jako biomarker při expozici nervově paralytickými látkami a organofosfátovými pesticidy. [23]

BChE se od AChE liší v kinetické odpovědi na koncentraci ACh. BChE je méně účinná v hydrolýze ACh při jeho nízkých koncentracích, ale vysoce účinná při vysokých koncentracích tohoto substrátu, při kterých je AChE inhibována. BChE by se mohla tedy uplatňovat při hydrolýze neurotransmiteru ACh a sloužit tak jako tzv. záložní enzym.

Butyrylcholinesteráza má ve své struktuře tři různé enzymatické aktivity jako acetylcholinesteráza, a to esteráza, aryl-acylamidáza a peptidáza (nebo proteáza). [24]

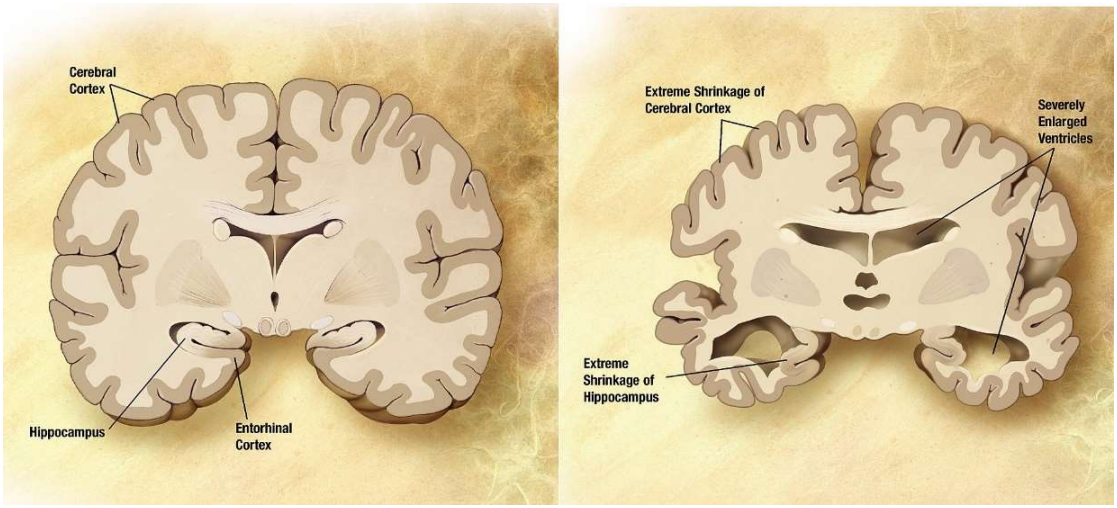
Hladiny BChE mohou být sníženy u pacientů s pokročilým onemocněním jater a snížení musí být vyšší než 75 %, než dojde k významnému prodloužení neuromuskulární blokády se sukcinylcholinem. Zvýšení BChE bylo pozorováno u 90,5 % případů akutního infarktu myokardu, což lze použít jako marker toxicity látek. Stanovení enzymu může být tedy vhodné pro jednoduché prokázání patologických stavů. BChE se také uplatňuje při katabolismu tuků a je spojována se vznikem amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek u AD. [1]

2 ROLE CHOLINESTERÁZ U ALZHEIMEROVY CHOROBY

Alzheimerova choroba je vyznačována porušením centrálního acetylcholinergního systému. Tento systém je také důležitý pro mechanismy krátkodobé paměti a paměťové konsolidace. AD je nemoc, která představuje nejčastější formu demence na celém světě. Společným patofyziologických znakem AD je kromě přítomnosti β-amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek také ztráta cholinergních neuronů. Cholinergní deficit vede ke kognitivním poruchám, poklesu pozornosti, koncentrace a rychlosti zpracování informací. Při AD je snížena tvorba a uvolnění ACh z presynaptických zakončení, hladina enzymu cholinacetyltransferázy a zároveň je snížen vstup prekurzoru cholinu do neuronů. Současně je snížen i počet nikotinových acetylcholinergních receptorů, avšak počet muskarinových acetylcholinergních receptorů zůstává relativně nezměněn. Zajímavostí je, že hladina BChE při AD progresivně a významně stoupá. [25, 26]

AD byla poprvé popsána německým lékařem Aloisem Alzheimerem v roce 1907. Jedná se o chronické neurodegenerativní onemocnění, které je z 60–70 % příčinou demence. Tato nemoc se nejčastěji objevuje u lidí kolem 65 let. K prvním příznakům patří porucha paměti, postupně se přidává poškození kognitivních, intelektuálních, ale i fyzických schopností. Příčina nemoci je z 90 % sporadická (ojedinělá). Familiární forma AD, která je příčinou 5–10 % onemocnění, se objevuje často před 60. rokem). Tato forma je způsobena vrozenými mutacemi v důležitých genech, jako je například amyloidový prekurzorový protein nebo tau protein. Předpokládá se, že sporadická i familiární forma vede k hromadění amyloidu β v mozkové tkáni, především v hipokampu a mozkové kůře. V roce 2015 bylo na celém světě přibližně 29 milionů lidí s AD a ve stejném roce byla tato demence příčinou smrti 1,9 milionu lidí. Jak bylo řečeno, tak nejčastěji se projevuje u lidí starších 65 let, avšak 4–5 % případů se objevuje dříve. Prevalence AD se zvyšuje s věkem – z 10 % u osob kolem 65 let na téměř 50 % u osob kolem 85 let. Jako léčiva, která zmírňují progresi, se používají inhibitory acetylcholinesterázy (takrin, rivastigmin, galantamin a donepezil). Tyto inhibitory snižují degradaci ACh, což vyrovnává ztrátu ACh způsobenou degradací cholinergních center v mozku. Dalším používaným léčivem je memantin ze skupiny inhibitorů NMDA receptorů. [4, 27]

Na obrázku 4 můžeme vidět porovnání mozku zdravého člověka a mozku člověka s AD.



Obrázek 4 Porovnání mozku zdravého člověka (vlevo) a mozku člověka s AD (vpravo) [28]

Mozek AD je charakterizován přítomností β-amyloidních plaků a neurofibrilárních spletí, které jsou charakteristickými patologickými rysy. β-amyloidové plaky jsou extracelulární depozity, jejichž hlavní složkou je β-amyloidní protein, malý polypeptid vytvořený zpracováním mnohem většího transmembránového β-amyloidního prekurzorového proteinu postupným působením proteolytických enzymů známých jako sekretázy. Intracelulární neurofibrilární spleť se skládá ze spárovaných helikálních filamentů mikrotubulového proteinu tau, který je abnormálně hyperfosforylovaný. V dnešní době se zaměření na výzkum posunulo od proteinových ložisek směrem ke studiím role spouštěcích efektorů, β-amyloidní protein a tau protein. V souladu s tím je věnován velký výzkum porozumění tomu, jak β-amyloidní protein a tau protein vedou k toxickým událostem spojeným s AD, jak způsobují změny v expresi dalších klíčových mozkových proteinů a nakonec, jak způsobují neurodegeneraci. [29]

Jak už bylo řečeno, AChE může existovat v několika různých molekulárních formách, které mají specifické vzorce exprese v různých typech buněk. Ne všechny molekulární formy AChE jsou v mozku AD stejně postiženy. Studie používající centrifugaci v sacharózovém gradientu odhalily dvě hlavní formy AChE v mozku savců, a to tetramer (G4) a monomer (G1). Hlavní formy v mozku dospělých jsou G4, které jsou ukotveny v buněčné membráně neuronů a představují cholinergní druh. Dalšími minoritními druhy jsou monomery (G1) a dimery (G2). Několik studií však dokázalo, že každá forma odráží jiné fyziologické funkce a že existují změny v relativních poměrech isoforem AChE v mozku pacienta s AD. U pacientů s AD, kteří byli vyšetřováni post-mortem se prokázala selektivní ztráta enzymaticky aktivního G4 v řadě kortikálních a subkortikálních oblastí mozku, zatímco minoritní druhy byly zachovány nebo v těžkých případech AD dokonce zvýšeny. [29, 30]

Důsledkem selektivní ztráty formy G4 vázané na membránu je pokles poměru molekulárních forem G4/G1 AChE. Poměr AChE formy G4/G1 byl obvykle studován ve vztahu k neurochemickým, neuroanatomickým, zejména cholinergním vlastnostem mozku. Na membránu vázaná G4 forma AChE je přednostně exprimována na cholinergních synapsích, a právě poměr G4/G1 je markerem pro tato místa. Právě ztráta G4 souvisí s extraneuronálním ukládáním amyloidního proteinu a následnou tvorbou plaků a s rozvojem intraneuronálních neurofibrilárních spletí. Tyto rysy jsou považovány za histopatologické markery. [30]

Studie prokázaly, že zatímco koncentrace AChE poklesne až o 85 % v postižených oblastech mozku, tak dojde ke zvýšení koncentrace BChE. Zvýšená hladina BChE má za následek tvorbu β-amyloidních plaků a neurofibrilárních spletí, neboť bylo prokázáno, že inhibicí poklesne vznik β-amyloidů. [29]

3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ

Inhibitory cholinesteráz jsou látky, které náleží do tzv. kognitiv. Kognitiva jsou látky, které zlepšují funkci centrálního acetylcholinergního systému, a kromě IChE mezi ně patří také prekurzory tvorby acetylcholinu a agonisté muskarinových a nikotinových receptorů. IChE jsou látky jejichž úkolem je zablokování rozpadu ACh, a tím prodloužení vazby ACh na své receptory s následujícím zvýšením acetylcholinergní transmise. Centrální IChE musí dobře procházet hematoencefalickou bariérou, ovlivňovat specificky mozkové formy ChE a být dobře tolerovány. Většina látek jsou inhibitory AChE, některé však také inhibují i BChE. Inhibitory dělíme do tří skupin podle způsobu účinku. První skupinou jsou inhibitory reverzibilní, které jsou odbourávány v játrech a jejich působení trvá po dobu jejich přítomnosti v plazmě. Druhou skupinou jsou inhibitory ireverzibilní, které jsou spojovány s toxickými účinky a s množstvím nežádoucích účinků. Třetí skupina zahrnuje inhibitory pseudoreverzibilní. [31]

3.1 Reverzibilní inhibitory

Tyto inhibitory hrají důležitou roli ve farmakologickém odvětví a zahrnují sloučeniny s různými funkčnímu skupinami, jako je karbamátová, kvartérní nebo terciární aminová skupina. Jsou používány při diagnostice nebo léčbě různých nemocí, jako například myasthenia gravis, distenze močového měchýře nebo glaukom. [3]

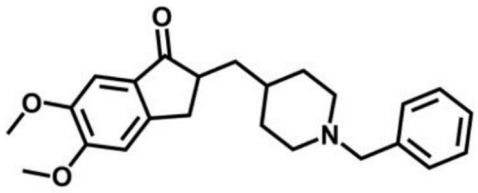
3.1.1 Donepezil

Donepezil (obr. 5) je selektivní reverzibilní inhibitor, který se váže na periferní aniontové místo. Tento lék byl schválen pro léčbu AD v roce 1996 a je z inhibitorů ChE nejdéle na trhu. Jedná se o piperidinový derivát a má nejen symptomatické účinky při léčbě AD, ale také kauzální účinky, které zpomalují ukládání amyloidního plaku. [3, 32]

Benzylpiperidinové skupiny a skupiny indanonu donepezilu interagují s indolovým kruhem Trp 84 aniontového podřízeného místa na dně rokle a indolovým kruhem Trp 279 v periferním místě enzymu. Farmakologický profil donepezilu urychlil vývoj dalších derivátů *N*-benzylpiperidinu jako potenciálních léků proti Alzheimerově chorobě. Villalobos a kol. navrhli a syntetizovali *N*-benzylpiperidinové deriváty nahrazením indanonové části sloučeninou benzisoxazolové skupiny s velmi vysokou *in vitro* inhibiční aktivitou AChE a také velmi vysokou selektivitou. Vykazuje však nízkou aktivitu *in vivo* díky své rychlé hydrolýze a produkci méně účinných metabolitů. V poslední době Meng a kol. syntetizovali deriváty indanonu fúzováním pyridinylmethylenindanonové části se substituovanými aminovými

skupinami, jako je piperidinyl, pyrrolidinyl, imidazolyl, *N*,*N*-diethylamino v 6. poloze indanonu pomocí polymethylenového linkeru. Bylo zjištěno, že derivát s piperidinovou skupinou a indanonovou skupinou spojený dvěma methylenovými skupinami je nejúčinnější sloučeninou. Sloučeniny s piperidinylovou skupinou vázanou pyridinylmethylenindanonem vykazovaly ve srovnání se sloučeninami s pyrrolidinylovou a *N*,*N*-diethylaminoskupinou vysokou účinnost, což ukazuje na významnou roli substituované aminoskupiny při inhibici AChE. Kromě toho nahrazení pyridinylmethylenové skupiny indanonové části fenylovou skupinou vedlo ke snížení inhibice AChE. [33]

Výsledky testů ukazují, že donepezil je vysoce selektivní vůči AChE ve srovnání s BChE. Lék vyrábí farmaceutické společnosti Eisai a Pfizer pod obchodním názvem Aricept. Přestože je jeho hlavní terapeutické použití v paliativní léčbě mírné až střední AD, některé klinické studie uvádějí, že donepezil zlepšuje kognitivní funkci i u pacientů se závažnými symptomy AD. Donepezil je inhibitorem samotné AChE a má snadný přechod přes hematoencefalickou bariéru. Protože má dlouhý poločas vylučování (cca 70 hodin), je možné ho podávat pouze jednou denně. Donepezil je obecně dobře snášen, proto se po zahajovací dávce 5 mg může přejít po několika týdnech na dávku 10 mg denně. Donepezil prokazuje pozitivní vliv na kognitivní funkce, behaviorální symptomy a aktivity denního života. Mezi mírné a přechodné nežádoucí účinky donepezilu patří nevolnost, průjem a bolest břicha. [3]



Obrázek 5 Strukturní vzorec donepezilu [22]

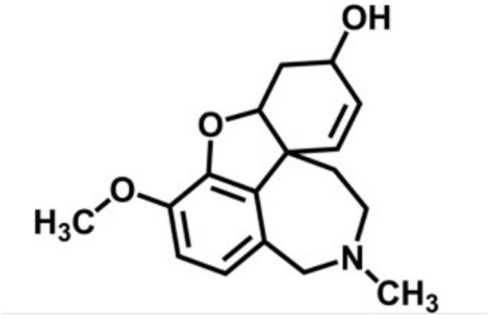
3.1.2 Galantamin

Galantamin (obr. 6) je alkaloid, který je izolovaný z rostliny *Galanthus woronowii* a používá se k léčbě mírné až střední AD. Je to selektivní, kompetitivní a rychle reverzibilní inhibitor AChE. Tento inhibitor interaguje s anionickým místem a aromatickou prohlubní enzymu. Galantamin je na trhu nejkratší dobu (od roku 2001) a je prodávaný pod obchodním názvem Razadyne nebo Nivalin. Galantamin vykazuje jedinečný duální mechanismus na cholinergním systému, tj. inhibici AChE spolu s alosterickou modulací nikotinových acetylcholinových receptorů a zvýšeným uvolňováním ACh. Vzhledem k tomu, že závažnost

kognitivního poškození u AD koreluje se ztrátou nikotinových receptorů, zdá se tento účinek pro léčbu poruchy prospěšný. Galantamin svým alosterickým mechanismem ovlivňuje nejen cholinergní přenos, ale také jiné neurotransmiterové systémy, jako jsou monoaminy, glutamát a kyselina γ-aminobutyrová. Tyto účinky mohou vést k příznivějším účinkům a zlepšit kognitivní dysfunkci. Galanthamin je méně účinný, ale také méně toxický než takrin. [3, 34]

