

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**VYUŽITÍ INDOXYLACETÁTU JAKO CHROMOGENNÍHO
A FLUROGENNÍHO SUBSTRÁTU PRO CHOLINESTERASY**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Kateřina Škvorová

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

**USING OF INDOXYALCETATE AS A CHROMOGENIC
AND FLUOROGENIC SUBSTRATE FOR CHOLINESTERASES**

DIPLOMA THESIS

2023

Bc. Kateřina Škvorová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina Škvorová
Osobní číslo: C21465
Studijní program: N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví
Téma práce: Využití indoxylacetátu jako chromogenního a fluorogenního substrátu pro cholinesterázy
Téma práce anglicky: Using of Indoxylacetate as a Chromogenic and Fluorogenic Substrate for Cholinesterases
Zadávající katedra: Katedra biologických a biochemických věd

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se funkce, struktury a mechanismu působení cholinesteráz.
2. Shrnout význam změněné aktivity cholinesteráz pro rozvoj Alzheimerovy choroby, případně dalších neurodegenerativních onemocnění.
3. Popsat možnosti využití inhibitorů cholinesteráz.
4. Uvést stručný přehled analytických metod využívaných ke stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

Experimentální část:

1. Testovat různé reakční podmínky za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické a fluorimetrické měření aktivity cholinesteráz s využitím indoxylacetátu jako substrátu.
2. Stanovit kinetické parametry K_M a V_m .
3. Za zvolených vhodných reakčních podmínek stanovit inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů cholinesteráz a porovnat je se standardními látkami.
4. Stanovit rozdělovací koeficient testovaných inhibitorů.

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

Seznam doporučené literatury:

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

Datum zadání diplomové práce: 23. prosince 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 5. května 2023

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Využití indoxylacetátu jako chromogenního a fluorogenního substrátu pro cholinesterasy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2. 5. 2023

Bc. Kateřina Škvorová

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucího mé diplomové práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za cenné rady a odborný přístup při vedení praktické části. V neposlední řadě za ochotu, vstřícnost a čas věnovaný pro vytvoření této práce.

ANOTACE

Teoretická část je věnována cholinestarám – acetylcholinesterase a butyrylcholinesterase. Dále se zaměřuje na inhibitory těchto enzymů a na neurodegenerativní onemocnění, zejména na Alzheimerovu chorobu. Experimentální část zahrnuje stanovení reakčních rychlostí třemi metodami s využitím acetylthiocholinu a indoxylacetátu jako substrátů. U neinhibovaných reakcí jsou stanoveny kinetické parametry, u inhibovaných reakcí pak hodnoty IC_{50} .

KLÍČOVÁ SLOVA

Cholinesterasa, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, inhibitory cholinesteras, neurodegenerativní onemocnění, Alzheimerova choroba, myasthenia gravis

TITLE

Using of indoxyacetate as a chromogenic and fluorogenic substrate for cholinesterases

ANNOTATION

The theoretical part is devoted to cholinesterases – acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. It is also focused on inhibitors of cholinesterases and neurodegenerative disease, especially on Alzheimer's disease. The experimental part includes determination of reaction rate by three methods using acetylthiocholine and indoxy acetate as substrates. Kinetic parameters are determined for uninhibited reaction and values of IC_{50} are determined for inhibited reaction.

KEY WORDS

Cholinesterase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibitors of cholinesterases, neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, myasthenia gravis

SEZNAM ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ADME	„vstřebávání, distribuce, účinnost, metabolismus a vylučování“ (absorption, distribution, efficacy, metabolism and excretion)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEI	acetylcholinesterasový inhibitor
AChR	receptor acetylcholinesterasy (acetylcholinesterase receptor)
A β	amyloid beta
APP	amyloidní prekurzorový protein (amyloid precursor protein)
ATCh	acetylthiocholin
BBB	hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier)
BChE	butyrylcholinesterasa
BTCh	butyrylcholin
CAS	katalytické aktivní místo (catalytic active site)
ChE	cholinesterasa
ChEI	inhibitory cholinesteras
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
IA	indoxylacetát
IVIg	intravenózní imunoglobulin
MG	myasthenia gravis

NDD	neurodegenerativní onemocnění (neurodegenerative diseases)
NS	nervový systém
OAH	oxoaniontová jamka (oxyanion hole)
PAS	periferní aniontové místo (peripheral anionic site)
PNS	periferní nervová soustava
PLEX	výměna plasmy (plasma exchange)
p-tau	protein tau (tau protein)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Enzymová hydrolýza ACh pomocí AChE.....	18
Obrázek 2: Metabolismus ACh pomocí AChE.....	19
Obrázek 3: Katalytická podjednotka AChE s ACh.....	20
Obrázek 4: Dva monomery BChE tvořící společně dimer	24
Obrázek 5: Porovnání zbytků v acylových kapsách u BChE a AChE	25
Obrázek 6: 3D struktura BChE a AChE.....	26
Obrázek 7: Struktura klinicky užívaných inhibitorů cholinesteras pro léčbu AD	27
Obrázek 8: Chemická struktura biologicky aktivních karbamátů.....	31
Obrázek 9: Hematoencefalická bariéra	37
Obrázek 10: Srovnání mozku zdravého člověka s pacientem trpícím AD.....	39
Obrázek 11: Hydrolytická (enzymová) reakce s použitím substrátu a Ellmanova činidla.....	50
Obrázek 12: Hydrolytické (enzymové) štěpení indoxylacetátu za vzniku indiga	51

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled testovaných inhibitorů	47
Tabulka 2: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím ATCh jako substrátu.....	63
Tabulka 3: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím ATCh jako substrátu.....	63
Tabulka 4: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím IA jako substrátu	64
Tabulka 5: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím IA jako substrátu	65
Tabulka 6: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím IA jako substrátu	66
Tabulka 7: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím IA jako substrátu	66
Tabulka 8: Přehled zprůměrovaných hodnot IC_{50} daných inhibitorů u příslušných měření	68
Tabulka 9: Přehled testovaných inhibitorů s hodnotami log P a tPSA	73

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci ATCh při dané aktivitě AChE	59
Graf 2: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci ATCh při dané aktivitě BChE	59
Graf 3: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě AChE.....	60
Graf 4: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě BChE	60
Graf 5: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě AChE.....	61
Graf 6: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě BChE.....	61
Graf 7: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu ATCh a enzymu AChE o aktivitě 0,1 U.....	63
Graf 8: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu ATCh a enzymu BChE o aktivitě 0,2 U.....	63
Graf 9: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu IA a enzymu AChE o aktivitě 0,8 U	64
Graf 10: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu IA a enzymu BChE o aktivitě 0,4 U	65
Graf 11: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu IA a enzymu AChE o aktivitě 0,08 U	65
Graf 12: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím IA a BChE o aktivitě 0,08 U.....	66
Graf 13: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,2 U.....	69
Graf 14: Závislost % inhibice na log c inhibitoru č. 3 ve 21. s.....	69
Graf 15: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,6 U.....	70
Graf 16: Závislost % inhibice na log c inhibitoru č. 1 ve 20. min	70
Graf 17: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,1 U.....	71
Graf 18: Závislost % inhibice na log c inhibitoru č. 1 ve 20. s.....	71

OBSAH

ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 Cholinesterasy	18
1.1.1 Acetylcholinesterasa	18
1.1.1.1 Funkce	19
1.1.1.2 Struktura	19
1.1.1.3 Formy.....	21
1.1.1.4 Výskyt.....	22
1.1.2 Butyrylcholinesterasa	22
1.1.2.1 Funkce	23
1.1.2.2 Struktura	24
1.1.2.3 Výskyt.....	24
1.1.3 Porovnání AChE a BChE	25
1.2 Inhibitory cholinesteras	26
1.2.1 Reverzibilní inhibitory	27
1.2.1.1 Takrin.....	27
1.2.1.2 Donepezil	28
1.2.1.3 Galantamin.....	28
1.2.1.4 Rivastigmin	29
1.2.1.5 Huperzin A.....	29
1.2.1.6 Neostigmin.....	30
1.2.1.7 Fyzostigmin.....	30
1.2.1.8 Pyridostigmin	31
1.2.2 Pseudoireverzibilní inhibitory	31
1.2.2.1 Karbamáty.....	31
1.2.3 Ireverzibilní inhibitory	32
1.2.3.1 Flavonoidy	32
1.2.3.2 Kumarin	32
1.2.3.3 Bambuterol.....	32

1.3	Detekce AChE, BChE a jejich inhibitorů.....	33
1.3.1	Kolorimetrické metody	33
1.3.2	Elektrochemické metody.....	34
1.3.3	Fluorescenční metody	34
1.4	Neurodegenerativní onemocnění	35
1.4.1	Klinické projevy.....	35
1.4.2	Klasifikace	36
1.4.3	Léčba	36
1.4.4	Prevalence.....	36
1.4.5	Hematoencefalická bariéra	36
1.4.6	Alzheimerova choroba	37
1.4.6.1	Charakteristika a patologie AD.....	38
1.4.6.2	Diagnóza	40
1.4.6.3	Léčba	40
1.4.6.4	Prevalence.....	41
1.4.6.5	Cholinergní hypotéza.....	41
1.4.6.6	Amyloidní hypotéza	42
1.4.6.7	Hypotéza tau proteinu.....	42
1.4.7	Myasthenia gravis	42
1.4.7.1	Charakteristika MG	43
1.4.7.2	Diagnostika	43
1.4.7.3	Léčba	43
1.4.7.4	Prevalence.....	45
2	CÍL PRÁCE	46
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	47
3.1	Použité chemikálie a roztoky.....	47
3.2	Použité přístroje a pomůcky	48
3.3	Stanovení aktivity enzymu	48
3.4	Stanovení reakční rychlosti	49

3.4.1	Stanovení rychlosti hydrolýzy acetylthiocholinu cholinesterasami (Ellmanova metoda)	49
3.4.2	Stanovení rychlosti hydrolýzy indoxylacetátu cholinesterasami	51
3.4.2.1	UV/VIS spektrometrie	51
3.4.2.2	Fluorescenční měření	52
3.5	Stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů cholinesteras	53
3.5.1	Stanovení IC ₅₀ s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)	54
3.5.2	Stanovení IC ₅₀ s využitím indoxylacetátu	55
3.5.2.1	UV/Vis spektrometrie	55
3.5.2.2	Fluorescenční měření	56
4	VÝSLEDKY	58
4.1	Stanovení reakční rychlosti	58
4.1.1	Stanovení rychlosti hydrolýzy acetylthiocholinu cholinesterasami (Ellmanova metoda)	59
4.1.2	Stanovení rychlosti hydrolýzy indoxylacetátu cholinesterasami	60
4.1.2.1	UV/Vis spektrometrie s využitím IA	60
4.1.2.2	Fluorimetrické měření s využitím IA	61
4.2	Stanovení kinetických parametrů	62
4.2.1	Stanovení kinetických parametrů s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)	62
4.2.2	Stanovení kinetických parametrů s využitím indoxylacetátu	64
4.2.2.1	UV/Vis spektrometrie	64
4.2.2.2	Fluorimetrické měření	65
4.3	Stanovení reakční rychlosti u inhibované reakce	66
4.3.1	Stanovení IC ₅₀ s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)	69
4.3.2	Stanovení IC ₅₀ s využitím indoxylacetátu	70
4.3.2.1	UV/Vis spektrometrie	70
4.3.2.2	Fluorimetrické měření	71
4.4	Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA	72
4.4.1	Lipofilita	72
4.4.2	Rozdělovací koeficient	72

4.4.3	Lipinského pravidlo	72
4.4.4	tPSA	73
5	DISKUZE.....	75
5.1	Stanovení reakční rychlosti	75
5.2	Stanovení kinetických parametrů	76
5.3	Stanovení reakční rychlosti u inhibované reakce	76
6	ZÁVĚR	78
	ZDROJE	79

ÚVOD

Cholinesterasy (ChE) jsou spojovány s neurologickými patologiemi, především s Alzheimerovou chorobou (AD) nebo myasthenií gravis (MG). Aktivita těchto enzymů, primárně acetylcholinesterasy (AChE), bývá vysoká. ChE mají také významné nekatalytické funkce, které mohou přispět k agregaci amyloidu (Kiełczewska a kol., 2021).

Acetylcholinesterasa je enzym, patřící do skupiny hydrolas, které působí na esterové vazby karboxylových kyselin. Jedná se o serinovou hydrolasu, ukončující působení neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) jeho hydrolýzou na kyselinu octovou a cholin. Hraje důležitou roli v patogenezi neurodegenerativních onemocnění (NDD), neboť ovlivňuje zánětlivou odpověď, apoptózu, oxidační stres či agregaci patologických proteinů (Thapa a kol., 2017; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Butyrylcholinesterasa (BChE) je sérový protein a enzym, označovaný také jako plazmatická cholinesterasa či pseudocholinesterasa. Vyskytuje se hlavně ve formě glykosylovaného rozpustného tetrameru. Hraje důležitou roli v metabolismu mnoha léčiv (Jasiecki a kol., 2021).

Inhibitory cholinesteras (ChEI) se využívají jako cholinergní léčiva. Jejich funkcí je zpomalení progresu a tlumení symptomů neurodegenerativních onemocnění. Dosud jsou hlavními léky pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy choroby, jejich užívání je však omezené, neboť vykazují četné vedlejší účinky (Sharma, 2019; Shinagawa a Shigeta, 2014; Yamazaki a kol., 2021).

Alzheimerova choroba je jedno z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění lidí v pokročilém věku. Základem léčby jsou inhibitory acetylcholinesterasy (AChEI) jako je donepezil, rivastigmin a galantamin. Jedním z nejslibnějších přístupů pro symptomatickou léčbu AD je zvýšení synaptické hladiny ACh v mozku pomocí inhibice enzymu AChE (Anand a kol., 2012; Huang a kol., 2020).

Myasthenia gravis je autoimunitní onemocnění způsobené protilátkami proti acetylcholinovým receptorům (AChR) a dalším strukturálním proteinům nervosvalového spojení. Dochází ke snížení cholinergního přenosu, což může mít za následek svalovou slabost. Oční MG se zpočátku léčí inhibitory AChE, generalizovaná vyžaduje dlouhodobou imunosupresi (Müllges a Stoll, 2019).

1 TEORETICKÁ ČÁST

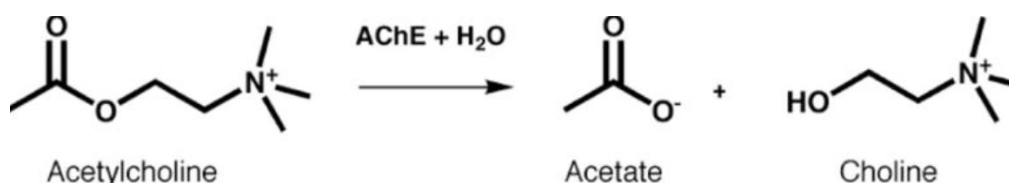
1.1 Cholinesterasy

Cholinesterasy jsou třídou serinových hydrolas, jejichž úlohou je hydrolýza esterů cholinu, které mají v organismu různou účinnost. U obratlovců představují dvoučlennou skupinu, neboli dvě formy, kódované odlišnými geny – acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu (Korabecny, 2021; Silman a Sussman, 2008).

Funkcí těchto hydrolas je několik: hrají důležitou roli v nervovém systému (NS), zahrnující periferní (PNS) a centrální (CNS) nervový systém. Kromě cholinergního přenosu se podílejí i na buněčné proliferaci, diferenciaci a reakcích na různé inzulty (např. stres, tvorba amyloidu). Dále mohou sloužit jako biochemické markery některých patologií (Eckroat a kol., 2020; Korabecny, 2021; Talesa, 2001).

1.1.1 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa je enzym, patřící do rodiny karboxyesteras. Za fyziologických podmínek ukončuje působení neurotransmiteru acetylcholinu jeho hydrolýzou na neuromuskulárních spojích, za vzniku cholinových a acetátových iontů (viz obr. 1). ACh je důležitý neurotransmitter, regulující pohyb svalů a mozkové funkce (paměť, pozornost, učení) na cholinergních synapsích. Díky své rychlé katalýze je AChE považována za jeden z nejučinnějších enzymů (Korabecny, 2021; Sharma, 2019; Silman a Sussman, 2008).

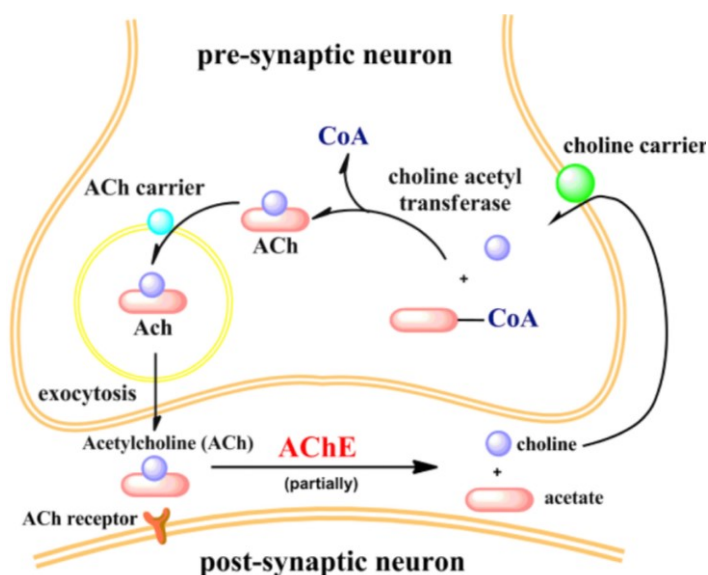


Obrázek 1: Enzymová hydrolýza ACh pomocí AChE (Dvir a kol., 2010)

Účinky (a tedy i hladina AChE) závisí na typu buňky, stavu buněčné diferenciaci, buněčné distribuci a vazbě s proteinovými partnery. Mimo jiné hraje důležitou roli v patogenezi neurodegenerativních onemocnění – ovlivňuje zánětlivou odpověď, účastní se oxidačního stresu, degradace patologických proteinů a apoptózy. Bylo zjištěno, že buňky exprimující tento enzym snadněji podléhají apoptóze. Pokud je AChE inhibována, dochází i k inhibici apoptózy. Dále se tato cholinesterasa účastní tvorby apoptosomu, pro jehož vznik je nezbytná interakce AChE s kaveolinem a následná reakce s cytochromem c. Inhibice AChE může způsobit řadu nežádoucích zdravotních účinků včetně toxicity (Eckroat a kol., 2020; Li a kol., 2022; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

1.1.1.1 Funkce

Jak již bylo uvedeno výše, základní biologickou úlohou acetylcholinesterasy je ukončení přenosu vzruchu na cholinergních synapsích hydrolyzou neurotransmiteru acetylcholinu (viz obr. 2) (Dvir a kol., 2010).



Obrázek 2: Metabolismus ACh pomocí AChE (Li, Q. a kol., 2018)

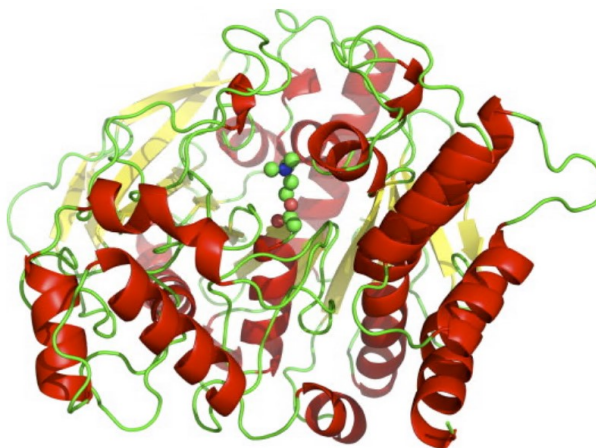
ACh je v synaptické štěrbině částečně hydrolyzován pomocí AChE na cholin a acetát. Volný cholin se dostává přes nosič zpět do presyntaptického neuronu, kde se spolu s acetylkoenzymem A účastní resyntézy ACh. Tato reakce je katalyzována cholinacetyltransferasou. Následně se uvolní jedna molekula koenzymu A. ACh pronikne do vezikul a pomocí exocytózy se dostává opět ven, aby inicioval nový oběh (Li a kol., 2018).

Při vývoji nervového systému je AChE zodpovědná nejen za cholinergní neurotransmisi, ale podílí se i na vzniku neuromuskulárních a thalamo-kortikálních spojů a růstu axonů. Může působit jako mediátor změn buněčné architektury v neurogenезi a může být příčinou neuroplastických procesů v neokortexu. Dále se podílí na diferenciaci embryonálních kmenových buněk, buněčné adhezi, hematopoéze a trombopoéze, synaptogenezi, aktivaci dopaminových neuronů, sestavování amyloidních β -vláken ($A\beta$), aj. (Jiang a Zhang, 2008; Korabecny, 2021; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

1.1.1.2 Struktura

Aktivní místo AChE (obr. 3) má tvar hluboké a úzké rokle a rozšiřuje se směrem k základně enzymu. Základna a výstelka rokle jsou složeny ze zbytků Asn66 a Ile444, obsahují i zbytky Asp285, Glu273, Tyr334, Asp72 nebo Glu199. Glu199 je spojen se

stabilizací přechodného stavu, zbytek Asp72 se podílí na zachycení ligandu v rokli. V rokli je téměř středově symetricky od každé katalytické podjednotky umístěno aktivní centrum. Vzdálenost aktivního centra a katalytické podjednotky je 4 Å (Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).



