

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Stanovení kinetických parametrů acetylcholinesterázy

Bc. Veronika Folcová

Diplomová práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Determination of kinetic parameters of acetylcholinesterase

Bc. Veronika Folcová

Thesis

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Folcová**
Osobní číslo: **C16445**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení kinetických parametrů acetylcholinesterázy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se cholinesteráz, jejich struktury, funkce a souvislosti s Alzheimerovou chorobou.
2. Shrnout poznatky o Alzheimerově chorobě a možnostech její léčby.
3. Popsat metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

Experimentální část:

1. Stanovit inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů acetylcholinesterázy Ellmanovou metodou.
2. Stanovit kinetické parametry neinhibovaných a inhibovaných hydrolyz acetylthiocholinu Ellmanovou metodou a pomocí tříelektrodových senzorů. Vypočítat inhibiční konstanty.
3. Stanovit typ inhibice.
4. Stanovit rozdělovací koeficient v systému n-oktanol:voda.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Katarína Vorčáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

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

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Veronika Folcová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Kataríně Vorčákové, PhD. a Mgr. Šárce Štěpánkové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a za čas, který mi věnovaly v průběhu celé diplomové práce. Děkuji také své rodině za veškerou podporu během studia.

ANOTACE

Tématem této práce je stanovení kinetických parametrů acetylcholinesterázy. Teoretická část je věnována cholinesterázám. Zabývá se popisem jejich struktury, funkce a souvislostmi acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy s Alzheimerovou chorobou. Velká část teoretické části je věnována popisu metod stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz. V experimentální části se práce zabývá stanovením hodnot IC_{50} daných inhibitorů Ellmanovou metodou, pH-statovou metodou a pomocí elektrochemických senzorů technikou square wave voltametrie. Dále stanovením kinetických parametrů neinhibované reakce zmíněnými metodami a stanovením kinetických parametrů inhibované reakce a inhibičních konstant vybraných inhibitorů Ellmanovou metodou. Experimentální část je také věnována stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda.

KLÍČOVÁ SLOVA

acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, Alzheimerova choroba, metody stanovení, Ellmanova metoda, pH-stat, elektrochemický senzor

TITTLE

Determination of kinetic parameters of acetylcholinesterase

ANNOTATION

This thesis is focused on the determination of kinetic parameters of acetylcholinesterase. In the theoretical part there are described cholinesterases, their structure, function and acetylcholinesterase and butyrylcholinestrace relationships with Alzheimer's disease. A large part of the theoretical part is devoted to the description of methods of activity and inhibition cholinesterases determination. In the experimental part there is described determination of IC_{50} values of given inhibitors by Ellman's method, pH-stat method and electrochemical sensors using square wave voltammetry technique. Furthermore, there is described determination of kinetic parameters of uninhibited reaction by mentioned methods and there is described determination of kinetic parameters of inhibited reaction and inhibitory constants of selected inhibitors by the Ellman's method too. The experimental part is also devoted to the determination of the partition coefficients of the tested inhibitors in the 1-octanol:water system.

KEYWORDS

acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, assay methods, Ellman's method, pH-stat, electrochemical sensor

SEZNAM ZKRATEK

ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ATCH	acetylthiocholin
ATCHCl	acetylthiocholin chlorid
ATCHI	acetylthiocholin jodid
BCH	butyrylcholin
BCHE	butyrylcholinesteráza
BTCH	butyrylthiocholin
BTCHI	butyrylthiocholin jodid
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNA	6,6'-dithiodinikotinová kyselina
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
HA	kyselina octová (acetic acid)
CH	cholin
CHAT	cholin-acetyltransferáza
CHE(s)	cholinesteráza (cholinesterázy)
CHO	cholinoxidáza
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu
K _I	inhibiční konstanta
K _M	Michaelisova konstanta
K _{ow}	rozdělovací koeficient
M _r	molekulová hmotnost
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PDS	dithiodipyridin, (pyridyl disulfide)
PSA	polární povrch molekuly (polar surface area)
RS	reakční směs
tPSA	topologický polární povrch molekuly (topological PSA)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
V _m	mezní rychlost

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura ACHE	16
Obrázek 2 Aktivní místo lidské ACHE	17
Obrázek 3 Funkce ACHE u nervové synapse	18
Obrázek 4 Základní CHEs inhibitory používané v terapii AD	23
Obrázek 5 Reakční schéma vystihující princip stanovení aktivity/inhibice ACHE elektrochemicky s využitím bi-enzymatického systému (ACHE/CHO)	35
Obrázek 6 Princip Ellmanovy metody	41
Obrázek 7 Princip titrační metody stanovení aktivity/inhibice ACHE.....	47
Obrázek 8 Reakční schéma vystihující princip stanovení aktivity/inhibice ACHE elektrochemicky s využitím mono-enzymatického systému a substrátu ATCH	50

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Příklad závislosti absorpance A na čase t při stanovení aktivity ACHE	52
Graf 2 Příklad závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$	54
Graf 3 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu ATCHI.....	56
Graf 4 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu ATCHCl	56
Graf 5 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu BTCHI.....	57
Graf 6 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 2	58
Graf 7 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 6	59
Graf 8 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 2 v RS při konstantních koncentracích substrátu $[S]$	60
Graf 9 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 6 v RS při konstantních koncentracích substrátu $[S]$	60
Graf 10 Příklad závislosti poměrů rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 2	62
Graf 11 Příklad závislosti poměrů rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 6	63
Graf 12 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu ACH	64
Graf 13 Příklad závislosti reciprokových hodnot výšky píku proudové odezvy $1/I$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu ATCHI.....	65
Graf 14 Příklad závislosti reciprokových hodnot výšky píku proudové odezvy $1/I$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu BTCHI	66

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled studovaných inhibitorů	40
Tabulka 2 Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 1-7 a standardů rivastigminu a galantaminu	54
Tabulka 3 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce	57
Tabulka 4 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m inhibované reakce (inhibitor č. 2)	58
Tabulka 5 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m inhibované reakce (inhibitor č. 6)	59
Tabulka 6 Hodnoty K_I inhibitorů č. 2 a 6	60
Tabulka 7 Hodnoty K_{ow} , M_r a tPSA testovaných inhibitorů	61
Tabulka 8 Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 2 a 6	63
Tabulka 9 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce ACH	64
Tabulka 10 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce	66

OBSAH

ÚVOD	14
1 TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Cholinesterázy	15
1.1.1 Acetylcholinesteráza	15
1.1.1.1 Struktura	15
1.1.1.2 Funkce	17
1.1.1.3 Syntéza acetylcholinu	18
1.1.2 Butyrylcholinesteráza	18
1.1.2.1 Struktura	18
1.1.2.2 Funkce	19
1.1.3 Role ACHE a BCHE u Alzheimerovy choroby	19
1.1.3.1 Léčba Alzheimerovy choroby	21
1.1.3.2 Diagnostika Alzheimerovy choroby	24
1.2 Metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz	25
1.2.1 Přehled analytických metod	25
1.2.2 Spektrofotometrické metody	30
1.2.2.1 Ellmanova metoda	30
1.2.3 Potenciometrické metody	33
1.2.4 Elektrochemické ACHE biosenzory	34
2 CÍL PRÁCE	37
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
3.1 Použité přístroje	38
3.2 Použité chemikálie	38
3.3 Spektrofotometrické metody	41
3.3.1 Ellmanova metoda	41
3.3.1.1 Princip	41
3.3.1.2 Stanovení enzymové aktivity ACHE	41
3.3.1.3 Stanovení IC ₅₀ testovaných inhibitorů a standardů rivastigminu a galantaminu	42
3.3.1.4 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované a inhibované reakce a určení K _I testovaného inhibitoru	43
3.3.2 Stanovení K _{ow} testovaných inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda	45
3.4 Potenciometrické metody	47

3.4.1	pH-stat.....	47
3.4.1.1	Princip	47
3.4.1.2	Stanovení IC ₅₀ inhibitoru č. 2 a 6.....	47
3.4.1.3	Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce	48
3.5	Elektrochemické senzory	49
3.5.1	Square wave voltametrie.....	49
3.5.1.1	Princip	49
3.5.1.2	Stanovení IC ₅₀ inhibitoru č. 2 a 6.....	50
3.5.1.3	Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce	51
4	VÝSLEDKY	52
4.1	Spektrofotometrické metody	52
4.1.1	Ellmanova metoda	52
4.1.1.1	Stanovení enzymové aktivity ACHE	52
4.1.1.2	Stanovení IC ₅₀ testovaných inhibitorů a standardů rivastigminu a galantaminu.....	53
4.1.1.3	Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované a inhibované reakce a určení K _i testovaného inhibitoru.....	55
4.1.2	Stanovení K _{ow} testovaných inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda	61
4.2	Potenciometrické metody	61
4.2.1	pH-stat.....	61
4.2.1.1	Stanovení IC ₅₀ inhibitoru č. 2 a 6.....	61
4.2.1.2	Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce	63
4.3	Elektrochemické senzory	64
4.3.1	Square wave voltametrie.....	64
4.3.1.1	Stanovení IC ₅₀ inhibitoru č. 2 a 6.....	64
4.3.1.2	Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce	65
5	DISKUZE	67
	ZÁVĚR	70
	CITOVANÁ LITERATURA	71

ÚVOD

První zmínky o existenci enzymu schopného hydrolyzy acetylcholinu (ACH) na cholin (CH) a kyselinu octovou (HA) poprvé popsal Dale ve své práci v roce 1914. Tato původní práce byla propracována Loewim a Navrátilem v roce 1926 a od té doby byla existence acetylcholinesterázy (ACHE) potvrzena mnoha vědci [1]. Následoval vývoj mnoha metod, které by určovaly a popisovaly aktivitu a inhibici ACHE. Mezi první metody se řadí využití změny pH v důsledku hydrolyzy ACH několika způsoby. Například Stedman v roce 1932 zavedl titrační techniku úpravou metody podle Willstaettera. Dále Ammon v roce 1933 představil Warburgovu manometrickou metodu, která je založena na měření oxidu uhličitého uvolněného z hydrogenuhličitanového pufru HA. Následovalo představení spektrofotometrické metody založené na reakci zbývajícího substrátu ACH s hydroxylaminem podle Hestrina v roce 1949 [2]. V roce 1961 byla představena nepochybně nejpoužívanější fotometrická metoda, která si drží svoji popularitu dodnes, tzv. Ellmanova metoda [3]. Pozadu však nezůstávaly ani elektrochemické senzory. Jedním z hlavních průkopníků v oblasti senzorů je George Gerry Guilbault, který v roce 1963 demonstroval biosenzor s imobilizovanou ACHE pro stanovení nervově paralytických látek a pesticidů [4].

V současnosti je známa celá řada metod, kterými se stanovuje aktivita a inhibice cholinesteráz (CHEs). Tato práce se především věnuje popisu stávajících metod stanovení aktivity a inhibice ACHE. Velká pozornost je věnována hlavně Ellmanově metodě, pH-statové metodě a elektrochemickým senzorům po teoretické i experimentální stránce. Práce se také věnuje popisu struktury a funkce CHEs - jak ACHE, tak butyrylcholinesterázy (BCHE). Práce se také zmiňuje o souvislostech ACHE a BCHE s Alzheimerovou chorobou (AD) a o možnostech léčby a diagnostiky zmíněné choroby.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Cholinesterázy

CHEs jsou α/β serinové hydrolázy přítomné u obratlovců a hmyzu [5]. Jsou známé dva typy CHEs a to ACHE, která má vysoké hladiny převážně v mozku, v nervových buňkách a v červených krvinkách, a BCHE, která se nejvíce nachází v krevním séru, v slinivce břišní, v játrech a v centrálním nervovém systému [6]. Hlavní enzymatickou funkcí ACHE je hydrolýza ACH, kde u nervových synapsí přerušuje přenos nervových impulzů hydrolýzou tohoto neurotransmiteru. Příbuzný enzym BCHE, také nazývána jako pseudocholinesteráza či nespecifická cholinesteráza, nemá žádnou známou fyziologickou funkci, avšak je prokázán její toxikologický význam. BCHE působí jako tzv. záchranný enzym vázající toxické látky, které by mohly inhibovat ACHE. BCHE se od ACHE liší v kinetické odpovědi na koncentraci ACH. BCHE je méně účinná v hydrolýze ACH při jeho nízkých koncentracích, ale vysoce účinná při vysokých koncentracích tohoto substrátu, při kterých je ACHE inhibována. BCHE by se mohla tedy uplatňovat při hydrolýze neurotransmiteru ACH a sloužit tak jako tzv. záložní enzym [7].

CHEs mohou být inhibovány různorodými chemickými sloučeninami s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, jako jsou např. organofosfátové a karbamátové pesticidy, nervově paralytické látky, přírodní toxiny a léky. Inhibice CHEs má tedy toxikologické a farmakologické uplatnění. Stanovení aktivity a inhibice CHEs se uplatňuje ve velmi širokém spektru oblastí zahrnující farmaceutický průmysl, zdravotnictví, potravinářský průmysl, zemědělství, životní prostředí a vojenství [8]. CHEs jsou také spojovány s lidskou pamětí a AD [9, 10].

1.1.1 Acetylcholinesteráza

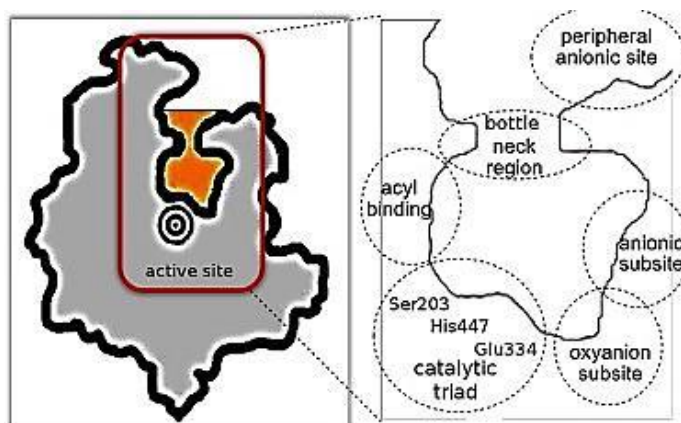
1.1.1.1 Struktura

Krystalová struktura ACHE byla poprvé vizualizována u parejnoka *Torpedo californica* [5]. Monomer enzymu se skládá z dvanácti β skládaných listů, které jsou obklopeny čtrnácti α helixy [11]. Struktura ACHE je zobrazena na obr. 1.



Obrázek 1 Struktura ACHE [12]

Katalytická jednotka enzymu se skládá z periferního aniontového místa, z prohlubně aktivního místa a z katalytického aktivního místa. Periferní aniontové místo slouží jako selektivní brána pro ACH. Vazbou substrátu na periferní aniontové místo začíná počáteční krok v katalytické dráze. Charakteristickou vlastností struktury ACHE je hluboká a úzká prohlubeň tzv. prohlubeň aktivního místa, asi 20 Å dlouhá, končící uprostřed molekuly enzymu. Tato prohlubeň je lemována 14 aromatickými kruhy aminokyselin převážně Phe, Trp, a Tyr. Přítomnost aromatických hydrofobních zbytků pomáhá k zavedení ACH do katalytického aktivního místa. Katalytické aktivní místo se skládá ze dvou hlavních podjednotek a to z esterového a aniontového. V rámci esterové podjednotky je umístěno vazebné místo pro acyl tzv. acylová kapsa a je zde umístěna také oxyaniontová jamka. Acylová kapsa je místem, kde je acylová skupina ACH zachycena během katalýzy. Oxyaniontová jamka by mohla být tvořena amidovými dusíky hlavního řetězce Gly a Ala, které tak interagují s karbonylovým kyslíkem ACH. Aniontová podjednotka slouží k interakci s kladně nabitou kvartérní skupinou CH. Kvarterní dusík pravděpodobně interaguje přednostně s π elektrony aromatických kruhů. Esterová podjednotka ACHE parejnoka *Torpedo californica*, kde je ACH hydrolyzován na acetát a CH, obsahuje triádu tří aminokyselin a to Ser 200, His 440 a Glu 327 [11]. Katalytická jednotka lidské ACHE je zobrazena na obr. 2.



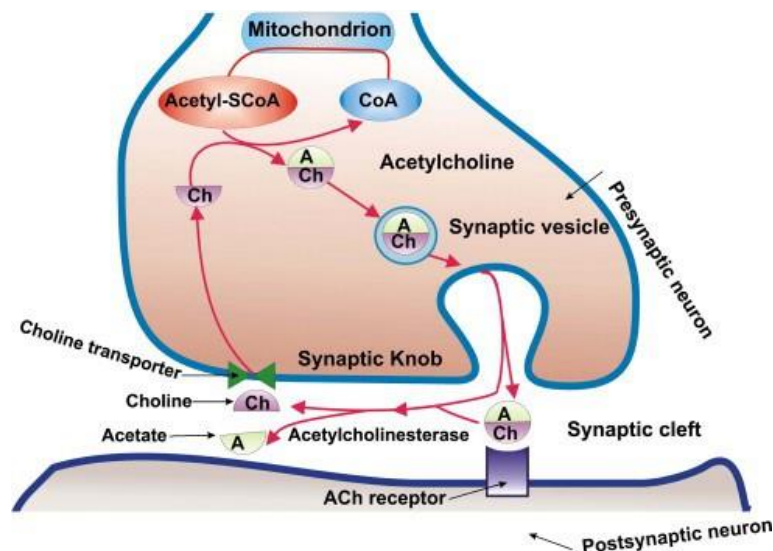
Obrázek 2 Aktivní místo lidské ACHE včetně znázornění katalytické triády Ser 203, His 447, Glu 334 [13]

Hydrolytickou reakcí esteru dochází k tvorbě acyl-enzymu a volného CH. Poté acyl-enzym podléhá nukleofilnímu ataku molekuly vody a za pomoci aminokyseliny His 440 se uvolní kyselina octová a dojde k regeneraci enzymu [11].

Enzym ACHE existuje ve více molekulárních formách, které mají podobné katalytické vlastnosti. Bohatý růst molekulárního polymorfismu ACHE je dán alternativním sestřihem, transkripčními, post-transkripčními a post-translačními modifikacemi. To znamená, že lidská ACHE existuje ve vícečetných molekulárních formách, a to jako G1 (monomer o velikosti 69 kDa), G2 (dimer o velikosti 131 kDa, kde dva monomery jsou spojené disulfidickou vazbou Cys-Cys) a G4 (tetramer o velikosti 275 kDa, kde dva G2 dimery jsou spojené hydrofobními interakcemi). V mozku savce se ACHE vyskytuje většinou jako tetramerní forma G4, zatímco monomerní G1 forma je zastoupena mnohem méně [8].

1.1.1.2 Funkce

Hlavní biologickou funkcí ACHE je ukončení nervového přenosu na cholinergních receptorech rychlou hydrolyzou neurotransmiteru ACH. ACHE má obrovský dipólový moment, kterým přitahuje pozitivně nabitý ACH. Neurotransmitter je zachycen do prohlubně enzymu a je rychle vtahován do aktivního místa ACHE [11]. Katalytická reakce ACHE probíhá nejprve nukleofilním atakem na karbonylový uhlík ACH, poté následuje acylace enzymu a vznik volného CH. Nakonec dojde k rychlé hydrolyze acylovaného enzymu, uvolnění HA a k obnovení aktivního místa [14]. Funkce ACHE u nervové synapse je znázorněna na obr. 3.



Obrázek 3 Funkce ACHE u nervové synapse [15]

ACHE je také zapojena do mnoha buněčných procesů včetně embryogeneze, synaptogeneze, neuritogeneze, hematopoézy, trombopoézy, adheze buněk a apoptózy. ACHE je také spojována s tvorbou amyloidních plaků u AD [9].