Ke zvýšení jeho účinnosti zavedlo několik výzkumných skupin změny ve struktuře galantaminu a syntetizovalo nové deriváty tohoto inhibitoru. Mary a kol. syntetizovali bis-interagující ligandy v galantaminové řadě, tj. *N*-demethylgalantamin deriváty za použití různých alkylových linkerů s koncovou amoniovou nebo ftalimidovou skupinou. Bylo zjištěno, že *N*-alkylamoniové sloučeniny jsou účinnější než odpovídající *N*-ftalimido sloučeniny, což naznačuje, že kvartérní amoniová funkce je důležitější při určování účinnosti než ftalimidoskupina. Jia a výzkumní pracovníci navrhli a syntetizovali *N*-substituované deriváty galantaminu začleněním benzylpiperidinů, benzyldialkylaminu, benzylmorfolinových a benzylamidových skupin s různými linkery alkylového řetězce do molekuly galantaminu za účelem syntézy silných inhibitorů AChE. Účinnost AChE inhibice byla ovlivněna hlavně funkcí na konci linkeru, jakož i délkou alkylového řetězce (s nejlepšími inhibičními aktivitami pozorovanými u šesti methylenových linkerů). Pro stejnou délku alkylového řetězce vedla změna funkce na konci linkeru k velké změně inhibiční účinnosti AChE. Bylo zjištěno, že deriváty s benzylpiperidinovou skupinou se šesti methylenovými jednotkami jsou nejúčinnějším inhibitorem AChE. [33, 35]

Jeho výhodami jsou relativně krátký poločas, vysoká biologická dostupnost a předvídatelná lineární farmakokinetika při dodržování doporučených dávek. Poločas rozpadu je cca 7 hodin a je prokázáno zlepšení kognitivních funkcí. Je úspěšný i při léčbě narušených aktivit denního života a behaviorálních poruch. Léčba se obvykle zahajuje dávkou 4 mg dvakrát denně a lze ji postupně zvyšovat až na 12 mg dvakrát denně. Výskyt nežádoucích účinků je podobný jako u donepezilu, mezi které patří především nevolnost. [30]

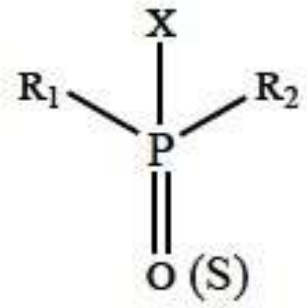


Obrázek 6 Strukturní vzorec galantaminu [22]

3.2 Ireverzibilní inhibitory

3.2.1 Organofosfáty

OF jsou estery nebo thioly odvozené od kyseliny fosforečné, fosfonové, fosfinové nebo fosfoamidové a jsou hlavní skupinou ireverzibilních inhibitorů AChE. OF mají hlavní toxikologické účinky díky nevratné fosforylaci esteráz v centrálním nervovém systému, a to souvisí s nevratnou inaktivací AChE. Strukturní vzorec OF je uveden na obrázku 7. [3]



Obrázek 7 Strukturní vzorec organofosfátu [3]

R1 a R2 jsou arylové nebo alkylové skupiny, které jsou navázány na atom fosforu přímo nebo přes atom kyslíku nebo síry. Skupina -X může patřit do široké škály halogenových, alifatických, aromatických nebo heterocyklických skupin. Skupina -X se váže na atom fosforu prostřednictvím atomu kyslíku nebo síry. Tato skupina se uvolňuje z atomu fosforu, když je OF hydrolyzován nebo při interakci s cílovými proteiny. V medicíně a zemědělství slovo „organofosfáty“ označuje skupinu insekticidů a nervových látek, které inhibují AChE. [3, 36]

OF vstupují do aktivního místa a jsou zde kovalentně vázány na serinovou -OH skupinu. Tím dojde ke štěpení OF a fosforylaci enzymu. Inhibice enzymu vede k akumulaci ACh v synaptické štěrbině, což vede k nadměrné stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů ACh a brání neurotransmisi. Nevratná inhibice AChE způsobená OF vede k akutním toxickým účinkům. Typickými příznaky akutní otravy jsou neklid, svalová slabost, svalové fascikulace, mióza, hypersalivace, pocení. Těžké otravy mohou způsobit respirační selhání, bezvědomí, zmatenost, křeče. [3, 37]

Nevratná inhibice probíhá ve dvou krocích. Prvním krokem je rychlá, krátkodobá reverzibilní inhibice enzymu, které má dominantní vliv na počátku reakce. Druhým krokem je pomalá ireverzibilní inhibice, díky které vzniká stabilní komplex enzym-inhibitor. Inhibitor je na enzym vázán kovalentními vazbami. [3]

Organofosforové nervové látky prochází dobře hematoencefalickou bariérou. Tyto nervové látky zahrnují tabun, sarin, soman, cyklosarin, VX a některé vysoce toxické sloučeniny. Na základě akutní toxicity je VX nejtoxičtější sloučeninou ze všech nervových látek. Soman, tabun, sarin a cyklosarin se řadí do skupiny tzv. nervově paralytických látek. Vývoj a výroba těchto nervových látek začala ve 30. letech minulého století a později byla použita při válkách. Akutní otrava nervovými látkami vede k hojnému slinění, křečím, nedobrovolnému močení, defekaci až smrti v důsledku udušení. [38, 39]

OF mohou být využity i jako terapeutická činidla. Nejčastěji se používají v oftalmologii při léčbě chronického glaukomu, což je oční onemocnění, které je charakterizováno zvýšeným tlakem tekutin v oku a může trvale poškodit vidění. Mezi tato terapeutická činidla patří diisopropylfluorfosfát a echothiofát. Diisopropylfluorfosfát je parasympatomimetikum, které se lokálně používá v očních kapkách jako miotikum při léčbě glaukomu. Vyvolává vedlejší účinky spojené se schopností vyvolat opožděnou periferní neuropatii. Echothiofát je stejně jako diisopropylfluorfostát parasympatomimetikum, které se používá při léčbě chronického glaukomu. Mezi nežádoucí účinky patří svalové křeče. [40, 41]

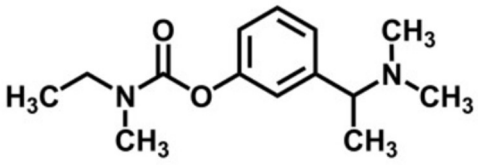
OF sloučeniny obvykle inhibují jak AChE, tak BChE. Tetraisopropylpyrofosforamid se liší od ostatních inhibitorů tím, že neproniká do aktivního místa AChE a inhibuje pouze BChE. Tento fakt se obvykle používá pro rychlé rozlišení mezi aktivitou AChE a BChE. Sloučeniny OF se používají při léčbě neurologických poškození jako je AD a Parkinsonova choroba. Příkladem je trichlorfon (metrifonát), který se dříve používal jako pesticid a má podobné využití léku s karbamátem rivastigminem. [3, 42]

3.3 Pseudoreverzibilní inhibitory

3.3.1 Rivastigmin

Rivastigmin (obr. 8) je nekompetitivní, silný inhibitor patřící do skupiny karbamátů, který se prodává pod obchodním názvem Exelon. Tento inhibitor blokuje aktivitu ChE vazbou na esteratickou část aktivního místa. Jedná se o duální inhibitor, což znamená, že současně inhibuje AChE i BChE. Rivastigmin se řadí do skupiny pseudoreverzibilních inhibitorů díky tomu, že jeho doba působení je cca 12 hodin, avšak molekula rivastigminu je vázána na receptor pouze 30 až 60 minut. Biologické studie ukázaly větší selektivitu rivastigminu v centrální nervové soustavě než v periferní. Rivastigmin působí především v mozkové kůže a hipokampu, tedy v částech mozku, které jsou nejvíce postiženy AD. [3, 32, 43]

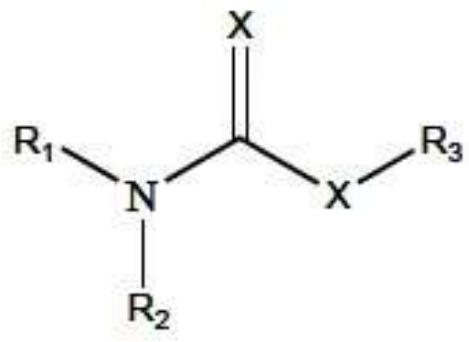
Lék se podává orálně ve formě tobolek nebo kapalných formách. Léčba se zahajuje dávkou 1,5 mg dvakrát denně a postupně se zvyšuje během týdnů na 6 mg dvakrát denně. Včasná léčba AD rivastigminem prokázala účinnost v léčbě kognitivních funkcí, behaviorálních změn a aktivit denního života. Nežádoucí účinky zahrnují nevolnost, zvracení, průjem, bolest hlavy a závratě. Rivastigmin se významně neváže na plazmatické proteiny a je inaktivován během inhibice enzymu. Tím se zabrání jaternímu metabolismu, a tak se rychle vylučuje ledvinami. Rivastigmin se kromě léčby AD používá i při léčbě demence s Lewyho tělísky a Parkinsonovy choroby. [31, 43]



Obrázek 8 Strukturní vzorec rivastigminu [22]

3.3.2 Další karbamáty

Kromě rivastigminu jsou další karbamáty významnými pseudoreverzibilními inhibitory. Jsou to organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové (NH_2COOH). Struktura biologicky aktivních karbamátů je znázorněna na obrázku 9. [3]



Obrázek 9 Struktura biologicky aktivních karbamátů [3]

X může být kyslík nebo síra, R1 a R2 jsou organické nebo alkylové substituenty (zřídka může být R1 a R2 vodík) a R3 je většinou organický substituent nebo někdy kov. Karbamáty se využívají při léčbě AD, Parkinsonovy choroby, glaukomu a myasthenia gravis. Kromě zmíněných terapeutických léčiv se tyto inhibitory využívají jako pesticidy a ve veterinární medicíně pro léčbu parazitárních infekcí. [3, 44]

Karbamáty mají podobné toxické akutní účinky a podobné symptomy při otravě jako organofosfáty. Hlavním rozdílem mezi karbamáty a OF je stabilita komplexu AChE-

karbamát a AChE-OF. OF dokáží fosforylovat serinové zbytky AChE nevratným způsobem, kdežto karbamoylovaný serinový zbytek je méně stabilní a karbamoylová část může být z enzymu odštěpena spontánní hydrolýzou. Dalším rozdílem mezi těmito dvěma typy inhibitorů je, že karbamáty jsou schopné dealkylovat a nedochází tak k tzv. stárnutí inhibovaného enzymu, kdežto u OF ano. [44, 45]

Karbamátové sloučeniny se v zemědělství používají jako fungicidy, insekticidy a herbicidy. Karbamáty, které obsahují vodík a methylovou skupinu místo R1 a R2 mají insekticidní aktivitu. Mezi insekticidy patří například aldikarb, karbofuran, karbaryl, fenobukarb a propoxur. Jejich účinek je založen na reverzibilní inaktivaci AChE. Jako herbicidy se používají ferbam, mancozeb a thiram. Mezi karbamáty, které vykazují fungicidní aktivitu se řadí butylát, molinát a pebulát. Akutní toxicita zmíněných látek je pro člověka nízká, ale mohou dráždit pokožku, oči a způsobovat kýchání a kašel. [3, 46]

Díky svému reverzibilnímu inhibičnímu účinku mají karbamáty využití jako farmakologicky aktivní sloučeniny. V přírodě vyskytující se karbamát zvaný fysostigmin je široce využíván při léčbě onemocnění myasthenia gravis. Jedná se o přírodní derivát v rostlině *Physostigma venenosum* a jeho struktura se stala předlohou pro syntetické sloučeniny, například rivastagmin a pyridostigmin, které se používají v terapii dodnes. Pyridostigmin je schopen zabránit ireverzibilní vazbě OF na AChE, proto se používá jako profylaktikum proti intoxikaci nervově paralytickými látkami. Výše zmíněný fysostigmin jako silný inhibitor AChE snižuje rychlost hydrolýzy ACh, a tím zvyšuje jeho hladinu v poškozených neurosynaptických štěrbinách. [3, 47]

3.4 Ostatní inhibitory cholinesteráz při léčbě Alzheimerovy choroby

3.4.1 Takrin

Takrin je centrálně působící reverzibilní inhibitor ChE s další farmakologickou aktivitou, jako je inhibice monoaminooxidázy, blokáda draslíkových kanálů nebo interakce s podtypy muskarinových a nikotinových receptorů. Takrin byl poprvé popsán v roce 1961 jako reverzibilní inhibitor AChE a BChE. Později v roce 1993 byl schválen jako první lék pro léčbu AD. Postupem času byl takrin stažen z trhu kvůli závažným vedlejším účinkům, jako je hepatotoxicita. Bylo zjištěno, že akridinová část takrinu se váže pouze k indolovému kruhu Trp 84 aktivního místa enzymu AChE. Pang a kolektiv v roce 1996 zavedli změny, které umožnily vazbu i na jiná vazebná místa včetně periferního anionického místa. [32, 33]

Kvůli zlepšení aktivity takrinu a eliminaci toxicity se několik výzkumných skupin zabývalo změnami v jeho struktuře, což vedlo k syntéze nových derivátů takrinu. Tyto nové deriváty lze rozdělit do tří skupin. Tou první skupinou jsou deriváty s úpravami v kruhové struktuře takrinu. Několik výzkumníků syntetizovalo řadu sloučenin, avšak účinnost byla vždy menší než u takrinu. Barreiro a kolektiv v roce 2003 navrhl a syntetizoval pyrazolový kruh, který obsahuje fenylový substituent. Marco a kolektiv syntetizoval v roce 2004 novou řadu analogů takrinu jako je naftyridin. Stejná skupina provedla i další modifikace náhradou fenylového kruhu 4 pyridylovými skupinami v poloze C2 za jiné substituenty jako je chlor a brom. Avšak jak už bylo zmíněno, účinnost syntetizovaných sloučenin byla vždy menší než u takrinu. Druhá skupina zahrnuje homo- a heterodimery takrinu nebo tzv. deriváty duálního vazebného místa. Tyto deriváty se vážou na aktivní i na periferní místa AChE a inhibují tak tvorbu amyloidu, což je prospěšné pro léčbu AD. Pang a kolektiv syntetizovali v roce 1996 homodimery dvou takrinových skupin spojených oligomethylenovými řetězci různých délek. Savini a kolektiv v roce 2001 syntetizovali homo a heterodimery tatrahydroakridinu s linkery různých látek. Bylo prokázáno, že tyto sloučeniny mají až 200x větší účinnost než takrin. Třetí skupina zahrnuje deriváty s dalšími vlastnostmi. Bylo prokázáno, že některé deriváty takrinu vykazující antioxidační vlastnosti poskytují ochranu před oxidačním poškozením zprostředkovaným β-amyloidem. To přináší výhody v prevenci u pacientů s AD. [33, 48, 49]

Takrin je rychle absorbován a vylučován játry. Vzhledem k jaterní hydroxylaci má takrin sám o sobě velmi nízkou biologickou dostupnost. Při vyšších a opakovaných dávkách se zvyšuje jeho eliminační poločas na 3,5 h. Vztah mezi dávkou a biologickou dostupností není úměrný, např. zdvojnásobení dávky může třikrát zvýšit biologickou dostupnost. Stručně řečeno charakteristikou takrinu je nelinearita dávky, rozsáhlá distribuce a rychlá eliminace díky jaterní transformaci. [50, 51]