Obrázek 3: Katalytická podjednotka AChE s ACh (Silman a Sussman, 2008)

Molekula AChE má elipsoidní tvar o rozměrech cca 45 × 60 × 65 Å a obsahuje celkem 537 aminokyselin. Její vazebné místo se skládá z několika dílčích míst: katalytického aktivního místa (CAS), periferního aniontového místa (PAS), acylové kapsy a oxyaniontové jamky (OAH) (Eckroat a kol., 2020; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Katalytické aktivní místo se nachází na dně úzké prohlubně uvnitř enzymu, kde probíhá hydrolytická reakce. Toto místo se skládá ze dvou částí – negativně nabitého aniontového místa pro substrát a esterového místa. Na aniontovém místě se kromě kladně nabitého kvartérního aminu ACh mohou vázat i další kationtové substráty a inhibitory. Esterové místo je tvořeno zbytky serinu, kyseliny glutamové a histidinu, označující se souhrnně jako „katalytická triáda“. Součástí katalytické triády je Ser 200, zodpovědný za hydrolyzu esterů cholinu přenosem protonů (De Boer a kol., 2021; Sharma, 2019; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Jakmile ligand vstoupí do rokle, začnou svou úlohu plnit acylová a cholinová vazebná místa. Tato vazebná místa se nacházejí v blízkosti katalytické triády a pomáhají při umístění ligandu důležitého pro katalýzu. Jedná se o hydrofobní oblasti, složené především z tryptofanu, tyrosinu a fenylalaninu. Za CAS existují jakási „zadní vrátka“, řízená zbytkem tryptofanu. Mohou jimi procházet produkty katalýzy, díky čemuž nedochází k zablokování vstupu do rokle,

nýbrž ke zvýšení katalytické aktivity AChE (De Boer a kol., 2021; Thapa a kol., 2017; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Periferní aniontové místo leží u vstupu do rokle asi 14 Å od aktivního místa. Obsahuje důležité aminokyseliny jako je serin, tyrosin, kyselina aspargová a tryptofan. Úlohou PAS je transport pozitivně nabitých ligandů, jako jsou např. choliny. Dále slouží pro vstup substrátu do acylačního místa. Dochází zde i k interakci s inhibičními sloučeninami. Toto místo se podílí na alosterické modulaci katalýzy v aktivním centru i na řadě neklasických funkcí - zejména na ukládání amyloidu, buněčné adhezi a růstu neuritů. Je cílem různých anticholinesteras (De Boer, a kol., 2021; Johnson a Moore, 2006; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Oxyaniontová jamka je jakousi „kapsou“ v aktivním místě enzymu, mající za úkol stabilizovat negativní náboj v přechodném stavu na deprotonovaném kyslíku či alkoxidu. Snižuje také energetickou bariéru pro hydrolýzu ACh. OAH je tvořena dvěma glyciny a jednou molekulou alaninu, v případě AChE a BChE má tři hroty, u jiných molekul jako jsou proteasy či hydrolasy, se mohou vyskytovat i formy dvouhroté (De Boer a kol., 2021; Eckroat a kol., 2020).

Důležitou roli hraje také Ω-smyčka, vazebné místo pro acyl. Tato smyčka je umístěna podél jedné strany prohlubně aktivního místa. V přítomnosti substrátu nebo inhibitoru reguluje velikost prohlubně, a tak umožňuje průchod ligandu do aktivního místa. Tato smyčka je nezbytná pro zvyšování vazebné afinity a stability komplexu. Ω-smyčka prochází konformačními změnami (De Boer a kol., 2021).

1.1.1.3 Formy

U všech obratlovců je AChE kódována jedním genem ACHE, ale v důsledku alternativního sestřihu na C-konci mRNA vznikají 3 různé izoformy: synaptická (S) nebo koncová (T), erytrocytární (E) a čtecí (R). Tyto sestřihové varianty sdílejí 95 % kódující sekvence a liší se pouze karboxylovými konci. Exprese dané varianty AChE závisí na aktivaci promotoru vyvolané stresem a na posttranskripční modulaci, včetně stability mRNA, alternativního sestřihu mRNA, kontroly translace a modifikace proteinu (Jiang a Zhang, 2008; Rotundo, 2017).

Jiný zdroj uvádí sestřihové varianty cholinergní AChE: T (koncová), R (čtecí) a H (hydrobóbní). AChE-T transkript se vyskytuje v mozku společně s menším množstvím

AChE-R, jejíž exprese je zvýšena ve stresu a u AD. AChE-H je exprimována v jiných buňkách (mimo nervové) (Cortés-Gómez a kol., 2021).

Všechny formy AChE jsou glykoproteiny, vznikající na hrubém endoplazmatickém retikulu, kde podléhají kotranslační glykosylaci. Dochází k přidání třech nebo čtyř oligosacharidů vázaných asparginem, které se vážou k prodlužujícímu se polypeptidovému řetězci. Následně jsou transportovány do Golgiho aparátu k dalším úpravám. Jednotlivé enzymové formy vykazují podobné katalytické aktivity, mají ale odlišné hydrodynamické parametry, iontové a hydrofobní interakce. Lidská AChE je vysoce glykosylovaná – obsahuje tři potenciální glykosylační místa (Rotundo, 2017; Talesa, 2001).

Molekulární formy AChE se dělí na asymetrické a globulární. Asymetrické formy jsou zahrnuté do extracelulární matrice kolagenním ocasem a přednostně jsou lokalizované v neuromuskulárním spojení. Globulární formy se vyskytují ve formě monomerů, dimerů nebo katalytických tetramerů. Monomer AChE je α/β protein, složený z dvanácti vláknového centrálního smíšeného β -listu, obklopeného čtrnácti α -helixy. Tetramerní forma se vyskytuje především v mozku, dimerní se nachází v erytrocytech. Tyto formy jsou rozlišitelné díky jejich oligomernímu sestavení a způsobu připojení k buněčným membránám. Globulární formy mohou být vylučovány jako rozpustné nebo jsou ukotveny k membráně hydrofobní doménou. Některé molekulární formy jsou membránově vázány hydrofobním peptidem a přednostně exprimovány v CNS savců, jiné jsou spojeny s membránou glykolipidové kotvy a nacházejí se v nervech, svalech, erytrocytech a lymfocytech (Bester a kol., 2019; Talesa, 2001; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

1.1.1.4 Výskyt

AChE se nachází v mnoha typech vodivých tkání: CNS, PNS, motorických či senzorických vláknech, v neuromuskulárním spojení všech inervovaných orgánů, autonomních gangliích a cholinergních synapsích v mozku a míše. Dále se vyskytuje ve svalech, plazmě a hematopoetických buňkách. Obvykle je doprovázena BChE, jejíž hladina je ale nižší (Bester a kol., 2019; Li a kol., 2018; Talesa, 2001).

1.1.2 Butyrylcholinesterasa

Butyrylcholinesterasa je enzym označovaný také jako plazmatická cholinesterasa či pseudocholinesterasa. Jde o sérový protein, patřící spolu s AChE do skupiny cholinesteras. Jelikož se jedná o pseudocholinesterasu, má v CNS omezenou neuronální distribuci.

Počet neuronů bohatých na BChE je v lidské mozkové kůře přibližně o dva řády nižší, než počet neuronů obsahujících AChE (Li a kol., 2018).

Vyskytuje se především jako glykosylovaný rozpustný tetramer. Interaguje s řadou plazmatických proteinů v lidském séru a tvoří s nimi komplexy. Zároveň hraje důležitou roli v metabolismu mnoha léčiv (Delacour a kol., 2016; Jasiecki a kol., 2021).

Jedna ze studií ukázala, že faktor ředění séra ovlivňuje aktivitu BChE. Čím více byl vzorek séra naředěn ve fosfátovém pufru, tím byla pozorována vyšší aktivita BChE. Dále bylo zjištěno, že některé faktory séra (vícesložkový klinický materiál), mohou ovlivnit kinetické parametry BChE. Výsledky ukázaly, že předpokládaný inhibitor je pravděpodobně větší než 3 kDa, takže by se mohlo jednat o jeden nebo více proteinů nebo jiných velkých molekul. Vzhledem k tomu, že sérum je bohaté na proteiny, je zde možnost tvorby velkého množství interakcí. To vede k otázce, zda BChE interaguje se specifickými proteiny a zda tvoří mnohem větší komplexy, než se předpokládá z molekulové hmotnosti tetrameru (Jasiecki a kol., 2021).

1.1.2.1 Funkce

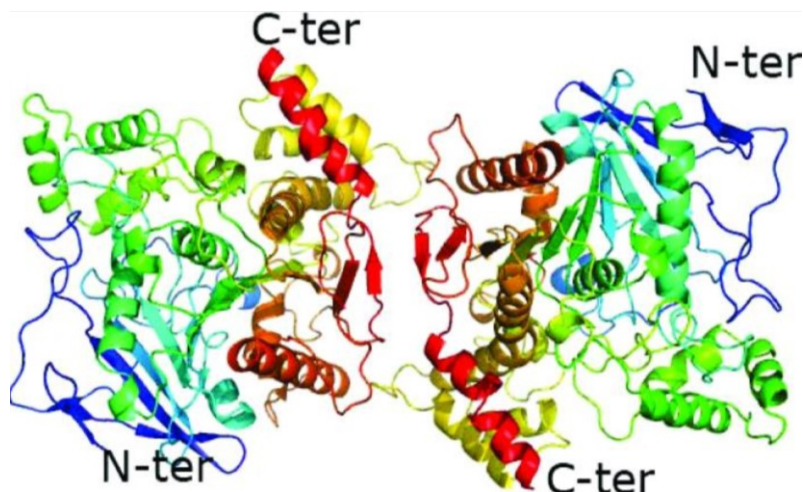
Tento enzym sice nemá žádnou specifickou funkci, dokáže ale hydrolyzovat některé sloučeniny a léčiva (např. kyselina acetylsalicylová, sukcinylcholin, kokain, heroin, fyzostigmin, aj.). Podílí se tak na detoxikační reakci v první obranné fázi proti toxickým sloučeninám, které by se mohly dostat do krevního řečiště a následně inhibovat aktivitu AChE. Stejně jako AChE dokáže hydrolyzovat acetylcholin a další chemické látky obsahující esterové vazby (Eckroat a kol., 2020; Jasiecki a kol., 2021; Pohanka a Zakova, 2021).

BChE je cílovým enzymem pro inhibitory, které zvyšují dostupnost neurotransmiterů na synapsích v mozku a jsou klinicky používány jako hlavní pilíř při léčbě AD. Působí na nervosvalových spojích a sekvstruje (nevratně váže) inhibitory acetylcholinesterasy (organofosfáty, bojové nervové látky a pesticidy). Tak chrání nervový systém do chvíle, než inhibitory dosáhnou cíle, tj. synaptické AChE, a vyvinou účinky. V případě, že dojde k poruše funkce AChE se předpokládá, že BChE přebírá její roli. Hladina BChE také hraje důležitou roli u diabetu, obezity nebo steatosy jater (Jasiecki a kol., 2021; Korabecny, 2021; Li a kol., 2018).

Přestože funkce BChE za normálního stavu organismu stále není objasněna, bylo zjištěno, že koreluje s metabolismem lipoproteinů a léčiv a podílí se na degradaci sukcinylcholinu (myorelaxant užívaný při chirurgických zákrocích) (Li a kol., 2018).

1.1.2.2 Struktura

Struktura BChE je složena ze čtyř identických podjednotek, sestavujících se do tetrameru tetramerizační doménou na C-konci. V malém množství se BChE vyskytuje také jako dimer nebo monomer. Existují i složitější formy BChE, které se skládají ze dvou, tří nebo čtyř tetramerů (A4, A8 a A12). Tyto tetramery jsou k membránám připojeny pomocí domény obsahující prolin, který je součástí kotvy složené z kolagenu Q. Příklad struktury BChE je znázorněn na obr. 4 (Jasiecki a kol., 2021).



Obrázek 4: Dva monomery BChE tvořící společně dimer (Ngamelue a kol., 2007)

Oproti AChE obsahuje tento enzym odlišné aminokyseliny v oblasti PAS – aspargin, kyselina aspargová, glutamin, serin, tyrosin. Složení aminokyselin v cholinovém místě se liší pouze u tyrosinu (Tyr337), který je nahrazen alaninem (Ala328). U acylového vazebného místa je u BChE nahrazen Phe295 a Phe297 aminokyselinami Leu286 a Val288. Touto náhradou je umožněna vazba větších substrátů a inhibitorů. Katalytické aktivní místo je shodné s CAS u AChE (De Boer a kol., 2021).

1.1.2.3 Výskyt

BChE je exprimována v jiných tkáních než AChE. Syntéza probíhá především v játrech, poté je enzym sekretován do plazmy, kde plní detoxikační úlohu. BChE byla nalezena v amyloidních placích a neurofibrilárních klubkách, což naznačuje, že protein se může podílet na patogenezi AD (De Boer a kol., 2021; Jasiecki a kol., 2021; Li a kol., 2018).

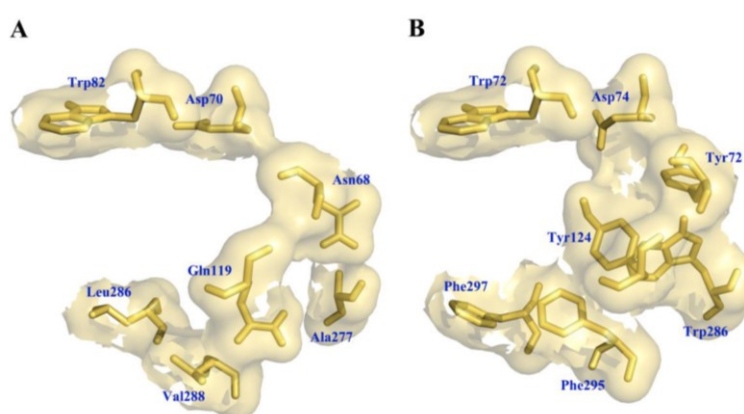
V lidské plazmě se vyskytuje ve vyšší koncentraci než AChE, v rozmezí 2–5 mg/l, ve formě glykosylovaných rozpustných tetramerů o molekulové hmotnosti 340 kDa (De Boer a kol., 2021; Jasiecki a kol., 2021).

Jelikož je BChE přítomna u mnoha obratlovců a toleruje několik mutací, vznikla teorie, která říká, že se BChE vyvinula z AChE jako obecný detoxikátor, zachovávající si funkci v procesu neurotransmise. Dalším důkazem pro tuto teorii je fakt, že BChE i AChE mají podobnou strukturu vazebných míst a afinitu k určitým substrátům a ligandům. Jejich sekvenční homologie je kolem 65 % (De Boer a kol., 2021).

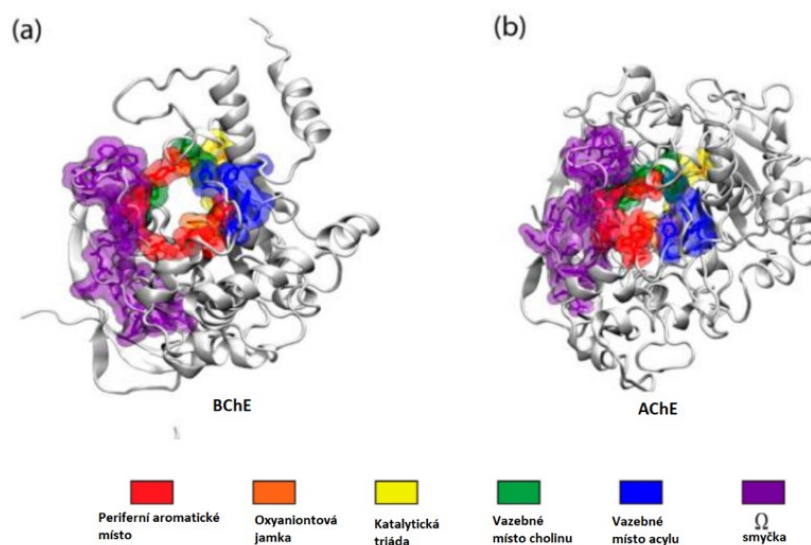
1.1.3 Porovnání AChE a BChE

Za fyziologických podmínek hraje AChE v cholinergní neurotransmisi regulací hladin ACh dominantnější roli než BChE. Rozdíl mezi AChE a BChE se nachází také v progresivitě onemocnění. Zatímco aktivita AChE klesá s progresí patogeneze AD, aktivita BChE roste. U pacientů s pokročilou AD však hladiny AChE klesají na 55–67 %, zatímco u BChE se zvyšují až na 120 %. Z tohoto důvodu se pro léčbu časně AD primárně používá AChE, naopak v pokročilém stádiu AD by inhibice BChE měla zajistit udržitelnou léčbu (Li a kol., 2021; Pérez-Sánchez a kol., 2021).

Struktury obou ChE jsou velmi podobné, ne ale zcela stejné, což přispívá k jejich substrátové specifitě. Obě obsahují CAS, PAS s hlubokou prohlubní. AChE má vyšší selektivitu pro malé molekuly (jako je ACh), BChE má větší afinitu k různým neuroaktivním peptidům. Rozdíly v krystalových strukturách a acylových kapsách u AChE a BChE jsou znázorněny na obr. č. 5 a 6. Zatímco u AChE tvoří acyl-vazebná místa zbytky: Tyr124, Trp286, Phe295 a Phe297, u BChE jsou tato místa tvořena zbytky: Gln119, Ala227, Leu286 a Val288 (Li a kol., 2018; Carreiras a kol., 2020).



Obrázek 5: Porovnání zbytků v acylových kapsách u BChE (A) a AChE (B) (Li a kol., 2018)



Obrázek 6: 3D struktura BChE (a) a AChE (b) (De Boer a kol., 2021)

1.2 Inhibitory cholinesteras

Inhibitory cholinesteras představují obsáhlou skupinu chemických látek. Z praktického hlediska mají dvě oblasti uplatnění: první zahrnuje farmaceutické využití, kde se ChEI využívají jako cholinergní léčiva pro různá onemocnění (AD, MG, některé typy demence nebo léčba glaukomu), druhou oblastí je uplatnění jako pesticidů nebo chemických bojových látek. Z chemického hlediska jsou inhibitory sloučeniny s různými strukturami, které se mohou vázat esterovou vazbou na serinový hydroxyl aktivního místa, nebo interagovat s alfa aniontovou částí aktivního místa, aromatickou prohlubní a aniontovým periferním místem (Daneman a Prat, 2015; Vorčáková a kol., 2018).

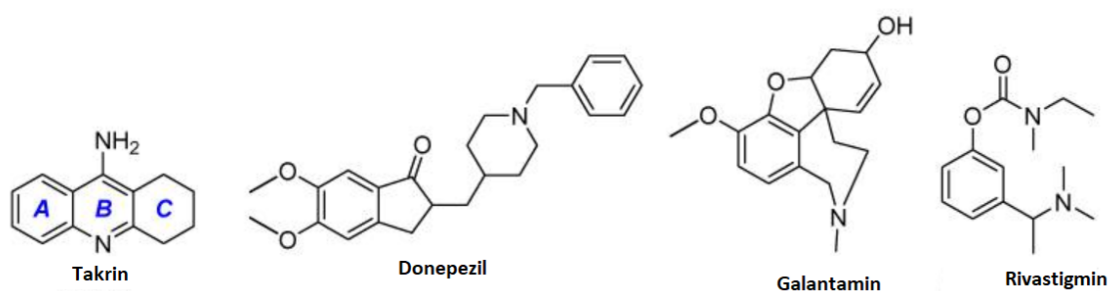
ChEI jsou skupinou léčiv, která dokáže blokovat hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu na acetát a cholin. Tím ChEI zvyšují interakci mezi ACh a AChR a následně hladinu ACh v CNS. Působí tedy v synaptické štěrbině, kde inhibují cholinesterasové enzymy. Dle tohoto principu působení se vyrábí mnoho terapeutických léčiv. Používají se proto při léčbě různých neurologických poruch. Dosud jsou hlavními léky schválenými Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro symptomatickou léčbu Alzheimerovy choroby (Dvir a kol., 2010; Liu a kol., 2017; Yamazaki a kol., 2021).

Mezi silné ireverzibilní inhibitory AChE i BChE patří toxické sloučeniny, jako jsou organofosforové nervově paralytické látky (sarin, soman, tabun) nebo organofosforové pesticidy a léčiva (paraoxon, metrifonát). Pokud dojde k ireverzibilní blokádě těchto enzymů, může to mít fatální následky (Korabecny, 2021; Pohanka a Zakova, 2021).

Některé inhibitory mohou být pro AChE více selektivní než pro BChE. To je dáno vyvinutějším PAS a aniontovým žlábkem u AChE. Z toho důvodu může pak AChE snadněji podléhat kation- π interakci s inhibitory. Mezi takovéto inhibitory se řadí kofein, donepezil, galantamin, aflatoxiny a některé ionty těžkých kovů (Pohanka a Zakova, 2021).

Funkcí inhibitorů cholinesteras je zpomalení progresu a tlumení symptomů neurodegenerativních onemocnění. I když mají tato léčiva jiné farmakologické vlastnosti, vykazují u AD stejné účinky. Jejich užívání je však omezené, neboť vykazují četné vedlejší účinky, které mohou souviset s dávkou. Studie zaměřující se na inhibitory cholinesteras mají svá omezení jako je např. fakt, že Alzheimerova choroba se vyskytuje pouze u lidí. Proto při výzkumech není užívání zvířecích modelů moc přínosné (Przybyłowska a kol., 2021; Sharma, 2019; Shinagawa a Shigeta, 2014).

Dle mechanismu účinku jsou inhibitory cholinesteras rozděleny na krátkodobě působící (takrin, donepezil, galantamin), středně dlouho působící a pseudoireverzibilní látky (rivastigmin). Struktura těchto inhibitorů je znázorněna na obr. 7 (Marucci a kol., 2021).



Obrázek 7: Struktura klinicky užívaných inhibitorů cholinesteras pro léčbu AD (Eckroat a kol., 2020)

Reverzibilní inhibitory fungují kompetitivním nebo nekompetitivním mechanismem a mají terapeutické využití. Ireverzibilní modulátory mají toxické účinky. Společným znakem obou typů inhibitorů je vazba na periferní nebo katalytické místo enzymu nebo se mohou vázat na obou vazebných místech současně (Islam a kol., 2018).

1.2.1 Reverzibilní inhibitory

1.2.1.1 Takrin

Takrin je jeden z prvních klinicky užívaných inhibitorů obou cholinesteras. Jedná se o derivát akridinu. V roce 1993 byl schválený FDA pro léčbu AD, u které je účinný především u mírné až střední formy (Przybyłowska a kol., 2019; Przybyłowska a kol., 2021).

Původně byl v roce 1945 syntetizován jako antibakteriální lék pro infikované rány vojáků, bohužel nebyl účinný proti běžným kmenům bakterií. Následné studie zjistily, že se jedná o inhibitor AChE, který zhruba stokrát více inhibuje BChE než AChE. V Austrálii se v 80. letech 20. století používal k léčbě akutního anticholinergního syndromu. William Summers poté vyslovil hypotézu, že by se mohlo jednat o lék AD (Jarrott, 2017; Marucci a kol., 2021).

Stejně jako u většiny léčiv mohou i při užívání takrinu nastat nežádoucí účinky. Mezi ně patří např. nauzea, zvracení, nechutenství nebo průjem. Další nevýhodou je krátký poločas rozpadu, z toho důvodu musí být aplikován častěji. V roce 2013 byl stažen z trhu, neboť u něj bylo zjištěno hepatotoxické působení. Stále ale zůstává důležitým výchozím bodem pro vývoj víceúčinných inhibitorů cholinesteras. Současné modifikace struktury takrinu se zaměřují především na nahrazení benzenového kruhu heterocyklickým kruhem (Eckroat a kol., 2020; Przybyłowska, a kol., 2019; Przybyłowska a kol., 2021).

1.2.1.2 Donepezil

Tento inhibitor byl vyvinut s cílem překonat nevýhody fyzostigminu a takrinu při symptomatické léčbě AD. Jeho použití je založeno na cholinergní hypotéze. Jedná se o nekompetitivní, selektivní, reverzibilní inhibitor AChE druhé generace. Je transportován přes hematoencefalickou bariéru (BBB) pomocí organického kationtového transportéru, kde následně zvyšuje množství ACh v synaptických štěrbinách (Barfejani a kol., 2020; Przybyłowska a kol., 2021; Shigeta a Homma, 2001).

