

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení aktivity cholinesteráz vybranými analytickými metodami

Diplomová práce

2021

Bc. Dušan Balog, MBA

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Determination Of Cholinesterase Activity By Selected Analytical Methods
Thesis

2021

Bc. Dušan Balog, MBA

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Dušan Balog**
Osobní číslo: **C19531**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Stanovení aktivity cholinesteráz vybranými analytickými metodami**

Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se cholinesteráz, jejich struktury, funkce a souvislosti s neurologickým onemocněními
2. Popsat kinetiku neinhibovaných a inhibovaných reakcí katalyzovaných cholinesterázami
3. Popsat jednotlivé analytické metody, které se využívají pro testování aktivity cholinesteráz

Experimentální část:

1. Zpracování odebrané krve pro dané analytické stanovení
2. Otestovat vybrané analytické postupy pro stanovení aktivity lidské cholinesterázy
3. Zvolené postupy aplikovat pro stanovení inhibiční účinnosti vybraných cholinesterázových inhibitorů
4. Použité metody testování vzájemně porovnat a vyhodnotit

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce:
Konzultant diplomové práce:

Mgr. Katarína Svrčková, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:
Termín odevzdání diplomové práce:

18. prosince 2020
7. května 2021

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení aktivity cholinesteráz vybranými analytickými metodami, jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 směrnici 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 24. 7. 2021

.....

Bc. Dušan Balog, MBA

Poděkování

Rád bych poděkoval Mgr. Kataríně Svrčkové, Ph.D za vedení této práce, její rády, trpělivost a čas, který této práci věnovala.

Anotace

Teoretická část je zpracovaná jako rešerše popisující historii, strukturu a funkci cholinesteráz. Jsou popsány neuropsychické poruchy, kinetika inhibovaných a neinhibovaných reakcí a jsou specifikovány jednotlivé analytické metody stanovující cholinesterázy. Experimentální část se zabývá zpracováním krve, která je následně testována spektrofotometrickou metodou v různých stanoveních. Stanovení probíhá za pomoci chromogenů DTNA a PDS, jsou testovány různé poměry ředění erytrocytů a stanovena inhibiční účinnost vybraných inhibitorů.

Klíčová Slova

Cholinesteráza, acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz

Annotation

The theoretical part is processed as a search describing the history, structure and function of cholinesterases. Neuropsychic disorders, the kinetics of inhibited and non-inhibited reactions are described, and individual analytical methods for the determination of cholinesterases are specified. The experimental part deals with the processing of blood, which is then tested by spectrophotometric method in various determinations. The assay is performed using DTNA and PDS chromogens, various erythrocyte dilution ratios are tested, and the inhibitory activity of selected inhibitors is determined.

Key Words

Cholinesterase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors

Seznam obrázků

Obrázek 1: Vývoj v oblasti cholinesteráz	15
Obrázek 2: Schematické znázornění diferenciací kmenových buněk při tvorbě neuronálních a svalových linií.....	19
Obrázek 3: Děje neuromuskulárního spojení.....	20
Obrázek 4: Změna konformace receptoru po navázání dvou molekul ACh.....	21
Obrázek 5: Pohled shora na tetramer BChE s polyprolinem ve středu.	24
Obrázek 6: Boční pohled na tetramer BChE. Čtyři identické podjednotky se sestavují do tetrameru prostřednictvím interakce polyprolinového peptidu s BChE tetramerizační doménou na C-konci.....	25
Obrázek 7: Štěpení acetylthiocholinu na kys. octovou a thiocholin.....	37
Obrázek 8: Štěpení DTNB a vznik chromoforu	37
Obrázek 9: Přejchod chromoforu na formu, která se dále fotometricky stanovuje	38

Seznam tabulek

Tabulka 1: Distribuce enzymů BChE a AChE v dospělém lidském těle. [34, 35, 36].....	26
Tabulka 2: Hodnota IC ₅₀ v závislosti na chromogenu a ředění erytrocytů	50

Seznam grafů

Graf 1: Saturační graf pro DTNA (5 mM).....	52
Graf 2: Saturační graf pro PDS (1 mM), ředění erytrocytů v poměru 1:1	53
Graf 3: Saturační graf pro PDS (1 mM), ředění erytrocytů v poměru 1:3	54
Graf 4: Srovnání chromogenů DTNA (5mM) a PDS (5mM)	55
Graf 5: Saturační graf pro ředění erytrocytů s použitím PDS (1 mM)	56
Graf 6: Saturační graf pro ředění erytrocytů s použitím DTNA (1 mM)	57
Graf 7: Saturační graf pro ředění erytrocytů, porovnání obou chromogenů.....	58
Graf 8: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:4, inhibitor galantamin.....	59
Graf 9: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:4, inhibitor donepezil	59

Graf 10: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:9, inhibitor galantamin... 60

Graf 11: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:9, inhibitor donepezil60

Graf 12: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:4, inhibitor galantamin.....61

Graf 13: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:4, inhibitor donepezil61

Graf 14: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:9, inhibitor galantamin.....62

Graf 15: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty ze 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:9, inhibitor donepezil62

Seznam zkratek

2-PDS	2,2'-dithiodipyridin
4-PDS	4,4' -dithiodipyridin
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEICER	kapilární enzymový reaktor s acetylcholinesterázou pro screening a charakterizaci selektivních inhibitorů
ATCh(I)	acetylthiocholin jodid
BChE	butyrylcholinesteráza
BTCh(I)	butyrylthiocholin jodid
CoA	koenzym A
Coch	kokainová hydroláza
DTNA	kyselina 6,6'-dithiodinikotinová
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
E	enzym
EI	komplex enzym-inhibitor
EIS	komplex enzym-inhibitor-substrát
ES	komplex enzym-substrát
Ch	cholin
ChE _s	cholinesterázy
I	inhibitor
K _i	inhibiční konstanta
K _M	Michaelisova konstanta
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
OP	organofosfáty

P	produkt
PTCh(I)	propionylthiocholin jodid
RS	reakční směs
TNB	2-nitro-5-thiobenzoová kyselina
V_{\max}	mezní rychlost

Obsah

1.	Úvod.....	14
2.	Teoretická část	15
2.1	Historie cholinesteráz.....	15
2.2	Genová exprese	18
2.3	Neuromuskulární spojení	20
2.4	Butyrylcholinesteráza.....	23
2.4.1	Genová podstata	23
2.4.2	Struktura	24
2.4.3	Distribuce butyrylcholinesterázy v lidských tkáních.....	25
2.4.4	Funkce butyrylcholinesterázy.....	26
2.4.5	Potenciální terapeutické použití lidské BChE pro intoxikaci kokainem a závislost na kokainu.....	27
2.5	Acetylcholinesteráza	28
2.5.1	Struktura	28
2.6	Neuropsychické choroby.....	29
2.6.1	Myasthenia gravis.....	29
2.6.2	Alzheimerova choroba.....	29
2.7	Kinetika neinhibovaných a inhibovaných reakcí katalyzovaných cholinesterázami	32
2.7.1	Hydrolyza acetylcholinu.....	32
2.7.2	Rovnice Michaelise-Mentenové.....	32
2.7.3	Kompetitivní a nekompetitivní inhibice.....	34
2.7.3.1	Kompetitivní inhibitory.....	34
2.7.3.2	Reverzibilní (vratné) nekompetitivní inhibitory	35
2.7.3.3	Ireverzibilní (nevratné) inhibitory.....	35
2.7.4	Inhibitory cholinesteráz	35
2.7.4.1	Takrin	35

2.7.4.2	Galantamin	36
2.7.4.3	Donepezil	36
2.8	Stanovení aktivity cholinesteráz analytickými metodami.....	36
2.8.1	Warburgovo manometrické stanovení.....	36
2.8.2	Spektrofotometrické stanovení	37
2.8.3	Potenciometrické metody	38
2.8.4	HPLC.....	38
2.8.5	Fluorometrické metody	38
2.8.6	Radioizotopické metody	38
2.8.7	Biosenzory	39
2.9	Stanovení aktivity cholinesteráz z plné krve.....	41
2.9.1	Workova modifikace Ellmanovy metody.....	41
2.9.2	WRAIR test	41
2.9.3	Mikro pH stat.....	42
2.9.4	Použití chromogenních disulfidů.....	42
3.	Experimentální část.....	43
3.1	Použité chemikálie a roztoky	43
3.2	Přístroje a pomůcky.....	43
3.3	Metody stanovení	44
3.4	Zpracování krve	44
3.5	Postup měření za použití chromogenu DTNA	44
3.6	Postup měření za použití chromogenu PDS.....	45
3.7	Postup měření za použití jiné koncentrace chromogenu PDS	46
3.8	Stanovení nejvhodnějšího ředění erytrocytů	46
3.9	Stanovení IC ₅₀	47
4.	Výsledky a diskuse.....	48
4.1	Postup měření za použití chromogenu DTNA	48

4.2	Postup měření za použití chromogenu PDS.....	48
4.3	Postup měření za použití jiné koncentrace chromogenu PDS	49
4.4	Stanovení nejvhodnějšího ředění erytrocytů	49
4.5	Stanovení IC ₅₀	50
5.	Závěr	51
	Přílohy:	52
	Zdroje	63

1. Úvod

Cholinesterázy jsou enzymy patřící do skupiny esteráz, mezi které řadíme acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Oba enzymy se navzájem liší substrátovou specifitou a místem exprese. Výzkum acetylcholinesterázy může být zásadní pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, studium butyrylcholinesterázy např. při léčbě kokainové závislosti. [1]

Inhibitory cholinesteráz jako např. galantamin, donepezil nebo rivastigmin se používají pro zmírnění příznaků Alzheimerovy choroby, tím, že zvyšují cholinergní neurotransmisu. Inhibitory mají různou specifitu a inhibiční aktivitu. [2]

Sledování aktivity cholinesteráz lze mnoha analytickými postupy, mezi nejpoužívanější patří Ellmanova spektrofotometrická metoda, včetně jejich modifikací. Na vzestupu jsou také biosenzory, které jsou atraktivní kvůli svojí miniaturizaci, přenositelnosti a jednoduchosti. Při stanovení cholinesteráz z plné krve je vhodná např. spektrofotometrie s použitím chromogenních disulfidů. [1]

Výzkum cholinesteráz není důležitý jen v oblasti neurodegenerativních onemocnění, ale i v jiných sektorech např. farmakologii, v zemědělském průmyslu a armádě. [1]

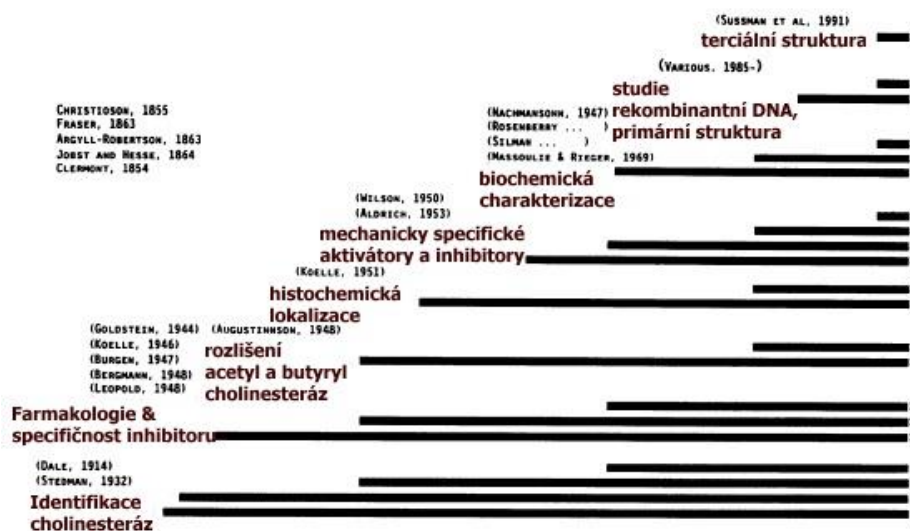
2. Teoretická část

2.1 Historie cholinesteráz

Výzkum cholinesteráz (ChEs) předchází jejich samotné identifikaci jako enzymů a ve skutečnosti sahá až do poloviny 19. století. Různí badatelé byli fascinováni farmakologickými účinky puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*) na počátku šedesátých let 19. století, kdy se ke zkoumání jeho farmakologie použily jak testy na zvířatech, tak samo podávání. Argyll-Robinsonovy popisy jeho odpovědí na vlastní podání extraktů do jednoho oka a druhého oka jako odpovídající kontroly jsou zvláště poučné. [3] První organofosfátový inhibitor cholinesteráz byl syntetizován ve stejném období Clermontem. [2]

V roce 1914 byl vydán rukopis sira Henryho Dale o nikotinových a muskarinových účincích esterů cholinu (Ch), objevil koncept fyzostigminu inhibujícího enzym zodpovědný za degradaci přírodního neurotransmiteru v cholinergním nervovém systému. [4] Nicméně název cholinesteráza byl vytvořen v novinách organickým chemikem, Stedmanem asi o 18 let později. [5]

Přehled výzkumu cholinesteráz od Daleove studie odhalil několik důležitých trendů, z nichž některé jsou znázorněny na obr. 1.



Obrázek 1: Vývoj v oblasti cholinesteráz [1]

Za prvé, hybnost v poli byla a nadále je podporována dvěma vnitřními atributy enzymu. Jedná se o vysokou katalytickou kapacitu a jeho citlivost na množství přírodních a umělých inhibitorů. [6]

Velké množství tkáňového homogenitu spolu s hydrogenuhličitanovým pufrům umožnilo měření v heterogenních systémech surovými Warburgovými manometrickými metodami v prvních letech, což usnadnilo pozdější histologickou detekci aktivity a umožnilo identifikaci enzymových izoform na základě hydrodynamických vlastností. [7]

Výzkum v této oblasti je určen inovacemi a, jak je znázorněno na obr. 1, nový vývoj vždy posiluje probíhající výzkum ve stanovených oblastech. Pokrok v této oblasti do značné míry závisí na novém technologickém vývoji a aplikacích. [8]

Po druhé světové válce a obavách ze zákeřného používání organofosfátů byl výzkum zaměřen na specifčnost a farmakologické působení možných přítomných inhibitorů farmakologického a chemického dovozu. Toto období zjistilo, že podstatná část výzkumných pracovníků ve farmakologické komunitě začala pracovat na cholinesterázách, což mělo mezinárodní dopad. Krátce nato nastal důležitý vývoj v histochemických technikách a v odlišení acetyl – od butyrylcholinesteráz. Příspěvky Irwina Wilsona v 50. letech 20. století na směřování enzymových inhibitorů a reaktivátorů a na vymezení jednotlivých kroků v reakčním mechanismu jsou obzvláště pozoruhodné, protože předcházely zkoumání jiných na místě zaměřených značení a afinitních metodách pro modifikaci a čištění enzymů. [9] Porozumění mechanismům působení inhibitorů a jejich široké strukturální rozmanitosti nyní poskytuje bohatou farmakologii pro místně specifický výzkum mutagenese, oblast, jež má velký potenciál. Biochemické aplikace při čištění a charakterizaci acetylcholinesterázy (AChE) v laboratořích Wilsona a Davida Nachmansohna v Columbii poskytly substrát a také vychovali Izraela Silmana a Terrona Rosenberryho, dva přední vědce, kteří přispěli k biochemické a kinetické charakterizaci enzymu za poslední dvě desetiletí. [10] Objev Jean Massouliého a Françoise Riegera v roce 1969 o rozměrově asymetrické formě AChE obsahující kolagenní strukturu vytvořilo novou dimenzi studia polymorfismu cholinesteráz. Je pozoruhodné, že struktura AChE obsahující kolagen byla mezi membránovými proteiny jedinečná a teprve nedávno bylo zjištěno, že další buněčné povrchové proteiny jsou sestavovány podobným způsobem. [11]

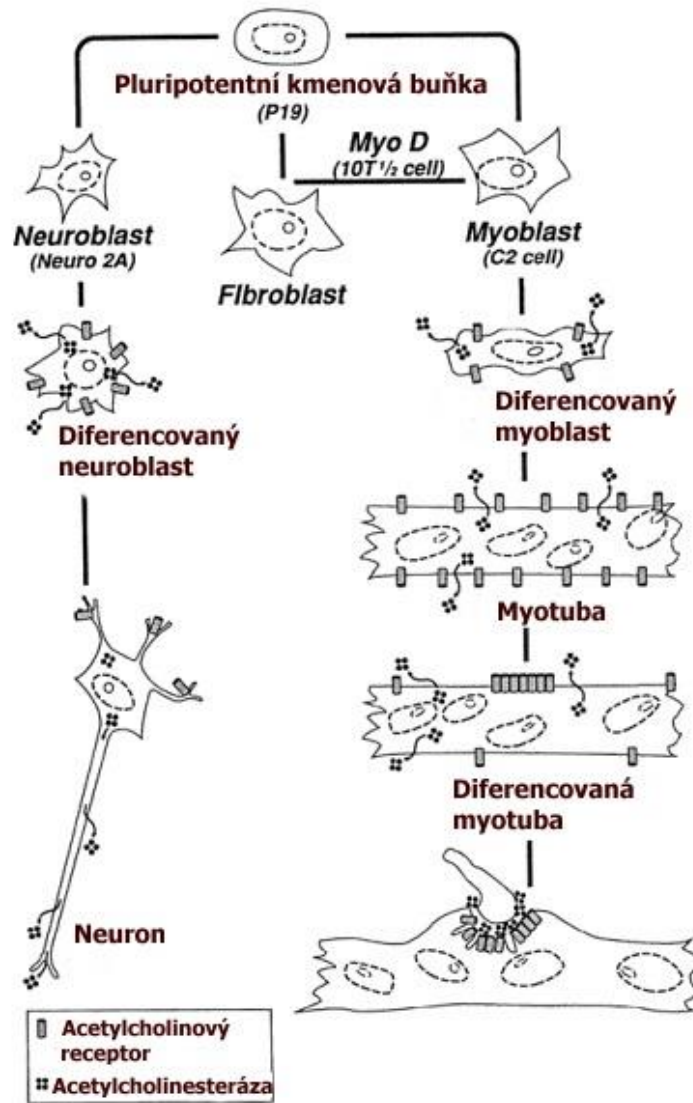
Technologie rekombinantní DNA byla přirozeným směrem pro výzkum cholinesterázy v 80. letech 20. století. Počáteční klonování genu AChE ukázalo, že sdílí homologii globální sekvence pouze s thyroglobulinem, ale za posledních 6 let se proteiny homologní s cholinesterázou rozšířily na rozsáhlou, ale funkčně eklektickou rodinu, z nichž ne všechny fungují jako hydrolázy. [12] Rodina nyní zahrnuje taktiny, které jsou důležité pro heterologní

buněčné kontakty. Tato strukturální podobnost může poskytnout indikaci pro nekatalytickou funkci cholinesteráz ve vývojových procesech. Nedávná zpráva o krystalové struktuře AChE rejnoka elektrického s vysokým rozlišením přidává do struktury kritický třetí rozměr. Porovnání trojrozměrných struktur také ukazuje, že určité karboxypeptidázy a dehalogenázy sdílejí ve své páteři společný vzorec skládání, a to i přesto, že neexistuje významná sekvenční identita. Jak studie rekombinantní DNA, tak i krystalografické studie kriticky závisely na chemii bílkovin, aby poskytli známou sekvenci pro molekulární klonování a pro samotný krystalický enzym. [13]

Průzkumy cholinergního nervového systému nadále přinesly řadu seminárních objevů ve farmakologii a neurobiologii; mezi ně patří identifikace prvního neurotransmiteru, počáteční rozlišení subtypů receptoru, demonstrace kvantového uvolňování neurotransmiteru, první molekulární charakterizace a rekonstrukce neurotransmiterového receptoru a biofyzikální měření kanálů řízených ligandem prostřednictvím oprav a analýzy šumu. K tomu můžeme nyní přidat krystalovou strukturu AChE, protože se zdá, že se jedná o první synapticky lokalizovaný proteinový integrál neurotransmíse, který má známou trojrozměrnou strukturu. [14]

2.2 Genová exprese

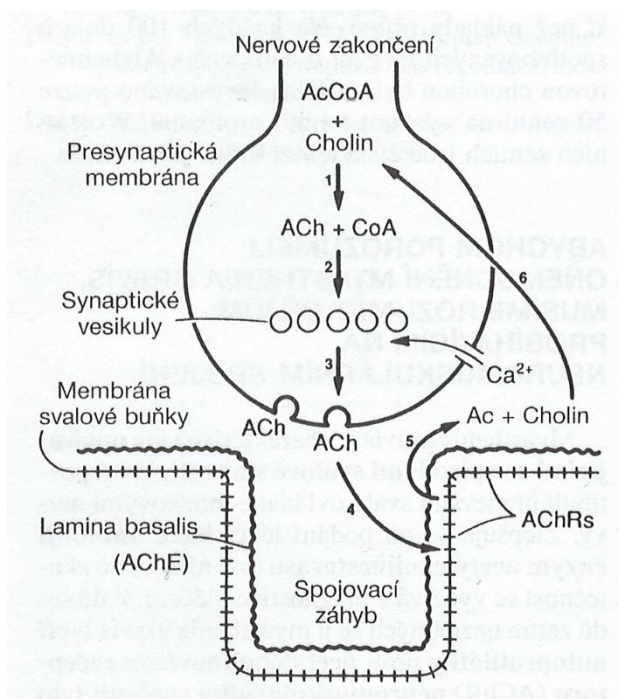
Charakterizace celých genů kódujících rejnočí, myší a lidské AChE poskytuje strukturální základ pro studium regulace exprese genu kódujícího AChE. Exprese AChE má několik charakteristických rysů. Za prvé, exprese AChE je přesně regulována v hematopoetickém systému, nervovém systému a ve svalu. [15] V hematopoetickém systému exprimují enzym pouze buňky určitých linií, zatímco v kosterním svalu se zdá, že celková exprese je koordinována s expresí nikotinového acetylcholinového receptoru (nAChR) v diferenciaci a synaptogenezi svalových buněk, znázorněno na obr. 2. Zatímco detaily exprese nikotinového receptoru a AChE se liší v programu diferenciaci svalových buněk, k podobnému zvýšení celkové genové exprese dochází při diferenciaci kmenových buněk na myoblasty, myoblasty na tvorbu myotub a inervace. Bude tedy zajímavé porovnat transkripční rychlosti, stabilitu mRNA a účinnost translace spojené s takovými událostmi pro tyto dva proteiny. [16] Studie rychlostí transkripce pro AChE a nAChR, exprese promotoru-reportérového genu a degradace mRNA v přítomnosti inhibitorů syntézy proteinů ukazují, že zvýšená hladina mRNA spojená s fúzí myoblastů s myotubami je způsobena stabilizací AChE mRNA, zatímco transkripční aktivace je zodpovědná za zvýšení mRNA kódující nAChR podjednotky ve stejném fúzním kroku. Zdá se tedy, že AchR a AChE používají odlišné diferenciacní body v diferenciaci svalových buněk. [17]



Obrázek 2: Schematické znázornění diferenciace kmenových buněk při tvorbě neuronálních a svalových linií. [1]

2.3 Neuromuskulární spojení

Toto spojení je tvořeno z jediného nervového zakončení odděleného od postsynaptické oblasti synaptickou štěrbinou. Specializovanou částí je motorická ploténka v buněčné membráně, která se účastní spojení. Junkční záhyby jsou výrazné, obsahují velké množství acetylcholinových receptorů, které jsou těsně u nervového zakončení. Nervosvalové spojení lze popsat šesti kroky, viz obr. 3. [18]



Obrázek 3: Děje neuromuskulárního spojení. [18]

1. Syntéza acetylcholinu (ACh) probíhá v cytosolu nervového zakončení, zde je důležitý enzym acetylcholintransferáza, který katalyzuje reakci popsanou v rovnici 2. 1.