4 METODY STANOVENÍ AKTIVITY CHOLINESTERÁZ

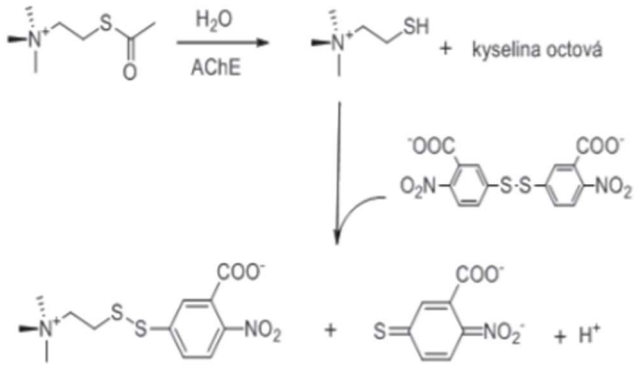
Bylo popsáno mnoho metod pro stanovení aktivity ChEs a toto stanovení se stalo důležitým nástrojem při navrhování a objevování léčiv v medicíně a toxikologii. Změny činnosti ChEs jsou spojeny s mnoha chorobami jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba, a proto je velmi důležité určit jejich aktivitu rychle, jednoduše a přesně. Metod pro stanovení aktivity ChEs je mnoho, patří mezi ně spektrofotometrické, radiometrické, na pH závislé, histochemické nebo elektrochemické metody. Nová moderní technika založená na zlatých nanočásticích významně přispěla k vývoji různých testů na aktivitu a inhibici ChEs. [52, 53]

4.1 Spektrofotometrické metody

Ačkoliv existuje mnoho metod pro stanovení aktivity ChEs, tak spektrofotometrická metoda byla a je nejpoužívanější metodou pro stanovení aktivity i inhibice ChEs. [52]

4.1.1 Ellmanova metoda

Nepochybně nejvíce používanou spektrofotometrickou metodou pro stanovení aktivity a inhibice ChEs je Ellmanova metoda. Tato metoda spočívá v reakci mezi thioly a kyselinou 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB). Produktem této reakce je žlutý iont kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB). Intenzita barvy produktu se měří při 412 nm a je přímo úměrná enzymatické aktivitě. Princip Ellmanovy metody je znázorněn na obrázku 10. [54]



Obrázek 10 Princip Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE [55]

Ellmanova metoda se označuje jako „zlatý standard“ mezi metodami. Mezi výhody patří především to, že splňuje požadované parametry jako je rychlost, jednoduchost, přesnost a nízké náklady. Metoda je citlivá díky tomu, že se měří absorbance vznikajícího produktu, a ne

ubývajícího substrátu, jako je tomu u jiných metod. K dalším výhodám patří například flexibilita, stálost pH (optimální pH pro AChE je 7,0–8,0) a měření se dá provádět i mimo laboratoř. [54]

Metoda má však i své nevýhody. Mezi ně patří například měření aktivity AChE ve vzorku plné krve, kdy reakční produkt TNB interferuje s hemoglobinem při 410 nm. Alternativou je použití kyseliny 6,6´-dithionikotinové místo DTNB. Dalším řešením, jak omezit interferenci hemoglobinu, je použití 2,2-dithiopyridinu, jehož produkt se měří při 434 nm. Při této vlnové délce je absorbance hemoglobinu snížena na 25 % ve srovnání s jeho absorbancí při 412 nm. [52, 56]

Bissbort a kolektiv navrhli novou jednoduchou kinetickou metodu pro stanovení AChE v erytrocytech. Princip využívá enzymatické redukce 2,6-dichlorfenolindofenolu. Tato látka má v oxidované formě modrou barvu a v redukované formě je látka bezbarvá. V této metodě se absorpce nezvyšuje a hodnotí se odbourávání barvy, která je sledována při 606 nm. Díky této metodě se vyřešily problémy s vysokými koncentracemi hemoglobinu, kdy absorpční hodnoty překračovaly stanovenou mez. [57]

4.1.2 Fluorimetrické metody

Fluorimetrické testy využívají sekundární záření fluorescence. Princip stanovení aktivity nebo inhibice ChEs je založený na tvorbě fluorescenčního produktu. Testy mají nižší mez detekce a poskytují až 100× vyšší citlivost než kolorimetrické metody. Fluorescenční látky jsou stabilní s vysokou intenzitou fluorescence a dlouhou životností. Jako substrát se ideálně používají nefluorescenční látky, mezi které patří indoxylacetát nebo resorufinové estery (resorufin butyrát, resorufin acetát). Tyto látky jsou hydrolyzovány ChEs na vysoce fluorescenční produkty, přičemž hydrolýza indoxylacetátu je mnohem rychlejší. Další výhodou indoxylacetátu oproti resorufinovým estrů je jeho větší stabilita vůči spontánní hydrolýze. Mezi fluorescenční substráty patří např. 7-acetoxy-l-methylchinolinium. [52, 58]

Parvari a kolektiv vyvinuli vysoce citlivý mikrofluorimetrický test pro ChEs. Thiocholin uvolněný během enzymatické reakce reaguje se sloučeninou N-[4-(7-diethylamino-4-methylkumarin-3-yl)fenyl]maleimid. Tato reakce poskytuje intenzivně modrý fluorescenční produkt s fluorescenční emisí při 473 nm. Výhodami tohoto testu jsou citlivost, nízké náklady a široký lineární rozsah přesnosti. [59, 60]

V poslední době se věnuje pozornost polovodičovým nanočásticím, tzv. kvantovým tečkám (QDs), které mají jedinečné fluorescenční vlastnosti. AChE hydrolyzuje ACh na cholin, zatímco cholinoxidáza oxiduje vzniklý cholin za vzniku betainu a peroxidu vodíku. Vzniklý

peroxid vodíku zháší fluorescenci QDs. Jestliže se zvýší koncentrace inhibitoru, tak se sníží obsah peroxidu vodíku generovaného enzymem, a proto klesne zhášení QDs. QDs se díky svým fluorescenčním vlastnostem využívají ve spojení s biosenzory. [60, 61]

4.2 Difraktometrické metody

Walker a Asher vyvinuli materiál pro snímání fotonických krystalů polymerizovaného krystalického koloidního pole. Tento materiál je schopen snímat koncentraci organofosfátů. Periodické pole koloidních částic s AChE je uloženo v hydrogelové síti s mřížkovou roztečí tak, že rozptyluje viditelné světlo. Navázání organofosfátu např. parathionu na AChE vytváří Donnanův potenciál, který způsobuje zvětšení hydrogelové sítě, což zvyšuje rozteč mřížky vloženého pole částic a způsobuje červený posun vlnové délky difrakčního světla. Velikost difrakčního červeného posunu je úměrná množství vázaného parathionu. [62]

4.3 Radiometrické metody

Radiometrická metoda umožňuje rychlé a jednoduché měření aktivity/inhibice ChE lidské krve. Mezi další výhody této metody patří přesnost a vysoká citlivost. Využívá přírodní substráty, což se liší od ostatních metod stanovení aktivity ChEs. Radiometrie má i své nevýhody, mezi které patří vysoké náklady na radioaktivně značený substrát a komplikace s manipulací s radioaktivním materiálem. Radioizotopové stanovení aktivity je založeno na acetylcholinu značeném ^{3}H nebo ^{14}C. Tyto metody jsou si velmi podobné. Liší se pouze při kvantifikaci označeného nehydrolyzovaného ACh nebo označeného uvolněného acetátu. [63, 64]

Pří využití ACh značeným ^{14}C se ACh smíchá se vzorkem hemolyzované plné krve na podložním mikroskopickém sklíčku. Po pár minutách se směs okyselí a vysuší. V těchto podmínkách je enzymaticky uvolněný radioaktivní acetát těkavý, zatímco radioaktivní nehydrolyzovaný substrát není. Ztráta radioaktivity při okyselení a sušení je proto přímým měřítkem aktivity AChE. [65]

V dnešní době byly zavedeny nové radioizotopové metody s použitím radioaktivně značených substrátů N-[14C]-methylpiperidin-4-yl-acetátu a (R)-N-[14C]-methylpiperidin-3yl butyrátu pro AChE a BChE. Tato nová metoda sleduje inhibiční vlastnosti ChEs především u chemických bojových látek, pesticidů a terapeutik. [65]

4.4 Kalorimetrické metody

Kalorimetrické stanovení využívá měření tepla samotné enzymatické reakce, zatímco ostatní současné analytické techniky měří sekundární reakci, jako je pH nebo změna barvy (samotná enzymová reakce není měřena). O´Farrell a spol. měřili pomocí kalorimetrického stanovení aktivitu ChEs v lidském séru. Pokud je sérum smícháno s ACh, tak odezva kalorimetru odpovídá sérové aktivitě ChE. [52]

4.5 Metody založené na stanovení pH

4.5.1 Michelova metoda

Michelova metoda byla poprvé popsána v roce 1949 a v dnešní době se hojně používá v praxi pro rutinní stanovení ChE. Další výhodou je cenová dostupnost a možnost využití automatických analyzátorů. Princip je založen na měření změny pH reakční směsi, která je důsledkem vzniku kyseliny octové při hydrolýze ACh. Zaznamenává se pH na začátku a na konci měření, které trvá 60 minut. Nevýhodou této metody je nízká citlivost a přesnost, protože pH je logaritmickou funkcí. Rychlá změna pH může ovlivnit měření aktivity ChEs. Tento problém byl v poslední době vyřešen novou metodou. Byla vyvinuta elektroda selektivní k ACh na bázi plastifikované polymerní membrány. Elektroda vykazuje dobrou selektivitu pro acetylcholin vůči cholinu a některým běžným iontům. [66, 67, 68]

4.5.2 Titrační stanovení

Při tomto stanovení je uvolněná kyselina octová během enzymatické hydrolýzy ACh sledována titrací pomocí roztoku standardních alkálií při konstantním pH. Ke sledování změny pH lze využít indikátor nebo potenciometr. Postup metody je jednoduchý, ale zdlouhavý a výsledky mohou být ovlivněny používanými indikátory. Rychlejší a přesnější výsledky titračního stanovení umožnilo zavedení automatického titrátoru se záznamovým zařízením. Rychlost přídavku alkalického roztoku potřebného k udržení konstantního pH je úměrná aktivitě nebo inhibici ChEs. Díky těmto automatickým pH-statům je metoda jedna z nejpřesnějších a nejpohodlnějších způsobů stanovení aktivity/inhibice cholinesteráz. Metoda má však i své nevýhody, mezi které patří nutnost používání média bez pufru a nepoužitelnost v terénu. [58, 69, 70]

4.5.3 Acholestova metoda

Metoda využívá speciální indikátorové papírky, které jsou napuštěny substrátem (ester cholinu) a indikátorem (bromthymolová modř). Vzorek krve se nanáší přímo na papírek a pozoruje se změna barvy indikátoru. Tato změna je způsobena plazmatickou cholinesterázou, která hydrolyzuje substrát v papírku za vzniku kyseliny, což má za následek změnu barvy indikátoru od tmavě modré až po žlutozelenou. Změna barvy se porovnává se srovnávacím papírkem, na kterém není přítomný žádný ester cholinu. Aktivita enzymu odpovídá rychlosti, kterou vzorek dosáhne stejného odstínu jako srovnávací papír. [52, 68, 71]

Jedná se o screeningový test, který se snadno provádí a vyžaduje minimální vybavení. Ze séra musí být odstraněny červené krvinky a nesmí dojít k hemolýze, což patří k jediné nevýhodě této metody. Speciální mikrocentrifuga, která byla vyvinuta pro tento účel, umožňuje používat metodu i mimo laboratoř. [68]

4.6 Biosenzory

Biosenzor je popsán jako kompaktní analytické zařízení, které se skládá z biologické složky a z fyzikálně-chemického převodníku. Princip této metody je založen na interakci mezi molekulou analytu a biologickou složkou, která je imobilizována na vhodném médiu. Výsledkem této reakce je vznik signálu, který je zpracován převodníkem a poté detekován. Biosenzory založené na ChE představují velmi užitečnou techniku pro analytické a klinické účely. Jsou také využívány v toxikologii, pro monitorování životního prostředí a v potravinářství. [72, 73]

Nejvýznamnější výhody biosenzorů zahrnují vysokou specifitu a citlivost, rychlou odezvu, nízké náklady, jednoduchost a miniaturizaci. Biosenzory založené na ChEs se používají v kombinaci s různými převodníky, jako je elektrochemický, který se dále dělí na potenciometrický, amperometrický, konduktometrický a voltametrický. Další převodník je optický nebo piezoelektrické. Nedávný pokrok v technologii nanosenzorů má značný význam pro budoucnost. [52]

První generací biosenzorů ChE byl amperometrický bi-enzymatický senzor, který je založen na dvou enzymech, a to na cholinesteráze a cholinoxidáze. V tomto systému AChE hydrolyzuje svůj přirozený substrát ACh na cholin a kyselinu octovou. Avšak cholin nevede elektrický proud, proto je využita cholinoxidáza, která oxiduje cholin za vzniku betainu a peroxidu vodíku. Vzniklý peroxid vodíku je detekován na platinové pracovní elektrodě. [58]

Druhá generace mono-enzymatických senzorů využívá jako substrát thiocholin, který je nespecifický. Thiocholin uvolňovaný během enzymatické reakce je snadno oxidovatelný na pracovní platinové elektrodě na dithioformu, která je přímo amperometricky detekována. [58]

4.6.1 Elektrochemické biosenzory

Elektrochemické biosenzory jsou jednou z nejpoužívanějších technik při stanovení aktivity/inhibice ChEs. Princip spočívá ve změně elektrických vlastností roztoku. To je způsobeno přibýváním nebo ubýváním iontů či elektronů, které vznikají nebo se spotřebovávají v průběhu chemické reakce. Elektrochemické senzory dělíme podle měřitelné vlastnosti na potenciometrické, amperometrické a konduktometrické. Cholinesterázové elektrochemické biosenzory jsou rozděleny do dvou skupin, a to mono-enzymatické, kde se používá jako biologický rozpoznávací prvek pouze ChE a bi-enzymatické, ve kterém je ChE spojena s cholinoxidázou. [74, 75]

Jak bylo řečeno, elektrochemický biosenzor se skládá z imobilizovaného enzymu na povrchu měniče a z převodníku. Mezi nejpoužívanější techniky imobilizace patří adsorpce, zachycení, kovalentní vazby, zesítění nebo afinitní interakce. Testují se i nedávno zavedené nové metody nanomateriálů, jako jsou vodivé polymerní nanodráty, uhlíkové nanotrubice nebo nanočástice. Studie ukázaly, že metody imobilizace představují důležitý parametr, který ovlivňuje citlivost, selektivitu a stabilitu. [76]

Elektrochemické biosenzory představují jednu z nejrozšířenějších detekčních technik, které mají potenciál nahradit klasické metody analýzy, a to díky miniaturizaci a jednoduchosti. [58]

Amperometrické biosenzory jsou založeny na měření proudu, který je výsledkem elektrochemické oxidace nebo redukce elektroaktivních látek při konstantním potenciálu, který je vložen na pracovní elektrodu. Na detekci rychlosti změny pH média jsou založeny potenciometrické biosenzory. Okyselení média lze dosáhnout přidáním přírodního substrátu (acetylcholin), což vede k uvolnění kyseliny octové. Konduktometrické biosenzory využívají změnu vodivosti, kterou způsobují vodíkové ionty vzniklé enzymatickou reakcí. Výhodou těchto senzorů je možnost miniaturizace a není vyžadována referenční elektroda. Hlavní nevýhodou je jejich relativně nižší citlivost ve srovnání s amperometrickými a potenciometrickými biosenzory. [52, 74]

4.6.2 Optické biosenzory

Optické biosenzory využívají produkci kyseliny octové, která vede ke snížení pH. Tento pokles pH lze převést na opticky měřitelný signál imobilizovaným indikátorem pH. Senzory využívají spektrofotometrické, kolorimetrické i fluorimetrické detekce. V případě poruchy detektoru lze průběh reakce pozorovat pouhým okem oproti biosenzorům elektrochemickým, což patří mezi výhody. Jako nevýhoda optických biosenzorů se udává nebezpečí interference barevných sloučenin, jako je hemoglobin nebo potravinářská barviva. Bylo popsáno mnoho různých optických biosenzorů pro detekci pesticidů nebo neurotransmiterů. Andreou a kolektiv vyvinuli pro použití v terénu biosenzor z optických vláken pro stanovení pesticidů. Ren a kolektiv vyvinuli fluorescenční biosenzor pro kvantitativní analýzu AChE založený na uhlíkových kvantových tečkách. Tento senzor je využíván při detekci cholinu, acetylcholinu a při detekci aktivity acetylcholinesterázy a cholinoxidázy. [74, 77]

