

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Inhibice vybraných enzymů hrajících roli v rozvoji neurodegenerativních
onemocnění

Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Inhibition of selected enzymes playing a role in the progression of
neurodegenerative diseases

Diploma thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Daniela Zachrdlová**
Osobní číslo: **C22385**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Inhibice vybraných enzymů hrajících roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění**
Téma práce anglicky: **Inhibition of Selected Enzymes Playing a Role in the Progression of Neurodegenerative Diseases**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se funkce, struktury a mechanismu působení enzymů, které mohou hrát roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění, zaměřit se především na cholinesterázy, prolyloligopeptidázu a monoaminoxidázu.
2. Shmout význam změněné aktivity daných enzymů pro rozvoj neurodegenerativních onemocnění se zaměřením především na Alzheimerovu chorobu.
3. Popsat možnosti využití inhibitorů daných enzymů.
4. Uvést stručný přehled analytických metod využívaných ke stanovení aktivity a inhibice těchto enzymů.

Experimentální část:

1. Zavedení metody stanovení aktivity prolyloligopeptidázy – testovat různé reakční podmínky s cílem vybrat vhodné podmínky pro měření aktivity a inhibice prolyloligopeptidázy.
2. Za vhodných reakčních podmínek stanovit inhibiční účinnosti vybraných sloučenin vůči prolyloligopeptidáze a porovnat je se standardem.
3. Inhibiční účinnost studovaných inhibitorů ověřit u cholinesteráz a monoaminoxidázy.
4. Zhodnotit schopnost studovaných inhibitorů přestupovat biologické membrány (především na základě hodnoty rozdělovacího koeficientu).

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

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

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

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

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

LS.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Inhibice vybraných enzymů hrajících roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění 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 7. 5. 2024

Bc. Daniela Zachrdlová v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, laskavý přístup a čas, který mi věnovala a také za cenné rady, které mi poskytla. Velké poděkování patří také mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá problematikou inhibice vybraných enzymů hrajících roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění. Na začátku teoretické části jsou popsány testované enzymy. Další část obsahuje některé metody stanovení enzymů. Poslední část je zaměřena na příčinu vzniku, diagnostiku a terapii Alzheimerovy choroby. Experimentální část se věnuje inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám za použití acetylthiocholinu a butyrylthiocholinu jako substrátu. Dále se zabývá optimalizací podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolylloleptidasy a zároveň i stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči tomuto enzymu. Poslední část se zabývá stanovením inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alzheimerova choroba, Ellmanova metoda, Acetylcholinesterasa, Butyrylcholinesterasa, Prolylloleptidasa, Monoaminoxidasa

TITLE

Inhibition of selected enzymes playing a role in the progression of neurodegenerative diseases

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the issue of inhibition of selected enzymes playing a role in the progression of neurodegenerative diseases. At the beginning of the theoretical part, the tested enzymes are described. The next part contains some methods for determining enzymes. The last part is focused on the cause, diagnosis and therapy of Alzheimer's disease. The experimental part is devoted to the inhibitory efficiency of the studied inhibitors and the used standards towards cholinesterases using acetylthiocholine and butyrylthiocholine as a substrate. It also deals with the optimization of the conditions for determining the activity and inhibition of prolylloleptidase, as well as determining the inhibitory efficiency of the studied inhibitors against this enzyme. The last part deals with determining the inhibitory efficiency of the studied inhibitors against monoamine oxidase.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, Ellman's method, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, Prolylloleptidase, Monoamine oxidase

SEZNAM ZKRATEK

Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APOE ϵ 4	apolipoprotein ϵ 4
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesterasa
BTCh	butyrylthiocholin
CAS	katalytické aktivní místo (catalytic active site)
DTNB	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
eeAChE	acetylcholinesterasa z paúhoře elektrického (electric eel AChE)
FAD	flavinadenindinukleotid
hAChE	lidská acetylcholinesterasa (human AChE)
MAO A	monoaminoxidasa A
MAO B	monoaminoxidasa B
MAO	monoaminoxidasa
NMDA	N-methyl D-aspartát
PAS	periferní aniontové místo (peripheral anion site)
POP	prolyloligopeptidasa
PSA	polární plocha povrchu (polar surface area)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
tPSA	topologická polární povrchová plocha (topological polar surface area)

Seznam obrázků

Obrázek 1: Katalytická podjednotka AChE s ukotveným ACh	17
Obrázek 2: Enzymatická hydrolýza ACh působením AChE.....	18
Obrázek 3: Metabolismus ACh pomocí AChE.....	18
Obrázek 4: Tetramerní lidská BChE.....	20
Obrázek 5: Struktura POP.....	22
Obrázek 6: Struktura monoaminooxidasy	24
Obrázek 7: Princip Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE.....	26
Obrázek 8: MRI – skenování pacienta s AD a kontroly	33
Obrázek 9: PET u zdravého pacienta a u pacienta s AD	33
Obrázek 10: Strukturní vzorce studovaných inhibitorů enzymů	40

Seznam grafů

Graf 1: Závislost procent inhibice na logaritmu koncentrace inhibitoru 4 při inhibici BChE..	51
Graf 2: Lineweaver-Burkův výnos pro inhibitor 4 inhibující BChE	53
Graf 3: Závislost směrnice (Lineweaver-Burkův výnos) vs. koncentrace inhibitoru 4 inhibujícího BChE – stanovení inhibiční konstanty K_i	55
Graf 4: Závislosti poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce na koncentraci inhibitoru číslo 2.....	57
Graf 5: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a aktivitě enzymu v reakční směsi při teplotě 25 °C.....	58
Graf 6: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a aktivitě enzymu v reakční směsi při teplotě 37 °C.....	59
Graf 7: Orientační stanovení kinetických parametrů prolylologopeptidázy při koncentraci substrátu 0,25 mM a aktivitě POP 1,1 U (teplota 37 °C).....	60

Seznam tabulek

Tabulka 1: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici eeAChE a BChE (Ellmanova metoda).....	52
Tabulka 2: Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m pro inhibitor 4 inhibující BChE.....	54
Tabulka 3: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici hAChE (fluorescenční metoda)	56
Tabulka 4: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici eeAChE (fluorescenční metoda)	57
Tabulka 5: Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m POP	60
Tabulka 6: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standard při inhibici POP.....	61
Tabulka 7: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardu při inhibici MAO.....	62
Tabulka 8: Hodnoty rozdělovacího koeficientu a topologické polární povrchové plochy studovaných inhibitorů	63

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Cholinesterasy.....	16
1.1.1 Acetylcholinesterasa.....	16
1.1.1.1 Formy acetylcholinesterasy	16
1.1.1.2 Struktura acetylcholinesterasy	17
1.1.1.3 Funkce acetylcholinesterasy	18
1.1.2 Butyrylcholinesterasa	19
1.1.2.1 Formy butyrylcholinesterasy	19
1.1.2.2 Struktura butyrylcholinesterasy	19
1.1.2.3 Funkce butyrylcholinesterasy	20
1.2 Prolyloligopeptidasa	21
1.2.1 Struktura prolyloligopeptidasy	21
1.2.2 Funkce prolyloligopeptidasy	22
1.3 Monoaminoxidasa.....	23
1.3.1 Formy monoaminoxidasy.....	23
1.3.2 Struktura monoaminoxidasy.....	23
1.3.3 Funkce monoaminoxidasy.....	24
1.4 Detekční metody enzymů	25
1.4.1 Spektrofotometrické metody	25
1.4.1.1 Ellmanova metoda	25
1.4.1.2 Fluorimetrické metody.....	26
1.4.2 Radioizotopické metody	27
1.4.3 Biosenzory	27
1.5 Neurodegenerativní onemocnění	28
1.5.1 Alzheimerova choroba.....	28

1.5.1.1	Epidemiologie.....	28
1.5.1.2	Příčina vzniku	29
1.5.1.3	Rizikové faktory	30
1.5.1.4	Diagnostika	31
1.5.1.5	Terapie	34
2	Cíl práce.....	37
3	Experimentální část	38
3.1	Použité chemikálie a roztoky	38
3.2	Použité přístroje a pomůcky	40
3.3	Stanovení aktivity eeAChE a BChE	41
3.4	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám.....	42
3.4.1	Ellmanova metoda	42
3.4.1.1	Stanovení IC_{50}	42
3.4.1.2	Určení typu inhibice nejúčinnějšího inhibitoru a stanovení kinetických parametrů K_M , V_m	43
3.4.1.3	Stanovení inhibiční konstanty K_i	44
3.4.2	Fluorescenční metoda	44
3.4.2.1	Stanovení za použití hAChE.....	45
3.4.2.2	Stanovení za použití eeAChE	46
3.5	Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy	47
3.5.1	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči prolyloligopeptidase	47
3.6	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase B.....	49
4	VÝSLEDKY	51

4.1	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám.....	51
4.1.1	Ellmanova metoda.....	51
4.1.1.1	Stanovení IC_{50}	51
4.1.1.2	Určení typu inhibice nejúčinnějšího inhibitoru a stanovení kinetických parametrů K_M , V_m	52
4.1.1.3	Stanovení inhibiční konstanty K_i	54
4.1.2	Stanovení IC_{50} (Fluorescenční metoda).....	55
4.2	Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy	57
4.2.1	Stanovení kinetických parametrů K_M a V_m prolyloligopeptidasy	59
4.2.2	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči prolyloligopeptidase	60
4.3	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase B.....	61
4.4	Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA.....	62
5	DISKUZE	64
5.1	Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči cholinesterasám.....	64
5.2	Stanovení typu inhibice	65
5.3	Stanovení inhibiční konstanty K_i	65
5.4	Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy	65
5.5	Stanovení inhibiční účinnosti monoaminoxidasy.....	66
5.6	Rozdělovací koeficient a tPSA	66
6	ZÁVĚR.....	68
	ZDROJE	69

ÚVOD

Neurodegenerativní onemocnění jsou celosvětově velmi rozšířená multifaktoriální onemocnění. Jedná se o hlavní příčinu invalidity a předčasného úmrtí zejména starších osob po celém světě. Pro neurodegenerativní onemocnění je charakteristická ztráta struktury a funkce nervového systému. Počet těchto onemocnění neustále narůstá ve spojitosti s rostoucí průměrnou délkou života. Dnes je demencí postiženo přes 50 milionů lidí a předpokládá se, že do roku 2050 vzroste toto číslo na 130 milionů. (HANSSON, 2021; SURESH a kol., 2020)

Mezi neurodegenerativní onemocnění se řadí například Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba či amyotrofická laterální skleróza, avšak nejběžnějším typem demence je Alzheimerova choroba. Charakteristickým znakem tohoto onemocnění je výskyt neuritických plaků, vzniklých akumulací nerozpustného A β proteinu, a neurofibrilárních klubek, jež vznikají agregací hyperfosforylovaného tau proteinu. (BREIJYEH A KARAMAN, 2020; SURESH a kol., 2020)

Na tyto choroby zatím neexistuje lék, je však k dispozici symptomatická léčba umožňující alespoň zmírnění progresu onemocnění. Tato léčba spočívá zejména v inhibici enzymů podílejících se na vzniku onemocnění. Mezi léky na Alzheimerovu chorobu se konkrétně řadí inhibitory cholinesteras (donepezil, galantamin, rivastigmin) a parciální antagonistu N-methyl D-aspartátu (NMDA) zvaný memantin. (BREIJYEH A KARAMAN, 2020)

Významnou roli v rozvoji Alzheimerovy choroby hraje acetylcholinesterasa. Tento enzym katalyzuje hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholinu, čímž dochází k ukončení neurotransmise a obnově cholinergního neuronu. U Alzheimerovy choroby dochází ke snížení hladiny acetylcholinu v oblastech mozku zprostředkávající paměť a učení. Inhibicí acetylcholinesterasy se zabrání hydrolýze acetylcholinu, čímž se zvýší jeho koncentrace v synaptické štěrbině. Proto jsou inhibitory tohoto enzymu první volbou při léčbě Alzheimerovy choroby. (DE BOER a kol., 2021)

Butyrylcholinesterasa, též označována jako pseudocholinesterasa, hydrolyzuje acetylcholin stejně jako acetylcholinesterasa. Předpokládá se, že se tento enzym vyvinul z acetylcholinesterasy jako obecný detoxifikátor se zachovanou funkcí v procesu neurotransmise. Jedná se o další cílový enzym pro inhibitory cholinesteras, díky kterým se zvyšuje dostupnost neurotransmiterů na synapsích v mozku a jsou tak využívány pro léčbu Alzheimerovy choroby. (DE BOER a kol., 2021; JASIECKI a kol., 2021)

Prolyloligopeptidasa je serinová proteasa hydrolyzující peptidy, které jsou menší než 30 aminokyselin. Podílí se na regulaci oxidačního stresu, agregaci proteinů a zánětu. Inhibice tohoto enzymu by tedy mohla být významná v terapii neurodegenerativních onemocnění, včetně Alzheimerovy choroby. (TOPPILA a kol., 2023)

Monoaminoxidasy jsou flavoproteiny na vnější straně mitochondriální membrány. Podílí se na metabolismu monoaminových neurotransmiterů a dalších aminů. Zvýšené hladiny enzymu jsou spojovány s neurodegenerativními stavy jako je Alzheimerova choroba a inhibice tohoto enzymu by tak měla potencionálně zdržet progresi onemocnění. (BEHL a kol., 2021)

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cholinesterasy

Cholinesterasy jsou serinové hydrolázy rozkládající estery cholinu. Mají významnou roli jak v periferním, tak v centrálním nervovém systému. Kromě charakteristického cholinergního přenosu se podílí také na buněčné proliferaci, diferenciaci, reakcích na inzulty jako je stres a tvorbě amyloidu. Jsou také významnými biochemickými markery některých patologií jako je například Alzheimerova choroba (AD). U obratlovců se vyskytují dvě formy, kódované dvěma různými geny, a to acetylcholinesterasa a butyrylcholinesterasa. (KORABECNY A SOUKUP, 2021; TALESA, 2001)

1.1.1 Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (AChE), též známá jako skutečná cholinesterasa, se nachází ve svalech, nervových a hematopoetických buňkách. Ve starších zdrojích je AChE označována jako krevní cholinesterasa, její aktivita je totiž lokalizována také na povrchu erytrocytů. Díky rychlosti své katalýzy se jedná o jeden z nejučinnějších enzymů. Inhibitory AChE našly využití v léčbě neuromuskulárních poruch a jsou jedním z hlavních léčiv používaných k léčbě AD. (DE BOER a kol., 2021; DVIR a kol., 2010; POHANKA, 2013)

1.1.1.1 Formy acetylcholinesterasy

Formy AChE jsou glykoproteiny syntetizované na hrubém endoplazmatickém retikulu, kde dochází ke kotranslační glykosylaci. Dojde k připojení tří až čtyř asparaginem vázaných oligosacharidů k prodlužujícímu se polypeptidovému řetězci. Po složení, sestavení a kontrole kvality přechází do Golgiho aparátu k dalšímu zpracování. Následně jsou oligomerní formy AChE zabaleny a transportovány do dané povrchové domény buňky. AChE je vysoce glykosylovaný protein, což nejspíš způsobuje připojení tkáňově specifické značky na jinak identické molekuly. (ROTUNDO, 2017; TALESA, 2001)

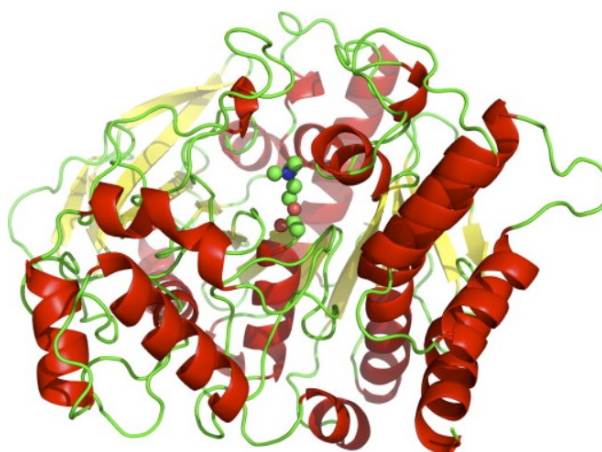
Enzymové formy mají podobné katalytické aktivity, jejich odlišnost spočívá zejména v hydrodynamických parametrech a iontových nebo hydrofobních interakcích. Molekulární formy AChE dělíme na asymetrické a globulární formy. Asymetrické formy obsahují jednu (A4), dvě (A8) nebo tři (A12) katalytické podjednotky tetrameru, které jsou připojeny ke kolagenovému ocasu, díky kterému jsou ukotveny k bazální lamině v synaptické štěrbině a přednostně se tak tedy vyskytují na neuromuskulárním spojení. Globulární formy se vyskytují jako katalytické monomery (G1), dimery (G2) a tetamery (G4). Ve speciálních případech bývají vylučovány v rozpustné formě, převážně jsou však ukotveny k membráně. Mezi typy

vazeb k buněčným membránám se řadí vazba hydrofobním peptidem, která se přednostně nachází v centrálním nervovém systému, dalším typem vazby je glykolipidová kotva nacházející se v nervech, svalech a hematopoetických buňkách. (ROTUNDO, 2017; SILMAN, 2021; TALESÁ, 2001)

1.1.1.2 Struktura acetylcholinesterasy

Znalost 3D struktury AChE je nutná pro pochopení katalytické účinnosti enzymu. Díky znalosti struktury enzymu bylo možné navrhnout léčiva a terapeutické přístupy k léčbě AD, případně k léčbě intoxikace organofosfátovými jedy. (DVIR a kol. 2010)

Molekula AChE má elipsoidní tvar, skládá se z 537 aminokyselin a degraduje až 25 000 molekul acetylcholinu (ACh) za sekundu. Monomerní forma tohoto enzymu se skládá z dvanácti β skládaných listů obklopených čtrnácti α helixy (obrázek 1). Jsou známé tři základní části, a to katalytické aktivní místo (CAS), periferní aniontové místo (PAS) a úzká čtrnácti aromatickými zbytky lemovaná prohlubeň vedoucí dovnitř enzymu. CAS se nachází uvnitř enzymu a dochází v něm k hydrolytické reakci. PAS se nachází vně enzymu a slouží jako vazebné místo s nízkou afinitou ke koncentraci ACh u vstupu do prohlubně. Oblast prohlubně spojuje CAS a PAS s vnějškem enzymu. (ECKROAT a kol., 2020; LI a kol., 2018; WALCZAK-NOWICKA A HERBERT, 2021)



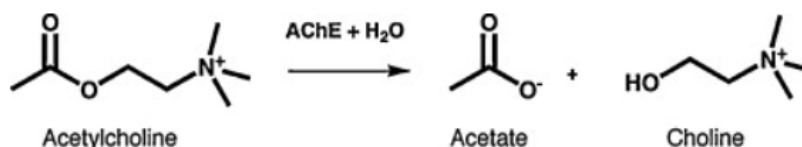
Obrázek 1: Katalytická podjednotka AChE s ukotveným ACh (SILMAN A SUSSMAN, 2008)

CAS se nachází 20 Å hluboko na dně prohlubně a směrem k základně enzymu se rozšiřuje. Tvoří jej zbytky Ser203, His447, Glu334 neboli takzvaná „katalytická triáda“ nacházející se v oblasti esteratického místa. Dalším místem CAS je periferní aniontové místo obsahující aromatické zbytky Trp86, Tyr133, Tyr337, Phe338, které mají dominantní roli ve stabilizaci a adaptaci substrátů. Dále obsahuje aniontové místo oxyaniontovou jamku obsahující zbytky

Gly121, Gly122 a Ala204 ke stabilizaci záporně nabitého přechodného stavu a acylovou kapsu, která využívá zbytky Phe295 a Phe297 ke kontrole specifity substrátu. PAS na vnější straně enzymu se skládá z aromatických zbytků Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286, Tyr341. (ECKROAT a kol., 2020; LI a kol., 2018)