2. Dále je acetylcholin zabudován do částic, které jsou vázané na membráně, tzv. synaptické vezikuly, zde je skladován.
3. Pomocí exocytosis dochází k uvolnění acetylcholinu ze synaptických vezikul do synaptické štěrbinou. Dochází přitom k fúzi vezikul a presynaptické membrány. V klidovém stavu je spontánně uvolňováno asi 10 000 molekul, ty vyvolávají malé potenciály na motorické ploténce. Když je nervové zakončení depolarizováno přenosem nervového impulsu, dojde k otevření napětově řízených Ca²⁺ kanálů, což

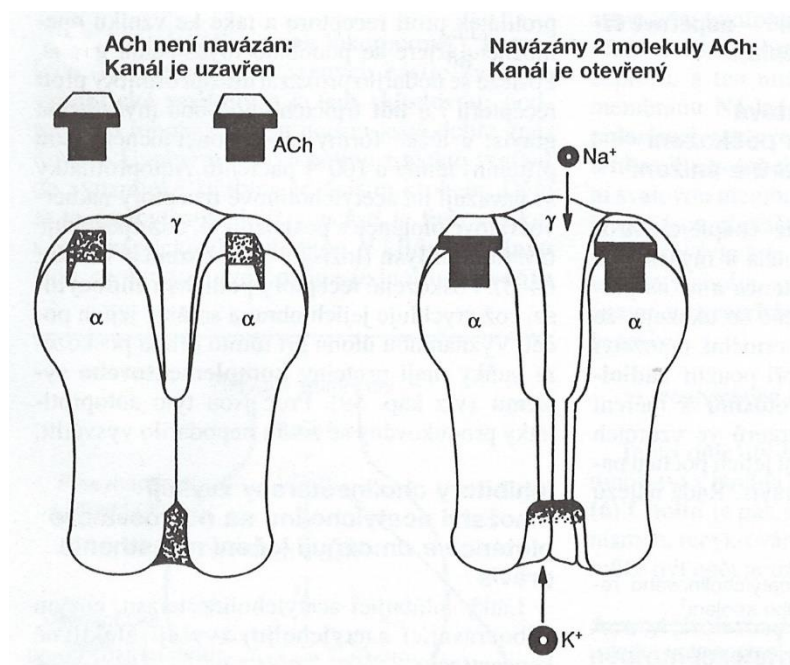
umožňuje vniknutí Ca^{2+} ze synaptického prostoru do nervového zakončení. Ca^{2+} je důležitý pro exocytosu, při které se uvolňuje acetylcholin do synaptické štěrby.

- Acetylcholin poté prostupuje ke svým receptorům. Když se na příslušný receptor naváží dvě molekuly acetylcholinu, tak dojde ke konformační změně, dojde k otevření transmembránového kanálku receptoru a kationty mohou proudit skrz membránu, znázorněno na obr. 4. Vstoupení sodných iontů vyvolá depolarizaci svalové membrány a vzniká ploténkový potenciál. Ploténkový potenciál depolarizuje okolní svalovou membránu a vzniká akční potenciál, který vyvolává kontrakci.
- Když se kanál uzavírá, acetylcholin je uvolňován a je hydrolyzován enzymem acetylcholinesterázou, která katalyzuje reakci popsanou v rovnici 2. 2.



Acetylcholinesteráza je ve velkém množství přítomna v bazální lamině synaptického prostoru.

- Cholin je pak za pomoci aktivního transportu recyklován do nervového zakončení a může být znovu použit pro syntézu acetylcholinu. [18, 19]



Obrázek 4: Změna konformace receptoru po navázání dvou molekul Ach. [20]

Receptory jsou dvojího druhu, nikotinové a muskarinové (označené podle aktivujícího účinku příslušných alkaloidů). Nikotinový receptor je v nervosvalové ploténce a v sympatických gangliích. Je složen z pěti podjednotek a obsahuje dvě vazebná místa pro acetylcholin. Kanály, které se otevřou pro sodné a draselné kationty jsou otevřeny na velmi krátkou dobu (1–2 ms), takže se tento receptor řadí mezi velmi rychle reagující. Muskarinový receptor je v mozkových buňkách i v periferním nervstvu a pracuje o dost pomaleji, má dlouhou dobu latence (100 ms) a jeho účinek trvá 300–500 ms. Muskarinový receptor se odlišuje od nikotinového i svou stavbou. Je tvořen bílkovinným řetězcem, který se v meandrovitém uspořádání proplétá membránou neuronu, spolupracuje s G-proteiny a tvoří tzv. druhého posla (záleží na typu receptoru cAMP nebo IP₃), výsledkem je pak změna koncentrace vápenatého kationtu. Jak nikotinový, tak i muskarinový receptor může být blokován, aktivován či naopak tlumen různými endogenními a cizorodými látkami. Nikotinový receptor je inhibován sukcinylcholinem a šípovým jedem *D*-tubokurarinem, muskarinový receptor je citlivý na atropin. [18, 19, 21]

Z medicínského hlediska je nejdůležitější inhibice acetylcholinesterázy. Alkaloid fyzostigmin a jemu podobná farmaka tvoří s acetylcholinesterázou kovalentní sloučeniny, a ty téměř nelze hydrolyzovat, fyzostigmin se používá například při léčbě očního glaukomu. Ještě lepšími inhibitory tohoto enzymu jsou organické fluorofosfáty, které se napojují kovalentní vazbou na hydroxylovou skupinu serinu v enzymové molekule, vazba je tak silná, že by v těle vydržela i několik týdnů, pokud by to organismus přežil. Specifickým antidotem při otravě organofosfáty jsou reaktivátory acetylcholinesterázy a lze využít i atropin, který stimuluje sympatikus, protože při otravě organofosfáty je charakteristické, že je trvale drážděn parasympatikus, to má za následek ochrnutí dýchacího svalstva. [18, 20]

2.4 Butyrylcholinesteráza

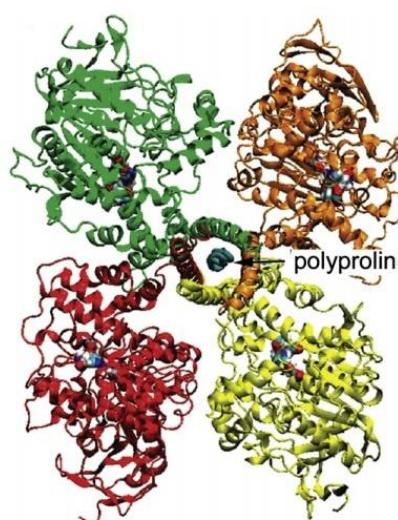
Butyrylcholinesteráza (BChE) byla studována od 40. let 20. století. Počáteční práce zjistila, že existují dva druhy cholinesterázy a že pouze acetylcholinesteráza má rozhodující roli v přenosu nervových impulsů. [22] Zavedení sukcinylcholinu jako svalového relaxanta v 50. letech přineslo poznání, že někteří lidé mají dědičnou formu BChE, která není schopna hydrolyzovat sukcinylcholin. Kromě toho bylo zjištěno, že někteří jedinci nemají vůbec žádnou aktivní BChE a že i přes úplnou absenci BChE jsou jedinci zdraví. Tato informace vedla k myšlence, že BChE nemá žádnou fyziologickou funkci, a proto si nezaslouží studium. [23] Vědecká literatura do roku 1990 je na téma BChE řídká. K dramatickému nárůstu zájmu o BChE došlo poté, co Clarence Broomfield z Ústavu chemické obrany Aberdeen Proving Ground, provedl zásadní experiment. Ukázal, že opice předem ošetřené BChE jsou chráněny před toxicitou nervových látek. Jeho výsledky byly potvrzeny i u jiných živočišných druhů. Úžasné výsledky přesvědčily představitele Pentagonu, že je k dispozici léčivo pro toxicitu nervových látek. Zvířata bezpečně tolerují dávky BChE, které překračují endogenní hladiny tisíckrát. [24] Absence kritické fyziologické funkce pro BChE je výhodou, protože přebytek BChE neovlivňuje žádnou funkci. V současné době vyvíjí několik laboratoří metody dodávání lidského BChE v dlouhodobých formulacích, jako jsou nanočástice nebo adenovirus. [25] Vize, jak používat BChE pro jiné zdravotní problémy, se rozšířila o léčbu závislosti na kokainu. [26] Použití BChE k léčbě kokainové toxicity má však hlavní omezení. Klinické použití BChE závisí na základních vědeckých informacích o proteinu BChE, k němuž přispělo mnoho vědců po celé desetiletí. K dispozici je vynikající hloubkový přehled úlohy BChE v neurotransmisí. [27] Další recenze diskutují o BChE jako o biomarkeru expozice organofosfátů a poukazují na další potenciální bioscavengery. [28]

2.4.1 Genová podstata

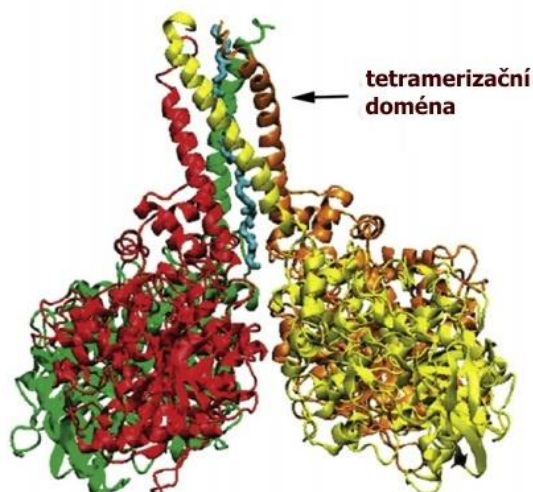
Butyrylcholinesteráza patří do rodiny serinových hydroláz definovaných jako enzymy, jejichž aktivní stránka zahrnuje serin. Katalýza pomocí BChE vyžaduje funkční katalytickou trojici: Ser 198, Glu 325 a His 438. [29] Gen BChE je umístěn na dlouhém rameni chromozomu 3. Neexistují žádné alternativně sestřížené formy lidské BChE. Rozpustná globulární tetramerická BChE v plazmě je stejná jako formy vázané na membránu ve svalů a mozku a jsou kódovány stejnou BChE mRNA. [30]

2.4.2 Struktura

Krystalová struktura lidského BChE monomeru byla vyřešena pro rekombinantní formu BChE, která byla zkrácena na C-konci o 40 aminokyselin v tetramerizační doméně. Kromě toho byl rekombinantní protein BChE mutován, aby se snížil počet asparaginem vázaných glykanů z 9 na 4. [31] Nativní BChE tetramer nebyl od roku 2014 krystalizován, ale model byl vytvořen týmem z University of Kentucky. Na obr. 5 je znázorněn pohled shora na tetramer BChE ukazující čtyři identické podjednotky (každá 85 kDa), které spolu navzájem interagují prostřednictvím svazku se čtyřmi spirály na koncích C. Peptid bohatý na polyprolin leží ve středu svazku čtyř šroubovice. Svazek čtyř šroubovice je doménou tetramerizace. Na obr. 6 je zobrazen boční pohled na modelovaný tetramer BChE ukazující čtyřhelixový svazek vyčnívající z globule. [32] Peptid bohatý na polyprolin ve středu svazku se čtyřmi spirálovými vazbami je vázán vodíkem na tři zbytky tryptofanu a na tři další hydrofobní zbytky, všechny na stejné straně amfifilního helixu. [33]



Obrázek 5: Pohled shora na tetramer BChE s polyprolinem ve středu. [32]



Obrázek 6: Boční pohled na tetramer BChE. Čtyři identické podjednotky se sestavují do tetrameru prostřednictvím interakce polyprolinového peptidu s BChE tetramerizační doménou na C-konci. [32]

2.4.3 Distribuce butyrylcholinesterázy v lidských tkáních

Názvy sérová cholinesteráza a plazmatická cholinesteráza naznačují, že BChE je přítomná výhradně v krvi. Tato jména jsou však zavádějící. Mnoho tkání kromě plazmy a séra obsahuje BChE. Studie v Indii analyzovala aktivitu BChE v pitevnických tkáních dvou dospělých mužů, z nichž jeden zemřel při nehodě a druhý pověšením. Tkáně byly odebrány do 10 hodin od smrti. Pro srovnání byla každá tkáň testována také na aktivitu AChE. [34]

Tabulka 1 srovnává obsah enzymů BChE a AChE v dospělých lidských tkáních. Dle výsledku patrných v tabulce 1 je možné odhadnout, že lidské tělo obsahuje celkem 58 mg BChE a 4,34 mg AChE. Dospělý člověk má tedy 10krát více BChE než AChE. Každá tkáň má oba enzymy. Nejbohatším zdrojem enzymu BChE jsou plazma a játra následovaná kůží a svaly nohou. Nejbohatším zdrojem enzymu AChE jsou svaly nohou, kůže a mozek. [35] Laboratorní postup Northern blot ukázal, že nejhojnější lidská BChE mRNA byla v játrech, plicích, mozku a srdci, což je výsledek konzistentní s relativním obsahem enzymu BChE v játrech, plicích a mozku. Zdá se však, že srdce má více mRNA BChE, než by se očekávalo od nízkého obsahu enzymu BChE v tabulce 1. Lidská AChE mRNA byla nejhojnější v kosterním svalu, což odpovídá relativně vysokému obsahu enzymu AChE ve svalech nohou. Mozek měl 4krát menší AChE mRNA než kosterní sval. Nejnížší hladiny AChE mRNA byly v placentě, ledvinách a pankreatu. [36]

Tabulka 1: Distribuce enzymů BChE a AChE v dospělém lidském těle. [34, 35, 36]

Tkáň	BChE [mg]	AChE [mg]
Plazma	16	0,003
Játra	13	0,10
Kůže	7	0,77
Svaly nohou	6	2,3
Tenké střevo	4	0,14
Plíce	3	0,06
Mozková kůra	3	0,46
Žaludek	1,8	0,05
Slezina	1	0,05
Ledviny	1	0,02
Mozeček	0,8	0,25
Srdce	0,6	0,06
Prodloužená mícha	0,085	0,08
Štítná žláza	0,0085	0,002
Celkem	58	4,34

2.4.4 Funkce butyrylcholinesterázy

Obecně se uznává, že BChE hraje roli při detoxikaci jedů, které jsou požívány nebo vdechovány. Fyzostigmin puchýřnatce jedovatého a kokain v listech rostliny koky jsou přirozeně se vyskytující toxické látky, které jsou hydrolyzovány BChE na neaktivní produkty. Estery organofosforu včetně nervových činidel, pesticidů a neurotoxické anticholinesterázy zvané anatoxin produkované modro-zelenými řasami *Anabaena* jsou zachyceny a ničeny pomocí BChE. [37] Jiné přirozeně se vyskytující organofosforové estery produkované bakteriemi *Streptomyces* a mořskou houbou *Ulova* byly identifikovány jako inhibitory AChE, a proto pravděpodobně také inhibují BChE, i když inhibice BChE nebyla testována. [38, 39] Aspirin je hydrolyzován pomocí BChE na kyselinu salicylovou. Heroin je diester, který se přeměňuje na morfin působením BChE. Bambuterol je prekurzorové léčivo, které je pomocí BChE přeměněno na aktivní antiastmatické léčivo terbutalin. [40]

Na laboratorních myších proběhla studie, kterou byla dokázána schopnost BChE zastoupit AChE v krizových situacích při hydrolyze acetylcholinu. Za normálních podmínek BChE nijak nepřispívá k hydrolyze acetylcholinu. [34]

Oktanoyl ghrelin je peptid 28 aminokyselin esterifikovaný na Ser 3 na kyselinu oktanovou. Je zodpovědný za apetit a podporuje zvyšování hmotnosti tlumením katabolismu tuků. Lidská BChE hydrolyzuje tento peptid, a tudíž se předpokládá, že nedostatek BChE je spojeno se sníženým tukovým katabolismem. [41]

2.4.5 Potenciální terapeutické použití lidské BChE pro intoxikaci kokainem a závislost na kokainu

Kokain je metabolizován na neaktivní produkty působením lidské BChE. [42] Předpokládalo se, že BChE se zlepšenou aktivitou kokainové hydrolázy by mohlo být terapeuticky užitečné pro léčbu kokainové toxicity, a dokonce i závislosti na kokainu u lidí. Simulace molekulární dynamiky byly použity k návrhu 5 mutací aminokyselin v aktivním místě BChE, které zvýšily katalytickou účinnost vůči kokainu 1800krát ve srovnání s přirozeným typem BChE. [43] Mutovaná BChE je tak účinná, že získala název kokainová hydroláza (CocH). CocH by se mohl stát velmi důležitým léčivem pro prevenci relapsu užívání drog. Studie na potkanech ukázaly, že CocH genový přenos potlačil opětovné navázání chování při hledání kokainu po dobu nejméně šesti měsíců. [44] CocH ničí lék dříve, než se dostane do mozku, čímž blokuje prospěšné účinky kokainu. Lidská BChE pro léčbu zneužívání kokainu je tedy na dobré cestě stát se lékem schváleným Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv. [45]

2.5 Acetylcholinesteráza

Hlavní biologickou úlohou acetylcholinesterázy je ukončení přenosu impulsů na cholinergních synapsích rychlou hydrolýzou neurotransmiteru, acetylcholinu. [46] V souladu s tímto požadavkem má AChE pozoruhodně vysokou specifickou aktivitu, která pracuje rychlostí, která se blíží rychlosti difúzně regulované reakce. Silná akutní toxicita organofosforových jedů je způsobena především skutečností, že jsou silnými ireverzibilními inhibitory AChE a vytvářejí kovalentní vazbu se serinovým zbytkem v aktivním místě. [47] AChE inhibitory se používají při léčbě různých neuromuskulárních poruch a poskytly první generaci léčiv pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD). [48] Znalost 3D struktury AChE je proto nezbytná pro pochopení její pozoruhodné katalytické účinnosti, pro racionální návrh léčiv a pro vývoj terapeutických přístupů k intoxikaci OP. Strukturální informace o Ach-vazebném místě AChE nám mohou pomoci pochopit molekulární základ pro rozpoznávání Ach jinými proteiny vázajícími Ach, jako jsou muskarinové a nikotinové Ach receptory. [49]