4.6.3 Piezoelektrické biosenzory

Piezoelektrické biosenzory využívají křemenné mikrovážky (QCM). Tyto biosenzory jsou založené na měření celkové hmotnosti chemické látky, která je vázaná na mikrovážkách. QCM jsou piezoelektrická zařízení vyrobená z tenké desky z křemene se zlatými elektrodami připevněnými na každé straně desky. Jsou citlivější na látky s vysokou molekulární hmotností než pro nízkomolekulární látky, avšak některá zařízení QCM jsou dostatečně citlivá k určení vazby substrátu nebo inhibitoru s nižší molekulovou hmotností než 1 kDa. Citlivost senzoru QCM lze zvýšit využitím srážek produktů enzymatické reakce ke zvýšení hromadění hmoty. [77, 78]

Abad a kolektiv popsali biosenzor pro stanovení organofosforových i karbamátových pesticidů na základě měření inhibičních účinků těchto sloučenin na aktivitu AChE. Jako substrát použili 3-indolyl-acetát a detekovali vzniklý nerozpustný produkt indigového pigmentu. Rychlost a rozsah enzymatické reakce sledovali měřením frekvenčních změn spojených se změnami hmotnosti na povrchu QCM vyvolanými produktem enzymatické reakce. [52, 78]

Alfonta a kolektiv popsali sestavu skládající se ze tří enzymů (křenová peroxidáza, cholinoxidáza a acetylcholinesteráza). Stanovení bylo založeno na křenovou peroxidázou zprostředkované oxidaci 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu pomocí peroxidu vodíku a tvorbě nerozpustného produktu na převodníku. Množství vytvořeného peroxidu vodíku a nerozpustného produktu koreluje s koncentrací ACh ve vzorku. [78]

4.7 Mikročipy

Princip mikročipové techniky spočívá v tom, že jsou všechny reagencie (roztok inhibitoru, substrátu, enzymu a derivatizační činidlo) smíchány v mikročipových kanálech pomocí počítačem řízeného elektrokinetického transportu. Vzniklý thiocholin uvolněný během hydrolýzy katalyzované AChE reaguje s kumarinylfenylmaleimidem za vzniku thioetheru, který je detekován laserem indukovanou fluorescencí. Detekovaný fluorescenční signál je snižován díky inhibitorům. Výhodou čipů je, že měří několik milimetrů čtverečných a umožňují mnoho funkcí s extrémně malými objemy roztoků. [79]

5 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo stanovit optimální podmínky pro měření inhibiční účinnosti. Byly testovány různé reakční podmínky s použitím 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu. Nejprve byla stanovena vhodná koncentrace substrátu a aktivita enzymu v reakční směsi tak, aby stoupání saturační křivky bylo lineární, tzv. aby byla dostatečná odezva. Dále bylo provedeno stanovení IC_{50} u jednotlivých vzorků a standardů, a to s použitím acetylthiocholinu a 2,6-dichlorindofenol acetátu jako substrátu. Poslední část této diplomové práce je věnována stanovení rozdělovacího koeficientu a polární povrchové plochy molekuly.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1 Použité chemikálie, roztoky, přístroje a pomůcky

2,6-dichlorindofenol sodná sůl hydrát (Sigma-Aldrich)

Acetanhydrid čistý (Penta)

Demineralizovaná voda

Diethylether p. a. (Penta)

***n*-hexan** p.a. (Penta)

Síran sodný bezv. p. a. (LachNer)

Ellmanovo činidlo (DTNB) (Sigma-Aldrich)

5×10^{-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 KH_2PO_4, 1,45 g $Na_2HPO_4.12H_2O$, 0,1 g KCl do 500 ml demineralizované 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

1×10^{-3} M roztok ATCh v PBS – substrát pro stanovení IC_{50} a typu inhibice

Acetylcholinesteráza z paúhoře elektrického (Sigma-Aldrich)

AChE rozpuštěná v 0,1 M PBS

2,6-dichlorindofenol acetát (IFA)

3×10^{-2} M 2,6-dichlorindofenol acetát rozpuštěný v 96% etanolu

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta)

Etanol 96% (LachNer)

Inhibitory (Tab. 1) rozpuštěné v DMSO na koncentraci 1×10^{-2} M

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

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^{-2} M

Donepezil (Sigma-Aldrich)

donepezil hydrochlorid rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci 1×10^{-2} M

Přístroje a pomůcky

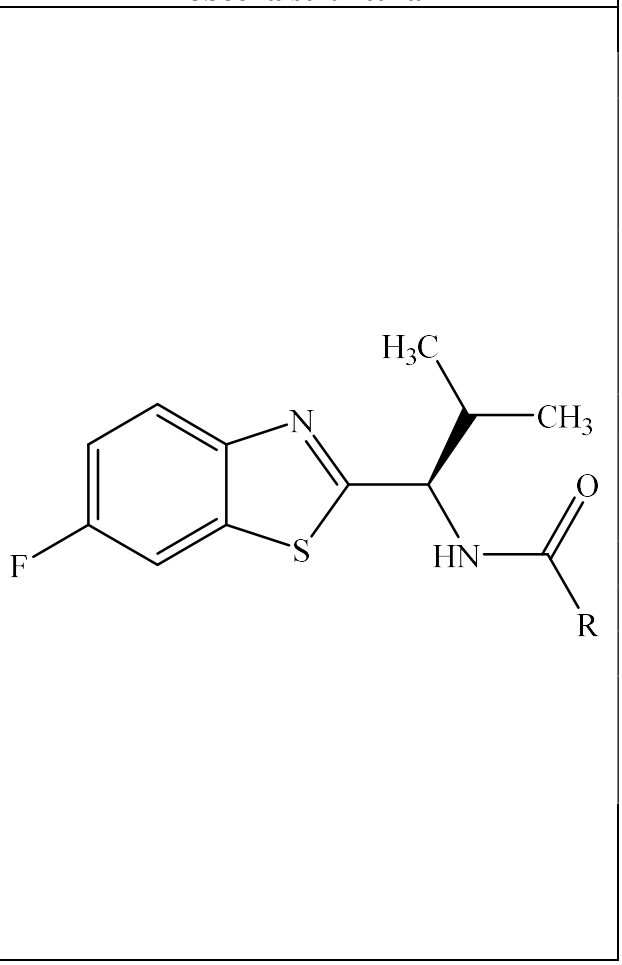
Spektrofotometr Agilent 8453

pH metr HI3220 Hanna Instruments

pipety Eppendorf a Sartorius

PMMA semimikrokyvety Plastibrand

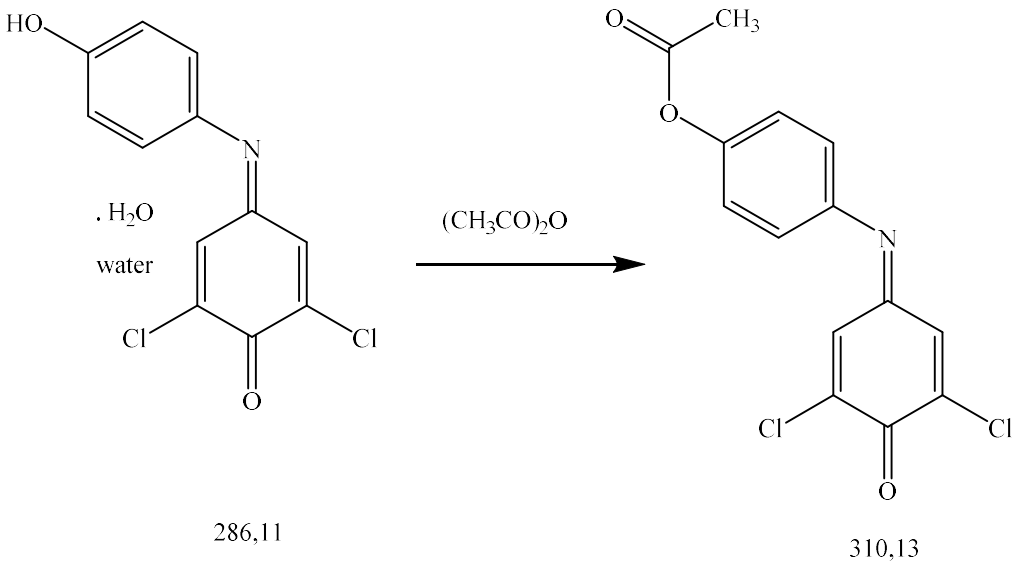
Tabulka 1 Přehled testovaných inhibitorů

označení	R	obecná struktura
1	$-CH_3$	
2	$-CH_2-CH_3$	
3	$-CH(CH_3)_2$	
4	$-C(CH_3)_3$	
5	$-CH=CH_2$	
6	$-C(CH_3)=CH_2$	
7	$-CH_2-O-CH_3$	
8	$-CH_2-Br$	
9	$-CH_2-Cl$	
10	$-CHCl_2$	
11	$-CBrF_2$	

6.2 Syntéza 2,6-dichlorindofenol acetátu

Do 50 ml baňky bylo předloženo 5 g (0,017 mol) 2,6-dichlorindofenol sodná sůl hydrátu a 10 g (0,1 mol) acetanhydridu. Reakční směs byla míchána 2 hodiny. Poté byla reakční směs vylita na 50 g ledové drtě. Reakční směs byla hodinu míchána a dále stála bez míchání další tři hodiny. Následně byla z reakční směsi odlita veškerá voda. Vyloučený surový produkt byl sušen stáním na vzduchu do druhého dne. Následně byl vyextrahován 5×40 ml etheru. Etherická vrstva byla dále vysušena stáním nad bezvodým síranem sodným. Z vysušeného etherického roztoku bylo oddestilováno cca 150 ml etheru. K destilačnímu zbytku bylo přilito 40 ml

n-hexanu. Během hodiny došlo k vysrážení pevné látky, která byla odfiltrována přes skládaný filtr. Filtrát byl 48h chlazen při teplotě 4 °C (v chladničce). Vyloučený tmavě červený produkt byl odfiltrován na fritě a byl sušen na vzduchu. Bylo připraveno 1,2 g (23 %). Na obr. 11 je uvedeno reakční schéma přípravy 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)amino)fenyl acetátu.



Obrázek 11 Reakční schéma přípravy 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)amino)fenyl acetátu

6.3 Charakterizace 2,6-dichlorindofenol acetátu

- **Bod tání**

Teplota tání byla stanovena pomocí bodotávku Büchi Melting Point B-540. Tento přístroj umožňoval sledovat průběh tání skrz zvětšovací sklo.

- **NMR spektroskopie**

NMR spektra byla měřena v hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K přístrojem BrukerAvance 400 MHz v pulzním módu s Fourierovou transformací. Spektra byla měřena v 5 mm širokopásmové laditelné sondě. Při měření byly u ^{1}H spekter použity frekvence 400,13 MHz, u ^{13}C spektra pak 100,62 MHz, a u ^{19}F spektra 376,46 MHz. Všechna zmíněná NMR spektra byla měřena standardně. Hodnoty ^{1}H a ^{13}C chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ($\delta(^{1}H)$ = 2,5 ppm ($\delta(^{13}C)$ = 39,5 ppm (DMSO) a přepočteny do δ-stupnice.

- **Elementární analýza**

Elementární analýza byla provedena na přístroji FLASH 2000 CHNS Organic elemental analyser.

6.4 Stanovení aktivity acetylcholinesterázy

Stanovení aktivity AChE bylo prováděno pomocí Ellmanovy metody. Princip tohoto stanovení je podrobněji popsán v kapitole 4.1.1.

Při vlnové délce 412 nm byla měřena změna absorbance A v čase t v intervalech po 3 s. Celková doba měření byla 70 s. Ze získaných hodnot byla do grafu vynesena závislost absorbance na čase a pomocí rovnice regrese byla vypočítána aktivita enzymu. Pro hodnotu t bylo dosazeno číslo 60 a výsledná hodnota absorbance byla vynásobena číslem 17,67. Tento přepočítávací faktor (17,67) zahrnuje:

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

Nejdříve byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank, jehož celkový objem byl 2 ml a obsahoval:

- 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).

Jako další vzorky byly proměřeny roztoky pro stanovení aktivity AChE. Celkový objem činil 2 ml a reakční směsi obsahovaly:

- 1,184 ml PBS (0,1 M, pH 7,4),
- 0,8 ml DTNB (5×10^{-4} M),
- 0,008 ml ATCh (0,1 M),
- 0,008 ml AChE.

V okamžiku, kdy se smíchá enzym se substrátem, dochází k zahájení reakce. Proto bylo nutné přidávat enzym jako poslední, aby nedošlo ke špatným výsledkům předčasným smícháním. Takovéto stanovení aktivity bylo u každého vzorku provedeno až třikrát. Výsledné hodnoty aktivit byly zprůměrovány a konečná hodnota byla vzata v úvahu při dalších měřeních. Postup stanovení aktivity byl prováděn vždy ráno před začátkem měření.

6.5 Stanovení závislosti rychlosti reakce na koncentraci 2,6-dichlorindofenol acetátu

Před každým vlastním měřením byla nejdříve stanovena aktivita AChE, jejíž postup je uveden v kapitole 6.4. Průměr stanovených aktivit byl přepočítán, aby dávkovaný objem odpovídal zvoleným aktivitám enzymu buď 0,2; 0,5 nebo 1 U/ml v reakční směsi.

Jako první byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank, jehož celkový objem byl 1 ml a obsahoval:

- množství 3×10^{-2} M substrátu rozpuštěného v 96% etanolu, aby koncentrace IFA ve výsledné reakční směsi byla v rozmezí $1{,}5\times10^{-4}$ – 1×10^{-3} M,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 1 ml.

Dále byly připraveny roztoky s rostoucí koncentrací IFA jako substrátu, jejichž objem byl 1 ml:

- objem AChE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- množství 3×10^{-2} M substrátu rozpuštěného v 96% etanolu, aby koncentrace IFA ve výsledné reakční směsi byla v rozmezí $1{,}5\times10^{-4}$ – 1×10^{-3} M,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 1 ml.

Reakce byla odstartována přidáním substrátu k ostatním složkám směsi. Při vlnové délce 606 nm byla měřena změna absorbance A v čase t v intervalech po 60 s, přičemž celková doba měření byla 1800 s. [80]

Pro každou danou koncentraci substrátu a enzymu bylo měření provedeno minimálně dvakrát. Ze získaných hodnot byla vypočítána rychlost reakce $v = \Delta A/\Delta t$ a do grafu byla vynesena závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při dané koncentraci AChE (tj. 0,2; 0,5 a 1 U/ml) v reakční směsi.

6.6 Stanovení IC_{50}

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

Pro stanovení hodnoty IC_{50} daných 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]. Platí, že pro všechny typy uni-uni enzymatických inhibovaných reakcí (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšená) je závislost přímková s úsekem rovným 1. Proto teoreticky stačí na odhad jejího průběhu pouze jeden experimentálně

stanovený poměr v_0/v_i pro danou koncentraci [I]. Z takto získané přímky, procházející body (0; 1) a (v_0/v_i; [I]), lze z rovnice regrese po dosazení za hodnotu $v_0/v_i = 2$ vypočítat IC_{50}, což vyplývá z její definice.

6.6.1 Postup stanovení IC_{50} s acetylthiocholinem jako substrátem

Stanovení hodnoty IC_{50} jednotlivých inhibitorů bylo provedeno opět Ellmanovou metodou, jejíž princip je popsán v kapitole 4.1.1.

Nejdříve byl přepočítán objem přidávaného enzymu ze získaných výsledků z předchozích měření aktivit a to tak, aby celková reakční směs měla objem 2 ml a aktivita AChE byla 0,2 U. Objem přidávaného enzymu byl spočítán podle rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Jako první byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank, jehož celkový objem byl 2 ml a obsahoval:

- 1,52 ml PBS (0,1 M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB (5×10^{-4} M),
- 0,08 ml ATCh (1×10^{-3} M).