Obecně je dobře snášen a jeho nežádoucí účinky jsou mírné a přechodné (např. nespavost, nevolnost, svalová slabost, průjem, zvracení nebo bradykardie). Stejně jako u takrinu se i zde může vyskytnout hepatotoxicita (Barfejani a kol., 2020; Przybyłowska a kol., 2021).

V roce 1996 byl schválen pro léčbu mírné až středně těžké AD. Je prodáván pod názvem Aricept a velmi často se používá v kombinaci s memantinem. Dostupný je ve formě tablet, v některých zemích se vyskytuje v tekuté či transdermální podobě (Birks a Harvey, 2018; Eckroat a kol., 2020; Sharma, 2019).

1.2.1.3 Galantamin

Galantamin je heterocyklický derivát fenantridinu, izolovaný z cibulí a květů *Galanthus woronowii* a příbuzných rodů, patřící do čeledi *Amaryllidaceae* (např. cibule narcisů). Byl vyvinut na počátku 50. let 20. století v Bulharsku pod názvem Nivalin (Marucci a kol., 2021; Mucke, 2015).

Tento alkaloid má dvojí mechanismus účinku – je reverzibilním inhibitorem AChE a alosterickým modulátorem neuronálních nikotinových AChR (za přítomnosti ACh zvyšuje aktivitu těchto receptorů). Ovlivňuje nejen cholinergní přenos, ale i další neurotransmitterové systémy (monoaminy, glutamin, kyselinu γ -aminomáselnou). Následkem jeho působení je zlepšení kognitivních funkcí a psychiatrických onemocnění. Aktivitu BChE ovlivňuje minimálně (Colović a kol., 2013; Mucke, 2015; Battle a kol., 2021).

Vhledem ke schopnosti procházet hematoencefalickou bariérou a ovlivňovat cholinergní funkce byl v roce 2000 schválen v Evropě, USA a Asii jako symptomatický lék proti AD. Původně byl nazýván Reminyl, v USA se později přejmenoval na Razadyne (Atanasova, M., a kol., 2015; Mucke, 2015).

Galantamin se používá k léčbě myasthenia gravis, myopatie, syndromů reziduální paralýzy po poliomyelitidě a k léčbě sensorických poruch CNS. Také bylo zjištěno, že může významně ovlivnit imunitní odpověď u tularemie prostřednictvím cholinergní protizánětlivé dráhy tím, že reguluje interferon γ a snižuje interleukin 6 (Mucke, 2015).

Mezi nežádoucí účinky galantaminu patří křeče, těžká nevolnost či zmatenost. Stejně jako takrin je používán jako referenční sloučenina při objevování léčiv (De Boer a kol., 2021).

1.2.1.4 Rivastigmin

Rivastigmin je nekompetitivní, pseudoireverzibilní, karbamátový inhibitor obou cholinesteras. Je podáván perorálně pod názvem Exelon, dostupný je také ve formě transdermální náplasti. V roce 2000 byl schválen FDA pro léčbu všech forem AD a také pro střední a těžkou formu Parkinsonovy choroby (Kandiah a kol., 2017; Marucci a kol., 2021; Przybyłowska a kol., 2021).

Mezi nežádoucí účinky patří zvracení, nevolnost, průjem, úbytek hmotnosti až anorexie nebo bolesti břicha. Kromě trávicího traktu může být postižena i nervová soustava (bolesti hlavy, synkopy) (Przybyłowska a kol., 2021).

1.2.1.5 Huperzin A

Huperzin A je alkaloid získaný z čínské byliny *Huperzia serrata*. Identifikován byl v 80. letech 20. století v Číně. V tradiční čínské medicíně se používá při horečnatých onemocněních a zánětech. Je silným, reverzibilním, selektivním inhibitorem AChE a antagonistou N-metyl-D-aspartát receptorů. Má podobný mechanismus účinku jako

donepezil, galantamin a rivastigmin. V některých zemích (např. USA) se užívá jako doplněk stravy (Marucci a kol., 2021; Yang a kol., 2013).

1.2.1.6 Neostigmin

Neostigmin je ve vodě rozpustná sloučenina, reverzibilně inhibující AChE. Je indikován pro tlumení účinků nedepolarizujících nervosvalových blokátorů po chirurgickém zákroku. Po jeho podání musí být pacient monitorován, protože může dojít k cholinergním účinkům (např. bradykardie, bronchokonstrikce), které mohou ovlivnit další orgány. Neostigmin je kvartérní amoniová sloučenina neprostupující BBB. Používá se při léčbě akutní pseudo-obstrukce tlustého střeva (Ahuja a kol., 2018; Neely a kol., 2021).

Podává se intravenózně, většinou s antimuskarinovou látkou (např. glykopyrolát, atropin), aby se oslabil parasymptomimetická aktivita na jiných nesvalových místech acetylcholinových receptorů. Při podávání léčiva u pacientů s MG by měla být použita nejnižší možná dávka, která se případně postupně zvyšuje v závislosti na reakci organismu pacienta (Neely a kol., 2021).

1.2.1.7 Fyzostigmin

Fyzostigmin je přírodní derivát karbamátu a reverzibilní inhibitor obou cholinesteras. AChE inhibuje interakcí s aniontovými a esterovými místy enzymů. Díky terciárním aminovým fragmentům může procházet hematoencefalickou bariérou. Byl schválen FDA pro léčbu glaukomu a je schopen zabránit ireverzibilní vazbě organických fosfátů na AChE. Díky tomu se uplatňuje proti intoxikaci nervově paralytickými látkami (Andrade a Gondal, 2022; Arens a Kearney, 2019; Colović a kol., 2013).

V roce 1864 byl izolován ze semen *Physostigma venenosum* (kalabarský bob), který se hojně vyskytuje v afrických tropech. Jde o velmi toxický parasymptomimetický alkaloid a jeden z prvních inhibitorů cholinesteras na bázi karbamátu (Andrade a Gondal, 2022; Zhang a kol., 2022).

Kvůli úzkému terapeutickému indexu a krátkému poločasu rozpadu s četnými vedlejšími účinky (průjem, zvýšená tvorba slin, žaludeční křeče, nadměrné pocení) nebyl schválen pro léčbu AD. Po předávkování byly zaznamenány příznaky cholinergního excessu jako jsou halucinace, nadměrné slinění či pocení. Periferní muskarinové účinky fyzostigminu zahrnují aktivaci nevasculárního hladkého svalstva s následnou střevní hyperperistaltikou a potencionálním bronchospasmem (Arens a Kearney, 2019; Sharma, 2019).

Existují i deriváty fyzostigminu, které se řadí mezi inhibitory ChE nové generace. Do této skupiny patří fenserin, tolserin a eserolin. Fenserin je selektivní a nekompetitivní inhibitor AChE. Tento lék byl klinicky testován u pacientů s AD, v počátečních klinických studiích bylo ale zjištěno, že není moc účinný (Sharma, 2019).

1.2.1.8 Pyridostigmin

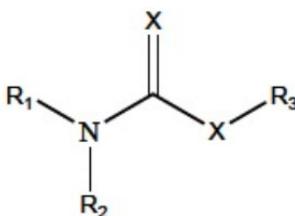
Jedná se o syntetický inhibitor AChE, který inhibuje hydrolýzu ACh v synaptické štěrbině a zvyšuje tak počet interakcí mezi ACh a AChR v neuromuskulárním spojení. Výhodou tohoto léčiva je neprůchodnost hematoencefalickou bariérou, díky čemuž je omezena toxicita pro CNS (Farmakidis a kol., 2018).

Používá se pro léčbu myasthenia gravis, při pooperačních stavech ilea, léčbě AD či glaukomu. U MG je počáteční dávka stanovena na 60 mg, podávána každých 6 hodin. Projev účinku je mezi 15–30 minutami, doba trvání přibližně 3–4 hodiny. Dávkování může být zvýšeno až na 120 mg. Se zvyšující se dávkou ale stoupá riziko nežádoucích účinků, mezi které patří křeče břicha, rozmazané vidění, zmatenost nebo kóma. Mohou se vyskytnout i svalové záškuby a křeče. Při vysokých dávkách může dojít až k cholinergní krizi, vyznačované respirační insuficiencí (Farmakidis a kol., 2018; Malabaey a kol., 2019).

1.2.2 Pseudoireverzibilní inhibitory

1.2.2.1 Karbamáty

Karbamáty jsou organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové (NH_2COOH). Ve struktuře biologicky aktivních karbamátů jsou organické nebo alkylové substituenty R_1 a R_2 , případně i vodík. R_3 většinou označují organický substituent či kov. X potom označuje kyslík nebo síru. Chemická struktura karbamátů je znázorněna níže na obr. 8 (Colović a kol., 2013)



Obrázek 8: Chemická struktura biologicky aktivních karbamátů (Colović a kol., 2013)

Většina karbamátů jsou pseudoireverzibilní inhibitory cholinesteras, které se kovalentně vážou na enzymy a následně karbamylují katalytický serin. Pro tento proces potřebují nosný skelet, který navede karbamátovou část do správné polohy enzymu. Poté může být tato část

přenesena na serin CAS a dojde k uvolnění nosiče. Prvním karbamátem užívaným jako ChEI je fyzostigmin (Li a kol., 2017).

Některé inhibitory na bázi karbamánů mohou snadno pronikat BBB a inhibovat ChE v CNS. Preklinické studie doposud prokázaly, že inhibitory ChE na bázi karbamátů mohou zvýšit hladinu ACh a zlepšit tak poruchy chování. Z toho důvodu mají karbamáty potenciál pro léčbu AD (Li a kol., 2017; Zhang a kol., 2022).

1.2.3 Ireverzibilní inhibitory

1.2.3.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolů, které lze snadno extrahovat z rostlin. Zlepšující kognitivní funkce a dokáží zpomalit neuronální degeneraci, neboť jsou schopny procházet hematoencefalickou bariérou a byla u nich prokázána aktivita v CNS. Mohou snižovat riziko demence regulací různých procesů, jako je buněčná signalizace nebo apoptóza. Při AD vychytávají reaktivní formy kyslíku a snižují produkci β -amyloidu. Dělí se do šesti podtříd: flavanony, flavanoly, flavony, flavonoly, antokyaniny a isoflavony (Kaur a kol., 2022).

Isoflavony (např. genistein) byly studovány pro vývoj nových látek pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je AD. Li a spol. provedli řadu výzkumů isoflavonu a jeho derivátů a došli k závěru, že tento typ sloučenin vykazuje inhibiční účinky i pro BChE a působí protizánětlivě. Tento objev naznačuje, že by v budoucnu mohly isoflavony přispět k léčbě AD (Kaur a kol., 2022; Zhang a kol., 2022).

1.2.3.2 Kumarin

Kumarin je přírodní produkt, vyskytující se v mnoha rostlinách. Nejúčinnější kumarinové deriváty obsahují piperidinylové a ethoxylové skupiny. Snižují vazebnou energii AChE téměř 1,5krát více než takrin. Mají mnoho biologických účinků, např. protizánětlivé, protinádorové, antialergické, antivirové, antimikrobiální, antimykotické či antioxidační (Anand a kol., 2012; De Boer a kol., 2021).

1.2.3.3 Bambuterol

Bambuterol je známý selektivní inhibitor BChE, nicméně dokáže inhibovat i AChE. Jedná se o proléčivo, které může být hydrolyzováno BChE za vzniku aktivního metabolitu terbutalinu, který se používá např. při léčbě astmatu. Nevýhodou bambuterolu je průnik přes BBB, kdy vzniklý terbutalin může způsobovat srdeční potíže (Li a kol., 2021; Li a kol., 2017).

1.3 Detekce AChE, BChE a jejich inhibitorů

AChE a BChE mohou být používány jako biochemické markery různých patologických stavů, jako jsou otravy neurotoxickými látkami nebo poruchy funkce jater (Pohanka a Zakova, 2021).

Měření aktivity cholinesteras má diagnostický význam. Snížení AChE může indikovat otravu některých z inhibitorů, jako jsou organofosforové nebo karbamátové pesticidy a nervově paralytické látky. Snížení BChE bývá způsobeno poruchou funkce jater. Pokud je současně snížena aktivita AChE i BChE, lze předpokládat, že u pacienta došlo k otravě ireverzibilním nebo pseudoireverzibilním inhibitorem (Daneman a Prat, 2015; Pohanka a Zakova, 2021).

Stanovení aktivity AChE hraje důležitou roli v diagnostice, detekci pesticidů a nervově paralytických látek, dále *in vitro* charakterizaci toxinů a léčiv, včetně potencionální léčby Alzheimerovy choroby. Doposud byly pro stanovení aktivity AChE zavedeny různé metody – např. kolorimetrické, fluorescenční, chemiluminiscenční či elektrochemické. Dále se aktivita AChE může stanovovat pomocí radiometrických enzymatických testů nebo imunocytochemickým značením enzymů. Většina těchto metod má však své nevýhody a omezení (Daneman a Prat, 2015; Rotundo, 2017; Xiao, T. a kol., 2021).

Pro stanovení inhibitorů AChE se používají metody zahrnující např. tenkovrstvou chromatografii, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, elektrochemické a fluorescenční metody (Huang a kol., 2020).

1.3.1 Kolorimetrické metody

Mezi optické metody, používané pro měření hladin BChE, AChE a jejich inhibitorů, patří spektrofotometrické stanovení thiolů. Uplatňuje se při nich Ellmanův test a kolorimetrická detekce H_2O_2 (Xia a kol., 2014).

Ellmanova metoda byla vyvinula Ellmanem a spolupracovníky začátkem 60. let 20. století. Principem je hydrolýza acetylthiocholinu (ATCh, stanovení AChE) nebo butyrylthiocholinu (stanovení BChE) na thiocholin a kyselinu octovou (resp. máselnou). Tato reakce je katalyzována pomocí cholinesterasy. Ve druhém kroku thiocholin spontánně reaguje s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) a vzniká žlutě zbarvená aniontová forma 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny, která absorbuje viditelné světlo při vlnové délce kolem 412 nm (Daneman a Prat, 2015; Pohanka a Zakova, 2021).

Protože kolorimetrické metody nemají dostatečnou citlivost, byly vyvinuty pokročilé techniky, založené na kovových a magnetických nanočásticích a kvantových tečkách (Xia a kol., 2014).

1.3.2 Elektrochemické metody

Pro detekci AChE a jejích inhibitorů mohou být používány i elektrochemické techniky, založené na inhibici AChE. V typickém uspořádání je enzym nanosen na povrch pracovní elektrody, aktivita AChE se následně sleduje přidáním substrátu do roztoku. Měří se redoxní proud enzymových produktů (Xia a kol., 2014).

1.3.3 Fluorescenční metody

Fluorimetrická metoda používaná pro stanovení aktivity AChE má velký význam díky své jednoduchosti, vysoké citlivosti a rychlé odezvě. Fluorescenční sondy jsou závislé na organických barvivech a vykazují dobrou citlivost a selektivitu. Jejich nevýhodou je špatná stabilita a nedostatečná intenzita emise. Aktivita AChE a jejích inhibitorů je určována dle intenzity fluorescence. Pro detekci mohou být použity polovodičové kvantové tečky, jejichž výhodou oproti organickým fluoroforům je vyšší jas, snížení vybělení a delší životnost (Xia a kol., 2014; Xiao, T. a kol., 2021).

Jako substrát se často používá thiamin. Mezi jeho výhody patří vysoká stabilita, dobrá rozpustnost ve vodě a snadná dostupnost. Pomocí vhodných oxidantů (např. peroxid vodíku, organické peroxidy) ho lze přeměnit na intenzivně fluoreskující thiochrom. Oxidace je zprostředkována enzymem peroxidasou či enzymovým imitátorem. Za katalýzy křenové peroxidasy lze thiamin oxidovat na thiochrom pomocí peroxidu vodíku, s výtěžkem vyšším než 95 %. K oxidaci thiaminu lze použít i další činidla, jako je hexakynoželozitan, rtuť, zlato či měď. Většina těchto oxidantů má ale nedostatky – především vysokou toxicitu nebo nestabilitu (Xiao, T. a kol., 2021).

Jako oxidační činidlo mohou být používány i nanodestičky oxidu manganického. Dokáží přímo oxidovat thiamin na intenzivně fluoreskující thiochrom. Výhodou je nízká toxicita a dobrá rozpustnost ve vodě (Xiao, T. a kol., 2021).

Pro detekci aktivity AChE se stále více používají nanomateriály (kovové nanočástice, anorganické kvantové tečky) a fluorescenční konjugované polymery. Zde je ale nevýhoda složitějšího vývoje, časová náročnost a finanční stránka, případně toxicita (v případě některých kvantových teček) (Xiao, T. a kol., 2021).

1.4 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou charakterizovaná nevratnou ztrátou struktury a funkce nervového systému s následným poškozením neuronů. Zároveň může docházet k vaskulární dysfunkci, hypoperfuzi a dysregulaci cerebrovaskulárního průtoku, apoptóze nebo zvýšení oxidačního stresu (Ahmad a kol., 2020; Suresh a kol., 2020).

NDD jsou často spojována se změnami v cholinergním systému, kde je hlavním neurotransmiterem ACh štěpený AChE. Acetylcholin je jeden z nejstarších neurotransmiterů v NS, v PNS se váže na své specifické receptory a reguluje svalovou kontrakci. Hraje zásadní roli v CNS v procesech souvisejících s behaviorálním chováním. Jeho nedostatek může způsobit poruchu přenosu nervových vzruchů, ochrnutí až smrt. Do neurodegenerativních onemocnění se řadí např. Alzheimerova choroba, myasthenia gravis, Parkinsonova a Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo spinocerebelární ataxie (Ashmawy a kol., 2019; Stephenson a kol., 2018; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

1.4.1 Klinické projevy

Jak již bylo uvedeno výše, u NDD dochází ke ztrátě a poškození synapsí a neuronů. Tento proces je doprovázen vznikem patologických proteinů, které se primárně ukládají v mozku a míše v neuronech i gliových buňkách. Mohou se kumulovat v extracelulárních místech, např. amyloidních placích. Některé z těchto proteinů lze detekovat i v periferních orgánech. K patologickým proteinům se řadí amyloid beta (vznikající štěpením transmembránového amyloidního prekursorového proteinu APP), tau protein (p-tau), α -synuklein, prionový protein a FET proteiny (RNA-vazebný protein FUS, Ewingův RNA-vazebný protein a TATA-vazebný protein). Poškození neuronů bývá často spojeno s chronickou aktivací imunitní odpovědi v CNS, v některých případech i s vlivem virových infekcí, následkem mrtvice nebo v důsledku geneticky podmíněných onemocnění bílé hmoty mozkové (Kovacs, 2019; Stephenson a kol., 2018).

Klinicky se NDD projevují poklesem kognitivních funkcí, demencí, změnou funkce mozku s následným postižením neokortikální oblasti a hipokampu. Mohou se rozvinout hyperkinetické, hypokinétické a cerebrální pohybové poruchy. Klinické symptomy jsou určeny anatomickou oblastí, která vykazuje neuronální dysfunkci. Symptomy nejsou závislé na distribuci patologického proteinu, neboť ten se nemusí vždy vyskytovat. Přestože se klinické příznaky jednotlivých chorob liší, základní příčiny na molekulární úrovni jsou téměř stejné (Kovacs, 2019; Suresh a kol., 2020).

1.4.2 Klasifikace

Klasifikace je založena na klinických příznacích, anatomických oblastech, typu buněk a konformačně změněných proteinech, účastnících se patologického procesu. Existují dvě formy NDD – dědičná a sporadická (Kovacs, 2019; Suresh a kol., 2020).

Molekulárně-patologická klasifikace je zaměřena na rozlišování synaptických, intracelulárních a extracelulárních akumulací proteinů. U intracelulárních akumulací se určuje subcelulární umístění – např. jaderný, cytoplazmatický, buněčný proces (Kovacs, 2019).

1.4.3 Léčba

K léčbě těchto onemocnění se často používají inhibitory AChE nebo antagonisté muskarinových a nikotinových receptorů (Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

Význam by při léčbě NDD mohl mít neurovaskulární systém. Studie zatím naznačují, že dysfunkce tohoto systému (konkrétně rozpad BBB a změna průtoku krve v mozku) způsobují akumulaci toxických proteinů prostupujících z krve do CNS. To vede k neurodegeneraci a následné smrti neuronů. V současné době zatím neexistují žádné terapeutické zákroky, které by zabránily nebo zpomalily progresi neurodegenerace (Ahmad a kol., 2020).

1.4.4 Prevalence

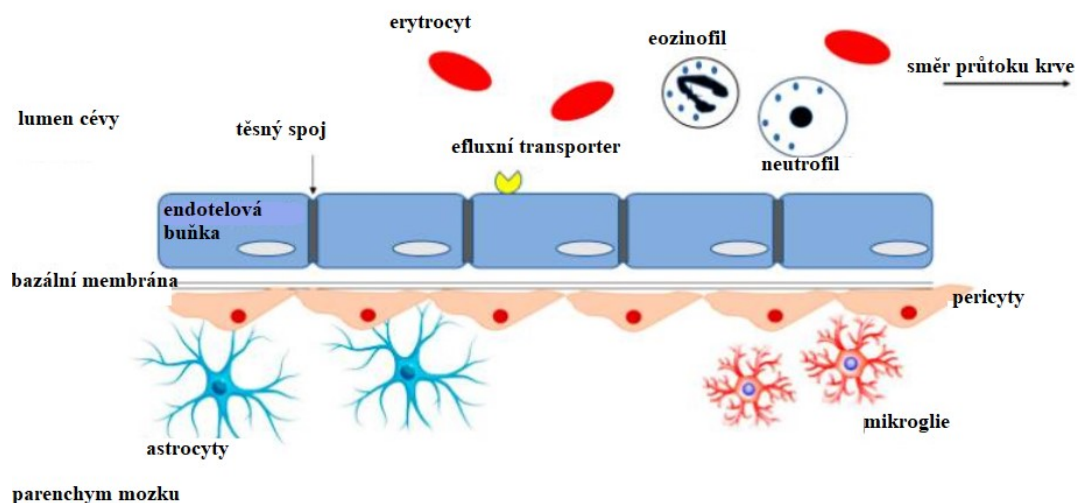
Prevalence závisí na konkrétní zemi, celosvětově se ale jedná o nejrozšířenější onemocnění demence a zároveň nejčastější příčinu úmrtí. Nárůst demence je částečně způsoben postupným zvyšováním věku populace, neboť mozek u staršího člověka je náchylnější k poškození (např. virovou infekcí). Příkladem je virus Zika, přispívající k neurodegenerativním onemocněním u seniorů a mající také vliv na mozek během vývoje (Stephenson a kol., 2018).