2.5.1 Struktura

Acetylcholinesteráza je vyjádřena jako repertoár molekulárních forem lišících se v kvartérní struktuře a způsobu ukotvení, jehož vzorec se liší od tkáně k tkáni, a může odrážet prostorové a časové požadavky jednotlivých synapsí. [50] Tento strukturální polymorfismus vychází z alternativního sestřihu na C-konci, který usnadňuje spojení se strukturálními proteiny. Varianta ve tvaru T (AChET) je jedinou formou exprimovanou v mozku a ve svalech normálních dospělých savců, která vytváří monomery, dimery a tetramery, jakož i hetero-oligomery s kolagenovým a hydrofobním sledem. [51] Funkční druhy AChE na cholinergních synapsích obratlovců jsou tvořeny čtyřmi podjednotkami AchET asociovanými buď s kolagenním proteinem ColQ, nebo s transmembránovým prolinem, bohatým membránovým kotevním proteinem (PriMA). Tyto heteroligomerní formy AchET a homologické druhy butyrylcholinesterázy jsou jedinečné struktury. [52] U druhů kolagenových jsou jeden, dva nebo tři AChET tetramery připojeny ke třem kolagenovým vláknům. Každý takový hetero-tetramer je asymetrický, tj. dvě AChE podjednotky jsou disulfidově vázány prostřednictvím svých C-koncových Cys zbytků, zatímco odpovídající Cys zbytek dalších dvou podjednotek vytváří disulfidové vazby s kolagenovým vláknem. [53] Nicméně kvartérní struktura je udržována, i když jsou sníženy všechny meziřetězcové disulfidy a katalytické a strukturální podjednotky jsou stále spojovány, když jsou mutovány příslušné zbytky Cys v AChE nebo ColQ; tyto disulfidy tedy nejsou nutné k udržování kvartérní struktury. [54]

2.6 Neuropsychické choroby

2.6.1 Myasthenia gravis

Onemocnění, které je charakterizované opakující svalovou slabostí, postiženy jsou především ty svaly, které jsou ovládané mozgovými nervy. Výrazné zlepšení poskytují léky, které inhibují acetylcholinesterázu. Při tomto onemocnění se vytváří autoprotilátky proti acetylcholinovému receptoru, tím dochází k redukci jejich počtu. [55] Elektromyografie ukázala, že hlavní problém je na motorické ploténce. Je tedy prokázáno, že se uvolňuje normální množství acetylcholinu, ale je výrazně sníženo množství receptorů ve svalech. Řada studií se domnívá, že patogeneze je zhoršena poruchou imunitního systému, jelikož řada pacientů se potýká s hypoplazií v brzlíku nebo s nádory brzlíku. Kolem 10 % pacientů má i jiné autoimunitní onemocnění. [56]

Inhibice acetylcholinesterázy vede ke zvýšení koncentrace acetylcholinu na motorické ploténce a prodlužuje jeho účinek. Inhibitory jsou hlavním léčebným prostředkem myasthenie gravis. Existují dva typy inhibitorů, reverzibilní a ireverzibilní. Reverzibilní mohou působit krátkodobě i dlouhodobě, krátkodobé jsou vhodné pro diagnostiku jako například edrophonium (Tensilon), po jehož podání by měl pacient s myasthenia gravis pocítit zlepšení svalové síly. Pyridostigmin a neostigmin působí dlouhodobě a jsou využívány k léčbě onemocnění. [57] Vhodnou léčbou může být i potlačení nadměrné imunitní odpovědi za pomoci kortikosteroidů či cytotoxických imunosupresiv jako je např. azathioprin. Příznivě může působit i thymektomie, což je operativní odejmutí brzlíku. Autoprotilátky lze snížit dočasně plazmaferézou. [58]

2.6.2 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je degenerativní porucha CNS se závažnými následky: je postiženo až 20 % všech jedinců starších 80 let. Ve vyspělých zemích je Alzheimerova choroba čtvrtou hlavní příčinou úmrtí po srdečních chorobách, rakovině a cévní mozkové příhodě. Tato nemoc představuje velký veřejný problém, a to jak kvůli počtu postižených osob, tak kvůli závažnosti doprovodných postižení. [59]

V současné době není známo, že by farmakologická činidla byla účinná při léčbě tohoto onemocnění. Snížený počet cholinergních neuronů v bazálních předních mozkových jádrech a snížené hladiny cholinacetyltransferázy u pacientů s Alzheimerovou chorobou však zvyšuje možnost, že alespoň některá z poruch pozorovaných u postižených pacientů by mohla být důsledkem ztráty cholinergní aktivity. [60]

Pravděpodobný význam cholinergního deficitu je podporován také psychofarmakologickými studiemi. Anticholinergní léky zhoršují paměť u osob, které netrpí demencí, a způsobují příznaky podobné těm, které se vyskytují v raných stádiích Alzheimerovy choroby. [61]

V důsledku toho byla pro léčbu navržena léčiva, která zvyšují cholinergní aktivitu u člověka. Jedním přístupem je inhibice acetylcholinesterázy, která však nepřímo vede k muskarinickým a nikotinovým účinkům. Fyzostigmin, nejjednodušší dostupný lék tohoto typu, je navíc velmi krátkodobě působící (minuty). Bylo však prokázáno, že způsobuje určité zlepšení paměti u pacientů s tímto onemocněním. [62]

Rozsah zlepšení úzce souvisel se stupněm inhibice AChE, měřeným v mozkomíšním moku, a tedy s množstvím fyzostigminu dosahujícího CNS. Biologická dostupnost orálně podaného fyzostigminu je však nepředvídatelná, což ztěžuje manipulaci s tímto léčivem na klinice. [63]

Další inhibitor acetylcholinesterázy, takrín (1,2,3,4-tetrahydro-9-9 aminoakridin, THA), způsobil významné zlepšení u pacientů, pokud byl podáván v průměrném období 12,6 měsíců. Tato zjištění však nebyla obecně akceptována a nyní probíhá několik větších studií s takrínem u pacientů s Alzheimerovou chorobou. [64]

Existence acetylcholinesterázy v různých molekulárních formách je dobře prokázána. Polymorfni enzym může být klasifikován na základě charakteristik rozpustnosti a sedimentačních rychlostí stanovených centrifugací v gradientech hustoty sacharózy. Tyto formy jsou rozděleny podle globulární formy sestávající z monomerních (G1), dimerových, (G2) a tetramerových (G4) struktur. Ačkoli význam různých molekulárních forem není dosud jasný, předpokládá se, že jejich distribuce ve tkáni odráží specifické fyziologické funkce. [65] V lidském mozku se celkové hladiny AChE a distribuce molekulárních forem liší v různých oblastech. Nejhojnější formou nalezenou v mozku je tetramerická G4. Tato forma je funkčně důležitá pro degradaci Ach na cholinergních synapsích, ale další navrhované fyziologické funkce AChE v CNS jsou pravděpodobně zprostředkovány prostřednictvím G4 AChE. V menším množství je přítomna i monomerní G1 v lidském mozku. [66]

Během stárnutí a dramatičtěji při Alzheimerově chorobě je forma G4 snížena v neokortexu a hippocampu, zatímco nebyla nalezena žádná změna nebo menší pokles formy G1. To má za následek zvýšení poměru enzymové aktivity G1 / G4, což je v literatuře dobře zdokumentováno. V experimentech byl studován vliv různých inhibitorů acetylcholinesterázy

(AChE-I) na G1 a G4 formy AChE izolované z mozkové tkáně *post mortem* od pacientů s Alzheimerem. [67]

2.7 Kinetika neinhibovaných a inhibovaných reakcí katalyzovaných cholinesterázami

2.7.1 Hydrolýza acetylcholinu

Hydrolýza acetylcholinu pomocí cholinesteráz je popsána reakcí v rovnici 2. 3.



E je enzym (BChE nebo AChE), S je substrát (ACh nebo BCh), ES je komplex enzym-substrát, který spadá do produktů hydrolýzy P₁ a P₂ (cholin) a (kys. octová). Z obecného reakčního schématu je odvozena rovnice Michaelis – Mentenove popisující pokles S nebo produkci P v čase. [68]

2.7.2 Rovnice Michaelise-Mentenové

Koncentrace substrátu, při níž reakce probíhá polovinou maximální rychlosti, se nazývá Michaelisova konstanta (K_m). Experimentálně může být stanovena vynesáním poměru rychlosti neinhibované reakce v a rychlosti inhibované reakce v_i na koncentraci substrátu [S]. K_m má rozměr molární (látkové) koncentrace.

Jestliže je [S] přibližně rovná K_m, rychlost v reaguje velmi citlivě na změny [S] a reakce s enzymem probíhá přesně polovinou maximální rychlosti V_{max}. Ve skutečnosti přísluší většině enzymů hodnota K_m odpovídající přibližně fyziologické koncentraci jejich substrátů. [69]

Chování mnoha enzymů při změně koncentrace substrátu popisuje rovnice, kterou odvodili Michaelis a Mentenová:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2.4)$$

Závislost počáteční rychlosti enzymově katalyzované reakce na [S] a K_m vysvětluje následující rozbor rovnice 2. 4.

1) [S] je mnohem menší než K_m

Hodnota [S] ovlivňuje hodnotu součtu ve jmenovateli jen velmi málo, takže může být zanedbána. Mezní rychlost reakce V_{max} a K_m jsou konstanty, za jejichž poměr může být dosazena nová konstanta K, což je popsáno v rovnici 2. 5.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} ; v \sim \frac{V_{\max}[S]}{K_m} \sim \frac{V_{\max}}{K_m} [S] \sim K[S] \quad (2.5)$$

kde symbol \sim znamená „je přibližně rovno“. Tedy, je-li koncentrace substrátu menší než jaká je třeba pro dosažení poloviční maximální rychlosti (hodnoty K_m), závisí počáteční rychlost na koncentraci substrátu $[S]$.

2) $[S]$ je mnohem větší než K_m

V tomto případě může být zanedbána K_m , jejíž příspěvek ovlivňuje hodnotu jmenovatele jen velmi málo.

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} ; v \sim \frac{V_{\max}[S]}{[S]} \sim V_{\max} \quad (2.6)$$

Znamená to, že je-li koncentrace substrátu $[S]$ mnohem větší než K_m , je počáteční rychlost v rovna maximální rychlosti V_{\max} , znázorněno v rovnici 2. 6.

3) $[S]$ je rovno K_m

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} ; v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{\max}}{2} \quad (2.7)$$

Je-li koncentrace substrátu rovna K_m , je počáteční rychlost v polovina maximální rychlosti. Tento vztah také ukazuje způsob stanovení K_m , tedy experimentální stanovení koncentrace substrátu, při níž je počáteční rychlost reakce polovinou maximální rychlosti, jak je zobrazeno v rovnici 2. 7.

Mnohé enzymy neposkytují saturační křivku, která by dovolovala určení V_{\max} a tedy i K_m z grafu závislosti v na $[S]$. Je proto výhodné upravit rovnici Michaelise-Mentenové, viz rovnice 2. 8.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2.8)$$

Rovnice 2. 9 je rovnicí přímky.

$$Y = a \times x + b$$

(2. 9)

Výpočet x a y popisuje rovnice 2. 10.

$$y = \frac{1}{v} \quad a \quad x = \frac{1}{[S]} \quad (2.10)$$

Vyneseme-li do grafu y , v závislosti na x , potom úsečka b na ose y odpovídá $1/V_{\max}$ a směrnice přímkou a odpovídá K_m/V_{\max} , Záporná úsečka na ose x může být stanovena položením $y = 0$. Potom je výpočet x zobrazen v rovnici 2. 11.

$$x = -\frac{b}{a} = -\frac{1}{K_m} \quad (2. 11)$$

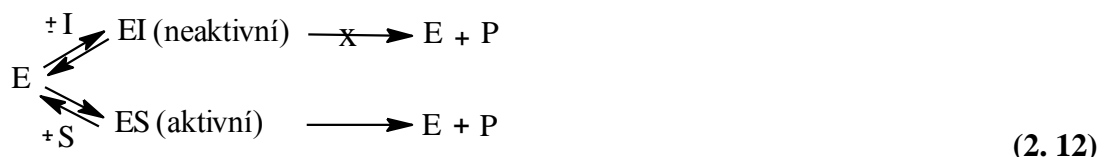
Protože $[S]$ je v jednotkách (mol/l), má i K_m rozměr mol na litr. Rychlost v může být vyjádřena v jakýchkoliv jednotkách, neboť K_m nezávisí na enzymu. [18, 19]

2.7.3 Kompetitivní a nekompetitivní inhibice

Inhibitory enzymové aktivity obvykle rozlišujeme podle toho, zda inhibice je či není snížena zvýšením koncentrace substrátu. Řada inhibitorů ovšem nemá idealizované vlastnosti odpovídající čistě kompetitivní či nekompetitivní inhibici. [70]

2.7.3.1 Kompetitivní inhibitory

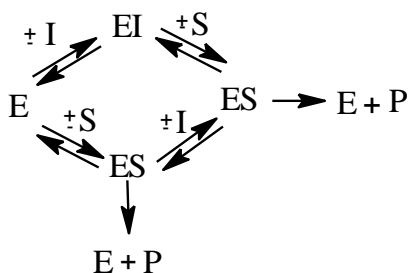
Klasická kompetitivní inhibice nastává ve vazebném místě na enzymu. Inhibitor je svojí strukturou často podobný struktuře substrátu, tím pádem inhibitor a substrát soutěží o vazebné místo na enzymu. Pokud je inhibitor v dostatečném množství, tak substrát vytěsni a vytvoří s enzymem komplex enzym-inhibitor na místo komplexu enzym-substrát, jak je znázorněno v rovnici 2. 12.



Rychlost tvorby produktů, která se obvykle měří, je závislá na koncentraci komplexu enzym-substrát ES . Jestliže se inhibitor I váže na enzym pevně, tak je hodnota inhibiční konstanty K_i malá, což je vlastně disociační konstanta komplexu enzym-inhibitor, takže zbývá málo volného enzymu E pro vazbu se substrátem S , tedy pro tvorbu komplexu ES , tím pádem i pro tvorbu produktů. Stejná koncentrace méně pevně vázaného inhibitoru s větší hodnotou K_i reakční rychlost tolik nesníží. Jestliže přidáme při dané koncentraci I více substrátu S , lze vytěsnit inhibitor z vazebného místa a tím inhibici potlačit. Při dostatečně vysoké koncentraci S bude koncentrace EI zanedbatelně malá a rychlost reakce bude stejná jako v nepřítomnosti inhibitoru. [18, 71]

2.7.3.2 Reverzibilní (vratné) nekompetitivní inhibitory

V tomto případě nenastává soutěž mezi S a I, jelikož inhibitor se svojí chemickou strukturou jen velmi málo podobá struktuře substrátu a také se obvykle váže na jiné vazebné místo enzymu. Reverzibilní nekompetitivní inhibitory snižují maximální rychlost dosažitelnou při daném množství enzymu (snižují V_{max}), obvykle však neovlivňují K_m . Protože se I a S kombinují s různými místy enzymu, může vznikat jak komplex EI, tak i komplex enzym-inhibitor-substrát EIS. Protože se komplex EIS může rozkládat za vzniku produktu pomaleji než ES, může se reakce zpomalit, ale nikoliv zastavit, viz rovnice 2. 13. [73, 74]



(2. 13)

2.7.3.3 Ireverzibilní (nevratné) inhibitory

Při této inhibici dochází ke kovalentní modifikaci enzymu, kovalentně navázaný inhibitor nelze z vazby na enzym odstranit, pokud nedojde k velmi včasnému podání reaktivátorů jako je např. pralidoxim, obidoxim apod. při otravě organofosfáty. Dalším příkladem je řada „enzymových jedů“, jakými jsou např. jodacetamid, ionty těžkých kovů (Ag^+ , Hg^{2+}), oxidační činidla. Protože tyto inhibitory nemají žádnou strukturní podobnost se substrátem, není tato inhibice obecně zmírňována zvýšením koncentrace substrátu. Přítomnost jednoho či více substrátů nebo produktů ovšem může chránit enzym před inaktivací. Reverzibilní a ireverzibilní nekompetitivní inhibice mají podobnou kinetiku. [75]

2.7.4 Inhibitory cholinesteráz

2.7.4.1 Takrin

Takrin je dobře známý lék, dříve používaný k léčbě Alzheimerovy choroby, který inhibuje cholinesterázu, tím zvyšuje koncentraci acetylcholinu v mozku. Předpokládá se, že toto zvýšení je odpovědné za zlepšení paměti při použití takrinu. Takrin je navíc velmi účinný při inhibici plazmatické BChE. Takrin působí jako nekompetitivní reverzibilní inhibitor cholinesteráz, to znamená, že se zvyšující se koncentrací takrinu klesá V_{max} . K ukončení jeho používání vedla především jeho vysoká hepatotoxicita. Takrin se označoval například obchodním názvem Cognex®. [76, 77]

2.7.4.2 Galantamin

Galantamin je reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy. Je také alosterickým modulátorem v místech nikotinových cholinergních receptorů, což potencuje cholinergní nikotinovou neurotransmisi. Používá se při léčbě Alzheimerovy choroby, různých neuromuskulárních poruch a ke snížení svalové relaxace vyvolané kompetitivními neuromuskulárními blokátory. Obchodním názvem může být označován jako Razadyn®. [78]

2.7.4.3 Donepezil

Donepezil hydrochlorid je inhibitor AChE, u kterého se prokázalo, že je účinný při zmírňování kognitivních poruch u pacientů s Alzheimerovou chorobou a je široce předepisován pro léčbu tohoto onemocnění. Donepezil působí jako nekompetitivní reversibilní inhibitor. [79]

2.7.4.4 Rivastigmin

Rivastigmin, karbamátový inhibitor acetylcholinesterázy, se používá k léčbě Alzheimerovy choroby pod obchodním názvem Exelon®. Jeho inhibiční vlastnosti byly také prokázány pro butyrylcholinesterázu. Vlastním mechanismem účinku je tzv. pseudoireverzibilní inhibice cholinesteráz. Dojde tak k zablokování enzymu odbourávajících acetylcholin a ke zvýšení počtu molekul tohoto neuromediátoru. Rivastigmin účinkuje selektivně v hippocampu a neokortexu, tedy oblastech mozku, které jsou při Alzheimerově demenci nejvíce postiženy. Tato vlastnost vyplývá z přednostní inhibice G1 izofomy acetylcholinesterázy. [80]

2.8 Stanovení aktivity cholinesteráz analytickými metodami

2.8.1 Warburgovo manometrické stanovení

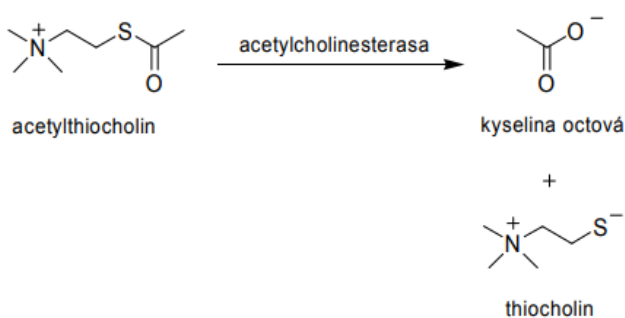
Princip manometrického stanovení je založen na měření oxidu uhličitého uvolněného z hydrogenuhlčitanového pufru. Takový pufr se rozloží kyselinou octovou, která se uvolní hydrolyzou ACh. [7]

Manometrická metoda patří mezi nejranější metody stanovení cholinesteráz. Lindstrom-Lang a Glick představili Warburgovu manometrickou metodu, která vyžadovala značné množství tkáňového homogenátu a omezila výběr média na pufr obsahující vodík a uhlík. Modifikací bylo možné stanovit aktivitu cholinesteráz v čase. Později Augustinsson a kolegové představili modifikaci Warburgovy metody, při které bylo využito vysušeného vzorku krve na filtračním papíru, který byl dále detekován přístrojem pro manometrické měření. Warburgovo manometrické měření dokáže identifikovat relativně nízkou aktivitu

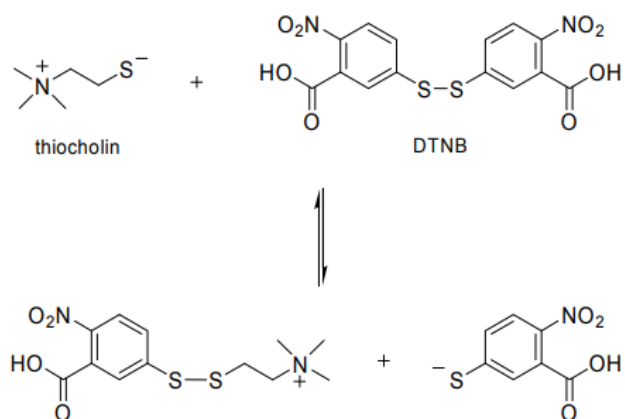
cholinesteráz ve všech tkáních, ale nevýhodou je omezený výběr pufrů a nemožnost měnit pH během měření. [7, 81]