Pro získání rychlosti neinhibované reakce v_0 byly proměřeny vzorky bez inhibitoru smícháním:

- 0,4 ml DTNB (5×10^{-4} M),
- 0,08 ml ATCh (1×10^{-3} M),
- objem AChE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Závislost absorbance na čase při vlnové délce 412 nm byla měřena třikrát. V okamžiku, kdy se smíchá enzym se substrátem, dochází k zahájení reakce. Proto bylo nutné přidávat enzym jako poslední, aby nedošlo ke špatným výsledkům předčasným smícháním.

Dále byly pro měření inhibovaných reakcí připraveny vzorky, které obsahovaly navíc inhibitor, jehož koncentrace byla zvolena tak, aby poměr v_0/v_i byl vyšší než 1. Výsledná reakční směs o objemu 2 ml obsahovala:

- 0,4 ml DTNB (5×10^{-4} M),
- 0,08 ml ATCh (1×10^{-3} M),
- objem AChE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- množství inhibitoru volené tak, aby bylo dosaženo uvedených koncentrací v reakční směsi,

- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 2 ml.

Opět byl enzym přidáván jako poslední, aby nedošlo ke zkreslení výsledků předčasným smícháním.

Při vlnové délce 412 nm byla měřena změna absorbance A v čase t v intervalech po 3 s. Celková doba měření byla 70 s. Pro každou danou koncentraci inhibitoru bylo měření provedeno minimálně dvakrát. Ze získaných hodnot byla vypočítána rychlost reakce $v = \Delta A/\Delta t$, do grafu byla vynesena závislost v_0/v_i na koncentraci inhibitoru [I] a pomocí rovnice regrese byla vypočítána hodnota IC_{50}.

6.6.2 Postup stanovení IC_{50} s 2,6-dichlorindofenol acetátem jako substrátem

Před každým vlastním měřením byla stanovena aktuální aktivita AChE. Pipetovaná hodnota enzymu byla přepočítána tak, aby výsledný objem reakční směsi byl 1 ml a odpovídal zvolené aktivitě 0,5 U/ml. Objem přidávaného enzymu byl spočítán podle rovnice:

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

Nejdříve byl proměřen slepý vzorek, tzv. blank, jehož celkový objem byl 1 ml a obsahoval:

- 15 µl 3×10^{-2} M substrátu rozpuštěného v 96% etanolu,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 1 ml.

Poté byly proměřeny vzorky bez inhibitoru pro získání rychlosti neinhibované reakce v_0 smícháním:

- 15 µl 3×10^{-2} M substrátu rozpuštěného v 96% etanolu,
- objem AChE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 1 ml.

Roztoky použité pro měření inhibovaných reakcí obsahovaly navíc inhibitor, jehož koncentrace byla zvolena tak, aby poměr v_0/v_i byl vyšší než 1. Celková reakční směs 1 ml obsahovala:

- objem AChE vypočítaný dle aktuální aktivity,
- 15 µl 3×10^{-2} M substrátu rozpuštěného v 96% etanolu,
- množství inhibitoru volené tak, aby bylo dosaženo uvedených koncentrací v reakční směsi,
- objem PBS dopočítaný do celkového objemu 1 ml.

Reakce byla zahájena přidáním enzymu se substrátem k ostatním složkách směsi. Při vlnové délce 606 nm byla měřena změna absorbance A v čase t v intervalech po 60 s, přičemž celková doba měření byla 1200 s. Pro každou danou koncentraci inhibitoru bylo měření provedeno minimálně dvakrát. Ze získaných hodnot byla vypočítána rychlost reakce $v = \Delta A/\Delta t$, do grafu byla vynesena závislost v_0/v_i na koncentraci inhibitoru [I] a pomocí rovnice regrese byla vypočítána hodnota IC_{50}.

6.7 Stanovení typu inhibice

U vzorku inhibitoru číslo **1** byl určován typ inhibice stejným způsobem jako stanovení IC_{50}, jehož postup je uveden v kapitole 6.6.1. Pro určení typu inhibice byly použity čtyři různé koncentrace substrátu acetylthiocholinu, a to 2×10^{-5}, 4×10^{-5}, 6×10^{-5} a 8×10^{-5} M. Zároveň při každé koncentraci substrátu byly testovány čtyři různé koncentrace inhibitoru, a to 0, 5×10^{-6}, 1×10^{-5}, $2{,}5\times10^{-5}$ M. Poté byl sestrojen graf závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti 1/v na převrácené hodnotě koncentrace substrátu, tedy graf podle Lineweavera a Burka. Z grafu byla následně vypočtena Michaelisova konstanta (K_M) a mezní rychlost (V_m) a byl určen typ inhibice.

7 VÝSLEDKY

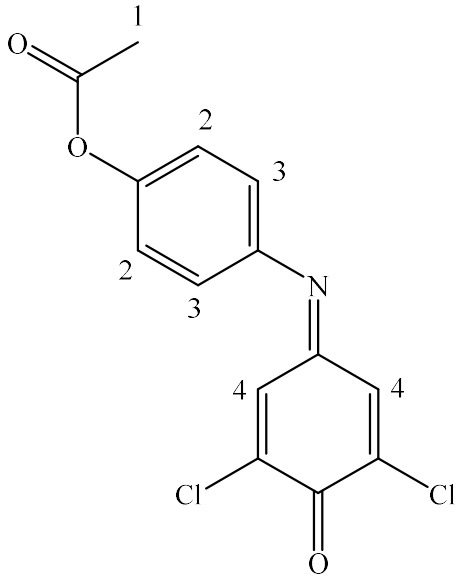
7.1 Syntéza 2,6-dichlorindofenol acetátu

V rámci této diplomové práce byl připraven 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden) amino)fenylacetát, který byl dále použit jako substrát pro AChE. Tento substrát byl použit pro sledování neinhibovaných i inhibovaných reakcí katalyzovaných AChE. Jako inhibitory byly použity standardní sloučeniny (rivastigmin, galantamin, donepezil) a vybrané sulfonamidové deriváty.

4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden) amino)fenyl acetát byl syntetizován reakcí 2,6-dichlorindofenolátu sodného s acetanhydridem. Sodná fenolická sůl do reakce vstupovala ve formě hydrátu. Acetanhydrid byl v reakční směsi použit jednak jako acetylační činidlo a také jako rozpouštědlo. Tmavě zelený fenolát sodný ihned po přídavku acetanhydridu přešel na tmavě červený acetylovaný derivát. Reakční směs byla 2 hodiny míchána při laboratorní teplotě a následně byla nalita na drcený led a byla míchána další hodinu. Tím došlo v reakční směsi k hydrolýze nadbytečného acetanhydridu za vzniku kyseliny octové, která je dobře rozpustná ve vodě. Reakční směs byla dále ponechána bez míchání další 3 hodiny. Během této doby došlo k usazení ve vodě nerozpustného produktu. Vodná vrstva byla oddělena, čímž byla z produktu odstraněna kyselina octová. Sediment byl sušen stáním na vzduchu. Dále byl ze sedimentu extrahován produkt diethyletherem. Extrakt byl vysušen stáním nad bezvodým síranem sodným. Následně bylo z extraktu atmosféricky oddestilováno cca 80 % diethyletheru. K destilátu byl přidán *n*-hexan v takovém množství, až se viditelně začala srážet pevná látka. Po hodinovém stání byla reakční směs přefiltrována přes skládací filtr, čímž byly z produktu odstraněny další nečistoty. Filtrát byl umístěn na 48 hodin do chladničky, kde došlo ke krystalizaci. Vyloučený produkt byl izolován filtrací, byl promyt *n*-hexanem a byl sušen stáním na vzduchu. Produkt byl připraven v 23% výtěžku. Připravený produkt byl charakterizován stanovením bodu tání a NMR analýzou. Čistota produktů byla ověřena pomocí elementární analýzy.

7.2 Charakterizace 2,6-dichlorindofenol acetátu

Na obr. 12 je uveden strukturní vzorec syntetizovaného substrátu pro AChE, tj. 2,6-dichlorindofenol acetátu.



Obrázek 12 4-((3,5-dichlor-4-oxocyklohexa-2,5-dien-1-yliden)amino)fenyl acetát

Vzhled: tmavě červená krystalická látka

Výtěžek: 23 %

Bod tání: 101 – 102 °C

^{1}H NMR (400.13 MHz, methanol-d$_4$): δ = 7,49 (1H, d, ^{4}J = 2,5 Hz, H4); 7,29 (1H, d, ^{4}J = 2,5 Hz, H5); 7,11 (2H, d, ^{3}J = 9,0 Hz, H3); 6,90 (2H, ^{3}J = 9,0 Hz H2); 2,19 (3H, s, H1).

^{13}C NMR (100.62 MHz, methanol-d$_4$): δ = 216,0; 170,0; 150,0; 146,9; 140,0; 138,7; 137,5; 125,6; 122,6; 122,2; 19,7.

Elementární analýza: $C_{17}H_{20}N_2O_3S$ (Mr = 310,13)

Vypočteno: C (54,22%), H (2,93%), N (4,52%)

Stanoveno: C (54,45%), H (2,82%), N (4,78%)

7.3 Stanovení závislosti rychlosti reakce na koncentraci 2,6-dichlorindofenol acetátu

7.3.1 Stanovení reakční rychlosti

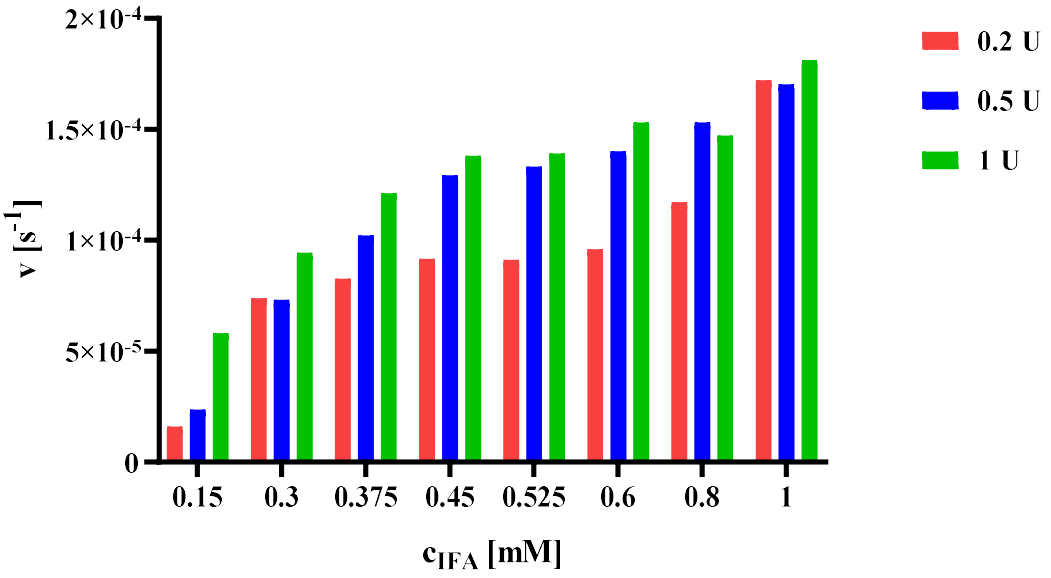
Postup stanovení rychlosti saturace enzymu 2,6-dichlorindofenol acetátem je uveden v kapitole 6.5. Toto stanovení bylo provedeno ke zjištění vhodné aktivity enzymu a koncentrace substrátu. Reakční rychlost byla spočítána pro každou kombinaci dané koncentrace substrátu a aktivity AChE v reakční směsi. Níže je uveden vzorový výpočet pro koncentraci IFA $3{,}75\times10^{-4}$ M a aktivitu AChE 0,5 U:

$$v = \frac{(A_{1092,1} - A_{132,2})}{\Delta t}$$

$$v = \frac{(0{,}349 - 0{,}241)}{959{,}9}$$

$$v = 1{,}12.10^{-4}\ s^{-1}$$

Hodnoty $A_{1092,1}$ a $A_{132,2}$ odpovídají hodnotám absorbance v čase 1092,1 a 132,2 s, Δt označuje čas 959,9 s a odpovídá rozdílu časů, při kterých byly odečteny hodnoty absorbance. Pro všechny aktivity enzymu, tj. 0,2; 0,5 a 1 U byla vytvořena saturační křivka z průměrných hodnot reakčních rychlostí všech měření k dané koncentraci substrátu. Saturační křivka (obr. 13) znázorňuje závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu IFA.

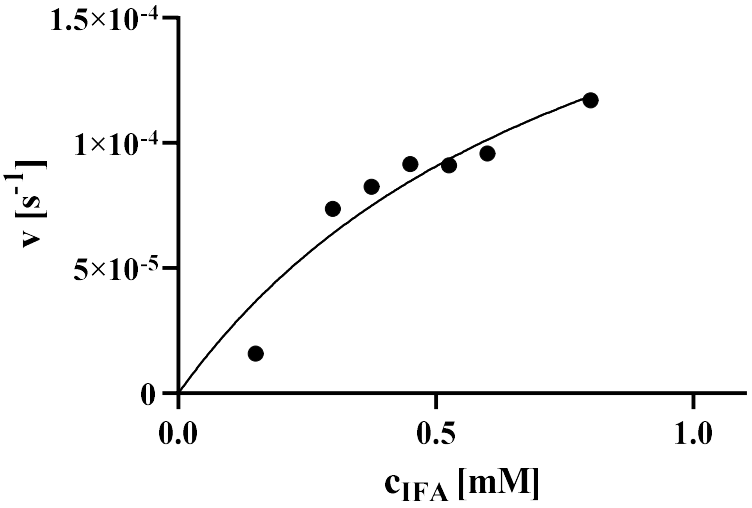


Obrázek 13 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu pro aktivity AChE 0,2; 0,5 a 1 U (průměr alespoň ze dvou měření)

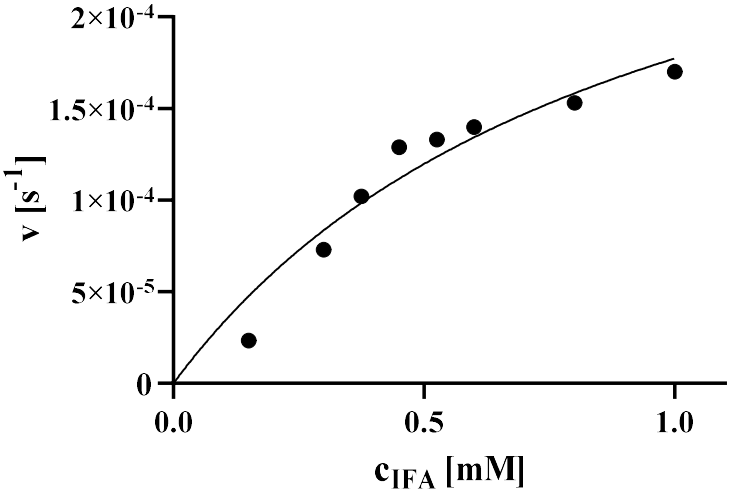
Pro stanovení IC_{50} testovaných inhibitorů byla na základě získaných výsledků zvolena koncentrace substrátu $4{,}5\times10^{-4}$ M a aktivita enzymu 0,5 U.