1.1.1.3 Syntéza acetylcholinu

ACh, neurotransmitter autonomního nervového systému sympatiku a parasympatiku, centrálního nervového systému a nervosvalové ploténky, je syntetizován jednostupňovou reakcí katalyzovanou biosyntetickým enzymem cholin-acetyltransferázou (CHAT). Většina ACh je obsažena ve vezikulách v nervových zakončeních a malé množství volného ACh je obsaženo v cytosolu. Během nervového přenosu je ACh uvolněn z presynaptické membrány axonu do synaptické štěrby a váže se na ACh receptory nikotinové či muskarinové postsynaptické membrány dendritu. ACHE, nacházející se také na postsynaptické membráně, ukončí nervový přenos hydrolyzou ACh. Volný cholin, který pochází z hydrolyzovaného neurotransmiteru, je opět přijat presynaptickým neuronem, aby mohl být ACh resyntetizován z Ch a acetyl-CoA za katalýzy CHAT [14].

1.1.2 Butyrylcholinesteráza

1.1.2.1 Struktura

Struktura BCHE je velmi podobná struktuře ACHE. Mezi těmito dvěma enzymy je 53,8% podobnost v jejich sekvenci. BCHE patří, tak jako ACHE, do skupiny α/β serinových hydroláz. Katalytická jednotka enzymu se skládá z periferního aniontového místa nacházejícího se na povrchu enzymu, z úzké prohlubně, která je lemována aromatickými zbytky aminokyselin, a z aktivního místa na dně prohlubně enzymu.

Aminokyseliny Asp 70 a Tyr 332 lidské BCHE se podílejí na tvorbě počáteční vazby nabitého substrátu, jako je butyrylcholin (BCH), a umožňují mu vstoupit do aktivního místa. Prohlubeň tvořená aromatickými zbytky aminokyselin představuje hlavní rozdíl mezi ACHE a BCHE. Zatímco prohlubeň ACHE je tvořena 14 aromatickými zbytky aminokyselin, prohlubeň BCHE je tvořena pouze 8 aromatickými zbytky. Tento početní rozdíl aminokyselin je důvodem pro různou substrátovou specifitu enzymů. BCHE může katalyzovat hydrolýzu velkého množství esterů, zatímco ACHE je velmi specifická pro ACH. Aktivní místo lidské BCHE obsahuje katalytickou triádu Ser 198, Glu 325 a His 438, která určuje katalytickou aktivitu enzymu. Nejvíce se BCHE vyskytuje jako tetramer. Celková hmotnost jedné podjednotky je přibližně 85 kDa [16].

1.1.2.2 Funkce

Fyziologická funkce BCHE zůstává nejasná, neboť doposud nebyl popsán žádný endogenní přírodní substrát pro tento enzym, který je pojmenován podle umělého substrátu BCH [8]. Avšak BCHE má roli při detoxikaci jedů, které mohou být konzumovány nebo inhalovány. Například organofosfátové pesticidy, nervově paralytické látky a neurotoxické látky zvané anatoxiny jsou vychytány a zničeny BCHE, proto se tento enzym využívá jako potenciální terapeutikum při otravě např. organofosfátovými pesticidy a slouží také jako biomarker při expozici nervově paralytickými látkami a organofosfátovými pesticidy [17]. Dále BCHE hydrolyzuje fyzostigmin a kokain na neaktivní produkty. Také aspirin je hydrolyzován BCHE na kyselinu salicylovou a heroin je působením BCHE konvertován na morfin [18]. BCHE se dále uplatňuje v krizových situacích jako záložní enzym při hydrolýze ACH, pokud je ACHE inhibována. Za normálních podmínek BCHE nepřispívá k hydrolýze ACH [16].

BCHE je enzym spojený s mnoha patologiemi. Jeho sérová hladina klesá v mnoha klinických stavech, jako jsou akutní a chronické poškození jater, zánět, zranění, infekce a podvýživa. Stanovení enzymu může být tedy vhodné pro jednoduché prokázání patologických stavů. BCHE se také uplatňuje při katabolismu tuků a je spojována se vznikem amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek u AD [19, 10].

1.1.3 Role ACHE a BCHE u Alzheimerovy choroby

Zajímavým případem je vztah CHEs u AD. Přítomnost ACHE a BCHE v β amyloidních placích a v neurofibrilárních klubkách se stala hádankou. Doposud nebyla vysvětlena příčina hromadění obou enzymů v těchto útvarech, avšak je

prokázáno, že přítomnost jak ACHE, tak BCHE zvyšuje tvorbu β amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek u této choroby [20].

AD, popsána Aloisem Alzheimerem v roce 1907, je neurodegenerativní onemocnění charakterizované progresivní ztrátou kognitivních funkcí. Postihuje více než 20 milionů lidí po celém světě. Jeho prevalence se zvyšuje s věkem - z 10 % u osob kolem 65 let na téměř 50 % u osob kolem 85 let [21]. Patologie AD zahrnuje extracelulární senilní plaky tvořené především β amyloidem a intracelulární neurofibrilární klubka sestávajících z abnormálně hyperfosforylovaného tau proteinu [22]. Podle cholinergní hypotézy za iniciaci a progresi AD může poškození cholinergního systému zejména v oblastech mozkové kůry neokortexu a hippocampu, které se zabývají učením, pamětí, chováním a emocionálními reakcemi [23]. Podle amyloidní hypotézy za iniciaci a progresi AD může ukládání β amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku, jejichž tvorba se zvyšuje přítomností ACHE a BCHE. Avšak etiologie AD je stále neznámá [24].

Některé studie ukázaly, že existují změny v relativních poměrech izoform ACHE v mozku pacienta s AD. U vyšetřovaných pacientů post-mortem byla zjištěna ztráta tetramerní globulární izoformy G4 v kortikálních a subkortikálních oblastech mozku. Tato izoforma představuje přibližně 80 % celkového zastoupení ACHE v mozku. Bylo také prokázáno, že ACHE u pacientů s AD je abnormálně glykosylovaná. Skutečnost, že přítomnost ACHE zvyšuje tvorbu β amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek je potvrzena experimentem, ve kterém se nechala inkubovat směs obsahující β amyloidní peptid bez ACHE a s ACHE. U směsi, která obsahovala ACHE, došlo k třikrát větší tvorbě β amyloidních plaků než u směsi bez ACHE. Také byl pozorován vliv inhibitorů v různých částech katalytické jednotky ACHE. Ukázalo se, že v přítomnosti inhibitoru aktivního místa edrofonie dojde k urychlení tvorby β amyloidních plaků, ale v přítomnosti inhibitoru periferního aniontového místa propidia dojde ke zpomalení tvorby. Z tohoto důvodu se předpokládá vznik tvorby plaků způsobený interakcí β amyloidu s periferním aniontovým místem ACHE a také to, že inhibitory periferního aniontového místa mohou zpomalit vznik β amyloidních plaků [25].

Studie prokázaly také zvýšené koncentrace BCHE, hlavně G1 formy, zatímco koncentrace ACHE poklesne až o 85 % v postižených oblastech mozku. Poměr BCHE/ACHE se dramaticky mění v kortikálních oblastech od 0,2 až do 11. Zvýšená hladina BCHE má za následek tvorbu β amyloidních plaků a neurofibrilárních klubek,

neboť bylo prokázáno, že inhibicí BCHE poklesne vznik β amyloidů v mozku myší, které nadměrně tvořily tento peptid [26].

1.1.3.1 Léčba Alzheimerovy choroby

Inhibice obou enzymů byla přijata jako pozoruhodná alternativní léčba proti AD [27]. **Fyzostigmin** byl první inhibitor CHEs, který byl uvažován pro léčbu AD. Jedná se o rostlinný alkaloid, který pochází ze semen *Physostigma venenosum*. Přestože je schopen projít hematoencefalickou bariérou, má krátký poločas rozpadu a nízký terapeutický index. Má také mnoho vedlejších účinků jako je nevolnost, zvracení, bolesti hlavy, průjem a závrať. Proto tento lék nebyl schválen pro léčbu AD [28].

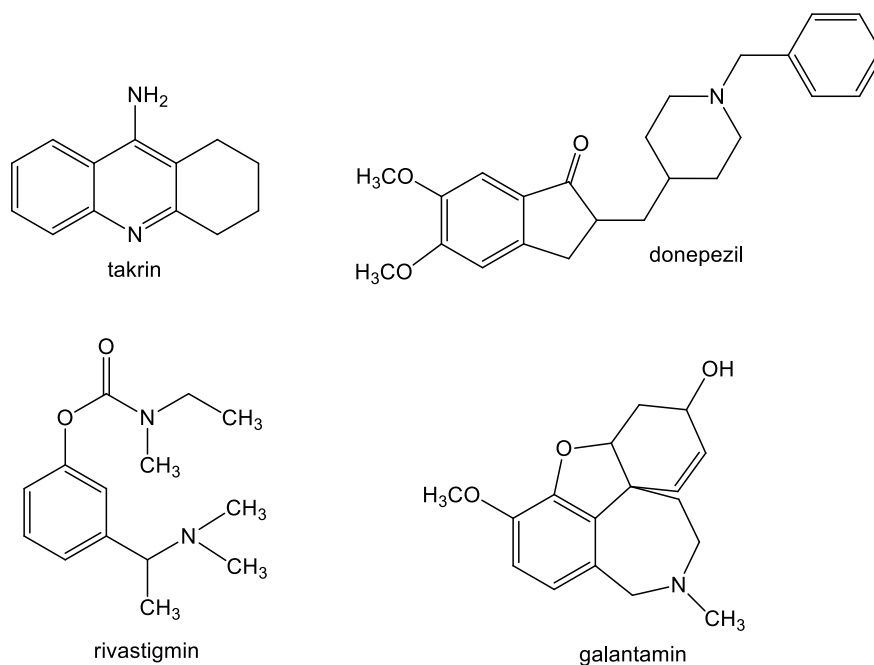
V roce 1986 byl vytvořen lék **takrin**, který byl schválen v roce 1993 [29]. Je to silný inhibitor jak ACHE, tak BCHE, který patří do třídy akridinů. Rozsáhlé užívání takrinu však bylo omezeno, neboť byl špatně tolerován. Způsoboval řadu nežádoucích účinků jako je nevolnost, zvracení, závrať, průjem. Dále způsoboval záchvaty a poruchy vědomí synkopy. Také režim dávkování byl náročný. Takrin se podával čtyřikrát denně kvůli krátkému poločasu rozpadu. Navíc pacienti museli být sledováni, neboť tento lék způsoboval hepatotoxicitu, která mohla být způsobena afinitou k BCHE. Nakonec byla léčba takrinem zrušena [28]. Ale derivát hepatotoxického takrinu, 7 - methoxytakrin, je široce studován jako vhodná náhrada za takrin. Jedná se o silný inhibitor aniontové podjednotky aktivního místa ACHE. *In vitro* a *in vivo* testy ukázaly jak jeho menší toxické účinky, tak silnější inaktivaci ACHE v porovnání s takrinem [30].

V roce 1996 byl schválen lék **donepezil** [29]. Donepezil je selektivní reverzibilní ACHE inhibitor, který se váže na periferní aniontové místo. Patří do třídy piperidinů. Nemá pouze symptomatické účinky v léčbě AD, ale také pozastavuje ukládání amyloidového plaku. Lék je vyráběn farmaceutickými společnostmi Eisai a Pfizer pod obchodním názvem Aricept. Ačkoli se užívá jako symptomatická léčba mírného stádia AD, některé klinické studie uvádějí, že donepezil zlepšuje kognitivní funkce u pacientů s těžkými AD příznaky. Je k dispozici jako tableta a perorální roztok s biologickou dostupností 100 %, který snadno přestoupí hematoencefalickou bariérou. Jeho poločas rozpadu je asi 70 hodin a může být užíván jednou denně. Lék je dostupný v dávkách 5 a 10 mg. Léčba se obvykle zahajuje v dávce 5 mg denně a zvyšuje se po několika týdnech na 10 mg denně. Maximální denní dávka je 23 mg/den. U pacientů užívajících vyšší dávku se ukázalo mírné zlepšení kognitivních funkcí. Na druhou stranu vyšší dávka léku vyvolala zvýšený výskyt cholinergních vedlejších účinků. Mezi obvyklé

nežádoucí účinky donepezilu patří gastrointestinální nevolnosti, průjem, anorexie, bolest břicha a bradykardie [14].

Dále v roce 2000 byl schválen duální inhibitor **rivastigmin** [29]. Rivastigmin prodáváný pod obchodním názvem Exelon je silný, pomalu reverzibilní karbamátový inhibitor, který blokuje aktivitu CHEs prostřednictvím vazby na esterovou podjednotku aktivního místa. Rivastigmin inhibuje ACHE i BCHE a je používán v léčbě mírného až středně závažného stádia AD v 60 zemích včetně všech členských států Evropské unie a USA. Léčivo je podáváno perorálně jako kapsle nebo jako kapalných roztok s biologickou dostupností asi 40 % v dávce 3 mg. Léčba se zahajuje dávkou 1,5 mg dvakrát denně a postupně se zvyšuje po dobu několika týdnů na 6 mg dvakrát denně. Dávka se zvyšuje o 3 mg denně každé 2 až 4 týdny. Časná léčba AD rivastigminem maximalizuje příznivé účinky na kognitivní funkce a aktivity každodenního života s denními dávkami od 6 do 12 mg. Mezi nepříznivé vedlejší cholinergní účinky léčiva patří nevolnost, zvracení, průjem, anorexie, bolest hlavy, poruchy vědomí, bolest břicha a závrať. Vedlejší účinky mohou být sníženy použitím transdermální náplasti rivastigminu. Cílová dávka 9,5 mg denně podána v náplasti poskytuje podobné klinické účinky, jako je lepší paměť a myšlení, zlepšení aktivit každodenního života a soustředění [14].

V roce 2001 byl schválen lék **galantamin** [29]. Galantamin, prodáváný pod obchodním názvem Razadyne či Nivalin, je alkaloid izolovaný z rostliny *Galanthus woronowii*, který se používá k léčbě mírného až středního stádia AD. Jedná se o selektivní, kompetitivní, rychle reverzibilní ACHE inhibitor, který interaguje jak s aniontovou podjednotkou aktivního místa, tak s aromatickou prohlubní aktivního místa. Kromě toho je lék alosterickým ligandem pro nikotinové cholinergní receptory. Kognitivní poruchy u AD souvisí se ztrátou nikotinových receptorů, zdá se tedy, že tento účinek je prospěšný, neboť vazbou galantaminu na nikotinové receptory v přítomnosti ACH se počet nikotinových receptorů zvyšuje. Galantamin se na nikotinové receptory váže v odlišném místě, než se váže ACH a než se váží nikotinový agonisté. Absorpce galantaminu je rychlá s biologickou dostupností mezi 80 a 100 %. Jeho poločas rozpadu je 7 hodin. Léčba je obvykle zahájena dávkou 4 mg dvakrát denně a lze ji postupně zvyšovat až na 12 mg dvakrát denně. Vedlejší účinky léku jsou podobné jako u jiných ACHE inhibitorů. Jedná se především o gastrointestinální nevolnost [14]. Základní CHEs inhibitory využívané v léčbě AD (včetně z terapie vyřazeného takrinu) jsou zobrazeny na obr. 4.



Obrázek 4 Základní CHEs inhibitory používané v terapii AD [14]

Dalšími inhibitory ACHE jsou přírodní alkaloidy **huperzin A** a **huperzin B**, které pocházejí z čínské plavuně *Huperzia serrata* [28]. Huperzin A se váže na periferní aniontové místo. V porovnání s ostatními používanými ACHE inhibitory, huperzin A lépe přestupuje přes hematoencefalickou bariéru, má vyšší biologickou dostupnost a déle inhibuje ACHE. Klinické studie odhalily zlepšení kognitivních funkcí a zlepšení funkčních poruch u pacientů s AD. Přírodní huperzin B je méně účinný než huperzin A [28].

Zajímavou látkou, která se používá k léčbě AD je **memantin**. Memantin je nekompetitivní antagonist *N*-methyl-*D*-aspartátových receptorů. Předpokládá se, že memantin chrání neurony před nadměrnou aktivitou glutamátu, která vede k excitotoxicitě. Jiné vlastnosti memantinu, které mohou být také relevantní v AD terapii, jsou jeho schopnosti snižovat hyperfosforylovaný tau protein. Klinické studie ukazují, že léčba memantinem zlepšuje kognitivní, neuropsychiatrické a behaviorální symptomy u pacientů s AD. Je klinicky významný u střední až těžké fáze AD a používá se okrajově v mírném stádiu AD. Lék je klinicky používán jako podpůrná léčba k inhibitorům CHEs v pozdějších stádiích demence. Kombinovaná léčba memantinem a donepezilem u pacientů se středním až s těžkým stádiem AD významně zlepšuje kognitivní funkce, aktivity každodenní činnosti a chování. Stejně tak jako inhibitory CHEs, memantin nedokáže zastavit progresi AD [31].

Stále se pracuje na modifikacích a kombinacích známých inhibitorů, které by se vážaly jak na periferní místo, tak na katalytické místo enzymu, a mohly se stát potenciálními kandidáty v léčbě AD. Nicméně nevýhoda CHEs inhibitorů v léčbě AD je taková, že pouze zmírňují a zpomalují průběh AD. Další nevýhodou také je, že CHEs inhibitory nedokáží zmírňovat průběh AD dlouhodobě. I přes tyto skutečnosti, reverzibilní CHEs inhibitory zůstávají základem farmakoterapie v léčbě AD [14]. Mezi další postupy se řadí např. léčba namířená proti β amyloidním plakům a tau proteinům [31]. Za atraktivní terapeutickou možnost se také považují agonisté M1 muskarinových receptorů [32].

1.1.3.2 Diagnostika Alzheimerovy choroby

Diagnóza AD jako nejčastější příčiny demence, je u pacientů stanovena zejména vyloučením jiných etiologií demence. Začíná se rodinnou anamnézou pacienta. Poté je pacient testován z kognitivních funkcí, z behaviorálních funkcí a z aktivit každodenního života. V běžné neurologické praxi se používá test duševního stavu Mini-Mental State Examination a test hodin pro zjištění kognitivních funkcí. Test duševního stavu Mini-Mental State Examination se zaměřuje na kognitivní funkce, které jsou zprostředkovány ve velké míře řečovými funkcemi. U testu hodin se dá pacientovi příkaz nakreslit ciferník hodin se všemi čísly a s ručičkami, aby naznačovaly konkrétní čas. Dále se provede vyšetření pomocí počítačové tomografie a magnetickou rezonancí. Avšak při tomto vyšetření mozku pacienta podezřelého na AD nebyly nalezeny jednoznačné specifické patologické obrazy typické pro AD. Nicméně častá bývá kortikální a subkortikální atrofie mozku. Na magnetické rezonanci můžeme sledovat objemy hipokampů a temporálních rohů postranních komor, kde je obvykle zjištěna atrofie největšího rozsahu. Při vyšetření pozitronovou emisní tomografií se zaznamenává snížení metabolismu v šedé hmotě s temporo-parietální převahou. Tyto nálezy jsou ale nespecifické, i když byly prováděny studie ve snaze stanovit specifické oblasti mozku, kde by snížení metabolismu bylo signifikantní pro AD. V poslední době je studována možnost vyšetření β amyloidu a tau proteinu v likvoru. Specifický profil v mozkomíšním moku je snížený β amyloid, zvýšený tau protein a zvýšený hyperfosforylovaný tau protein. Avšak dosud nebyla tato metoda přijata jako rutinní vyšetření, neboť je pro pacienta náročná a výsledky mají svá úskalí a jsou dosud předmětem výzkumu [33]. K diagnostice AD by také mohly pomoci cholinergní markery a to snížená koncentrace ACh, snížená koncentrace CHAT, snížená

koncentrace ACHE a zvýšená koncentrace BCHE v mozku pacienta. AD se může diagnostikovat pouze s určitou pravděpodobností [26, 27, 34]. Jistou diagnózu AD získáme pouze post-mortem a biopsií mozku [33].