1.4.5 Hematoencefalická bariéra

Neurony v CNS komunikují pomocí chemických a elektrických signálů. Pro spolehlivou nervovou signalizaci je velmi důležitá přesná regulace iontového prostředí v okolí synapsí a axonů. Hlavní roli v této regulaci hrají bariérové vrstvy na rozhraní krve a nervové tkáně (Abbott a kol., 2010).

Hematoencefalická bariéra je tvořena endotelovými buňkami, které tvoří stěny cév, prokrvující CNS. BBB poskytuje stabilní prostředí pro funkce nervů a díky kombinaci specifických iontových kanálů a transportérů udržuje optimální prostředí pro synaptickou signalizaci. Vlastnosti BBB umožňují regulovat a případně zabránit průchodu mnoha

makromolekul a neurotoxických látek (metabolity, xenobiotika) do mozku. Díky tomu je nervová tkáň chráněna před toxiny a patogeny. Na obr. 9 je znázorněno schéma BBB s normální funkcí (Abbott a kol., 2010; Daneman a Prat, 2015).



Obrázek 9: Hematoencefalická bariéra (Jnaidi, a kol., 2020)

U neurologických onemocnění (např. Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza nebo mrtvice) může dojít ke ztrátě vlastností BBB. To má za následek dysregulaci iontů, změnu homeostázy a průnik imunitních buněk a molekul do CNS. Následně dochází k dysfunkci a degeneraci neuronů (Daneman a Prat, 2015).

Na rozvoji AD se může podílet dysfunkce strukturálních složek BBB (pericyty, astrocyty, cévní endoteliální buňky). Při dysfunkci BBB dochází k poruše transportu $A\beta$ z mozku do periferního oběhu, vyvolání neurozánětu a oxidačního stresu. Následně je zvýšena aktivita β -sekretasy a γ -sekretasy a tvorba $A\beta$. $A\beta$ se hromadí v mozku, neboť jeho nadbytek nemůže být dostatečně odstraněn kvůli nefunkčnosti bariéry. Postupné hromadění $A\beta$ poté vede ke zhoršení kognitivních funkcí a vzniku demence. Z tohoto důvodu by regulace funkce BBB mohla být novým terapeutickým cílem pro léčbu AD (Cai a kol., 2018; Daneman a Prat, 2015).

1.4.6 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je komplexní, heterogenní, neurodegenerativní onemocnění s chronickým průběhem. Jde o nejčastější formu demence, při kterém dochází ke ztrátě cholinergního systému a snižování hladiny ACh v částech mozku, důležitých pro chování, paměť, emoční reakce a učení. Následkem toho vzniká porucha kognitivních funkcí, změna behaviorálního chování nebo dezorientace (Anand a kol., 2012; Perkovic a Pivac, 2019).

Počáteční fáze je charakterizována neschopností ukládat nové vzpomínky, v pozdějších fázích dochází k progresivním změnám v chování. Mezi rizikové genetické faktory zvyšující pravděpodobnost AD patří alela APOE ϵ 4 (Lopez a kol., 2019; Robinson a kol., 2018; Sharma, 2019).

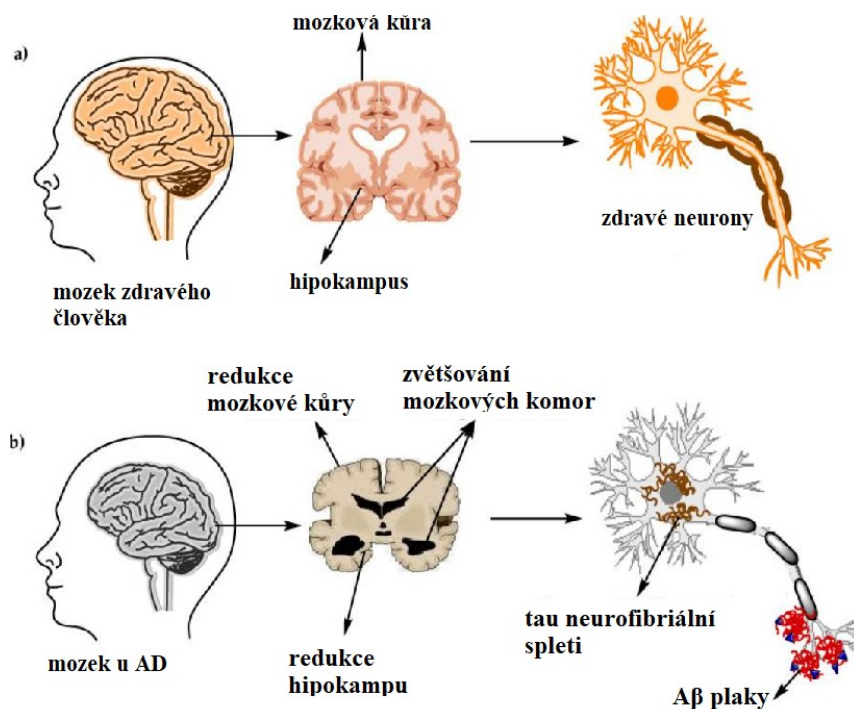
1.4.6.1 Charakteristika a patologie AD

AD je charakterizována extracelulárním ukládáním A β fibril a intraneuronální akumulací abnormálně fosforylovaného tau proteinu. Mezi základní rysy patří amyloidní plaky, neurofibrilární spleti a cerebrální atrofie. Amyloidní plaky jsou extracelulární akumulace beta amyloidu v šedé kůře mozkové, obsahující převážně abnormálně složený A β řetězec obsahující 40 nebo 42 aminokyselin. Dále se u AD vyskytují neurofilní či dystrofická vlákna (Kovacs, 2019; Lane a kol., 2018).

Při akumulaci A β v různých oblastech mozku vzniká kaskáda biochemických dějů, zahrnující vznik volných radikálů, zánět, dysregulaci vápníku či poškození membrány neuronálních buněk. To má za následek neuronální dysfunkci, vedoucí k makroskopické atrofii. U starších pacientů se často vyskytuje smíšená patologie, zahrnující vaskulární onemocnění či Lewyho tělíska (Anand a kol., 2012; Lane a kol., 2018).

V průběhu AD může docházet i k úbytku a dysfunkci pericytů, které hrají důležitou roli v odstraňování agregovaného A β . Degenerací pericytů dochází ke zvyšování hladiny A β a degradaci BBB. V důsledku toho vstupují buňky imunitního systému do mozku a podporují vznikající zánět, který může ovlivnit rozvoj neurodegenerativních nebo cerebrovaskulárních onemocnění. V minulých letech proběhlo několik studií na myších, jako je studie vedená Sagarem a jeho kolektivem, kteří objevili, že nedostatek pericytů vede k patologickému rozvoji tau proteinu (Ahmad a kol., 2020).

Za patogenezi AD jsou zodpovědné především patologické změny a dysfunkce neurocholinergního systému, β -amyloidu a agregace indukující neurální apoptózu, hyperfosforylaci tau proteinu tvořícího senilní plak, neurofibrilární klubka aj. Na obr. 10 je znázorněno srovnání mozku a neuronů zdravého člověka s pacientem trpícím AD (Li a kol., 2018).



Obrázek 10: Srovnání mozku zdravého člověka (a) s pacientem trpícím AD (b) (Breijyeh a Karaman, 2020)

Některé studie se snažily zjistit, zda změny aktivity AChE a jejích izoforem odrážejí stav centrálního cholinergního systému u AD. Studie AChE v mozkomíšním moku jsou komplikované, neboť měření může být ovlivněno řadou parametrů (užívání léků, čas provedení lumbální punkce, strava či prostředí, kde se pacient nachází). Za přísně kontrolovaných podmínek (lumbální punkce byla prováděná po dobu alespoň 2 týdnů po nočním klidu a po 3 dnech dodržované diety) byl u AD pozorován mírný pokles (16 %) aktivity AChE v mozkomíšním moku. Ovšem tento pokles byl stanoven pouze v některých případech, jiní autoři nenašli u pacientů s AD významné rozdíly v aktivitě AChE (Talesa, 2001).

Dále byla snaha zjistit souvislost aktivity AChE v krevních buňkách a plazmě. V plazmě ani u trombocytů nebyly zjištěny žádné změny aktivity ani AChE ani BChE. U erytrocytů bylo prokázáno, že se aktivita BChE snížila o 40 %, zatímco aktivita AChE zůstala nepozměněna. Naopak u lymfocytů byla aktivita AChE snížena a aktivita BChE nevykazovala žádné změny. Po rozdělení pacientů s AD do familiární a sporadické skupiny vykazovaly lymfocyty pacientů ze sporadické skupiny významné snížení aktivity AChE (o 60 %), u erytrocytů byla aktivita BChE snížena o 45 % (Talesa, 2001).

1.4.6.2 Diagnóza

Diagnóza je vždy pouze pravděpodobná, neboť definitivně může být stanovena pomocí autopsie (Lane a kol., 2018).

Studie vedená Robinsonem a kol. se zabývala rozsahem proteinopatií proteinu tau, amyloidu β , α -synukleinu a TDP-43. Došlo k pitvě celkem 766 jedinců, z toho bylo 247 *post mortem* pacientů s AD. U AD došlo ke zvýšení α -synukleinu (41–55 %) a TDP-43 (33–40 %) (Robinson a kol., 2018).

U pacientů s AD byla *post mortem* vyšetřována kortikální a subkortikální oblast mozku. Byla zjištěna absence enzymaticky aktivní globulární formy G4, která je za normálních okolností přednostně exprimovaná na cholinergních synapsích. Následkem toho došlo ke snížení poměru G4/G1 molekulárních forem AChE. Tento poměr koreluje s úrovní aktivity presynaptického cholinergního markeru cholinacetyltransferasy ve zdravě fungujícím mozku. Proto může sloužit jako marker pro tato místa. Forma G4 AChE představuje více jak 80 % celkové aktivity AChE transportované v axonech. Při její ztrátě dochází k ukládání amyloidního proteinu mimo neurony. Následkem je tvorbou plaků. Mimo to dochází k intraneuronálnímu rozvoji neurofibrilárních klubek. Oba tyto procesy patří mezi histopatologické markery Alzheimerovy choroby (Talesa, 2001).

1.4.6.3 Léčba

Léčba AD se zaměřuje na posílení cholinergní funkce pomocí agonistů cholinergních receptorů a inhibitorů acetylcholinesteras. Používá se několik AChEI různých chemických struktur a mechanismů účinku. V současné době se využívají inhibitory cholinesteras (donepezil, galantamin, rivastigmin) spolu s antagonistou N-methyl-D-asparátových receptorů. Jedná se o sloučeniny strukturálně rozmanité, lišící se farmakokinetickými vlastnostmi a uplatňující odlišné mechanismy inhibice enzymů. Jejich účinnost by měla být ale stejná (Kiełczewska a kol., 2021).

Jelikož je AD komplexní multifaktoriální porucha, terapie by se měla zaměřovat nejen na cholinergní systém ale i na další neurotransmitery. Důležité je zahájit léčbu v počátku onemocnění, kdy jsou příznaky mírné. Především u starších lidí by měly být prováděny prevence (Galimberti a Scarpini, 2016).

Vzhledem k závažnosti a složitosti tohoto onemocnění bylo doposud pro léčbu aplikováno velmi málo léků. Toto malé množství je zapříčiněno nejen kvůli omezenému počtu léčiv, která projdou schválením, ale i jejich špatnou účinností. Kvůli tomu se AD doposud řadí

mezi nevléčitelná onemocnění. Současná farmakologická terapie, včetně inhibitorů cholinesteras, bohužel nepředstavuje léčbu jako takovou, neboť léčí pouze symptomy, nikoli progresi demence (Li a kol., 2018; Przybyłowska a kol., 2019).

Účinnost těchto léčiv je omezená nejen v důsledku vzniku vedlejších účinků (zvracení, nevolnost, úbytek hmotnosti), ale i kvůli nedostatečné schopnosti zastavit progresi onemocnění. Z toho důvodu by bylo přínosné navrhnout nové inhibitory AChE, které by vycházely z cholinergní hypotézy, kdy AChE obsahuje dvě vazebná místa (CAS a PAS), zodpovědná za tvorbu amyloidních plaků. Objev nové molekuly interagující s těmito místy by mohl zabránit agregaci A β a stát se tak základem pro vývoj látek proti A β (Sharma, 2019; Zia a kol., 2022).

1.4.6.4 Prevalence

AD je jedno z nejčastějších neurodegenerativních onemocnění způsobujících demenci a poruchu paměti. Celosvětově představuje 60–70 % případů demence. Zároveň jde o čtvrtou nejčastější příčinu úmrtí v pokročilém věku (Lane a kol., 2018; Sharma, 2019; Zhang a kol., 2022).

Výskyt onemocnění stoupá v souladu se zvyšujícím se věkem především ve vyspělých zemích a častěji se vyskytuje u žen. Průměrná doba života po stanovení diagnózy AD ve věku nad 65 let je odhadována na 4–8 let (Ahmad a kol., 2020; Dundar a kol., 2019; Kovacs, 2019).

Dle informací vydaných v roce 2021 Alzheimer's Disease International trpí Alzheimerovou chorobou více než 55 milionů lidí na celém světě. Předpokládaný výskyt v následujících letech má být mnohem vyšší, do roku 2030 pravděpodobně dosáhne 78 milionů pacientů. Předpokládaný odhad výskytu AD k roku 2050 pravděpodobně vzroste na 132 milionů (Li a kol., 2018; Zhang a kol., 2022).

1.4.6.5 Cholinergní hypotéza

Tato hypotéza byla navržena v roce 1976. Vznikla na základě faktu, že u AD dochází ke ztrátě cholinergních neuronů, což má za následek sníženou hladinu neurotransmiteru acetylcholinu. Předpokládá se, že cholinergní funkci lze zlepšit inhibitory AChE nebo antagonisty nikotinových či muskulárních receptorů. Obě tyto varianty jsou používány při léčbě pacientů s AD. Pokud je nadměrná aktivita AChE, dochází ke snížení koncentrace ACh a následně degeneraci cholinergního systému. Proto se AChEI používají k omezení degradace ACh tím, že jsou schopny zvýšit funkci nervových buněk, a to má za následek zvýšení koncentrace ACh. Při použití těchto inhibitorů může dojít ke zlepšení života pacienta, ale terapie je pouze symptomatická (Liu a kol., 2017; Liu a kol., 2019; Sharma, 2019).

1.4.6.6 Amyloidní hypotéza

Druhou hypotézou, pokoušející se vysvětlit patogenezi AD, je hypotéza amyloidní, navržená v roce 1991. Jako příčina onemocnění je uváděno hromadění amyloidních peptidů v mozku. Zvýšená produkce nebo snížená clearance β -amyloidu má neurotoxický účinek na zralé neurony, což vede ke smrti těchto buněk (Li a kol., 2018).

V neamyloidní dráze je amyloidní prekurzorový protein primárně štěpen α -sekretasou a následně γ -sekretasou. V amyloidní dráze plní nejprve úlohu β -sekretasa, která uvolňuje $A\beta$ do extracelulárního kompartmentu. Následně se uplatňuje γ -sekretasa a nastává štěpení APP. Z tohoto hlediska je inhibice β -sekretasy účinná pro inhibici $A\beta$ a neuroprotekcí u pacientů s AD. APP je důležitým modulátorem AChE na transkripční úrovni a má na AChE represivní účinky. Podle výzkumů existuje mezi cholinergní a amyloidní hypotézou spojení – synaptická forma AChE se spojuje s plaky v mozku (Jean a kol., 2019; Li a kol., 2018; Walczak-Nowicka a Herbet, 2021).

1.4.6.7 Hypotéza tau proteinu

U hypotézy tau proteinu jsou příčinou AD neurofibrilární spleti, tvořící se z hyperfosforylovaného proteinu tau. Tento protein stabilizuje mikrotubuly, což je za normálních okolností důležité pro správné fungování neuronů. V nativním stavu p-tau postrádá definovanou trojrozměrnou strukturu. To vede ke zvýšené náchylnosti a abnormálnímu skládání. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese p-tau způsobuje zvýšení aktivity AChE v mozku s následným vyčerpáním ACh v nervovém systému. P-tau se kolokalizuje s AChE především v cytoplazmatických buňkách (Cortés-Gómez a kol., 2021; Przybyłowska a kol., 2019; Sharma, 2019).

Hyperfosforylace p-tau je stimulována agregací amyloidního peptidu. Dochází k destabilizaci peptidu a následkem toho je destabilizace cytoskeletu a degradace buněk. Mimo to se vlákna hyperfosforylovaného p-tau, která jsou šroubovitě stočená, agregují a vytvářejí neurofibrilární spleti, což je důležitý faktor AD (Przybyłowska a kol., 2019).

1.4.7 Myasthenia gravis

Myasthenia gravis je autoimunitní onemocnění a zároveň nejčastější onemocnění, u kterého dochází k poruše neuromuskulárního přenosu. Dochází k tvorbě patogenních protilátek, které se vážou na složky neuromuskulárních synapsí – nejčastěji na AChR, ale i na receptory svalové specifické kinasy, argininu aj. Projevem je únava kosterního svalstva, včetně celkové slabosti a zasažení okohybných svalů. Protilátky proti AChR patří převážně

do podtřídy IgG1 a IgG3. Mohou aktivovat komplement na postsynaptické membráně a způsobit destrukci a ztrátu AChR (Bubuioc, 2021; Farmakidis a kol., 2018; Lazaridis a Tzartos, 2020).

1.4.7.1 Charakteristika MG

MG postihující děti lze rozdělit do 3 forem: přechodná neonatální myasthenia, vrozené myastenické syndromy a juvenilní myasthenia gravis. Juvenilní forma postihuje především extraokulární svaly. Při zasažení kosterních svalů dochází ke generalizované slabosti a únavě, při zasažení dýchacích svalů k respiračnímu selhání (Peragallo, 2017).

První symptomy se projevují na očních svalech. U většiny pacientů se pak rozšíří do dalších kosterních svalů, u menší části pacientů mohou zůstat lokalizovaně. Dělí se podle věku na MG s nástupem časným (do 50 let věku) a pozdním (nad 50 let) (Lazaridis a Tzartos, 2020).

1.4.7.2 Diagnostika

Diagnostika MG probíhá pomocí sérologického vyšetření, u kterého se prokazují výše zmíněné protilátky proti AChR. Následně je prováděno elektrofyzilogické vyšetření a posouzení odpovědi na inhibitory AChE. Titr protilátek sice nekoreluje se závažností onemocnění, je ale spojen se symptomy a odpovědí na terapii. Detekce protilátek je nejčastěji prováděna radioimunoprecipitačním testem, založeném na nepřímém značení AChR 125-I- α -bungarotoxinem (antagonista AChR). Diagnóza by měla být stanovena na základě klinického vyšetření, výskytu protilátek proti AChR v séru, opakované nervové stimulace a elektromyografie (Lazaridis a Tzartos, 2020; Peragallo, 2017).

1.4.7.3 Léčba

Terapie se zaměřuje především na podávání inhibitorů AChE. Dále se používají imunosupresiva, plazmaferéza nebo intravenózní imunoglobuliny (IVIg). Nevýhodou je velká řada nežádoucích účinků. Z toho důvodu je v posledních letech snaha zaměřit léčbu na antigenně specifické autoimunitní složky imunitního systému. V tomto případě je terapie prováděna individuálně, kdy nutností je znát dané protilátky pacienta (Lazaridis a Tzartos, 2020).

Symptomatická léčba zahrnuje cholinesterasové inhibitory, které byly objeveny a zavedeny do lékařské praxe během 19. století. Patří sem např. pyridostigmin (kapitola 1.2.1.8). Jednou z prvních plošně zavedených léčeb MG byla imunosupresivní terapie pomocí

kortikosteroidů. Mezi imunosupresiva používaná pro léčbu tohoto onemocnění patří azathioprin, cyklosporin, mykofenolát mofetil nebo metotrexát. Azathioprin je cytotoxický antimetabolit inhibující DNA a RNA syntézu, buněčnou replikaci a funkci lymfocytů. V 70. letech 20. století se v Evropě stal nejrozšířenějším imunosupresivem používaným pro léčbu MG. Mykofenolát mofetil inhibuje syntézu guanosinových nukleotidů, která je důležitá pro funkci T a B lymfocytů. Nevýhodou této léčby je schopnost kortikosteroidů tlumit imunitní odpověď snížením produkce zánětlivých cytokinů a endoteliální adheze leukocytů. Dále se vyskytují nežádoucí účinky jako hypertenze, demineralizace kostí, diabetes mellitus či neuropsychické poruchy (Farmakidis a kol., 2018).

Koncem roku 2017 byl pro léčbu dospělých s MG schválen eculizumab. Jedná se o rekombinantní monoklonální protilátku podávanou intravenózně. Principem účinku je inhibice štěpení C5 složky komplementu. Primárně je určen pro středně těžký až těžký průběh MG, imunoterapie ale není účinná u pacientů majících protilátky proti AChR. Doporučené dávkování je 900 mg týdně první měsíc, 5. týden je dávkování zvýšeno na 1200 mg a následně upraveno na 200 mg podávané každé 2 týdny. Před zahájením terapie je důležité meningokokové očkování (Farmakidis a kol., 2018).

Další možností léčby je thymektomie (chirurgické odstranění brzlíku). Indikuje se v případech, kdy pacienti neodpovídají na imunoterapii nebo mají v důsledku léčby kortikosteroidy vážné nežádoucí účinky. Thymektomie by měla být zvážena u dětí s generalizovanou MG, u kterých se vyskytují protilátky proti AChR, a to v případech, kdy je odpověď na léčbu pyridostigminem neuspokojivá nebo aby se mohlo předejít komplikacím při léčbě imunosupresivy (Sanders a kol., 2016).

Ke krátkodobé léčbě především u pacientů s život ohrožujícími symptomy (např. respirační insuficience) se indikuje výměna plazmy (PLEX) nebo intravenosní imunoglobuliny. Tyto metody se používají i před začátkem podání kortikosteroidů či u pacientů s nedostatečnou odpovědí na jinou léčbu. Volba mezi PLEX a IVIg závisí na zdravotním stavu pacienta, PLEX nelze použít např. u pacientů se sepsí, IVIg u pacientů s renálním selháním. U těžké generalizované MG jsou obě tato léčiva pravděpodobně stejně účinná. U mírnější a oční MG je účinnost IVIg snížena, ale mohou být vhodná pro léčbu refrakterní MG (Sanders a kol., 2016).