7.3.2 Stanovení kinetických parametrů

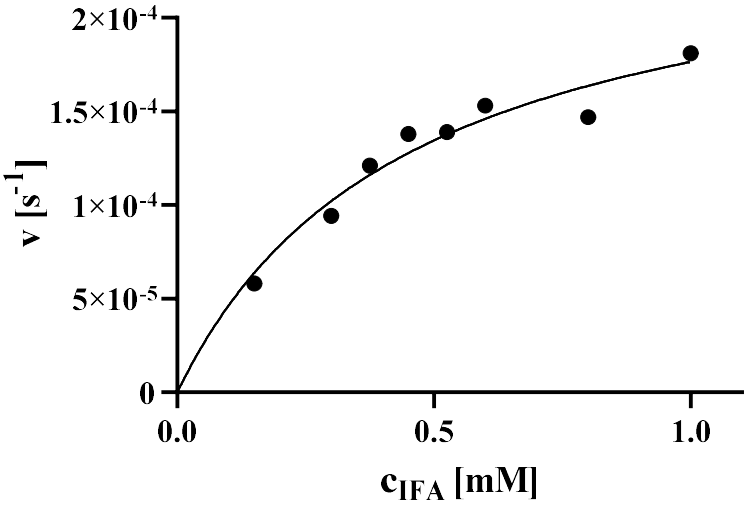
Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu pro danou aktivitu AChE (obr. 14, 15, 16) byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism (verze 8.0.1). Byl zvolen model nelineární regrese a ověřena platnost modelu Michaelis-Mentenové. Touto analýzou byly získány hodnoty K_M a V_m. Mezní rychlost (V_m) je taková rychlost, při které dochází k přeměně substrátu na produkt maximální rychlostí. Michealisova konstanta (K_M) je taková koncentrace substrátu, při níž je dosaženo poloviny mezní rychlosti.



Obrázek 14 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 0,2 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Obrázek 15 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 0,5 U (průměr alespoň ze dvou měření)



Obrázek 16 Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu při aktivitě AChE 1 U (průměr alespoň ze dvou měření)

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

Tabulka 2 Hodnoty kinetických parametrů K_M a Vm

aktivita AChE	**0,2 U**	**0,5 U**	**1 U**
K_M (mol/l)	$8{,}51\times10^{-4}$	$9{,}26\times10^{-4}$	$4{,}53\times10^{-4}$
V_m (s^{-1})	$2{,}45\times10^{-4}$	$3{,}42\times10^{-4}$	$2{,}56\times10^{-4}$

Z výše uvedených hodnot je zřejmé, že nejvyšších hodnot K_M a V_m je dosaženo u aktivity enzymu 0,5 U, proto se tato aktivita jeví jako optimální pro použití IFA jako substrátu.

7.4 Stanovení IC_{50} s acetylthiocholinem jako substrátem

Pomocí Ellmanovy metody bylo provedeno stanovení inhibiční aktivity standardů **rivastigminu**, **galantaminu** a **donepezilu** a inhibitorů **1–11**. Byla spočítána reakční rychlost pro každou koncentraci inhibitoru (včetně nulové). Vzorový příklad výpočtu pro koncentraci inhibitoru 5×10^{-6} M je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{23} - A_8)}{\Delta t}$$

$$v = \frac{(0{,}332 - 0{,}152)}{15}$$

$$v = 1{,}2.\,10^{-2}\ s^{-1}$$

Hodnoty A_{23} a A_8 odpovídají hodnotám absorbance v čase 23 a 8 s, Δt označuje čas 15 s a odpovídá rozdílu časů, při kterých byly odečteny hodnoty absorbance. Z hodnot všech rychlostí byly vytvořeny poměry v_0/v_i a následně byly hodnoty poměrů rychlostí při dané koncentraci inhibitoru zprůměrovány. Tyto průměrné hodnoty byly použity k vytvoření grafu závislosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru. Z rovnice regrese byly následně po dosazení za y = 2 vypočítány hodnoty IC_{50}. Vzorový příklad výpočtu pro vzorek inhibitoru **1** je uveden níže (rovnice přímky: y = 0,03576x + 0,9966):

$$y = 0{,}03576x + 0{,}9966$$

$$2 = 0{,}03576x + 0{,}9966$$

$$x = \frac{2 - 0{,}9966}{0{,}03576}$$

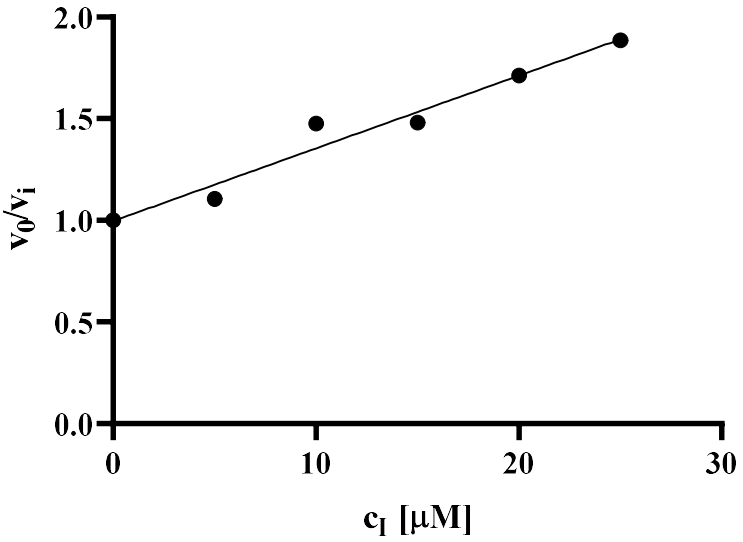
$$x = 28{,}059\ \mu M$$

V tabulce 3 jsou uvedeny vypočtené hodnoty IC_{50} včetně hodnot směrodatné odchylky pro všechny použité standardy a nové inhibitory.

Tabulka 3 Hodnoty IC_{50} testovaných inhibitorů stanovené Ellmanovou metodou

látka	**IC_{50} (μM)**
rivastigmin	56,1±1,41
galantamin	1,20±0,01
donepezil	0,0186±0,0011
1	28,07±0.34
2	111,95±6,93
3	84,53±0,84
4	155,44±13,26
5	94,43±10,03
6	96,62±2,98
7	69,54±5,15
8	30,84±0,93
9	214,87±11,65
10	155,93±6,78
11	64,55±1,10

Grafický příklad závislosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru je uveden na obr. 17.



*Obrázek 17 Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované a inhibované na koncentraci inhibitoru **1** s použitím substrátu ATCh (průměr alespoň ze dvou měření)*

7.5 Stanovení IC_{50} s 2,6-dichlorindofenol acetátem jako substrátem

Bylo provedeno stanovení inhibiční aktivity standardů **rivastigminu**, **galantaminu** a **donepezilu** a inhibitorů **1–11** s aktivitou enzymu 0,5 U/ml. Tato aktivita byla zvolena na základě výsledků rychlosti saturace enzymu 2,6-dichlorindofenol acetátu (viz kapitola 7.1). Byla spočítána reakční rychlost pro každou koncentraci inhibitoru (včetně nulové). Vzorový příklad výpočtu pro koncentrace inhibitoru 5×10^{-5} M je uveden níže:

$$v = \frac{(A_{1092,1} - A_{132,2})}{\Delta t}$$

$$v = \frac{(0{,}098 - 0{,}007)}{959{,}9}$$

$$v = 9{,}49.10^{-5}\ s^{-1}$$

Hodnoty $A_{1092,1}$ a $A_{132,2}$ odpovídají hodnotám absorbance v čase 1092,1 a 132,2 s, Δt označuje čas 959,9 s a odpovídá rozdílu časů, při kterých byly odečteny hodnoty absorbance. Z hodnot všech rychlostí byly vytvořeny poměry v_0/v_i a následně byly hodnoty poměrů rychlostí při dané koncentraci inhibitoru zprůměrovány. Tyto průměrné hodnoty byly použity k vytvoření grafu závislosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru. Z rovnice regrese byly následně po dosazení za y = 2 vypočítány hodnoty IC_{50}. Níže je uveden vzorový příklad výpočtu pro vzorek inhibitoru **7** (rovnice přímky: y = 0,01155x + 0,9761):

$$y = 0{,}01155x + 0{,}9761$$

$$2 = 0{,}01155x + 0{,}9761$$

$$x = \frac{2 - 0{,}9761}{0{,}01155}$$

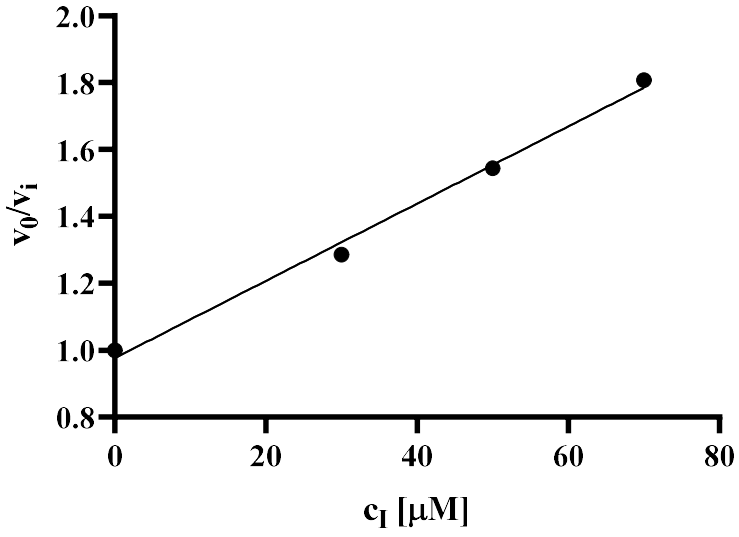
$$x = 88{,}65\ \mu M$$

V tabulce 4 jsou uvedeny vypočtené hodnoty IC_{50} včetně hodnot směrodatné odchylky pro všechny použité standardy a nové inhibitory.

Tabulka 4 Hodnoty IC_{50} testovaných inhibitorů stanovené s IFA jako substrátem

látka	**IC_{50} (μM)**
rivastigmin	183,38±1,94
galantamin	1,12±0,02
donepezil	0,17±0,001
1	153,61±18,94
2	158,60±0,06
3	88,97±0,39
4	365,84±1,16
5	113,98±4,40
6	384,79±13,09
7	88,47±2,50
8	100,48±3,98
9	259,10±3,53
10	326,77±14,08
11	305,02±29,06

Grafická závislost poměru v_0/v_i na koncentraci inhibitoru je znázorněna na obr. 18.



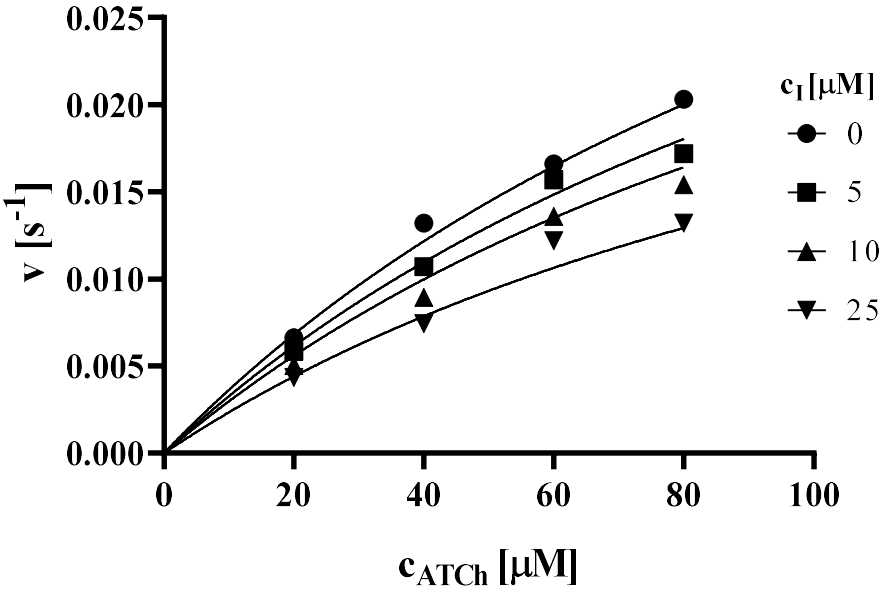
Obrázek 18 Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované a inhibované na koncentraci inhibitoru 7 s použitím substrátu IFA (průměr alespoň ze dvou měření)

Je známo, že čím je hodnota IC_{50} nižší, tím je inhibitor silnější. Podle výsledků je za daných reakčních podmínek nejúčinnější inhibitor **7**, jehož grafická závislost poměru v_0/v_i na koncentraci inhibitoru je znázorněna na obrázku 16. Vzorek inhibitoru **3** a **8** můžeme také považovat za středně účinné inhibitory. Na druhou stranu vzorek inhibitoru **6** má nejnižší inhibiční aktivitu. Hodnoty IC_{50} jsou s použitím IFA jako substrátu vyšší než v porovnání se stanovením inhibiční aktivity Ellmanovou metodou s acetylthiocholinem.

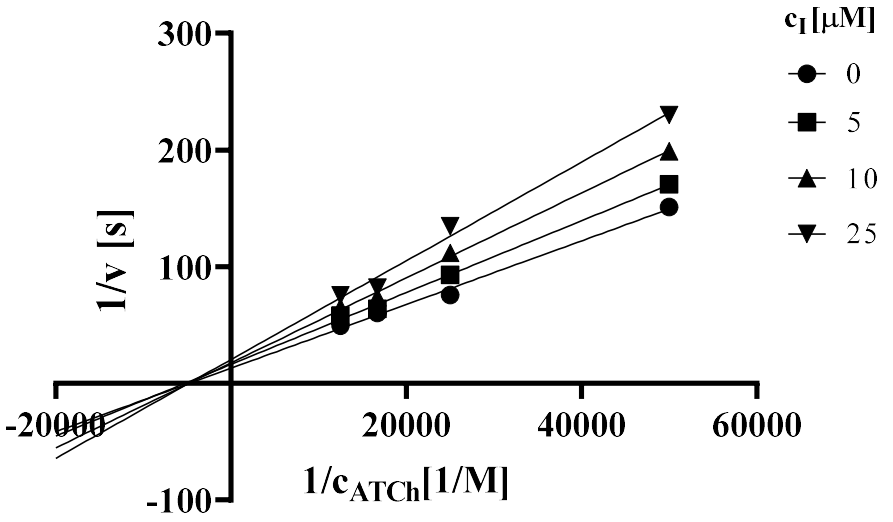
7.6 Stanovení typu inhibice

Jsou známé čtyři typy reverzibilní inhibice, a to kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšená. Při kompetitivní inhibice, kde soutěží o vazebné místo enzymu inhibitor a substrát, zůstává V_m konstantní, kdežto hodnota K_M se zvyšuje. U nekompetitivní inhibice inhibitor nebrání vazbě substrátu na enzym, protože má vlastní vazebné místo. Tyto inhibitory způsobí to, že se sníží rychlost přeměny substrátu na produkt, proto se snižuje V_m a K_M zůstává konstantní. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže na komplex enzym-substrát, a tím brání přeměně substrátu na produkt. Kvůli tomuto bránění se hodnoty K_M a V_m snižují. Posledním typ inhibice je inhibice smíšená, kdy se hodnota K_M zvyšuje a hodnota V_m naopak snižuje. [81]

Na obrázku 19 je znázorněn graf nelineární regrese zpracované programem GraphPad (verze 8.0.1) a na obrázku 20 graf lineární regrese podle Lineweaver a Burka, dle něhož byly pomocí rovnic regrese vypočítány kinetické parametry K_M a V_m (tabulka 5).



*Obrázek 19 Typ inhibice - nelineární regrese, inhibitor **1***



*Obrázek 20 Typ inhibice - graf podle Lineweavera a Burka, inhibitor **1***

Kinetické parametry lze spočítat z rovnice regrese: y = kx + q. Vzorový výpočet pro koncentraci inhibitoru 5 µM je uveden níže:

Rovnice regrese: y = 0,003077x + 16,28

$$V_m = \frac{1}{q}$$

$$V_m = \frac{1}{16{,}28}$$

$$V_m = 6{,}14.10^{-2} s^{-1}$$

$$K_M = k.V_m$$

$$K_M = 0{,}002727\ .\ 7{,}68.10^{-2}$$

$$K_M = 2{,}09.10^{-4} mol/l$$

Tabulka 5 Typ inhibice - kinetické parametry K_M a V_m

c_I (µM)	**0**	**5**	**10**	**25**
K_M (mol/l)	$2{,}09\times10^{-4}$	$1{,}89\times10^{-4}$	$2{,}08\times10^{-4}$	$2{,}07\times10^{-4}$
V_m (s^{-1})	$7{,}78\times10^{-2}$	$6{,}14\times10^{-2}$	$7{,}71\times10^{-2}$	$4{,}91\times10^{-2}$

Hodnoty parametrů K_M se se zvyšující koncentrací inhibitoru prakticky nemění, zatímco hodnoty V_m se snižují. Z těchto výsledků lze usuzovat, že se jedná o nekompetitivní inhibici.