1.2 Metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz

Pro stanovení aktivity a inhibice CHEs byla navržena řada metod [35]. Stanovení aktivity CHEs je obvykle založeno na kvantifikaci produktu nebo nezreagovaného substrátu během reakce [36]. Kromě přírodního substrátu ACH, se pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs používají také umělé substráty včetně esterů thiocholinu, a to acetylthiocholin (ATCh) či butyrylthiocholin (BTCh). Mnohé substráty, jako jsou např. propionylthiocholin, acetyl- β -methylthiocholin, *o*-nitrofenylacetát, indofenylacetát, *p*-aminofenylacetát a α -naftylacetát, byly prozkoumány za účelem zjištění nejlepšího substrátu pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs danou metodou. Pro stanovení aktivity či inhibice CHEs se nesmí opomenout čistota enzymu, neboť v případě použití nepurifikovaného enzymu by mohlo dojít k zavádějícím výsledkům. Také je nutno mít na paměti, že CHEs jsou ze své podstaty nestabilní, neboť jsou izolovány od svého původního biologického prostředí. Teplota a pH patří mezi parametry, které dále ovlivňují stabilitu enzymu. CHEs izolované z octomilky obecné (*Drosophila Melanogaster*) a z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) jsou nejvíce používanými komerčními enzymy pro stanovení aktivity a inhibice CHEs [35].

1.2.1 Přehled analytických metod

Mezi nejranější metody pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs se řadí **manometrická stanovení**. Warburgova manometrická metoda je založena na měření oxidu uhličitého uvolněného z hydrogenuhličitanového pufru. Pufr se rozkládá HA, která se uvolní hydrolýzou ACH. Warburgova metoda je schopna určit relativně malou CHE aktivitu ve všech tkáních, avšak úskalí této metody představuje omezení volby pufru a to na hydrogenuhličitanový [37].

Další metody pro stanovení aktivity a inhibice CHEs jsou **potenciometrické metody**, kde se měří změna hodnoty pH respektive potenciálu enzymatické hydrolýzy substrátu ACH [38]. Ze zmíněných potenciometrických metod vychází automatická titrační **metoda pH-stat**, kde se měří množství přídavku alkalického roztoku potřebného k neutralizaci HA uvolněné enzymatickou reakcí ACH v čase. Rychlost přídavku alkalického roztoku potřebného k udržení konstantního pH je tedy úměrná aktivitě nebo inhibici CHEs. [39].

Další metody pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs jsou **spektrofotometrické metody**, kde se v UV-VIS oblasti měří změna absorbance nejčastěji **Ellmanovou metodou** [3]. Dále do spektrofotometrických metod patří **fluorimetrická metoda**, kde se měří sekundární záření fluorescence. Princip stanovení CHE aktivity nebo inhibice založený na tvorbě fluorescenčního produktu je v současnosti široce využíván. Fluorimetrická metoda je ve většině případů až 100 násobně citlivější než odpovídající kolorimetrické metody. V ideálním případě je substrát nefluorescenční. Mezi nefluorescenční substráty patří např. indoxylacetát, resorufinové estery nebo naftylestery a poskytují vysoce fluorescenční produkty. Pokud jsou substrát a produkt fluorescenční sloučeniny, tak by nemělo docházet k interferenci jejich spekter. Mezi fluorescenční substráty patří např. 7-acetoxy-1-methylchinolinium. Citlivost této metody a možnost poskytnutí kinetických údajů jsou nejdůležitějšími výhodami fluorimetrického stanovení. Proto se také fluorimetrické metody využívají pro objevování a identifikaci nových inhibitorů [36]. Nefluorescenční substrát indoxylacetát je tedy enzymaticky hydrolyzován CHE za přítomnosti kyslíku na fluorescenční indigo, které je kvantifikováno fluorimetricky při excitační vlnové délce 395 nm a při emisní vlnové délce 470 nm při pH 6,5. Indigo může být kvantifikováno také spektrometricky při vlnové délce 420-450 nm [40]. Zajímavé je také využití polovodičových nanočástic tzv. kvantových teček, které mají jedinečné fluorescenční vlastnosti. ACHE hydrolyzuje ACH na CH, zatímco cholinoxidáza (CHO) oxiduje vzniklý CH na betain. Při této reakci vzniká také peroxid vodíku, který zhasí fluorescenci kvantových teček. Zvýšením koncentrace inhibitoru se snižuje obsah enzymem generovaného peroxidu vodíku, a to má za následek pokles zhasení kvantových teček. Kvantové tečky se využívají ve spojení s biosenzory [41].

Do spektrofotometrických metod patří také **chemiluminiscenční metoda**, kde se měří záření, které vznikne chemickou reakcí [40, 42]. Jedna z chemiluminiscenčních metod používá přirozený substrát ACH. Tento přirozený substrát je hydrolyzován ACHE na CH, který je oxidován. Při této reakci vzniká peroxid vodíku, který oxiduje luminol za katalýzy křenové peroxidázy za vzniku chemiluminiscenčního 3-aminofthalátu [42]. Mezi spektrofotometrické metody se také řadí **difraktometrická metoda**. Walker a Asher vyvinuli polymerizované krystalické koloidní pole, které je schopno snímat koncentraci organofosfátů. Periodické pole koloidních částic s ACHE je zakotveno v hydrogelové síti, která difraktuje viditelné světlo. Navázání organofosfátu např. parathionu na ACHE způsobí zvětšení hydrogelové sítě. Změna objemu

hydrogelové síť má za následek posun vlnové délky difrakčního světla. Velikost posunu je úměrná koncentraci parathionu [43]. Mezi spektrofotometrické metody také patří hmotnostní spektrometrie. Tyto metody se primárně používají pro identifikaci inhibitorů ACHE v přírodních extraktech pomocí **spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií**. Inhibice ACHE ve vzorku je sledována pomocí post-kolonového biochemického testu, který je založen na postupném smíchání ACHE, ACH a činidla s chromatografickým eluátem. Inhibice ACHE se také detekuje měřením poklesu tvorby produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se tedy o stanovení inhibice ACHE více detektory simultánně [44].

Rostoucí obavy veřejnosti z kontaminace pesticidy v potravinách a v životním prostředí zvýšily poptávku po širším a přísnějším monitorování pesticidů. Nicméně běžné laboratorní metody jako jsou plynové nebo kapalinové chromatografie, jsou často časově a pracovně náročné a drahé. Jsou také nevhodné pro analýzu velkých objemů vzorků. Proto byly vynalezeny **kolorimetrické papírky nebo proužky** pro detekci pesticidů v terénu pouhým okem [35]. Navrhované testy zahrnují inkubaci proužku potaženého ACHE v roztoku pesticidů a následnou inkubaci proužku v roztoku chromogenního substrátu. Nitrocelulósová membrána Hybond N⁺ se používá pro imobilizaci enzymu a jako chromogenní substrát se používá indoxylacetát. Mezi aktuálně dostupné komerční produkty patří proužky OP Sticks Sensor a proužky Eclox-Pesticide Strips [45].

Metoda, která souvisí s určením aktivity CHEs, je **histochemická lokalizace** ACHE. Thiocholin-hexakynoželizitanová metoda je široce používána pro lokalizaci ACHE ve tkáni. Jako substrát se používá acetylthiocholin jodid (ATCHI). Thiocholin redukuje hexakynoželizitan na hexakynoželizitan, který reaguje s měďnatými ionty za vzniku Hatchettovy hnědi. Tato metoda má tu výhodu, že přímo produkuje zrnitou, snadno viditelnou sraženinu [46].

Analýzy na bázi **tenkovrstvé chromatografie** se používají pro rychlý screening možných CHEs inhibitorů z rostlinných extraktů. Nejprve je destička eluována acetonem nebo izopropanolem a potom je důkladně vysušena. Po migraci vzorku ve vhodném rozpouštědle se destička vysuší za úplného odstranění rozpouštědla. Destička je poté nasprejována enzymatickým roztokem a důkladně vysušena. Následně je smíchán roztok naftylacetátu s Fast Blue B solným roztokem. Nakonec se tato směs nasprejuje na destičku, aby se vytvořilo fialové zbarvení po předchozí hydrolýze naftylacetátu ACHE na α -naftol, který reaguje s Fast Blue B solným roztokem za

vzniku diazoniového barviva po 1-2 minutách. V přítomnosti inhibitorů jsou pozorovány bílé skvrny na barevném pozadí destičky [47].

Radioizotopové stanovení aktivity nebo inhibice CHEs je založeno na hodnocení ^3H nebo ^{14}C značeného ACH pomocí počítačích technik jako je scintilační technika [48]. Tyto metody jsou si velmi podobné, neboť se obvykle liší pouze při kvantifikaci označeného nehydrolyzovaného ACH nebo v kvantifikaci označeného uvolněného acetátu. Přestože je radiometrická metoda obvykle metoda end-point, která není vhodná pro kinetické studie, tak radiometrické stanovení je nejcitlivější metoda pro měření enzymové aktivity. Na druhou stranu vysoké náklady na radioaktivně značený substrát a komplikace související s manipulací s radioaktivním materiálem představují nevýhody této metody. Je také nutná separace substrátu od produktu například extrakcí organickým rozpouštědlem nebo vysrážením [36]. Nové radioizotopové metody pro stanovení inhibice CHEs byly zavedeny s použitím radioaktivně značených substrátů *N*-[^{14}C]-methylpiperidin-4-yl-acetátu a (*R*)-*N*-[^{14}C]-methylpiperidin-3yl butyrátu pro ACHE a BCHE. Tato metoda účinně sleduje inhibiční vlastnosti inhibitorů CHEs zejména u terapeutik, pesticidů a chemických bojových látek [49].

Všechny současné analytické techniky pro stanovení aktivity a inhibice CHEs měří nějakou sekundární reakci, jako je pH nebo změna barvy, kde samotná enzymová reakce není měřena. Bylo však vyvinuto **kalorimetrické stanovení**, kde se měří teplo samotné enzymatické reakce. O'Farrell a spol. měřili aktivitu CHEs v lidském séru pomocí kalorimetrického stanovení. Odezva kalorimetru, pokud je sérum smícháno s ACH, odpovídá sérové CHE aktivitě [50].

Aktivita a inhibice CHEs se měří také **biosenzorem**. Biosenzor je obecně definován jako analytické zařízení, které se skládá z biologické složky a z fyzikálně-chemického převodníku. Princip biosenzoru je založen na interakci mezi molekulou analytu a biologickou složkou, která způsobí vznik signálu. Tento signál je zpracován převodníkem a detekován detektorem. V tomto případě je biologická složka enzym CHE, která je na povrch senzoru imobilizována. Fyzikálně-chemický převodník může být elektrochemický, optický, piezoelektrický a kalorimetrický, záleží na povaze vzniklých produktů, které budou detekovány biosenzorem [51]. V případě elektrochemického převodníku se měří proud za konstantního potenciálu nebo za měnícího se potenciálu, dále se měří napětí a vodivost [52]. U optického převodníku se měří nejčastěji absorbance, dále fluorescence, chemiluminiscence, změna optických vlastností optických vláken a změna šíření konstantní plasmonové vlny [51]. V případě

piezoelektrického převodníku se měří frekvence kmitajícího krystalu, ze kterého je převodník zhotoven [53]. U kalorimetrického převodníku se měří změna tepla reakce [54].

S vývojem metod pro stanovení aktivity a inhibice CHEs se rozvíjel příchod **mikročipů**. Potenciál této techniky spočívá v analýze ACHE inhibitorů. Nejprve se kanálky v mikročipu naplní roztokem směsi inhibitorů, roztokem enzymu, roztokem substrátu a roztokem derivatizačního činidla. Poté se směs inhibitorů rozdělí kapilární elektroforézou v mikročipu. Následně proběhne samotná reakce pomocí počítačem řízeného elektrokinetického transportu, kde uvolněný thiocholin vzniklý enzymem katalyzované hydrolýzy reaguje s kumarinylfenylmaleimidem za vzniku thioetheru, který je detekován fluorescenčně. Inhibitory následně sníží fluorescenční signál [55]. Další generace biosenzorů přináší vzrušující mikročipové techniky tzv. lab-on-chip nebo mikro analytické systémy, které integrují mnoho laboratorních funkcí v jediném čipu o rozměrech jen pár čtverečních centimetrů nebo milimetrů. Jsou schopny měřit extrémně malé množství vzorku dokonce o menším objemu, než jsou pikolitry. V jediném miniaturizovaném zařízení může být provedena separace a detekce. Tan a spol. vyvinuli čip pro detekci sarinu v malém objemu krve, který zahrnuje lýzi plné krve, regeneraci navázaného sarinu z krevní CHE, precipitaci bílkovin, filtraci, enzymatickou reakci a optickou detekci. Tento příklad demonstruje potenciální použití tohoto kapesního přístroje pro detekci nervově paralytických látek v terénu [56].

Pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs se používá spousta metod. Většina z nich měří změnu pH nebo využívá spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické nebo radiometrické techniky. Nanotechnologie významně přispívají k vývoji různých metod pro stanovení aktivity a inhibice CHEs. Metody pro stanovení aktivity a inhibice CHEs se také používají v širokém rozsahu aplikací např. v diagnostice klinických nemocí, k posouzení povahy a rozsahu expozice organofosfátů a karbamátů u lidí, živočichů a v životním prostředí. Screening inhibitorů je také užitečný při hledání nových léků, které potlačují aktivitu patologických CHEs. Je také možnost použití těchto metod k odhadu koncentrace organofosfátů a karbamátů ve vzorcích potravin. Avšak většina toxických látek je obecně charakterizována jejich nízkou hodnotou rozpustnosti ve vodě a souběžně vysokou hodnotou rozpustnosti v organických rozpouštědlech. Enzymatická katalýza se tradičně provádí ve vodném roztoku. Proto se doporučuje použít 1 až 10 % vody nezbytných pro enzymatickou

aktivitu, které se doplní do organického rozpouštědla pro dostatečnou hydrataci aktivního místa enzymu [35].

1.2.2 Spektrofotometrické metody

I když existuje mnoho typů metod pro stanovení aktivity a inhibice CHEs, spektrofotometrické metody představují nejběžnější typ metod, které se dnes používají [35]. K prvním fotometrickým metodám patří metoda založená na změně pH, kde acidobazický indikátor jako je např. fenolová červeň nebo bromthymolová modř změní své zbarvení s přibývajícím kyselinou octovou [57]. V počátečním vývojovém stádiu spektrofotometrických metod byla popsána metoda zbývajícího substrátu podle Hestrina. Tato metoda je založena na reakci zbývajícího substrátu ACh s hydroxylaminem, které dohromady tvoří acetoxyhydroxylaminový komplex. V přítomnosti kyseliny chlorovodíkové a chloridu železitého vznikne červeno-fialový komplex. Tento produkt je kvantifikován fotometricky při 500-540 nm [58]. Tato technika však neměří rychlost ubývání substrátu, což je jeho největší nevýhodou. Metoda podle Hestrina se v současné době používá v testech v mikrotitrační destičce pro stanovení nervově paralytických látek [59].

Velmi rychle se také rozvíjí použití nanočástic pro optická stanovení. Pavlov a spol. vyvinuli metodu, kde hydrolyzou ATCh vznikne thiocholinové redukční činidlo, které stimuluje katalytické zvětšení zlatých nanočástic v přítomnosti aniontu kyseliny chlorozlatité. Redukční zvětšení zlatých nanočástic závisí jak na koncentraci substrátu, tak na enzymové aktivitě. Měří se absorbance zlatých nanočástic. Katalytický růst zlatých nanočástic je inhibován např. paraoxonem. Výsledkem je, že systém poskytuje novou metodu založenou na nanotechnologii pro nervově paralytické látky [60]. Wang a spol. uvedli další zajímavou kolorimetrickou metodu pro stanovení aktivity nebo inhibice CHEs, kde AChE katalyzuje hydrolyzu ATCh za vzniku thiocholinu, který indukce zesíťování/agregaci zlatých nanočástic. Před zesíťováním je roztok zlatých nanočástic červený a po agregaci zlatých nanočástic v přítomnosti thiocholinu šedý [61]. K rozvoji fotometrických metod také přispívá miniaturizace spektrometrů a vývoj optických vláken [36].

1.2.2.1 Ellmanova metoda

Nepochybně nejpoužívanější fotometrickou metodou pro stanovení aktivity a inhibice CHEs je Ellmanova metoda. Jedná se o zlatý standard mezi metodami. Princip metody je uveden v kapitole 3.3.1.1. Ellmanova metoda má však i některá omezení.

Např. skupiny SH thiocholinů ve vzorku mohou reagovat s 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB). Dále estery thiocholinu mohou podléhat spontánní hydrolyze, která je zrychlena vysokou teplotou nebo pH nad 8. Spontánní hydrolyza ATCH vzroste dvakrát až čtyřikrát, jakmile se reakční teplota zvýší z 25 °C na 30 °C a posléze na 35 °C. Při každém zvýšení stupně reakční teploty vzroste aktivita enzymu o 4 %. Jako kompromis byla navržena testovací teplota 30 °C. Bylo zjištěno, že optimální pH pro CHE je 7,8-8,0. DTNB je navíc stabilnější při pH 7 než při pH 8, a proto je doporučeno, aby zásobní roztok DTNB byl připraven při pH 7. Limitující je také fotosenzitivita DTNB. Také rychlost hydrolyzy thioesterů se může významně lišit během měření aktivity CHEs v přítomnosti reaktivátorů oximů. Jedná se o látky, které mohou hydrolyzovat esterovou vazbu thiocholinu rychleji než Ellmanovou reakcí. Tato skutečnost může zkreslit výsledky Ellmanovy metody, proto se oximy nemohou použít pro stanovení reaktivity fosforylovaných CHEs. Další úskalí se objevuje při měření aktivity ACHE ve vzorku plné krve za přítomnosti selektivního inhibitoru BCHE ethopropazinu, neboť absorbance 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny (TNB) interferuje s absorbancí hemoglobinu při 412 nm. Interference hemoglobinu se dá omezit změnou vlnové délky na 436 nm. Při této vlnové délce je absorbance hemoglobinu snížena na 25 % ve srovnání s jeho absorbancí při 412 nm, zatímco absorpce TNB je na 80 % svého maxima [36]. Padilla a spol. navrhli další možnost jak omezit interferenci hemoglobinu s absorbancí TNB. Tato metoda pracuje s faktem, že ACHE je připojena k povrchu erytrocytů pomocí fosfatidylinositolové kotvy. Tato technika využívá lipázu C specifickou pro fosfatidylinositol, která uvolňuje molekuly ACHE z erytrocytové membrány bez lýzi erytrocytů. Uvolněná ACHE je oddělena od zbytku vzorku centrifugací [62].

U Ellmanovy metody bylo také provedeno několik změn v použití původního substrátu a činidla. Namísto ATCHI a acetylthiocholinu chloridu (ATCHCl) nebo butyrylthiocholinu jodidu (BTCHI) či chloridu se použil propionylthiocholin jodid pro stanovení erytrocytové aktivity CHEs [63]. ACHE hydrolyzuje tento substrát o něco pomaleji než ATCH [35]. Dále se místo původního substrátu může použít indoxylacetát. Aktivita CHEs se stanoví za přítomnosti kyslíku tvorbou enzymatického reakčního produktu indigo. Indigo může být kvantifikováno spektrometricky při 420-450 nm nebo fluorimetricky při excitační vlnové délce 395 nm a při emisní vlnové délce 470 nm při pH 6.5. Indoxylacetát není specifickým substrátem pro ACHE a mohl by být použit i pro stanovení aktivity BCHE. Použití indoxylacetátu je vhodné pro stanovení *in vitro*

účinnosti reaktivátorů ACHE [40, 64]. Pro stanovení aktivity BCHE v plazmě se může použít umělý substrát benzoylcholin. Bylo zjištěno, že analoga benzoylcholinu mají silnější UV absorpci než produkty jeho hydrolyzy. Tato metoda byla založena na ubývání substrátu během enzymatické reakce při 235 nm [65]. Abernethy a spol. vyvinuli multienzymový postup, který používá jako substrát sukcinylcholin [66]. BCHE hydrolyzuje tento substrát o něco pomaleji než BTCH [35]. Sukcinylcholin je nejprve hydrolyzován BCHE. Vzniklý CH je poté oxidován CHO za vzniku kyseliny cholinové a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku poté reaguje za katalýzy křenové peroxidázy s fenolem a s aminoantipyrinem za vzniku růžového produktu s absorpčním maximem při 500 nm. V tomto postupu se mohou použít i jiné substráty, jako jsou ACH nebo benzoylcholin. Tato metoda se může použít ve vzorcích, kde by interferoval hemoglobin. Tento postup se také hodí pro rutinní stanovení CHE aktivity. Avšak tato metoda svou komplikovaností ztrácí na přesnosti a citlivosti [66].