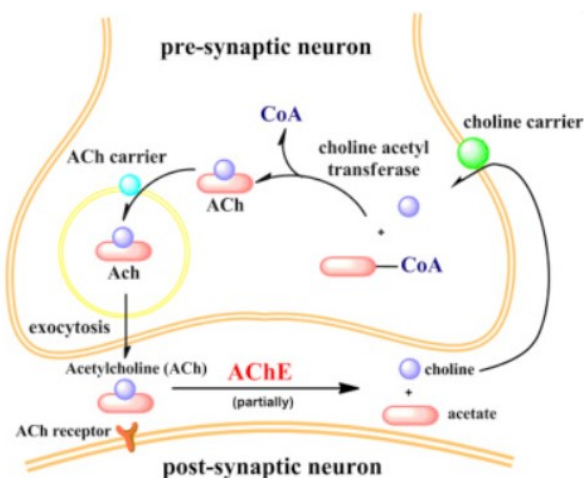
1.1.1.3 Funkce acetylcholinesterasy

Funkce AChE v organismu je velmi dobře známá, enzym je součástí takzvaného cholinergního systému, který je založen na cholinergní neurotransmisi. AChE má svůj fyziologický substrát, neurotransmitter ACh, který je enzymem štěpen na cholin a acetát (obrázek 2). Tímto rozštěpením substrátu dochází k ukončení neurotransmise. (POHANKA, 2013)



Obrázek 2: Enzymatická hydrolyza ACh působením AChE (DVIR a kol., 2010)

Principem cholinergního systému je tedy již zmíněná hydrolyza ACh pomocí AChE na cholin a acetát probíhající v synaptické šterbině. Cholin se následně dostává zpět do presynaptického neuronu pomocí nosiče cholinu. Dochází k resyntéze ACh spojením cholinu s komplexem acetátu a koenzymu A (acetyl-CoA). Reakce je katalyzována cholinacetyltrasferasou za současného uvolnění jedné molekuly koenzymu A. Vzniklý ACh prostupuje do vezikuly a exocytózou vytéká do synaptické šterbiny, aby mohl začít nový cyklus (obrázek 3). (LI a kol., 2018)



Obrázek 3: Metabolismus ACh pomocí AChE (LI a kol., 2018)

Přestože primární funkcí AChE je ukončení neurotransmise, má enzym významný podíl také na diferenciaci embryonálních kmenových buněk, neuritogenezi, buněčné adhezi, synaptogenezi, aktivaci dopaminových neuronů, sestavování amyloidních β -vláken, hematopoéze a trombopoéze. Důležitou roli hraje enzym v patogenezi neurodegenerativních onemocnění. Dochází k zánětům, zvýšení oxidačního stresu a buněčné apoptóze, kdy buňky exprimující AChE podléhají apoptóze snadněji. Pokud je tedy AChE inhibována dochází také k inhibici apoptózy. (KORABECNY A SOUKUP, 2021; WALCZAK-NOWICKA A HERBERT, 2021)

1.1.2 Butyrylcholinesterasa

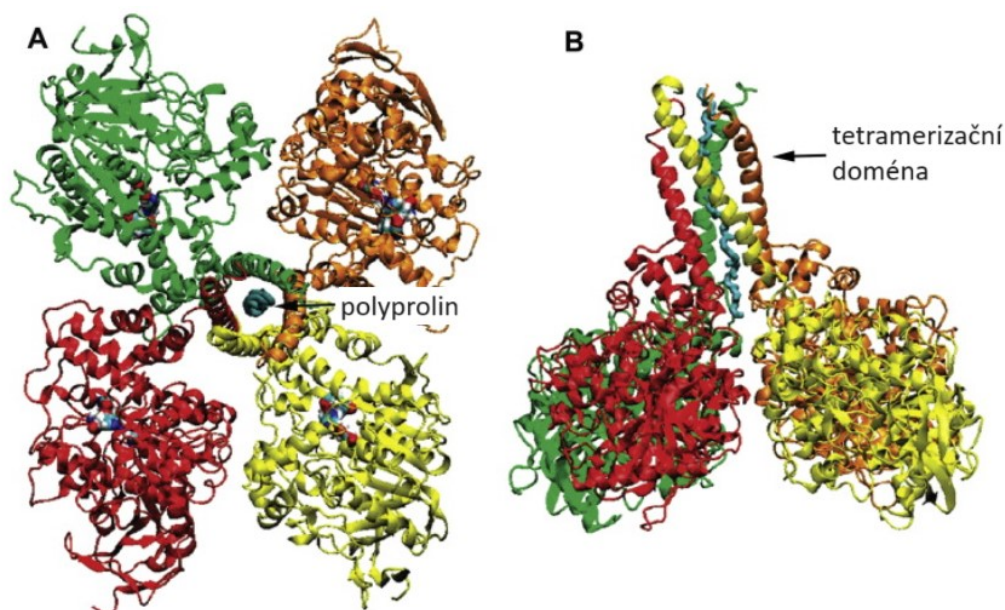
Butyrylcholinesterasa (BChE), též známá jako plazmatická cholinesterasa nebo pseudocholinesterasa, se nachází skoro ve všech tkáních těla. Předpokládá se, že se tento enzym vyvinul z AChE jako obecný detoxifikátor se zachovanou funkcí v procesu neurotransmise. Nejvyšší hladiny BChE nalezneme zejména v játrech, odkud je enzym uvolňován do krevní plazmy. Byl však nalezen také v amyloidních placích a neurofibrilárních klubkách, což naznačuje, že se může podílet na patogenezi AD. K acetylcholinu má nižší afinitu než AChE. Poločas rozpadu BChE je 12 dní. (DE BOER a kol., 2021; JASIECKI a kol., 2021; SANTARPIA a kol., 2013)

1.1.2.1 Formy butyrylcholinesterasy

BChE se v lidské plazmě nachází ve čtyřech molekulárních formách a to G1 (monomer), G1-ALB (monomer navázaný na albumin), G2 (dimer) a nejčastěji se vyskytující formě G4 (tetramer). (BONO a kol., 2015)

1.1.2.2 Struktura butyrylcholinesterasy

Struktura BChE se velmi podobá struktuře AChE. Bylo zjištěno, že v sekvenci těchto enzymů je až 53,8% identita. Nejčastěji se vyskytující forma BChE, tedy tetramer, se skládá ze čtyř podjednotek, kdy je každá podjednotka složena z 574 aminokyselin a devíti sacharidů, které jsou spojeny s devíti asparaginovými zbytky. Hmotnost každé podjednotky je 85 kDa. Za spojení podjednotek do tetrameru odpovídá interakce tetramerizační domény, což je spojení šroubovic tvořených čtyřiceti aminokyselinami na C-konci každé podjednotky, s polyprolinovým peptidem, který je ve středu svazku šroubovic vázán vodíkovou vazbou (obrázek 4). (LOCKRIDGE, 2015; POHANKA, 2013)



Obrázek 4: Tetramerní lidská BChE. A) Pohled shora na tetramer BChE s polyprolinem uprostřed, B) Boční pohled na tetramer BChE (převzato a upraveno z LOCKRIDGE, 2015)

Samotná struktura BChE se skládá ze tří základních částí, stejných jako u AChE, z PAS nacházejícího se na povrchu enzymu, úzké osmi aromatickými zbytky lemované prohlubně vedoucí dovnitř enzymu a CAS na dně aromatické prohlubně. Rozdíl v konformačních změnách prohlubně BChE oproti AChE je důvodem, proč BChE může štěpit velké množství esterů s vysokou rychlostí obratu, zatímco AChE je specifická pouze pro ACh. (Li a kol. 2017; POHANKA, 2013)

1.1.2.3 Funkce butyrylcholinesterasy

Přesná funkce BChE zůstává nejasná, na rozdíl od AChE nemá tento enzym svůj fyziologický substrát. Je však zřejmé, že dokáže hydrolyzovat ACh a další látky a léčiva (např. succinylcholin, kokain, heroin). BChE je také významným obráncem proti toxickým sloučeninám (např. organofosfáty, pesticidy), které by po vstupu do krve mohly inhibovat aktivitu AChE. BChE tyto látky nevratně váže ještě před vazbou na AChE, a brání tak projevu toxického účinku na nervovém systému. Jelikož je uvolňována z jater, může BChE sloužit jako biochemický marker v jaterním funkčním testu. BChE má také významnou roli v diagnostice diabetu, urémie či hypertyreózy. (JASIECKI a kol., 2021; POHANKA, 2013; POHANKA A ZAKOVA, 2021; SANTARPIA a kol., 2013)

Významná je však BChE jako cílový enzym pro inhibitory cholinesteras, které zvyšují dostupnost neurotransmiterů na synapsích v mozku a jsou tak využívány pro léčbu AD. U pacientů s pokročilou AD dochází k poklesu hladiny AChE na 55–67 %, hladina BChE se

naopak zvyšuje na 120 %. Přestože je BChE gliového původu a AChE neuronového původu, je dokázáno, že BChE za přítomnosti inhibitoru cholinesteras hydrolyzuje ACh, čímž kompenzuje deficit AChE a měla by tak zajistit udržitelnou léčbu AD. (JASIECKI a kol., 2021; LI a kol., 2021)

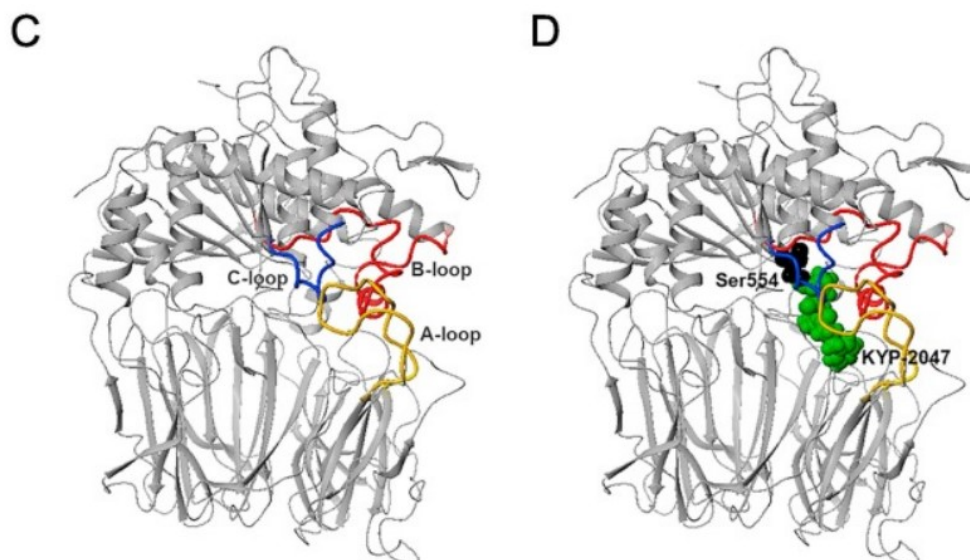
1.2 Prolyloloigopeptidasa

Prolyloloigopeptidasa (POP), též známá jako prolylendopeptidasa, je serinová proteasa, kterou můžeme nalézt téměř v celém lidském těle. Nejvíce exprimována je zejména v mozku, ledvinách, varlatech a brzlíku. Množství vyskytovaného proteinu však nutně neodpovídá enzymatické aktivitě POP. U pacientů s AD byly nalezeny významně vyšší hodnoty aktivity POP než u zdravých jedinců, což naznačuje, že by enzym mohl souviset s neurodegenerací. Inhibitory POP by tedy mohly najít uplatnění jako terapeutika při léčbě AD. (SIATKA a kol., 2017; SVARCBAHS a kol., 2019)

1.2.1 Struktura prolyloloigopeptidasy

Molekula POP má válcovitý tvar, skládá se z 710 aminokyselinových zbytků a její molekulová hmotnost je přibližně 80 kDa. Existuje pouze jedna forma POP, a to monomer, který je tvořen dvěma doménami. Jedna z domén je katalytická s α/β -hydrolázou, zatímco druhá je nekatalytická sedmilistá β -vrtulová doména. Tato β -vrtulová doména funguje jako filtr peptidů a k aktivnímu místu pouští pouze ty peptidy, které velikostně nepřesahují 30 aminokyselin. Peptidy větší než 30 aminokyselin nemůže enzym štěpit kvůli poloze katalytické kapsy mezi katalytickou a vrtulovou doménou. Aktivní centrum POP se skládá z aminokyselinových zbytků Ser554, Asp641 a His680 a nachází se na rozhraní domén. (DUNAEVSKY a kol., 2020; SVARCBAHS a kol., 2019)

Unikátní pro POP je flexibilní struktura smyčky na rozhraní domén. Tato struktura zajišťuje důležité katalytické funkce jako je výběr substrátu dle velikosti a specifčnosti, ale také samotný vstup substrátu do aktivního místa. Smyčková struktura obsahuje smyčku nekatalytické vrtulové domény (smyčku A), smyčku katalytické peptidasové domény (smyčku B) a další smyčky, které jsou důležité pro kontrolu katalytické aktivity enzymu (obrázek 5). (DUNAEVSKY a kol., 2020; SZELTNER a kol. 2013)



Obrázek 5: Struktura POP. C) odlišená žlutá smyčka A, červená smyčka B a modrá smyčka C v molekule POP, D) inhibitor KYP-2047 (zelený) navázaný na Ser554 (černý) v aktivním místě POP (SVARCBABS a kol., 2019)

1.2.2 Funkce prolyloligopeptidasy

Charakteristickou funkcí POP je schopnost štěpit krátké peptidy do 30 aminokyselin na C-terminální straně prolinu. (SVARCBABS a kol., 2019)

POP ovlivňuje biologické procesy zejména díky jeho enzymatické peptidasové aktivitě, případně může biologické procesy ovlivňovat také díky neenzymatické přímé interakci protein-protein. Katalytická aktivita enzymu slouží zejména ke štěpení peptidových hormonů a neuropeptidů jako je oxytocin, vazopresin, hormon uvolňující tyreotropin či látka P. Proteinová interakce je zodpovědná především za regulaci oxidačního stresu a zánětu. Enzym se také účastní regulace paměti a učení, agregace α -synukleinu, neuronálních procesů a angiogeneze. Aktivita a exprese POP se v důsledku stárnutí a neurodegenerativních chorob zvyšuje, což souvisí s hromaděním oxidačního stresu a toxických proteinových agregátů. Zároveň vede vyšší aktivita a exprese POP k zvýšenému rozpadu neuropeptidů a s tím souvisejícímu poklesu kognitivních funkcí a zrychlení neurodegenerace. Inhibice POP by tak mohla být nápomocná v terapii neurodegenerativních onemocnění. (DUNAEVSKY a kol., 2020; KLIMAVICIUSA a kol., 2012; TOPPILA a kol., 2023)

Přestože se jedná o intracelulární enzym, může dojít k jeho uvolnění z buňky do extracelulárního prostoru. Enzym byl také nalezen v krevní plazmě a semenné tekutině. V důsledku neřízeného uvolňování POP do krve a mozkomíšního moku mohou být ovlivněny emoce, citlivost nebo i sociální chování. Tato informace ukazuje souvislost mezi změnami aktivity POP a neuropsychiatrickými onemocněními, kdy snížené hladiny POP nacházíme

u lidí s depresí, naopak zvýšené hladiny POP se vyskytují u pacientů s manickými poruchami a schizofrenií. (DUNAEVSKY a kol., 2020)

1.3 Monoaminoxidasa

Monoaminoxidasa (MAO) patří mezi flavoenzymové oxidasy. Enzym je vázán na povrchovou membránu mitochondrií, má vysoké hladiny exprese zejména v neurálních a gastrointestinálních tkáních a podílí se významně na metabolismu monoaminových neurotransmiterů, jako je dopamin, serotonin, adrenalin a noradrenalin, a dalších aminů. U pacientů s AD byly objeveny zvýšené hladiny tohoto enzymu a inhibitory MAO by tak ve víceúčelových kombinacích mohly pomoci při udržování konstantní hladiny neurotransmiterů u neurodegenerativních onemocnění. (BEHL a kol., 2021; CHAURASIYA a kol., 2014; RAMSAY A ALBREHT, 2018)

1.3.1 Formy monoaminoxidasy

MAO se vyskytuje ve dvou izoformách, a to jako monoaminoxidasa A (MAO A) a monoaminoxidasa B (MAO B). Tyto dvě izoformy jsou kódované různými geny, mají svou vlastní substrátovou specifitu, odlišnou distribuci v tkáních a odlišnou rozpoznávací oblast substrát-inhibitor. (BEHL a kol., 2021)

Obecně se MAO nachází zejména v mozku, kde převažuje především izoforma MAO B, kterou nalezneme například v cerebrálních gliových buňkách. MAO B nalezneme také v souvislosti s krevními destičkami a jaterními buňkami. Projevy MAO A můžeme pozorovat spíše v periferních tkáních, ve střevech, ve štítné žláze, v srdci či placentě. Co se týče katalýzy oxidační deaminace monoaminů, serotonin, melatonin, noradrenalin a adrenalin jsou primárně deaminovány MAO A, zatímco fenylamin a benzylamin jsou primárně deaminovány MAO B. Substráty dopamin, tyramin a tryptamin jsou společné pro obě formy. (BEHL a kol., 2021; SHULMAN a kol., 2013)

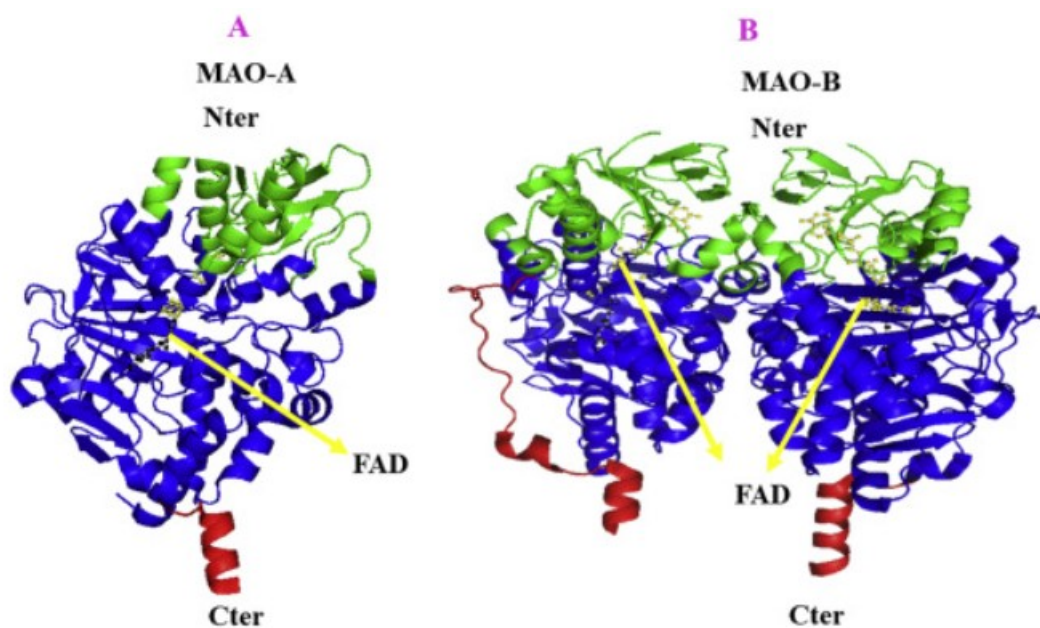
1.3.2 Struktura monoaminoxidasy

MAO A i MAO B jsou relativně velké enzymy dlouhé 527, respektive 520 aminokyselinových zbytků. Molekulová hmotnost enzymů je asi 60 kDa. (IACOVINO a kol., 2018)

Lidská MAO B je dimer, kdy je do oligomerizace zapojeno asi 15 % povrchu monomerů. Vnitřní struktura dimeru je stabilizována vodíkovými můstky, které vedou od vrchu až ke spodní části hlavního globulárního těla proteinu. Jednotlivé monomery obsahují

FAD-vazebnou doménu (FAD – flavinadenindinukleotid) v aplikační části dimeru, substrát-vazebnou doménu, která ukrývá dutinu aktivního místa, a C-koncový segment skládající se z α -helixu, jenž se nachází na spodní části monomeru. Oba α -helixy dimeru jsou vzájemně rovnoběžné, vysoce hydrofobní a plní úlohu membránové kotvy. Aktivní místo enzymu obsahuje velké bipartitní aktivní místo skládající se z centrální dutiny vázající substrát, zde je také vázán FAD, a vstupní dutiny na periferii, která se protíná s povrchem proteinu. To, zda dutiny zůstanou otevřeny nebo se spojí, záleží na povaze přítomného substrátu, případně inhibitoru. (BEHL a kol., 2021; IACOVINO a kol., 2018; WANG a kol., 2013)

MAO A je monomer obsahující úsek devíti aminokyselin na N-konci, které MAO B nemá. Lze říci, že izoformy spolu sdílejí 73 % sekvence aminokyselin. MAO A má také oproti MAO B menší hydrofobní dutinu vázající substrát, která je pouze monovalentní. (WANG a kol., 2013) Struktura MAO A a MAO B je znázorněna na obrázku 6.