7.7 Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA

Rozdělovací koeficient je empiricky bezrozměrná vlastnost, která popisuje, jak se chemická látka rozděluje mezi dvě fáze. Je definována jako poměr koncentrací chemické látky v systému navzájem dvou nemísitelných rozpouštědel. Hodnota rozdělovacího koeficientu je přímo úměrná rozpustnosti dané látky v organické fázi. Nejčastěji je jedním z rozpouštědel voda a druhým rozpouštědlem je *n*-oktanol. Výpočet rozdělovacího koeficientu je důležitý při odhadu distribuce léků v těle. Hydrofobní léky s vysokým rozdělovacím koeficientem jsou distribuovány především v oblastech, jako jsou lipidové dvojvrstvy buněk. Hydrofilní léky s nízkým rozdělovacím koeficientem jsou distribuovány především v krevním séru. Níže je uvedený vzoreček pro výpočet rozdělovacího koeficientu:

$$P = \frac{c_o}{c_w}$$

kde: c_o je koncentrace látky v *n*-oktanolu a c_w je koncentrace látky ve vodě. [82]

Hodnota rozdělovacího koeficientu se nejčastěji vyjadřuje v logaritmickém tvaru (logP) a je závislá na podmínkách měření jako je teplota a pH. Jak už bylo řečeno, slouží jako měřítko vztahu mezi lipofilitou (rozpustnost v tucích) a hydrofilitou (rozpustnost ve vodě) látky. Pokud je hodnota větší než jedna, je látka rozpustnější v tucích. Pokud je menší než jedna, je látka rozpustnější ve vodě. Hodnota logP nás především informuje o schopnosti látky prostupovat biologickými membránami. [82, 83]

Lipinský a kolektiv navrhli tzv. Lipinského pravidlo pěti. Podařilo se jim určit fyzikálně chemické vlastnosti, díky kterým by měla látka snadno prostupovat jak buněčnou membránou, tak i hematoencefalickou bariérou. Toto pravidlo slouží pro vývoj orálně biologicky dostupných léčiv s malou molekulou. Léčiva by měla splňovat tyto podmínky:

- molekula s molekulovou hmotností ≤ 500,
- ne více než 5 donorů vodíkových vazeb,
- ne více než 10 akceptorů vodíkových vazeb,
- logP ≤ 5. [84]

Hodnoty logP inhibitorů **1–11** byly získány pomocí programu ChemDraw 20.0 a jsou shrnuty v tabulce 6.

Topologická molekulární polární povrchová plocha (tPSA) určuje schopnost vytvářet vodíkové vazby a určení jejího počtu je důležité pro střevní absorpci a propustnost přes hematoencefalickou bariéru. tPSA je oproti výpočtu klasického polárního povrchu molekuly (PSA) jednodušší. PSA udává součet povrchů všech polárních atomů v molekule

a pro výpočet vyžaduje sestavit 3D model. Tento způsob výpočtu je zdlouhavý a vyžaduje speciální program, proto pro odhadnutí stačí určit tPSA díky 2D molekulové struktuře. Jednotka $Å^2$ označuje rozměr tPSA, kde 1 Å = 10^{-10} m. Pokud je hodnota tPSA menší než 70 $Å^2$, znamená to vyšší pravděpodobnost propustnosti látky přes hematoencefalickou bariéru. V tabulce 6 jsou také uvedeny hodnoty tPSA, které byly stejně jako hodnoty logP získány pomocí programu ChemDraw 20.0. [85, 86]

Tabulka 6 Hodnoty logP a tPSA testovaných inhibitorů

	Mr	**ClogP**	**tPSA ($Å^2$)**
1	266,33	2,30	41,46
2	280,36	2,82	41,46
3	294,39	3,13	41,46
4	308,42	3,53	41,46
5	278,35	2,53	41,46
6	292,37	2,84	41,46
7	296,36	2,33	50,69
8	345,23	3,05	41,46
9	300,78	2,91	41,46
10	335,22	3,62	41,46
11	381,21	3,98	41,46

Z výsledků logP je patrné, že jsou všechny hodnoty vyšší než 1, tudíž mají látky vyšší lipofilitu. Vzorek **10** a **11** má nejvyšší hodnotu, proto budou pravděpodobně dobře procházet buněčnými membránami a hematoencefalickou bariérou. LogP není vyšší než 5, tudíž splňují pravidlo Lipinského. Jak už bylo řečeno, pokud je hodnota tPSA menší než 70 $Å^2$, procházejí látky dobře přes hematoencefalickou bariéru. Z výsledků tPSA je zřejmé, že tuto vlastnost splňují všechny testované inhibitory.

8 DISKUZE

8.1 Rychlost saturace enzymu 2,6-dichlorindofenol acetátem

Za účelem určit vhodnou aktivitu AChE a koncentraci substrátu pro měření inhibiční aktivity vybraných inhibitorů (sulfonamidové deriváty) bylo provedeno stanovení rychlosti saturace enzymu substrátem IFA. Vhodnost testovaných podmínek byla posuzována dle reakčních rychlostí.

Rychlost saturace AChE pomocí IFA byla měřena pro tři různé aktivity enzymu v reakční směsi, a to 0,2; 0,5 a 1 U/ml v rozmezí koncentrace substrátu $1{,}5\times10^{-4}$ – 1×10^{-3} M. Na základě výsledků saturační křivky (obr. 11), která měla trvale stoupající průběh u aktivity enzymu 0,5 U/ml, byla tato aktivita zvolena jako optimální. Jako vhodná koncentrace substrátu byla zvolena koncentrace $4{,}5\times10^{-5}$ M, kdy už byla odezva dostatečná. U IFA použitého jako substrát byly spočítány parametry K_M a V_m. Tyto kinetické parametry by měly se zvyšující se aktivitou enzymu stoupat, avšak jak je vidět z výsledků uvedených v tabulce 2, substrát IFA toto nesplňuje.

Testovaná metoda s použitím IFA jako substrátu se zkoušela proto, aby se porovnala s Ellmanovou metodou. Metoda s IFA je jednodušší, protože sám substrát dává po hydrolýze enzymem barevný produkt. Z toho důvodu není potřeba v reakční směsi žádný chromogen jako je DTNB u Ellmanovy metody. Mezi výhody patří také oblast, při které se měří absorbance (606 nm), protože nedochází k interferenci s hemoglobinem. Nicméně ve výsledku se ukázalo, že Ellmanovu metodu zatím stále nic nepřekoná. Při využití IFA je potřeba delší čas na analýzu, vyšší aktivita enzymu v reakční směsi, aby byla odezva dostatečná.

8.2 IC_{50}

S využitím dvou různých substrátů, ATCh a IFA, byly stanoveny hodnoty IC_{50} vzorků **1–11** a standardů rivastigminu, galantaminu a donepezilu. Jak už bylo řečeno, čím je menší hodnota IC_{50}, tím je inhibitor účinnější. Hodnoty získané s použitím substrátu ATCh (tabulka 3) ukazují, že pouze vzorek **1** a **8** má vyšší inhibiční aktivitu než rivastigmin. Avšak ve srovnání se dvěma zbylými standardy, a to galantaminem a donepezilem, mají všechny vzorky inhibitorů **1–11** inhibiční aktivitu nižší až o dva řády. Za účinný inhibitor by se dal považovat vzorek **1**, na druhou stranu za nejméně účinný vzorek **9**.

Hodnoty získané s použitím substrátu IFA (tabulka 4) jsou u většiny vzorků vyšší v porovnání se stanovením inhibiční aktivity s ATCh jako substrátem. Jediný standard galantamin vykazuje nižší inhibiční aktivitu s IFA jako substrátem v porovnání s ATCh jako

substrátem. Z těchto výsledků lze říci, že se v závislosti na použitém substrátu a reakčních podmínkách liší účinnost jednotlivých inhibitorů. Lze také říci, že účinnost vzorků **1–11** s použitím ATCh je několikanásobně vyšší než s použitím IFA. Podle výsledků je za daných reakčních podmínek nejúčinnější inhibitor **7**. Na druhou stranu vzorek inhibitoru **6** má nejnižší inhibiční aktivitu. Proto by se dalo říci, že testovaná metoda není tak dobrá pro stanovení IC_{50} testovaných inhibitorů jako Ellmanova metoda.

Studie zkoumající inhibiční aktivitu podobných sulfonamidových derivátů jako jsou vzorky **1–11** Ellmanovou metodou [87] udávají hodnoty IC_{50} nižší než výsledky našeho měření. Proto nemohu usoudit, zda by se naše inhibitory daly použít jako vhodná léčiva AD.

Dosud nebyla publikována žádná studie zabývající se stanovením inhibiční účinnosti rivastigminu, galantaminu a donepezilu s použitím IFA jako substrátu. Z našich dat vyplývá, že galantamin a donepezil mají hodnotu IC_{50} o dva až tři řády nižší než nejúčinnější vzorek **7**. Naproti tomu rivastigmin (tabulka 4) je méně účinný než polovina testovaných vzorků, proto IFA není vhodným substrátem pro rutinní testování inhibiční účinnosti.

8.3 Typ inhibice

Díky výsledkům, které byly získány z grafu podle Lineweavera a Burka a podle změny kinetických parametrů, kdy se V_m snižuje a K_M zůstává konstantní, můžeme usuzovat, že inhibitory **1–11** fungují na principu nekompetitivní inhibice.

8.4 Rozdělovací koeficient a tPSA

LogP charakterizuje lipofilitu inhibitorů – se zvyšující se hodnotou logP se zvyšuje lipofilita látek, tudíž jejich propustnost přes membrány. Látky, které se používají pro léčbu AD, by měly snadno procházet hematoencefalickou bariérou, a tím tak působit v mozku. Záporné hodnoty logP vypovídají o hydrofilitě, tedy dobré rozpustnosti ve vodném prostředí. Toto pravidlo ale žádný z testovaných vzorků nesplňuje (viz tabulka 6). Nejvyšší hodnoty logP mají vzorky **10** a **11**, proto budou dobře procházet přes biologické membrány a mají z tohoto pohledu největší potenciál pro to být použity jako léčiva AD. Naopak nejnižších hodnot dosahují vzorku **1** a **7**.

Hodnoty tPSA vypovídají jak o propustnosti látek přes hematoencefalickou bariéru, tak o vstřebatelnosti v gastrointestinálním traktu a hydrofilitě. Látka, která má hodnotu nižší než 70 $Å^2$ dobře prochází biologickou membránou. Tuto podmínku splňují všechny vzorky inhibitorů (tabulka 6).

9 ZÁVĚR

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo nastavit optimální reakční podmínky pro stanovení inhibice AChE až jedenácti různých inhibitorů za použití IFA jako substrátu. Dostatečné odezvy bylo dosaženo při koncentraci substrátu $4{,}5\times10^{-4}$ M a aktivitě enzymu 0,5 U/ml.

Další část práce je věnována stanovení inhibiční účinnosti vybraných vzorků sulfonamidových derivátů jako potenciálních inhibitorů acetylcholinesteráz a jejich porovnání se standardními látkami. Všechny tři použité standardy, a to rivastigmin, galantamin a donepezil, se používají při léčbě Alzheimerovy choroby. Podle hodnot IC_{50}, jež vypovídají o účinnosti jednotlivých inhibitorů, lze říci, že se účinnost liší s použitím různých substrátů. V případě IFA jsou hodnoty IC_{50} mnohonásobně vyšší než u ATCh, což znamená, že IFA pravděpodobně není vhodným substrátem pro stanovení inhibiční účinnosti vybraných sulfonamidových derivátů.

Grafickým vyhodnocením podle Lineweavera a Burka a určením změn kinetických parametrů K_M a V_m byl stanoven nekompetitivní typ inhibice.

Posledním cílem této práce bylo stanovit rozdělovací koeficient v systému *n*-oktanol:voda a tPSA. Obě tyto hodnoty vypovídají o tom, jak dobře látka prochází biologickými membránami. Z tohoto hlediska jsou nejvhodnější vzorky **10** a **11**, protože mají nejvyšší hodnoty logP a hodnota tPSA je nižší než 70 $Å^2$.

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

10 CITACE

[1] DZOYEM, J., KUETE, V. a ELOFF, J. Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* [online]. Elsevier, 2014, s. 659-715 [cit. 2020-04-02]. ISBN 9780128000182. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-800018-2.00023-6.

[2] LOEWI, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* [online]. 1922, **193**(1), 201-213 [cit. 2020-04-02]. ISSN 0031-6768. Dostupné z: doi:10.1007/BF02331588.

[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. 2020-08-19]. ISSN 1570159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006.

[4] STAHL, M.S. The New Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease, Part 2: Illustrating Their Mechanisms of Action. *The Journal of Clinical Psychiatry* [online]. 2000, **61**(11), 813-814 [cit. 2020-08-28]. ISSN 0160-6689. Dostupné z: doi:10.4088/JCP.v61n1101.

[5] DINGOVÁ, D. a HRABOVSKÁ, A. *Methods for determination of cholinesterase activity. Ceskoslovenska Fysiologie. 2015 ;64(2):79-83.* [online]. [cit. 2020-08-29].

[6] POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2013, **114**(12), 726-734 [cit. 2020-08-19]. ISSN 1336-0345. Dostupné z: doi:10.4149/BLL_2013_153.

[7] MASSON, P. LOCKRIDGE, O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2010, **494**(2), 107-120 [cit. 2020-04-02]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2009.12.005.

[8] SULTATOS, L. Interactions of Organophosphorus and Carbamate Compounds with Cholinesterases. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds* [online].

Elsevier, 2006, s. 209-218 [cit. 2020-04-02]. ISBN 9780120885237. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012088523-7/50016-8.

[9] DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., ROSENBERRY, T.L. a SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2010, **187**(1-3), 10-22 [cit. 2020-08-19]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042.

[10] *Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine* [online]. 2002, **413555** [cit. 2020-09-09]. Dostupné z: doi:10.2210/pdb1gqr/pdb.

[11] SOREQ, H. a SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2001, **2**(4), 294-302 [cit. 2020-08-19]. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/35067589.

[12] CHATONNET, A a LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* [online]. 1989, **260**(3), 625-634 [cit. 2020-08-19]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2600625.

[13] RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica* [online]. 2003, **54**(2), 183-189 [cit. 2020-08-19]. ISSN 0236-5383. Dostupné z: doi:10.1556/ABiol.54.2003.2.7.

[14] POHANKA, M. CHOLINESTERASES, A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. *Biomedical Papers* [online]. 2011, **155**(3), 219-223 [cit. 2020-08-19]. ISSN 12138118. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2011.036.

[15] ZEMEK, F., ZDAROVA, J., SEPSOVA, V. a KUCA, K. Acetylcholinesterase Reactivators (HI-6, Obidoxime, Trimedoxime, K027, K075, K127, K203, K282): Structural Evaluation of Human Serum Albumin Binding and Absorption Kinetics. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, **14**(8), 16076-16086 [cit. 2020-08-19]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms140816076.

[16] GOODSELL, D.S. Acetylcholinesterase. *RCSB Protein Data Bank* [online]. 2004 [cit. 2020-09-09]. ISSN 1234-432X. Dostupné z: doi:10.2210/rcsb_pdb/mom_2004_6.

[17] BIGBEE, J.W, SHARMA, K.V., GUPTA, J.J. a DUPREE, J.L. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environmental Health Perspectives* [online]. 1999, **107**(1), 81-87 [cit. 2020-08-19]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.99107s181.