Uete a spol. použili 2,2'-dithiodipyrudin (2,2'-PDS) nebo 4,4'-dithiodipyrudin (4,4'-PDS) namísto původního činidla DTNB. Thiocholin reaguje s těmito činidly za tvorby 2-thiopyridinu, který absorbuje při 343 nm, nebo 4-thiopyridinu, který absorbuje při 324 nm. Tento postup se snaží vyhnout interferenci s hemoglobinem. Jedná se tedy o rychlou a přesnou metodu, která se používá pro stanovení CHEs ve vzorcích plné krve [67]. Tato modifikovaná metoda se také používá pro rutinní stanovení pesticidů [68]. Největší nevýhoda této metody spočívá ve významné inhibici CHEs používaným činidlem [67]. Další modifikace byla představena pokusem o nahrazení DTNB kyselinou 6-dithiodinikotinovou (DTNA). DTNA na rozdíl od DTNB neovlivňuje Michaelisovu konstantu (K_M). Nejpraktičtějším aspektem použití DTNA je sledování změny absorbance při 340 nm, kde nedochází k interferenci absorbance hemoglobinem. Nicméně neexistují žádné důkazy podporující použití DTNA nad DTNB [69].

Ellmanova metoda také existuje v kombinaci s jinými analytickými technikami. Ellmanova metoda byla modifikována pro 96-jamkovou mikrotitrační destičku za účelem stanovení více vzorků CHEs ve vzorcích tkáně [70]. Bylo také prokázáno úspěšné spojení hydrolyzy ATCH s DTNB s metodou založenou na chromatografii na tenké vrstvě pro identifikaci CHEs inhibitorů, kde na žlutém pozadí jsou detekovány bílé skvrny inhibitorů [71]. Bylo také zavedeno spojení Ellmanovy metody s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pro stanovení inhibice CHEs post-kolonovým biochemickým testem, kde směs inhibitorů je nejprve separována v koloně a následně chromatograficky eluát reaguje s roztokem ACHE, ACH a DTNB

[44]. Další spojení je také s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, avšak v tomto případě je enzym ACHE imobilizována na koloně. Postupně se na kolonu dávkuje ATCH, DTNB a posléze inhibitor. Nasbírané frakce se detekují spektrofotometricky. Tato metoda se používá pro stanovení inhibice ACHE [72]. Ellmanova metoda může být také přizpůsobena pro měření CHEs v terénu. Miniaturní přístroje CHE check mobile nebo Test-mate CHE byly navrženy pro možné stanovení a hodnocení expozice pesticidů nebo nervově paralytických látek [73].

1.2.3 Potenciometrické metody

První potenciometrické stanovení, tzv. Michelova metoda, je založeno na rozkladu přírodního substrátu ACH na CH a HA. Enzymatická aktivita se stanoví změnou hodnoty pH respektive potenciálu po 1 hodině od zahájení experimentu v reakční nádobě. Fosfát/hydrogenuhličitanový pufovací systém byl navržen tak, aby zajistil lineární pokles pH v čase. Tato metoda je užitečná pro rutinní měření intoxikace CHEs pesticidy v biologických vzorcích a je relativně levná a jednoduchá. Rychlá změna pH je nevýhoda této techniky, neboť pH může rychle klesat ve vzorcích s vysokou aktivitou CHEs. V důsledku toho může změna pH ovlivnit měření aktivity CHEs [38]. Tento problém byl v poslední době kompenzován novou metodou, která používá ACH-selektivní elektrodu založenou na plastifikované polymerní membráně. Využívá se více lipofilního ACH oproti méně lipofilnímu CH. Měří se potenciál proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Elektroda může být použita pro stanovení aktivity ACHE jako vhodná alternativa k jiným technikám [74].

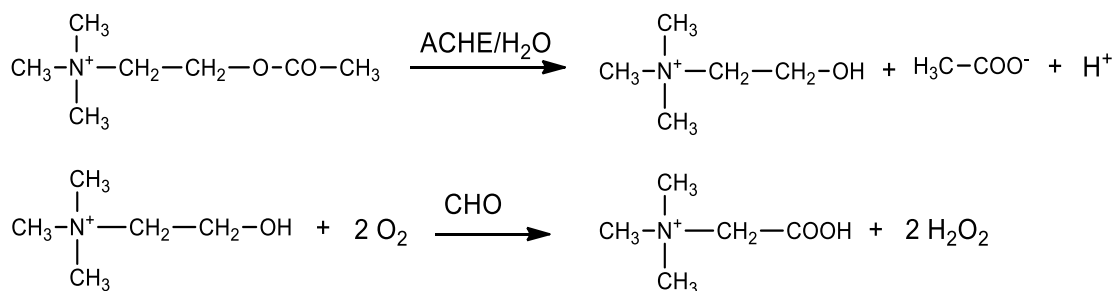
Ze zmíněné potenciometrické metody vychází automatická titrační metoda pH-stat, kde HA uvolněná enzymatickou reakcí ACH se kontinuálně neutralizuje standardním alkalickým roztokem, aby se udržovalo konstantní pH. Potenciometr nebo barevný indikátor lze použít k rozpoznání změny pH. Rané titrační metody zahrnovaly inhibitory CHEs, které zastavily enzymatickou reakci, aby byla provedena neutralizace [39]. Zavedení automatického titrátoru se záznamovým zařízením umožnilo rychlejší a přesnější produkci výsledků této metody. Automatická metoda pH-stat je jednou z nejpřesnějších a nejpohodlnějších metod, kde rychlost přídatku alkalického roztoku potřebného k udržení konstantního pH je úměrná aktivitě nebo inhibici CHEs. Největší nevýhoda této metody souvisí s rychlou změnou pH jako u potenciometrického stanovení. Další nevýhodou je nutnost používat médium bez pufru. A také objem

přidané alkálie by neměl výrazně zvýšit reakční objem. Princip této metody je uveden v kapitole 3.4.1.1 [75].

1.2.4 Elektrochemické ACHE biosenzory

Elektrochemická analýza nabízí mnoho výhod včetně vysoké citlivosti, levné instrumentace a snadného provozního postupu [35]. Elektrochemický biosenzor se skládá z imobilizovaného enzymu a fyzikálně-chemického převodníku. Imobilizace může být fyzikální nebo chemická. Mezi nepoužívanější fyzikální metody imobilizace patří adsorpce a zachycení. Mezi nepoužívanější chemické metody imobilizace se řadí tvorba kovalentní vazby, zesítnění a afinitní interakce [76]. Fyzikálně-chemický převodník může být **amperometrický** (měří se proud za konstantního potenciálu), **potenciometrický** (měří se napětí za neprocházejícího elektrického proudu), **voltametrický** (měří se proud za měnícího se potenciálu) a **konduktometrický** (měří se schopnost roztoku vést elektrický proud, tzv. vodivost) [52]. V případě stanovení např. organofosfátových inhibitorů je biosenzor trvale inhibován a funguje vlastně jako jednorázový senzor. Proto není nutné zvolit nákladný a náročný imobilizační postup. Avšak se stále pracuje na překonání nevýhody jednorázového použití reaktivací enzymu pomocí např. oximů [35]. Elektrochemické biosenzory představují jednu z nejrozšířenějších detekčních technik, které mají potenciál nahradit klasické metody analýzy a to miniaturizací a jednoduchostí [36].

První generace CHE biosenzorů zahrnuje amperometrické bi-enzymatické senzory. Tento systém se objevil koncem 80. let a byl používán k detekci organofosfátových pesticidů. V této konfiguraci ACHE hydrolyzuje svůj přirozený substrát ACH na CH a HA. CH není elektrochemicky aktivní, a proto je zde využit druhý enzym CHO, který oxiduje CH za vzniku betainu a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku může být snadno detekován na platinové pracovní elektrodě amperometricky při vloženém napětí +650 mV proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Tato nepřímá detekce aktivity ACHE je problematická kvůli vysoce aplikovanému potenciálu, který ponechává senzor citlivý k interferenci jinými elektroaktivními látkami přítomnými v reakčním médiu [77]. Hydrolýza substrátu ACH a následná oxidace cholinu CHO je znázorněna na obr. 5.



Obrázek 5 Reakční schéma vystihující princip stanovení aktivity/inhibice ACHE elektrochemicky s využitím bi-enzymatického systému (ACHE/CHO) [77]

Druhá možnost zahrnuje použití Clarkovy elektrody pro měření spotřeby kyslíku CHO katalyzované reakce. CHO se obvykle používá v přebytku a množství ACHE je optimalizováno, aby se zajistily kinetické podmínky. Tyto dva enzymy mohou být společně imobilizovány na povrch pracovní elektrody ve stejných nebo oddělených imobilizačních maticích. Nebo také může být jeden z enzymů imobilizován a druhý může být přidán v roztoku. Ko-imobilizace těchto dvou enzymů obecně umožňuje detekci analytů v nižších koncentracích [77]. Do první generace CHE biosenzorů také patří potenciometrické senzory. Potenciometrická detekce aktivity ACHE je založena na měření změny pH. Změna pH souvisí s uvolňováním HA způsobené hydrolýzou ACH. První generace potenciometrických senzorů CHE byly připraveny fyzikálním připojením enzymu na povrch skleněné pH elektrody. Moderní potenciometrické CHE senzory měří změnu pH pomocí např. iontově selektivních transduktorů s efektem pole. Tyto senzory jsou citlivější, méně nákladné a mají malou velikost s porovnáním s tradičními skleněnými pH elektrodami [78]. Hydrolýza ACH se také může sledovat konduktometricky měřením zvýšené vodivosti v roztoku [79].

Druhá generace mono-enzymatických CHE biosenzorů používá nespecifický substrát pro ACHE a to ATCH. Systém je založen na přímé amperometrické detekci thiocholinu (resp. oxidované formy thiocholinu), kde thiocholin je snadno oxidován na pracovní platinové elektrodě na dithioformu při vloženém napětí +410 mV proti nasycené kalomelové referenční elektrodě. Měří se tedy proudová odezva oxidované formy thiocholinu za konstantního potenciálu +410 mV. Tento systém má dvě hlavní výhody oproti bi-enzymatickým biosenzorům. Za prvé, použití jediného enzymu výrazně zjednodušuje konstrukci senzoru. A za druhé, detekční vkládaný potenciál je nižší než u bi-enzymatického systému. Jediné omezení představuje mírná spontánní hydrolýza substrátu v nepřítomnosti enzymu, ale lze se jí však vyhnout zředěným roztokem 0,09% chloridu sodného a skladováním roztoku v chladu. Použitím

tzv. mediátorů, jako jsou např. pruská modř, hexakynoželeznan kobaltnatý nebo hexakynoželeznan draselný, se ještě více sníží vkládaný detekční potenciál. Tento mediátor je nejprve redukován thiocholinem a poté je oxidován na pracovní platinové elektrodě při vloženém napětí +100 mV proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Pro usnadnění rychlého přenosu elektronů je mediátor obvykle imobilizován na povrch pracovní elektrody ve stejné matici jako enzym, nebo je imobilizován v samostatné vrstvě [77].

Kromě klasických mono a bi-enzymatických systémů popsaných výše, byly také uvedeny další CHE biosenzory, jako jsou např. mono-enzymatické CHE biosenzory, které jako substrát používají 4-aminofenylacetát. V tomto případě je produktem enzymem katalyzované reakce 4-aminofenol, který může být detekován amperometricky. Nicméně spontánní oxidace substrátu na 4-aminofenol představuje jistou nevýhodu [80]. Dalším příkladem CHE biosenzorů jsou tri-enzymatické systémy. Sensory jsou velmi podobné amperometrickým bi-enzymatickým systémům s tou výjimkou, že používají třetí enzym, křenovou peroxidázu, namísto aplikovaného napětí k detekci peroxidu vodíku potenciometricky. Tyto systémy se obejdou bez mediátoru [81].

Klasické ACHE biosenzory byly nahrazeny sítotiskovými senzory. Tato technika umožňuje výrobu jednorázových senzorů s nízkou cenou. Obvykle jsou všechny elektrody tvořící snímací systém, a to referenční, pomocná a pracovní, uloženy současně na pevný nosič. Výrobní proces spočívá v nanášení několika vrstev. Typická vodivá vrstva tzv. pasta na bázi uhlíku nebo např. platiny a pasta na bázi stříbra se tiskne za účelem vytvoření pracovní, referenční a pomocné elektrody. Poslední vrstva představuje aktivní snímací vrstvu, která obsahuje enzym a pokrývá pracovní elektrodu. Její složení se mění s imobilizačním postupem. Tato aktivní vrstva může být na senzor vytištěna nebo přidělána ručně. Nakonec se použije izolační vrstva s otvorem umožňujícím elektrický kontakt [77, 82]. Současný trend v oblasti výroby CHE biosenzorů je využití nanomateriálů. Nanočástice představují díky svým výjimečným vlastnostem, jako jsou např. velký povrch, vysoká vodivost a dobré katalytické vlastnosti, velice atraktivní součást elektrochemických biosenzorů. Využití uhlíkových nanotrubic nebo kovových nanočástic přispívá tedy k vylepšení vlastností elektrochemických senzorů. Avšak nanomateriály jsou stále relativně neprobádány ve spojení s biosenzory a představují důležitý směr výzkumu [83].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovení hodnot koncentrací inhibitoru, které způsobí 50% inhibici enzymu (IC_{50}) daných karbamátových inhibitorů a standardů rivastigminu a galantaminu Ellmanovou metodou. Dále stanovení kinetických parametrů a to K_M a mezní rychlosti (V_m) neinhibované a inhibované reakce ACHE a stanovení inhibičních konstant (K_I) vybraných karbamátových inhibitorů Ellmanovou metodou. Cílem práce také bylo stanovení hodnot IC_{50} vybraných karbamátových inhibitorů a stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce ACHE pH-statovou metodou a pomocí elektrochemických senzorů technikou square wave voltametrie. Do cíle práce bylo také zahrnuto stanovení rozdělovacích koeficientů (K_{ow}) testovaných karbamátových inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje

- spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA
- centrifuga MPW-340, Polsko
- třepačka Heidolph Multi Reax
- automatický titrátor 799 GPT Metrohm, Švýcarsko
- síťotiskový elektrochemický senzor (25,4×7,3×0,6 mm), BVT Technologies, Brno, ČR
 - pracovní platinová elektroda
 - referenční Ag/AgCl elektroda
 - pomocná platinová elektroda
- potenciostat, PalmSens BV, Nizozemí

3.2 Použité chemikálie

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny roztoky vodné.

- ACHE (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - z paúhoře elektrického
 - rozpuštěna v 0,1 M fosfátovém pufru (PBS)
 - uchována v umělohmotné zkumavce v mrazicím boxu při teplotě -6 °C
- ACH (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - 0,1 M roztok pro stanovení IC_{50} a kinetických parametrů neinhibované reakce pH-statovou metodou
- ATCHI (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - rozpuštěn v PBS
 - 0,1 M roztok pro stanovení aktivity ACHE Ellmanovou metodou
 - 0,001 M roztok pro stanovení IC_{50} , kinetických parametrů neinhibované a inhibované reakce a pro stanovení K_I Ellmanovou metodou
 - 1 M a 0,1 M roztok pro stanovení IC_{50} a 0,1 M roztok pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce pomocí elektrochemického senzoru
- ATCHCl (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - rozpuštěn v PBS
 - 0,1 M roztok pro stanovení aktivity ACHE Ellmanovou metodou

- 0,001 M roztok pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce Ellmanovou metodou
- 1 M a 0,1 M roztok pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce pomocí elektrochemického senzoru
- BTCHI (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - rozpuštěn v PBS
 - 0,1 M roztok, 0,01 M roztok a 0,001 M roztok pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce Ellmanovou metodou
 - 0,5 M a 0,1 M roztok pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce pomocí elektrochemického senzoru
- DTNB (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - $5 \cdot 10^{-4}$ M roztok
- PBS
 - 0,1 M o pH 7,4
 - připraven ze 4 g NaCl, 0,1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a 0,1 g KCl do 500 ml redestilované H_2O
- deionizovaná voda
- dimethylsulfoxid (DMSO)
- 1-oktanol (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
- KCl (Penta s.r.o.)
 - 0,5 M roztok
- KOH (Penta s.r.o.)
 - 0,1 M roztok
- inhibitory (strukturní vzorec uveden v tab. 1)
 - rozpuštěny v DMSO na koncentraci 0,01 M, dále ředěny dle potřeby deionizovanou vodou
 - rozpuštěny v 1-oktanolu na koncentraci 0,01 M pro stanovení K_{ow}
 - 0,001 M roztoky pro stanovení IC_{50} , kinetických parametrů inhibované reakce a pro stanovení inhibičních konstant Ellmanovou metodou
 - 0,01 M roztoky pro stanovení IC_{50} pH-statovou metodou
 - 0,001 M roztoky pro stanovení IC_{50} pomocí elektrochemického senzoru
 - rivastigmin
 - 0,001 M roztok
 - standard

- galantamin
 - $1 \cdot 10^{-4}$ M roztok
 - standard

Tabulka 1 Přehled studovaných inhibitorů (inhibitory k testování byly poskytnuty PharmDr. Mgr. Martinem Krátkým, Ph.D., Farmaceutická fakulta Hradec Králové)

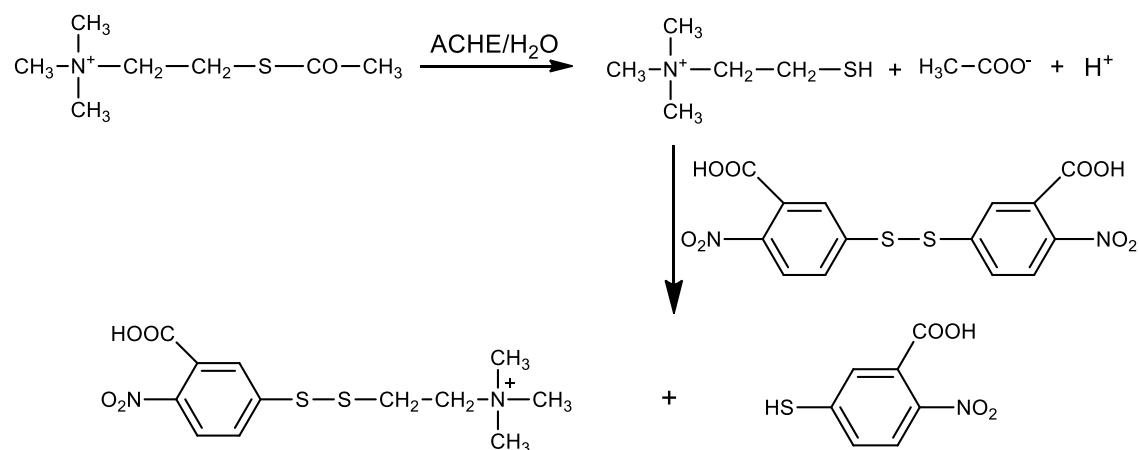
Označení	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	H	H	CH ₃	CH ₃
2	H	H	Et	Et
3	H	H	Ph	Ph
4	H	H	CH ₃	Ph
5	Cl	Cl	CH ₃	Ph
6	Cl	Br	CH ₃	Ph
7	Cl	F	CH ₃	Ph

3.3 Spektrofotometrické metody

3.3.1 Ellmanova metoda

3.3.1.1 Princip

Ellmanova metoda používá umělé substráty esterů thiocholinu a to ATCH a BTCH. ACHE nebo BCHE hydrolyzuje ATCH nebo BTCH za vzniku thiocholinu, který reaguje s DTNB na žlutě zbarvenou TNB. Intenzita barvy produktu se měří při 412 nm a je přímo úměrná enzymatické aktivitě [3]. Hlavní výhody metody představují jednoduchost, přesnost, kontinuální zvyšování hustoty barvy v čase a relativně nízké náklady. Je také snadno adaptabilní pro automatické analyzátoři pro rychlé zpracování velkého počtu vzorků [35]. Princip Ellmanovy metody je znázorněn na obr. 6.