Obrázek 6: Struktura monoaminoxidasy. A) struktura monomeru MAO A, B) struktura dimeru MAO B; žlutě označen FAD, modře označena doména vázající substrát, zeleně označena doména vázající FAD, červeně označena C-terminální oblast, N-ter představuje N-terminální oblast (MANZOOR A HODA, 2020)

1.3.3 Funkce monoaminoxidasy

Funkcí MAO je katalýza oxidační deaminace monoaminů. Mozkové monoaminy jako serotonin a norepinefrin jsou neustále metabolizovány, což je nezbytné pro neurální přenos. Při reakci katalyzované MAO vzniká aldehyd, amoniak a peroxid vodíku. Vzniklé aldehydy jsou dále oxidovány na kyseliny a vzniklý peroxid vodíku může být přeměněn na hydroxylový radikál. MAO tedy přispívá k mitochondriální produkci reaktivních forem kyslíku, podílí se na neurotransmisi a na oxidačním stresu v mozku. Enzym také působí jako metabolická barikáda,

díky jeho konzervačnímu účinku v kapilárách hematoencefalické bariéry, a brání tak pronikání aminů do krve zejména v periferních orgánech. Zvýšená exprese MAO B v mozku, zejména v astrocytech v okolí amyloidu- β , katalyzuje již zmíněný metabolismus monoaminů, a tedy zvýšenou tvorbu škodlivých látek jako jsou volné radikály a peroxid vodíku, čímž působí na neurodegenerativní mechanismy u AD. Inhibice MAO B by tak měla snížit oxidační stres a neurodegeneraci a zmírnit progresi onemocnění. (BEHL a kol., 2021; FÍŠAR 2016)

MAO A má také významnou roli při udržování hladin neurotransmiterů a její zvýšená aktivita a exprese je, stejně jako u MAO B, spojována s neurodegenerativními poruchami. Navíc byla zvýšená hladina MAO A zjištěna u pacientů s depresí, naopak deficit enzymu byl prokázán u pacientů s mentální retardací. (ALJANABI, 2021)

1.4 Detekční metody enzymů

Pro stanovení aktivity i inhibice enzymů existuje řada metod. Většina z nich je založena na měření změny pH, případně jsou tyto metody založeny na principu kolorimetrie, spektrofotometrie, fluorometrie, radiometrie, elektrochemie a jiných. Je prokázáno, že žádná technika není vhodná pro všechny aplikace, jelikož každá z nich požaduje určité sobě specifické podmínky. Nejnovější techniky založené na nanotechnologiích a materiálech významně rozšířily možnosti stanovení aktivity a inhibice enzymů. Mezi tradičními testy a novějšími technikami je však velká propast. (MIAO a kol., 2010)

1.4.1 Spektrofotometrické metody

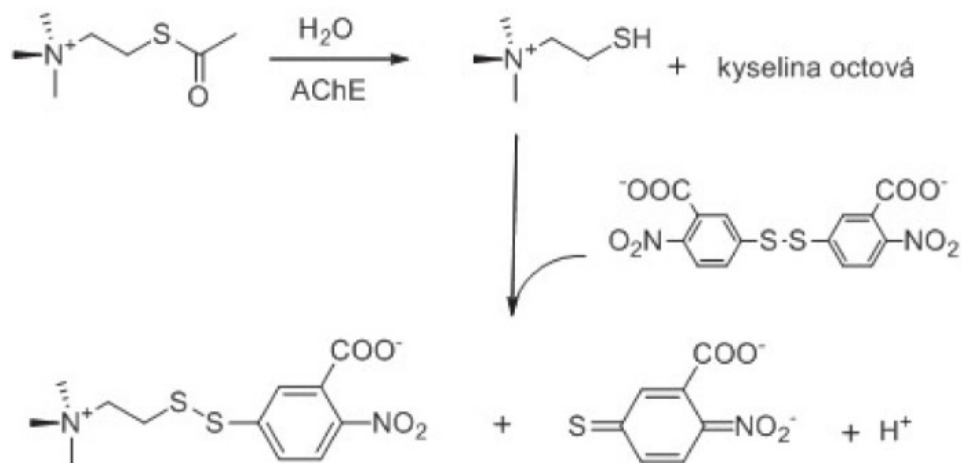
Přestože existuje velké množství různých testů, jsou dodnes spektrofotometrické metody jedny z nejpoužívanějších metod pro stanovení cholinesteras a jejich inhibitorů. (MIAO a kol., 2010)

Aktivita a inhibice POP je, stejně jako u zmíněných cholinesteras, také stanovitelná spektrofotometricky. Typickým substrátem pro POP je Z-Gly-Pro-p-nitroanilid, kdy se sleduje vznik p-nitroanilinu, který je přímo úměrný aktivitě POP. Spektrofotometrické měření probíhá při 405 nm. (SIATKA a kol., 2017)

1.4.1.1 Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je nejpoužívanější spektrofotometrickou metodou pro stanovení aktivity a inhibice cholinesteras jako je AChE a BChE. Metoda pro stanovení AChE spočívá v hydrolyze ATCh katalytickým působením AChE na thiocholin a kyselinu octovou. V případě stanovení BChE dochází k hydrolyze BTCh na thiocholin a kyselinu máselnou. Následně

dochází ke spontánní reakci thiocholinu s Ellmanovým činidlem, tedy 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB). Touto spontánní reakcí dochází ke vzniku žlutě zbarvené aniontové formy kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB). Tato aniontová forma absorbuje při 412 nm. Intenzita barvy produktu je pak přímo úměrná aktivitě cholinesterasy. Princip metody je znázorněn na obrázku 7. (POHANKA, 2017; POHANKA A ZAKOVA, 2021)



Obrázek 7: Princip Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE (POHANKA, 2017)

Významnou výhodou Ellmanovy metody je zejména její rychlost, jednoduchost, přesnost a nízké náklady na provedení. Další výhodou této metody je její flexibilita, metoda je snadno přizpůsobitelná pro automatické analyzátoři a dá se provádět i externě mimo laboratoř. (MIAO a kol., 2010)

Nevýhodou této metody je nízká citlivost detekce, což znemožňuje detekovat nízké aktivity cholinesteras, nízká stabilita DTNB v čase a jeho nízká citlivost na světlo, vysoké pozadí v biologických vzorcích v důsledku interakce s volnými sulfhydrylovými skupinami a interference produktu TNB s hemoglobinem při 410 nm, což je problém při měření aktivity cholinesteras v krvi. Řešením této komplikace je použití alternativního barevného činidla, místo DTNB, jako je například kyselina 6,6'-dithiodinikotinová. (DINGOVA a kol., 2014; MIAO a kol., 2010)

1.4.1.2 Fluorimetrické metody

Fluorimetrické testy jsou další spektrometrickou metodou, která se využívá ke stanovení aktivity či inhibice enzymu. Princip metody je založen na tvorbě fluorescenčního produktu. Fluorescenční látky jsou stabilní, mají dlouhou životnost a vysokou intenzitu fluorescence. Pro stanovení aktivity cholinesteras se používají zejména nefluorescenční substráty, jako je indoxylacetát nebo resorufin butyrát, které následně, po hydrolýze enzymem, poskytují vysoce

fluorescenční produkty. Hydrolýza indoxylacetátu je však oproti resorufinu mnohem rychlejší. Další výhodou indoxylacetátu je také vyšší stabilita vůči spontánní hydrolýze a větší rozdíl mezi excitační a emisní vlnovou délkou. Resorufin má naproti tomu výhodu větší fluorescence, čímž umožňuje měřit nižší koncentrace substrátu. Test tedy, ve srovnání s kolorimetrickými metodami, poskytuje až 100× vyšší citlivost a zároveň také nižší detekční limity. (HOLAS a kol., 2012; MIAO a kol., 2010)

Příkladem fluorimetrické metody je i stanovení aktivity a inhibice MAO. Principem je reakce MAO s p-tyraminem, což je substrát jak pro MAO A tak i pro MAO B. Tato reakce vede k tvorbě H_2O_2 , který dále reaguje s křenovou peroxidázou za použití barevného činidla N-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazinu. Fluorimetrické měření se provádí při excitačním záření 530 nm a emisním záření 585 nm. (ZHOU A PANCHUK-VOLOSHINA, 1997)

V současnosti se čím dál více pro fluorescenční detekci aktivity enzymů využívají nanomateriály jako kovové nanočástice či anorganické kvantové tečky a fluorescenční konjugované polymery. Tyto metody jsou však časově a finančně dost náročné. Kvantové tečky jsou navíc toxické, což omezuje jejich použití v praxi. (XIAO a kol., 2021)

1.4.2 Radioizotopické metody

Princip radioizotopické metody pro stanovení aktivity AChE je založen na hodnocení acetylcholinu značeného 3H nebo ^{14}C . Metody jsou si velmi podobné, liší se pouze v kvantifikaci označeného nehydrolyzovaného ACh nebo označeného uvolněného acetátu. Radiometrický test není vhodný pro kinetická měření, jelikož se jedná o koncový test. Každopádně se jedná o nejcitlivější test ke stanovení i velmi nízké enzymové aktivity. Další výhodou metody je její jednoduchost, reprodukovatelnost a přesnost. Velkou nevýhodou této metody je zejména vysoká cena radioaktivního substrátu a také komplikace s manipulací s radioaktivním materiálem. (HOLAS a kol., 2012; MIAO a kol., 2010)

1.4.3 Biosenzory

Biosenzor je analytické zařízení skládající se z biologické rozeznávací části zajišťující biochemickou odpověď, fyzikálně-chemického převodníku, který tuto odpověď převádí na signál, a detektoru, díky kterému je signál detekován a následně lze vyjádřit číselně. Nejčastěji používaným biologickým prvkem v biosenzorech je enzym. Tento enzym reaguje se substrátem a odezva je následně monitorována detektorem. Existují dva přístupy měření, a to měření produktu enzymatické reakce, kdy je cílový analyt substrátem pro enzym, další možnost je, že

cílový analyt působí jako inhibitor enzymu a pokles tvorby enzymatického produktu se pak měří a koreluje s koncentrací cílového analytu. (ŠTĚPÁNKOVÁ A VORČÁKOVÁ, 2016)

Elektrochemické biosenzory jsou nejrozšířenější. Principem je změna elektrických vlastností na základě produkce nebo spotřeby iontů či elektronů, ke které dochází v rámci reakcí mezi enzymem a cílovým analytem. Mezi elektrochemické biosenzory se řadí biosenzory konduktometrické, potenciometrické a amperometrické, dalšími druhy jsou optický, fotoelektrochemický a piezoelektrický biosenzor. Výhodou biosenzorů je velká výkonnost, vysoká specifita a citlivost, rychlá odezva, nízké náklady a kompaktní velikost, díky čemuž jsou použitelné pro klinické monitorování. (MIAO a kol., 2010; ŠTĚPÁNKOVÁ A VORČÁKOVÁ, 2016)

1.5 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou celosvětově velmi rozšířená. Jedná se o hlavní příčinu invalidity a předčasného úmrtí zejména starších osob po celém světě. Pro neurodegenerativní onemocnění je charakteristická ztráta struktury a funkce nervového systému. Mezi významné zástupce patří například Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba či amyotrofická laterální skleróza. Zatímco klinickými projevy se tyto nemoci liší, jejich molekulární podstata, akumulace charakteristických proteinů do nerozpustných agregátů v nebo mezi neurony a gliovými buňkami, je víceméně stejná. (BRETTSCHNEIDER a kol., 2015; SURESH a kol., 2020)

1.5.1 Alzheimerova choroba

Nemoc je pojmenována podle německého psychiatra Aloise Alzheimerera, který u svého prvního pacienta, jenž před smrtí trpěl ztrátou paměti, dezorientací, a změnou osobnosti, popsal při posmrtném zkoumání jeho mozku masivní úbytek neuronů, přítomnost amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek. Tento nálezný charakterizoval jako závažné onemocnění mozkové kůry. Emil Kraepelin následně ve své psychiatrické příručce poprvé použil termín Alzheimerova choroba, čímž tuto nemoc odlišil od tehdy známé senilní demence. (CIPRIANI a kol., 2011)

1.5.1.1 Epidemiologie

Jedná se o nejběžnější typ demence u lidí ve věku 65 let a starších. Vyskytuje se až v 75 % všech případů. Podle organizace Alzheimer's Disease International trpělo v roce 2021 AD celosvětově více než 55 milionů lidí a předpokládá se, že se toto číslo bude dále rapidně zvyšovat. V roce 2030 by podle předpokladů mělo být nemocných až 78 milionů lidí. Spolu se

zvyšujícím se počtem nemocných se zvyšují také náklady na léčbu a péči. (GARCÍA-MORALES a kol., 2021; ZHANG a kol., 2022)

1.5.1.2 Příčina vzniku

AD se dlouho vyvíjí v preklinickém období, kdy toto období může trvat i několik desetiletí. Není zcela jasné, co přesně stojí za vznikem patologických změn u AD. Existuje však několik hypotéz, které popisují možnou příčinu patologických změn AD. Mezi hlavní hypotézy patří zejména cholinerní hypotéza a amyloidní hypotéza. (BREIJYEH A KARAMAN, 2020; SCHELTENS a kol., 2016)

Cholinerní hypotéza je nejstarší a velmi významnou teorií popisující patogenezi AD. ACh je neurotransmitter, který se účastní procesu učení, paměti a dalších kritických funkcí. Jeho hladina je ovlivňována centrálním cholinerním nervovým systémem, který reguluje syntézu a uvolňování ACh. V mozcích pacientů s AD je často zjištěna neurodegenerace, ztráta cholinerních neuronů a s tím spojená snížená hladina neurotransmiteru ACh. Degenerace cholinerních neuronů pak tedy způsobuje ztrátu paměti, pozornosti či omezení kritických funkcí. Abnormální centrální cholinerní změny mohou také způsobit fosforylaci tau proteinu, zánět nervových buněk, buněčnou apoptózu, nerovnováhu neurotransmitterového a neurohormonálního systému a další patologické jevy. (BREIJYEH A KARAMAN, 2020; CHEN a kol., 2022)

Amyloidní hypotéza také hraje důležitou roli v patologii AD. Nadměrná produkce nebo nedostatečné odstraňování A β proteinu způsobuje ukládání amyloidu v mozku. Vysoké koncentrace A β proteinu pak působí neurotoxicky na neurony a způsobují jejich atrofii až smrt. (LIU a kol., 2019)

Amyloidní prekurzorový protein (APP) je štěpen dvěma způsoby. Prvním způsobem je hydrolýza APP přes α dráhu α -sekretázou, po které následuje hydrolýza γ -sekretázou. Tento způsob fyziologicky převládá a nedochází k produkci nerozpustného A β proteinu. U druhého způsobu, přes dráhu β , dochází k hydrolýze APP β -sekretázou, po které následuje hydrolýza γ -sekretázou a vzniká tak nerozpustný A β protein. Za fyziologických podmínek je takto tvořeno jen malé množství nerozpustného A β proteinu, který je následně eliminován imunitním systémem. Je-li však přítomná mutace, dochází k nadměrné tvorbě nerozpustného A β proteinu β dráhou, dochází k jeho akumulaci a vzniku AD. (LIU a kol., 2019)

Další hypotézou snažící se vysvětlit vznik AD je hypotéza tau proteinu. Důležitou součástí patogeneze AD jsou intracelulární neurofibrilární klubka obsahující hyperfosforylované tau

proteiny. Funkcí tau proteinu je zejména stabilizace mikrotubulů. Tato stabilizace je důležitá především pro neurony, jelikož mikrotubuly slouží pro správnou přepravu signálů v jejich dendritech a axonech. Za patologických podmínek dochází ke zvýšení hyperfosforylace tau, což způsobí větší náchylnost proteinu k agregaci, sníží se afinita proteinu k mikrotubulům a celkově se ovlivní přenos signálů uvnitř a mezi neurony. (DU a kol., 2018; LIU a kol., 2019)

Hypotéza oxidačního stresu zdůrazňuje jeho význam v patogenezi AD. Oxidační stres je způsoben zvýšenou hladinou reaktivních forem kyslíku a/nebo reaktivních forem dusíku, zároveň také nedostatečnou antioxidační obranou. Mozek je více náchylný k poškození volnými radikály, jelikož spotřebovává velké množství kyslíku a má jen malé množství antioxidačních enzymů ve srovnání s jinými tkáněmi. U AD dochází k významnému snížení počtu mitochondrií v neuronech a k s tím souvisejícímu zvýšení oxidačního poškození, což vede až k neurodegenerativním změnám. Postupné kumulativní oxidační poškození v průběhu času by mohlo být příčinou pozdního nástupu a pomalé progresy AD. (LIU a kol., 2019; MARKESBERY, 1997)

1.5.1.3 Rizikové faktory

Určitý významný vliv na nástup demence mají i rizikové faktory jako je celkový životní styl, cukrovka, obezita, fyzická a duševní nečinnost, deprese, kouření, nízké vzdělání či špatná strava a mnoho dalších. Odstranění či úprava zmíněných rizikových faktorů by vedla alespoň k částečnému snížení výskytu demence. Určitý podíl na vzniku demence má také genetický rizikový faktor Apolipoprotein $\epsilon 4$ (APOE $\epsilon 4$). (SCHELTENS a kol., 2016)

Věk je významným rizikovým faktorem ovlivňujícím vznik AD. Naprostá většina případů AD má takzvanou pozdní formu nemoci, která postihuje dospělé ve věku 65 let a více. Obecně lze říct, že se výskyt demence s věkem exponenciálně zvyšuje. Nejvýraznější nárůst lze pozorovat zejména v 7. a 8. dekádě života. (REITZ A MAYEUX, 2014; SILVA a kol., 2019)

Diabetes mellitus 2. typu je spojen s patologií AD díky inzulinu, který má významnou roli jako neuromodulátor. Významná je rezistence inzulinu nebo jeho nedostatek, které stimulují aktivaci β a γ -sekretáz a také tvorbu neurofibrilárních klubek. (ARMSTRONG, 2019; SILVA a kol., 2019)

Alkohol má, zejména u lidí, kteří jej pijí pravidelně a ve velkém množství, vysoký potenciál zapříčinit onemocnění AD. Zajímavostí je, že alkohol ve víně obsahuje určité látky, které vykazují ochranné účinky proti neurodegeneraci. (ZHANG a kol., 2021)

Kouření cigaret zvyšuje tvorbu volných radikálů a oxidační stres, čímž zvyšuje riziko vzniku AD. Navíc může kouření vést k cerebrovaskulárním onemocněním, která také zvyšují riziko vzniku AD (viz níže). (SILVA a kol., 2019)

Obezita také nese zvýšené riziko demence. Větší riziko demence a AD je u pacientů, kteří mají zvýšený index tělesné hmotnosti ve středním věku. U starších lidí je naopak vyšší váha spojena s určitým ochranným účinkem. Zvýšený úbytek hmotnosti u starších lidí pak může předcházet výskytu demence. (SILVA a kol., 2019; ZHANG a kol., 2021)

Cerebrovaskulární onemocnění, jako je cévní mozková příhoda, mnohočetné mozkové krvácení či těžká mozková ateroskleróza, jsou považovány za rizikové faktory AD. V důsledku cerebrovaskulárního onemocnění může dojít ke snížení průtoku krve mozkem, poruše hematoencefalické bariéry nebo selektivní mozkové atrofii. Následkem může být poškození neuronů, případně akumulace A β proteinu. (ZHANG a kol., 2021)

Traumatické poškození mozku v důsledku vnější mechanické síly může vést k poruše paměti, změnám chování a fyzických funkcí. Zvýšené riziko rozvoje AD a demence je zejména u mužů, kteří vykonávají sporty jako je box nebo americký fotbal. (ARMSTRONG, 2019)

Krevní tlak, zejména hypertenze, může být také jedním z rizikových faktorů ve vývoji AD. Především hypertenze ve středním věku významně ovlivňuje výskyt AD ve stáří. Se zvyšujícím se věkem se pak vliv hypertenze na riziko vzniku AD zmenšuje. Hypertenze způsobuje změnu ve stěnách cév, což může vést až k ischemii mozku. Navíc může poškodit hematoencefalickou bariéru, a tím zvýšit riziko AD. Je však třeba zmínit, že i hypotenze přispívá k rozvoji AD a také příliš velké kolísání tlaku může vést až ke dvojnásobnému riziku vzniku AD. (REITZ A MAYEUX, 2014; ZHANG a kol., 2021)