2.8.2 Spektrofotometrické stanovení

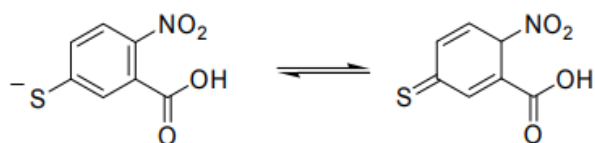
Fotometrické stanovení aktivity cholinesteráz je založeno na produktu chemické reakce, který je schopen interferovat se světlem specifické vlnové délky. Nejpoužívanější spektrofotometrickou metodou je metoda dle Ellmana, která používá jako substrát estery thiocholinu, acetylthiocholin pro AChE a butyrylthiocholin pro BChE. Thiocholin uvolněný během enzymatické reakce (viz obr. 7) reaguje s Ellmanovým činidlem, systematický název kyselina 5,5' – dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB) (viz obr. 8) a vzniká 3-karboxy-4-nitrothiolátový anion, který má silnou absorpci při 412 nm (viz obr. 9). [7, 82]



Obrázek 7: Štěpení acetylthiocholinu na kys. Octovou a thiocholin [83]



Obrázek 8: Štěpení DTNB a vznik chromoforu [83]



Obrázek 9: Přechod chromoforu na formu, která se dále fotometricky stanovuje [83]

2.8.3 Potenciometrické metody

Tyto metody využívají rozklad acetylcholinu na kyselinu octovou a cholin. Aktivita enzymu je určena hodnotou pH v reakční nádobě. Dnes jsou potenciometrické metody založeny na acetylcholin/butyrylcholin selektivních elektrodách a pH senzorech. [84]

2.8.4 HPLC

Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem je velmi účinný nástroj především pro screening AChE inhibitorů. Tyto metody také mohou velmi rychle pomoci při zjišťování kinetických a termodynamických konstant. Ve screeningových testech pro identifikaci nových ligandů se používá například metoda AChEICER, což je kapilární enzymový reaktor s acetylcholinesterázou pro screening a charakterizaci selektivních inhibitorů. Využívá se imobilizované AChE z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) a kapiláry vytvořené z oxidu křemičitého. Jako substrát se používá acetylthiocholin a jako referenční inhibitory galantamin a takrin. [85, 86]

2.8.5 Fluorometrické metody

Jedna z nejnovějších fluorescenčních metod je založena na hydrolýze acetylthiocholinu molekulami AChE, kdy vzniká thiocholin, který následně reaguje se squarainem. Squarain patří mezi organická barviva vykazující intenzivní fluorescenci, ale při reakci s thiocholinem se jeho fluorescence tlumí. V přítomnosti inhibitoru AChE nedochází k hydrolýze acetylthiocholinu a tudíž ani ke vzniku thiocholinu, který by reagoval se squarainem, ten zůstává neporušený a vykazuje fluorescenční signál, který koreluje s množstvím inhibitoru AChE. [87]

2.8.6 Radioizotopické metody

Tyto metody patří mezi nejcitlivější, jsou schopny vyhodnotit i velmi malou aktivitu enzymu. Jako substrát se používá značený acetylcholin nebo jiný značený substrát pro AChE

nebo BChE. Vyhodnocuje se buď množství nehydrolyzovaného substrátu, nebo množství produktu, který je díky značení substrátu také radioizotopově označen. [88]

2.8.7 Biosenzory

Biosenzory jsou analytická zařízení skládající se z bioreceptoru a převodníku, který poskytuje výstupní signál. Výhody, díky kterým často nahrazují klasické analytické metody, jsou miniaturizace, přenositelnost a jednoduchost. [7] Nejdůležitějším krokem ve vývoji enzymového biosenzoru je stabilní připojení enzymu na povrch pracovní elektrody. Tento proces je řízen různými interakcemi mezi enzymem a materiálem elektrody a silně ovlivňuje výkon biosenzoru z hlediska citlivosti, stability, doby odezvy a reprodukovatelnosti. V této souvislosti je pro spolehlivý biosenzor nezbytný vhodný výběr materiálu elektrody a imobilizační chemie. Hlavní požadavky na výběr materiálu elektrody jsou:

- biokompatibilita s enzymem
- stabilita
- přítomnost funkčních skupin nezbytných pro připojení enzymu
- dostatečná citlivost a selektivita pro detekovaný druh
- nízké náklady. [89]

Ve většině případů nativní materiály nesplňují tyto požadavky, a proto jsou nutné další úpravy, aby se umožnilo připojení enzymu. Imobilizační chemie by neměla obsahovat žádná toxická nebo denaturační činidla, která by mohla ovlivnit katalytickou aktivitu enzymu. Byly použity různé strategie imobilizace schopné připojit cholinesterázy na povrch pracovní elektrody. [90]

Nejjednodušší a nejméně denaturační metodou je fyzická adsorpce. Postup spočívá v jednoduchém ukládání enzymu na materiál elektrody a připojení enzymu prostřednictvím slabých vazeb, jako jsou Van der Waalsovy síly a elektrostatické interakce. Tato technika nezahrnuje žádnou funkcionalizaci elektrodových materiálů nebo kovalentních vazeb a je obecně nedestruktivní pro aktivitu enzymu. Biosenzory s adsorbovaným enzymem však trpí špatnou provozní a skladovací stabilitou. [91] Tato technika byla použita k imobilizaci AChE na povrch grafitových jednorázových elektrod. Aby se zvýšila provozní stabilita biosenzoru, byly elektrody promyty řadou promývacích pufrů obsahujících NaCl a Tween, které odstranily povrchové nečistoty a přebytek adsorbovaného enzymu. Tímto způsobem jsou elektrody stabilní ve vakuu cca 50 dní. [92]

Nejčastějším způsobem imobilizace cholinesteráz je za pomoci kovalentní vazby. Postup zahrnuje modifikaci převodníku síťovacím činidlem (glutaraldehyd nebo karbodimid), které na nosné straně vážou amino, karboxylové nebo hydroxylové skupiny a na druhé straně biomolekuly. Postup poskytuje zvýšenou stabilitu enzymu, ale je špatně reprodukovatelný.
[93]

2.9 Stanovení aktivity cholinesteráz z plné krve

2.9.1 Workova modifikace Ellmanovy metody

Worek a kolegové modifikovali Ellmanovu metodu pro měření vzorků plné krve, která umožňuje selektivní měření AChE. Problém Ellmanovy metody je, že absorbance anionu TNB silně interferuje s absorbcí hemoglobinu při 412 nm, proto se veškeré vzorky musely ředit. Pokud použijeme vlnovou délku 436 nm, tak se absorpce hemoglobinu sníží o 25 %, absorpce TNB je v tomto případě na 80 % jeho maxima. [7]

Aktivita AChE z plné krve se stanovuje v přítomnosti selektivního inhibitoru BChE ethopropazinu. Co se týče vlnové délky, tak nejlepší poměr mezi hemoglobinem a TNB byl nalezen při 462,5 nm. Lze také stanovit aktivitu BChE podobným způsobem, kdy jako inhibitor AChE se použije huperzin A. [94]

Jiná modifikace využívá znalosti toho, že je AChE připojena k povrchu erytrocytů prostřednictvím kotvy fosfatidylinositolu. Toto připojení lze přerušit za pomoci specifické lipázy C, aniž by to vedlo k lýze erytrocytů. Uvolněné molekuly AChE se oddělí od zbytku vzorku centrifugací. [95]

2.9.2 WRAIR test

Test WRAIR měří aktivitu cholinesteráz z plné krve v přítomnosti tří substrátů pro AChE a BChE, které poskytují nezávislé stanovení jak AChE, tak BChE aktivit. To je možné, protože každý z enzymů má odlišnou afinitu a citlivost pro každý ze svých substrátů a protože existuje vztah mezi aktivitou a koncentrací enzymu. Test WRAIR používá techniku odběru krve z prstu nebo malý vzorek krve ze zkumavky s necentrifugovanou krví. Pokud tedy stanovujeme aktivitu obou enzymů, vypočítáme jejich koncentrace pomocí dvou rovnic se dvěma neznámými proměnnými. Dále máme tři různé substráty, takže máme tři sady těchto dvou rovnic. Koeficienty citlivosti v každé rovnici (x a y) představují příspěvky, kterými AChE a BChE nezávisle přispívají k celkové rychlosti hydrolýzy každého substrátu. Současné řešení těchto tří sad rovnic poskytuje tři nezávislé odhady koncentrací AChE a BChE. Stanovením střední hodnoty a směrodatné odchylky pro tyto nezávisle odvozené hodnoty tedy poskytují koncentraci každého enzymu AChE a BChE. Jako substráty se používají acetylthiocholin jodid (ATChI), propionylthiocholin jodid (PTChI), butyrylthiocholin jodid (BTChI), měří se při vlnové délce 324 nm, tudíž nedochází k interferenci s hemoglobinem. [95–97]

2.9.3 Mikro pH stat

Tato technika je založena na stanovení pH. V pH statu je udržováno konstantní pH pomocí vstřikování kyseliny nebo báze, čímž se vyvažuje posun pH od probíhající enzymové reakce. Z toho lze snadno získat reakční rychlost, protože se rovná rychlosti přidávání titrantu. Součástí elektrochemického pH statu je rotující platforma se vzorkem, který je usazený v hydrofobním prstenci, který drží vzorek na místě. Přidání kyseliny nebo báze umožňuje elektrolýza vody na pracovní platinové elektrodě, která je zalita ve stacionárním substrátu. Velikost proudu je řízena skutečným rozdílem mezi odečtem pH v reálném čase ve vzorku a požadovanou hodnotou pH nastavenou v řídicím systému. Tato metoda tedy nevyžaduje žádné speciální reagenty, je vhodná pro biologické vzorky, především sérum. Vzhledem k tomu, že je pH udržováno elektrickým proudem a dosahuje se téměř 100 % proudové účinnosti, tak metoda poskytuje absolutní měření a není tedy nutná kalibrace se standardními roztoky. [98, 99]

2.9.4 Použití chromogenních disulfidů

Kyselina 6,6'-dithiodinikotinová (DTNA) poskytuje v reakci s thiocholinem produkt kyseliny 6-merkaptotikotinovou, která má absorpční maximum při vlnové délce 340 nm. Z chromoforu 4,4'-dithiodipyridinu (4-PDS) se po reakci s thiocholinem získá produkt 4-thiopyridon, jehož maximální absorpce je při vlnové délce 324 nm. Používá se také 2,2'-dithiodipyridin (2-PDS) s následným produktem 2-thiopyridonem, který má absorpční maximum při 343 nm, ale jeho absorpce je třikrát nižší, než u 4-PDS, tudíž poskytuje nižší citlivost. [100, 101]

Chromogeny DTNA a PDS jsou vhodné pro měření z plné krve, nejsou citlivé na světlo a nedochází k interferenci s hemoglobinem. [100, 101]

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

- Acetylthiocholin jodid (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - 0,1 M roztok ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,1 M)
- Deiozinovaná voda
- 6,6'-Dithiodinikotinová kyselina – DTNA (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - 5 mM roztok ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,1 M)
 - 1 mM roztok ve fosfátovém pufru (pH 7,4; 0,1 M)
- Fosfátový pufr (pH 7,4; 0,1 M)
 - 11,49 g Na_2HPO_4 bylo rozpuštěno v 810 ml destilované vody
 - 3,4 g KH_2PO_4 rozpuštěno v 250 ml destilované vody
 - roztok KH_2PO_4 byl pomalu přidáván k Na_2HPO_4 až do pH 7,4
- 4,4'-dithiodipyridin – PDS (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - PDS bylo rozpuštěno v destilované vodě s přídavkem etanolu (1% etanol v RS) a výsledná koncentrace byla 1 mM nebo 5mM
- Galantamin hydrobromid (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - 0,02 M vodný roztok
- Donepezil hydrochlorid (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - 0,02 M vodný roztok
- Erytrocyty od dobrovolných dárců

3.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga (Eppendorf 5804/5804 R, Německo)
- Spektrofotometr Agilent 8453, UV/VIS (Agilent Technologies, Německo)
- Vortex (Heidolph multi reax, Německo)
- Skleněné kyvety – vnitřní průměr 1 cm
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)
- Odměrné baňky, kádinky, plastové zkumavky

3.3 Metody stanovení

Pro všechna stanovení byla použita spektrofotometrická metoda, kdy je využíváno chemických reakcí, jejichž produkty reagují se světlem specifické vlnové délky. Přístroj, který byl použit pro tyto analýzy je UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453. Jako chromogeny byly použity DTNA a PDS, které jsou popsány v kapitole 2.9.4.

3.4 Zpracování krve

- Krev byla odebrána od dobrovolných dárců do zkumavek s EDTA.
- Následně byla centrifugována při 3000 otáčkách/minutu po dobu 15 minut při 4 °C.
- Plazma byla odpipetována do mikrozkušavek a uchovávána v mrazáku při – 80 °C.
- Buffy coat (vrstva trombocytů a leukocytů nad erytrocytární vrstvou) byla odebrána do odpadu.
- Erytrocyty byly poté promyty redestilovanou vodou (poměr 1:2) a centrifugovány při 3000 otáčkách/minutu po dobu 20 minut při 4 °C.
- Po centrifugaci byla vrchní vrstva odstráněna do odpadu a erytrocyty byly rozpipetovány do mikrozkušavek a uloženy v mrazáku při – 80 °C.
 - Po vyjmutí erytrocytů z mrazáku před stanovením znovu zředěny redestilovanou vodou dle potřeby analýzy.

3.5 Postup měření za použití chromogenu DTNA

Nastavení přístroje:

- celkový čas reakce 120 s
- časový interval 3 s
- vlnová délka 340 nm
- celkový objem reakční směsi v kyvetě 1 ml

Blank obsahoval DTNA, daný objem erytrocytů a fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Směs s probíhající reakcí navíc obsahovala substrát acetylthiocholin jodid, který byl přidán do směsi po minutové inkubaci.

Z každého měření byla vypočtena reakční rychlost poměrem rozdílů absorbancí v čase. Výsledné hodnoty rychlosti jednotlivých stanovení byly zprůměrovány a vyneseny do grafů.

V prvním kroku byla zvolena koncentrace DTNA 5 mM a objem 200 μ l. Tyto zvolené hodnoty vycházeli z dostupné literatury. [101] Byly testovány objemy erytrocytů 5, 7, 10, 12,

15 a 20 μl ředěny demineralizovanou vodou v poměru 1:1 a koncentrace substrátu v reakční směsi ($5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$, $9 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ M)

Reakční směs (RS) vždy obsahovala 200 μl DTNA o 5 mM koncentraci, jeden z výše uvedených objemů erytrocytů, 100 μl substrátu v požadované koncentraci, fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Reakční směs bez substrátu byla 1 minutu inkubována a poté byl přidán substrát, čím byla spuštěna měřená enzymatická reakce. Každá kombinace byla měřena dle potřeby 2-3x.

3.6 Postup měření za použití chromogenu PDS

Nastavení přístroje:

- celkový čas reakce 120 s
- časový interval 3 s
- vlnová délka 324 nm
- celkový objem reakční směsi v kyvetě 1 ml

Blank obsahoval PDS, daný objem erytrocytů a fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Směs s probíhající reakcí obsahovala navíc substrát acetylthiocholin jodid, který byl přidán do směsi po minutové inkubaci.

Z každého měření byla vypočtena reakční rychlost poměrem rozdílů absorbancí v čase. Výsledné hodnoty rychlosti jednotlivých stanovení byly zprůměrovány a vyneseny do grafů.

V prvním kroku byla zvolena koncentrace PDS 1 mM a objem 50 μl . Tyto zvolené hodnoty vycházeli z dostupné literatury.[102] Byly testovány objemy erytrocytů 5, 7, 10, 12, 15 a 20 μl ředěny demineralizovanou vodou v poměru 1:1 a koncentrace substrátu v reakční směsi ($5 \cdot 10^{-5}$, $7 \cdot 10^{-5}$, $9 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-4}$, $3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$, $9 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-3}$ M).

Reakční směs vždy obsahovala 50 μl PDS o 1 mM koncentraci, jeden z výše uvedených objemů erytrocytů, 100 μl substrátu v požadované koncentraci, fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Reakční směs bez substrátu byla vždy 1 minutu inkubována, poté byl teprve přidán substrát a tím byla spuštěna měřená enzymatická reakce. Každé měření bylo opakováno dle potřeby 2-3x.

3.7 Postup měření za použití jiné koncentrace chromogenu PDS

Pro tento experiment byly nastaveny stejné parametry přístroje jako v kapitole 3.6. Koncentrace PDS byla změněna na 5 mM a objem na 200 μl , neboť bylo cílem nastavit podobné podmínky jako při měření s DTNA v kapitole 3.5. Z časových důvodů byly zvoleny jenom tři testované koncentrace acetylthiocholinu ($3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$ M). Objem erytrocytů byl zvolen 15 μl . Tento objem erytrocytů byl vybrán z důvodu dostatečné odezvy při předchozím testování (viz. Graf č. 2).

Reakční směs vždy obsahovala 200 μl chromogenu PDS (5 mM), 15 μl erytrocytů ředěných demineralizovanou vodou v poměru 1:1 až 1:5, 100 μl substrátu v požadované koncentraci, fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Reakční směs bez substrátu byla vždy 1 minutu inkubována, poté byl teprve přidán substrát a tím se spustila měřená enzymatická reakce. Každé měření bylo opakováno dle potřeby 2-3x.

3.8 Stanovení nejvhodnějšího ředění erytrocytů

Z důvodu nelineárního průběhu reakcí u některých testovaných kombinací erytrocytů se substrátem, při použití daného chromogenu, následovalo testování různého ředění erytrocytů. Pro tento experiment byly nastaveny stejné parametry přístroje jako v kapitole 3.5 v případě použití DTNA, při použití PDS byly nastaveny stejné parametry přístroje jako v kapitole 3.6. Z časových důvodů byly zvoleny jenom tři testované koncentrace acetylthiocholinu ($3 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$, $8 \cdot 10^{-4}$ M). Objem erytrocytů byl zvolen 15 μl . Tyto hodnoty byly vybrány z důvodu dostatečné odezvy při předchozím testování. Ředění erytrocytů probíhalo postupně v poměrech 1:1 až 1:9, poté následovalo ještě ředění v poměrech 1:15 a 1:20. Cílem bylo zjistit jaké ředění je nejvhodnější pro měření s PDS i DTNA a zároveň jaké nejnižší ředění erytrocytů by mohlo být použito pro měření inhibičních koncentrací vybraných inhibitorů cholinesteráz. U DTNA byla zvolena pro toto měření 1 mM koncentrace a objem 50 μl v reakční směsi, neboť jsme chtěli nastavit co nejpodobnější podmínky pro oba testované chromogeny.

Reakční směs vždy obsahovala 50 μl chromogenu, 15 μl erytrocytů ředěných dle výše uvedených poměrů, 100 μl substrátu v požadované koncentraci, fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml. Reakční směs bez substrátu byla vždy 1 minutu inkubována, poté byl teprve přidán substrát a tím se spustila měřená enzymatická reakce. Každé měření bylo opakováno dle potřeby 2-3x.

3.9 Stanovení IC₅₀

Hodnota IC₅₀ představuje potřebnou koncentraci inhibitoru pro 50% inhibici enzymu. Hodnotu IC₅₀ lze získat z grafu závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci inhibitoru c_i . Rovnice regrese přímky procházející body (1;0) a body (c_i ; v_0/v_i) umožňuje po dosazení za $y=2$ výpočet IC₅₀.

Pro měření byly vybrány dva inhibitory cholinesteráz (standardy), galantamin a donepezil a měření probíhalo za následujících reakčních podmínek. Reakční směs obsahovala substrát acetylthiocholin jodid ($3 \cdot 10^{-4}$ M) v objemu 100 μ l, chromogen DTNA nebo PDS (1 mM) v objemu 50 μ l, objem erytrocytů 15 μ l za použití ředění v poměru 1:4 a 1:9.

Měření neinhibované reakce probíhalo stejným způsobem jako u předchozích stanovení s DTNA a PDS. Inhibovaná reakce navíc obsahovala inhibitor o zvolené koncentraci.

Blank pro inhibovanou reakci obsahoval 50 μ l chromogenu, 15 μ l erytrocytů, inhibitor o dané koncentraci (celkem 4 různé koncentrace) a fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml.