Obrázek 6 Princip Ellmanovy metody [36]

3.3.1.2 Stanovení enzymové aktivity ACHE

Enzymová aktivita je definována jako schopnost enzymu katalyzovat určitou reakci. Pro určení reakční rychlosti enzymu neboli jeho aktivity fotometrickou metodou se sleduje přírůstek produktů nebo úbytek substrátu za jednotku času, který je přímo úměrný změně absorbance. Aktivita enzymu může být vyjádřena jako množství enzymu v mg katalyzujícího za standardních podmínek při nasycení substrátem přeměnu 1 μmol substrátu za 1 min tzv. 1 U (unit).

Postup

Nejprve byl připraven srovnávací roztok do skleněné kyvety o objemu 3,5 ml s optickou dráhou 1 cm. Do srovnávací kyvety bylo tedy pipetováno 1,192 ml PBS, 0,8 ml DTNB a 8 μl 0,1 M ATCHI nebo ATCHCl. Následně bylo do měrné kyvety pipetováno 1,184 ml PBS, 0,8 ml DTNB a 8 μl 0,1 M ATCHI nebo ATCHCl. Enzymatická reakce byla odstartována pipetováním 8 μl ACHE a byla měřena

absorbance A při vlnové délce 412 nm po dobu t 70 s na spektrofotometru s diodovým polem. Z této přímkové závislosti A vs. t byla vypočtena hodnota y pro x = 60 s (z definice 1U). Aktivita enzymu AE_{ACHE} je tedy dána rovnicí:

$$AE_{ACHE} = y \cdot 17,67 \text{ [U]}$$

kde v přepočítávacím faktoru 17,67 je zahrnuta hodnota ředění enzymu, celkový objem reakční směsi (RS) 2 ml, molární absorpční koeficient $14150 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a optická dráha kyvety 1 cm.

3.3.1.3 Stanovení IC_{50} testovaných inhibitorů a standardů rivastigminu a galantaminu

Účinnost inhibitoru popisuje hodnota IC_{50} , což je taková koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu (nebo také: pokles aktivity enzymu na 50 %). Čím je tato hodnota menší, tím účinnější je daný inhibitor. Pro stanovení hodnoty IC_{50} daného inhibitoru lze použít závislosti, která platí mezi poměrem rychlostí neinhibované a inhibované hydrolyzy a koncentrací inhibitoru, tedy v_o/v_i vs. $[I]$. Pro všechny typy uni–uni enzymatických inhibovaných reakcí (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšená) je totiž tato závislost přímková s úsekem rovným 1. Z takto získané přímky, procházející body (0;1) tedy ($[I]$; v_o/v_i), lze odečíst pro $v_o/v_i = 2$ hodnotu IC_{50} .

Postup

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát. Poté byl připraven srovnávací roztok a to tak, že do skleněné kyvety bylo pipetováno takové množství PBS, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem RS 2 ml. V RS bylo dále obsaženo 0,4 ml DTNB a takové množství enzymu, aby jeho aktivita v RS byla 0,2 U. Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitoru. Do měrné kyvety bylo pipetováno takové množství PBS, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem RS 2 ml. V RS bylo dále obsaženo 0,4 ml DTNB, 80 μl 0,001 M ATCHI a takové množství enzymu, aby jeho aktivita v RS byla 0,2 U. Enzym byl pipetován jako poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s na spektrofotometru s diodovým polem. Měření byla provedena v duplikátu nebo v triplikátu.

Následovalo měření enzymatické reakce s inhibitorem. Do měrné kyvety bylo pipetováno takové množství PBS, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem RS 2 ml. V RS bylo dále obsaženo 0,4 ml DTNB, 80 μl 0,001 M ATCHI, 10, 20, 30, 40, 50 nebo 60 μl 0,001 M inhibitoru č. 1-7, standardu rivastigminu o koncentraci

0,001 M nebo standardu galantaminu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M a takové množství enzymu, aby jeho aktivita v RS byla 0,2 U. Enzym byl pipetován jako poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s. Měření byla provedena v duplikátu.

Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve zjištěny rychlosti jednotlivých neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Rychlost reakce je tedy dána rovnicí:

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} [\text{s}^{-1}]$$

kde v je reakční rychlost, A je absorbance, t čas v sekundách. Poté byly sestrojeny závislosti v_0/v_i vs. $[I]$, kde v_0 je rychlost reakce bez inhibitoru, v_i je rychlost reakce s inhibitorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibitoru. Z rovnice lineární regrese byly nakonec určeny hodnoty IC_{50} . Stanovení rychlosti neinhibované a inhibované reakce bylo provedeno vždy nejméně 2 krát.

3.3.1.4 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované a inhibované reakce a určení K_I testovaného inhibitoru

Jednou z možností k určení kinetických parametrů K_M a V_m enzymatické reakce je použití linearizované rovnice Michaelis-Mentenové. K_M je rovna koncentraci substrátu, která je při dané koncentraci enzymu nutná k dosažení poloviny V_m . Je nezávislá na koncentraci enzymu, avšak je závislá na podmínkách prostředí např. na teplotě, pH, iontové síle. Čím je K_M nižší, tím má enzym k danému substrátu vyšší afinitu. Obvykle má rozměr koncentrace substrátu. V_m je rychlost reakce, kde enzym je nasycen substrátem. Má rozměr použité reakční rychlosti. K určení typu inhibice se porovnávají hodnoty K_M a V_m neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Podle mechanismu účinku inhibitoru se inhibice dělí na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšenou. Při kompetitivní inhibici substrát a inhibitor soutěží o jedno vazebné místo aktivního místa enzymu. U této inhibice se zvyšuje K_M , zatímco V_m se nemění. Při nekompetitivní inhibici se inhibitor váže na alosterické místo enzymu a způsobuje konformační změny aktivního místa enzymu. U této inhibice se K_M nemění, avšak V_m je nižší. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže na komplex enzym-substrát. U této inhibice se oba parametry snižují ve stejném poměru. Smíšená inhibice se vyskytuje pouze, pokud nejsou splněny předpoklady pro výše uvedené 3 typy inhibice. U této inhibice je K_M buď vyšší nebo nižší a V_m je nižší.

Obecně by se dalo říci, že K_I udává koncentraci inhibitoru, při níž je dosaženo právě 50% inhibice enzymu. Avšak na rozdíl od hodnoty IC_{50} , která popisuje účinnost

inhibitoru, tak K_I je spíše odrazem vazebné afinity inhibitoru k danému enzymu. K_I tedy udává koncentraci inhibitoru, kde 50 % enzymu přítomného v RS je vázáno do komplexu enzym-inhibitor. Jedná se tedy o disociační konstantu komplexu enzym-inhibitor. Čím je hodnota K_I menší, tím větší je vazebná afinita inhibitoru k danému enzymu, a tudíž je potřeba menší množství inhibitoru k inhibici enzymu. Pokud sestrojíme závislosti $1/v$ vs. $[I]$ při alespoň dvou konstantních koncentracích substrátu $[S]$, kde v je rychlost reakce a $[I]$ je koncentrace inhibitoru RS, tak lze určit průsečíkem přímek závislostí hodnotu K_I . Jedná se o tzv. Dixonův výnos. Z tvaru závislostí lze i rozhodnout, o jaký typ inhibice se jedná. Při kompetitivní inhibici se přímky závislostí protínají nad osou x , jejich průsečík má souřadnice $(-K_I ; 1/V_m)$. Při nekompetitivní inhibici se přímky závislostí protínají na ose x , jejich průsečík má souřadnice $(-K_I ; 0)$. Při akompetitivní inhibici jsou přímky závislostí rovnoběžné a nelze tedy určit hodnotu K_I . Pokud tvar závislostí nespadá ani do jedné z uvedených typů inhibice, tak se jedná o smíšenou inhibici, kde přímky závislostí se protínají nad osou x v 2. kvadrantu, příp. pod osou x v 3. kvadrantu. Pro nekompetitivní inhibici je hodnota K_I v podstatě stejná jako hodnota IC_{50} . Zatímco pro kompetitivní a akompetitivní inhibici je hodnota K_I nižší, než je hodnota IC_{50} . U smíšené inhibice se souvislost mezi K_I a IC_{50} nepoužívá. V praxi se více využívají hodnoty IC_{50} k hodnocení interakce mezi enzymem a inhibitorem. Avšak farmaceutické společnosti udávají nejčastěji obě hodnoty a to IC_{50} i K_I pro charakterizaci daného léku.

Postup

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát. Poté byl připraven srovnávací roztok stejným postupem jako u stanovení IC_{50} (viz kapitola 3.3.1.3). Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitoru stejným postupem jako u stanovení IC_{50} (viz kapitola 3.3.1.3) s tím rozdílem, že byl měněn pipetovaný objem ATCHI, ATCHCl nebo BTCHI. Do měrné kyvety bylo tedy pipetováno 40, 80, 120 nebo 160 μ l 0,001 M ATCHI nebo 0,001 M ATCHCl (a s tím se měnil i objem PBS, aby výsledný objem RS po přidání všech komponent byl vždy 2 ml). V případě stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce u substrátu BTCHI, bylo do měrné kyvety pipetováno takové množství 0,001 až 0,1 M BTCHI, aby koncentrace v RS byla $8 \cdot 10^{-5}$ M, $1,5 \cdot 10^{-4}$ M, $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, $5 \cdot 10^{-4}$ M, $7,5 \cdot 10^{-4}$ M nebo $1 \cdot 10^{-3}$ M. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s u substrátu ATCHI nebo ATCHCl. U substrátu BTCHI byla absorbance měřena 300 s na spektrofotometru s diodovým polem. Měření byla provedena v duplikátu nebo v triplikátu.

Následovalo měření enzymatické reakce s inhibítorem č. 2 nebo 6 stejným postupem jako u stanovení IC_{50} (viz kapitola 3.3.1.3) s tím rozdílem, že byl měněn pipetovaný objem 0,001M ATCHI. Do měrné kyvety bylo tedy pipetováno 40, 80, 120 nebo 160 μ l substrátu. Při každém dávkovaném objemu ATCHI bylo pipetováno 10, 20, 30 nebo 40 μ l 0,001 M inhibítoru č. 2 nebo 6. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s. Měření byla provedena v duplikátu. Inhibitory č. 2 a 6 byly zvoleny jako zástupci nehalogenovaného a halogenovaného derivátu.

Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve zjištěny rychlosti jednotlivých neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Poté byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$, kde v je rychlost reakce a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Výnosem reciprokých hodnot reakčních rychlostí neinhibované a inhibované reakce a koncentrací substrátu v RS byly nakonec zjištěny kinetické parametry K_M a V_m neinhibovaných a inhibovaných reakcí podle linearizované rovnice Michaelis-Mentenové.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

Za účelem určení typu inhibice byly porovnávány hodnoty K_M a V_m neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Nakonec byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $[I]$ při konstantních koncentracích substrátu $[S]$, kde v je rychlost reakce a $[I]$ je koncentrace inhibítoru RS. Průsečíkem přímků závislostí byly určeny hodnoty K_I a z tvaru závislostí byl uvažován typ inhibice.

3.3.2 Stanovení K_{ow} testovaných inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda

Hodnota K_{ow} v soustavě 1-oktanol:voda je definována jako podíl koncentrace chemické látky (v našem případě daného inhibítoru) v nepolární organické fázi 1-oktanolu a v polární vodné fázi. K_{ow} je bezrozměrná veličina a obvykle je vyjádřena v logaritmicím tvaru $\log P$. Její hodnota závisí na pH, teplotě a iontové síle. Pokud působí dané inhibitory jako léčiva, tak hodnoty jejich K_{ow} podávají informaci o propustnosti těchto inhibitorů přes biologické membrány. Čím větší je hodnota K_{ow} , tím více je daná látka lipofilní. Rozpustnost léčiva v tucích tedy zlepšuje jeho prostupnost přes biologické membrány. Důležité je ovšem i zachování rozpustnosti ve vodě, neboť distribuce na místo účinku je zprostředkována krví. Avšak příliš vysoká rozpustnost ve vodě zase způsobuje krátkodobou účinnost léčiva. Proto lékařský chemik Christopher Lipinski a jeho kolegové analyzovali fyzikálně chemické vlastnosti 2000 léků se závěrem, že látka bude pravděpodobněji schopná projít buněčnou membránou a

hematoencefalickou bariérou se zachováním si přijatelné rozpustnosti ve vodě, pokud vyhoví následujícím požadavkům tzv. Lipinskému pravidlu 5. Její molekulová hmotnost (M_r) je ≤ 500 . Její K_{ow} tedy $\log P$ je ≤ 5 . Počet skupin v molekule schopných předat atom vodíku do vodíkové vazby, obvykle součet hydroxylových a aminových skupin v molekule léku, je ≤ 5 . A počet skupin schopných přijímat vodíkové atomy za tvorby vodíkových vazeb, obvykle součet atomů kyslíku a dusíku, je ≤ 10 [84].

Další rozhodující faktor pro látky, které budou schopné procházet přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariérou, je polární povrch molekuly (PSA). PSA je definován jako součet povrchů polárních atomů v molekule. Obvykle se jedná o atomy dusíku a kyslíku včetně jejich navázaných atomů vodíku. Jeho rozměr je v Å^2 , kde $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$. Hodnota $PSA \leq 70 \text{ Å}^2$ by měla být upřednostňována pro zvýšení pravděpodobnosti propustnosti přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru. Výpočet PSA klasickým způsobem je však velmi časově náročný, neboť je nutné vytvořit přiměřený 3D model struktury molekuly. Proto se přistoupilo k tzv. topologickému polárnímu povrchu molekuly (tPSA), který je poměrně dobře odhadnutelný přímo ze strukturního vzorce molekuly [84].

Postup

Nejprve bylo k 1,5 ml 1-oktanolu přidáno 10 μl oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Poté byla směs intenzivně protřepávána 15 min. Následně byl do kyvety odpipetován 1 ml této směsi a byla změřena její absorbance na spektrofotometru s diodovým polem při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Tak byla získána hodnota absorbance, která odpovídala 100 % daného inhibitoru v 1-oktanolu. Měření byla provedena v duplikátu.

Poté bylo ke směsi 1-oktanolu a deionizované vody (poměr 1:1, celkový objem 3 ml) přidáno 10 μl oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Následně byla směs intenzivně protřepávána 15 min a centrifugována při 3000 ot./min po dobu 10 min. Následně byl do kyvety odpipetován 1 ml oktanolové vrstvy a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Srovnávacím prostředím byl vždy 1-oktanol. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě $(\%)_1$ a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě $100 - (\%)_1$. Měření byla provedena v duplikátu. Poté byl vypočten K_{ow} jednotlivých inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda podle vztahu:

$$K_{ow} = \frac{(\%)_1}{100 - (\%)_1} = \frac{c_1}{c_2}$$

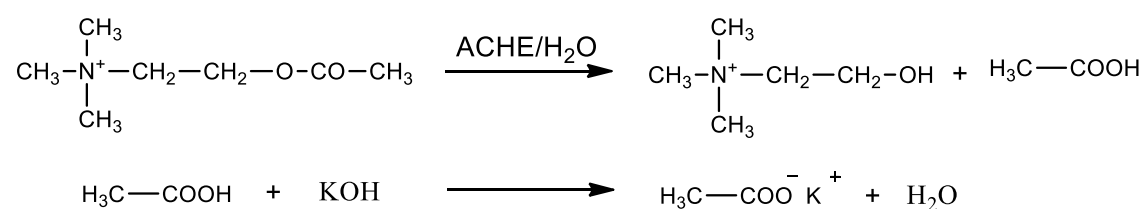
kde c_1 je koncentrace daného inhibitoru v 1-oktanolu a c_2 je koncentrace daného inhibitoru v deionizované vodě. Nakonec bylo uvažováno o propustnosti jednotlivých inhibitorů přes biologické membrány z hodnot K_{ow} respektive $\log P$, z hodnot M_r a tPSA získané programem Chemdraw.

3.4 Potenciometrické metody

3.4.1 pH-stat

3.4.1.1 Princip

Tato metoda je založena na kontinuální neutralizaci vznikající HA odměrným roztokem silné zásady. V našem zapojení dává automatický titrátor, zapojený jako pH-stat, příkazy automatické byretě k přidávkům odměrného vodného roztoku KOH o vhodné koncentraci na základě aktuálního pH reakční směsi sledovaného kontinuálně článkem skleněná-argentochloridová elektroda. Výsledkem je časová závislost objemu přidaného roztoku KOH. Je nutné mít také na paměti, že enzym ACHE a daný substrát musí být rozpuštěny v destilované vodě a nikoliv v PBS, neboť by docházelo k nežádoucí neutralizaci pufrům. Měří se tedy v RS bez pufru. Automatická metoda pH-stat je tedy jednou z nejpřesnějších a nejpohodlnějších metod, kde rychlost přidávku alkalického roztoku potřebného k udržení konstantního pH je úměrná aktivitě nebo inhibici CHEs. Tato metoda je použitelná pro sledování hydrolyzy ACH i ATCH [75]. Princip titrační metody je znázorněn na obr. 7.



Obrázek 7 Princip titrační metody stanovení aktivity/inhibice ACHE [36]

3.4.1.2 Stanovení IC_{50} inhibitoru č. 2 a 6

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát spektrofotometricky Ellmanovou metodou. Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitoru. Do dvouplášťové nádoby o objemu 50 ml bylo pipetováno takové množství destilované vody, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem RS 15 ml. V RS bylo dále obsaženo 3,3 ml KCl a 105 μl 0,1 M ACH. Po vytemperování reakční směsi na 25 °C byla titrátorem provedena pretitrace 0,1 M roztokem KOH pro nastavení pH na hodnotu 7,4. V čase $t=0$ byl přidán takový objem ACHE, aby jeho aktivita v reakční

směsi byla 0,2 U. Přidáním odpovídajícího množství enzymu byla zahájena titrace vznikající HA roztokem KOH. Enzym byl pipetován tedy jako poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. RS byla míchána elektromagnetickým míchadlem. Bylo provedeno měření množství přidávaného objemu KOH po dobu 15 min automatickým titrátorem. Měření byla provedena v duplikátu.

Následovalo měření enzymatické reakce s inhibítorem. Do dvouplášťové nádoby bylo pipetováno takové množství destilované vody, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem RS 15 ml. V RS bylo dále obsaženo 3,3 ml KCl, 105 μ l 0,1 M ACH a 15, 45, 75 nebo 105 μ l 0,01 M inhibítoru č. 2 nebo 6. Po vytemperování reakční směsi na 25 °C byla titrátorem provedena pretitrace 0,1 M roztokem KOH pro nastavení pH na hodnotu 7,4. V čase $t=0$ byl přidán takový objem ACHE, aby jeho aktivita v reakční směsi byla 0,2 U. Přidáním odpovídajícího množství enzymu byla zahájena titrace vznikající HA roztokem KOH. Enzym byl pipetován tedy jako poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. RS byla míchána elektromagnetickým míchadlem. Bylo provedeno měření množství přidávaného objemu KOH po dobu 15 min automatickým titrátorem. Měření byla provedena v duplikátu. Inhibitory č. 2 a 6 byly zvoleny jako zástupci nehalogenovaného a halogenovaného derivátu.

Z naměřených hodnot množství přidávaného objemu byly nejprve zjištěny rychlosti jednotlivých neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Rychlost reakce je tedy dána rovnicí:

$$v = \frac{\Delta V}{\Delta t} \text{ [ml/s]}$$

kde v je reakční rychlost, V je množství přidávaného objemu, t čas v sekundách. Poté byly sestrojeny závislosti v_0/v_i vs. $[I]$, kde v_0 je rychlost reakce bez inhibítoru, v_i je rychlost reakce s inhibítorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibítoru. Z rovnice lineární regrese byly nakonec určeny hodnoty IC_{50} . Stanovení rychlosti neinhibované a inhibované reakce bylo provedeno vždy nejméně 2 krát.