APOE ϵ 4 je jeden z hlavních genů, který zvyšuje riziko onemocnění AD. Zejména přítomnost alely APOE ϵ 4 je genetickým faktorem pro časný i pozdní nástup AD. Tento gen však není nezbytně nutný ani dostačující k samotnému vyvolání AD. Se zvyšujícím se počtem alel APOE ϵ 4 se zvyšuje riziko AD a zároveň se snižuje věk nástupu AD. (VAN CAUWENBERGHE a kol., 2016)

1.5.1.4 Diagnostika

V současné době neexistuje žádný test, který by stoprocentně diagnostikoval AD. AD lze tedy stoprocentně diagnostikovat pouze *post mortem* prostřednictvím patologického vyšetření při pitvě. Klinicky však lze zjistit alespoň pravděpodobná diagnóza AD, a to díky stále se

rozvíjejícím diagnostickým technikám a kritériím. Základem diagnostiky AD je zejména klinický rozhovor, fyzikální a kognitivní vyšetření. (BALLARD a kol., 2011; LANE a kol., 2018)

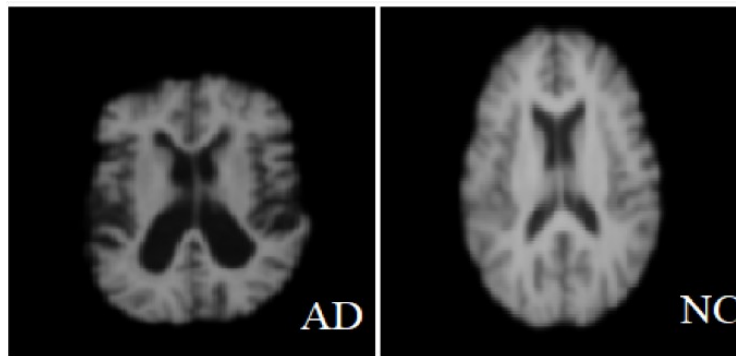
Neuropsychologické vyšetření se skládá z podrobné anamnézy průběhu a typů příznaků pacienta, díky informacím, které jsou zjištěny od jedince, jenž je s dotyčným v kontaktu a zná jeho každodenní život (rodinný příslušník/ošetřovatel). Následně je kvalifikovaným klinikem vyšetřen duševní stav pacienta a stanoveno kognitivní hodnocení. Toto základní vyšetření slouží k odlišení, zda pacient trpí AD či nikoliv. Schopnost rozlišit, zda se jedná o AD či jinou demenci je však méně přesná. (BALLARD a kol., 2011; KNOPMAN a kol., 2021)

Lumbální punkce je poměrně invazivní a pro pacienta pravděpodobně dost nepříjemný zákrok, avšak vyšetření mozkomíšního moku pomáhá odhalit nejvíce biomarkerů pro neurodegenerativní onemocnění. Toto vyšetření může pomoci stanovit AD již v počáteční fázi onemocnění. Nejčastěji používané biomarkery mozkomíšního moku pro AD jsou amyloid- β a tau protein. Pro AD jsou charakteristické zvýšené hladiny tau proteinu a fosforylovaného tau proteinu a snížená hladina rozpustného A β proteinu v důsledku ukládání A β proteinu v placích, což pacienty odlišuje od zdravých jedinců. (REITZ A MAYEUX, 2014; SALEEM a kol., 2022)

Rutině se provádějí snadno proveditelné krevní testy, které obvykle zahrnují krevní obraz, renální funkce, funkce štítné žlázy, vitamín B12 a folát. Tyto testy se provádějí zejména k vyloučení stavů, které by mohly přispět ke kognitivním symptomům AD. Provádějí se také rutinní sérologické testy, jako je antinukleární test, test na AIDS nebo syfilis, pro vyloučení zánětlivých, metabolických či infekčních příčin onemocnění AD. (LANE a kol., 2018)

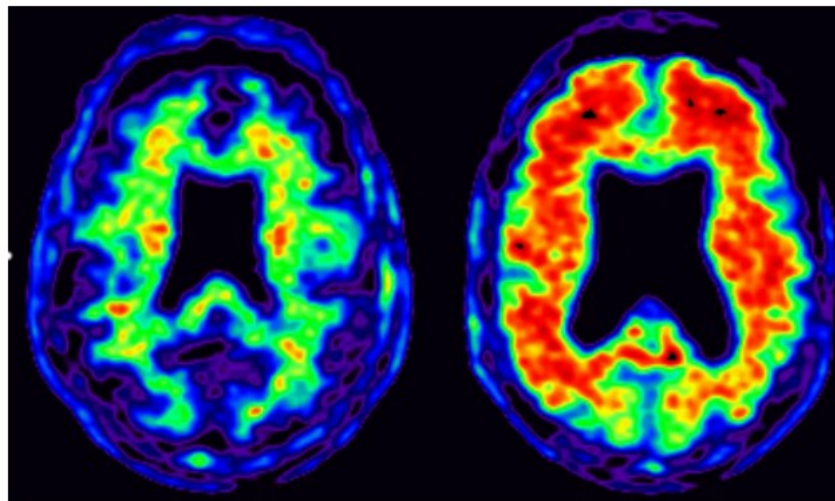
Výpočetní tomografie neboli CT je vyšetřovací metoda, která by měla být použita u každé osoby s podezřením na AD. Jedná se o zobrazení struktury mozku, kdy se měří tloušťka určitých částí mozku, které bývají u AD zmenšeny. (LANE a kol., 2018)

Magnetickou rezonancí neboli MRI se dá zobrazit struktura mozku detailněji. Jedná se o nejvíce používanou metodu zobrazující strukturu mozku. Používá se k posouzení atrofie mozku, ke které dochází v důsledku ztráty tkáně. Pro AD je charakteristická zejména atrofie mediálního temporálního laloku. Celkově u AD dochází k charakteristickému zmenšování hipokampu a mozkové kůry a růstu komor (obrázek 8). (BALLARD a kol., 2011; SALEEM a kol., 2022)



Obrázek 8: MRI – skenování pacienta s AD (vlevo) a kontroly (vpravo) (ALSAEED A OMAR, 2022)

Pozitronová emisní tomografie neboli PET je funkční zobrazovací technika. Slouží k zobrazení změn metabolismu mozku, které předchází strukturálním změnám u AD. Metodou lze měřit metabolismus glukózy u AD, kdy dochází k poklesu metabolismu glukózy v temporoparietální a hipokampální oblasti. PET metodou lze sledovat také umístění a rozsah A β proteinu v mozku. Dochází k vazbě fluorescenčního ligandu na protein a při pozitivním výsledku lze pozorovat akumulaci A β proteinu, který je zvýrazněn teplou barvou (obrázek 9). A β protein se každopádně vyskytuje i u jiných diagnóz a také u zdravých lidí starších 60 let, proto není tato zobrazovací metoda pro diagnostiku AD dostačující. (KNOPMAN a kol., 2021; SCHELTENS a kol., 2016)



Obrázek 9: PET u zdravého pacienta (vlevo) a u pacienta s AD (vpravo) (LANE a kol., 2018)

Genetickým vyšetřením lze stanovit mutace genu PSEN1, PSEN2, a APP, zároveň lze také stanovit přítomnost genu APOE ϵ 4 jako rizikového faktoru. Mutace zmíněných genů může AD vyvolat, není to však pravidlem. Přestože genetickým testem nelze zjistit přítomnost AD v genetickém materiálu ani věk nástupu nemoci, lze určit alespoň zvýšené riziko výskytu AD

do budoucna. Testy jsou dnes využívány spíše pro výzkumné účely. (VAN CAUWENBERGHE a kol., 2016)

1.5.1.5 Terapie

Neexistuje žádný lék, který by dokázal AD vyléčit, avšak je k dispozici symptomatická léčba umožňující alespoň zmírnění progresu onemocnění. V současné době existuje pouze několik druhů léků schválených Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro symptomatickou léčbu AD. Řadí se mezi ně zejména inhibitory cholinesteras (donepezil, galantamin, rivastigmin) a parciální antagonistu N-methyl D-aspartátu (NMDA) zvaný memantin. V nedávné době, konkrétně v letech 2021 a 2023, byly pro léčbu AD schváleny dva další léky, konkrétně anti-monoklonální protilátky Aducanumab a Lecanemab. Inhibitory cholinesterasy fungují na principu blokace rozkladu ACh enzymem cholinesterasou, čímž dochází ke zvýšení hladiny ACh v synaptické štěrbině. Antagonista NMDA receptoru, memantin, obnovuje jeho normální aktivitu tím, že brání nadměrné aktivaci NMDA glutamátového receptoru a s tím spojenému přílivu Ca^{2+} , které by způsobovaly buněčnou smrt a synaptickou dysfunkci. Zmíněné anti-monoklonální protilátky se váží na amyloidní oligomery či nerozpustné fibrily, překonávají hematoencefalickou bariéru a redukují A β plaky. (BEHL a kol., 2022; BREIJYEH A KARAMAN, 2020; YIANNOPOULOU A PAPAGEORGIOU, 2020)

Jedním z prvních léků schválených v roce 1993 pro léčbu AD byl Takrin. Tento lék byl však stažen kvůli jeho významným vedlejším účinkům, a to zejména hepatotoxicitě a špatné biologické dostupnosti po perorálním podání. (PRZYBYŁOWSKA a kol., 2019)

Donepezil je hlavním používaným lékem pro léčbu AD, díky dlouhému poločasu rozpadu a dobré snášenlivosti pacienty. Jedná se o látku, která reverzibilně a selektivně inhibuje AChE. Indikuje se v případech mírné, středně těžké i těžké demence u AD. Jako nejúčinnější se podle metaanalýz zdá dávka 10 mg/den. Látka přispívá ke zlepšení kognitivních funkcí, chování i aktivit každodenního života. Mezi nežádoucí účinky donepezilu se řadí zejména gastrointestinální poruchy a poruchy nervového systému. (BOMASANG-LAYNO A BRONSTHER, 2021; WALCZAK-NOWICKA A HERBERT, 2021)

Galantamin je látka původně izolovaná z cibulí sněženek a narcisů. Tento reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE se používá spíše u mírných až středně těžkých případů AD. Jeho použití je, stejně jako u donepezilu, spojeno se zlepšením kognitivních funkcí a rozvojem činností každodenního života. Největší vliv má však na dlouhodobou paměť. Galantamin má

schopnost rychleji překonat hematoencefalickou bariéru a ovlivnit tak mozek po delší dobu. (GARCÍA-MORALES a kol., 2021; WALCZAK-NOWICKA A HERBERT, 2021)

Rivastigmin je pseudoireverzibilní inhibitor AChE a BChE. Používá se u mírných a středně těžkých případů AD. Lék je dostupný v transdermální a orální formě. Pro pacienty je upřednostňováno transdermální podání léku. Toto podání je spojeno s lepší patientskou snášenlivostí, díky nepřetržitému dodávání léku v nižších dávkách, což snižuje výskyt nežádoucích účinků. Orální podání léku je pro pacienty nepohodlné, jelikož hodně pacientů trápí mimo ztrátu paměti také problémy s polykáním. Navíc je orální podání léku spojeno s mnoha nežádoucími účinky jako je nevolnost a ztráta hmotnosti či srdeční arytmie a vaskulární poruchy. (BREIJYEH A KARAMAN, 2020; WALCZAK-NOWICKA A HERBERT, 2021)

Memantin se používá u pacientů se středně těžkou až těžkou AD, u pacientů s mírnou AD nemá významný účinek. Funguje jako nekompetitivní nízkoafinitní antagonist NMDA receptorů, kdy modulací receptorů snižuje excitační neurotoxicitu zprostředkovanou glutamátem, aniž by narušil jeho fyziologickou funkci. Zpomaluje kognitivní i funkční zhoršení pacientů. Mezi vedlejší účinky patří zácpa a bolesti hlavy. Může se používat samostatně jako monoterapie, případně lze použít v kombinaci s inhibitory cholinesteras díky jejich komplementárnímu mechanismu účinku. (LANE a kol., 2018; YIANNOPOULOU A PAPAGEORGIOU, 2020)

Nedostatek účinných látek k prevenci a léčbě AD vede k vývoji nových léků. Výzkum se soustředí zejména na patofyziologickou podstatu AD, zejména akumulaci A β proteinu a hyperfosforylaci tau proteinu. Léčba zaměřující se na A β protein má tři terapeutické cíle, a to blokaci γ -sekretázy a β -sekretázy, inhibici agregace proteinu a posílení clearance A β proteinu imunoterapií. V současné době je testována účinnost mnoha léků. Mezi nejvýznamnější a v nedávné době schválené léky se řadí již zmíněný Aducanumab a Lecanemab, lidské anti-monoklonální protilátky zabraňující agregaci A β proteinu. Cílem terapeutického řešení tau proteinu je inhibice abnormální hyperfosforylace proteinu, snížení jeho akumulace a vývoj imunoterapie. Většina studií byla pozastavena kvůli látkové toxicitě a nedostatečné účinnosti. V současnosti probíhající studie jsou zaměřené zejména na imunoterapii, avšak většina je teprve v počátečních fázích. (BEHL a kol., 2022; BOMASANG-LAYNO A BRONSTHER, 2021; GARCÍA-MORALES a kol., 2021)

Nefarmakologická léčba je také důležitou součástí terapie pacientů s AD. Jednou z terapií je ergoterapie, kde ergoterapeuti pomocí kognitivních a behaviorálních cvičení pomáhají pacientům s AD zvýšit samostatnost a celkový rozvoj postupu při běžných aktivitách každodenního života. Další důležitou terapií pro pacienty s AD je pomoc psychologů, kteří jim pomáhají řešit deprese nebo úzkost. Tyto problémy jsou u lidí s AD velmi časté a zasahují až do kognitivní a funkční hladiny. Důležitá je také celková prevence AD, ať už jde o životní styl, fyzickou aktivitu, stravu či spánkový režim. (GARCÍA-MORALES a kol., 2021)

2 Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám za použití acetylthiocholinu a butyrylthiocholinu jako substrátu. Následně byl také určen typ inhibice nejúčinnějšího ze studovaných inhibitorů a stanoveny kinetické parametry K_M a V_m . Dále se tato práce zabývá určením vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy a zároveň také stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči tomuto enzymu. Poslední část této diplomové práce se věnuje stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase B.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a roztoky

Acetylcholinesterasa (eeAChE) z paúhoře elektrického (Sigma-Aldrich)

AChE rozpuštěná v 0,1 M PBS pH 7,4

Acetylcholinesterase Fluorescent Activity Kit (Invitrogen)

sada pro fluorescenční stanovení aktivity AChE

Butyrylcholinesterasa z koňského séra (Sigma-Aldrich)

BChE rozpuštěná v 0,1 M PBS pH 7,4

Monoamine Oxidase Assay kit (Sigma-Aldrich)

sada pro stanovení aktivity a inhibice MAO A a B

Monoaminoxidasa B (Sigma-Aldrich)

lidská rekombinantní MAO B získaná z mikrosomů hmyzích buněk infikovaných bakulovirem obsahujícím cDNA inzerty pro lidskou MAO B, rozpuštěná v pufru dodaném jako součást Monoamine Oxidase Assay kit

Prolyloligopeptidasa (Sigma-Aldrich)

rekombinantní POP exprimovaná v *E. coli*, rozpuštěná v 0,1 M PBS

0,1 M fosfátový pufr (PBS) pH 7,4

4 g NaCl, 0,1 g KH₂PO₄, 1,45 g N₂HPO₄.12H₂O, 0,1 g KCl (vše Penta) do 500 ml demineralizované vody

Ellmanovo činidlo (DTNB) (Sigma-Aldrich)

5·10⁻⁴ M 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

Acetylthiocholin jodid (ATCh) (Roth)

substrát pro AChE rozpuštěný v 0,1 M PBS pH 7,4

Butyrylthiocholin jodid (BTCh) (Sigma-Aldrich)

substrát pro BChE rozpuštěný v 0,1 M PBS pH 7,4

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta)

rozpouštědlo pro substráty a inhibitory

Z-Gly-Pro-4-nitroanilid (Sigma-Aldrich)

substrát pro POP rozpuštěný v DMSO na koncentraci 0,01 M

Z-Pro-Prolinal (prolinal) (Sigma-Aldrich)

selektivní inhibitor POP, rozpuštěný v DMSO na koncentraci 0,01 M

Donepezil hydrochlorid (Sigma-Aldrich)

Donepezil rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci 0,01 M

Galantamin hydrobromid z *Lycoris sp.* (Sigma-Aldrich)

Galantamin rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci 0,01 M

Rivastigmin tartrát (Sigma-Aldrich)

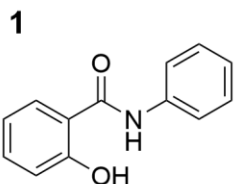
Rivastigmin rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci 0,01 M

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin hydrochlorid hydrát) (Sigma-Aldrich)

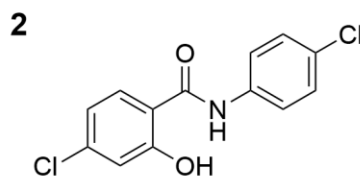
Takrin rozpuštěný v demineralizované vodě na koncentraci 0,01 M

Inhibitory

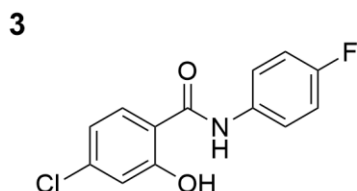
Vzorky inhibitorů byly poskytnuty Katedrou organické a bioorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Inhibitory byly rozpuštěny v DMSO na koncentraci 0,01 M. Na obrázku 10 jsou uvedeny strukturní vzorce studovaných inhibitorů.



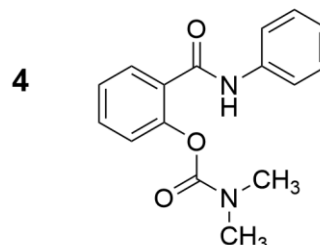
2-hydroxy-N-fenylbenzamid



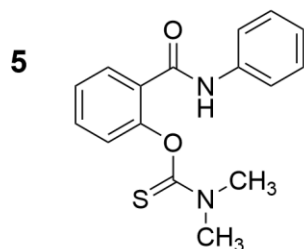
4-chloro-N-(4-chlorofenyl)-2-hydroxybenzamid



4-chloro-N-(4-fluorofenyl)-2-hydroxybenzamid



2-(fenylkarbamoyl)fenyl dimethylkarbamát



O-(2-(fenylkarbamoyl)fenyl) dimethylkarbamothioát

Obrázek 10: Strukturní vzorce studovaných inhibitorů enzymů

3.2 Použité přístroje a pomůcky

UV/VIS spektrometr Agilent 8453

Přístroj BioTek Synergy H1 microplate reader

Mikrotitrační destičky

Skleněné kyvety s optickou dráhou 1 cm

Jednokanálové a multikanálové pipety (Eppendorf, Biohit, Sartorius)

Třepačka IKA lab dancer

Mikrozkmavky

3.3 Stanovení aktivity eeAChE a BChE

Definicí enzymové aktivity je schopnost enzymu katalyzovat určitou reakci. Stanovení aktivity eeAChE a BChE bylo provedeno standardní Ellmanovou metodou. Pro eeAChE byl jako substrát použit ATCh, pro BChE byl jako substrát použit BTCh.

Nejprve byl změřen blank o celkovém objemu reakční směsi 2 ml, který obsahoval:

- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (800 μ l)
- 0,1 M ATCh/BTCh (8 μ l)
- 0,1 M PBS (1192 μ l)

Poté byla stanovena aktivita AChE, kdy bylo pipetováno:

- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (800 μ l)
- 0,1 M ATCh/BTCh (8 μ l)
- AChE/BChE (8 μ l)
- 0,1 M PBS (1184 μ l)

Celkový objem reakční směsi byl opět 2 ml. Přidáním enzymu dochází ke startu reakce, proto se enzym do směsi přidává až nakonec.

Samotné měření probíhalo za laboratorní teploty při vlnové délce $\lambda = 412$ nm. Měřila se závislost absorbance na čase po dobu 70 s v intervalech 3 s. Do grafu byla následně vynesena závislost absorbance na čase. Pomocí rovnice regrese byla následně spočítána daná aktivita enzymu. Z definice jednotky enzymové aktivity (1 U) byla za hodnotu času dosazena hodnota 60. Výsledná absorbance byla nakonec vynásobena přepočítávacím faktorem (17,67), který zahrnuje:

- délka 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.

Měření bylo provedeno celkem šestkrát. Výsledná aktivita enzymu byla nakonec zjištěna zprůměrováním všech šesti výsledků aktivit enzymů.