Reakční směs navíc obsahovala 100 μ l substrátu acetylthiocholin jodidu, kterým byla reakce spuštěna po předchozí minutové inkubaci, měření opakováno dle potřeby 2-3x.

Z každého měření byla vypočtena reakční rychlost a vynesena do grafu vůči dané koncentraci inhibitoru.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Postup měření za použití chromogenu DTNA

Stanovení probíhalo za pomoci UV/VIS spektrofotometru Agilent 8453. Byla měřena absorbance v závislosti na čase, z čehož byly následně vypočteny reakční rychlosti.

Z takto vypočtených průměrných reakčních rychlostí byl sestaven 3D graf (graf. č. 1, příloha 1) porovnávající závislosti reakčních rychlostí na koncentraci substrátu a objemu erytrocytů pro chromogen DTNA.

Měření spočívalo v určení nejvhodnějšího objemu erytrocytů a koncentrace substrátu v reakční směsi.

Jak je patrné z grafu č. 1 (příloha 1), tak odezva nebyla při nízkých objemech erytrocytů u nejnižších koncentrací dostatečná, naopak u objemu erytrocytů 20 μl se již pravděpodobně začal projevovat vliv hemoglobinu nebo vysoká koncentrace erytrocytů. Jako vhodný objem erytrocytů je zvolen objem 15 μl . Jako vhodná koncentrace substrátu je zvolena hodnota $9 \cdot 10^{-4}$ M. Obě tyto hodnoty poskytovaly dostatečnou odezvu.

4.2 Postup měření za použití chromogenu PDS

Stanovení probíhalo stejným způsobem jako stanovení s DTNA. Při měření s PDS byly erytrocyty ředěny demineralizovanou vodou v poměru 1:1 pouze u objemů 3, 5, 7, 10 a 12 μl . U objemů 15 a 20 μl byly erytrocyty zředěny v poměru 1:3 neboť ředění 1:1 ani 1:2 nevykazovaly lineární vzestupnou závislost absorbance na čase.

Z takto vypočtených průměrných reakčních rychlostí jsou sestaveny 3D grafy (grafy č. 2 a 3, přílohy 2 a 3) porovnávající závislosti reakčních rychlostí na koncentraci substrátu a objemu erytrocytů pro PDS.

Měření spočívalo v určení nejvhodnějšího objemu erytrocytů a koncentrace substrátu v reakční směsi.

Z grafu č. 2 (příloha 2), je patrné, že při objemu erytrocytů 3 μl byla odezva patrná až při koncentraci substrátu $1 \cdot 10^{-4}$ M, u objemů 10 a 12 μl až při koncentraci substrátu $3 \cdot 10^{-4}$ M. Pokud tedy jsou erytrocyty ředěny v poměru 1:1, volíme jako ideální objem erytrocytů množství 7 μl , odezva je dostatečná a poskytuje rostoucí závislost na koncentraci substrátu. Při ředění erytrocytů 1:3, jež je zobrazeno na grafu č. 3 (příloha 3), stačí objem erytrocytů 15

μl, neboť poskytuje stejně vhodné výsledky jako objem 20 μl. Jako vhodná koncentrace substrátu je zvolena hodnota $3 \cdot 10^{-4}$ M nebo vyšší, neboť poskytuje dostatečnou odezvu u obou ředění.

4.3 Postup měření za použití jiné koncentrace chromogenu PDS

Stanovení s 5 mM PDS proběhlo stejným způsobem jako při použití 1 mM PDS. Lineární vzestupná závislost absorbance na čase byla zaznamenána až při ředění 1:4, lepší výsledky ale poskytovalo ředění 1:5.

Při použití 5 mM PDS největší odezvu poskytovalo ředění erytrocytů v poměru 1:5, koncentrace substrátu $8 \cdot 10^{-4}$ M. Tento experiment byl proveden z důvodu přiblížení reakčních podmínek u stanovení s 5 mM DTNA. Na rozdíl od DTNA je při použití 5 mM PDS nutné ředění erytrocytů, alespoň 1:4, lépe však 1:5, na rozdíl od DTNA, kdy postačuje ředění erytrocytů 1:1., viz graf č. 4 (příloha č. 4).

4.4 Stanovení nejvhodnějšího ředění erytrocytů

Měřená závislost absorbance na čase pro poměry ředění erytrocytů 1:1 a 1:2 neměla lineární vzestupný trend, tudíž relevantní měření probíhalo až od poměru 1:3.

Výpočet reakčních rychlostí probíhal stejným způsobem jako v předešlých měření. Jak je patrné z grafu č. 5 (příloha č. 5) tak reakční rychlosti při použití PDS (1 mM) klesaly se zvyšujícím se ředění erytrocytů. Jako optimální ředění erytrocytů bylo zvoleno ředění 1:3, maximálně 1:4, neboť odezva byla dostatečně vysoká.

Při použití chromogenu DTNA (1 mM), byla maximální odezva při ředění erytrocytů 1:5, jak je patrné z grafu č. 6 (příloha č. 6). Poté s každým dalším ředěním odezvy klesaly, ale trend vzestupu reakčních rychlostí na koncentraci substrátu zůstal zachován. Jako vhodné ředění bylo zvoleno ředění 1:5, které poskytovalo nejvyšší odezvu.

Tento experiment byl navržen tak, aby se reakční podmínky při měření s DTNA i při měření s PDS, co nejvíce podobaly. To znamená oba chromogeny byly v 1 mM koncentraci a jejich objem v reakční směsi činil 50 μl. Prvotní stanovení s 5 mM DTNA nepřineslo očekávané výsledky, proto se koncentrace DTNA přizpůsobila koncentraci PDS, které již v prvním stanovení vykazovalo vhodné výsledky. Cílem bylo nalézt takové ředění erytrocytů, které bude vhodné pro měření s oběma chromogeny, což poskytuje ředění erytrocytů 1:4, které bylo zvoleno pro další měření. Dále bylo zvoleno ředění 1:9, které je posledním

ředěním, které ještě vykazuje dostačující odezvu. Na grafu č. 7 (příloha č. 7) porovnána odezvy při různém ředění u obou chromogenů, lze vidět, že PDS poskytuje vyšší odezvu v porovnání s DTNA a proto je jeho použití vhodnější.

4.5 Stanovení IC₅₀

Ředění erytrocytů 1:4 bylo zvoleno z důvodu dostatečné odezvy jak při použití DTNA, tak při použití PDS. Následné měření při ředění 1:9 bylo provedeno z důvodu, že je to maximální ředění erytrocytů, kdy je ještě odezva u obou chromogenů dostačující. Objem erytrocytů 15 µl byl zvolen na základě vykonaných měření, neboť poskytoval dostatečnou odezvu, stejně tak koncentrace i substrátu 3.10⁻⁴ M.

5. Tabulka 2: Hodnota IC₅₀ v závislosti na chromogenu a ředění erytrocytů

Inhibitor	Chromogen	Ředění erytrocytů	IC ₅₀ [µM] ± STD
Galantamin	DTNA	1:4	56,70 ± 2,25
Donepezil	DTNA	1:4	0,10 ± 0,00
Galantamin	DTNA	1:9	53,54 ± 3,18
Donepezil	DTNA	1:9	0,09 ± 0,00
Galantamin	PDS	1:4	101,01 ± 3,09
Donepezil	PDS	1:4	0,51 ± 0,02
Galantamin	PDS	1:9	126,31 ± 12,78
Donepezil	PDS	1:9	0,21 ± 0,01

Hodnota IC₅₀ je nepřímo úměrná účinnosti inhibitoru, z tabulky č. 2 je patrné že donepezil je řádově účinnější inhibitor, než galantamin. Pro měření IC₅₀ lze použít obě metody, tedy použít chromogen DTNA i PDS. Metoda s použitím DTNA je lepší, neboť poskytuje vhodné výsledky při různém ředění erytrocytů. Výsledky pro daný inhibitor se mění s použitím různých chromogenů a různých ředění erytrocytů (IC₅₀ výrazně závisí na reakčních podmínkách) U donepezilu můžeme pozorovat, že hodnoty IC₅₀ jsou řádově stejné při použití obou chromogenů a obou ředění. U galantamínu pozorujeme rozdílné hodnoty IC₅₀ za použití testovaných chromogenů. Dle dostupné literatury [103-105] se hodnoty IC₅₀ pro testované standardy pohybují v řádu kolem 0,5 mM pro galantamin a 0,02 mM pro donepezil. Pro stanovení IC₅₀ se těmito hodnotám blíží více stanovení s DTNA.

5. Závěr

Cílem diplomové práce bylo zpracovat krev od dobrovolných dárců a následně ji aplikovat v analytických metodách pro stanovení aktivity cholinesteráz. V rámci experimentální práce se testovali celkem dva chromogeny DTNA a PDS. Chromogen DTNA o koncentraci 5 mM byl testován v prvním kroku. Dostatečnou odezvu poskytoval objem erytrocytů 15 μl (ředění v poměru 1:1) a koncentrace substrátu $9 \cdot 10^{-4}$ M. Toto stanovení nepřineslo očekávané výsledky, přesněji absorbance v čase neměla dostatečně vzestupný průběh.

Následovalo stanovení za použití chromogenu PDS o 1 mM koncentraci, kde v případě ředění erytrocytů v poměru 1:1 poskytoval dostatečnou odezvu objem erytrocytů 7 μl . V případě ředění erytrocytů v poměru 1:3 poskytoval dostatečnou odezvu objem erytrocytů 15 μl . V obou případech ředění dostatečnou odezvu poskytovala koncentrace substrátu $3 \cdot 10^{-4}$ M.

Pro sjednocení podmínek u obou chromogenů bylo provedeno měření s 5 mM koncentrací PDS, kde dostatečná odezva byla až u ředění erytrocytů v poměru 1:5. Chromogeny tedy potřebují při 5 mM koncentraci jiné ředění erytrocytů, DTNA 1:1 a PDS 1:5.

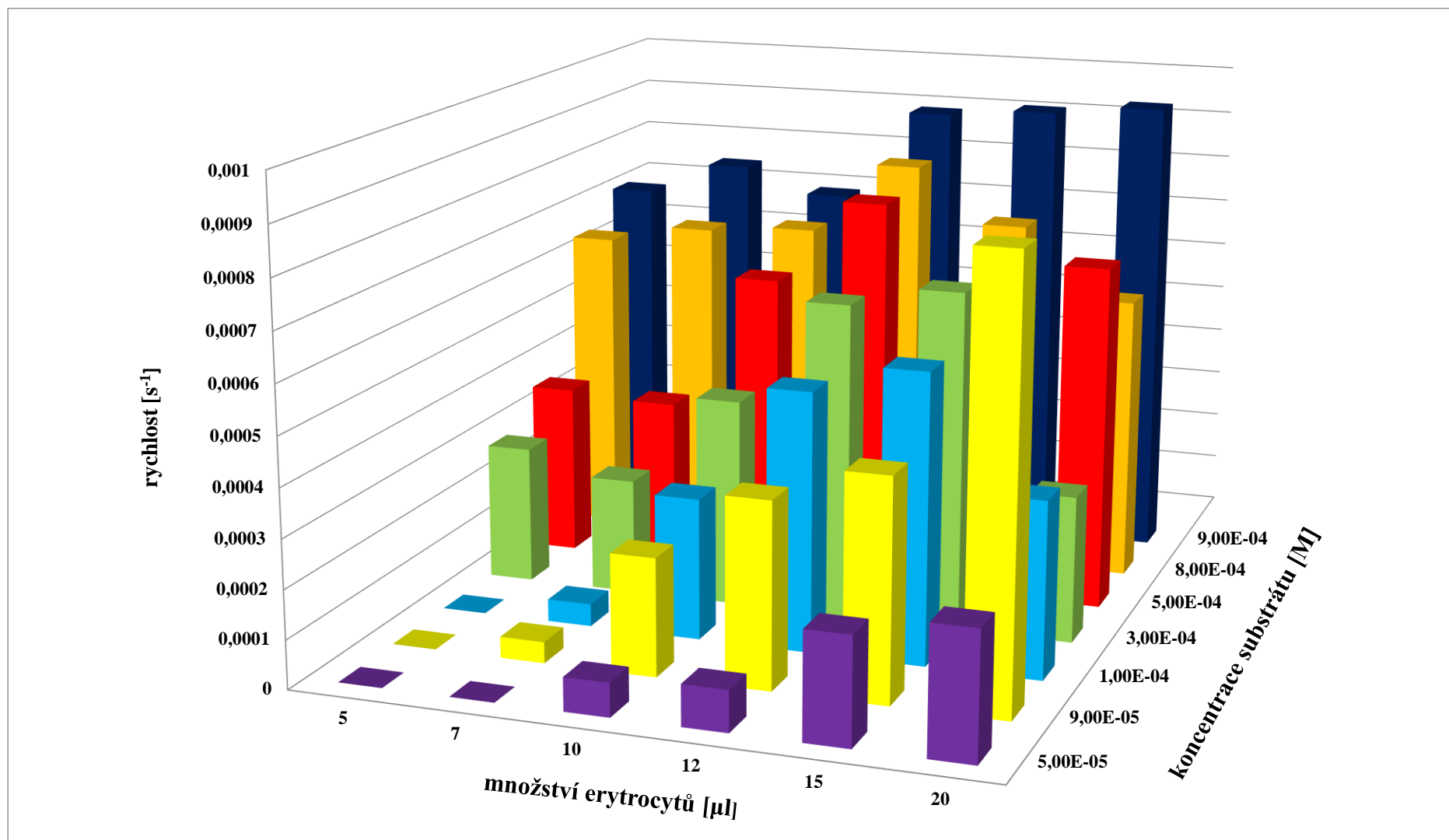
Dalším experimentem bylo stanovení nejvhodnějšího ředění erytrocytů, použity byly oba chromogeny o 1 mM koncentraci, objem erytrocytů 15 μl a tři různé koncentrace substrátu. Nejvhodnějším ředěním erytrocytů, které poskytuje největší odezvu při použití obou chromogenů je ředění v poměru 1:4. Ředění 1:9 je posledním ředěním, které poskytuje ještě dostačující odezvu při použití obou chromogenů. Při srovnání obou chromogenů, poskytuje PDS vyšší odezvy než DTNA.

Posledním stanovením v experimentální části bylo stanovení hodnoty IC_{50} . Pro tento experiment byly vybrány dva inhibitory, galantamin a donepezil. Na základě předchozích výsledků byly zvoleny erytrocyty v objemu 15 μl , které byly ředěny v poměru 1:4 a 1:9, koncentrace substrátu $3 \cdot 10^{-4}$ M a chromogeny DTNA a PDS o 1 mM koncentraci. Donepezil je řádově účinnější inhibitor než galantamin. Metoda s DTNA poskytuje lepší výsledky.

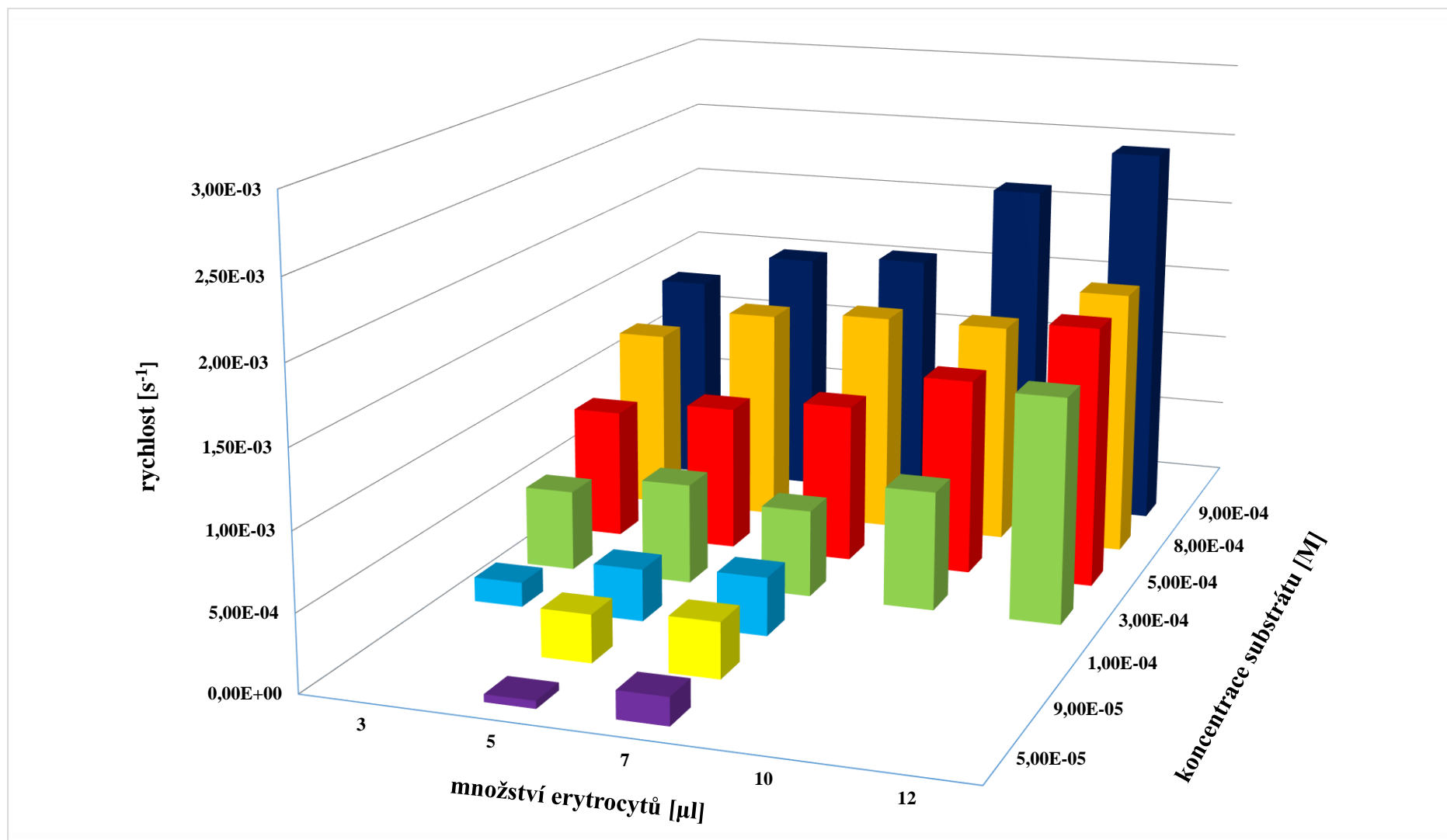
Obě metody hodnotím jako stejně dobré, pro DTNA bylo těžší najít optimální podmínky, ale po jejich nalezení se mi pracovalo s oběma chromogeny podobně.