3.4.1.3 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát spektrofotometricky Ellmanovou metodou. Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibítoru stejným postupem jako u stanovení IC_{50} (viz kapitola 3.4.1.2) s tím rozdílem, že byl měněn pipetovaný objem ACH. Do dvouplášťové nádoby bylo tedy pipetováno 15, 45, 75, 105, 150, 450 nebo 750 μ l 0,1 M ACH (a s tím se měnil i objem destilované vody, aby

výsledný objem RS po přidání všech komponent byl vždy 15 ml). Bylo provedeno měření množství přidávaného objemu KOH po dobu 15 min automatickým titrátorem. Měření byla provedena v duplikátu.

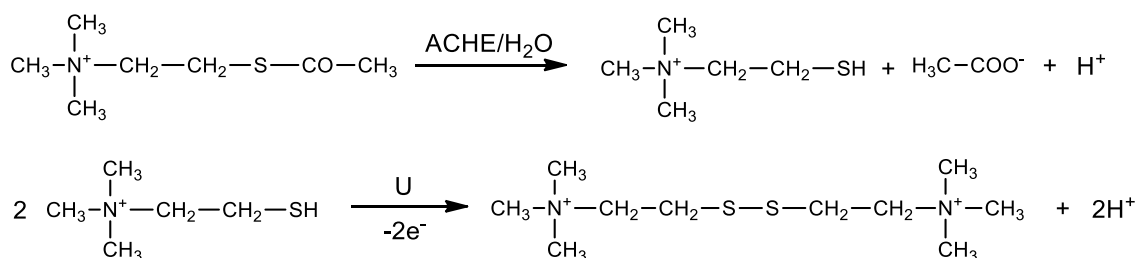
Z naměřených hodnot množství přidávaného objemu byly nejprve zjištěny rychlosti jednotlivých neinhibovaných reakcí. Poté byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$, kde v je rychlost reakce a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Výnosem reciprokých hodnot reakčních rychlostí neinhibované reakce a koncentrací substrátu v RS byly nakonec zjištěny kinetické parametry K_M a V_m neinhibovaných reakcí podle linearizované rovnice Michaelis-Mentenové. Kinetické parametry inhibované reakce se nestanovovaly.

3.5 Elektrochemické senzory

3.5.1 Square wave voltametrie

3.5.1.1 Princip

Elektrochemické senzory založené na hydrolyze ATCH a následné oxidaci thiocholinu aplikovaným napětím jsou poměrně běžné. Napětí je aplikováno buď v pulsech (pak se jedná např. o square wave voltametrii nebo diferenční pulzní voltametrii) nebo může být napětí také aplikováno lineárně (pak se jedná např. o cyklickou voltametrii nebo lineární voltametrii). Pokud je aplikované napětí konstantní, jedná se o amperometrii. Oxidaci thiocholinu lze tedy snadno měřit amperometricky, ale i voltametricky. Amperometrické stanovení oxidované formy thiocholinu je již popsáno v kapitole 1.2.4. V případě stanovení oxidované formy thiocholinu voltametricky např. metodou square wave voltametrie dochází k oxidaci thiocholinu na platinové pracovní elektrodě při aplikovaném napětí v rozmezí 0-1 V proti Ag/AgCl referenční elektrodě. Měří se tedy proud za měnícího se potenciálu. Maximální proudová odezva oxidované formy thiocholinu je zaznamenávána při 700 mV [85]. Dále je nutno podotknout, že v tomto případě je enzym obsažen v RS nikoliv imobilizován na sítotiskovém senzoru. Po hydrolyze ATCH enzymem, který je obsažen v RS, a následné oxidaci thiocholinu aplikovaným napětím, je proudová odezva zpracována převodníkem. Fyzikálně chemický převodník je elektrochemický a představují ho elektrody, které jsou vytištěné na povrch senzoru. V poslední řadě je signál detekován potenciostatem. Princip stanovení oxidované formy thiocholinu amperometricky, ale i voltametricky je znázorněn na obr. 8.



Obrázek 8 Reakční schéma vystihující princip stanovení aktivity/inhibice ACHE elektrochemicky s využitím mono-enzymatického systému a substrátu ATCH [85].
U - aplikované napětí

3.5.1.2 Stanovení IC_{50} inhibitoru č. 2 a 6

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát spektrofotometricky Ellmanovou metodou. Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitoru. Do plastové kyvety o objemu 1,5 ml bylo pipetováno takové množství PBS, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem v RS 550 μl . V RS bylo dále obsaženo 11, 22, 33 nebo 44 μl 0,001 M ATCHI za účelem zachování stejné koncentrace substrátu v RS jako u Ellmanovy metody. Avšak hodnoty výšky píku proudové odezvy těchto objemů substrátu byly tak malé, že by se z nich velmi špatně zpracovávaly výsledky. Proto byly zvoleny jiné objemy substrátu pro lepší zpracování výsledků. V RS bylo tedy dále obsaženo 30, 40, 55 nebo 83 μl 0,1 M ATCHI a takové množství enzymu, aby jeho aktivita v RS byla 0,5 U. Enzym byl pipetován jako poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. Po 5 min inkubaci byl do kyvety vložen sítotiskový elektrochemický senzor a bylo provedeno měření proudu za měněního se potenciálu v rozmezí 0-1 V s vlnovou frekvencí 1 Hz a amplitudou 0,01 V po dobu 180 s. Naměřená data byla sbírána po 0,005 V. Maximální proudová odezva oxidované formy thiocholinu byla zaznamenávána při 700 mV. Měření byla provedena v duplikátu.

Následovalo měření enzymatické reakce s inhibitorem. Do plastové kyvety bylo pipetováno takové množství PBS, aby po přidání všech dalších komponent byl celkový objem v RS 550 μl . V RS bylo dále obsaženo 30, 40, 55 nebo 83 μl 0,1 M ATCHI. Při každém dávkovaném objemu ATCHI bylo pipetováno 3, 5,5; 8,5 nebo 11 μl 0,001 M inhibitoru č. 2 za účelem zachování stejné koncentrace inhibitoru v RS jako u Ellmanovy metody. Avšak při těchto dávkovaných objemech inhibitoru, nedocházelo téměř k žádnému poklesu hodnot výšky píku proudové odezvy. Proto byly zvoleny jiné objemy inhibitoru. Při každém dávkovaném objemu ATCHI bylo tedy pipetováno 27,5; 55 nebo 110 μl 0,001 M inhibitoru č. 2 nebo 6. V RS bylo dále obsaženo takové množství enzymu, aby jeho aktivita v RS byla 0,5 U. Enzym byl pipetován jako

poslední, neboť jeho přidáním do RS se startuje reakce. Po 5 min inkubaci byl do kyvety vložen sítotiskový elektrochemický senzor a bylo provedeno měření proudu za měnícího se potenciálu v rozmezí 0-1 V s vlnovou frekvencí 1 Hz a amplitudou 0,01 V po dobu 180 s. Naměřená data byla sbírána po 0,005 V. Maximální proudová odezva oxidované formy thiocholinu byla zaznamenávána při 700 mV. Měření byla provedena v duplikátu. Inhibitory č. 2 a 6 byly zvoleny jako zástupci nehalogenovaného a halogenovaného derivátu.

Z naměřených hodnot výšky píku proudové odezvy oxidované formy thiocholinu, byly sestrojeny závislosti I_0/I_i vs. $[I]$, kde I_0 je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu enzymatické reakce bez inhibitoru, I_i je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu enzymatické reakce s inhibitorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibitoru. Z rovnice lineární regrese byly nakonec určeny hodnoty IC_{50} , neboť hodnoty výšky píku proudové odezvy jsou úměrné reakční rychlosti.

3.5.1.3 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce

Nejprve byla změřena aktivita enzymu ACHE 5 krát spektrofotometricky Ellmanovou metodou. Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitoru stejným postupem jako u stanovení IC_{50} (viz kapitola 3.5.1.2) s tím rozdílem, že byly použity různé pipetované objemy daných substrátů. Do kyvety bylo tedy pipetováno 30, 40 nebo 55 μ l 0,1 M ATCHI, ATCHCl nebo BTCHI a 14 nebo 28 μ l 1 M ATCHI nebo ATCHCl a 28 nebo 55 μ l 0,5 M BTCHI (a s tím se měnil i objem PBS, aby výsledný objem RS po přidání všech komponent byl vždy 550 μ l). Po 5 min inkubaci byl do kyvety vložen sítotiskový elektrochemický senzor a bylo provedeno měření proudu za měnícího se potenciálu v rozmezí 0-1 V s vlnovou frekvencí 1 Hz a amplitudou 0,01 V po dobu 180 s. Naměřená data byla sbírána po 0,005 V. Maximální proudová odezva oxidované formy thiocholinu byla zaznamenávána při 700 mV. Měření byla provedena v duplikátu.

Z naměřených hodnot výšky píku proudové odezvy oxidované formy thiocholinu neinhibované reakce, byly sestrojeny závislosti $1/I$ vs. $1/[S]$, kde I je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Výnosem reciprokových hodnot výšky píku proudové odezvy neinhibované reakce a koncentrací substrátu v RS byly nakonec zjištěny kinetické parametry K_M a V_m podle linearizované rovnice Michaelis-Mentenové, neboť hodnoty výšky píku proudové odezvy odpovídají reakční rychlosti.

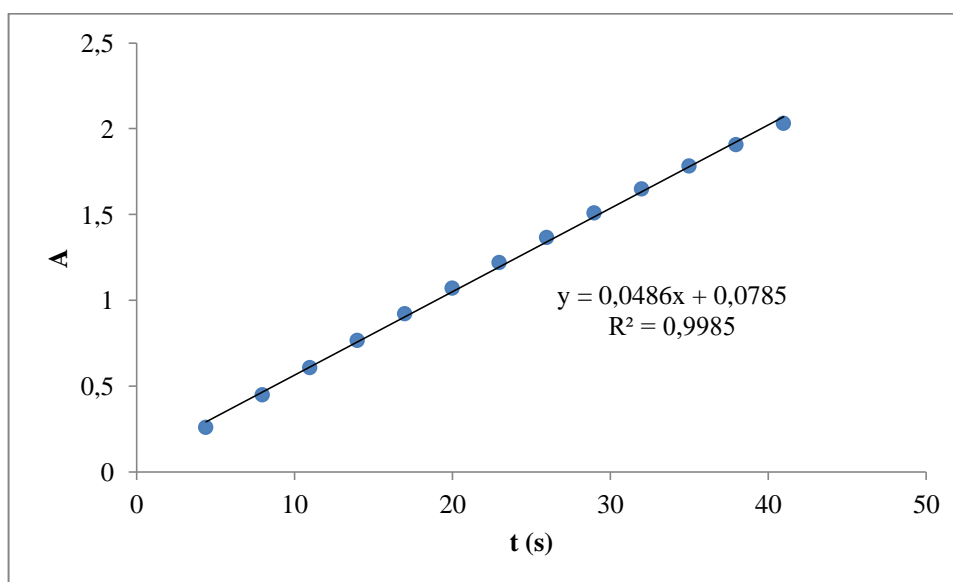
4 VÝSLEDKY

4.1 Spektrofotometrické metody

4.1.1 Ellmanova metoda

4.1.1.1 Stanovení enzymové aktivity ACHE

Aktivita enzymu ACHE byla vždy změřena nejméně 5 krát. Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve sestrojeny závislosti absorbance A na čase t . Příklad přímkové závislosti absorbance A na čase t pro stanovení aktivity enzymu ACHE je zobrazen v Grafu 1. Poté byly závislosti proloženy lineární spojnicí trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese. Pomocí těchto rovnic a přepočítávacího faktoru 17,67 byly vypočteny enzymové aktivity ACHE za časový úsek t 60 s (viz kapitola 3.3.1.2). Příklad výpočtu aktivity enzymu AE_{ACHE} je ukázán níže. Naměřené hodnoty aktivity enzymu byly poté zprůměrovány. Tyto zprůměrované hodnoty aktivity enzymu byly považovány za aktuální aktivitu enzymu \overline{AE}_{ACHE} . Následně bylo vypočteno množství enzymu, které bylo pipetováno do RS, aby jeho aktivita v RS byla 0,2 U nebo 0,5 U pro stanovení IC_{50} nebo kinetických parametrů ACHE (dle použité metody). Příklad výpočtu takového množství enzymu V_{ACHE} , aby jeho aktivita v RS o objemu 2 ml V_{RS} byla 0,2 U, je ukázán níže.



Graf 1 Příklad závislosti absorbance A na čase t při stanovení aktivity ACHE

Výpočet aktivity ACHE pro závislost A vs. t (viz graf 1)

$$x = t = 60 \text{ s}$$

$$y = 0,0486 \cdot x + 0,0785$$

$$y = 0,0486 \cdot 60 + 0,0785 = 2,9945$$

$$AE_{ACHE} = y \cdot 17,67 \text{ (U)}$$

$$AE_{ACHE} = 2,9945 \cdot 17,67 = \underline{52,9128 \text{ U}}$$

Výpočet množství enzymu V_{ACHE} , aby jeho aktivita v RS byla 0,2 U

$$V_{RS} = 2 \text{ ml}$$

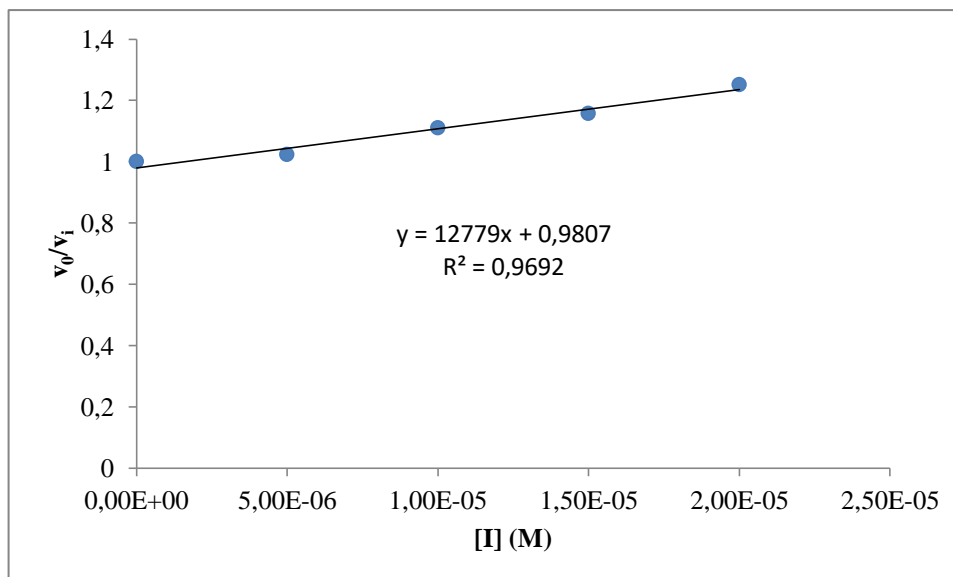
$$\overline{AE}_{ACHE} = 53,2758 \text{ U}$$

$$V_{ACHE} = \frac{0,2}{\overline{AE}_{ACHE}} \cdot V_{RS} \text{ (}\mu\text{l)}$$

$$V_{ACHE} = \frac{0,2}{53,2758} \cdot 2 = \underline{7,5 \mu\text{l}}$$

4.1.1.2 Stanovení IC_{50} testovaných inhibitorů a standardů rivastigminu a galantaminu

Hodnota IC_{50} byla stanovována pro inhibitory č. 1-7 a pro standardy rivastigmin a galantamin vždy 2 krát. Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve zjištěny rychlosti neinhibované a inhibované reakce a byly vypočteny jejich poměry (viz kapitola 3.3.1.3). Rychlost neinhibované reakce byla zprůměrována min. z 2 měření. Rychlost inhibované reakce byla měřena vždy 2 krát pro každé dávkované množství testovaného inhibitoru a standardu. Poté byly sestrojeny závislosti v_0/v_i vs. $[I]$, kde v_0 je rychlost reakce bez inhibitoru, v_i je rychlost reakce s inhibitorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibitoru. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnicí trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese. Příklad přímkové závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ pro stanovení IC_{50} inhibitoru č. 1 je zobrazen v Grafu 2. Z takto získaných přímek, procházejících body (0;1) tedy ($[I]$; v_0/v_i), lze odečíst po zobrazení rovnic lineární regrese pro $v_0/v_i = 2$ hodnotu IC_{50} . Příklad výpočtu hodnoty IC_{50} pro inhibitor č. 1 je ukázán níže. Hodnoty IC_{50} jednotlivých inhibitorů a standardů byly poté zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou. Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 1-7 a standardů rivastigminu a galantaminu jsou uvedeny v Tabulce 2.



Graf 2 Příklad závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$

Výpočet hodnoty IC_{50} (viz graf 2)

$$y = 2$$

$$x = [I]_1 = \frac{y-0,9807}{12779} \text{ (M)}$$

$$x = [I]_1 = \frac{2-0,9807}{12779} = \underline{\underline{79,764 \mu\text{M}}}$$

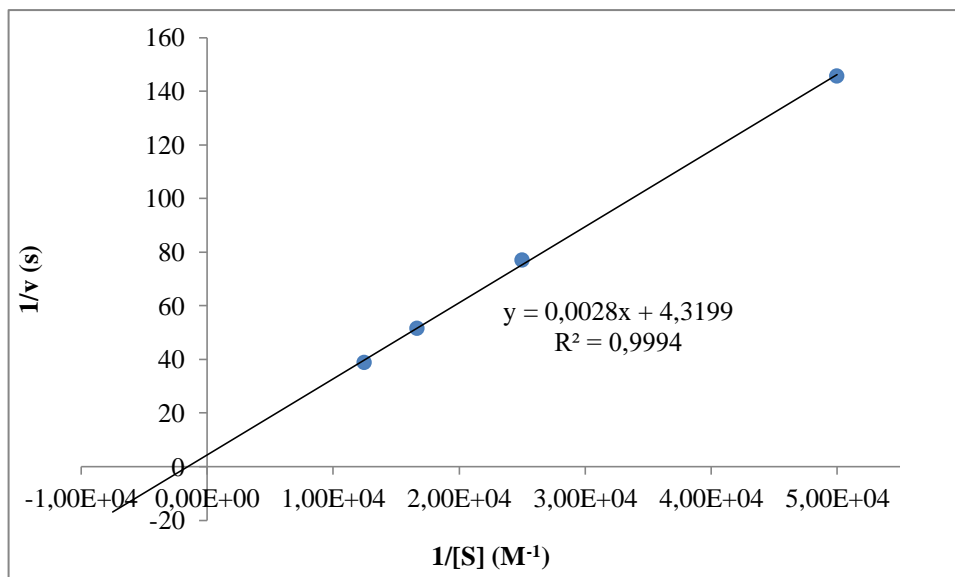
Tabulka 2 Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 1-7 a standardů rivastigminu a galantaminu

Inhibitor č.	$IC_{50} \text{ (}\mu\text{M)}$
1	$81,68 \pm 1,91$
2	$81,71 \pm 0,78$
3	$79,08 \pm 1,74$
4	$112,98 \pm 3,94$
5	$66,02 \pm 1,83$
6	$77,29 \pm 0,63$
7	$48,10 \pm 0,87$
rivastigmin	$45,11 \pm 0,97$
galantamin	$2,33 \pm 0,02$

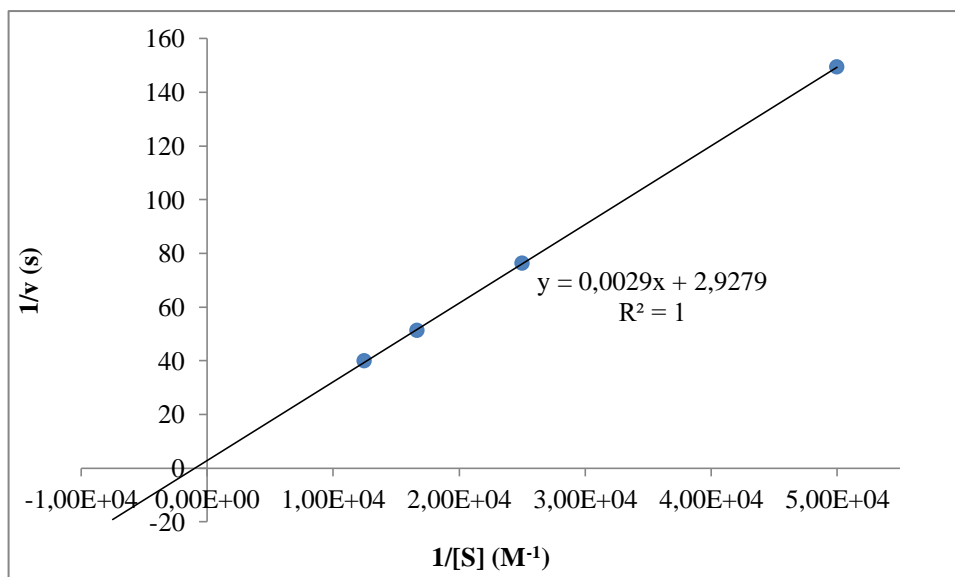
4.1.1.3 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované a inhibované reakce a určení K_I testovaného inhibitoru

Nejprve byly stanovovány kinetické parametry ACHE neinhibované reakce u substrátu ATCHI, ATCHCl a BTCHI. Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve zjištěny rychlosti neinhibované reakce a byly vypočteny jejich převrácené hodnoty (viz kapitola 3.3.1.4). Převrácené hodnoty rychlosti neinhibovaných reakcí byly zprůměrovány min. z 2 měření se směrodatnou odchylkou $SD \leq 0,9$ u substrátu ATCHI, $SD \leq 0,5$ u substrátu ATCHCl a $SD \leq 115$ u substrátu BTCHI. Poté byly stanovovány i kinetické parametry ACHE inhibované reakce s inhibitorem č. 2 a 6. Substrát pro ACHE byl použit ATCHI. Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve zjištěny rychlosti inhibované reakce a byly vypočteny jejich převrácené hodnoty (viz kapitola 3.3.1.4). Převrácené hodnoty rychlosti neinhibovaných a inhibovaných reakcí byly zprůměrovány min. z 2 měření se směrodatnou odchylkou $SD \leq 6$ u inhibitoru č. 2 a $SD \leq 9$ u inhibitoru č. 6.