3.4 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám

3.4.1 Ellmanova metoda

3.4.1.1 Stanovení IC₅₀

IC₅₀ byla proměřena pro eeAChE i BChE za použití pěti vzorků a čtyř standardů inhibitoru. Jejich přehled je uveden v kapitole 3.1. Pro každý enzym bylo v dubletu nebo tripletu změřeno celkem devět koncentrací každého ze studovaných inhibitorů i devět koncentrací každého použitého standardu. Koncentrace pro studované vzorky byly zvoleny v rozmezí $1 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-6}$ M ve výsledné reakční směsi. Pro standardy byly tyto koncentrace v reakční směsi zvolené v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 7 \cdot 10^{-7}$ M pro galantamin, $1 \cdot 10^{-4} - 7 \cdot 10^{-6}$ M pro rivastigmin a $1 \cdot 10^{-7} - 7 \cdot 10^{-9}$ M pro donepezil a takrin. Zároveň byl proměřen také blank a neinhibovaná reakce.

Vzorky a standardy byly ředěny PBS na výše uvedené koncentrační rozmezí. Množství substrátu (ATCh/BTCh – dle použitého enzymu) bylo voleno tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla $5 \cdot 10^{-5}$ M. Množství pipetovaného enzymu (eeAChE/BChE) bylo voleno na základě aktuálně stanovené aktivity zásobního roztoku enzymu tak, aby jeho výsledná aktivita v reakční směsi byla 0,05 U.

Každá jamka mikrotitrační destičky obsahovala reakční směs o celkovém objemu 300 μ l a měření bylo provedeno ve dvou nebo třech opakováních. Přidáním substrátu dochází k zahájení reakce, proto je nutné přidávat substrát až jako poslední.

Níže je uveden postup dávkování všech reagentů do jamek mikrotitrační destičky pro proměření blanku, neinhibované reakce a inhibovaných reakcí.

Jamka pro blank obsahovala:

- $5 \cdot 10^{-5}$ M ATCh/BTCh (pipetováno 15 μ l 0,001 M)
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (60 μ l)
- 0,1 M PBS (dopočítáno do celkového objemu 300 μ l) (225 μ l)

Jamky s neinhibovanou reakcí obsahovaly:

- $5 \cdot 10^{-5}$ M ATCh/BTCh (pipetováno 15 μ l 0,001 M)
- 0,05 U eeAChE/BChE (pipetovány 2 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 7,4 U)

- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (60 μ l)
- 0,1 M PBS (dopočítáno do celkového objemu 300 μ l) (223 μ l)

Jamky s inhibovanou reakcí obsahovaly:

- $5 \cdot 10^{-5}$ M ATCh/BTCh (pipetováno 15 μ l 0,001 M)
- 0,05 U eeAChE/BChE (pipetovány 2 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 7,4 U)
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (60 μ l)
- 10 μ l inhibitoru o dané koncentraci, aby bylo dosaženo žádané koncentrace inhibitoru ve výsledné reakční směsi (koncentrační rozmezí viz výše)
- 0,1 M PBS (dopočítáno do celkového objemu 300 μ l) (213 μ l)

Destička byla po pipetování substrátu vložena do readeru a absorbance byla měřena po 5minutové inkubaci, ta byla potřeba z důvodu, aby došlo k dostatečnému navázání jednotlivých složek směsi. Měření absorbance probíhalo za laboratorní teploty při vlnové délce 412 nm.

Následně byla vypočtena procenta inhibice, jako průměr minimálně ze dvou hodnot, pro každý enzym. Pro výpočet procent inhibice byl použit vztah:

$$\% I = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100,$$

kde A_i je absorbance reakční směsi obsahující inhibitor a A_0 je absorbance reakční směsi neobsahující inhibitor.

V programu GraphPad Prism 8.0.1 byla vynesena závislost % inhibice na logaritmu koncentrace inhibitoru ve výsledné reakční směsi a poté vypočtena hodnota IC_{50} .

3.4.1.2 Určení typu inhibice nejúčinnějšího inhibitoru a stanovení kinetických parametrů K_M , V_m

U vzorku inhibitoru číslo 4 byl určen typ inhibice BChE. Pro určení typu inhibice byly použity čtyři různé koncentrace substrátu BTCh v reakční směsi, a to $1 \cdot 10^{-5}$, $3 \cdot 10^{-5}$, $5 \cdot 10^{-5}$ a $7 \cdot 10^{-5}$ M. Pro každou koncentraci substrátu byly zároveň testovány čtyři různé koncentrace inhibitoru, a to $1,5 \cdot 10^{-5}$, $2,5 \cdot 10^{-5}$, $3,5 \cdot 10^{-5}$ a $4,5 \cdot 10^{-5}$ M v reakční směsi. Jako enzym byla použita BChE, kdy bylo dávkováno takové množství enzymu, aby jeho výsledná aktivita v reakční směsi byla 0,05 U. Každá jamka mikrotitrační destičky obsahovala směs o celkovém objemu 300 μ l a měření bylo provedeno v dubletu. Přidáním substrátu dochází k zahájení reakce, proto je nutné přidávat substrát až jako poslední.

Jamky s neinhibovanou reakcí obsahovaly:

- pipetované množství BTCh: 10 μl $3 \cdot 10^{-4}$ M (pro $1 \cdot 10^{-5}$ M); 9 μl 0,001 M (pro $3 \cdot 10^{-5}$ M); 15 μl 0,001 M (pro $5 \cdot 10^{-5}$ M); 21 μl 0,001 M (pro $7 \cdot 10^{-5}$ M)
- 0,05 U BChE (pipetováno 2,3 μl ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 6,5 U)
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (60 μl)
- 0,1 M PBS (dopočítáno do celkového objemu 300 μl) (222,7 μl)

Jamky s inhibovanou reakcí obsahovaly:

- pipetované množství BTCh: 10 μl $3 \cdot 10^{-4}$ M (pro $1 \cdot 10^{-5}$ M); 9 μl 0,001 M (pro $3 \cdot 10^{-5}$ M); 15 μl 0,001 M (pro $5 \cdot 10^{-5}$ M); 21 μl 0,001 M (pro $7 \cdot 10^{-5}$ M)
- 0,05 U BChE (pipetováno 2,3 μl ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 6,5 U)
- $5 \cdot 10^{-4}$ M DTNB (60 μl)
- 10 μl inhibitoru o dané koncentraci, aby bylo dosaženo žádané koncentrace inhibitoru ve výsledné reakční směsi (tedy $1,5 \cdot 10^{-5}$, resp. $2,5 \cdot 10^{-5}$, $3,5 \cdot 10^{-5}$ nebo $4,5 \cdot 10^{-5}$ M, viz výše)
- 0,1 M PBS (dopočítáno do celkového objemu 300 μl) (212,7 μl)

Pro měření absorbance bylo nastaveno kinetické měření. Byla sledována změna absorbance v čase po 7sekundových intervalech po dobu 2 minut. Měření probíhalo za laboratorní teploty při vlnové délce 412 nm. Ze získaných kinetických měření byly spočítány reakční rychlosti pro neinhibované a inhibované reakce ($v = \Delta A / \Delta t$).

Nakonec byl sestaven graf podle Lineweavera a Burka, tedy graf závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti $1/v$ na převrácené hodnotě koncentrace substrátu $1/S$. Z tohoto grafu byly následně vypočteny kinetické parametry, tedy Michaelisova konstanta (K_M) a mezní rychlost (V_m), a byl určen typ inhibice.

3.4.1.3 Stanovení inhibiční konstanty K_i

Inhibiční konstanta byla stanovena pro vzorek inhibitoru číslo 4 inhibujícího BChE. Byl sestaven graf závislosti směrnice (Lineweaver-Burkův výnos viz kapitola 3.4.1.2) na koncentraci inhibitoru číslo 4. Koncentrace inhibitoru byly stejné jako v kapitole 3.4.1.2. K_i byla stanovena odečtením hodnoty průsečíku na ose x.

3.4.2 Fluorescenční metoda

Test byl proveden pomocí sady pro fluorescenční stanovení aktivity acetylcholinesterasy. Tento test je vhodný pro měření aktivity AChE v různých vzorcích jako je sérum, plazma,

membrány erytrocytů či buněčných a tkáňových lyzátech. Tyto vzorky by měly být lidského původu, avšak předpoklad je, že by měl test fungovat i na vzorcích jiného druhu, například u myši a opic. Tato sada může být použita jak k měření kinetické aktivity, tak i pro end point testy. Principem je využití patentované nefluorescenční molekuly ke kovalentní vazbě thiolového produktu reakce mezi substrát a AChE za vzniku fluorescenčního produktu, který je následně měřen při excitačním záření 390 nm a emisním záření 510 nm. Důležitá je 20minutová inkubace před samotným měřením. (celý návod dostupný [zde](#))

Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů bylo provedeno pro lidskou AChE (hAChE), která byla součástí sady, a následně i pro eeAChE.

3.4.2.1 Stanovení za použití hAChE

Z důvodu malého množství hAChE byla inhibiční účinnost studovaných inhibitorů vůči tomuto enzymu stanovena pouze orientačně a byla vyjádřena jako procenta inhibice (% I) při jedné zvolené koncentraci inhibitoru ($30 \cdot 10^{-6}$ M ve výsledné reakční směsi).

Byla proměřena jak neinhibovaná reakce, tak i inhibovaná reakce s jednotlivými vzorky a standardy inhibitorů za použití hAChE, která byla součástí testované sady pro fluorescenční stanovení aktivity acetylcholinesterasy.

Nejprve bylo potřeba připravit roztok hAChE o aktivitě 0,1 U/ml přidáním 50 μ l dodaného standardního roztoku k 450 μ l pufru. Následně byla připravena detekční reagentie přidáním 700 μ l DMSO do lahvičky s detekčním činidlem. Nakonec byl připraven roztok substrátu, kdy bylo přidáno 700 μ l DMSO do lahvičky se substrátem AChE. Z připravených roztoků byl následně připraven roztok pracovní, který obsahoval 550 μ l substrátu AChE, 550 μ l detekčního činidla a 4,4 ml DMSO.

Jamka s neinhibovanou reakcí obsahovala:

- 0,05 U hAChE (pipetováno 75 μ l ze zásobního roztoku o aktivitě 0,1 U/ml)
- pufr (25,5 μ l)
- pracovní roztok (50 μ l)

Jamka s inhibovanou reakcí obsahovala:

- $30 \cdot 10^{-6}$ M vzorek/standard (pipetováno 0,5 μ l 0,01 M)
- 0,05 U hAChE (pipetováno 75 μ l ze zásobního roztoku o aktivitě 0,1 U/ml)
- pufr (25 μ l)
- pracovní roztok (50 μ l)

Fluorescenční měření probíhalo při laboratorní teplotě. Intenzita fluorescence byla měřena v intervalech po 1 minutě po dobu 20 minut, při již zmíněném excitačním záření o vlnové délce 390 nm a emisním záření o vlnové délce 510 nm. Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta RFU/\Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Poté byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100.$$

3.4.2.2 Stanovení za použití eeAChE

Fluorescenční stanovení aktivity eeAChE bylo provedeno pro kontrolu, zda je tento test zavedený především pro stanovení aktivity hAChE použitelný i pro eeAChE a zároveň také pro porovnání inhibice hAChE a eeAChE. Byla proměřena jak neinhibovaná reakce, tak i inhibovaná reakce s jednotlivými vzorky a standardy inhibitorů, a to tak, že bylo dávkováno takové množství inhibitoru, aby jeho koncentrace v reakční směsi byla $10 \cdot 10^{-6}$, $30 \cdot 10^{-6}$ a $50 \cdot 10^{-6}$ M. Nejprve bylo zapotřebí naředit $10 \times$ zásobní roztok inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Z tohoto naředěného roztoku bylo dále pipetováno množství inhibitoru potřebné pro výslednou koncentraci v reakční směsi $10 \cdot 10^{-6}$ M. Jako enzym byla použita eeAChE, kdy bylo dávkováno takové množství enzymu, aby jeho výsledná aktivita v reakční směsi byla 0,05 U. Stanovení bylo provedeno v dubletu.

Postup přípravy detekční reagentie, substrátu AChE i následná příprava pracovního roztoku jsou uvedeny výše v kapitole 3.4.2.1.

Jamky s neinhibovanou reakcí obsahovaly:

- 0,05 U eeAChE (pipetován 1 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 7,5 U)
- pufr (99 μ l)
- pracovní roztok (50 μ l)

Jamky s inhibovanou reakcí obsahovaly:

- vzorek/standard (1,5 μ l z 0,001 M roztoku; 0,5 a 0,8 μ l z 0,01 M roztoku)
- 0,05 U eeAChE (pipetován 1 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 7,5 U)
- pufr (vždy dopočítat do celkového objemu 200 μ l)
- pracovní roztok (50 μ l)

Fluorescenční měření probíhalo při laboratorní teplotě. Intenzita fluorescence byla měřena v intervalech po 1 minutě po dobu 20 minut, při již zmíněném excitačním záření o vlnové délce

390 nm a emisním záření o vlnové délce 510 nm. Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta RFU/\Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Poté byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci daného inhibitoru ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} .

3.5 Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy

Byly proměřeny různé kombinace koncentrace substrátu, množství dávkovaného enzymu za působení různé teploty tak, aby byla výsledná reakční rychlost dostačující pro průběh reakce po přiměřeně dlouhou dobu. Výběr těchto podmínek vychází z několika publikací, jako je článek od PORTUGAL a kol., 2017 nebo LASSE a kol., 2020. Měření probíhalo při teplotě 25 °C a 37 °C. Pro každou koncentraci enzymu byly v dubletu změřeny všechny vybrané koncentrace substrátu.

Celkový objem reakční směsi byl vždy 200 μ l a jamky obsahovaly:

- množství POP pipetované ze zásobního roztoku o aktivitě 20 U tak, aby ve výsledné reakční směsi byla aktivita 0,5; 0,8; 1,1; resp. 1,4 U (odpovídá pipetovaným objemům 5, 8, 11, resp. 14 μ l).
- množství substrátu (Z-Gly-Pro-4-nitroanilidu) pipetované ze zásobního roztoku o koncentraci 0,01 M tak, aby koncentrace substrátu ve výsledné reakční směsi byla $5 \cdot 10^{-5}$; $1,5 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-4}$; $3,5 \cdot 10^{-4}$; resp. $4,5 \cdot 10^{-4}$ M (odpovídá pipetovaným objemům 1, 3, 5, 7, resp. 9 μ l).
- 0,1 M PBS – vždy dopočítat do 200 μ l pro každé měření

Měření absorbance probíhalo 10 minut po minutových intervalech při vlnové délce 405 nm při teplotě 25 °C, resp. 37 °C. Poté byly spočítány reakční rychlosti ($v = \Delta A/\Delta t$) a následně byl v programu GraphPad Prism 8.0.1 vynesen graf závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu pro různé aktivity enzymu v reakční směsi.

3.5.1 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči prolyloligopeptidase

Z důvodu malého množství POP byla inhibiční účinnost studovaných inhibitorů vůči tomuto enzymu stanovena pouze orientačně a byla vyjádřena jako procenta inhibice

(% I) při jedné zvolené koncentraci inhibitoru ($30 \cdot 10^{-6}$ M ve výsledné reakční směsi). Jako standard byl použit prolinal, jehož inhibiční účinnost byla vyjádřena hodnotou IC_{50} .

Nejprve byla změřena inhibiční účinnost studovaných inhibitorů, kdy bylo dávkováno takové množství inhibitoru, aby jeho koncentrace ve výsledné reakční směsi (200 μ l) byla $30 \cdot 10^{-6}$ M.

Byl měřen blank, kdy tato jamka obsahovala:

- $30 \cdot 10^{-6}$ M inhibitor (pipetováno 0,6 μ l 0,01 M roztoku inhibitoru)
- 0,1 M PBS (199,4 μ l)

Jamka s neinhibovanou reakcí obsahovala:

- $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Z-Gly-Pro-4-nitroanilid (pipetováno 5 μ l 0,01 M roztoku Z-Gly-Pro-4-nitroanilidu)
- 1,1 U POP (pipetováno 11 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 20 U)
- 0,1 M PBS (184 μ l)

Jamka s inhibovanou reakcí obsahovala:

- $30 \cdot 10^{-6}$ M inhibitor (pipetováno 0,6 μ l 0,01 M roztoku inhibitoru)
- $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Z-Gly-Pro-4-nitroanilid (pipetováno 5 μ l 0,01 M roztoku Z-Gly-Pro-4-nitroanilidu)
- 1,1 U POP (pipetováno 11 μ l ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 20 U)
- 0,1 M PBS (183,4 μ l)

Měření absorbance probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 10 minut v minutových intervalech při vlnové délce 405 nm. Z naměřených závislostí absorbance na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta A / \Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Poté byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100.$$

Pro porovnání inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů byl jako standardní inhibitor použit selektivní inhibitor POP – prolinal. Do reakční směsi bylo pipetováno takové množství inhibitoru, aby jeho koncentrace ve výsledné reakční směsi byla $5 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-9}$, resp. $1 \cdot 10^{-9}$ M. Původní koncentrace inhibitoru byla 0,01 M. Bylo tedy zapotřebí nejprve tento roztok naředit, a to na koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-7}$ M. Následně bylo v dubletu pipetováno:

- pipetované množství prolinalu: 10 μl $1 \cdot 10^{-6}$ M (pro $5 \cdot 10^{-8}$ M); 2 μl $1 \cdot 10^{-6}$ M (pro $1 \cdot 10^{-8}$ M); 10 μl $1 \cdot 10^{-7}$ M (pro $5 \cdot 10^{-9}$ M); 2 μl $1 \cdot 10^{-7}$ M (pro $1 \cdot 10^{-9}$ M)
- 5 μl 0,01 M Z-Gly-Pro-4-nitroanilidu
- 11 μl ze zásobního roztoku POP o aktivitě 20 U
- 0,1 M PBS – vždy dopočítat do 200 μl pro každé měření

Měření absorbance probíhalo při teplotě 37 °C po dobu 10 minut v minutových intervalech při vlnové délce 405 nm. Z naměřených závislostí absorbance na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta A / \Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Poté byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci prolinalu ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} .

3.6 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase B

Test byl proveden pomocí sady pro stanovení aktivity monoaminoxidasy. Principem je reakce s p-tyraminem, substrátem pro MAO B, což vede k tvorbě H_2O_2 , která je stanovena fluorimetrickou metodou. Fluorescenční produkt je následně měřen při excitačním záření o vlnové délce 530 nm a emisním záření o vlnové délce 585 nm. Důležitá je vždy 10minutová inkubace enzymu s inhibitorem před přidáním reakčního roztoku a také 20minutová inkubace před samotným měřením. (celý návod dostupný [zde](#))

Nejprve byl ředěním pufrů dodaných v sadě pro stanovení aktivity monoaminoxidasy připraven zásobní roztok MAO B o aktivitě 0,06 U.

Pracovní roztok byl připraven smícháním 50 μl testovacího pufru, 1 μl p-tyraminu, 1 μl enzymu křenuvová peroxidáza a 1 μl barvicího činidla, nacházejících se v použité sadě.

U neinhibované reakce, provedené v dubletu, jamky obsahovaly:

- MAO B (pipetováno 45 μl ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 0,06 U)
- pufr (5 μl)
- reakční roztok (50 μl)

V dubletu byl proměřen také specifický inhibitor pro MAO B, pargylin, a to v koncentracích $0,5 \cdot 10^{-6}$; $1 \cdot 10^{-6}$; $5 \cdot 10^{-6}$ a $10 \cdot 10^{-6}$ M v reakční směsi, kdy bylo nejprve zapotřebí naředit původní roztok o koncentraci $20 \cdot 10^{-3}$ M. Jamky tedy následně obsahovaly:

- MAO B (pipetováno 45 μl ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 0,06 U)
- pargylin v dané koncentraci (pipetováno vždy 5 μl vhodně naředěného pargylinu)
- reakční roztok (50 μl)

Nakonec byly, také v dubletu, proměřeny vzorky inhibitorů, kdy bylo také zapotřebí původní roztoky naředit, a to z koncentrace 0,01 M vhodně tak, aby koncentrace ve výsledné reakční směsi byla $30 \cdot 10^{-6}$ M. Po naředění bylo pipetováno:

- MAO B (pipetováno 45 μl ze zásobního roztoku enzymu o aktivitě 0,06 U)
- ředěný vzorek inhibitoru (5 μl)
- reakční roztok (50 μl)

Fluorescenční měření probíhalo při laboratorní teplotě. Intenzita fluorescence byla měřena v intervalech po 1 minutě po dobu 20 minut, při již zmíněném excitačním záření o vlnové délce 530 nm a emisním záření o vlnové délce 585 nm.

Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta\text{RFU}/\Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Pro studované inhibitory byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100.$$

Pro standard pargylin byla v programu GraphPad Prism 8.0.1 vynesena závislost poměru neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci pargylinu ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byla spočítána hodnota IC_{50} .

4 VÝSLEDKY

4.1 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči cholinesterasám

4.1.1 Ellmanova metoda

4.1.1.1 Stanovení IC₅₀

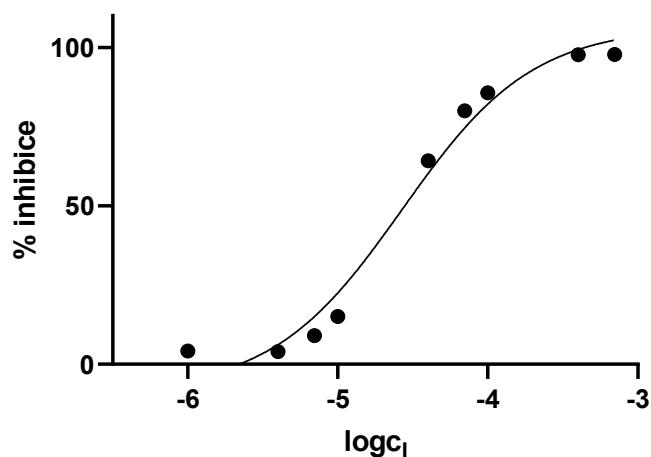
Hodnota IC₅₀ popisuje účinnost inhibitoru. Udává tedy koncentraci inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu, nebo také pokles aktivity enzymu na 50 %. Čím je tedy hodnota IC₅₀ inhibitoru menší, tím je daný inhibitor účinnější.

Pomocí Ellmanovy metody byla stanovena hodnota IC₅₀ pro studované inhibitory a použité standardy vždy třikrát pro každé dávkované množství studovaného inhibitoru a standardu za použití eeAChE a BChE. Z každých tří naměřených hodnot absorbance byla vypočtena průměrná hodnota absorbance jak pro neinhibovanou (A₀) tak pro inhibované reakce (A_i). Následně byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100$$

V programu GraphPad Prism 8.0.1 byla následně vynesena závislost % inhibice na koncentraci inhibitoru ve výsledné reakční směsi a vypočtena hodnota IC₅₀.

Příklad grafické závislosti procent inhibice na logaritmu koncentrace inhibitoru pro inhibitor číslo 4 při inhibici BChE je zobrazen na grafu číslo 1.



Graf 1: Závislost procent inhibice na logaritmu koncentrace inhibitoru 4 při inhibici BChE.
(Hodnoty procent inhibice jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)
(logIC₅₀ = -4,570, IC₅₀ = 26,93 μM, R₂ = 0,9818)

V tabulce číslo 1 jsou uvedeny vypočtené hodnoty IC_{50} pro všechny studované inhibitory a použité standardy při inhibici acetylcholinesterasy z paúhoře elektrického a butyrylcholinesterasy z koňského séra.

Tabulka 1: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici eeAChE a BChE (Ellmanova metoda)

inhibitor	AChE		BChE	
	IC_{50} (μ M)	$\log IC_{50}$	IC_{50} (μ M)	$\log IC_{50}$
1	$135,39 \pm 8,23$	3,87	$317,07 \pm 12,78$	3,50
2	$84,46 \pm 3,62$	4,07	$512,07 \pm 16,98$	3,29
3	$89,19 \pm 4,01$	4,05	$335,33 \pm 13,22$	3,48
4	$125,02 \pm 6,32$	3,90	$38,05 \pm 1,78$	4,42
5	$170,01 \pm 8,84$	3,77	$237,59 \pm 10,01$	3,62
rivastigmin	$60,12 \pm 1,41$	4,22	$40,11 \pm 1,12$	4,40
galantamin	$1,64 \pm 0,03$	5,79	$3,21 \pm 0,05$	5,50
donepezil	$0,04 \pm 0,002$	7,40	$0,03 \pm 0,001$	7,52
takrin	$0,03 \pm 0,001$	7,52	$0,01 \pm 0,001$	8,00

Hodnoty IC_{50} jsou vyjádřeny jako průměr alespoň ze dvou měření.

4.1.1.2 Určení typu inhibice nejúčinnějšího inhibitoru a stanovení kinetických parametrů K_M , V_m

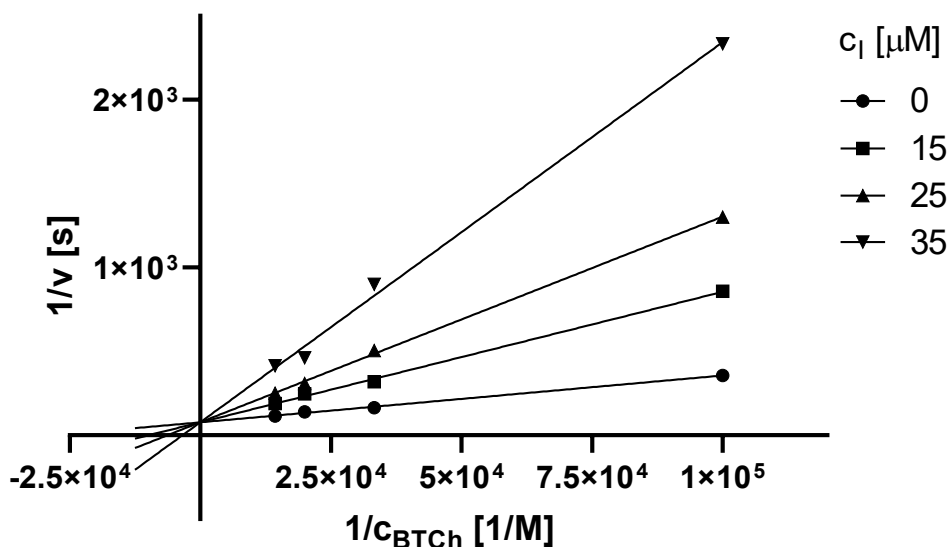
Kinetické parametry lze určit z linearizované rovnice Michaelis-Mentenové dle Lineweavera-Burka. Michaelisova konstanta (K_M) udává koncentraci substrátu, která je při dané koncentraci enzymu nutná k dosažení poloviny maximální rychlosti (V_m). Čím je K_M nižší, tím má enzym k danému substrátu vyšší afinitu. V_m je rychlost reakce, kdy je enzym nasycen substrátem. Typ inhibice se určuje porovnáním K_M a V_m stanovených pro reakce neinhibované a inhibované.

Inhibice se dle mechanismu účinku inhibitoru dělí na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšenou. Při kompetitivní inhibici soutěží substrát a inhibitor o jedno vazebné místo aktivního místa enzymu, dochází k zvyšování K_M , zatímco V_m zůstává stejné. Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na alosterické místo enzymu a způsobuje konformační změny aktivního místa enzymu. K_M se nemění, avšak V_m se snižuje. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže na komplex enzym-substrát a oba kinetické parametry (K_M a V_m) se snižují poměrově stejně. Pokud nejsou splněny předpoklady pro výše uvedené typy inhibice, jedná se

o inhibici smíšenou, kdy je K_M buď vyšší nebo nižší a V_m vždy nižší v porovnání s kinetickými parametry zjištěnými pro neinhibovanou reakci.

Ze souboru studovaných inhibitorů se ukázal jako nejúčinnější inhibitor 4 při inhibici BChE. Z tohoto důvodu byl zvolen pro stanovení typu inhibice.

Samotné měření bylo provedeno kineticky, kdy byly proměřeny čtyři koncentrace nejúčinnějšího inhibitoru číslo 4 pro každou ze čtyř koncentrací substrátu BTCh (vždy za stejné aktivity enzymu v reakční směsi). Následně byla provedena linearizace dle Lineweaver-Burka, kdy graf znázorňuje závislost převrácené hodnoty rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě jednotlivých koncentrací substrátu ($1/c_{BTCh}$). Jak je patrné z grafu číslo 2, inhibitor 4 působí jako kompetitivní inhibitor BChE z koňského séra.



Graf 2: Lineweaver-Burkův výnos pro inhibitor 4 inhibující BChE – stanovení typu inhibice. (Hodnoty $1/v$ jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Všechny hodnoty reakčních rychlostí získaných z kinetických závislostí byly vždy pro danou koncentraci inhibitoru a substrátu v reakční směsi zprůměrovány a z rovnic regrese, $y = kx + q$, přímek získaných v Lineweaver-Burkovu výnosu byly vypočítány kinetické parametry.

Vzorový výpočet pro koncentraci 15 μM inhibitoru číslo 4 je uveden níže:

$$y = 0,007778x + 77,27$$

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

$$V_m = \frac{1}{77,27}$$

$$V_m = 1,29 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = k \cdot V_m$$

$$K_M = 0,007778 \cdot 1,29 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$K_M = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Vypočtené hodnoty kinetických parametrů pro jednotlivé koncentrace inhibitoru číslo 4 jsou uvedeny v tabulce číslo 2.

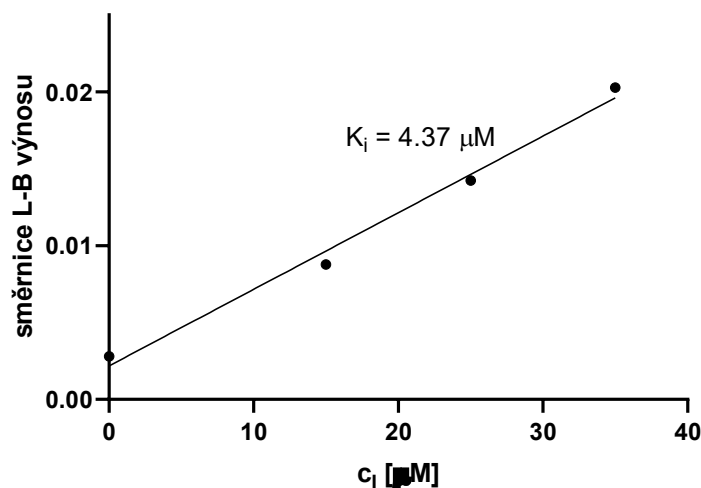
Tabulka 2: Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m pro inhibitor 4 inhibující BChE

Koncentrace inhibitoru č. 4	0 μM	15 μM	25 μM	35 μM
V_m (s^{-1})	$1,29 \cdot 10^{-2}$	$1,29 \cdot 10^{-2}$	$1,29 \cdot 10^{-2}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$
K_M (mol/l)	$3,60 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$2,90 \cdot 10^{-4}$

4.1.1.3 Stanovení inhibiční konstanty K_i

Inhibiční konstanta, K_i , udává koncentraci inhibitoru, kdy je 50 % enzymu v reakční směsi navázáno do komplexu enzym-inhibitor a je tedy dosaženo 50% inhibice enzymu. Na rozdíl od hodnoty IC_{50} popisující účinnost inhibitoru, popisuje K_i spíše vazebnou afinitu inhibitoru k danému enzymu.

Ze stanovení IC_{50} Ellmanovou metodou byl vybrán nejúčinnější inhibitor, tedy inhibitor číslo 4 inhibující BChE, pro který byla následně stanovena inhibiční konstanta K_i . Byl sestaven graf závislosti směrnice (Lineweaver-Burkův výnos viz graf č. 2) na koncentraci inhibitoru číslo 4 (graf číslo 3). K_i byl stanoven odečtením hodnoty průsečíku na ose x, kdy měl hodnotu $K_i = 4,37 \mu\text{M}$.



Graf 3: Závislost směrnice (Lineweaver-Burkův výnos, graf č. 2) vs. koncentrace inhibitoru 4 inhibujícího BChE – stanovení inhibiční konstanty K_i .

4.1.2 Stanovení IC_{50} (Fluorescenční metoda)

Pomocí fluorescenční metody byla stanovena hodnota IC_{50} pro studované inhibitory a použité standardy za použití eeAChE.

Nejprve byla stanovena inhibiční účinnost studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči hAChE, kdy byla procenta inhibice stanovena orientačně z důvodu nízkého množství hAChE. Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta RFU / \Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Následně pak byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0} \right) \times 100$$

V tabulce číslo 3 jsou uvedena vypočtená procenta inhibice pro všechny studované inhibitory a použité standardy při použití hAChE a koncentrace inhibitoru ve výsledné reakční směsi $30 \cdot 10^{-6}$ M.

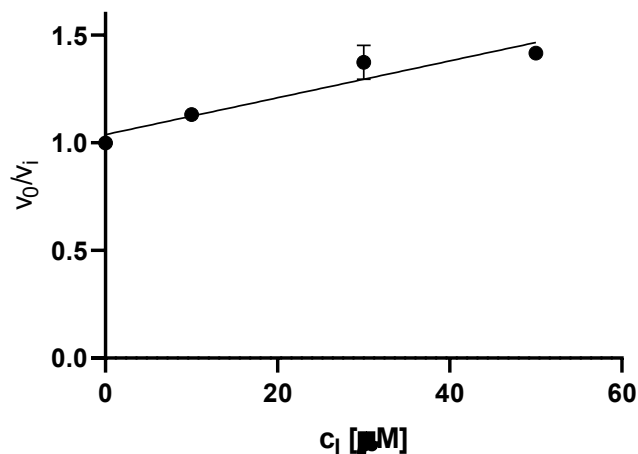
Tabulka 3: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici hAChE (fluorescenční metoda)

inhibitor	% inhibice (při $c_I = 30 \mu\text{M}$)
1	66,70
2	50,53
3	48,56
4	61,51
5	10,18
rivastigmin	40,64
galantamin	47,29
donepezil	68,39

Procenta inhibice jsou vyjádřena jako průměr alespoň ze dvou měření.

Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů vůči eeAChE bylo provedeno pro tři koncentrace každého ze studovaných inhibitorů a použitých standardů. Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly následně vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta\text{RFU}/\Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibovanou reakci (v_i). Poté byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci daného inhibitoru ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byly spočítány hodnoty IC_{50} (v rovnici regrese byly za y dosazena hodnota 2 – vychází z definice IC_{50}).

Příklad grafické závislosti poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce na koncentraci inhibitoru číslo 2 je zobrazen na grafu číslo 4.



Graf 4: Závislosti poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce na koncentraci inhibitoru číslo 2 (Hodnoty v_0/v_i jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

V tabulce číslo 4 jsou uvedeny vypočtené hodnoty IC_{50} pro všechny studované inhibitory a použité standardy při použití eeAChE.

Tabulka 4: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardů při inhibici eeAChE (fluorescenční metoda)

inhibitor	IC_{50} (μM)
1	$182,66 \pm 23,30$
2	$101,86 \pm 9,76$
3	$95,14 \pm 28,79$
4	$146,28 \pm 13,74$
5	$184,32 \pm 3,43$
rivastigmin	$63,65 \pm 1,65$
galantamin	$5,79 \pm 0,07$
donepezil	$94,86 \pm 3,09$

Procenta inhibice jsou vyjádřena jako průměr alespoň ze dvou měření.

4.2 Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyllogopeptidasy

Proměřením zvolených kombinací koncentrace substrátu a množství dávkovaného enzymu za působení různé teploty byla zjištěna jejich nejvhodnější kombinace, aby výsledná reakční rychlost odezvy byla dostatečná. Reakční rychlost byla spočítána pro každou kombinaci dané koncentrace substrátu a aktivity POP v reakční směsi.

Vzorový výpočet pro reakční rychlost při koncentraci substrátu 0,25 mM, aktivitě enzymu 1,1 U a teplotě 25 °C je uveden níže:

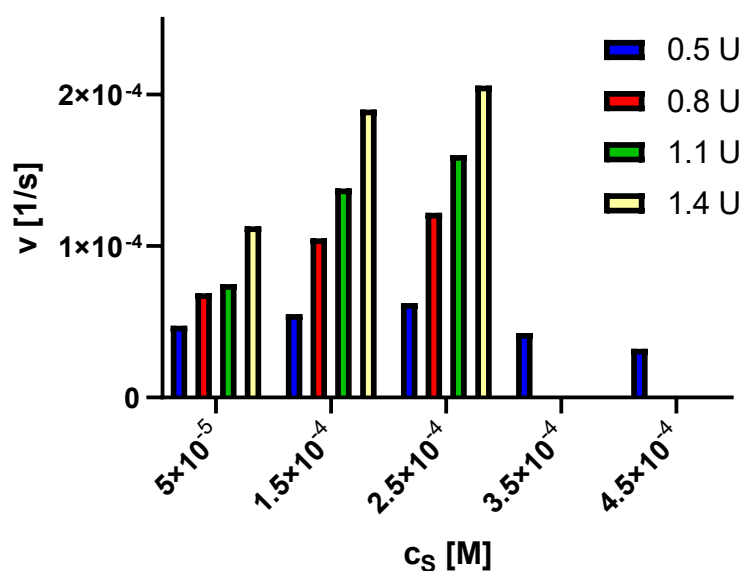
$$v = \frac{(A_{543} - A_{63})}{\Delta t}$$

$$v = \frac{(0,226 - 0,151)}{480}$$

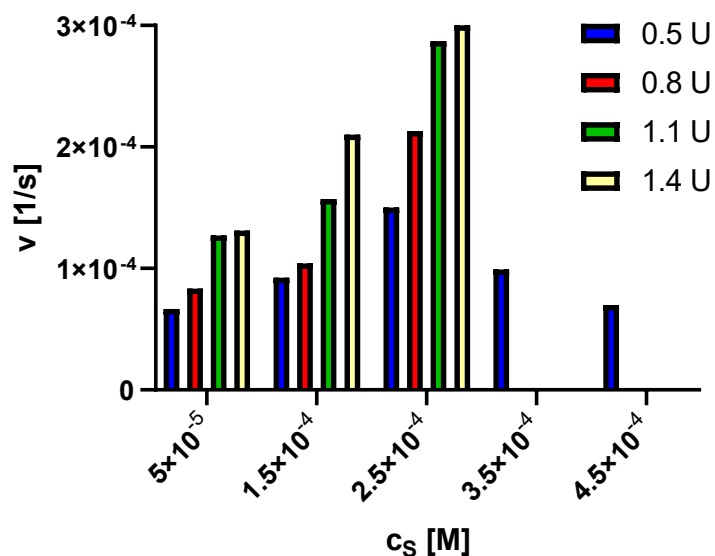
$$v = 1,56 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

Hodnoty A_{543} a A_{63} odpovídají hodnotám absorbance v čase 543 a 63 s, hodnota Δt označuje čas 480 s a odpovídá rozdílu časů, při kterých byly odečteny zmíněné hodnoty absorbance.

Následně byl sestaven graf závislosti průměrné hodnoty reakční rychlosti všech měření k dané koncentraci substrátu pro všechny aktivity enzymů. Na grafu číslo 5 lze vidět hodnoty naměřené při 25 °C a na grafu číslo 6 jsou naměřené hodnoty při 37 °C. Při aktivitě enzymu 0,5 U je při koncentracích substrátu $3,5 \cdot 10^{-4}$ a $4,5 \cdot 10^{-4}$ M v reakční směsi patrný pokles reakční rychlosti, což pravděpodobně naznačuje možnou inhibici enzymu substrátem. Z tohoto důvodu a také z důvodu úspory už tak malého množství enzymu nebyla reakční rychlost při těchto koncentracích substrátu již s vyšší aktivitou enzymu měřena.



Graf 5: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a aktivitě enzymu v reakční směsi při teplotě 25 °C. (Hodnoty v jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)



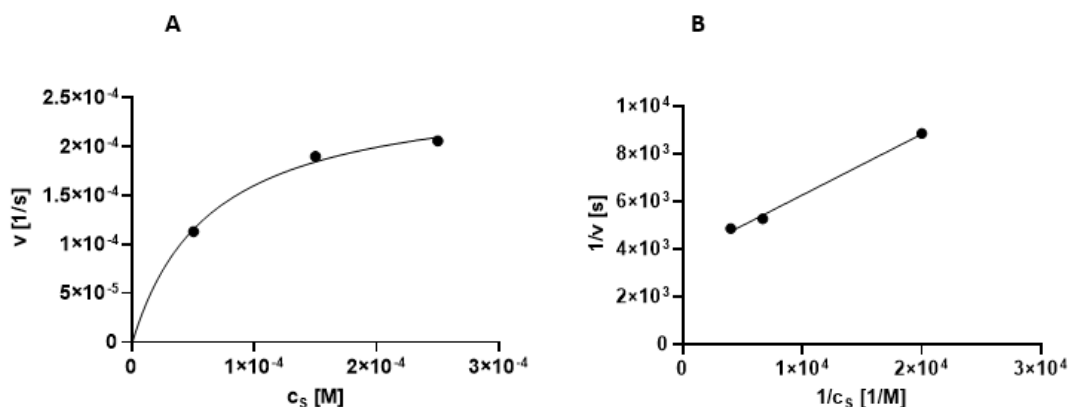
Graf 6: Závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a aktivitě enzymu v reakční směsi při teplotě 37 °C. (Hodnoty v jsou vyjádřené jako průměr minimálně ze dvou měření.)