Přílohy:

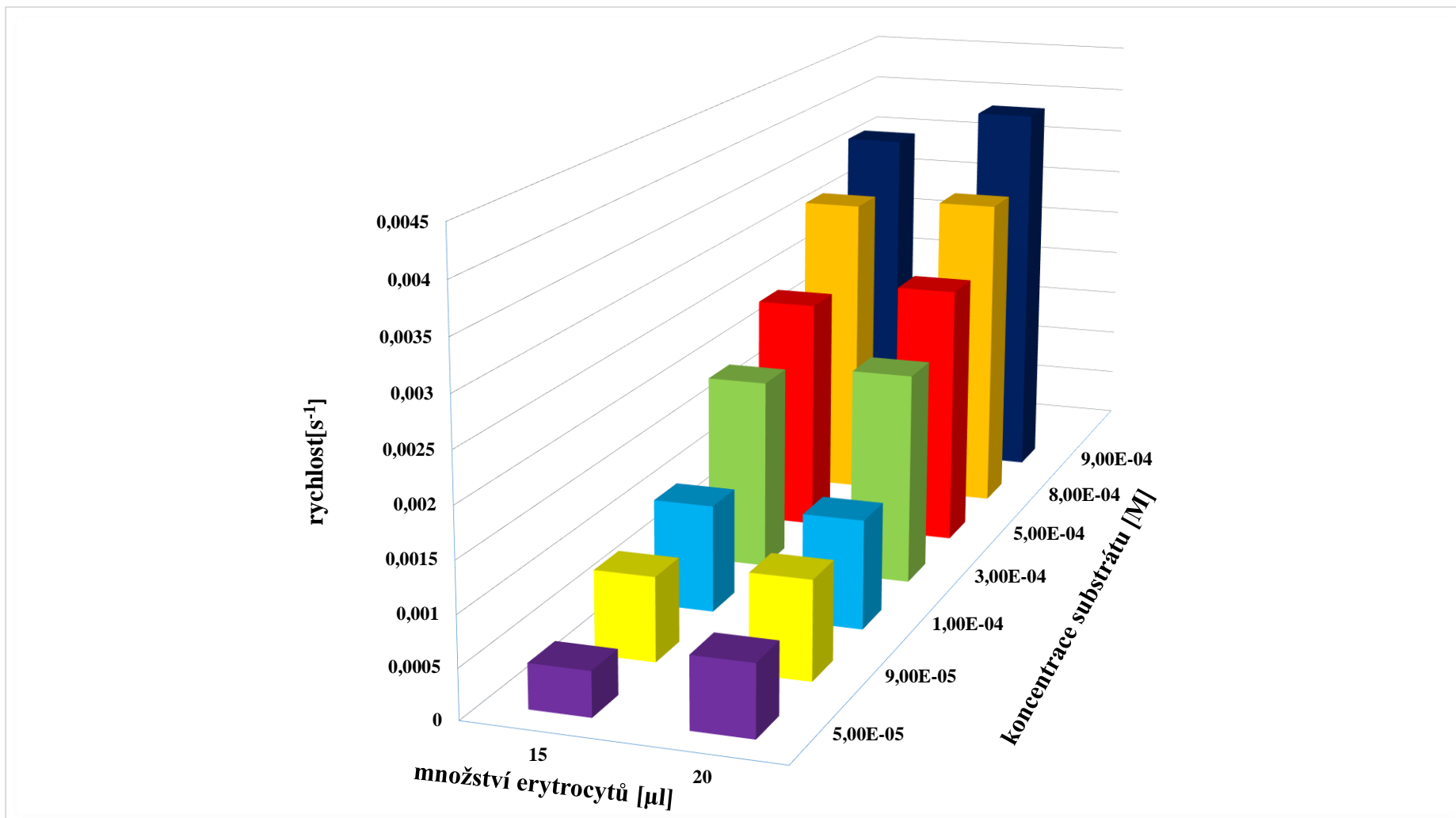
Příloha 1



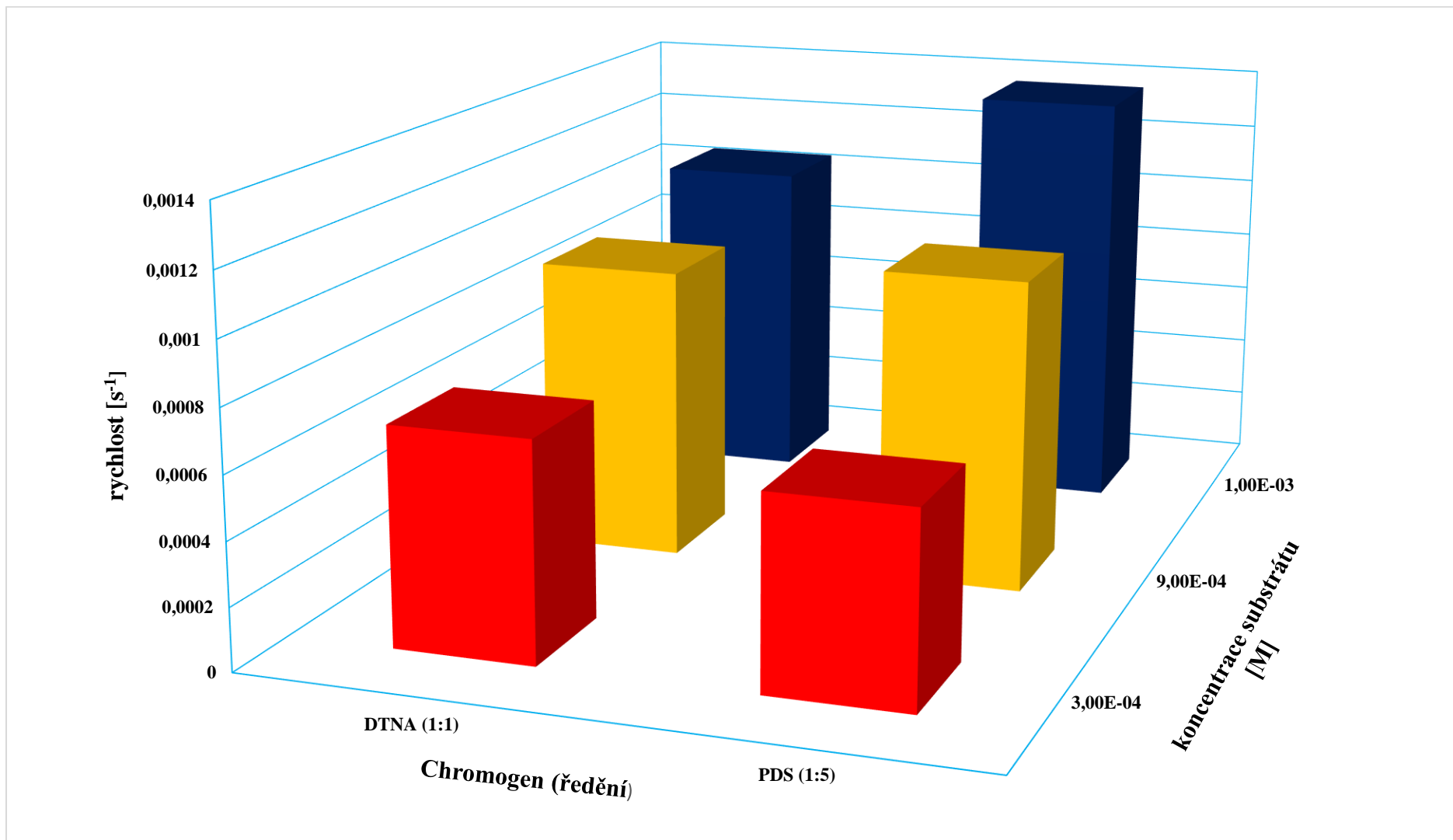
Graf 1: Saturační graf pro DTNA (5 mM)



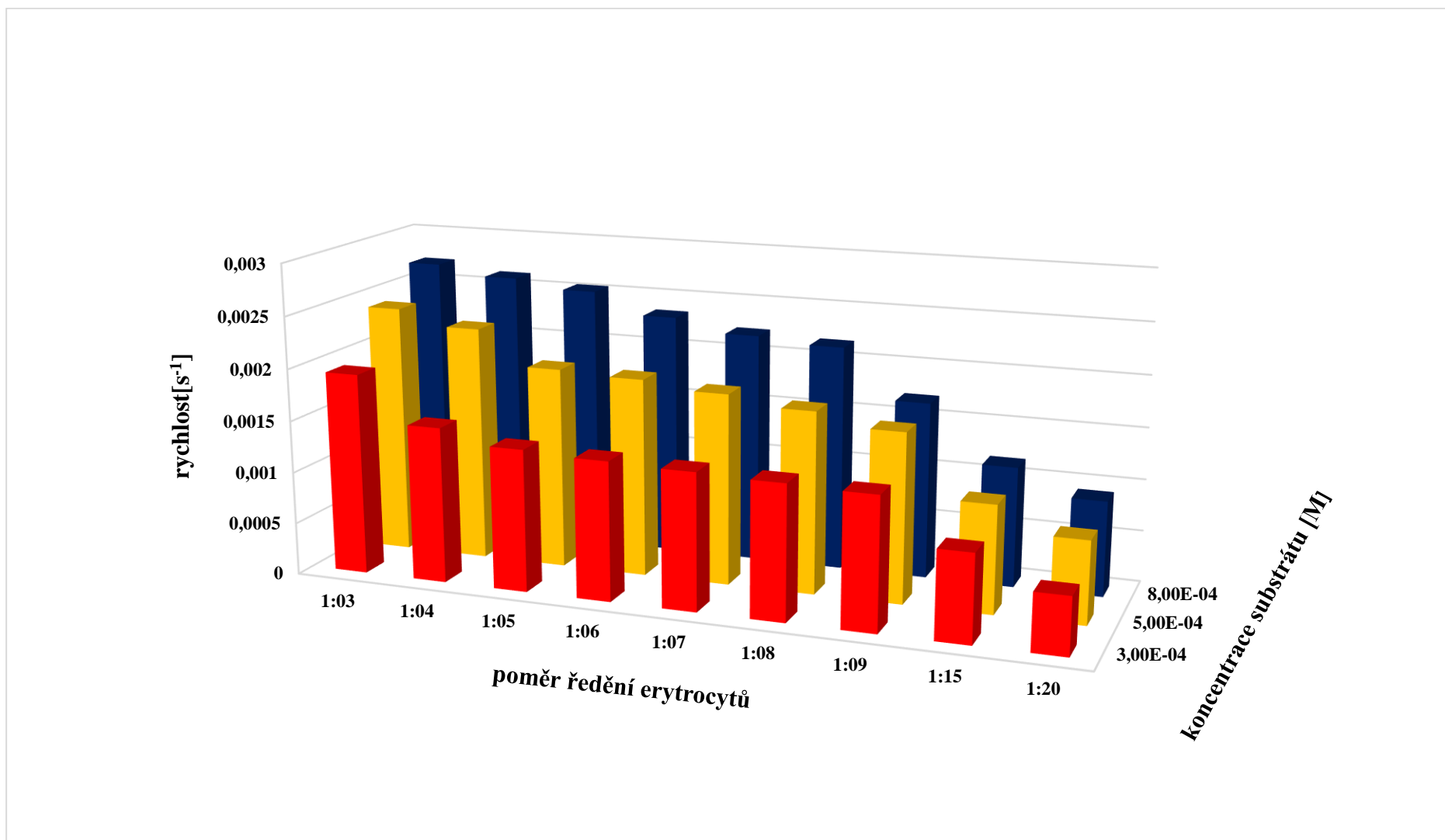
Graf 2: Saturační graf pro PDS (1 mM), ředění erytrocytů v poměru 1:1



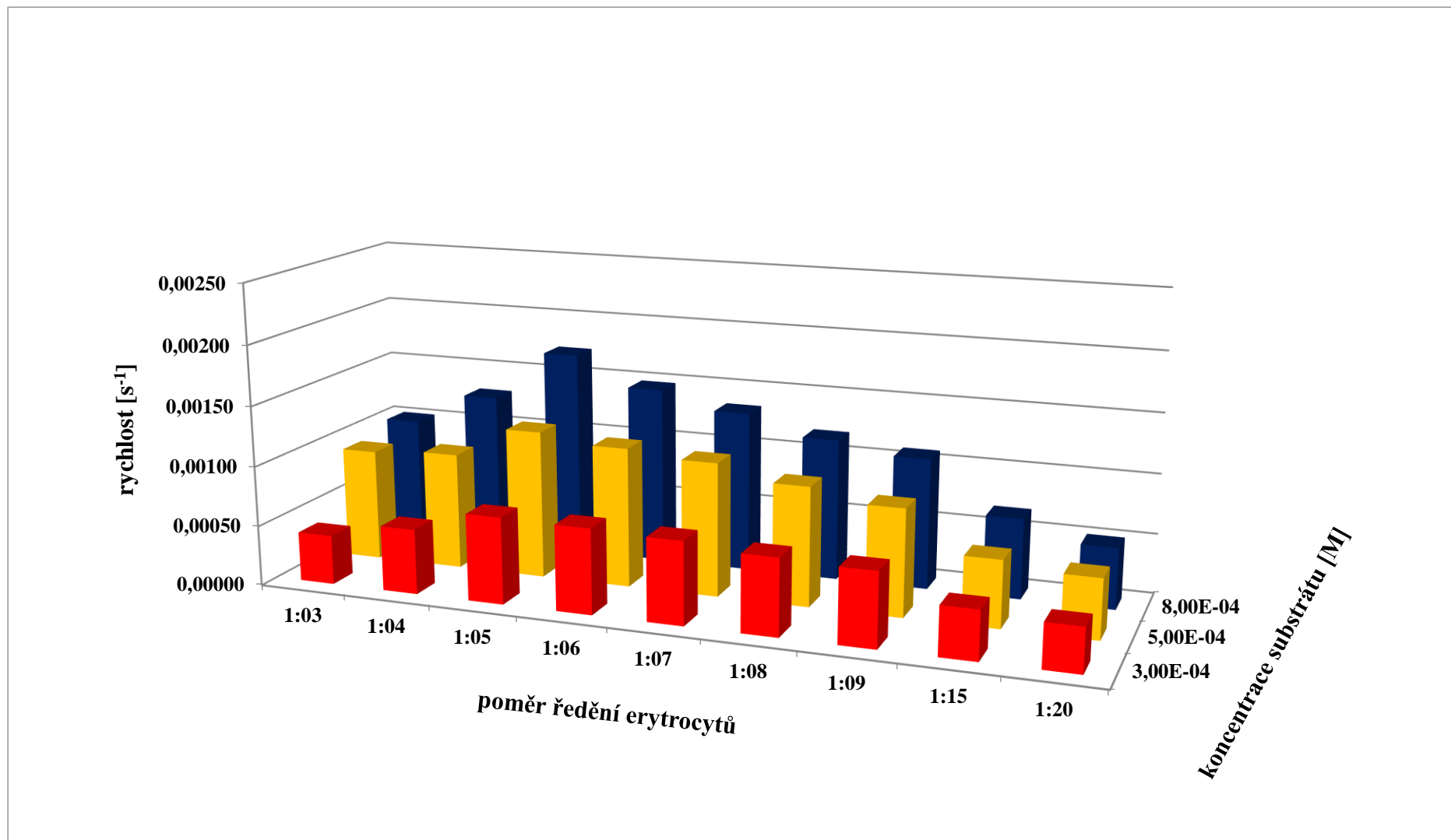
Graf 3: Saturační graf pro PDS (1 mM), ředění erytrocytů v poměru 1:3



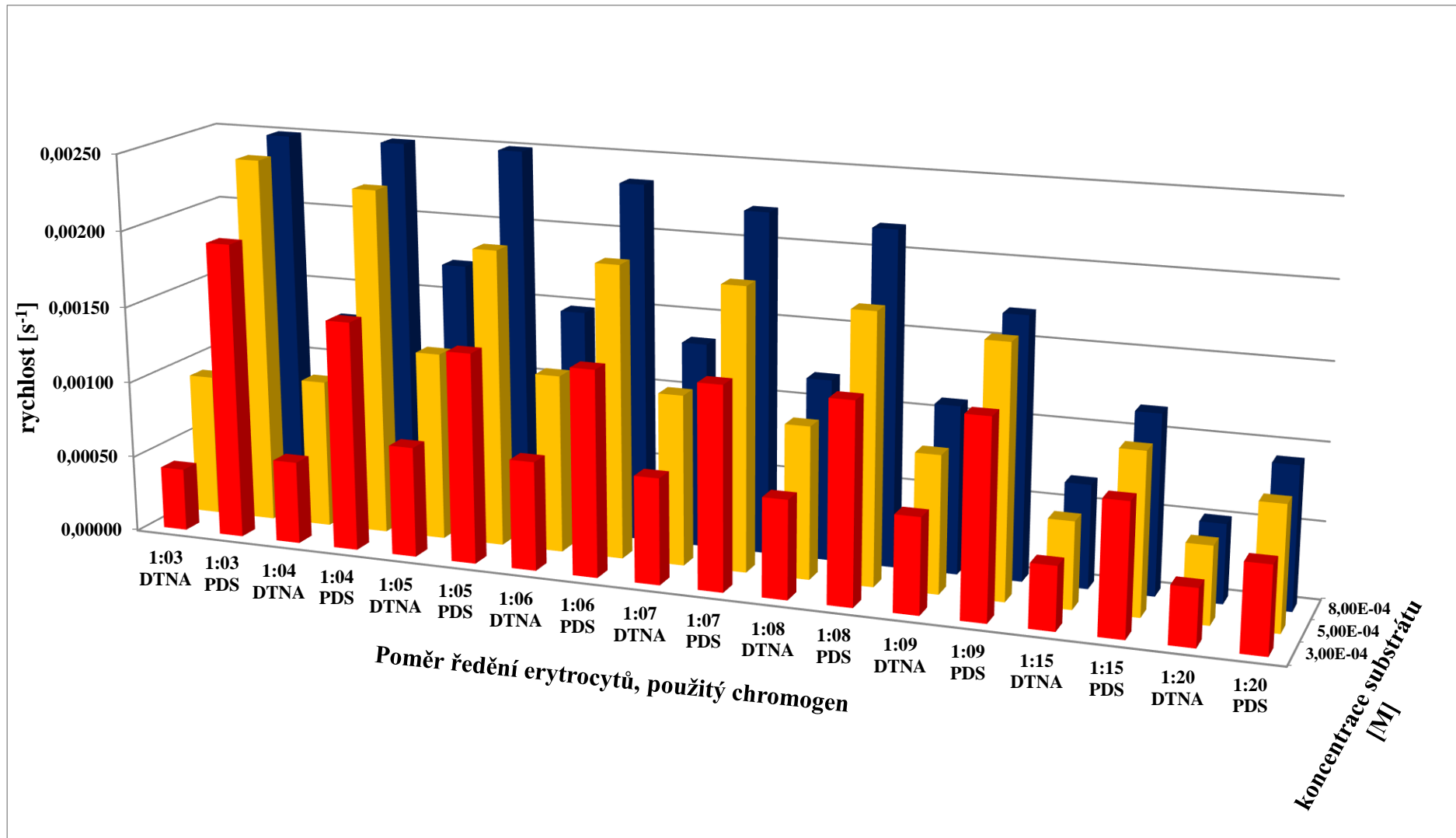
Graf 4: Srovnání chromogenů DTNA (5mM) a PDS (5mM)



Graf 5: Saturační graf pro ředění erytrocytů s použitím PDS (1 mM)

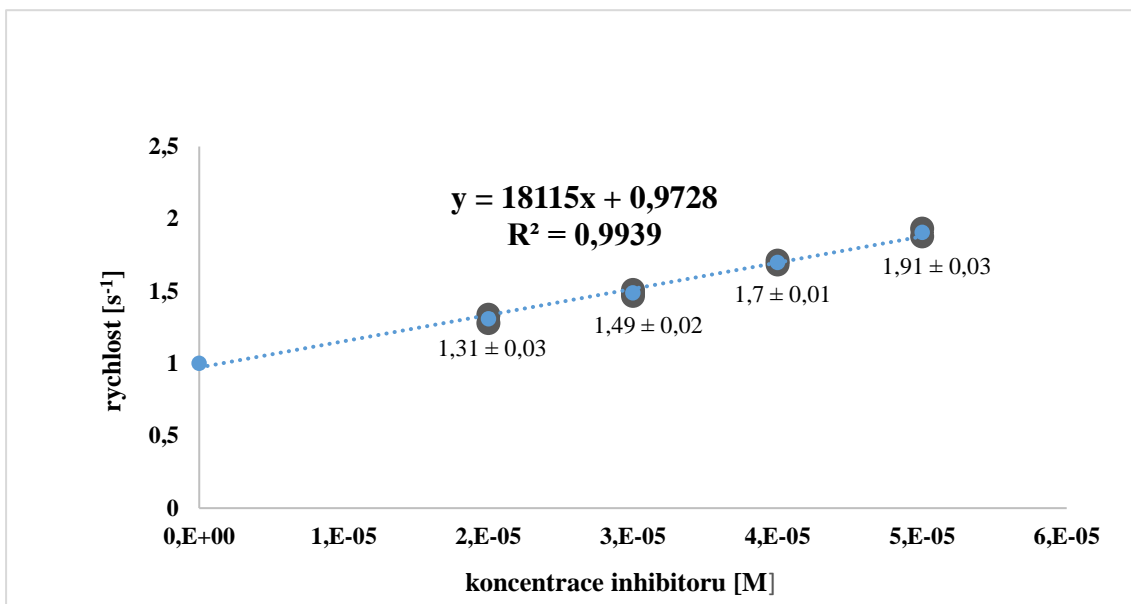


Graf 6: Saturační graf pro ředění erytrocytů s použitím DTNA (1 mM)