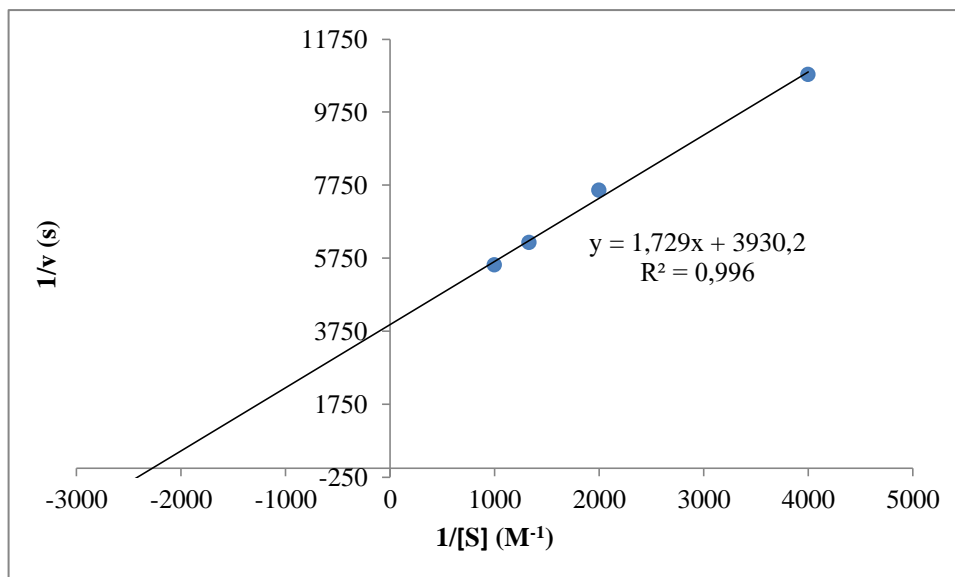
Poté byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$, kde v je rychlost reakce a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce u substrátu ATCHI je zobrazen v Grafu 3, u substrátu ATCHCl je zobrazen v Grafu 4 a u substrátu BTCHI je zobrazen v Grafu 5. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese, které odpovídají linearizované rovnici Michaelis-Mentenové. Z takto získaných přímek lze tedy odečíst hodnoty K_M a V_m neinhibované reakce. Příklad výpočtu kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce u substrátu ATCHI je ukázán níže. Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce u substrátu ATCHI, ATCHCl a BTCHI jsou uvedeny v Tabulce 3.



Graf 3 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu ATCHI



Graf 4 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu ATCHCl



Graf 5 Příklad závislosti recipročních hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS u substrátu BTCHI

Výpočet kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce u substrátu ATCHI (viz graf 3)

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

$$y = 0,0028 \cdot x + 4,3199$$

$$\frac{1}{v} = 0,0028 \cdot \frac{1}{[S]} + 4,3199$$

$$\frac{1}{V_m} = 4,3199$$

$$V_m = \frac{1}{4,3199} = \underline{\underline{0,2315 \text{ s}^{-1}}}$$

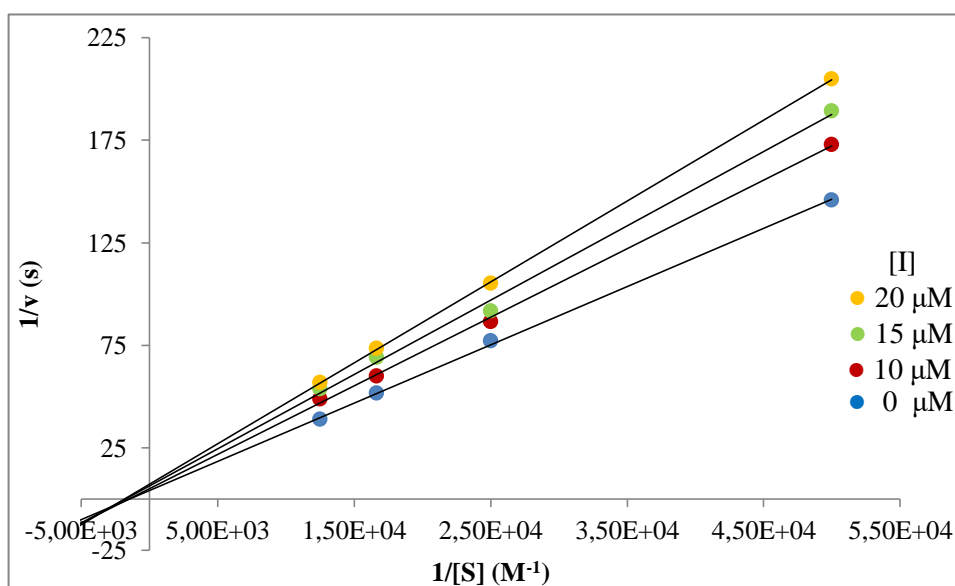
$$\frac{K_M}{V_m} = 0,0028$$

$$K_M = 0,0028 \cdot V_m = 0,0028 \cdot 0,2315 = \underline{\underline{0,6482 \text{ mM}}}$$

Tabulka 3 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce

Substrát	K_M (mM)	V_m (s ⁻¹)
ATCHI	0,6482	0,2315
ATCHCl	0,9905	0,3415
BTCHI	0,4399	0,000254

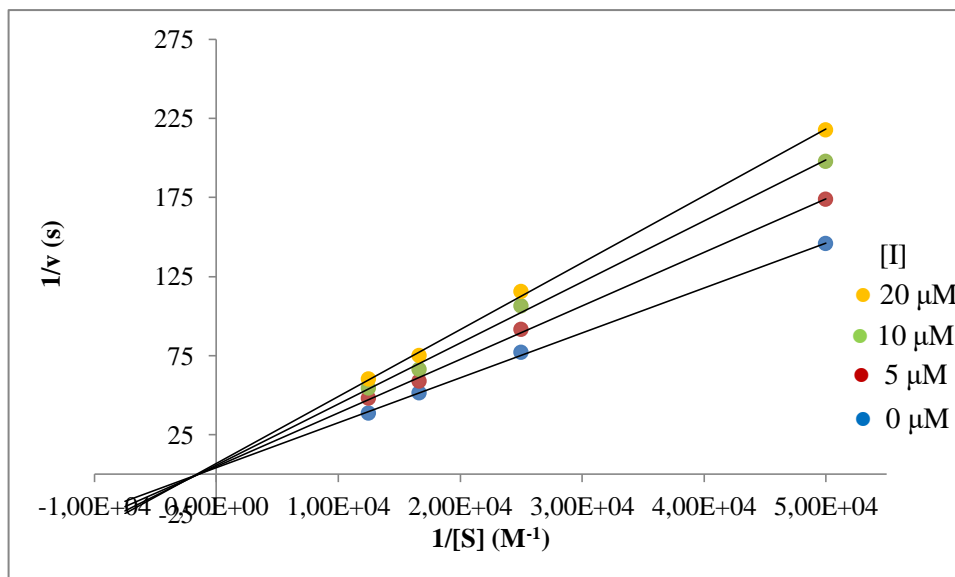
Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS pro stanovení kinetických parametrů inhibované reakce při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 2 je zobrazen v Grafu 6 a při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 6 je zobrazen v Grafu 7. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnicí trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese, které odpovídají linearizované rovnici Michaelis-Mentenové. Z takto získaných přímek lze tedy rovněž odečíst hodnoty K_M a V_m inhibované reakce. Za účelem určení typu inhibice byly porovnávány hodnoty K_M a V_m neinhibovaných a inhibovaných reakcí. Pro usnadnění byly vypočteny i poměry těchto kinetických parametrů K_M/V_m . Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m inhibované reakce inhibitorem č. 2 jsou uvedeny v Tabulce 4 a inhibitorem č. 6 jsou uvedeny v Tabulce 5.



Graf 6 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 2

Tabulka 4 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m inhibované reakce (inhibitor č. 2)

$[I]$ (μM)	K_M (mM)	V_m (s^{-1})	K_M/V_m
20	0,5337	0,14	3,90
15	0,5512	0,15	3,60
10	0,6597	0,20	3,30
0	0,6482	0,23	2,80

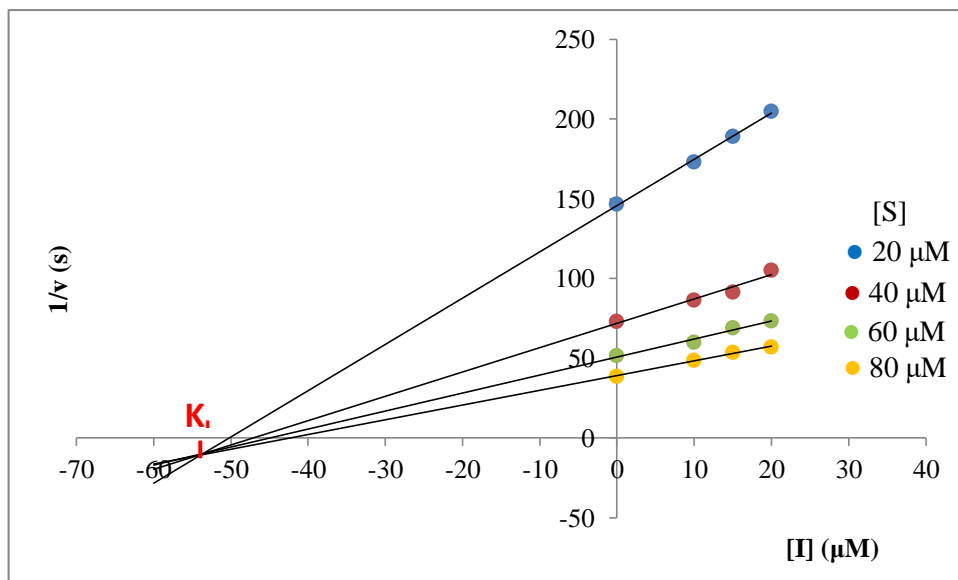


Graf 7 Příklad závislosti recipročních hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS při konstantních koncentracích inhibitoru $[I]$ č. 6

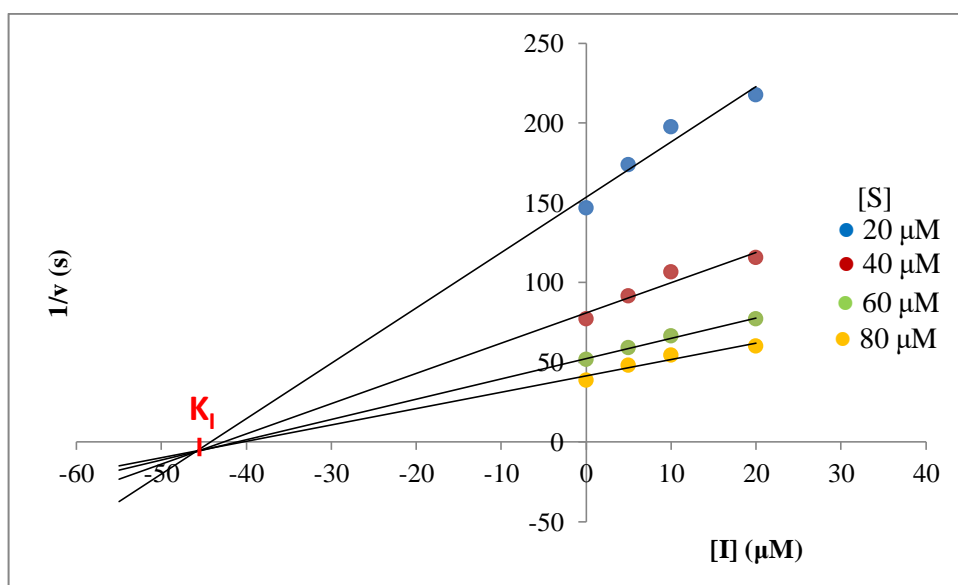
Tabulka 5 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m inhibované reakce (inhibitor č. 6)

$[I]$ (μM)	K_M (mM)	V_m (s^{-1})	K_M/V_m
20	0,5995	0,14	4,20
10	0,6765	0,17	3,90
5	0,6954	0,20	3,40
0	0,6482	0,23	2,80

Nakonec byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $[I]$ při konstantních koncentracích substrátu $[S]$, kde v je rychlost reakce a $[I]$ je koncentrace inhibitoru v RS (viz kapitola 3.3.1.4). Příklad závislosti recipročních hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci inhibitoru $[I]$ v RS při konstantních koncentracích substrátu $[S]$ pro stanovení K_I inhibitoru č. 2 je zobrazen v Grafu 8 a inhibitoru č. 6 je zobrazen v Grafu 9. Průsečíkem přímek závislostí byly určeny hodnoty K_I a z tvaru závislostí byl uvažován typ inhibice. Hodnoty K_I inhibitoru č. 2 a 6 jsou uvedeny v Tabulce 6.



Graf 8 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 2 v RS při konstantních koncentracích substrátu $[S]$



Graf 9 Příklad závislosti reciprokových hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 6 v RS při konstantních koncentracích substrátu $[S]$

Tabulka 6 Hodnoty K_i inhibitorů č. 2 a 6

Inhibitor č.	K_i (μM)
2	54
6	46

4.1.2 Stanovení K_{ow} testovaných inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda

Hodnota K_{ow} byla stanovována pro inhibitory č. 1-7 vždy 2 krát. Nejprve byly změřeny hodnoty absorbance, které odpovídaly 100 % daného inhibitoru v 1-oktanolu. Poté byly změřeny hodnoty absorbance, které odpovídaly procentuálnímu obsahu inhibitoru v oktanolové vrstvě v soustavě 1-oktanol:voda. Následně byly dopočtem do 100 % určeny hodnoty absorbance inhibitoru ve vodné vrstvě. Nakonec byly vypočteny hodnoty K_{ow} jednotlivých inhibitorů v soustavě 1-oktanol:voda (viz kapitola 3.3.2). Hodnoty K_{ow} jednotlivých inhibitorů byly poté zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou. Hodnoty K_{ow} inhibitorů č. 1-7 jsou uvedeny v Tabulce 7 jako hodnoty log P. Tyto hodnoty K_{ow} získané z experimentu jsou porovnávány s hodnotami K_{ow} získané pomocí programu Chemdraw a Chemskech. V tabulce jsou zahrnuty i M_r testovaných inhibitorů a tPSA získané pomocí programu Chemdraw. Tyto údaje byly společně uvažovány jako o schopnosti látek přestupovat přes biologické membrány (viz kapitola 3.3.2).

Tabulka 7 Hodnoty K_{ow} , M_r a tPSA testovaných inhibitorů

Inhibitor č.	M_r (Chemdraw)	K_{ow} (log P) (Chemdraw)	K_{ow} (log P) (Chemskech)	K_{ow} (log P) (experiment)	tPSA (\AA^2) (Chemdraw)
1	284,31	-0,08	1,72	$2,23 \pm 0,33$	58,64
2	312,36	0,98	2,78	$3,01 \pm 0,33$	58,64
3	408,45	3,31	5,16	$5,06 \pm 0,59$	58,64
4	346,38	1,83	3,41	$2,90 \pm 0,59$	58,64
5	415,27	5,79	5,53	$5,42 \pm 0,83$	58,64
6	459,72	5,94	5,90	$5,81 \pm 0,76$	58,64
7	398,81	5,22	5,18	$2,25 \pm 0,76$	58,64

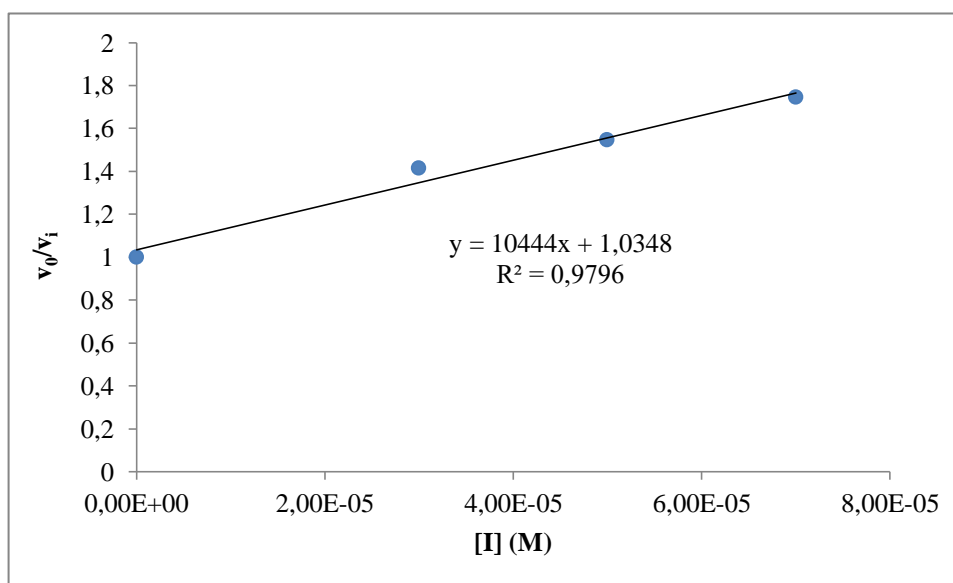
4.2 Potenciometrické metody

4.2.1 pH-stat

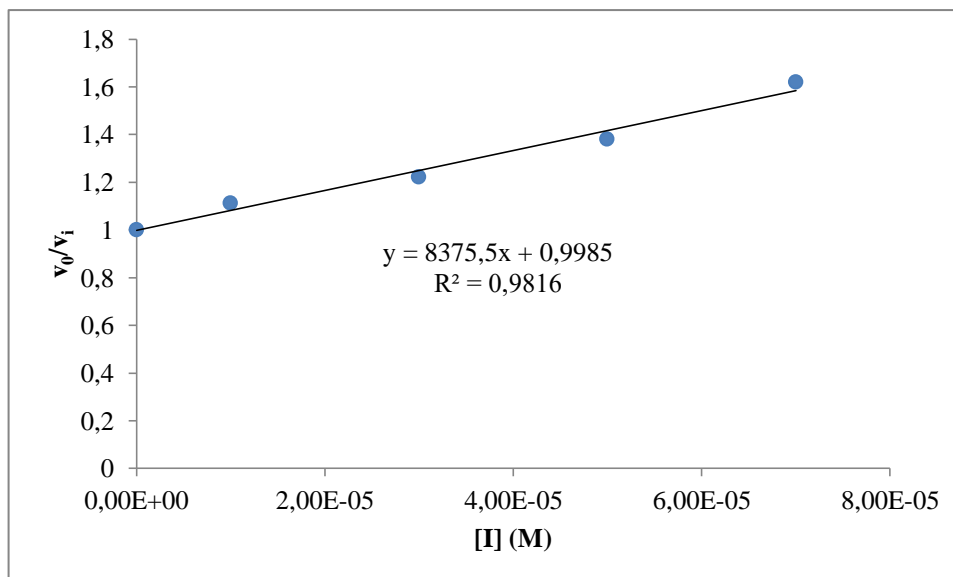
4.2.1.1 Stanovení IC_{50} inhibitoru č. 2 a 6

Hodnota IC_{50} byla stanovována pro inhibitory č. 2 a 6 vždy 2 krát. Z naměřených hodnot množství přidávaného objemu KOH byly nejprve zjištěny rychlosti neinhibované a inhibované reakce a byly vypočteny jejich poměry (viz kapitola 3.4.1.2).