Na základě získaných výsledků byla pro stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardu zvolena teplota 37 °C, koncentrace substrátu 0,25 mM a aktivita enzymu 1,1 U. Při této kombinaci koncentrace substrátu a aktivity enzymu v reakční směsi je odezva dostatečná.

4.2.1 Stanovení kinetických parametrů K_M a V_m prolyloligopeptidasy

Pro nejvhodnější kombinaci koncentrace substrátu, aktivity enzymu a teploty byly orientačně stanoveny kinetické parametry prolyloligopeptidázy. Stanovení tedy probíhalo při koncentraci substrátu 0,25 mM a aktivitě POP 1,1 U za teploty 37 °C.

V programu GraphPad Prism 8.0.1 byla do grafu nelineární regrese vynesena závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu a do grafu Lineweaver-Burkova výnosu regrese byla vynesena závislost převrácené hodnoty rychlosti ($1/v$) na převrácené hodnotě jednotlivých koncentrací substrátu ($1/c_s$) (graf číslo 7). Určení kinetických parametrů je pouze orientační.



Graf 7: Orientační stanovení kinetických parametrů prolyloligopeptidázy při koncentraci substrátu 0,25 mM a aktivitě POP 1,1 U (teplota 37 °C). A – nelineární regrese ($R^2 = 0,9901$), B – Lineweaver-Burkův výnos regrese ($R^2 = 0,9960$).

Hodnoty kinetických parametrů POP vypočtené programem GraphPad Prism 8.0.1 pro nelineární regresi (A) a z rovnic regrese dvojité reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka (B) jsou uvedeny v tabulce číslo 5.

Tabulka 5: Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m POP

Graf	A	B
V_m (s^{-1})	$2,63 \cdot 10^{-4}$	$2,69 \cdot 10^{-4}$
K_M (mol/l)	$6,41 \cdot 10^{-5}$	$6,88 \cdot 10^{-4}$

4.2.2 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči prolyloligopeptidase

Nejprve byla stanovena inhibiční účinnost studovaných inhibitorů vůči POP. Z důvodu malého množství enzymu byla inhibiční účinnost stanovena pouze orientačně a byla vyjádřena jako procenta inhibice enzymu při jedné zvolené koncentraci inhibitoru ($30 \cdot 10^{-6}$ M) v reakční směsi. Z naměřených závislostí absorbance na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta A / \Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Následně pak byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100$$

Pro porovnání inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů, byl proměřen i selektivní inhibitor POP. Tento inhibitor, prolinal, byl již proměřen v dubletu ve čtyřech koncentracích. Z naměřených závislostí absorbance na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta A / \Delta t$) pro

neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Následně byly v programu GraphPad Prism 8.0.1 vyneseny závislosti poměru zprůměrovaných hodnot rychlostí neinhibovaných a inhibovaných reakcí (v_0/v_i) na koncentraci prolinalu ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byla spočítána hodnota IC_{50} .

V tabulce číslo 6 jsou uvedena vypočtená procenta inhibice pro všechny studované inhibitory a hodnota IC_{50} použitého standardu prolinalu.

Tabulka 6: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standard při inhibici POP

inhibitor	% inhibice (při $c_I = 30 \mu\text{M}$)
1	32,76
2	11,02
3	26,00
4	24,91
5	49,49
prolinal IC_{50} (nM)	$17,91 \pm 1,32$

Procenta inhibice a hodnota IC_{50} jsou vyjádřeny jako průměr alespoň ze dvou měření.

4.3 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči monoaminoxidase B

Nejprve byla stanovena inhibiční účinnost specifického inhibitoru pro MAO B, pargylin, a byla vyjádřena hodnotou IC_{50} . Z důvodu vysoké ceny a malého množství MAO B byla inhibiční účinnost studovaných inhibitorů stanovena pouze orientačně a byla vyjádřena hodnotou procent inhibice enzymu při jedné zvolené koncentraci inhibitoru ($30 \cdot 10^{-6}$ M) v reakční směsi.

Pro standard pargylin byla v programu GraphPad Prism 8.0.1 vynesena závislost poměru rychlosti neinhibované a inhibované reakce (v_0/v_i) na koncentraci pargylinu ve výsledné reakční směsi. Ze získané rovnice regrese byla spočítána hodnota IC_{50} .

Z naměřených závislostí intenzity fluorescence na čase byly vypočítány reakční rychlosti ($v = \Delta\text{RFU}/\Delta t$) pro neinhibovanou (v_0) a inhibované reakce (v_i). Pro studované inhibitory byla spočítána procenta inhibice podle vztahu:

$$\% I = \left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right) \times 100.$$

V tabulce číslo 7 jsou uvedeny inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů (vyjádřených hodnotami procent inhibice) a vypočtená hodnota IC₅₀ pro standard pargylin.

Tabulka 7: Inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardu při inhibici MAO

inhibitor	% inhibice (při c ₁ = 30 μM)
1	51,69
2	48,54
3	43,83
4	0
5	7,93
pargylin	53,56 ± 1,16
IC ₅₀ (nM)	

Procenta inhibice a hodnota IC₅₀ jsou vyjádřeny jako průměr alespoň ze dvou měření.

4.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu a tPSA

Rozdělovací koeficient, popisující lipofilitu látky, a tedy i její schopnost prostupovat hematoencefalickou bariérou, je bezrozměrná veličina popisující rovnovážné rozdělení molekuly mezi dvě kapalně fáze neboli rozpouštědla, která jsou v kontaktu. Nejčastěji používanými rozpouštědly jsou voda a oktanol. Hodnota rozdělovacího koeficientu je přímo úměrná rozpustnosti dané látky v organické fázi. Čím je tedy rozdělovací koeficient nižší, tím je látka méně lipofilní. Jeho hodnota je často vyjádřena v logaritmicím tvaru log P. (IŠIK a kol., 2020)

Hodnoty logP studovaných inhibitorů byly získány pomocí programu ChemDraw 21.0.0. a jsou shrnuty v tabulce číslo 8.

Lipinský a jeho kolektiv zkoumali fyzikálně chemické vlastnosti léčiv a určili ty fyzikálně chemické vlastnosti, díky kterým by měla být látka snadno absorbovatelná a schopna překonat hematoencefalickou bariéru. Navrhli tak tzv. Lipinského pravidlo 5, kdy by dané léčivo mělo splňovat následující podmínky:

- molekulová hmotnost ≤ 500 g/mol
- ≤ 5 donorů vodíkových vazeb
- ≤ 10 akceptorů vodíkových vazeb
- $\log P \leq 5$ (HARITHA a kol., 2024)

Topologická molekulární polární povrchová plocha (tPSA), určující schopnost vytvářet vodíkové vazby, je také důležitým kritériem, popisujícím látku z hlediska schopnosti adsorpce a překonání hematoencefalické bariéry. Ve srovnání se stanovením klasické polární plochy povrchu (PSA), kdy je nejprve potřeba pro výpočet sestavit 3D model molekuly, je tPSA jednodušší. Pro odhad tPSA stačí pouze 2D molekulový model. (PRASANNA A DOERKSEN, 2009)

Rozměr tPSA se udává v jednotkách \AA^2 , kdy $1 \text{\AA} = 10^{-10}$ m. Pokud je hodnota tPSA menší nebo rovna 70\AA^2 , je vysoká pravděpodobnost propustnosti přes hematoencefalickou bariéru. (PRASANNA A DOERKSEN, 2009)

Stejně jako rozdělovací koeficient byly hodnoty tPSA získány analýzou struktury molekul v programu ChemDraw 21.0.0. Výsledky jsou také shrnuty v tabulce číslo 8.

Tabulka 8: Hodnoty rozdělovacího koeficientu a topologické polární povrchové plochy studovaných inhibitorů

inhibitor	Mr [g/mol]	logP	tPSA [\AA^2]
1	213,24	2,45	49,33
2	282,12	3,57	49,33
3	265,67	3,17	49,33
4	284,31	2,57	58,64
5	300,38	3,55	41,57

Z výsledků v tabulce číslo 8 je patrné, že všechny studované inhibitory měly molekulovou hmotnost nižší než 500 g/mol, tudíž splňují jedno z Lipinského pravidel. Další hodnotou je logP, kdy žádný z inhibitorů neměl tuto hodnotu vyšší než 5, čímž splňují další z Lipinského pravidel. Nejvyšší hodnotu logP měly vzorky číslo 2 a 5, což znamená, že budou pravděpodobně procházet buněčnými membránami a hematoencefalickou bariérou lépe než vzorky 1, 2 a 4. Hodnota tPSA je u studovaných inhibitorů menší než 70\AA^2 , všechny inhibitory by tedy, i podle této hodnoty, mohly dobře procházet přes hematoencefalickou bariéru.

5 DISKUZE

5.1 Stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči cholinesterasam

Inhibiční účinnost studovaných inhibitorů 1 – 5 a použitých standardů donepezilu, galantaminu, rivastigminu a tarkrinu byla stanovena pro všechny použité enzymy za použití příslušných substrátů. Hodnota IC_{50} popisuje účinnost inhibitoru, kdy udává takovou koncentraci inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu, čím je tedy hodnota IC_{50} inhibitoru menší, tím je daný inhibitor účinnější. U procent inhibice však platí, že enzym je tím účinnější, čím je procentuální hodnota vyšší.

Hodnoty (tabulka číslo 1) získané Ellmanovou metodou, tedy za použití eeAChE a BChE, ukazují, že hodnoty IC_{50} studovaných inhibitorů jsou výrazně vyšší než hodnoty IC_{50} použitých standardů. Jediný účinný inhibitor je inhibitor BChE číslo 4, jež dosahuje inhibiční účinnosti podobné inhibiční účinnosti rivastigminu. Ostatní studované inhibitory zdaleka nedosahují inhibiční účinnosti standardů – u nich stanovené hodnoty IC_{50} jsou až o řád vyšší.

Zmíněná inhibiční účinnost je z velké části dána strukturou inhibitorů. Struktura studovaného inhibitoru číslo 1 byla vybrána jako základní, inhibitory číslo 2, 3, 4 a 5 jsou pak od inhibitoru číslo 1 odvozené a to tak, že u inhibitorů 2 a 3 byla modifikována fenylová skupina připojením chloru a fluoru v tomto pořadí. Inhibitor číslo 4 byl dimethylkarbamát odvozený od základního inhibitoru číslo 1 a inhibitor číslo 5 je thioderivát zmíněného inhibitoru číslo 4.

Z výsledků patrných v tabulce číslo 1 je zřejmé, že halogenace má mírný pozitivní vliv na inhibici eeAChE. U BChE má halogenace opačný efekt, inhibitory 2 a 3 jsou tak nejméně inhibující BChE. Karbamoylace má výrazně nižší inhibiční vliv na AChE oproti halogenaci. Převedení základního inhibitoru na dimethylkarbamát však výrazně zvýšil inhibiční účinnost vůči BChE, kdy tato účinnost je téměř 10× vyšší než u základního inhibitoru číslo 1. Převedení inhibitoru číslo 4 na thioderivát byl však krok špatným směrem jak pro inhibici AChE tak i inhibici BChE.

Inhibiční účinností derivátů 2-hydroxy-N-fenylbenzamidů vůči eeAChE a BChE se ve své práci zabývali i Krátký a kol., 2019. V jejich případě byly fenylové skupiny modifikovány připojením fluoru, bromu, případně trifluormethanu. Hodnoty IC_{50} při inhibici eeAChE byly v rozmezí 33,13–85,75 μM , zatímco při inhibici BChE v rozmezí 53,46–228,42 μM . Inhibiční

účinnost námi studovaných derivátů 2-hydroxy-N-fenylbenzamidů byla v porovnání s výše uvedenými nižší.

V porovnání se stanovením inhibiční účinnosti fluorescenční metodou, kdy byla použita eeAChE jsou hodnoty IC_{50} (tabulka číslo 4) u většiny vzorků vyšší, což značí, že pro stanovení inhibiční účinnosti je vhodnější Ellmanova metoda. Bylo však potvrzeno, že se dá tento test, zavedený především pro stanovení hAChE, využít také pro měření eeAChE.

Stanovení inhibiční účinnosti fluorescenční metodou však sloužilo zejména pro porovnání inhibice hAChE a eeAChE. Co se týče IC_{50} u eeAChE (tabulka číslo 4), ta byla u studovaných inhibitorů výrazně vyšší než u použitých standardů. Procenta inhibice hAChE (tabulka číslo 3), při jedné koncentraci inhibitoru, však víceméně ukázala vyšší inhibici u studovaných inhibitorů než u použitých standardů. Zmíněné rozdíly v inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči eeAChE a hAChE by mohly být dány mírně odlišnou strukturou enzymů pocházejících z různých živočišných druhů. K potvrzení této domněnky by však bylo potřeba provést některý z *in silico* testů, jako je například molekulární docking. Provedením tohoto testu by bylo možné prokázat, kde se dané inhibitory vážou. V této práci byl konkrétní typ inhibice stanoven pouze pro nejúčinnější inhibitor číslo 4 inhibující BChE.

5.2 Stanovení typu inhibice

Ze stanovení IC_{50} Ellmanovou metodou byl vybrán nejúčinnější inhibitor, tedy inhibitor číslo 4 inhibující BChE. Kineticky byly proměřeny čtyři koncentrace nejúčinnějšího inhibitoru pro každou ze čtyř zvolených koncentrací substrátu BTCh. Na základě výsledků získaných z grafu podle Lineweavera a Burka a porovnáním hodnot K_M a V_m je patrné, že se K_M zvyšuje, zatímco V_m zůstává stejné. Lze tedy konstatovat, že nejúčinnější inhibitor BChE číslo 4 funguje na principu kompetitivní inhibice.

5.3 Stanovení inhibiční konstanty K_i

Pro nejúčinnější inhibitor BChE, tedy inhibitor číslo 4, byla také stanovena inhibiční konstanta K_i . Byl sestaven graf závislosti směrnice Lineweaver-Burkova výnosu na koncentraci inhibitoru číslo 4 a bylo zjištěno, že hodnota K_i je $4,37 \mu\text{M}$.

5.4 Určení vhodných podmínek pro stanovení aktivity a inhibice prolyloligopeptidasy

Proměřením zvolených kombinací koncentrace substrátu a množství dávkovaného enzymu za působení různé teploty, byla zjištěna jejich nejvhodnější kombinace, aby výsledná reakční

rychlost odezvy byla dostatečná. Pro stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a standardu byla nakonec na základě výsledkových grafů (graf 5 a 6) zvolena teplota 37 °C, koncentrace substrátu 0,25 mM a aktivita enzymu 1,1 U. Za těchto podmínek byla odezva dostatečná. Ve srovnání se zvolenými podmínkami pro stanovení inhibice POP v článku od CAHLÍKOVÁ a kol., 2013, byla použita koncentrace substrátu řádově nižší, použitá aktivita enzymu byla naopak o řád vyšší. Teplota použitá pro měření inhibice POP byla stejná, tedy 37 °C.

Za podmínek vyhodnocených jako nejvhodnější byly orientačně stanoveny kinetické parametry K_M a V_m prolyloligopeptidasy, které byly spočítány nelineární regresí a z rovnic regrese dvojité reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka.

Inhibice POP studovanými inhibitory byla z důvodu malého množství enzymu hodnocena pouze orientačně, a to na základě zjištěných procent inhibice tohoto enzymu při jedné zvolené koncentraci inhibitoru. Pro porovnání byl však proměřen i selektivní inhibitor POP, prolinal, pro který byla vypočtena hodnota IC_{50} (tabulka číslo 6). Žádný z inhibitorů však nedosahoval dostatečné inhibiční účinnosti ve srovnání s inhibiční účinností selektivního inhibitoru. Lze však konstatovat, že i přes nedostačující inhibiční účinnost v porovnání se standardem, byl ze studovaných inhibitorů nejúčinnější thioderivát, tedy inhibitor číslo 5.

5.5 Stanovení inhibiční účinnosti monoaminoxidasy

Z důvodu vysoké ceny a malého množství enzymu MAO B byly inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů proměřeny pouze orientačně a byla vypočítána procenta inhibice při jedné zvolené koncentraci inhibitoru. Pro porovnání byl však proměřen i selektivní inhibitor MAO B, pargylin, pro který byla vypočtena hodnota IC_{50} (tabulka číslo 7). Žádný z inhibitorů nedosahoval dostatečné inhibiční účinnosti ve srovnání s inhibiční účinností selektivního inhibitoru. Je však patrné, že i přes nedostačující inhibiční účinnost studovaných inhibitorů v porovnání se standardem, byly ze studovaných inhibitorů, testovaných při zvolené koncentraci 30 μ M, nejvíce účinné inhibitory číslo 1, 2 a 3. Inhibitor číslo 5, thiokarbamát, prokázal minimální inhibiční účinnost (necelých 8 % inhibice při zvolené koncentraci inhibitoru) a inhibitor číslo 4, dimethylkarbamát, měl dokonce nulovou inhibiční účinnost.

5.6 Rozdělovací koeficient a tPSA

Látky, používané pro léčbu AD, by měly snadno procházet hematoencefalickou bariérou, aby mohly působit v mozku. LogP charakterizuje lipofilitu látky, čím je tedy tato hodnota vyšší, tím se zvyšuje lipofilita látek, a tedy také jejich propustnost přes biologické membrány.

Hodnoty tPSA vypovídají jak o propustnosti látek přes hematoencefalickou bariéru, tak o vstřebatelnosti v gastrointestinálním traktu.

Z tabulky číslo 8 je patrné, že hodnota tPSA je u všech vzorků nižší než 70 \AA^2 . Všechny studované inhibitory tedy prochází přes hematoencefalickou bariéru dobře. Hodnoty logP jsou nejvyšší u vzorků 2 a 5, z tohoto pohledu mají tyto inhibitory největší potenciál být použity jako léčiva AD.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů a použitých standardů u vybraných enzymů hrajících roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění.

Nejprve byla Ellmanovou metodou stanovena inhibiční účinnost vůči cholinesterasám za použití ATCh a BTCh jako substrátu. Podle výsledných hodnot IC_{50} byl nejúčinnější inhibitor BChE číslo 4, jehož hodnota byla řádově srovnatelná s hodnotou rivastigminu, jenž byl použit jako standard. Ostatní inhibitory zdaleka nedosahovaly inhibiční účinnosti standardů, ať už za použití ATCh nebo BTCh.

Grafickým vyhodnocením podle Lineweavera a Burka a vyhodnocením změn kinetických parametrů K_M a V_m byl stanoven typ inhibice nejúčinnějšího inhibitoru jako kompetitivní. Pro nejúčinnější inhibitor byla také z grafu závislosti směrnice Lineweaver-Burkova výnosu na koncentraci inhibitoru odečtena hodnota inhibiční konstanty K_i .

Inhibiční účinnost byla stanovena také fluorescenční metodou za použití hAChE a eeAChE. U hAChE byla stanovena procenta inhibice, kdy se jako nejúčinnější inhibitor projevil inhibitor číslo 1. U eeAChE byla stanovena hodnota IC_{50} a nejúčinnějším inhibitorem byl inhibitor číslo 3, jehož hodnota IC_{50} byla srovnatelná s hodnotou IC_{50} donepezilu, jenž byl použit jako standard.

Následně byly určovány vhodné podmínky pro stanovení aktivity a inhibice POP. Dostatečné odezvy bylo dosaženo při teplotě 37 °C u koncentrace substrátu 0,25 mM a aktivity enzymu 1,1 U v reakční směsi. Pro tyto podmínky byly spočítány nelineární regresí a z rovnic regrese dvojitě reciprokého výnosu podle Lineweaver-Burka kinetické parametry K_M a V_m . Zároveň byla stanovena procenta inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči POP.