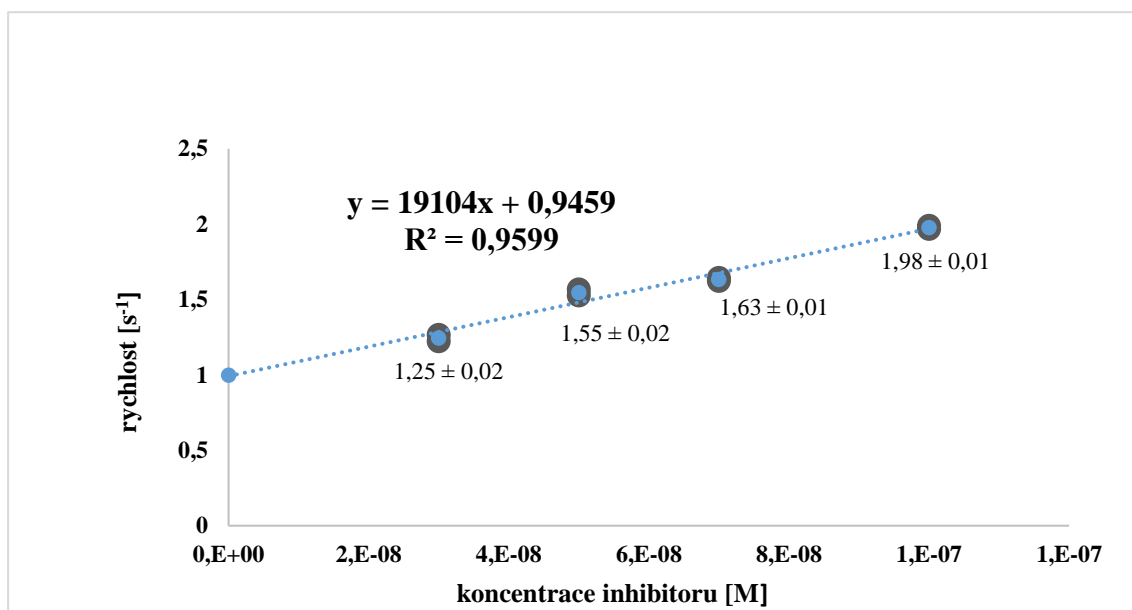


Graf 7: Saturační graf pro ředění erytrocytů, porovnání obou chromogenů

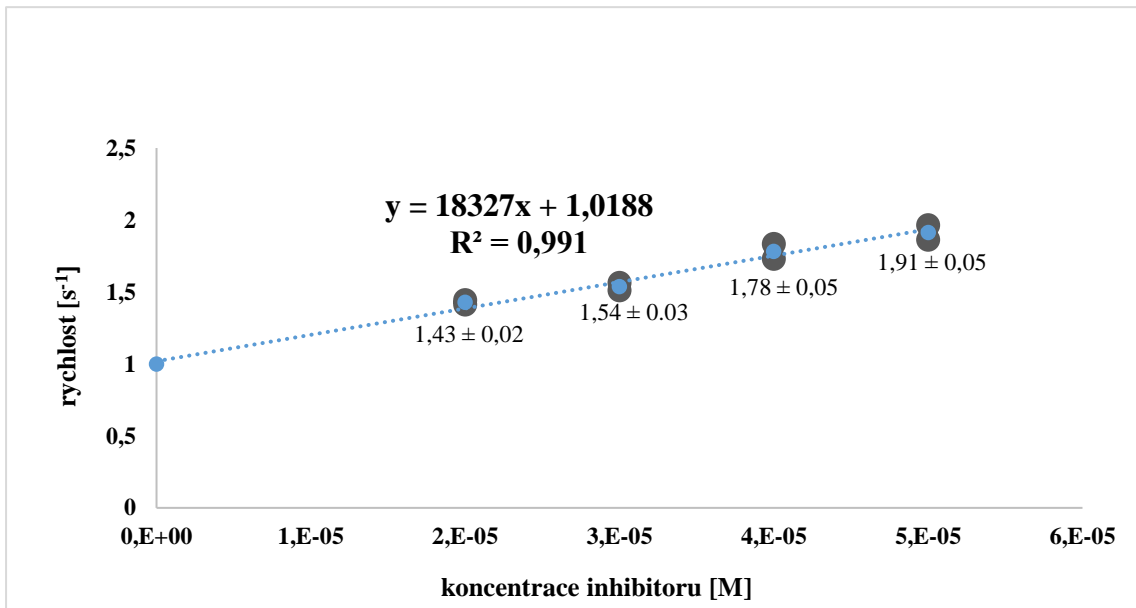
Příloha 8



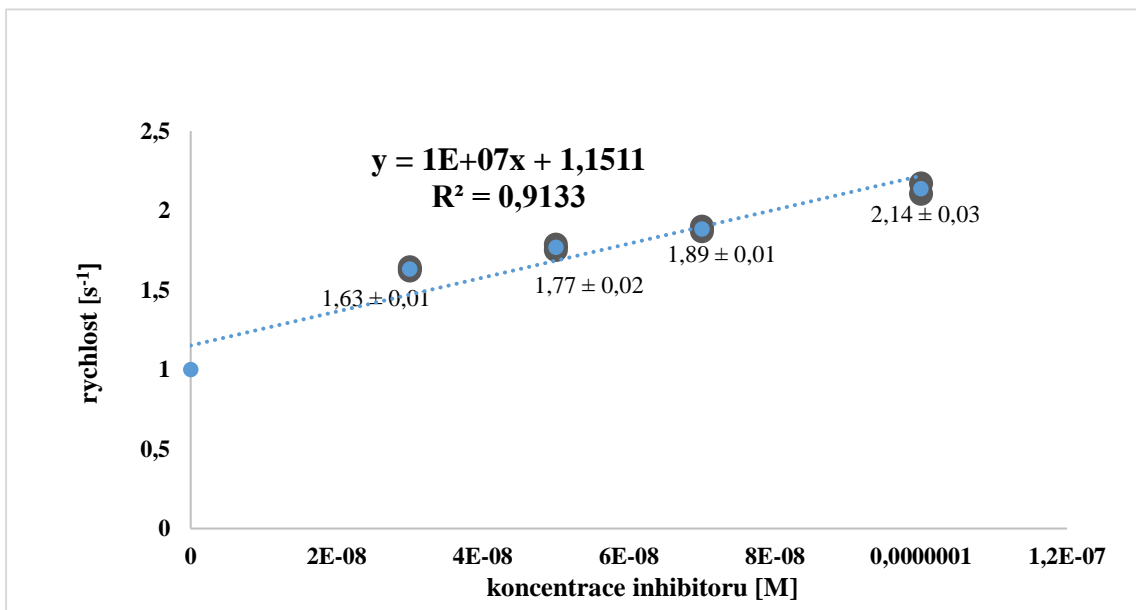
Graf 8: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:4, inhibitor galantamin



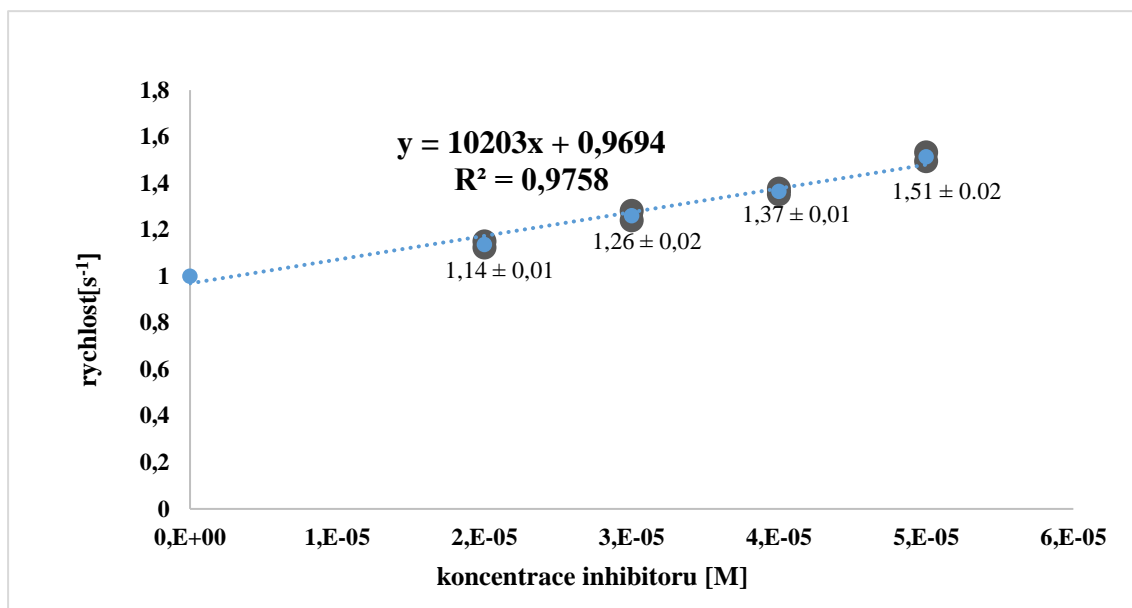
Graf 9: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:4, inhibitor donepezil



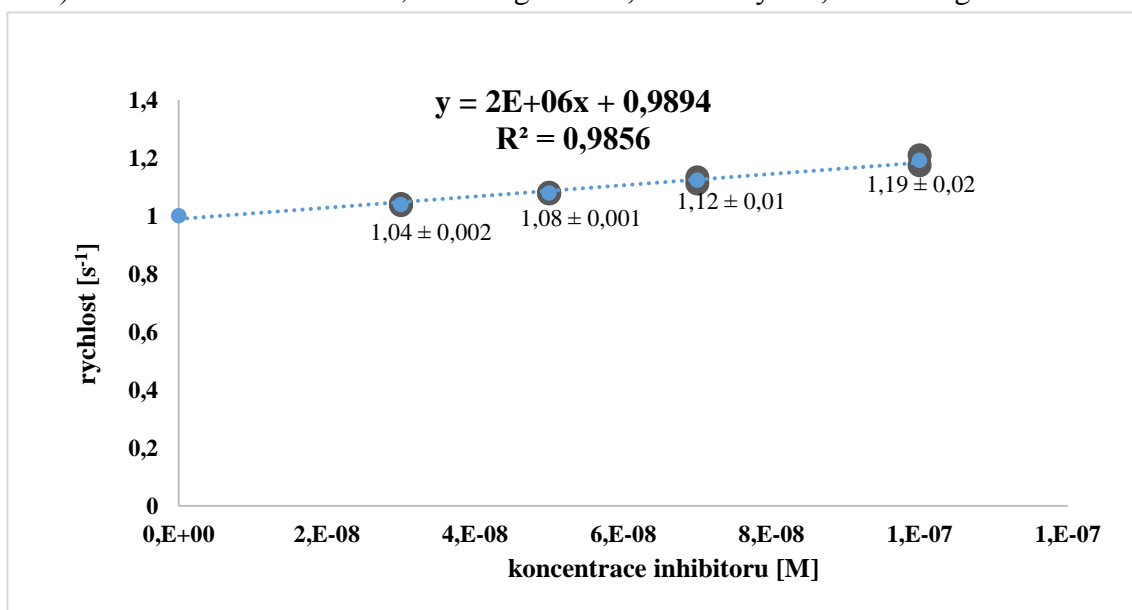
Graf 10: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:9, inhibitor galantamin



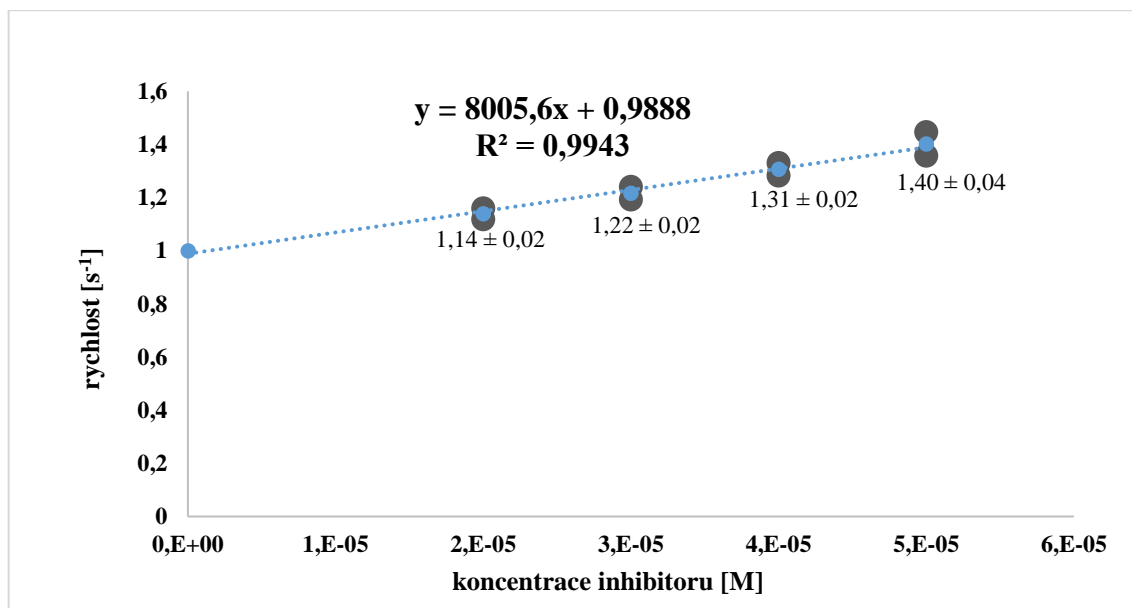
Graf 11: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen DTNA, ředění ery 1:9, inhibitor donepezil



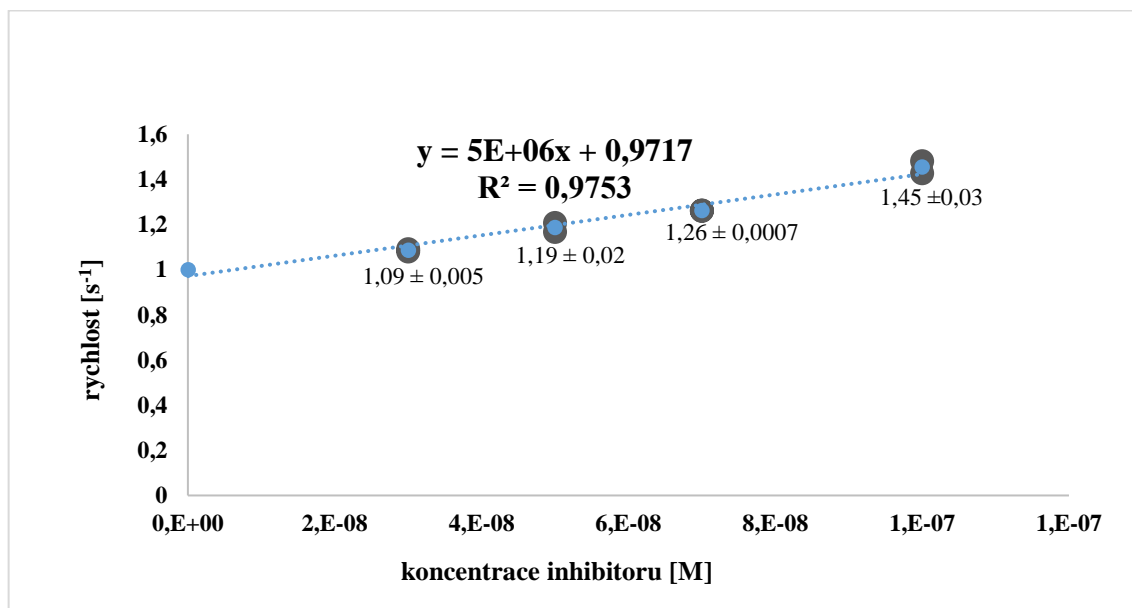
Graf 12: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:4, inhibitor galantamin



Graf 13: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:4, inhibitor donepezil



Graf 14: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:9, inhibitor galantamin



Graf 15: Závislost poměru rychlosti reakce neinhibované/inhibované (průměrné hodnoty z 2 měření) na koncentraci inhibitoru, chromogen PDS, ředění ery 1:9, inhibitor donepezil

Zdroje

- [1] SHAFFERMAN, A. a VELAN, B. 2012. Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Functions (1992nd ed.). Springer.
- [2] PETROIANU, G., 2008. The history of cholinesterase inhibitors: Who was Moschnin(e)? Die Pharmazie [online]. 63, 325–327. Dostupné z: doi:10.1691/ph.2008.7275
- [3] ROBERTSON, D A, 1863. On the Calabar Bean as a New Agent in Ophthalmic Medicine. ISSN 0367-1038
- [4] FISHMAN, M C, 1972. Sir Henry Hallett Dale and acetylcholine story. The Yale journal of biology and medicine. 45(2), 104–118. ISSN 0044-0086.
- [5] STEDMAN, E a EASSON L H, 1932. Choline-esterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. The Biochemical journal [online]. 26(6), 2056–2066. ISSN 0264-6021 (Print). Dostupné z: doi:10.1042/bj0262056
- [6] KOELLE, G. B., 1951. The elimination of enzymatic diffusion artifacts in the histochemical localization of cholinesterases and a survey of their cellular distributions. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.
- [7] HOLAS, O, MUSILEK K, POHANKA M a KUCA K, 2012. The progress in the cholinesterase quantification methods. Expert opinion on drug discovery [online]. 7. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2012.729037
- [8] MASSOULIÉ, J, RIEGER F a BON S, 1971. [Various globular and elongated acetylcholinesterases in electric organs of fishes]. European journal of biochemistry [online]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1971.tb01500.x
- [9] WILSON, I B, GINSBERG S a MEISLICH E K, 1955. The Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by Tetraethyl Pyrophosphate and Diisopropyl Fluorophosphate¹. Journal of the American Chemical Society [online]. B.m.: American Chemical Society, 77(16), 4286–4291. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja01621a035
- [10] BERGMANN, F., IRWIN B a WILSON D. NACHMANSOHN, 1950. Acetylcholinesterase IX. structural features determining the inhibition by amino acids and related compounds. Journal of Biological Chemistry [online]. 186(2), 693–703. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)56262-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)56262-1)
- [11] MASSOULIÉ, J a RIEGER F, 1969. L'acétylcholinestérase des organes électriques de Poissons (torpille et gymnote); complexes membranaires. European Journal of

- Biochemistry [online]. 11(3), 441–455. Dostupné z: doi:
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00794.x>
- [12] SCHUMACHER, M, CAMP S, MAULET Y, NEWTON M, MACPHEE-QUIGLEY K, TAYLOR S, FRIEDMANN T a TAYLOR P, 1986. Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* [online]. 319(6052), 407–409. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/319407a0
- [13] SUSSMAN, J L, HAREL M, FROLOW F, OEFNER C, GOLDMAN A, TOKER L a SILMAN I, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* [online]. B.m.: American Association for the Advancement of Science, 253(5022), 872–879. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1678899
- [14] MACPHEE-QUIGLEY, K, VEDVICK T, TAYLOR P a TAYLOR S, 1986. Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. *The Journal of biological chemistry* [online]. 261, 13565–13570. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)67056-5
- [15] RACHINSKY, T L, CAMP S, LI Y, EKSTRÖM T J, NEWTON M a TAYLOR P, 1990. Molecular cloning of mouse acetylcholinesterase: Tissue distribution of alternatively spliced mRNA species. *Neuron* [online]. 5(3), 317–327. ISSN 0896-6273. Dostupné z: doi: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90168-F](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90168-F)
- [16] WANG, H, YU M, OCHANI M, AMELLA C A, TANOVIĆ M, SUSARLA S, LI J H, WANG H, YANG H, ULLOA L, AL-ABED Y, CZURA K a TRACEY K J, 2003. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* [online]. 421(6921), 384–388. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature01339
- [17] LUO, Z, FUENTES M a TAYLOR P, 1994. Regulation of acetylcholinesterase mRNA stability by calcium during differentiation from myoblasts to myotubes. *The Journal of biological chemistry* [online]. 269, 27216–27223. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)46971-2
- [18] MURRAY, R K., 2002. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H & H 3. Jinočany: H & H. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.
- [19] LEDVINA, M STOKLASOVÁ A a CERMAN J, 2009. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum. ISBN 978-80-246-1416-8.
- [20] KANDEL, E R., ed, 2013. *Principles of neural science*. 5th ed. New York: McGraw-Hill Medical. ISBN 9780071390118.