Problémem při léčbě MG je heterogenita tohoto onemocnění, kvůli čemuž neexistuje nejlepší obecný přístup pro všechny pacienty. V říjnu 2013 se sešli odborníci organizace

Myasthenia Gravis Foundation of America s cílem vypracovat doporučený postup při léčbě. Došli k závěru, že pyridostigmin by měl být součástí počáteční léčby u většiny pacientů, s dávkou upravenou dle individuálních příznaků nemocných. Kortikoidy by se měly předepsat až u pacientů, kteří na léčbu pyridostigminem nereagují, po čase se jejich dávka ale musí snížit. Pokud jsou kortikosteroidy kontraindikovány či odmítnuty, měla by se začít podávat nesteroidní látka. Ta se také používá i v případě, že se rozvinou vážnější nežádoucí účinky po podávání kortikosteroidů, odpověď na kortikosteroidy je nedostatečná či se dávka kortikosteroidů nedá snížit kvůli relapsu symptomů (Sanders a kol., 2016).

1.4.7.4 Prevalence

Počet pacientů s MG stále roste a za posledních 20 let se více než zdvojnásobil, celosvětová prevalence je okolo 700 000 jedinců. Nárůst je pravděpodobně způsoben zvyšující se délkou života, diagnostice a následné léčbě tohoto onemocnění. Myasthenia gravis dostala svůj název kvůli velké úmrtnosti v předešlých letech. Současná úmrtnost se uvádí v rozmezí 0,06–0,89 na 1 mil. osob za rok (Bubuioc, 2021; Farmakidis a kol., 2018).

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo porovnat klasickou Ellmanovu metodu, používanou pro sledování aktivity a inhibice cholinesteras, u které se jako substrát používá acetylthiocholin, se spektrofotometrickými metodami užívajícími jako substrát indoxylacetát. K detekci produktu vzniklého hydrolýzou indoxylacetátu bylo využito měření absorbance a fluorescence. Na základě získaných dat byly vybrány vhodné podmínky pro stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů cholinesteras.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a roztoky

Acetylcholinesterasa z paúhoře elektrického (Sigma-Aldrich)

AChE rozpuštěná v 0,1 M PBS pH 7,4

Butyrylcholinesterasa z koňského séra (Sigma-Aldrich)

BChE rozpuštěná v 0,1 M PBS pH 7,4

Indoxylacetát (IA)

$5 \cdot 10^{-3}$ M IA rozpuštěný v 5% ethanolu

0,1 M fosfátový pufr (PBS)

4 g NaCl, 0,1 g KH_2PO_4 , 1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g KCl do 500 ml demineralizované vody, pH upraveno na 7,4 (vše od Penta)

5% ethanol – k přípravě koncentrací substrátu IA a spolu s PBS jako blank při reakcích využívajících IA

Ellmanovo činidlo (DTNB) (Sigma-Aldrich)

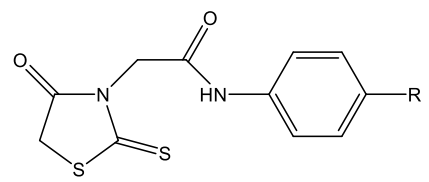
$5 \cdot 10^{-4}$ M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

Acetylthiocholin jodid (ATCh) (Sigma-Aldrich)

0,1 M roztok ATCh v PBS – substrát pro stanovení aktivity AChE

Inhibitory (tab. 1); 0,01 M rozpuštěné v DMSO, poskytnuty Katedrou organické a bioorganické chemie (Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)

Tabulka 1: Přehled testovaných inhibitorů

označení inhibitoru	-R	obecná struktura
1	-Cl	
2	-H	
3	-CF ₃	
4	-CH ₃	
5	-OCH ₃	
6	-NO ₂	

Rivastigmin (Sigma-Aldrich)

Rivastigmin tartarát rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ M

Galantamin (Sigma-Aldrich)

Galanthamin hydrobromid rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci $2 \cdot 10^{-2}$ M

3.2 Použité přístroje a pomůcky

Přístroj BioTek Synergy H1 microplate reader

Mikrotitrační destička

Jednokanálové a multikanálové pipety (Eppendorf, Biohit, Sartorius)

Mikrozkumavky

3.3 Stanovení aktivity enzymu

Stanovení aktivity enzymů AChE a BChE bylo uskutečněno Ellmanovou metodou. Tato metoda je zlatým standardem pro určení aktivity cholinesteras.

Nejprve byl změřen blank, který obsahoval:

- 0,1 M ATCh (0,08 ml),
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (0,8 ml),
- 1,192 ml PBS (o pH 7,4).

Objem PBS byl dopočítán do celkového objemu reakční směsi (2 ml). Následně bylo provedeno samotné stanovení aktivity obou cholinesteras, u kterého bylo dávkováno:

- 0,1 M ATCh (0,08 ml),
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (0,8 ml),
- 0,008 ml AChE (BChE),
- 1,184 ml PBS (o pH 7,4).

Stejně jako u blanku i zde byl celkový objem reakční směsi 2 ml. PBS bylo opět dopočítáno z celkového množství směsi po odečtení přidaného objemu ATCh, DTNB a AChE (BChE). Enzym byl vždy dávkován jako poslední, neboť po jeho přidání do směsi dochází ke startu reakce.

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, při vlnové délce $\lambda = 412$ nm, po dobu 70 s v intervalech 3 s. Každé měření bylo provedeno vždy alespoň třikrát, naměřené hodnoty byly následně zprůměrovány. Do grafu byla vynášena závislost absorbance na čase.

Z vynesného grafu byla pomocí rovnice regrese spočítána daná aktivita enzymu. Z definice jednotky enzymové aktivity byla za hodnotu času dosazena hodnota 60. Výsledná absorbance byla nakonec vynásobena přepočítávacím faktorem (17,67), který zahrnuje:

- délku kyvety (1 cm),
- molární absorpční koeficient ($14150 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$),
- celkový objem reakční směsi (2 ml),
- objem dávkovaného enzymu (0,008 ml).

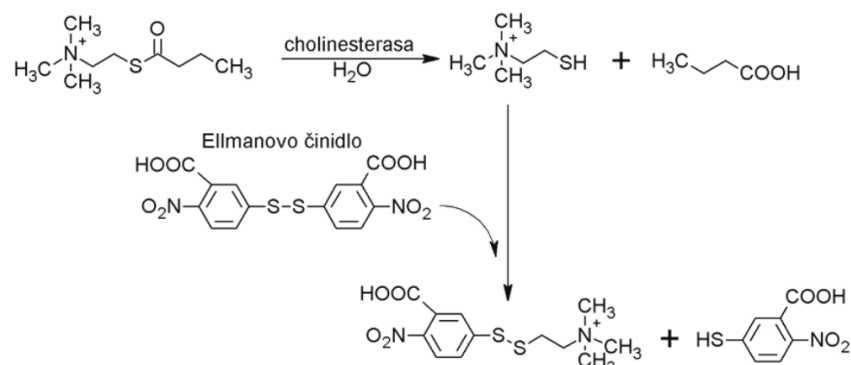
3.4 Stanovení reakční rychlosti

U obou cholinesteras (AChE a BChE) byly reakční rychlosti těchto enzymů měřeny celkem třemi způsoby s využitím dvou substrátů – acetylthiocholinu a indoxylacetátu. ATCh byl využit u Ellmanovy metody, IA u UV/Vis spektrometrie a fluorimetrického měření. U všech měření bylo zvoleno 8–10 koncentrací příslušného substrátu (IA, ATCh), které byly do mikrotitrační destičky dávkovány vzestupně.

Začátek reakce nastává po smísení enzymu a substrátu, z toho důvodu byl u všech měření přidáván daný enzym (AChE, BChE) jako poslední a ihned následovalo měření.

3.4.1 Stanovení rychlosti hydrolýzy acetylthiocholinu cholinesterasami (Ellmanova metoda)

U Ellmanovy metody se jako substrát používá acetylthiocholin. Tato metoda je rychlá, levná a slouží k měření aktivity cholinesteras. Principem je hydrolýza acetyl- nebo butyryl- thiocholinu pomocí cholinesteras (AChE, BChE) a reakce thiocholinu s thiolovým činidlem DTNB (5,5'-dithiobis-2-benzoová kyselina). Vzniká kyselina 5-thio-2-nitrobenzoová (TNB). Nevýhodou této metody je nestabilita činidla DTNB, které může ve vzorku interagovat s volnými sulfhydrylovými skupinami a následně může dojít k ovlivnění aktivity cholinesteras. Na obr. 11 je znázorněn princip této reakce (Shetab-Boushehri, 2018; Dingova, D. a kol., 2014).



Obrázek 11: Hydrolytická (enzymová) reakce s použitím substrátu a Ellmanova činidla (Zeman a kol., 2018)

Jak již bylo uvedeno, při Ellmanově metodě byl jako substrát použit 5 mM zásobní roztok ATCh. Připravilo se 8 koncentrací tohoto substrátu tak, aby jednotlivé koncentrace ve výsledné reakční směsi byly v rozmezí 1.10^{-3} – 5.10^{-6} M. Koncentrace byly připraveny naředěním zásobního roztoku ATCh v PBS. Aktivity u obou enzymů (AChE, BChE) ve výsledné reakční směsi byly zvoleny následovně: 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 U.

Reakční směs v jamkách obsahovala složky o výsledné koncentraci:

- ATCh o námi zvolené koncentraci (40 μ l),
- 1.10^{-4} M DTNB (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l),
- AChE / BChE v takovém objemu, aby výsledná aktivita v celkové reakční směsi byla 0,1–0,4 U.

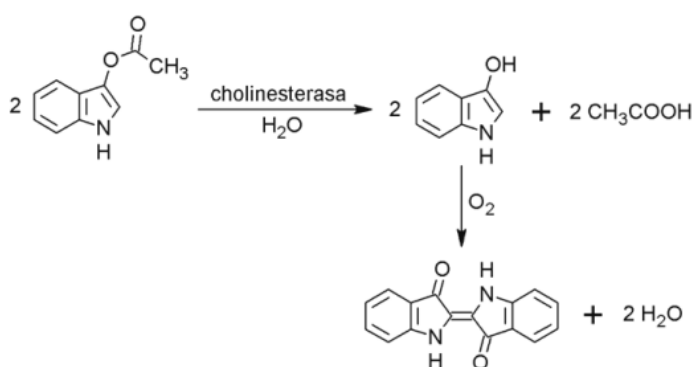
Při laboratorní teplotě byla měřena závislost absorbance ($\lambda = 412$ nm) na čase. Celková doba měření byla nastavena na 1 min a doba opakování na 3 s a jednotlivé koncentrace substrátu byly měřeny zvlášť, vždy v dubletu.

Následně byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 zpracovány jednotlivé závislosti – závislost absorbance na čase (ze které se poté vypočítaly reakční rychlosti u jednotlivých koncentrací substrátu), saturační křivka (závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu), linearizované závislosti (závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace substrátu) a graf závislosti zprůměrovaných reakčních rychlostí na koncentraci substrátu při daných aktivitách enzymů. Výsledky všech měření byly zprůměrovány.

3.4.2 Stanovení rychlosti hydrolýzy indoxylacetátu cholinesterasami

Indoxylacetát byl použit při UV/Vis spektrometrii a fluorimetrickém měření. Je tedy využíván jako chromogenní a fluorescenční substrát.

Principem reakce je hydrolýza indoxylacetátu, katalyzovaná cholinesterasou (AChE, BChE). Indoxylacetát je štěpen, vzniká indol a kyselina octová. Indol po oxidaci přechází na modré nerozpustné indigo. Indoxylacetát může být využit. U UV/Vis spektrometrie se stanovuje absorbance vzniklého barevného produktu, v případě fluorescenčního měření intenzita fluorescence. Schéma acetylcholinesterasou katalyzované reakce hydrolýzy indoxylacetátu je znázorněno na obrázku 12.



Obrázek 12: Hydrolytické (enzymové) štěpení indoxylacetátu za vzniku indiga (Zeman a kol., 2018)

3.4.2.1 UV/VIS spektrometrie

Pro oba enzymy (AChE, BChE) byly zvoleny stejné aktivity ve výsledné reakční směsi: 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 U. Ze zásobního roztoku indoxylacetátu (5 mM) byla pomocí ředění s 5% ethanolom připravena řada 8 různých koncentrací tak, aby výsledná koncentrace IA ve výsledné reakční směsi v jamkách byla v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-3}$ M. Pro každou koncentraci byla určena jedna jamka destičky.

Do jamek mikrotitrační destičky byly pipetovány reagenty:

- IA o námi zvolené koncentraci (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l),
- AChE / BChE v takovém objemu, aby výsledná aktivita v konečné reakční směsi byla 0,2–0,8 U.

Celkový objem každé jamky byl spočítán na 200 μ l. Množství přidávaného PBS bylo vypočítáno z rozdílu celkového objemu jamky (200 μ l) po odečtení objemů jednotlivých složek směsi (substrátu a enzymu).

Do deváté jamky byl pipetován blank:

- 5% ethanol (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (160 μ l).

Při laboratorní teplotě byla měřena závislost absorbance ($\lambda = 670$ nm) na čase. Celkový čas měření byl stanoven na 25 minut a absorbance byly odečítány v 1 min intervalech. Jednotlivé koncentrace substrátu byly měřeny zvlášť, vždy v dubletu (Pohanka a kol., 2011).

Na základě výsledků měření byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 zpracovány jednotlivé závislosti – závislost absorbance na čase (ze které se poté vypočítaly reakční rychlosti u jednotlivých koncentrací substrátu), saturační křivka (závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu), linearizované závislosti (závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace substrátu) a graf závislosti zprůměrovaných reakčních rychlostí na koncentraci substrátu při daných aktivitách enzymů. Měření byla vždy zprůměrována.

3.4.2.2 Fluorescenční měření

Pro měření aktivit cholinesteras fluorimetrickou metodu byl použit podobný postup jako u UV/Vis spektrometrie, kdy aktivity enzymů v reakčních směsích byly nejprve zvoleny stejně (tedy 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 U). Ukázalo se ale, že při použití těchto aktivit v kombinaci s vyššími koncentracemi substrátu (zhruba od $5 \cdot 10^{-4}$ M) změřené hodnoty intenzity fluorescence přesahovaly mez detekce přístroje. Proto byly zvoleny aktivity nižší, konkrétně 0,05; 0,08; 0,1 a 0,15 U. Bylo použito celkem 9 koncentrací indoxylacetátu v koncentračním rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ – $5 \cdot 10^{-4}$ M, kdy jednotlivé koncentrace substrátu IA byly připraveny naředěním zásobního roztoku IA (5 mM) s 5% ethanollem. Pipetovaný objem enzymů byl opět vypočítán pro jednotlivé aktivity, v závislosti na aktivitě zásobních roztoků enzymů.

Do každé jamky bylo postupně pipetováno:

- IA o dané koncentraci (v rozmezí $5 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ M) (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l),
- AChE / BChE v takovém objemu, aby výsledná aktivita v konečné reakční směsi byla 0,05–0,15 U.

Desátá jamka obsahovala blank:

- 5% ethanol (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (160 μ l).

Měření probíhalo při laboratorní teplotě. Byla měřena závislost intenzity fluorescence na čase, kdy vlnová délka excitačního záření byla stanovena na $\lambda_{exc} = 395$ nm a emisní vlnová délka na $\lambda_{em} = 470$ nm (Guilbault a Kramer, 1965).

Celková doba měření byla nastavena na 2 minuty, intenzita fluorescence byla měřena automaticky po 5 s. Jednotlivé koncentrace substrátu byly spolu se zbylými složkami směsi napipetovány do jamek 1–8 (každá do jiné jamky) a měřeny najednou. Měření bylo provedeno dvakrát až třikrát.

Po změření byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 zpracovány jednotlivé závislosti – závislost intenzity fluorescence na čase (na základě které se vypočítala rychlost reakce pro jednotlivé koncentrace substrátu), saturační křivka (závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu), linearizované závislosti (závislost převrácených hodnot reakčních rychlostí na převrácené hodnotě koncentrace substrátu) a graf závislosti zprůměrovaných reakčních rychlostí na koncentraci substrátu při daných aktivitách enzymů. Pro jednotlivé výpočty byly hodnoty zprůměrovány.

3.5 Stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů cholinesteras

U všech měření byla zvolena nejvhodnější koncentrace příslušného substrátu (ATCh, IA) v kombinaci s vhodnou aktivitou enzymu AChE. Tato kombinace byla volena v závislosti na výsledcích vynesných do grafů závislosti zprůměrovaných reakčních rychlostí na koncentraci substrátu při daných aktivitách enzymů, u kterých je dobře patrné, při kterých hodnotách docházelo k dostatečné odezvě. Měření probíhalo pouze s enzymem AChE, protože se jedná o předního zástupce cholinesteras.

Pomocí níže uvedených metod bylo možné stanovit rychlost inhibice reakce enzymu a substrátu po přidání inhibitoru o dané koncentraci. K zahájení reakce dochází po smíchání enzymu a daného substrátu. Z toho důvodu se u všech měření jako poslední přidával enzym, ihned po přidání muselo proběhnout měření při dané vlnové délce. Vždy byla porovnávána inhibovaná reakce s neinhibovanou.

U každé metody probíhalo celkem 8 měření s 8 různými inhibitory. Přehled jednotlivých inhibitorů je uveden výše v tab. 1. U každého inhibitoru bylo zvoleno 8 různých koncentrací

v rozmezí $2 \cdot 10^{-3}$ – $7 \cdot 10^{-7}$ M ve výsledné reakční směsi. Výjimkou byl galantamin, u kterého byly koncentrace voleny o řád nižší ($1 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-8}$ M ve výsledné reakční směsi). Koncentrace inhibitorů byly v destičce seřazeny vždy od nejvyšší po nejnižší.

Z jednotlivých měření byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 z průměrných hodnot příslušných měření spočítány hodnoty IC_{50} .

IC_{50} je kvantitativní hodnota udávající, kolik je potřeba konkrétní inhibiční látky k poklesu *in vitro* inhibice daného biologického procesu nebo biologické složky (enzym, buňka, buněčný receptor) na 50 %. Dále je definována jako koncentrace léčiva, potřebná pro 50 % inhibici. Díky ní lze zjistit účinnost a množství léčiv, které je potřeba k poloviční inhibici biologického procesu (Aykul a Martinez-Hackert, 2016).

3.5.1 Stanovení IC_{50} s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)

Pro jednotlivé inhibitory bylo připraveno 8 koncentrací v rozmezí $2 \cdot 10^{-3}$ – $7 \cdot 10^{-7}$ M (koncentrace inhibitorů jsou uvedeny výše v kapitole 3.5, přehled inhibitorů je uveden v tab.1). Tyto koncentrace byly získány naředěním zásobních inhibitorů v roztoku PBS. Koncentrace ATCh byla použita taková, aby ve výsledné směsi byla hodnota $1 \cdot 10^{-3}$ M. Jako enzym byla použita AChE s aktivitou 0,2 U ve výsledné směsi.

Pro inhibovanou reakci byly do jamek pipetovány reagentie tak, aby výsledná reakční směs obsahovala:

- daný inhibitor o příslušné koncentraci (uvedeno výše v kapitole 3.5) (40 μ l)
- $1 \cdot 10^{-3}$ M ATCh (40 μ l z 0,1 M zásobního roztoku ATCh)
- $1 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (40 μ l z $5 \cdot 10^{-4}$ M zásobního roztoku DTNB)
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (62 μ l)
- 0,2 U AChE.

Do jamek pro neinhibovanou reakci byly pipetovány složky, jejichž výsledná koncentrace ve směsi byla:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M ATCh (40 μ l z 0,1 M zásobního roztoku)
- $1 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (40 μ l z $5 \cdot 10^{-4}$ M zásobního roztoku)
- 102 μ l PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l)
- 0,2 U AChE.

Pro blank byly použity reagensie s konečnou koncentrací:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M ATCh (40 μ l z 0,1 M zásobního roztoku ATCh)
- $1 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (40 μ l z $5 \cdot 10^{-4}$ M zásobního roztoku DTNB)
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (120 μ l).

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace, při vlnové délce 412 nm. Celkový čas měření byl nastaven na 1 min, měření se opakovalo ve 3 s intervalech. U všech inhibitorů proběhlo měření minimálně dvakrát.

Následně byly vypočteny hodnoty reakčních rychlostí neinhibované (v_0) a inhibovaných (v_i) reakcí a v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru v_0/v_i na koncentraci daného inhibitoru ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} , které byly vždy v závislosti na počtu opakování měření zprůměrovány.

3.5.2 Stanovení IC_{50} s využitím indoxylacetátu

Pro stanovení hodnot IC_{50} byly u jednotlivých měření vybrány nejvhodnější kombinace substrátu a enzymu. Použitým enzymem byla AChE, protože je významnější cholinesterasou.

3.5.2.1 UV/Vis spektrometrie

Do mikrozkušavek bylo připraveno 8 různých koncentrací jednotlivých inhibitorů (koncentrace inhibitorů jsou uvedeny výše v kapitole 3.5, přehled inhibitorů je uveden v tab. 1). Koncentrace byly připraveny ředěním zásobních roztoků inhibitorů v PBS. Koncentrace IA byla zvolena tak, aby její výsledná hodnota v reakční směsi byla $1 \cdot 10^{-3}$ M. Použitým enzymem byla AChE s aktivitou 0,6 U ve výsledné reakční směsi.

První dva řádky mikrotitrační destičky (měření v dubletu) byly určeny pro inhibovanou reakci. Do těchto jamek byly pipetovány jednotlivé objemy tak, aby ve výsledné reakční směsi byly konečné koncentrace reagensí:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M indoxylacetátu (40 μ l),
- daný inhibitor s příslušnou koncentrací (uvedeno v kapitole 3.5) (40 μ l),
- 0,6 U AChE,
- PBS (dopočítáno vždy do celkového objemu 200 μ l) (60 μ l).

Pro neinhibovanou reakci byl určen třetí řádek destičky, který měl složení výsledné směsi:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M indoxylacetátu (40 μ l),
- 0,6 U AChE,
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (100 μ l).

Do deváté jamky prvního a druhého řádku byl napipetován blank inhibované reakce. Blank obsahoval složky s výslednou koncentrací v reakční směsi:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M indoxylacetátu (40 μ l)
- inhibitor v rozmezí koncentrací $5 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ M (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (120 μ l)

Do deváté jamky třetího řádku byl připraven blank neinhibované reakce (160 μ l PBS a 40 μ l 5% ethanolu).

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace. Zvolená vlnová délka byla 670 nm. Celkový čas měření byl nastaven na 25 minut a absorbance odečítána automaticky v 1 min intervalech. U všech inhibitorů se měření opakovalo nejméně dvakrát.

Následně byly vypočteny hodnoty reakčních rychlostí neinhibované (v_0) a inhibovaných (v_i) reakcí a v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru v_0/v_i na koncentraci daného inhibitoru ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} , které byly vždy zprůměrovány v závislosti na počtu opakování měření.

3.5.2.2 Fluorescenční měření

Při stanovení fluorimetrickou metodou se postupovalo podobně jako u měření s využitím absorbance. Nejprve bylo ze zásobního roztoku daného inhibitoru připraveno 8 koncentrací (od nejvyšší hodnoty po nejnižší). Koncentrace inhibitorů jsou uvedeny výše v kapitole 3.5, přehled inhibitorů je uveden v tab. 1. Koncentrace IA byla zvolena tak, aby ve výsledné reakční směsi bylo $1 \cdot 10^{-3}$ M. Použitým enzymem byla AChE s aktivitou 0,1 U ve výsledné reakční směsi.