[18] WU, D. a HERSH, L.B. Choline Acetyltransferase: Celebrating Its Fiftieth Year. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1994, **62**(5), 1653-1663 [cit. 2020-08-19]. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62051653.x.

[19] AMENTA, F. a TAYEBATI, S. Pathways of Acetylcholine Synthesis, Transport and Release as Targets for Treatment of Adult-Onset Cognitive Dysfunction. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2008, **15**(5), 488-498 [cit. 2020-08-19]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986708783503203.

[20] ROSENBERG, Y.J., ADAMS, R.J., HERNANDEZ-ABANTO, S., JIANG, X., SUN, W., MAO, L. a LEE, K.D. Pharmacokinetics and immunogenicity of a recombinant human butyrylcholinesterase bioscavenger in macaques following intravenous and pulmonary delivery. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, **242**, 219-226 [cit. 2020-08-19]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2015.09.021.

[21] EKHOLM, M. a KONSCHIN, H. Comparative model building of human butyrylcholinesterase. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* [online]. 1999, **467**(2), 161-172 [cit. 2020-08-19]. ISSN 01661280. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-1280(98)00488-6.

[22] *Development of an in-vivo active reversible butyrylcholinesterase inhibitor.* [online]. 2016, (639495-39495) [cit. 2020-09-09]. Dostupné z: doi:10.2210/pdb5DYW/pdb.

[23] DOCTOR, B.P. a SAXENA, A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2005, **157-158**, 167-171 [cit. 2020-08-19]. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.024.

[24] MANOHARAN, I., BOOPATHY, R., DARVESH, S. a LOCKRIDGE, O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2007, **378**(1-2), 128-135 [cit. 2020-08-19]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2006.11.005.

[25] ATACK, J.R., PERRY, E.K., BONHAM, J.R., CANDY, J.M. a PERRY, R.H. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Aged Human Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry* [online]. 1986, **47**(1), 263-277 [cit. 2020-08-28]. ISSN 00223042. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.1986.tb02858.x.

[26] HARRELL, L.E. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Archives of Neurology* [online]. 2001, **58**(3) [cit. 2020-08-28]. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneur.58.3.516.

[27] BACHURIN, S.O. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2003, **23**(1), 48-88 [cit. 2020-08-28]. ISSN 0198-6325. Dostupné z: doi:10.1002/med.10026.

[28] *A new combinational therapy in the treatment of Alzheimer's disease* [online]. 2015, (7), 337-342 [cit. 2020-09-09]. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0404.1996.tb00367.x/abstract;jsessionid=4CF09B62D.

[29] GARCÍA-AYLLÓN, M. Revisiting the role of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease: cross-talk with P-tau and β-amyloid. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2011, **4** [cit. 2020-08-28]. ISSN 16625099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2011.00022.

[30] TALESA, V.N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* [online]. 2001, **122**(16), 1961-1969 [cit. 2020-08-28]. ISSN 00476374. Dostupné z: doi:10.1016/S0047-6374(01)00309-8.

[31] JIRÁK, R. *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby* [online]. 2004, (8), 212-214 [cit. 2020-08-28]. Dostupné z: https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2004/04/06.pdf.

[32] MCGLEENON, DYNAN a PASSMORE. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 1999, **48**(4), 471-480 [cit. 2020-08-29]. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00026.x.

[33] 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. 2020-08-29]. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-013-0036-3.

[34] SCOTT, L.J. a GOA, K.L. Galantamine. *Drugs* [online]. 2000, **60**(5), 1095-1122 [cit. 2020-08-29]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200060050-00008.

[35] NADRI, H., PIRALI-HAMEDANI, M., MORADI, A. et al. 5,6-Dimethoxybenzofuran-3-one derivatives: a novel series of dual Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase inhibitors bearing benzyl pyridinium moiety. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **21**(1) [cit. 2020-08-29]. ISSN 2008-2231. Dostupné z: doi:10.1186/2008-2231-21-15.

[36] MAXWELL, D.M., BRECHT, K.M., KOPLOVITZ, I. a SWEENEY, R.E. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds?. *Archives of Toxicology* [online]. 2006, **80**(11), 756-760 [cit. 2020-09-15]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-006-0120-2.

[37] 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. 2020-09-15]. ISSN 03065251. Dostupné z: doi:10.1111/bcp.12784.

[38] HEILBRONN, E. a TOLAGEN, B. Toxogonin in Sarin, Soman and Tabun poisoning. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1965, **14**(1), 73-77 [cit. 2020-09-15]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(65)90059-6.

[39] KATZ, F.S., PECIC, S., SCHNEIDER, L. et al. New therapeutic approaches and novel alternatives for organophosphate toxicity. *Toxicology Letters* [online]. 2018, **291**, 1-10 [cit. 2020-09-15]. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2018.03.028.

[40] WATKINS, L.M., MAHONEY, H.J., MCCULLOCH, J.K. a RAUSHEL, F.M. Augmented Hydrolysis of Diisopropyl Fluorophosphate in Engineered Mutants of Phosphotriesterase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1997, **272**(41), 25596-25601 [cit. 2020-09-15]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.41.25596.

[41] ELLIS, P.P. Echothiophate Iodide Therapy in Children. *Archives of Ophthalmology* [online]. 1967, **77**(5) [cit. 2020-09-15]. ISSN 0003-9950. Dostupné z: doi:10.1001/archopht.1967.00980020600006.

[42] POHANKA, M. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(6), 9809-9825 [cit. 2020-09-15]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15069809.

[43] JANN, M.W. Rivastigmine, a New-Generation Cholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Pharmacotherapy* [online]. 2000, **20**(1), 1-12 [cit. 2020-09-15]. ISSN 0277-0008. Dostupné z: doi:10.1592/phco.20.1.1.34664.

[44] DARVESH, S., DARVESH, K.V., MCDONALD, R.S., MATAIJA, D., WALSH, R., MOTHANA, S. a MARTIN, E. Carbamates with Differential Mechanism of Inhibition Toward Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2008, **51**(14), 4200-4212 [cit. 2020-09-16]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm8002075.

[45] WATTS, P. a WILKINSON, R.G. The interaction of carbamates with acetylcholinesterase. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1977, **26**(8), 757-761 [cit. 2020-09-16]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(77)90220-9.

[46] GALGANI, F. a BOCQUENE, G. In Vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. 1990, **45**(2), 243-249 [cit. 2020-09-16]. ISSN 0007-4861. Dostupné z: doi:10.1007/BF01700191.

[47] CASIDA, J. E. Mode of Action of Carbamates. *Annual Review of Entomology* [online]. 1963, **8**(1), 39-58 [cit. 2020-09-16]. ISSN 0066-4170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.en.08.010163.000351.

[48] WAGSTAFF, A.J. a MCTAVISH, D. Tacrine. *Drugs & Aging* [online]. 1994, **4**(6), 510-540 [cit. 2020-09-16]. ISSN 1170-229X. Dostupné z: doi:10.2165/00002512-199404060-00006.

[49] 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. 2020-09-16]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986710791111206.

[50] FREEMAN, S.E. a DAWSON, R.M. Tacrine: A pharmacological review. *Progress in Neurobiology* [online]. 1991, **36**(4), 257-277 [cit. 2020-09-16]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0082(91)90002-I.

[51] EAGGER, S.A., LEVY, R. a SAHAKIAN, B.J. Tacrine in Alzheimer's disease. *The Lancet* [online]. 1991, **337**(8748), 989-992 [cit. 2020-09-16]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/0140-6736(91)92656-M.

[52] MIAO, Y., HE, N. a ZHU, J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews* [online]. 2010, **110**(9), 5216-5234 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr900214c.

[53] KOMERSOVÁ, A., KOMERS, K. a ČEGAN, A. New Findings about Ellman's Method to Determine Cholinesterase Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2007, **62**(1-2), 150-154 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1865-7125. Dostupné z: doi:10.1515/znc-2007-1-225.

[54] ŠINKO, G., ČALIć, 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. 2021-02-22]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2007.07.023.

[55] POHANKA, M. *Stanovení aktivity cholinesteras a jejich využití pro diagnostiku patologických stavů* [online]. (66), 147-153 [cit. 2021-02-22]. Dostupné z: https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2017-4/stanoveni-aktivity-cholinesteras-a-jejich-vyuziti-pro-diagnostiku-patologickych-stavu-62678/download?hl=cs.

[56] ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. a FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1961, **7**(2), 88-95 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9.

[57] BISSBORT, S.H., VERMAAK, W.J.H., ELIAS, J., BESTER, M.J., DHATT, G.S. a PUM, J.K.W. Novel test and its automation for the determination of erythrocyte acetylcholinesterase and its application to organophosphate exposure. *Clinica Chimica*

Acta [online]. 2001, **303**(1-2), 139-145 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00098981. Dostupné z: doi:10.1016/S0009-8981(00)00388-0.

[58] HOLAS, O., MUSILEK, K., POHANKA, M. a KUCA, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2012, **7**(12), 1207-1223 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2012.729037.

[59] ODO, J., INOGUCHI, M. a HIRAI, A. Fluorometric Determination of Quinolinic Acid Using the Catalytic Activity of Horseradish Peroxidase. *JOURNAL OF HEALTH SCIENCE* [online]. 2009, **55**(2), 242-248 [cit. 2021-02-22]. ISSN 1344-9702. Dostupné z: doi:10.1248/jhs.55.242.

[60] PARVARI, R., PECHT, I. a SOREQ, H. A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine. *Analytical Biochemistry* [online]. 1983, **133**(2), 450-456 [cit. 2021-02-22]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2697(83)90107-0.

[61] GUILBAULT, G.G. a KRAMER, D.N. Resorufin Butyrate and Indoxyl Acetate as Fluorogenic Substrates for Cholinesterase. *Analytical Chemistry* [online]. 1965, **37**(1), 120-123 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac60220a031.

[62] WALKER, J.P. a ASHER, S.A. Acetylcholinesterase-Based Organophosphate Nerve Agent Sensing Photonic Crystal. *Analytical Chemistry* [online]. 2005, **77**(6), 1596-1600 [cit. 2021-02-22]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac048562e.

[63] AUGUSTINSSON, K. Determination of Activity of Cholinesterases. GLICK, David, ed. *Methods of Biochemical Analysis* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, 1971, s. 217-273 [cit. 2021-02-23]. Methods of Biochemical Analysis. ISBN 9780470110409. Dostupné z: doi:10.1002/9780470110409.ch8.

[64] WINTERINGHAM, F.P.W. a DISNEY, R.W. Radiometric Assay of Acetylcholinesterase. *Nature* [online]. 1962, **195**(4848), 1303-1303 [cit. 2021-02-23]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/1951303a0.

[65] KIKUCHI, T., OKAMURA, T., ARAI, T., OBATA, T., Kiyoshi FUKUSHI, IRIE, T. a SHIRAISHI, T. Use of a novel radiometric method to assess the inhibitory effect of

donepezil on acetylcholinesterase activity in minimally diluted tissue samples. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2010, **159**(8), 1732-1742 [cit. 2021-02-23]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00674.x.

[66] MICHEL, H.O., WENDELL T.C., WETSTONE, H.J. a BOWERS, G.N. *Cholinesterase in Human Red Blood Cells and Plasma* [online]. Elsevier, 1961, s. 93-98 [cit. 2021-02-24]. Standard Methods of Clinical Chemistry. ISBN 9781483196848. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4831-9684-8.50014-4.

[67] CUARTERO, M., ORTUñO, J.A., GARCÍA, M.S. a GARCÍA-CÁNOVAS, F. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Analytical Biochemistry* [online]. 2012, **421**(1), 208-212 [cit. 2021-02-26]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2011.10.008.

[68] HOLMSTEDT, B. Distribution and determination of cholinesterases in mammals. *Bull World Health Organ* [online]. 1971, (44), 99-107 [cit. 2021-02-26]. Dostupné z: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4999484/.

[69] ALDRIDGE, W.N. a DAVIES, D.R. Determination of Cholinesterase Activity in Human Blood. *BMJ* [online]. 1952, **1**(4765), 945-947 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0959-8138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.1.4765.945.

[70] NABB, D.P. a WHITFIELD, F. Determination of Cholinesterase by an Automated pH Stat Method. *Archives of Environmental Health: An International Journal* [online]. 1967, **15**(2), 147-154 [cit. 2021-03-01]. ISSN 0003-9896. Dostupné z: doi:10.1080/00039896.1967.10664895.

[71] Acholest Test Paper Method for Simple Pseudocholinesterase Estimates. *JAMA* [online]. 1963, **183**(2) [cit. 2021-03-01]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.1963.03700020115059.

[72] VELASCO-GARCIA, M.N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2009, **20**(1), 27-33 [cit. 2021-03-01]. ISSN 10849521. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2009.01.013.

[73] POHANKA, M., MUSILEK, K. a KUCA, K.. Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition. *Current Medicinal Chemistry* [online]. 2009, **16**(14), 1790-1798 [cit. 2021-03-01]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709788186129.

[74] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š. a VORČÁKOVÁ, K. Cholinesterase-based biosensors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **31**(3), 180-193 [cit. 2021-03-02]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2016.1204609.

[75] POHANKA, M. Cholinesterase based amperometric biosensors for assay of anticholinergic compounds. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2009, **2**(2) [cit. 2021-03-02]. ISSN 1337-9569. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-009-0011-5.

[76] SASSOLAS, A., BLUM, L.J. a LECA-BOUVIER, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, **30**(3), 489-511 [cit. 2021-03-02]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.

[77] POHANKA, M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers* [online]. 2015, **69**(1) [cit. 2021-03-03]. ISSN 1336-9075. Dostupné z: doi:10.2478/s11696-014-0542-x.

[78] MARRAZZA, G. Piezoelectric Biosensors for Organophosphate and Carbamate Pesticides: A Review. *Biosensors* [online]. 2014, **4**(3), 301-317 [cit. 2021-03-05]. ISSN 2079-6374. Dostupné z: doi:10.3390/bios4030301.

[79] TAN, H.Y., LOKE, W.K, TAN, Y.T. a NGUYEN, N. A lab-on-a-chip for detection of nerve agent sarin in blood. *Lab on a Chip* [online]. 2008, **8**(6) [cit. 2021-03-08]. ISSN 1473-0197. Dostupné z: doi:10.1039/b800438b.

[80] POHANKA, M. a HOLAS, O. Evaluation of 2,6-dichlorophenolindophenol acetate as a substrate for acetylcholinesterase activity assay. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **30**(5), 796-799 [cit. 2021-06-02]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2014.976564.

[81] AMINE, A., MOHAMMADI, H., BOURAIS, I. a PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2006, **21**(8), 1405-1423 [cit. 2021-06-16]. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2005.07.012.

[82] SPEIGHT, J.G. Introduction Into the Environment. *Environmental Organic Chemistry for Engineers* [online]. Elsevier, 2017, s. 263-303 [cit. 2021-06-16]. ISBN 9780128044926. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804492-6.00006-X.

[83] SPEIGHT, J.G. Sorption, Dilution, and Dissolution. *Reaction Mechanisms in Environmental Engineering* [online]. Elsevier, 2018, s. 165-201 [cit. 2021-06-16]. ISBN 9780128044223. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804422-3.00005-5.

[84] GOODWIN, R.J.A., BUNCH, J. a MCGINNITY, D.F. Mass Spectrometry Imaging in Oncology Drug Discovery. *Applications of Mass Spectrometry Imaging to Cancer* [online]. Elsevier, 2017, s. 133-171 [cit. 2021-06-24]. Advances in Cancer Research. ISBN 9780128052495. Dostupné z: doi:10.1016/bs.acr.2016.11.005.

[85] 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. 2021-06-16]. ISSN 09298673. Dostupné z: doi:10.2174/092986709787002817.

[86] ERTL, P., ROHDE, B. a SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2000, **43**(20), 3714-3717 [cit. 2021-06-16]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm000942e.

[87] PEJCHAL, V., ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., PEJCHALOVÁ, M. et al. 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. 2021-7-1]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2016.02.033