- [21] COOPER, J. R., BLOOM, F. E., & ROTH, R. H., 2003. The biochemical basis of neuropharmacology (8th ed.). Oxford University Press.
- [22] LAYER P G, 1991. Cholinesterases during development of the avian nervous system. Cellular and Molecular Neurobiology [online]. 11(1), 7–33. ISSN 1573-6830. Dostupné z: doi:10.1007/BF00712798
- [23] DOENICKE, A, GURTNER T, KREUTZBERG G, REMES I, SPIESS W a STEINBEREITHNER K, 1963. Serum cholinesterase anenzymia. Report of a case confirmed by enzyme-histochemical examination of liver-biopsy specimen. Acta anaesthesiologica Scandinavica [online]. 7, 59–68. ISSN 0001-5172 (Print). Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-6576.1963.tb00204.x
- [24] BROOMFIELD, C A, MAXWELL D M, SOLANA R P, CASTRO C A, FINGER A V a LENZ D E, 1991. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics [online]. B.m.: American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 259(2), 633–638. ISSN 0022-3565. Dostupné z: <https://jpet.aspetjournals.org/content/259/2/633>
- [25] MURTHY, V, GAO Y , GENG L, LEBRASSEUR N K, WHITE T A, PARKS R J a BRIMIJOIN S, 2014. Physiologic and metabolic safety of butyrylcholinesterase gene therapy in mice. Vaccine [online]. 32(33), 4155–4162. ISSN 1873-2518 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.067
- [26] BRIMIJOIN, S a Y GAO, 2012. Cocaine hydrolase gene therapy for cocaine abuse. Future medicinal chemistry [online]. 4(2), 151–162. ISSN 1756-8927 (Electronic). Dostupné z: doi:10.4155/fmc.11.183
- [27] CONNORS, N J a HOFFMAN R S, 2013. Experimental treatments for cocaine toxicity: a difficult transition to the bedside. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics [online]. 347(2), 251–257. ISSN 1521-0103 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1124/jpet.113.206383
- [28] POHANKA, M, (2013). Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. Bratisl Lek Listy 114, 726–734.
- [29] NICOLET, Y, LOCKRIDGE O, MASSON P, FONTECILLA-CAMPS J C a NACHON F, 2003. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. The Journal of biological chemistry [online]. 278(42), 41141–41147. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M210241200

- [30] FIDDER, A, HULST A G, NOORT D, RUITER R D, VAN DER SCHANS M J, BENSCHOP P a LANGENBERG J P, 2002. Retrospective detection of exposure to organophosphorus anti-cholinesterases: mass spectrometric analysis of phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Chemical research in toxicology* [online]. 15(4), 582–590. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx0101806
- [31] PAN, Y, MUZYKA J L a ZHAN C G, 2009. Model of Human Butyrylcholinesterase Tetramer by Homology Modeling and Dynamics Simulation. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. B.m.: American Chemical Society, 113(18), 6543–6552. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp8114995
- [32] LOCKRIDGE, O, 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & therapeutics* [online]. 148, 34–46. ISSN 1879-016X (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- [33] BIBEROGLU, K, SCHOPFER L M, TACAL O a LOCKRIDGE O, 2012. The proline-rich tetramerization peptides in equine serum butyrylcholinesterase. *The FEBS journal* [online]. 279(20), 3844–3858. ISSN 1742-4658 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08744.x
- [34] MANOHARAN, I, BOOPATHY R, DARVESH S a LOCKRIDGE O, 2007. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* [online]. 378(1–2), 128–135. ISSN 0009-8981 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2006.11.005
- [35] DARVESH, S a HOPKINS D A, 2003. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *The Journal of comparative neurology* [online]. 463(1), 25–43. ISSN 0021-9967 (Print). Dostupné z: doi:10.1002/cne.10751
- [36] JBILO, O, BARTELS C F, CHATONNET A, TOUTANT J P a LOCKRIDGE O, 1994. Tissue distribution of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase messenger RNA. *Toxicon* [online]. 32(11), 1445–1457. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90416-2
- [37] MAHMOOD, N a CARMICHAEL W W, 1987. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* [online].

- 25(11), 1221–1227. ISSN 0041-0101. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90140-1](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90140-1)
- [38] KUROKAWA, T, SUZUKI K, HAYAOKA T, NAKAGAWA T , IZAWA T, KOBAYASHI M a HARADA N, 1993. Cyclophostin, acetylcholinesterase inhibitor from *Streptomyces lavendulae*. [online]. srpen 1993. ISSN 0021-8820 (Print). Dostupné z: doi:[10.7164/antibiotics.46.1315](https://doi.org/10.7164/antibiotics.46.1315)
- [39] VANWAGENEN B C, LARSEN R, CARDELLINA J H, RANDAZZO D , LIDERT Z C a SWITHENBANK C, 1993. Ulosantoin, a potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 58(2), 335–337. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:[10.1021/jo00054a013](https://doi.org/10.1021/jo00054a013)
- [40] BARRICKLOW J, BLATNIK M, 2013. 2-Arachidonoylglycerol is a substrate for butyrylcholinesterase: A potential mechanism for extracellular endocannabinoid regulation. *Archives of biochemistry and biophysics* [online]. 536(1), 1–5. ISSN 1096-0384 (Electronic). Dostupné z: doi:[10.1016/j.abb.2013.05.003](https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.05.003)
- [41] DE VRIESE C, GREGOIRE F, LEMA-KISOKA R, WAELBROECK M, DELPORTE C, 2004. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* [online]. 145(11), 4997–5005. ISSN 0013-7227 (Print). Dostupné z: doi:[10.1210/en.2004-0569](https://doi.org/10.1210/en.2004-0569)
- [42] STEWART, D, INABA T, TANG B K a KALOW W, 1977. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. *Life Sciences* [online]. 20(9), 1557–1563. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(77\)90448-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(77)90448-9)
- [43] XUE, L, KO M C, TONG M, YANG W, HOU S , FANG L, LIU J, ZHENG F, WOODS J H, TAI H H a ZHAN C G, 2011. Design, preparation, and characterization of high-activity mutants of human butyrylcholinesterase specific for detoxification of cocaine. *Molecular pharmacology* [online]. 79(2), 290–297. ISSN 1521-0111 (Electronic). Dostupné z: doi:[10.1124/mol.110.068494](https://doi.org/10.1124/mol.110.068494)
- [44] ANKER, J J, BRIMIJOIN S , GAO Y , GENG L, ZLEBNIK N E , PARKS R J a CARROLL M E, 2012. Cocaine Hydrolase Encoded in Viral Vector Blocks the Reinstatement of Cocaine Seeking in Rats for 6 Months. *Biological Psychiatry* [online]. B.m.: Elsevier, 71(8), 700–705. ISSN 0006-3223. Dostupné z: doi:[10.1016/j.biopsych.2011.11.014](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.11.014)
- [45] XUE, L, HOU S , YANG W , FANG L, ZHENG F a ZHAN C G, 2013. Catalytic activities of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase against

- (+)- and (-)-cocaine. *Chemico-biological interactions* [online]. 203(1), 57–62. ISSN 1872-7786 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2012.08.003
- [46] LAYER, P G, 1991. Cholinesterases during development of the avian nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. 11(1), 7–33. ISSN 1573-6830. Dostupné z: doi:10.1007/BF00712798
- [47] QUINN, D M, 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* [online]. B.m.: American Chemical Society, 87(5), 955–979. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr00081a005
- [48] GREENBLATT, H M, DVIR H, SILMAN I a SUSSMAN J I, 2003. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of molecular neuroscience: MN* [online]. 20(3), 369–383. ISSN 0895-8696 (Print). Dostupné z: doi:10.1385/JMN:20:3:369
- [49] DOUGHERTY, D A a STAUFFER D A, 1990. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 250(4987), 1558–1560. ISSN 0036-8075 (Print). Dostupné z: doi:10.1126/science.2274786
- [50] MASSOULIÉ, J, PEZZEMENTI L, BON S, KREJCI E a VALLETTE F M, 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in neurobiology* [online]. 41(1), 31–91. ISSN 0301-0082 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/0301-0082(93)90040-y
- [51] LEGAY, C, HUCHET M, MASSOULIÉ J a CHANGEUX J P, 1995. Developmental regulation of acetylcholinesterase transcripts in the mouse diaphragm: alternative splicing and focalization. *The European journal of neuroscience* [online]. 7(8), 1803–1809. ISSN 0953-816X (Print). Dostupné z: doi:10.1111/j.1460-9568.1995.tb00699.x
- [52] VIGNY, M, GISIGER V a MASSOULIÉ J, 1978. „Nonspecific" cholinesterase and acetylcholinesterase in rat tissues: molecular forms, structural and catalytic properties, and significance of the two enzyme systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 75(6), 2588–2592. ISSN 0027-8424 (Print). Dostupné z: doi:10.1073/pnas.75.6.2588
- [53] ANGLISTER, L a SILMAN I, 1978. Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase. *Journal of molecular biology* [online]. 125(3), 293–311. ISSN 0022-2836 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(78)90404-7

- [54] BON, S, COUSSEN F a MASSOULIÉ J, 1997. Quaternary associations of acetylcholinesterase. II. The polyproline attachment domain of the collagen tail. *The Journal of biological chemistry* [online]. 272(5), 3016–3021. ISSN 0021-9258 (Print). Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.5.3016
- [55] GILHUS, N E a VERSCHUUREN J J, 2015. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *The Lancet. Neurology* [online]. 14(10), 1023–1036. ISSN 1474-4465 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(15)00145-3
- [56] PASNOOR, M, DIMACHKIE M M, FARMAKIDIS C a BAROHN R J, 2018. Diagnosis of Myasthenia Gravis. *Neurologic clinics* [online]. 36(2), 261–274. ISSN 1557-9875 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1016/j.ncl.2018.01.010
- [57] HENZE, T, 1996. [Therapy of myasthenia gravis with cholinesterase inhibitors--principles and pharmacologic monitoring]. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* [online]. 64(3), 110–121. ISSN 0720-4299 (Print). Dostupné z: doi:10.1055/s-2007-996377
- [58] KOMLOOVA, M, MUSILEK K, DOLEZAL M, GUNN-MOORE F a KUCA K, 2010. Structure-activity relationship of quaternary acetylcholinesterase inhibitors - outlook for early myasthenia gravis treatment. *Current medicinal chemistry* [online]. 17(17), 1810–1824. ISSN 1875-533X (Electronic). Dostupné z: doi:10.2174/092986710791111198
- [59] BARTUS, R T, DEAN R L, BEER a LIPPA A S, 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)* [online]. 217(4558), 408–414. ISSN 0036-8075 (Print). Dostupné z: doi:10.1126/science.7046051
- [60] CHEN, X a MOBLEY W C, 2019. Exploring the Pathogenesis of Alzheimer Disease in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Converging Insights From Alternative Hypotheses. *Frontiers in Neuroscience* [online]. 13, 446. ISSN 1662-453X. Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2019.00446
- [61] PLOTKIN, D A a JARVIK L F, 1986. Cholinergic Dysfunction in Alzheimer Disease: Cause or Effect? Elsevier, *Progress in Brain Research*, s. 91–103. ISSN 0079-6123. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)60644-5
- [62] DAVIS, K L MOHS L C, 1982. Enhancement of memory processes in Alzheimer's disease with multiple-dose intravenous physostigmine. *The American journal of*

- psychiatry [online]. 139(11), 1421–1424. ISSN 0002-953X (Print). Dostupné z: doi:10.1176/ajp.139.11.1421
- [63] THAL, L J, MASUR D M, SHARPLESS N S, FULD P A a DAVIES P, 1986. Acute and chronic effects of oral physostigmine and lecithin in Alzheimer's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* [online]. 10(3), 627–636. ISSN 0278-5846. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0278-5846(86)90032-1
- [64] SUMMERS, W K, 2006. Tacrine, and Alzheimer's treatments. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. 9(3 Suppl), 439–445. ISSN 1387-2877 (Print). Dostupné z: doi:10.3233/jad-2006-9s350
- [65] MASSOULIÉ, J a BON S, 1982. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual review of neuroscience* [online]. 5, 57–106. ISSN 0147-006X (Print). Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ne.05.030182.000421
- [66] BRAI, E, SIMON F, COGONI A a GREENFIELD S A, 2018. Modulatory Effects of a Novel Cyclized Peptide in Reducing the Expression of Markers Linked to Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience* [online]. 12, 362. ISSN 1662-4548 (Print). Dostupné z: doi:10.3389/fnins.2018.00362
- [67] SIEK, G C, KATZ L S, FISHMAN E B, KOROSI T S a MARQUIS J K, 1990. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biological psychiatry* [online]. 27(6), 573–580. ISSN 0006-3223 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/0006-3223(90)90524-6
- [68] CABAL, J, PATOCKA J, KASSA J a MATE L, 2005. 2. Theoretical part [online]. 158, 157–158. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.067
- [69] JOHNSON, K a GOODY R S, 2011. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 50(39), 8264–8269. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi201284u
- [70] SPECTOR, T a HAJIAN G, 1981. Statistical methods to distinguish competitive, noncompetitive, and uncompetitive enzyme inhibitors. *Analytical Biochemistry* [online]. 115(2), 403–409. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90025-7
- [71] RAMSAY, R R a TIPTON K F, 2017. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase

- Inhibitory Drugs. *Molecules* (Basel, Switzerland) [online]. 22(7). ISSN 1420-3049 (Electronic). Dostupné z: doi:10.3390/molecules22071192
- [72] GOLDSTEIN, A, 1944. The mechanism of enzyme-inhibitor-substrate reactions: Illustrated by the cholinesterase-physostigmine-acetylcholine system. *The Journal of general physiology* [online]. 27(6), 529–580. ISSN 0022-1295 (Print). Dostupné z: doi:10.1085/jgp.27.6.529
- [73] AMINE, A, HARRAD L E, ARDUINI F , MOSCONE D a PALLESCHI G, 2014. Analytical aspects of enzyme reversible inhibition. *Talanta* [online]. 118, 368–374. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.025
- [74] MORRISON, J F, 1969. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* [online]. 185(2), 269–286. ISSN 0005-2744. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90420-3
- [75] FLANAGAN, M E, ABRAMITE J A, ANDERSON D P, AULABAUGH A , DAHAL U P, 2014. Chemical and Computational Methods for the Characterization of Covalent Reactive Groups for the Prospective Design of Irreversible Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 57(23), 10072–10079. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm501412a
- [76] AHMED, M, ROCHA J B T, CORRÊA M, MAZZANTI C M, ZANIN R F, MORSCH I B a SCHETINGER R C , 2006. Inhibition of two different cholinesterases by tacrine. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 162(2), 165–171. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.06.002
- [77] EAGGER, S, MORANT N, LEVY R a SAHAKIAN B, 1992. Tacrine in Alzheimer's Disease: Time Course of Changes in Cognitive Function and Practice Effects. *British Journal of Psychiatry* [online]. B.m.: Cambridge University Press, 160(1), 36–40. Dostupné z: doi:10.1192/bjp.160.1.36
- [78] KAUSAR, S, MUSTAFA H G, ALTAF A A, MUSTAFA G a BADSHAH A, 2019. Galantamine☆. In: *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. B.m.: Elsevier. ISBN 978-0-12-801238-3. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.98174-1
- [79] HIRAOKA, K, OKAMURA N, FUNAKI Y, WATANUKI S, TASHIRO M, KATO M, HAYASHI A, 2009. Quantitative analysis of donepezil binding to acetylcholinesterase using positron emission tomography and [5-11C-

- methoxy]donepezil. *NeuroImage* [online]. 46(3), 616–623. ISSN 1053-8119. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.006>
- [80] BAR-ON, P, MILLARD C B, HAREL M , DVIR H, ENZ A , SUSSMAN J L a SILMAN I, 2002. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmine,. *Biochemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 41(11), 3555–3564. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi020016x
- [81] AUGUSTINSSON, K B a HOLMSTEDT B, 1965. Determination of cholinesterase in blood samples dried on filter-paper and its practical application. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* [online]. 17(6), 573–583. ISSN 0036-5513 (Print). Dostupné z: doi:10.1080/00365516509083366
- [82] ELLMAN, G L, COURTNEY K D, ANDRES V J a FEATHER-STONE R M, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* [online]. 7, 88–95. ISSN 0006-2952 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9
- [83] KUČA, K, JUN D, BAJGAR J, KARASOVA J, 2010. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteráz. *Chem. Listy* 104, 46–50.
- [84] KHALED, E, HASSAN H N A, MOHAMED G G, RAGAB F A a SELEIM A E A, 2010. Disposable potentiometric sensors for monitoring cholinesterase activity. *Talanta* [online]. 83(2), 357–363. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.020>
- [85] VANZOLINI, K L, VIEIRA L C C, CORRÊA A G, CARDOSO C L a CASS Q B, 2013. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 56(5), 2038–2044. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm301732a
- [86] FORSBERG, M, GREEN J R A a BRENNAN J D, 2011. Continuous Flow Immobilized Enzyme Reactor–Tandem Mass Spectrometry for Screening of AChE Inhibitors in Complex Mixtures. *Analytical Chemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 83(13), 5230–5236. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac200534t
- [87] LIAO, S, HAN W , DING H, XIE D, TAN H, YANG S , WU Z , SHEN G a YU R, 2013. Modulated Dye Retention for the Signal-On Fluorometric Determination of

- Acetylcholinesterase Inhibitor. *Analytical Chemistry* [online]. B.m.: American Chemical Society, 85(10), 4968–4973. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac400865t
- [88] EHRENPREIS, S, MITTAG T W a PATRICK P, 1970. Radiometric assay of cholinesterases in intact tissues in the nanomolar concentration range of acetylcholine. *Biochemical Pharmacology* [online]. 19(6), 2165–2169. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/0006-2952(70)90316-3
- [89] ANDREESCU, S a MARTY J L, 2006. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering* [online]. 23(1), 1–15. ISSN 1389-0344. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.01.001
- [90] ANDREESCU, S a SADIK O, 2004. Trends & challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring. *Pure Appl. Chem* [online]. 76, 861–878. Dostupné z: doi:10.1351/pac200476040861
- [91] BONNET, CH, ANDREESCU S a MARTY J, 2003. Adsorption: An easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Analytica Chimica Acta* [online]. 481, 209–211. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(03)00122-3
- [92] JOSHI, K A, TANG J, HADDON R, WANG J, CHEN W a MULCHANDANI A, 2005. A Disposable Biosensor for Organophosphorus Nerve Agents Based on Carbon Nanotubes Modified Thick Film Strip Electrode. *Electroanalysis* [online]. 17, 54–58. Dostupné z: doi:10.1002/elan.200403118
- [93] SKLÁDAL, P, FIALA M a KREJČÍ J, 1996. Detection of Pesticides in the Environment Using Biosensors Based on Cholinesterases. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. B.m.: Taylor & Francis, 65(1–4), 139–148. Dostupné z: doi:10.1080/03067319608045549
- [94] WOREK, F, EYER P a THIERMANN H, 2012. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: a versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug testing and analysis* [online]. 4(3–4), 282–291. ISSN 1942-7611 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1002/dta.337
- [95] NAIK, R S, DOCTOR B P a SAXENA A, 2008. Comparison of methods used for the determination of cholinesterase activity in whole blood. *Chemico-biological*

- interactions [online]. 175(1–3), 298–302. ISSN 0009-2797 (Print). Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.05.002
- [96] GORDON, R, HAIGH J, GARCIA G, DOCTOR B P, FARAH M, BRUECKNER R, FEASTER S, DOCTOR D, LENZ D, CLARK C, RIEL M , AISEN P, SMART W, MO J, SULLIVAN B a TSAI J, 2004. Current Pyridostigmine Bromide and Huperzine A Studies and Future Cholinesterase Screening Using the WRAIR Whole Blood Cholinesterase Assay.
- [97] HAIGH, JR, LEFKOWITZ L J, CAPACIO B R, DOCTOR B P a GORDON R K, 2008. Advantages of the WRAIR whole blood cholinesterase assay: Comparative analysis to the micro-Ellman, Test-mate ChETM, and Michel (Δ pH) assays. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 175(1), 417–420. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.032>
- [98] KAO, L T.-H. a GRATZL M, 2009. Serum cholinesterase assay using a reagent-free micro pH-stat. *Analytical Biochemistry* [online]. 389(2), 93–96. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.034>
- [99] SHETTY, G N, SYED N, TOHDA K a GRATZL M, 2005. Hydrodynamic electrochemistry in 20 microL drops in the rotating sample system. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* [online]. 21(10), 1155–1160. ISSN 0910-6340 (Print). Dostupné z: doi:10.2116/analsci.21.1155
- [100] TECLES, F a CERÓN J J, 2003. Spectrophotometric whole blood cholinesterase determination: Preanalytical and analytical sources of variation. *Anales de Veterinaria de Murcia* [online]. 19, 61–76. Dostupné z: <https://revistas.um.es/analesvet/article/view/17091>
- [101] WILLIG, S, HUNTER D L, DASS P D a PADILLA S, 1996. Validation of the use of 6,6'-dithiodinicotinic acid as a chromogen in the Ellman method for cholinesterase determinations. *Veterinary and human toxicology*. 38(4), 249–253. ISSN 0145-6296.
- [102] UETE, T, MIYAMATO Y, OHNISHI M a SHIMANO N, 1972. Spectrophotometric Micromethod for Measuring Cholinesterase Activity in Serum or Plasma. *Clinical Chemistry* [online]. 18(5), 454–458. ISSN 0009-9147. Dostupné z: doi:10.1093/clinchem/18.5.454
- [103] AKBAR M, ANAEIGOUDARI A, ZAHEDIFAR M, POURAMIRI B, AYATI A a LOTFI S, 2021. Design, Green Synthesis, and Biological Evaluation of New

Substituted Tetrahydropyrimidine Derivatives as Acetylcholinesterase Inhibitors. Polycyclic Aromatic Compounds [online]. B.m.: Taylor & Francis, 0(0), 1–11. Dostupné z: doi:10.1080/10406638.2021.1933102

- [104] AMAT-UR-RASOOL H, AHMED M, HASNAIN S a CARTER W G, 2021. Anti-Cholinesterase Combination Drug Therapy as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. Brain sciences [online]. 11(2). ISSN 2076-3425 (Print). Dostupné z: doi:10.3390/brainsci11020184
- [105] LUO, Z, SHENG J, SUN Y, LU C, YAN J, LIU A, LUO H, HUANG L a LI X, 2013. Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. Journal of Medicinal Chemistry [online]. B.m.: American Chemical Society, 56(22), 9089–9099. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm401047q