Do 8 jamek mikrotitrační destičky dávkovány reagenty tak, aby výsledná směs obsahovala:

- daný inhibitor s příslušnou koncentrací (uvedeno v kapitole 3.5) (40 μ l),
- $1 \cdot 10^{-3}$ M IA (40 μ l),
- PBS (dopočítáno vždy do celkového objemu 200 μ l) (100,5 μ l),
- 0,1 U AChE.

V deváté jamce probíhala neinhibovaná reakce. Použité reagenty pro tuto reakci byly voleny tak, aby výsledná směs obsahovala:

- $1 \cdot 10^{-3}$ M IA (40 μ l),
- PBS (dopočítáno do celkového objemu 200 μ l) (140,5 μ l)
- 0,1 U AChE.

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace. Excitační vlnová délka byla 395 nm, emisní vlnová délka 470 nm. Intenzita fluorescence byla zaznamenávána v 5 s intervalech po dobu 2 min. Všechna měření proběhla opakovaně, alespoň dvakrát. Následně byly vypočteny hodnoty reakčních rychlostí neinhibované (v_0) a inhibovaných (v_i) reakcí a v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru v_0/v_i na koncentraci daného inhibitoru ve výsledné reakční směsi. Ze získaných rovnic regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} , které byly vždy zprůměrovány.

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení reakční rychlosti

U obou cholinesteras (AChE, BChE) byly při zvolených aktivitách enzymů a koncentrací substrátů stanoveny reakční rychlosti. Hodnoty aktivit enzymů se lišily v závislosti na konkrétní metodě. Při daném měření byly aktivity obou enzymů zvoleny stejně.

Stanovení reakční rychlosti bylo uskutečněno třemi metodami: Ellmanovou, UV/Vis spektrometrií a fluorescenční metodou. U Ellmanovy metody byl jako substrát použit acetylthiocholin, u zbylých dvou metod poté indoxylacetát.

U všech měření byla nejprve vynesena časová závislost naměřených hodnot při dané vlnové délce na námi zvolených koncentracích substrátů (IA, ATCh). Hodnoty byly získány vždy z průměru alespoň dvou měření. Z tohoto grafu byl poté vybrán lineární úsek, ze kterého bylo možno vypočítat reakční rychlost.

Reakční rychlost je definována jako přeměna množství látky za danou časovou jednotku. Vzorový výpočet této rychlosti je uveden níže:

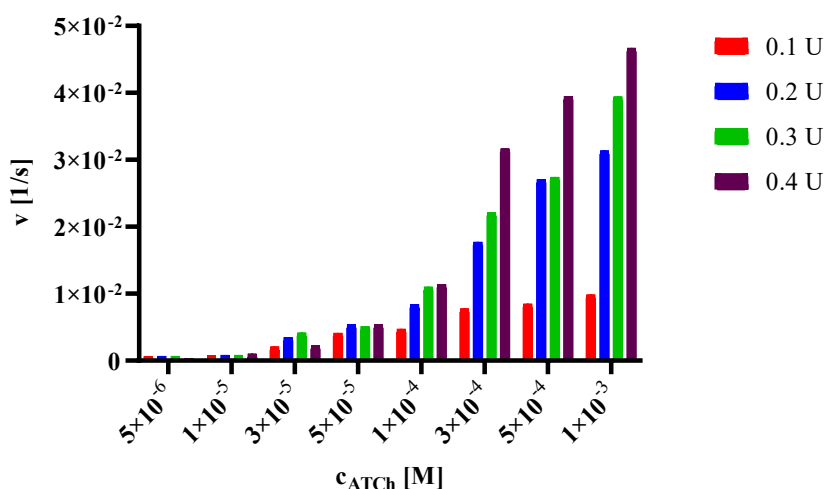
$$v = \frac{(A_{20} - A_6)}{(t_{20} - t_6)}$$
$$v = \frac{(0,61 - 0,4)}{(20 - 6)}$$
$$v = 0,015 \text{ min}^{-1}$$

Tento příklad uvádí měření UV/Vis spektrometrií při vlnové délce 670 nm s koncentrací substrátu IA $3 \cdot 10^{-4}$ M. Hodnoty A_{20} a A_6 jsou absorbance naměřené při vlnové délce 670 nm v čase 20. a 6. minuty. Hodnoty t_{20} a t_6 potom časy 20. a 6. minuta.

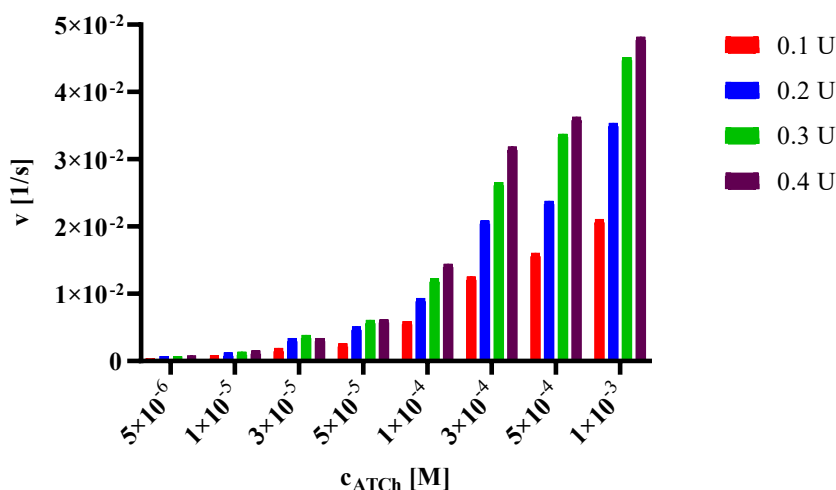
Následně byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 zhotoveny saturační křivky, které vystihují závislost reakčních rychlostí na daných koncentracích substrátu. Po vypočtení všech reakčních rychlostí při daných aktivitách enzymů (AChE, BChE) bylo možné sestavit graf závislosti zprůměrovaných reakčních rychlostí na koncentraci substrátu (IA, ATCh) při daných aktivitách enzymů. Grafy jednotlivých měření jsou uvedeny v příslušných kapitolách níže.

4.1.1 Stanovení rychlosti hydrolyzy acetylthiocholinu cholinesterasami (Ellmanova metoda)

U Ellmanovy metody probíhalo měření při vlnové délce 412 nm. Použitým substrátem byl ATCh s koncentracemi vyneseny v grafu na ose x. Aktivity enzymu ve výsledné reakční směsi byly zvoleny v rozmezí 0,1–0,4 U. Měření probíhalo 1 min při laboratorní teplotě. Závislosti průměrných hodnot reakčních rychlostí na koncentracích ATCh a aktivitě enzymů jsou znázorněny níže na grafu 1 (pro AChE) a grafu 2 (pro BChE).



Graf 1: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci ATCh při dané aktivitě AChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

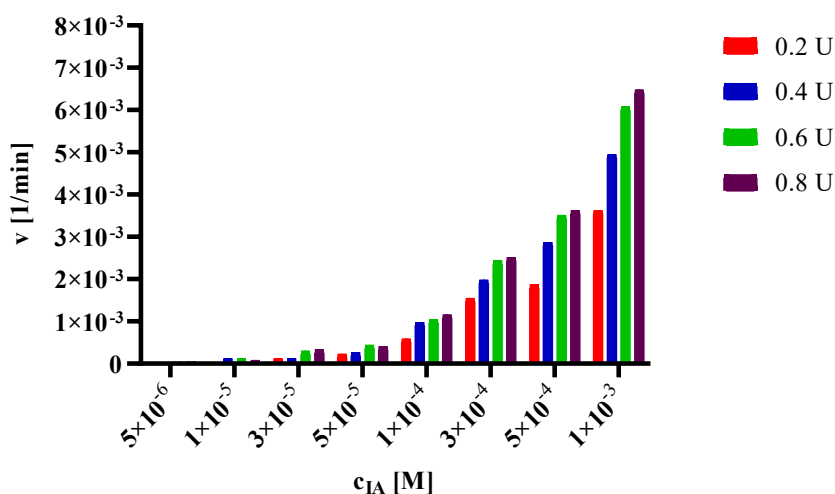


Graf 2: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci ATCh při dané aktivitě BChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

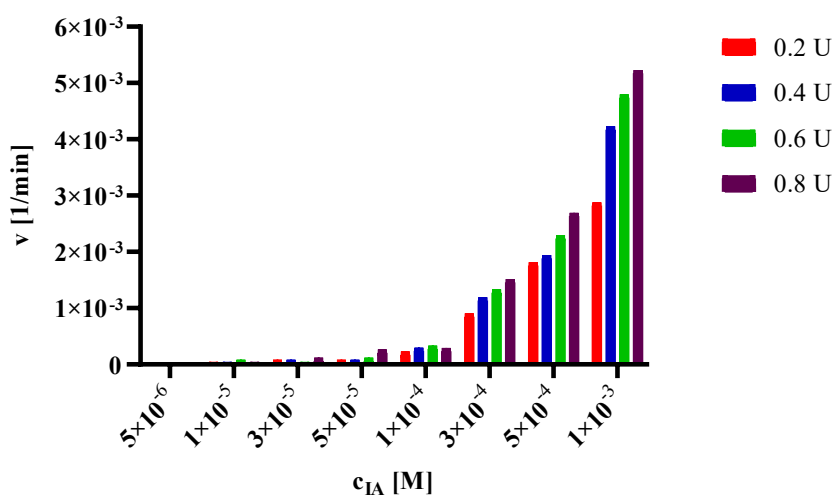
4.1.2 Stanovení rychlosti hydrolýzy indoxylacetátu cholinesterasami

4.1.2.1 UV/Vis spektrometrie s využitím IA

UV/Vis spektrometrie probíhala při vlnové délce 670 nm po dobu 25 minut při laboratorní teplotě. U tohoto měření byl jako substrát použit indoxylacetát s koncentracemi uvedenými na ose x. Aktivity enzymů (AChE, BChE) byly zvoleny v rozmezí 0,2–0,8 U ve výsledné reakční směsi. Závislosti reakčních rychlostí na různých koncentracích IA a při daných aktivitách enzymů jsou uvedeny na grafu 3 (pro AChE) a grafu 4 (pro BChE) níže. U obou grafů se jedná o zprůměrované hodnoty.



Graf 3: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě AChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

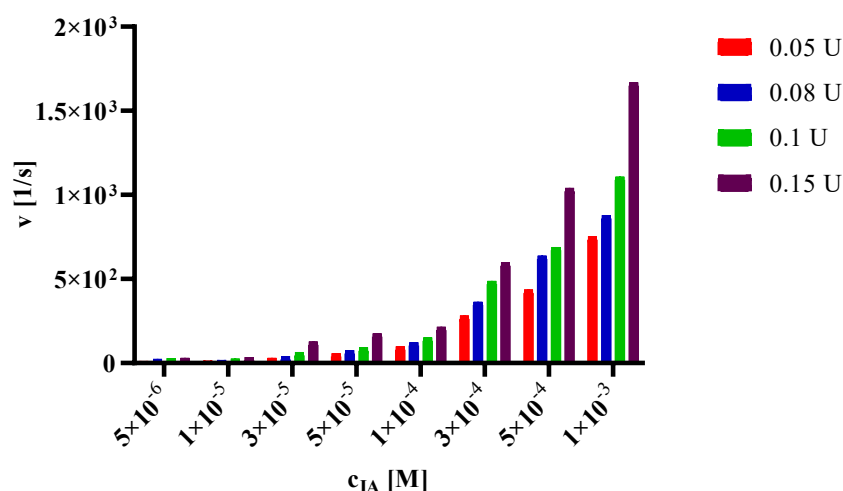


Graf 4: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě BChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

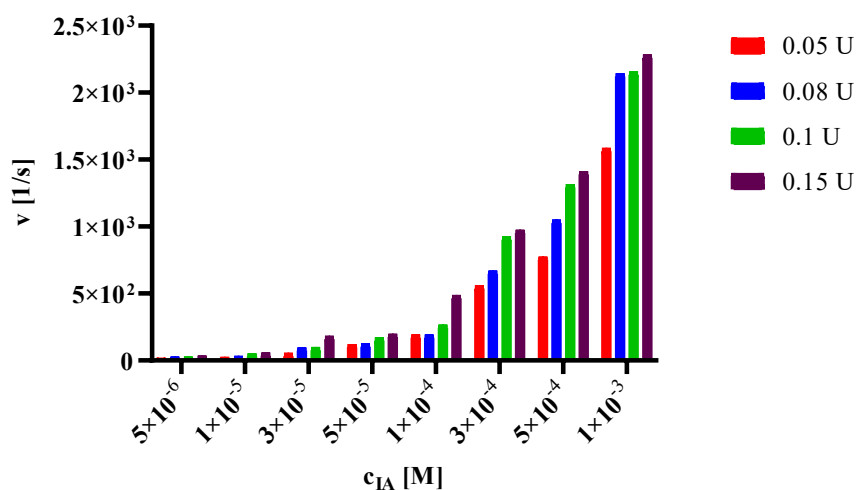
4.1.2.2 Fluorimetrické měření s využitím IA

U fluorimetrického měření byla zvolena excitační vlnová délka 395 nm a emisní vlnová délka 470 nm. Substrátem byl IA s koncentracemi vyneseny na ose x. Aktivita enzymu byla zvolena v rozmezí 0,05–0,15 U ve výsledné reakční směsi.

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace po dobu 1 min. Závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu a dané aktivitě enzymu jsou opět uvedeny na grafu 5 (pro AChE) a grafu 6 (pro BChE). U obou grafů se jedná o zprůměrované hodnoty.



Graf 5: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě AChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)



Graf 6: Závislost reakční rychlosti na dané koncentraci IA při dané aktivitě BChE. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

4.2 Stanovení kinetických parametrů

Následně byla provedena linearizace dle Lineweavera-Burka. Tento graf znázorňuje závislost převrácené hodnoty rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě jednotlivých koncentrací substrátu ($1/S$).

Všechna měření pro jednotlivé aktivity enzymů (AChE, BChE) byla zprůměrována a z rovnice grafu $y = kx + q$ byly dopočítány hodnoty mezní rychlosti (V_m) a Michaelisovy konstanty (K_m), kdy Michaelisova konstanta je definována jako konstanta poloviční saturace. Vyjadřuje koncentraci substrátu, při které se rychlost enzymové reakce rovná polovině limitní rychlosti. Vzorový příklad je uveden níže:

$$y = kx + q$$

$$y = 0,0911x + 502,56$$

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

$$V_m = \frac{1}{502,56}$$

$$V_m = 1,99 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$$

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

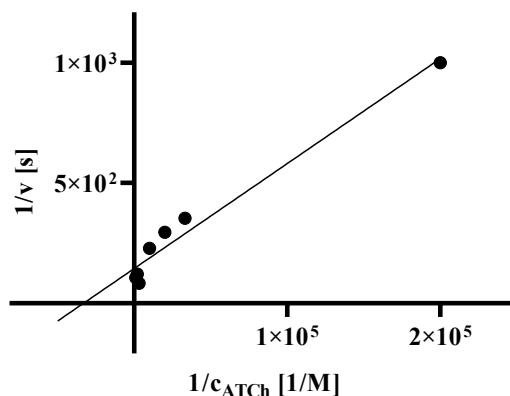
$$K_m = 0,0911 \cdot 1,99 \cdot 10^{-3}$$

$$K_m = 1,81 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Příklad UV/Vis spektrometrie s použitím enzymu AChE o aktivitě 0,4 U a substrátem IA. Příklady linearizačních křivek jsou uvedeny níže v kapitolách. Přehled hodnot V_m a K_m při daných aktivitách enzymů je shrnut níže v tabulkách č. 2–7.

4.2.1 Stanovení kinetických parametrů s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)

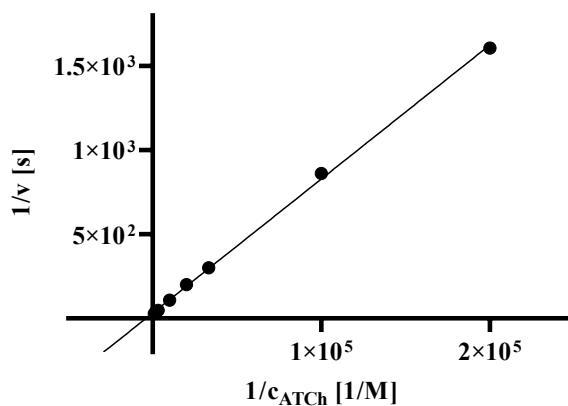
Měření Ellmanovou metodou probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace, při vlnové délce 412 nm, po dobu 2 minut. Každá koncentrace ATCh byla měřena zvlášť. Příklad závislosti $1/v$ na $1/S$ pro enzym AChE je uveden na grafu 7 a pro BChE na grafu 8. Jedná se vždy o průměr hodnot daného měření. V tabulkách 2 a 3 jsou uvedeny průměrné hodnoty V_m a K_m .



Graf 7: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu ATCh a enzymu AChE o aktivitě 0,1 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Tabulka 2: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím ATCh jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita AChE (U)	0,1	0,2	0,3	0,4
V_{\max} [s^{-1}]	$7,09 \cdot 10^{-3}$	$2,06 \cdot 10^{-2}$	$2,56 \cdot 10^{-2}$	$2,22 \cdot 10^{-1}$
K_m [M]	$6,73 \cdot 10^{-5}$	$1,90 \cdot 10^{-4}$	$3,78 \cdot 10^{-4}$	$2,47 \cdot 10^{-3}$



Graf 8: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu ATCh a enzymu BChE o aktivitě 0,2 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

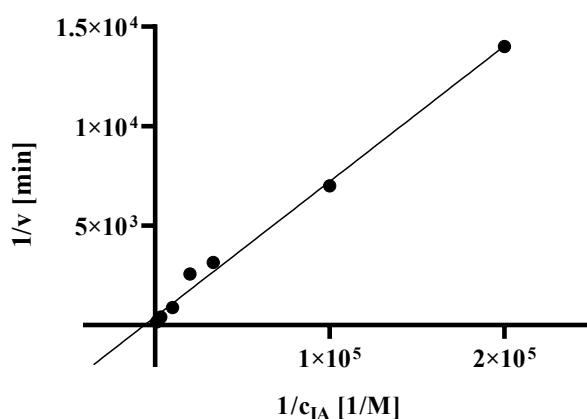
Tabulka 3: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím ATCh jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita BChE (U)	0,1	0,2	0,3	0,4
V_{\max} [s^{-1}]	$2,75 \cdot 10^{-2}$	$3,17 \cdot 10^{-2}$	$6,92 \cdot 10^{-2}$	$4,63 \cdot 10^{-2}$
K_m [M]	$3,99 \cdot 10^{-4}$	$2,46 \cdot 10^{-4}$	$5,19 \cdot 10^{-4}$	$3,19 \cdot 10^{-4}$

4.2.2 Stanovení kinetických parametrů s využitím indoxylacetátu

4.2.2.1 UV/Vis spektrometrie

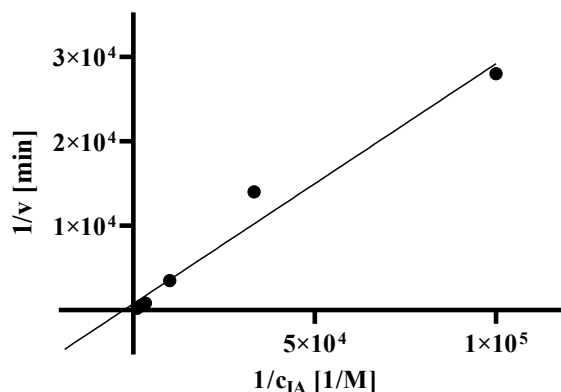
Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace o vlnové délce 670 nm po dobu 25 minut. Na grafu 9 je uvedena závislost převrácených hodnot reakční rychlosti na převrácených hodnotách koncentrace IA s aktivitou AChE 0,8 U ve výsledné reakční směsi a na grafu 10 závislost $1/v$ na $1/S$ (IA) s aktivitou BChE 0,4 U ve výsledné reakční směsi. V obou případech se jedná o zprůměrované hodnoty. Přehled jednotlivých zprůměrovaných hodnot V_m a K_m pro UV/Vis měření je při daných aktivitách enzymů s použitím IA uveden v tab. 4 (pro AChE) a tab. 5 (pro BChE).



Graf 9: Linearizace dle Lineweaver-Burka s použitím substrátu IA a enzymu AChE o aktivitě 0,8 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Tabulka 4: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím IA jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita AChE (U)	0,2	0,4	0,6	0,8
V_{max} [min^{-1}]	$6,24 \cdot 10^{-3}$	$1,99 \cdot 10^{-3}$	$5,52 \cdot 10^{-3}$	$1,07 \cdot 10^{-2}$
K_m [M]	$9,96 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^{-4}$	$5,12 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-3}$



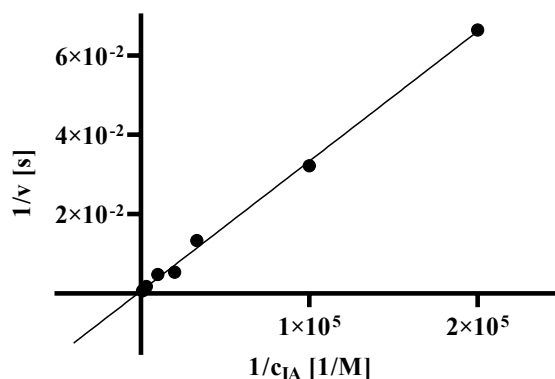
Graf 10: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu IA a enzymu BChE o aktivitě 0,4 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Tabulka 5: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím IA jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita BChE (U)	0,2	0,4	0,6	0,8
V_{max} [min^{-1}]	$4,44 \cdot 10^{-4}$	$5,15 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-3}$	$2,49 \cdot 10^{-2}$
K_m [M]	$1,23 \cdot 10^{-4}$	$1,44 \cdot 10^{-4}$	$2,42 \cdot 10^{-4}$	$6,97 \cdot 10^{-3}$

4.2.2.2 Fluorimetrické měření

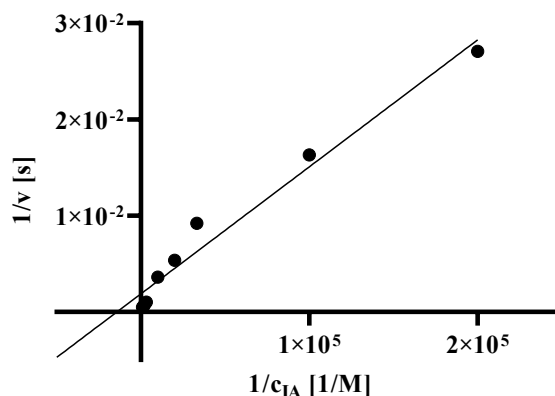
Fluorimetrické měření probíhalo při excitační vlnové délce 395 nm a emisní vlnové délce 470 nm při laboratorní teplotě po dobu 1 min (měřena každá koncentrace substrátu zvlášť). Příklady zprůměrovaných závislostí převrácených hodnot $1/v$ na $1/S$ (IA) jsou uvedeny pro enzym AChE na grafu 11 a pro BChE na grafu 12. V tabulkách 6 a 7 jsou poté uvedeny průměrné hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m .