Poslední část této diplomové práce se věnuje stanovení inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči MAO B, kdy byla také stanovena procenta inhibiční účinnosti studovaných inhibitorů vůči tomuto enzymu. Žádný z inhibitorů však nedosahoval dostatečné inhibiční účinnosti ve srovnání s inhibiční účinností standardu.

Na závěr byl u všech inhibitorů stanoven rozdělovací koeficient a tPSA. Tyto hodnoty vypovídají o tom, jak dobře bude daná látka procházet přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru. Nejvhodnějším inhibitorem se jevil inhibitor číslo 5.

ZDROJE

ALJANABI, R; ALSOUS, L; SABBAH, D. A.; GUL, H. I.; GUL, M. et al. Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 19. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26196019>. [cit. 2024-02-20].

ALSAEED, D. a OMAR, S. F. Brain MRI Analysis for Alzheimer's Disease Diagnosis Using CNN-Based Feature Extraction and Machine Learning. Online. *Sensors*. 2022, roč. 22, č. 8. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s22082911>. [cit. 2024-03-22].

ARMSTRONG, R. Risk factors for Alzheimer's disease. Online. *Folia Neuropathologica*. 2019, roč. 57, č. 2, s. 87-105. ISSN 1641-4640. Dostupné z: <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>. [cit. 2024-03-18].

BALLARD, C.; GAUTHIER, S.; CORBETT, A.; BRAYNE, C.; AARSLAND, D. et al. Alzheimer's disease. Online. *The Lancet*. 2011, roč. 377, č. 9770, s. 1019-1031. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9). [cit. 2024-03-20].

BEHL, T.; KAUR, I.; SEHGAL, A.; SINGH, S.; SHARMA, N. et al. "Aducanumab" making a comeback in Alzheimer's disease: An old wine in a new bottle. Online. 2022, roč. 148. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112746>. [cit. 2024-05-03].

BEHL, T.; KAUR, D.; SEHGAL, A.; SINGH, S.; SHARMA, N. et al. Role of Monoamine Oxidase Activity in Alzheimer's Disease: An Insight into the Therapeutic Potential of Inhibitors. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 12. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26123724>. [cit. 2024-02-16].

BOMASANG-LAYNO, E. a BRONSTHER, R. Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease. Online. *Delaware Journal of Public Health*. 2021, roč. 7, č. 4, s. 74-85. ISSN 2639-6378. Dostupné z: <https://doi.org/10.32481/djph.2021.09.009>. [cit. 2024-04-03].

BONO, G. F.; SIMÃO-SILVA, D. P.; BATISTELA, M. S.; JOSVIK, N. D. et al. Butyrylcholinesterase: K variant, plasma activity, molecular forms and rivastigmine treatment in Alzheimer's disease in a Southern Brazilian population. Online. *Neurochemistry International*. 2015, roč. 81, s. 57-62. ISSN 01970186. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.12.009>. [cit. 2024-01-15].

BREIJYEH, Z. a KARAMAN, R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Online. *Molecules*. 2020, roč. 25, č. 24. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>. [cit. 2024-03-15].

BRETTSCHEIDER, J.; TREDICI, K. D.; LEE, V. M.-Y. a TROJANOWSKI, J. Q. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. Online. *Nature Reviews Neuroscience*. 2015, roč. 16, č. 2, s. 109-120. ISSN 1471-003X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrn3887>. [cit. 2024-03-18].

CAHLÍKOVÁ, L.; HRABINOVÁ, M.; KULHÁNKOVÁ, A.; BENEŠOVÁ, N.; CHLEBEK, J. et al. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. Online. *Natural Product Communications*. 2013, roč. 8, č. 11. ISSN 1934-578X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801110>. [cit. 2024-05-01].

CIPRIANI, G.; DOLCIOTTI, C.; PICCHI, L. a BONUCCELLI, U. Alzheimer and his disease: a brief history. Online. *Neurological Sciences*. 2011, roč. 32, č. 2, s. 275-279. ISSN 1590-1874. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10072-010-0454-7>. [cit. 2024-03-14].

DE BOER, D.; NGUYEN, N.; MAO, J.; MOORE, J. a SORIN, E. J. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. Online. *Biomolecules*. 2021, roč. 11, č. 4. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom11040580>. [cit. 2024-01-15].

DINGOVA, D.; LEROY, J.; CHECK, A.; GARAJ, V.; KREJCI, E. et al. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. Online. *Analytical Biochemistry*. 2014, roč. 462, č. 9, s. 67-75. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.031>. [cit. 2024-03-01].

DU, X.; WANG, X. a GENG, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. Online. *Translational Neurodegeneration*. 2018, roč. 7, č. 1. ISSN 2047-9158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>. [cit. 2024-03-18].

DUNAEVSKY, Y. E.; TERESHCHENKOVA, V. F.; OPPERT, B.; BELOZERSKY, M. A.; FILIPPOVA, I. Y. et al. Human proline specific peptidases: A comprehensive analysis. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2020, roč. 1864, č. 9. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129636>. [cit. 2024-02-03].

DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. L. a SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. Online. *Chemico-Biological Interactions*.

2010, roč. 187, č. 1-3, s. 10-22. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>. [cit. 2024-01-20].

ECKROAT, T. J.; MANROSS, D. L. a COWAN, S. C. Merged Tacrine-Based, Multitarget-Directed Acetylcholinesterase Inhibitors 2015–Present: Synthesis and Biological Activity. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020, roč. 21, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms21175965>. [cit. 2024-01-22].

FIŠAR, Z. Drugs related to monoamine oxidase activity. Online. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2016, roč. 69, s. 112-124. ISSN 02785846. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.02.012>. [cit. 2024-02-20].

GARCÍA-MORALES, V.; GONZÁLEZ-ACEDO, A.; MELGUIZO-RODRÍGUEZ, L.; PARDO-MORENO, T.; COSTELA-RUIZ, V. J. et al. Current Understanding of the Physiopathology, Diagnosis and Therapeutic Approach to Alzheimer's Disease. Online. *Biomedicines*. 2021, roč. 9, č. 12. ISSN 2227-9059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121910>. [cit. 2024-03-14].

HANSSON, O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. Online. *Nature Medicine*. 2021, roč. 27, č. 6, s. 954-963. ISSN 1078-8956. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01382-x>. [cit. 2024-04-29].

HARITHA, M.; SREERAG, M. a SURESH, Ch. H. Quantifying the hydrogen-bond propensity of drugs and its relationship with Lipinski's rule of five. Online. *New Journal of Chemistry*. 2024, roč. 48, č. 11, s. 4896-4908. ISSN 1144-0546. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/D3NJ05476D>. [cit. 2024-04-28]. PRASANNA, S. a DOERKSEN, R. Topological Polar Surface Area: A Useful Descriptor in 2D-QSAR. Online. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, roč. 16, č. 1, s. 21-41. ISSN 09298673. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/092986709787002817>. [cit. 2024-04-28].

HOLAS, O.; MUSILEK, K.; POHANKA, M. a KUČA, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. Online. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012, roč. 7, č. 12, s. 1207-1223. ISSN 1746-0441. Dostupné z: <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.729037>. [cit. 2024-03-03].

CHAURASIYA, N.; IBRAHIM, M.; MUHAMMAD, I.; WALKER, L. a TEKWANI, B. Monoamine Oxidase Inhibitory Constituents of Propolis: Kinetics and Mechanism of Inhibition of Recombinant Human MAO-A and MAO-B. Online. *Molecules*. 2014, roč. 19, č. 11, s.

18936-18952. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules191118936>. [cit. 2024-02-16].

CHEN, Z.-R.; HUANG, J.-B.; YANG, S.-L. a HONG, F.-F. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. Online. *Molecules*. 2022, roč. 27, č. 6. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27061816>. [cit. 2024-03-15].

IACOVINO, L. G.; MAGNANI, F. a BINDA, C. The structure of monoamine oxidases: past, present, and future. Online. *Journal of Neural Transmission*. 2018, roč. 125, č. 11, s. 1567-1579. ISSN 0300-9564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1915-z>. [cit. 2024-02-18].

IŞIK, M.; LEVORSE, D.; MOBLEY, D. L.; RHODES, T. a CHODERA, J. D. Octanol-water partition coefficient measurements for the SAMPL6 blind prediction challenge. Online. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2020, roč. 34, č. 4, s. 405-420. ISSN 0920-654X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10822-019-00271-3>. [cit. 2024-04-28].

JASIECKI, J.; SZCZOCZARZ, A.; CYSEWSKI, D.; LEWANDOWSKI, K.; SKOWRON, P. et al. Butyrylcholinesterase-Protein Interactions in Human Serum. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 19. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms221910662>. [cit. 2024-01-15].

KLIMAVICIUSA, L.; JAIN, R. K.; JAAKO, K.; VAN ELZEN, R.; GERARD, M. et al. In situ prolyl oligopeptidase activity assay in neural cell cultures. Online. *Journal of Neuroscience Methods*. 2012, roč. 204, č. 1, s. 104-110. ISSN 01650270. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.11.011>. [cit. 2024-02-04].

KNOPMAN, D. S.; AMIEVA, H.; PETERSEN, R. C.; CHÉTELAT, G.; HOLTZMAN, D. M. et al. Alzheimer disease. Online. *Nature Reviews Disease Primers*. 2021, roč. 7, č. 1. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>. [cit. 2024-03-20].

KORABECNY, J. a SOUKUP, O. Cholinesterase Research. Online. *Biomolecules*. 2021, roč. 11, č. 8. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom11081121>. [cit. 2024-01-14].

KRÁTKÝ, M.; ŠTĚPÁNKOVÁ, Š.; HOUNGBEDJI, N.-H.; VOSÁTKA, R.; VORČÁKOVÁ, K. et al. 2-Hydroxy-N-phenylbenzamides and Their Esters Inhibit Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. Online. *Biomolecules*. 2019, roč. 9, č. 11. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom9110698>. [cit. 2024-05-03].

LANE, C. A.; HARDY, J. a SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. Online. *European Journal of Neurology*. 2018, roč. 25, č. 1, s. 59-70. ISSN 1351-5101. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ene.13439>. [cit. 2024-03-20].

LASSE, C.; AZEVEDO, C. S.; DE ARAÚJO, C. N.; MOTTA, F. N.; ANDRADE, M. A. et al. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2020, roč. 11. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01060>. [cit. 2024-04-16].

LI, Q.; HE, S.; CHEN, Y.; FENG, F.; QU, W. et al. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, roč. 158, s. 463-477. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.031>. [cit. 2024-01-21].

LI, Q.; YANG, H.; CHEN, Y. a SUN, H. Recent progress in the identification of selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, roč. 132, s. 294-309. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.062>. [cit. 2024-01-15].

LI, S.; LI, A. J.; TRAVERS, J.; XU, T.; SAKAMURU, S. et al. Identification of Compounds for Butyrylcholinesterase Inhibition. Online. *SLAS Discovery*. 2021, roč. 26, č. 10, s. 1355-1364. ISSN 24725552. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/24725552211030897>. [cit. 2024-01-15].

LIU, P.-P.; XIE, Y.; MENG, X.-Y. a KANG, J.-S. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. Online. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2019, roč. 4, č. 1. ISSN 2059-3635. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>. [cit. 2024-03-16].

LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. Online. 2015, roč. 148, s. 34-46. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>. [cit. 2024-01-15].

MANZOOR, S. a HODA, N. A comprehensive review of monoamine oxidase inhibitors as Anti-Alzheimer's disease agents: A review. Online. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020, roč. 206. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112787>. [cit. 2024-02-16].

MARKESBERY, W. R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. Online. Free Radical Biology and Medicine. 1997, roč. 23, č. 1, s. 134-147. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00629-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00629-6). [cit. 2024-03-18].

MIAO, Y.; HE, N. a ZHU, J.-J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. Online. Chemical Reviews. 2010, roč. 110, č. 9, s. 5216-5234. ISSN 0009-2665. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/cr900214c>. [cit. 2024-03-01].

POHANKA, M. a ZAKOVA, J. A Smartphone Camera Colorimetric Assay of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activity. Online. Sensors. 2021, roč. 21, č. 5. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/s21051796>. [cit. 2024-01-15].

POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. Online. Bratislava Medical Journal. 2013, roč. 114, č. 12, s. 726-734. ISSN 1336-0345. Dostupné z: https://doi.org/10.4149/BLL_2013_153. [cit. 2024-01-15].

POHANKA, M. Stanovení aktivity cholinesteras a jejich využití pro diagnostiku patologických stavů. Online. Česká a slovenská farmacie. 2017, roč. 66, č. 4, s. 147-153. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-slovenska-farmacie/2017-4/stanoveni-aktivity-cholinesteras-a-jejich-vyuziti-pro-diagnostiku-patologickych-stavu-62678/download?hl=cs>. [cit. 2024-02-29].

PORTUGAL, B.; MOTTA, F. N.; CORREA, A. F.; NOLASCO, D. O.; DE ALMEIDA, H. et al. Mycobacterium tuberculosis Prolyl Oligopeptidase Induces In vitro Secretion of Proinflammatory Cytokines by Peritoneal Macrophages. Online. Frontiers in Microbiology. 2017, roč. 08. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00155>. [cit. 2024-04-16].

PRZYBYŁOWSKA, M.; KOWALSKI, S.; DZIERZBICKA, K. a INKIELEWICZ-STEPNIAK, I. Therapeutic Potential of Multifunctional Tacrine Analogues. Online. Current Neuropharmacology. 2019, roč. 17, č. 5, s. 472-490. ISSN 1570159X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412091908>. [cit. 2024-04-03].

RAMSAY, R. R. a ALBREHT, A. Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. Online. Journal of Neural Transmission. 2018, roč. 125, č. 11, s. 1659-1683. ISSN 0300-9564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1861-9>. [cit. 2024-02-16].

REITZ, Ch. a MAYEUX, R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. Online. *Biochemical Pharmacology*. 2014, roč. 88, č. 4, s. 640-651. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>. [cit. 2024-03-16].

ROTUNDO, R. L. Biogenesis, assembly and trafficking of acetylcholinesterase. Online. *Journal of Neurochemistry*. 2017, roč. 142, č. S2, s. 52-58. ISSN 0022-3042. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jnc.13982>. [cit. 2024-01-21].

SALEEM, T. J.; ZAHRA, S. R.; WU, F.; ALWAKEEL, A.; ALWAKEEL, M. et al. Deep Learning-Based Diagnosis of Alzheimer's Disease. Online. *Journal of Personalized Medicine*. 2022, roč. 12, č. 5. ISSN 2075-4426. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jpm12050815>. [cit. 2024-03-21].

SANTARPIA, L.; GRANDONE, I.; CONTALDO, F. a PASANISI, F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. Online. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2013, roč. 4, č. 1, s. 31-39. ISSN 2190-5991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5>. [cit. 2024-01-15].

SHULMAN, K. I.; HERRMANN, N. a WALKER, S. E. Current Place of Monoamine Oxidase Inhibitors in the Treatment of Depression. Online. *CNS Drugs*. 2013, roč. 27, č. 10, s. 789-797. ISSN 1172-7047. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0097-3>. [cit. 2024-02-18].

SCHELTENS, P.; BLENNOW, K.; BRETELER, M. M. B.; DE STROOPER, B. et al. Alzheimer's disease. Online. *The Lancet*. 2016, roč. 388, č. 10043, s. 505-517. ISSN 01406736. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01124-1). [cit. 2024-03-15].

SIATKA, T.; ADAMCOVÁ, M.; OPLETAL, L.; CAHLÍKOVÁ, L.; JUN, D. et al. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from *Argemone platyceras* (Papaveraceae). Online. *Molecules*. 2017, roč. 22, č. 7. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules22071181>. [cit. 2024-02-01].

SILMAN, I. a SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function? Online. *Chemico-Biological Interactions*. 2008, roč. 175, č. 1-3, s. 3-10. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.035>. [cit. 2024-01-22].

SILMAN, I. The multiple biological roles of the cholinesterases. Online. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2021, roč. 162, s. 41-56. ISSN 00796107. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2020.12.001>. [cit. 2024-01-21].

SILVA, M. V. F.; LOURES, C. de M. G.; ALVES, L. C. V.; DE SOUZA, L. C.; BORGES, K. B. G. et al. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. Online. *Journal of Biomedical Science*. 2019, roč. 26, č. 1. ISSN 1423-0127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>. [cit. 2024-03-16].

SURESH, S. N.; CHAKRAVORTY, A.; GIRIDHARAN, M.; GARIMELLA, L. a MANJITHAYA, R. Pharmacological Tools to Modulate Autophagy in Neurodegenerative Diseases. Online. *Journal of Molecular Biology*. 2020, roč. 432, č. 8, s. 2822-2842. ISSN 00222836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.023>. [cit. 2024-03-18].

SVARCBABS, R.; JULKU, U.; KILPELÄINEN, T.; KYRÖ, M.; JÄNTTI, M. et al. New tricks of prolyl oligopeptidase inhibitors – A common drug therapy for several neurodegenerative diseases. Online. *Biochemical Pharmacology*. 2019, roč. 161, s. 113-120. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.01.013>. [cit. 2024-02-01].

SZELTNER, Z.; JUHÁSZ, T.; SZAMOSI, I.; REA, D.; FÜLÖP, V. et al. The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2013, roč. 1834, č. 1, s. 98-111. ISSN 15709639. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.012>. [cit. 2024-02-03].

ŠTĚPÁNKOVÁ, Š. a VORČÁKOVÁ, K. Cholinesterase-based biosensors. Online. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016, roč. 31, č. sup3, s. 180-193. ISSN 1475-6366. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1204609>. [cit. 2024-03-03].

TALESA V. N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. Online. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001, roč. 122, č. 16, s. 1961-1969. ISSN 00476374. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00309-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00309-8). [cit. 2024-01-14].

TOPPILA, M.; HYTTI, M.; KORHONEN, E.; RANTA-AHO, S.; HARJU, N. et al. The Prolyl Oligopeptidase Inhibitor KYP-2047 Is Cytoprotective and Anti-Inflammatory in Human Retinal Pigment Epithelial Cells with Defective Proteasomal Clearance. Online. *Antioxidants*. 2023, roč. 12, č. 6. ISSN 2076-3921. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox12061279>. [cit. 2024-02-04].

VAN CAUWENBERGHE, C.; VAN BROECKHOVEN, Ch. a SLEEGERS, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. Online.

Genetics in Medicine. 2016, roč. 18, č. 5, s. 421-430. ISSN 10983600. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>. [cit. 2024-03-18].

WALCZAK-NOWICKA, Ł. J. a HERBET, M. Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Neurodegenerative Diseases and the Role of Acetylcholinesterase in their Pathogenesis. Online. International Journal of Molecular Sciences. 2021, roč. 22, č. 17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22179290>. [cit. 2024-01-21].

WANG, Ch. Ch.; BILLET, E.; BORCHERT, A.; KUHN, H. a UFER, Ch. Monoamine oxidases in development. Online. Cellular and Molecular Life Sciences. 2013, roč. 70, č. 4, s. 599-630. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1065-7>. [cit. 2024-02-20].

XIAO, T.; WANG, S.; YAN, M.; HUANG, J. a YANG, X. A thiamine-triggered fluorometric assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening based on oxidase-like activity of MnO₂ nanosheets. Online. Talanta. 2021, roč. 221, č. 12, s. 1207-1223. ISSN 00399140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121362>. [cit. 2024-03-03].

YIANNOPOULOU, K. G. a PAPAGEORGIU, S. G. Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. Online. Journal of Central Nervous System Disease. 2020, roč. 12. ISSN 1179-5735. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1179573520907397>. [cit. 2024-04-03].

ZHANG, H.; WANG, Y.; WANG, Y.; LI, X.; WANG, S. et al. Recent advance on carbamate-based cholinesterase inhibitors as potential multifunctional agents against Alzheimer's disease. Online. European Journal of Medicinal Chemistry. 2022, roč. 240. ISSN 02235234. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114606>. [cit. 2024-03-14].

ZHANG, X.-X.; TIAN, Y.; WANG, Z.-T.; MA, Y.-H.; TAN, L. et al. The Epidemiology of Alzheimer's Disease Modifiable Risk Factors and Prevention. Online. The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease. 2021, s. 1-9. ISSN 22745807. Dostupné z: <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.15>. [cit. 2024-03-16].

ZHOU, M. a PANCHUK-VOLOSHINA, N. A One-Step Fluorometric Method for the Continuous Measurement of Monoamine Oxidase Activity. Online. Analytical Biochemistry. 1997, roč. 253, č. 2, s. 169-174. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2392>. [cit. 2024-04-06].