Graf 11: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím substrátu IA a enzymu AChE o aktivitě 0,08 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Tabulka 6: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách AChE s použitím IA jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita AChE (U)	0,05	0,08	0,1	0,15
V_{max} [s^{-1}]	151,52	263,16	400,00	2500,00
K_m [M]	$1,06 \cdot 10^{-4}$	$2,37 \cdot 10^{-4}$	$1,20 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-3}$



Graf 12: Linearizace dle Lineweavera-Burka s použitím IA a BChE o aktivitě 0,08 U. (Hodnoty reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Tabulka 7: Hodnoty kinetických parametrů V_m a K_m při daných aktivitách BChE s použitím IA jako substrátu (průměr alespoň ze 2 měření)

Aktivita BChE (U)	0,05	0,08	0,1	0,15
V_{max} [s^{-1}]	303,03	357,14	833,33	1428,57
K_m [M]	$9,09 \cdot 10^{-5}$	$7,14 \cdot 10^{-5}$	$1,67 \cdot 10^{-4}$	$2,86 \cdot 10^{-4}$

4.3 Stanovení reakční rychlosti u inhibované reakce

Z grafů závislostí reakčních rychlostí na koncentraci substrátu při daných aktivitách enzymů uvedených výše (kapitoly 4.1.1., 4.1.2. a 4.1.3.) byly pro jednotlivá měření zjištěny vhodné aktivity enzymů a koncentrace substrátů, mající dostatečnou odezvu. Tyto hodnoty se zvolily tak, aby při co nejnižší koncentraci substrátu a aktivitě enzymu byla stále dostatečná odezva. Důvodem byla snaha o úsporu použitého materiálu. Při stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů Ellmanovou metodou byla použita aktivita AChE 0,2 U a koncentrace substrátu ATCh $1 \cdot 10^{-3}$ M ve výsledné reakční směsi. U UV/Vis spektrometrie byla zvolena aktivita AChE 0,6 U a aktivita substrátu IA v reakční směsi $1 \cdot 10^{-3}$ M a u fluorimetrického měření byla aktivita AChE zvolena 0,1 U a koncentrace substrátu IA $1 \cdot 10^{-3}$ M ve výsledné reakční směsi.

Bylo testováno celkem 8 inhibitorů (přehled jednotlivých inhibitorů je uveden v tab. 1). Pro každý inhibitor bylo zvoleno 8 různých koncentrací. Pro všechny inhibitory č. 1–6 a rivastigmin byly zvoleny koncentrace v rozmezí $2 \cdot 10^{-3}$ – $7 \cdot 10^{-7}$ M. Výjimkou byl galantamin, pro který bylo určeno koncentrační rozmezí $1 \cdot 10^{-4}$ – $5 \cdot 10^{-8}$ M. Zásobní roztoky inhibitorů měly koncentraci 0,01 M a kalibrační řada byla připravena ředěním příslušných inhibitorů v PBS.

U všech měření s danými koncentracemi inhibitorů byla nejprve pro jednotlivé koncentrace inhibitorů vynesena závislost absorbance (Ellmanova metoda, UV/Vis spektrometrie) nebo fluorescence (fluorimetrické měření) na čase při určité vlnové délce. Z tohoto grafu byl vybrán lineární úsek, ze kterého bylo následně možné vypočítat reakční rychlosti při jednotlivých koncentracích inhibitorů, stejně jako při stanovení reakčních rychlostí u daných aktivit enzymů (uvedeno výše v kapitole 4.1.1. a 4.1.2., 4.1.3.). Vzorový výpočet reakční rychlosti je uveden níže:

$$v = \frac{(Fl_{60} - Fl_{40})}{(t_{60} - t_{40})}$$
$$v = \frac{(11561 - 7638)}{(60 - 40)}$$
$$v = 196,15 \text{ s}^{-1}$$

Reakční rychlost byla počítána při fluorimetrickém měření jako rozdíl hodnoty naměřené intenzity fluorescence (v 60 s a 40 s) vydělená rozdílem odpovídajících časů (60 s a 40 s). Naměřené hodnoty byly vždy průměrovány.

Dále byl vypočten poměr reakční rychlosti neinhibované reakce s inhibovanou. Pro výpočet reakční rychlosti neinhibované reakce byl použit stejný výpočet jako pro inhibovanou reakci. Poměr v_0/v_i byl důležitý pro vynesení závislosti v_0/v_i na koncentraci příslušného inhibitoru.

Pro stanovení IC_{50} byla vynesena závislost poměru neinhibované reakce s inhibovanou na dané koncentraci daného inhibitoru. Z kalibrační křivky byla získána rovnice regrese, ze které bylo možno dopočítat hodnoty IC_{50} .

Do rovnice $y = kx + q$ byla za y dosazena hodnota 2 (dle definice IC_{50}). Vzorový příklad pro stanovení IC_{50} je uveden níže:

$$y = 5964,4x + 0,936$$

$$x = \frac{2 - 0,936}{5964,4}$$

$$x = 1,78 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Příklad znázorňuje výpočet IC_{50} pro rivastigmin. Měření probíhalo UV/Vis spektrometrií s použitím enzymu AChE a substrátu IA. V tabulce 8 je uveden přehled jednotlivých hodnot IC_{50} při daných měřeních.

Tabulka 8: Přehled zprůměrovaných hodnot IC_{50} daných inhibitorů u příslušných měření

označení inhibitoru	měření s využitím indoxylacetátu		měření s využitím acetylthiocholinu
	UV/Vis	Fluorimetricky	Ellmanova metoda
1	$3,79 \cdot 10^{-5}$	$2,77 \cdot 10^{-5}$	$3,50 \cdot 10^{-5}$
2	$1,05 \cdot 10^{-4}$	$3,78 \cdot 10^{-5}$	$1,12 \cdot 10^{-4}$
3	$1,38 \cdot 10^{-4}$	$2,08 \cdot 10^{-5}$	$7,66 \cdot 10^{-5}$
4	$4,41 \cdot 10^{-5}$	$3,25 \cdot 10^{-5}$	$8,40 \cdot 10^{-5}$
5	$8,90 \cdot 10^{-5}$	$2,41 \cdot 10^{-5}$	$6,36 \cdot 10^{-5}$
6	$1,53 \cdot 10^{-5}$	$1,80 \cdot 10^{-5}$	$1,89 \cdot 10^{-5}$
Rivastigmin	$1,46 \cdot 10^{-4}$	$1,57 \cdot 10^{-4}$	$9,13 \cdot 10^{-4}$
Galantamin	$4,24 \cdot 10^{-7}$	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$2,08 \cdot 10^{-6}$

Dále byla vynesena závislost % inhibice na koncentraci daného inhibitoru. Procenta inhibice byla vypočítána pomocí uvedeného vzorce:

$$\% inh = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \cdot 100$$

$$\% inh = \left(1 - \frac{0,006}{0,166}\right) \cdot 100$$

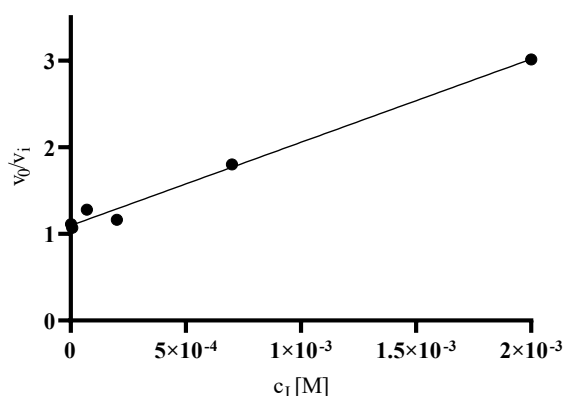
$$\% inh = 96,4 \%$$

Pro rivastigmin měřený UV/Vis spektrometrií (substrát indoxylacetát) byla pro koncentraci tohoto inhibitoru $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ v 15. minutě vypočítána inhibice 96,4 %. Hodnota A_1 odpovídá hodnotě absorbance inhibované reakce A_2 absorbanci neinhibované reakce. Pro daná měření jsou uvedeny příklady níže v jednotlivých kapitolách.

4.3.1 Stanovení IC_{50} s využitím acetylthiocholinu (Ellmanova metoda)

Měření Ellmanovou metodou probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace, při vlnové délce 412 nm po dobu 1 min (každá koncentrace příslušného inhibitoru byla měřena zvlášť). Jako substrát byl použit ATCh o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M a jako enzym AChE o aktivitě 0,2 U ve výsledné reakční směsi.

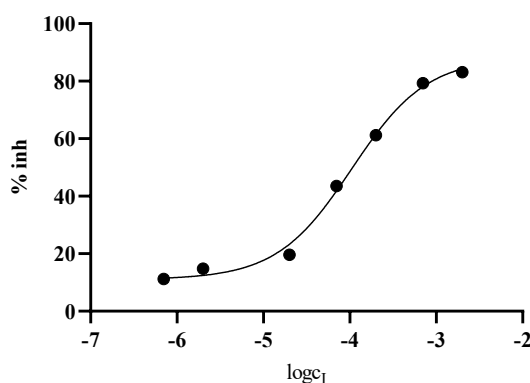
Níže na grafu 13 je znázorněna závislost poměru v_0/v_i na koncentraci příslušného inhibitoru. Jedná se o zprůměrované hodnoty dvou měření s použitím inhibitoru rivastigminu.



Graf 13: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,2 U. (Hodnoty poměru reakčních rychlostí jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Dále byla v programu GraphPad vynesena závislost procentuální inhibice na logaritmu koncentrace inhibitoru.

Jako příklad je níže uvedena závislost pro inhibitor č. 3 (graf 14) v 21. s. Jedná se opět o zprůměrované hodnoty. Pro nejvyšší koncentraci tohoto inhibitoru ($2 \cdot 10^{-3}$ M) byla vypočtena inhibice 83,1 % a pro nejnižší koncentraci ($7 \cdot 10^{-7}$ M) 11,2 %.

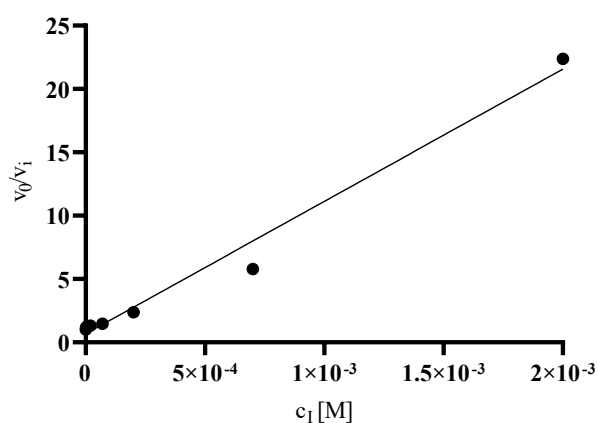


Graf 14: Závislost % inhibice na log c inhibitoru č. 3 ve 21. s. (Hodnoty procent inhibice jsou vyjádřeny jako průměr minimálně ze dvou měření.)

4.3.2 Stanovení IC₅₀ s využitím indoxylacetátu

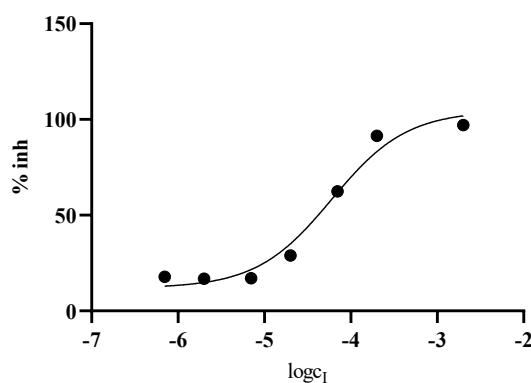
4.3.2.1 UV/Vis spektrometrie

Měření probíhalo při laboratorní teplotě, bez inkubace. Vlnová délka byla nastavena na 670 nm. Celkový čas měření byl 25 minut. Jako substrát byl použit IA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M a enzym AChE o aktivitě 0,6 U ve výsledné reakční směsi. Závislost zprůměrovaných hodnot poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce na koncentraci inhibitoru při použití AChE byla zhotovena v programu GraphPad Prism 8.0.1 (graf 15).



Graf 15: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,6 U. (Hodnoty poměru reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

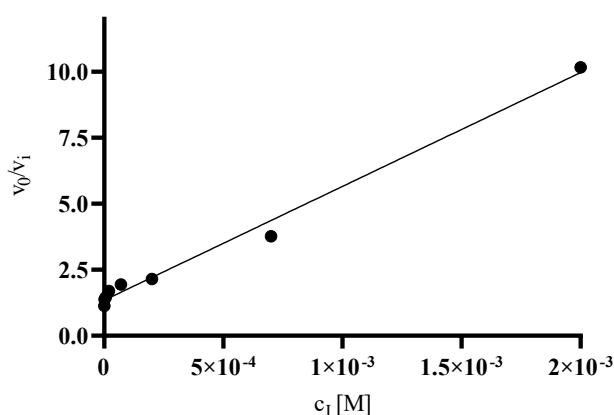
V níže uvedeném grafu 16 je vynesena závislost procentuální inhibice na koncentraci rivastigminu v 20. minutě. Pro nejvyšší koncentraci tohoto inhibitoru ($2 \cdot 10^{-3}$ M) byla vypočtena inhibice 97,0 % a pro nejnižší koncentraci ($7 \cdot 10^{-7}$ M) 17,8 %. Opět se jedná o zprůměrované hodnoty.



Graf 16: Závislost % inhibice na $\log c$ inhibitoru č. 1 ve 20. min. (Hodnoty procent inhibice jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

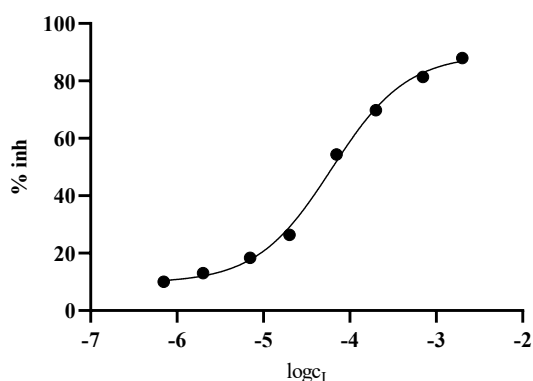
4.3.2.2 Fluorimetrické měření

Fluorimetrické měření probíhalo opět při laboratorní teplotě, bez inkubace. Excitační vlnová délka byla $\lambda = 395$ nm a emisní $\lambda = 470$ nm. Celkový čas měření byl 2 minuty (každá koncentrace příslušného inhibitoru byla měřena zvlášť). Jako substrát byl použit IA o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M a jako enzym AChE o aktivitě 0,1 U ve výsledné reakční směsi. Na níže uvedeném grafu 17 jsou znázorněny zprůměrované hodnoty závislosti poměru v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu.



Graf 17: Závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru rivastigminu při použití enzymu AChE s aktivitou 0,1 U. (Hodnoty poměru reakčních rychlostí jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

V grafu 18 jsou vyneseny zprůměrované hodnoty závislosti procentuální inhibice na koncentraci rivastigminu ve 20 s. Pro nejvyšší koncentraci ($2 \cdot 10^{-3}$ M) byla vypočítána inhibice 88,0 % a pro nejnižší koncentraci ($7 \cdot 10^{-7}$ M) 10,0 %.



Graf 18: Závislost % inhibice na $\log c$ inhibitoru č. 1 ve 20. s. (Hodnoty procent inhibice jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

4.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA

4.4.1 Lipofilita

Jednou z důležitých vlastností látek působících v lidském těle je lipofilita. Jde o fyzikálně-chemickou vlastnost, která ovlivňuje absorpci, distribuci, metabolismus, vylučování a toxicitu (ADME) dané látky. Hraje důležitou roli v permeabilitě léčiv přes buněčnou membránu a ovlivňuje tak i aktivitu léčiva v lidském těle. K dosažení cílové tkáně musí lék projít mnoha bariérami (např. hematoencefalickou). Vyšší lipofilita má za následek delší dobu retence ve tkáních. Lze ji stanovit klasickou metodou s využitím třepací baňky a chromatografickými technikami (Czyrski, 2022; Işık a kol., 2020)

4.4.2 Rozdělovací koeficient

Další důležitou vlastností je rozdělovací koeficient. Popisuje rovnovážné rozdělení molekuly mezi dvě kapalně fáze, které jsou v kontaktu. Běžně je používán jako P (případně PO) a je vztažen k rozdělení neutrálního stavu molekuly. Slouží jako test pro fyzikální výpočetní modely, podle kterých lze předpovědět vlastnosti využívané ve farmacii (např. vazebná afinita protein-ligand). Pro stanovení odhadu lipofility se často používá hodnota log P. Ta je definována jako rozdělovací koeficient neutrálních druhů a používá se jako prediktor vhodných vlastností podobných lékům z hlediska farmakokinetiky a toxicity. Log P není závislý na pH vodné fáze (Işık a kol., 2020).

Zlatým standardem pro stanovení rozdělovacích koeficientů je metoda třepacích baněk. Mezi další přímé metody patří metody založené na dialyzační komoře, micelární elektrokinetická kapilární chromatografie. Nepřímou experimentální metodou je pak odhad log P založený na retenčních časech vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi. Principem měření pro všechny tyto metody je měření log D (rovnovážný distribuční koeficient pro neutrální i ionizované látky) v závislosti na pH. V důsledku toho je pro měření log P nutno uvádět měření log D při pH, kde je analyt zcela neionizovaný. Při pH, u kterého je analyt v neutrálním stavu, platí: $\log P = \log D$ (Işık a kol., 2020).

4.4.3 Lipinského pravidlo

Lipinského pravidlo 5 je přímá metoda pro predikci léčiv ADME a účinnosti hlavně perorálních léků. Lipinski identifikoval, které fyzikálně-chemické vlastnosti jsou u vybraných sloučenin společné (Karami a kol., 2022).

Aby mohla léčiva co nejlépe projít jednotlivými bariérami, měla by splňovat tato kritéria:

- molekulová hmotnost je menší než 500 g/mol,
- log P je menší než 5,
- existuje méně než 5 donorů H-vazby,
- existuje méně než 10 akceptorů H-vazby (Chagas a kol., 2018).

4.4.4 tPSA

Polární povrchová plocha (PSA) je široce využívaný molekulární diskriptor při studiu vlastností u transportu léčiv, jako je intestinální absorpce a penetrace hematoencefalickou bariérou. Jde o součet příspěvků molekulárního povrchu polárních atomů jako je kyslík nebo dusík a jejich připojené vodíky. Výpočet PSA je komplikovaný, neboť se musí spočítat vhodná 3D molekulární geometrie pro každou studovanou molekulu. Tento problém byl překonán po vyvinutí topologické plochy polárního povrchu (tPSA), která se stala důležitou součástí lékařské chemie pro virtuální screening a predikci vlastností ADME včetně tendence dané látky k překročení hematoencefalické bariéry (Chagas a kol., 2018).

Topologická PSA je založena na součtu tabelovaných povrchových příspěvků polárních fragmentů. Díky ní lze zjistit, jakou má daná molekula schopnost vytvářet H-můstky, které hrají důležitou roli při průchodu látky přes BBB. Jednotkou tPSA pro určení propustnosti je Å. Pokud je $\text{Å}^2 \geq 70$ značí, že se jedná o látku se zvýšenou propustností (Prasanna a Doerksen, 2009).

V tabulce 9 jsou uvedeny konkrétní hodnoty jednotlivých inhibitorů. Tyto výpočty byly provedeny pomocí programu ChemDraw Ultra 12.

Tabulka 9: Přehled testovaných inhibitorů s hodnotami log P a tPSA

označení inhibitoru	Mr (g/mol)	ClogP	tPSA (Å ²)
1	300,77	1,76	49,41
2	266,33	0,79	49,41
3	334,33	2,12	49,41
4	280,36	1,29	49,41
5	296,36	0,86	58,64
6	311,33	1,08	101,22
rivastigmin	250,34	1,401	32,78
galantamin	287,36	0,23	41,39

Z tabulky 9 je patrné, že všechny inhibitory mají molekulovou hmotnost menší než 500 g/mol a splňují tak první pravidlo Lipinského. Nejvyšší hodnotu log P má inhibitor č. 3 a proto bude pravděpodobně ze všech stanovovaných inhibitorů procházet hematoencefalickou bariérou a buněčnými membránami nejsnáze. Nejnižší hodnotu log P má galantamin, proto lze předpokládat, že jeho průchod přes BBB bude pomalejší než u inhibitoru č. 3. Inhibitor č. 6 nesplňuje podmínky pro tPSA (maximum této hodnoty má být 70 Å²), z toho důvodu lze předpokládat, že by přes BBB procházel obtížně. Ostatní inhibitory tuto podmínku splňují. Z výše uvedených podmínek dle Lipinského se po srovnání jednotlivých parametrů jako nejvhodnější inhibitor ukazuje inhibitor č. 3.

5 DISKUZE

Nárůst reakční rychlosti je závislý na několika parametrech. Jedním z nich je koncentrace a typ daného substrátu, v případě inhibované reakce pak koncentrace a druh přidávaných inhibitorů. Dalším kritériem je typ a aktivita daného enzymu v reakční směsi. Pro zjištění průběhu reakční rychlosti bylo provedeno několik měření, využívající kombinaci výše uvedených parametrů, ovlivňujících průběh reakce.

5.1 Stanovení reakční rychlosti

Pro porovnání reakční rychlosti byly použity tři metody měření s odlišnými vlnovými délkami. První z nich byla Ellmanova metoda, užívající jako substrát ATCh. U zbylých dvou metod byl použit substrát indoxylacetát.

Se zvyšující se koncentrací obou substrátů (ATCh, IA) docházelo při dané aktivitě enzymu ke zvyšování reakční rychlosti. Se zvyšující se aktivitou enzymu taktéž reakční rychlost úměrně rostla. Nejvyššího nárůstu hodnot rychlosti bylo tedy dosaženo při nejvyšší námi zvolené koncentraci substrátu a aktivitě enzymu. U jednotlivých měření se nárůst reakčních rychlostí mírně odlišoval. U Ellmanovy metody byl tento nárůst patrný od koncentrace $3 \cdot 10^{-5}$ M ATCh. U fluorescenčního měření dochází k nárůstu rychlostí od koncentrace IA $5 \cdot 10^{-5}$ M a u UV/Vis spektrometrie až od koncentrace IA $1 \cdot 10^{-4}$ M.

Příkladem je porovnání nárůstu reakčních rychlostí u Ellmanovy metody (substrát acetylthiocholin) a UV/Vis spektrometrie s využitím indoxylacetátu. Při měření s aktivitou enzymu AChE 0,2 U a při nejvyšší koncentraci substrátů $1 \cdot 10^{-3}$ M byla u Ellmanovy metody naměřena hodnota $0,0312 \text{ s}^{-1}$, zatímco u při použití IA hodnota $0,049 \text{ min}^{-1}$, což je o řád nižší. Z toho vyplývá, že reakční rychlost se substrátem ATCh má rychlejší nárůst v porovnání s UV/Vis spektrometrií využívající IA. Příčinou je použití rozdílného substrátu, kdy substrát IA hydrolyzuje ve srovnání s ATCh pomaleji. Proto u Ellmanovy metody vycházejí hodnoty o řád nižší.

Fluorimetrické měření bylo v porovnání s Ellmanovu metodu citlivější, protože při stejných aktivitách enzymu (a koncentracích substrátu) docházelo k přesahu meze detekce přístroje. Z toho důvodu musely být nakonec zvoleny nižší aktivity enzymu, díky čemuž se šetřilo na dávkovaném objemu enzymu.

UV/Vis spektrometrie je v porovnání s fluorescenčním měřením (v obou případech byl použit IA jako substrát) časově náročnější. Zatímco dostatečná odezva u fluorimetrické metody

byla v řádu sekund, nárůst těchto hodnot byl u UV/Vis spektrometrie v řádu minut. Proto se v tomto případě jeví fluorescenční měření z časového hlediska výhodnější. Mimo to se také jedná o citlivější metodu, protože při nižších aktivitách AChE docházelo k dostatečné odezvě.

5.2 Stanovení kinetických parametrů

Při porovnání V_m a K_m je patrné, že u všech měření dochází se zvyšující se aktivitou enzymu k nárůstu těchto hodnot. Při porovnání kinetických parametrů u Ellmanovy metody s UV/Vis měřením hydrolyzy IA při 670 nm s aktivitou enzymu AChE 0,2 U byla hodnota V_m u Ellmanovy metody (s ATCh) vypočtena na $2,06 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ a hodnota K_m $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. U UV/Vis měření (s IA) vyšla hodnota V_m $6,24 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ a K_m $9,96 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, z čehož vyplývá, že reakce se substrátem ATCh probíhala rychleji, a tudíž hodnoty kinetických parametrů vyšly o řád vyšší. Při srovnání hodnot K_m Ellmanovou metodou s fluorimetrickým měřením (IA) při aktivitě AChE 0,1 U byla u Ellmanovy metody stanovena hodnota K_m $6,73 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a u fluorimetrického měření $1,24 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

5.3 Stanovení reakční rychlosti u inhibované reakce

Pomocí grafů závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu a aktivitě enzymu byly vybrány nejvhodnější koncentrace příslušného substrátu (ATCh, IA) a aktivity enzymu, u kterých stále docházelo k dostatečné odezvě. Kombinací těchto dvou hodnot byla snaha dosáhnout úspory reagentů. Jako enzym byla u všech inhibovaných reakcí zvolena AChE, neboť se jedná o předního zástupně cholinesteras.

Koncentrace inhibitorů byly u všech měření stejné s výjimkou galantaminu, který měl z důvodu vyšší inhibiční účinnosti oproti ostatním inhibitorům koncentrace voleny o řád nižší. Účinnost inhibitorů (např. léčiv) je v praxi stanovována v závislosti na jejich hodnotách IC_{50} . Čím více koncentrovaný inhibitor byl do reakce použit, tím více dochází ke snížení reakční rychlosti. Čím je hodnota IC_{50} nižší, tím je inhibitor účinnější. Podle výsledků uvedených v tab. 8 měl největší inhibiční aktivitu rivastigmin (téměř o řád vyšší než ostatní inhibitory). Inhibitory č. 1–6 měly dle výsledků inhibiční účinnost podobnou. Při jednotlivých měření nebyla odchylka naměřených hodnot pro konkrétní inhibitor výrazně odlišná.

Rhodaninové deriváty jsou heterocyklické sloučeniny, schopné interagovat s různými proteinovými cíli, což poskytuje možnosti pro objevování nových léčiv s různými způsoby účinku. V posledních letech rhodanin spolu s jeho deriváty zaznamenal významný pokrok ve vývoji nových léčivých látek – potenciálně antimikrobiálních a antivirových.

V jedné ze studií Yin spolu s kolegy vyšetřoval účinnost rhodaninu a jeho derivátů. Většina derivátů vykazovala silnou antiproliferační aktivitu a zároveň tyto deriváty neměly žádný negativní vliv na životaschopnost normálních buněk. Kromě toho zjistili, že některé sloučeniny rhodaninu byly stejně účinné nebo i účinnější než podávané léky u léčby rakoviny, jako je etoposid nebo pentamidin. V další studii byl zkoumán antimikrobiální účinek rhodaninu a jeho derivátů. Rhodaninové sloučeniny byly aktivní proti řadě grampozitivních koků. Z toho lze předpokládat, že by v budoucnu mohl být rhodanin nebo jeho deriváty významným léčivem (Chaurasyia a kol., 2023; Yin a kol., 2022; AbdelKhalek a kol., 2016). A jak bylo ukázáno v této diplomové práci, rhodaninové deriváty vykazují i jisté inhibiční účinky vůči cholinesterasám.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat Ellmanovu metodu, využívající substrát acetylthiocholin, s metodami užívajícími substrát indoxylacetát (UV/Vis spektrometrií a fluorimetrickou metodou). Srovnání těchto metod bylo provedeno při stanovení reakčních rychlostí v závislosti na různých koncentracích substrátů (ATCh, IA) a aktivitách enzymů (AChE, BChE). Z naměřených dat byly vypočteny hodnoty V_m a K_m , u kterých docházelo k nárůstu v závislosti na stoupající aktivitě enzymů.

Dále bylo prováněno měření inhibičních účinností nových rhodaninových derivátů vůči cholinesterasám, kdy byly hodnoty IC_{50} získány ze závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce na koncentraci daného inhibitoru.

U všech inhibitorů byla vypočtena hodnota tPSA a rozdělovací koeficient, díky kterým bylo možné určit, jak dobře by tyto látky mohly procházet přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru. Nejvhodnějším inhibitorem se zdál být inhibitor č. 3.

Při porovnání výše uvedených měření se jako nejprínosnější zdála být fluorimetrie, u které docházelo k dostatečné odezvě na rozdíl od Ellmanovy metody a UV/Vis spektrometrie již u nižších aktivit enzymů. Další výhodou této metody je rychlost stanovení, které probíhalo v řádu sekund, u UV/Vis spektrometrie se jednalo o minuty.

ZDROJE

- Abbott, N. J. a kol., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- AbdelKhalek, A. a kol., 2016. In Vitro Antibacterial Activity of Rhodanine Derivatives against Pathogenic Clinical Isolates. *PloS one*, 11(10), e0164227. DOI: 10.1371/journal.pone.0164227.
- Ahmad, A., a kol., 2020. The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases. *Molecular neurobiology*, 57(11), 4373–4393. DOI: 10.1007/s12035-020-02023-z.
- Ahuja, N. K. a kol., 2018. Pyridostigmine for the treatment of gastrointestinal symptoms in systemic sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 48 (1), 111–116. DOI: 10.1016/j.semarthrit.2017.12.007.
- Anand P., Singh B., Singh N., 2012. A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medical Chemistry*, 20(3), 1175–1180. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.12.042.
- Andrade, O. A., Gondal, A. Z., 2022. Physostigmine. *Stat Pearls*. PMID: 31424845.
- Arens, A. M., Kearney, T., 2019. Adverse Effects of Physostigmine. *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*, 15(3), 184–191. DOI: 10.1007/s13181-019-00697-z.
- Ashmawy N. H. a kol., 2019. Novel Carbon/PEDOT/PSS-Based Screen-Printed Biosensors for Acetylcholine Neurotransmitter and Acetylcholinesterase Detection in Human Serum. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(8), 1539. DOI: 10.3390/molecules24081539.
- Atanasova, M., a kol., 2015. Galantamine derivatives with indole moiety: Docking, design, synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(17), 5382–5389. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.07.058.
- Aykul, S., Martinez-Hackert, E., 2016. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry*, 508, 97–103. DOI: 10.1016/j.ab.2016.06.025.
- Barfejani, A. H. a kol., 2020. Donepezil in the treatment of ischemic stroke: Review and future perspective. *Life sciences*, 263, 118575. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118575.

- Bester, S. a kol., 2019. The structural and biochemical impacts of monomerizing human acetylcholinesterase. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(6), 1106–1114. DOI: 10.1002/pro.3625.
- Birks, J. S. & Harvey, R. J., 2018. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *The Cochrane database of systematic reviews*, 6(6), CD001190. DOI: 10.1002/14651858.CD001190.pub3.
- Breijyeh, Z., Karaman, R., 2020. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(24), 5789. DOI: 10.3390/molecules25245789.
- Bubuioc, A. M., 2021. The epidemiology of myasthenia gravis. *Journal of medicine and life*, 14(1), 7–16. DOI: 10.25122/jml-2020-0145.
- Cai, Z. a kol., 2018. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 63(4), 1223–1234. DOI: 10.3233/JAD-180098.
- Colović, M. B. a kol., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315–335. DOI: 10.2174/1570159X11311030006.
- Chagas, C. M., Moss, S., Alisaraie, L., 2018. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. *International journal of pharmaceutics*, 549(1-2), 133–149. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.04.
- Chaurasya, A. a kol., 2023. Rhodanine derivatives: An insight into the synthetic and medicinal perspectives as antimicrobial and antiviral agents. *Chemical biology & drug design*, 101(3), 500–549. DOI: 10.1111/cbdd.14163.
- Cortés-Gómez, M. Á., a kol., 2021. Tau phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β modulates enzyme acetylcholinesterase expression. *Journal of neurochemistry*, 157(6), 2091–2105. DOI: 10.1111/jnc.15189.
- Czyrski A., 2022. The spectrophotometric determination of lipophilicity and dissociation constants of ciprofloxacin and levofloxacin. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 265, 120343. DOI: 10.1016/j.saa.2021.120343.
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7 (1), a020412. DOI: 10.1101/cshperspect.a020412.

- De Boer, D., a kol., 2021. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. *Biomolecules*, 11(4), 580. DOI: 10.3390/biom11040580.
- Delacour, H. a kol., 2016. Butyrylcholinesterase deficiency. Déficit génétique en butyrylcholinestérase. *Annales de biologie clinique*, 74(3), 279–285. DOI: 10.1684/abc.2016.1141.
- Dingova, D. a kol., 2014. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: modifications to the standard Ellman's assay. *Analytical biochemistry*, 462, 67–75. DOI: 10.1016/j.ab.2014.05.031.
- Dundar, Y. a kol., 2019. Novel pyridazinone derivatives as butyrylcholinesterase inhibitors. *Bioorganic chemistry*, 92, 103304. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103304.
- Dvir, H. a kol., 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10–22. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.01.042.
- Eckroat, T. J., Manross, D. L., Cowan, S. C., 2020. Merged Tacrine-Based, Multitarget-Directed Acetylcholinesterase Inhibitors 2015-Present: Synthesis and Biological Activity. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 5965. DOI: 10.3390/ijms21175965.
- Farmakidis, C. a kol., 2018. Treatment of Myasthenia Gravis. *Neurologic clinics*, 36(2), 311–337. DOI: 10.1016/j.ncl.2018.01.011.
- Galimberti, D., Scarpini, E., 2016. Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert opinion on investigational drugs*, 25(10), 1181–1187. DOI: 10.1080/13543784.2016.1216972.
- Guilbault, G. G., Kramer, D. N., 1965. Resofurin butyrate and indoxyl acetate as a fluorogenic substrates for cholinesterase. *Analytical Chemistry*, 37, 120–123. DOI: 10.1021/ac60220a031.
- Huang, L., Li, Z., Guo, L., 2020. Colorimetric assay of acetylcholinesterase inhibitor tacrine based on MoO₂ nanoparticles as peroxidase mimetics. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 224, 117412. DOI: 10.1016/j.saa.2019.117412.
- Işık, M. a kol., 2020. Octanol-water partition coefficient measurements for the SAMPL6 blind prediction challenge. *Journal of computer-aided molecular design*, 34(4), 405–420. DOI: 10.1007/s10822-019-00271-3.

- Islam, M. M., a kol., 2018. Correlation of cholinergic drug induced quenching of acetylcholinesterase bound thioflavin-T fluorescence with their inhibition activity. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 189, 250–257. DOI: 10.1016/j.saa.2017.08.009.
- Jarrott B., 2017. Tacrine: In vivo veritas. *Pharmacological research*, 116, 29–31. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.033.
- Jasiecki, J. a kol., 2021. Butyrylcholinesterase-Protein Interactions in Human Serum. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10662. DOI: doi:10.3390/ijms221910662.
- Jean, L., Brimijoin, S., Vaux, D. J., 2019. In vivo localization of human acetylcholinesterase-derived species in a β -sheet conformation at the core of senile plaques in Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry*, 294(16), 6253–6272. DOI: 10.1074/jbc.RA118.006230.
- Jiang, H., Zhang, X. J., 2008. Acetylcholinesterase and apoptosis. *A novel perspective for an old enzyme. The FEBS journal*, 275(4), 612–617. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06236.x.
- Jnaidi, R., Almeida, A. J., Gonçalves, L. M., 2020. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Smart Drug Delivery Systems in the Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Pharmaceutics*, 12(9), 860. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090860.
- Johnson, G., Moore, S. W., 2006. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current pharmaceutical design*, 12(2), 217–225. DOI: 10.2174/138161206775193127.
- Kandiah, N. a kol., 2017. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clinical interventions in aging*, 12, 697–707. DOI: 10.2147/CIA.S129145.
- Karami, T. K. a kol., 2022. Eyes on Lipinski's Rule of Five: A New "Rule of Thumb" for Physicochemical Design Space of Ophthalmic Drugs. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics: the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 38(1), 43–55. DOI: 10.1089/jop.2021.0069.

- Kaur, R. a kol., 2022. Potential of flavonoids as anti-Alzheimer's agents: bench to bedside. *Environmental science and pollution research international*, 29(18), 26063–26077. DOI: 10.1007/s11356-021-18165-z.
- Kielczewska, U. a kol., 2021. The synthesis and cholinesterase inhibitory activities of solasodine analogues with seven-membered F ring. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 205, 105776. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105776.
- Korabecny, J., Soukup, O., 2021. Cholinesterase Research. *Biomolecules*, 11(8). DOI: 10.3390/biom11081121.
- Kovacs G. G., 2019. Molecular pathology of neurodegenerative diseases: principles and practice. *Journal of clinical pathology*, 72(11), 725–735. DOI: 10.1136/jclinpath-2019-205952.
- Lane, C. A., Hardy, J., Schott, J. M., 2018. Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59–70. DOI:10.1111/ene.13439.
- Lazaridis, K., Tzartos, S. J., 2020. Autoantibody Specificities in Myasthenia Gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in immunology*, 11, 212. DOI:10.3389/fimmu.2020.00212.
- Li, S. a kol., 2021. Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition. *SLAS discovery: advancing life sciences R & D*, 26(10), 1355–1364. DOI: 10.1177/24725552211030897.
- Li, S. a kol., 2022. Acetylcholinesterase Inhibition Assays for High-Throughput Screening. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2474, 47–58. DOI: 10.1007/978-1-0716-2213-1_6.
- Li, Q. a kol., 2018. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 158, 463–477. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.09.031.
- Li, Q., Yang, H., Chen, Y., & Sun, H., 2017. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 132, 294–309. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.062.

- Liu, H., Ye, W., & Chen, H. F., 2017. Positive cooperative regulation of double binding sites for human acetylcholinesterase. *Chemical biology & drug design*, 89(5), 694–704. DOI: 10.1111/cbdd.12891.
- Liu, P. P., a kol., 2019. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 4, 29. DOI:10.1038/s41392-019-0063-8.
- Lopez, J. A. S., González, H. M., Léger, G. C., 2019. Alzheimer's disease. *Handbook of clinical neurology*, 167, 231–255. DOI: 10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3.
- Malabaey, M. a kol., 2019. Pyridostigmine Suicidal Attempt in a Myasthenia Gravis Patient. *The American journal of case reports*, 20, 1418–1421. DOI: 10.12659/AJCR.917308.
- Marucci, G. A kol., 2021. Efficacy of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Neuropharmacology*, 190, 108352. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108352.
- Mucke H. A., 2015. The case of galantamine: repurposing and late blooming of a cholinergic drug. *Future science OA*, 1(4), FSO73. DOI: 10.4155/fso.15.73.
- Müllges, W., Stoll, G., 2019. Myasthenia gravis [Myasthenia gravis]. *Der Nervenarzt*, 90(10), 1055–1066. DOI: 10.1007/s00115-019-00798-8.
- Neely, G. A., Sabir, S., & Kohli, A., 2021. Neostigmine. *Stat Pearls*. PMID: 29261883.
- Ngamelue, M. N. a kol., 2007. Crystallization and X-ray structure of full-length recombinant human butyrylcholinesterase. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 63(Pt 9), 723–727. DOI: 10.1107/S1744309107037335.
- Peragallo J. H., 2017. Pediatric Myasthenia Gravis. *Seminars in pediatric neurology*, 24(2), 116–121. DOI: 10.1016/j.spen.2017.04.003.
- Perkovic, M. N., Pivac, N., 2019. Genetic Markers of Alzheimer's Disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 1192, 27–52. DOI: 10.1007/978-981-32-9721-0_3.
- Pérez-Sánchez, H., a kol., 2021. Combined Structure and Ligand-Based Design of Selective Acetylcholinesterase Inhibitors. *Journal of chemical information and modeling*, 61(1), 467–480. DOI: 10.1021/acs.jcim.0c00463.
- Pohanka, M. a kol., 2011. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *International journal of molecular sciences*, 12(4), 2631–2640. DOI: doi:10.3390/ijms12042631.

- Pohanka, M., Zakova, J., 2021. A Smartphone Camera Colorimetric Assay of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 21(5), 1796. DOI: 10.3390/s21051796.
- Prasanna, S., Doerksen, R. J., 2009. Topological polar surface area: a useful descriptor in 2D-QSAR. *Current medicinal chemistry*, 16(1), 21–41. DOI: 10.2174/092986709787002817.
- Przybyłowska, M. a kol., 2019. Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues. *Current neuropharmacology*, 17(5), 472–490. DOI: 10.2174/1570159X16666180412091908.
- Przybyłowska, M. a kol., 2021. Therapeutic Potential of Multifunctional Derivatives of Cholinesterase Inhibitors. *Current neuropharmacology*, 19(8), 1323–1344. DOI: 10.2174/1570159X19666201218103434.
- Robinson, J. L. a kol., 2018. Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain: a journal of neurology*, 141(7), 2181–2193. DOI: 10.1093/brain/awy146.
- Rotundo R. L., 2017. Biogenesis, assembly and trafficking of acetylcholinesterase. *Journal of neurochemistry*, 142 Suppl 2(Suppl 2), 52–58. DOI: 10.1111/jnc.13982.
- Sanders, D. B. a kol., 2016. International consensus guidance for management of myasthenia gravis: Executive summary. *Neurology*, 87(4), 419–425. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002790.
- Sharma K., 2019. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479–1487. DOI: 10.3892/mmr.2019.10374.
- Shetab-Boushehri S. V., 2018. Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterases activities. *EXCLI journal*, 17, 798–799. DOI: 10.17179/excli2018-1536.
- Shigeta, M., Homma, A., 2001. Donepezil for Alzheimer's disease: pharmacodynamic, pharmacokinetic, and clinical profiles. *CNS drug reviews*, 7(4), 353–368. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2001.tb00204.x.
- Shinagawa, S., Shigeta, M., 2014. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo*, 66(5), 507–516. PMID: 24807367.
- Silman, I., Sussman, J. L., 2008. Acetylcholinesterase: how is structure related to function?. *Chemico-biological interactions*, 175(1-3), 3–10. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.035.

- Stephenson, J., a kol., 2018. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, 154(2), 204–219. DOI: 10.1111/imm.12922.
- Suresh, S. N., a kol., 2020. Pharmacological Tools to Modulate Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Journal of molecular biology*, 432(8), 2822–2842. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.02.023.
- Talesa V. N., 2001. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of ageing and development*, 122(16), 1961–1969. DOI:10.1016/s0047-6374(01)00309-8.
- Thapa, S., Lv, M., Xu, H., 2017. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(17), 1665–1676. DOI:10.2174/1389557517666170120153930.
- Vorčáková, K. a kol., 2018. Synthesis and characterization of new inhibitors of cholinesterases based on N-phenylcarbamates: In vitro study of inhibitory effect, type of inhibition, lipophilicity and molecular docking. *Bioorganic chemistry*, 78, 280–289. DOI: doi:10.1016/j.bioorg.2018.03.012.
- Walczak-Nowicka, Ł. J., Herbet, M., 2021. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(17), 9290. DOI: 10.3390/ijms22179290.
- Xia, N., Wang, Q., Liu, L., 2014. Nanomaterials-based optical techniques for the detection of acetylcholinesterase and pesticides. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 15(1), 499–514. DOI: doi:10.3390/s150100499.
- Xiao, T. a kol., 2021. A thiamine-triggered fluorometric assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening based on oxidase-like activity of MnO₂ nanosheets. *Talanta*, 221, 121362. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121362.
- Yamazaki, D. a kol., 2021. Novel arylcarbamate-N-acylhydrazones derivatives as promising BuChE inhibitors: Design, synthesis, molecular modeling and biological evaluation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 32, 115991. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115991.
- Yang, G. a kol., 2013. Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PloS one*, 8(9), e74916. DOI: 10.1371/journal.pone.0074916.

Yin, L. J. a kol., 2022. Review of anticancer potentials and structure-activity relationships (SAR) of rhodanine derivatives. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 145, 112406. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112406.

Zeman, J. a kol., 2018. Metody imobilizace enzymů a jejich využití pro optickou (kolorimetrickou) detekci inhibitorů cholinesteras. *Chem. listy*, 112, 434–439.

Zhang, H. a kol., 2022. Recent advance on carbamate-based cholinesterase inhibitors as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease. *European journal of medicinal chemistry*, 240, 114606. DOI: 10.1016/j.ejmech.2022.114606.

Zia, M. a kol., 2022. Synthesis, structure and acetylcholinesterase inhibition activity of new diarylpyrazoles. *Bioorganic chemistry*, 121, 105658. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.105658.