Rychlost neinhibované reakce byla zprůměrována min. z 2 měření. Rychlost inhibované reakce byla měřena vždy 2 krát pro každé dávkované množství testovaného inhibitoru. Poté byly sestrojeny závislosti v_0/v_i vs. $[I]$, kde v_0 je rychlost reakce bez inhibitoru, v_i je rychlost reakce s inhibitorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibitoru. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnicí trendu a byla zobrazena rovnice lineární regrese. Příklad přímkové závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ pro stanovení IC_{50} inhibitoru č. 2 je zobrazen v Grafu 10 a inhibitoru č. 6 v Grafu 11. Z takto získaných přímek, procházejících body $(0;1)$ tedy $([I] ; v_0/v_i)$, lze odečíst po zobrazení rovnic lineární regrese pro $v_0/v_i = 2$ hodnotu IC_{50} . Hodnoty IC_{50} inhibitoru č. 2 nebo 6 byly poté zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou. Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 2 a 6 a jsou uvedeny v Tabulce 8.



Graf 10 Příklad závislosti poměrů rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 2



Graf 11 Příklad závislosti poměrů rychlostí neinhibované a inhibované reakce v_0/v_i na koncentraci inhibitoru $[I]$ č. 6

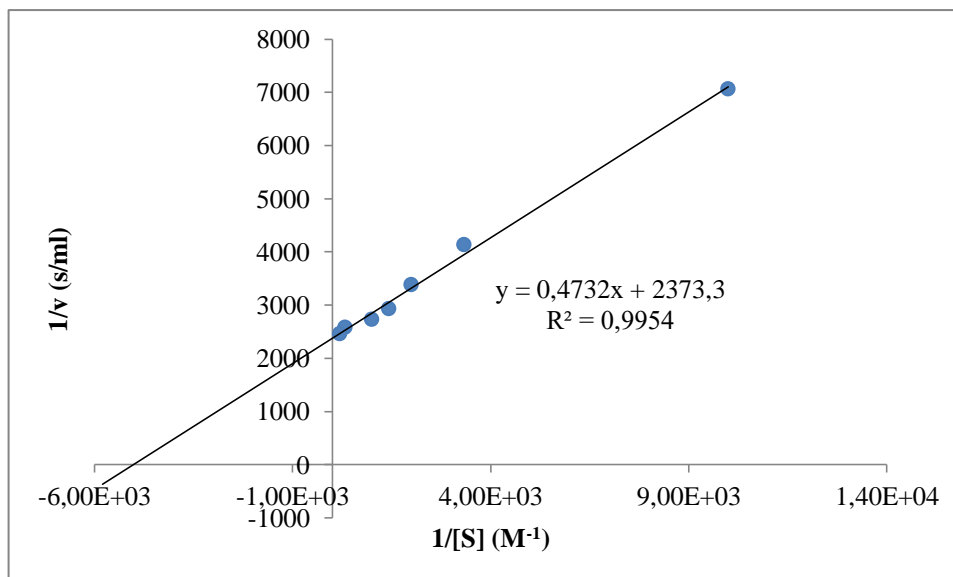
Tabulka 8 Hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 2 a 6

Inhibitor č.	IC_{50} (μM)
2	$97,20 \pm 4,79$
6	$126,62 \pm 7,04$

4.2.1.2 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce

Nejprve byly stanovovány kinetické parametry ACHE neinhibované reakce u substrátu ACH. Z naměřených hodnot množství přidávaného objemu KOH byly nejprve zjištěny rychlosti neinhibované reakce a byly vypočteny jejich převrácené hodnoty (viz kapitola 3.4.1.3). Převrácené hodnoty rychlosti neinhibovaných reakcí byly zprůměrovány min. z 2 měření se směrodatnou odchylkou $SD \leq 775$ u substrátu ACH.

Poté byly sestrojeny závislosti $1/v$ vs. $1/[S]$, kde v je rychlost reakce a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Příklad závislosti recipročních hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce u substrátu ACH je zobrazen v Grafu 12. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese, které odpovídají linearizované rovnici Michaelis-Mentenové. Z takto získaných přímk lze tedy odečíst hodnoty K_M a V_m neinhibované reakce. Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce u substrátu ACH jsou uvedeny v Tabulce 9.



Graf 12 Příklad závislosti recipročních hodnot reakční rychlosti $1/v$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu ACH

Tabulka 9 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce ACH

Substrát	K_M (mM)	V_m (ml/s)
ACH	0,19940	$4,2135 \cdot 10^{-4}$

4.3 Elektrochemické senzory

4.3.1 Square wave voltametrie

4.3.1.1 Stanovení IC_{50} inhibitoru č. 2 a 6

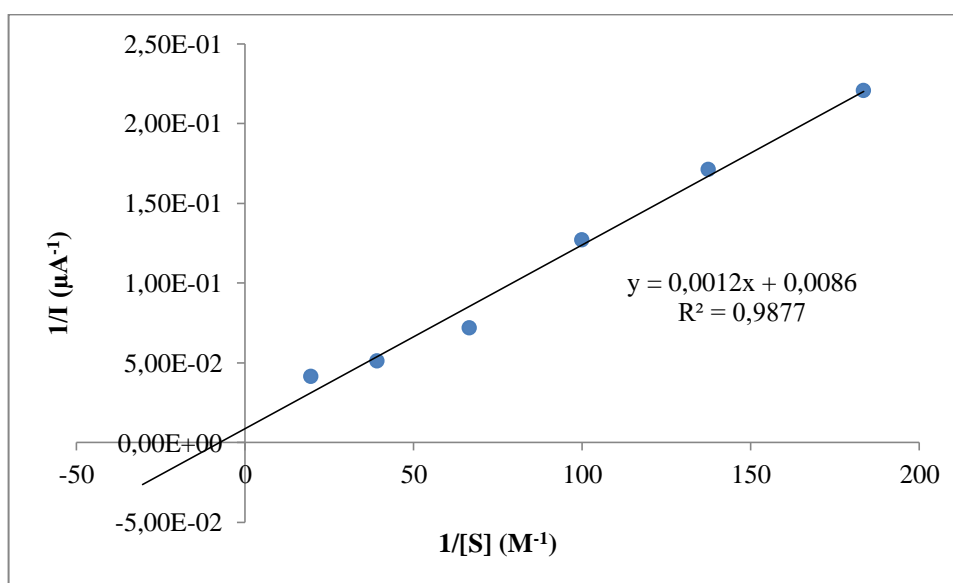
Hodnota IC_{50} byla stanovována pro inhibitory č. 2 a 6 vždy 2 krát. Z naměřených hodnot výšky píku proudové odezvy oxidované formy thiocholinu, které jsou úměrné reakčním rychlostem neinhibované a inhibované reakce, byly nejprve vypočteny jejich poměry (viz kapitola 3.5.1.2). Rychlost neinhibované a inhibované reakce byla zprůměrována min. z 2. Rychlost inhibované reakce byla měřena vždy 2 krát pro každé dávkované množství testovaného inhibitoru. Poté byly sestrojeny závislosti I_0/I_i vs. $[I]$, kde I_0 je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu enzymatické reakce bez inhibitoru, I_i je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu enzymatické reakce s inhibitorem a $[I]$ je molární koncentrace inhibitoru. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese. Z takto získaných přímek, procházejících body (0;1) tedy ($[I]$; I_0/I_i), lze odečíst po zobrazení rovnic lineární regrese pro $I_0/I_i = 2$ hodnotu IC_{50} . Avšak hodnoty IC_{50} inhibitorů č. 2 a 6 byly při všech testovaných

koncentracích substrátu větší jak 500 μM . Využití elektrochemických senzorů tedy není vhodné pro testování IC_{50} zvolených inhibitorů.

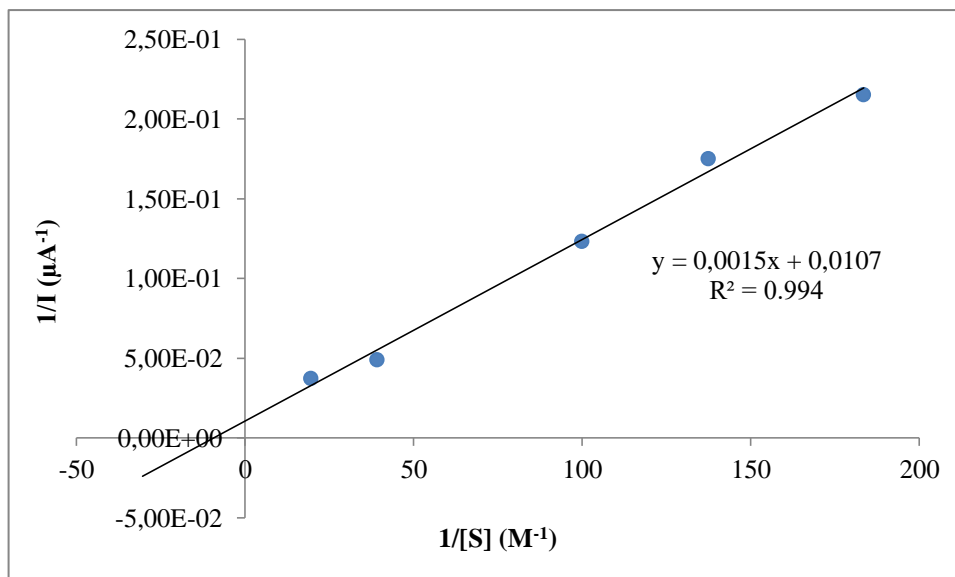
4.3.1.2 Stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce

Nejprve byly stanovovány kinetické parametry ACHE neinhibované reakce u substrátu ATCHI a BTCHI. Z naměřených hodnot výšky píku proudové odezvy oxidované formy thiocholinu, které jsou úměrné reakčním rychlostem neinhibované reakce, byly vypočteny jejich převrácené hodnoty (viz kapitola 3.5.1.3). Převrácené hodnoty výšky píku proudové odezvy neinhibovaných reakcí byly zprůměrovány min. z 2 měření se směrodatnou odchylkou $\text{SD} \leq 0,006$ u substrátu ATCHI a $\text{SD} \leq 0,003$ u substrátu BTCHI.

Poté byly sestrojeny závislosti $1/I$ vs. $1/[S]$, kde I je velikost výšky píku proudové odezvy produktu dithiocholinu a $[S]$ je koncentrace substrátu v RS. Příklad závislosti reciprokých hodnot výšky píku proudové odezvy $1/I$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ v RS pro stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce u substrátu ATCHI je zobrazen v Grafu 13 a u substrátu BTCHI je zobrazen v Grafu 14. Následně byly závislosti proloženy lineární spojnicí trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese, které odpovídají linearizované rovnici Michaelis-Mentenové. Z takto získaných přímek lze tedy odečíst hodnoty K_M a V_m neinhibované reakce. Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce u substrátu ATCHI a BTCHI jsou uvedeny v Tabulce 10.



Graf 13 Příklad závislosti reciprokých hodnot výšky píku proudové odezvy $1/I$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu ATCHI



Graf 14 Příklad závislosti recipročních hodnot výšky píku proudové odezvy $1/I$ a koncentrací substrátu $1/[S]$ u substrátu BTCHI

Tabulka 10 Hodnoty kinetických parametrů K_M a V_m neinhibované reakce

Substrát	K_M (M)	V_m (μA)
ATCHI	0,1395	116,2791
BTCHI	0,1402	93,4579

5 DISKUZE

Je známo, že ACHE hydrolyzuje svůj přirozený substrát ACH s mnohem vyšší afinitou a s mnohem větší rychlostí než BCH. Tento fakt platí i pro umělé substráty esterů thiocholinu, neboť hodnota V_m substrátu ATCHI činí $0,2315 \text{ s}^{-1}$, ATCHCl činí $0,3415 \text{ s}^{-1}$ a BTCHI činí $0,000254 \text{ s}^{-1}$. Překvapující jsou však hodnoty K_M , neboť u ATCHI je hodnota K_M $0,6482 \text{ mM}$, u ATCHCl je $0,9905 \text{ mM}$ a u BTCHI je $0,4399 \text{ mM}$.

Dále byly určeny kinetické parametry inhibované reakce ACHE u substrátu ATCHI karbamátovým inhibítorem č. 2 a 6. Jednalo se o zástupce nehalogenovaného a halogenovaného derivátu. U obou inhibítorů se hodnota K_M inhibované reakce buď zvyšovala, nebo snižovala v porovnání s hodnotou K_M neinhibované reakce. Hodnota V_m inhibované reakce se vždy snižovala v porovnání s hodnotou V_m neinhibované reakce. Mohlo by se tedy jednat o smíšenou inhibici, viz graf 6 a tab. 4 pro inhibitor č. 2 a viz graf 7 a tab. 5 pro inhibitor č. 6. Avšak hodnoty K_M inhibované reakce se snižovaly nebo zvyšovaly od neinhibované reakce více méně nepatrně. Po sestrojení Dixonova výnosu se přímky závislosti u obou inhibítorů protínaly téměř na ose x, viz graf 8 a 9. Mohlo by se tedy jednat i o nekompetitivní inhibici.

Dále byly stanoveny hodnoty IC_{50} karbamátových inhibítorů č. 1-7, viz tab. 2. Hodnoty IC_{50} zmíněných inhibítorů se pohybovaly v rozmezí $48\text{-}113 \text{ }\mu\text{M}$. Nejsilnější inhibitor je tedy inhibitor č. 7 s hodnotou IC_{50} $48,10 \pm 0,87 \text{ }\mu\text{M}$, který má ve své struktuře zabudovaný fluor. Nejslabší inhibitor je inhibitor č. 4 s hodnotou IC_{50} $112,98 \pm 3,94 \text{ }\mu\text{M}$, který patří mezi nehalogenované deriváty. Jako standardy byly použity karbamátový inhibitor rivastigmin a alkaloid galantamin, které se podávají pacientům s AD. Jejich IC_{50} činí $45,11 \pm 0,97 \text{ }\mu\text{M}$ u rivastigminu a $2,33 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$ u galantaminu. Galantamin je tedy silnější inhibitor než rivastigmin. Avšak ani jeden z testovaných inhibítorů č. 1-7 není účinnější než rivastigmin a už vůbec ne než galantamin. Tyto dva standardy měřené za stejných podmínek jako v této práci jsou uvedeny v publikaci Krátký a spol., kde hodnota IC_{50} pro rivastigmin je $56,10 \pm 1,41 \text{ }\mu\text{M}$ a pro galantamin je $1,54 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{M}$ [86]. Pokud by se přihlíželo k hodnotě IC_{50} rivastigminu uvedené v publikaci Krátký a spol., tak testovaný karbamátový inhibitor č. 7 by byl jako jediný účinnější než zmíněný rivastigmin. Jako další parametr popisující interakci mezi enzymem a inhibítorem, který byl stanovován, je hodnota K_i . Hodnota K_i u inhibítoru č. 2 je $54 \text{ }\mu\text{M}$ a u inhibítoru č. 6 je $46 \text{ }\mu\text{M}$.

V porovnání s hodnotou IC_{50} , má inhibitor č. 2 hodnotu IC_{50} kolem $82 \mu\text{M}$ a inhibitor č. 6 kolem $77 \mu\text{M}$. Inhibitor č. 6 je tedy nejen účinnější než inhibitor č. 2, ale také má větší vazebnou afinitu k ACHE než inhibitor č. 2.

Nakonec byly určeny hodnoty K_{ow} karbamátových inhibitorů č. 1-7 pomocí programu Chemdraw, Chemscketch a samozřejmě i experimentálně, viz tab. 7. Hodnoty K_{ow} získané těmito třemi způsoby se od sebe u některých inhibitorů lišily. Avšak Lipinského pravidlu 5 s přihlédnutím rozdílnému log P, spolu s parametrem M_r a tPSA, vyhověly určitě inhibitory č. 1, 2 a 4. Tito zmínění zástupci nehalogenových derivátů by tedy mohli nejpravděpodobněji procházet buněčnou membránou a hematoencefalickou bariérou se zachováním si přijatelné rozpustnosti ve vodě. Tyto inhibitory by tedy mohly být doporučeny, nehledě na jejich hodnoty IC_{50} , na další testování jako potenciální možné léky např. pro AD. Zmíněné karbamátové inhibitory č. 1-7 již byly testovány v roce 2014 Krátkým a spol. na antimikrobiální účinnost. Jedná se přesněji o salicylanilidové *N,N*-disubstitované karbamátové inhibitory, které by se mohly stát potenciálními antimikrobiálními léky především proti *Mycobacterium tuberculosis* a proti netuberkulózním bakteriím a to *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii* [87].

Veškeré výsledky uvedené výše byly stanoveny Ellmanovou metodou. K určení kinetických parametrů neinhibované reakce ACHE a k určení hodnoty IC_{50} inhibitoru č. 2 a 6 byla použita také pH-statová metoda. Zde byly stanovovány kinetické parametry ACHE hydrolyzy ACH. Hodnota K_M je $0,19940 \text{ mM}$ a hodnota V_m je $4,2135 \cdot 10^{-4} \text{ ml/s}$. Hodnota V_m je překvapivě malá, avšak afinita ACH k enzymu ACHE je na druhou stranu vysoká. Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce se nestanovovaly. Dále se určovala hodnota IC_{50} u inhibitoru č. 2 a 6, kde hodnota IC_{50} u inhibitoru č. 2, zástupce nehalogenovaného derivátu, je $97,20 \pm 4,79 \mu\text{M}$ a u inhibitoru č. 6, zástupce halogenovaného derivátu, je $126,62 \pm 7,04 \mu\text{M}$. Inhibitor č. 2 je tedy účinnější než inhibitor č. 6.

Kinetické parametry ACHE neinhibované reakce a hodnoty IC_{50} u inhibitoru č. 2 a 6 byly stanoveny v poslední řadě i elektrochemickým senzorem technikou square wave voltametrie. Zde byly určeny kinetické parametry K_M a V_m ACHE u substrátu ATCHI a BTCHI. ACHE hydrolyzovala ATCHI rychleji a s nepatrně vyšší afinitou než BTCHI. Hodnota K_M u ATCHI činí $0,1395 \text{ M}$ a hodnota V_m činí $116,2791 \mu\text{A}$. Hodnota K_M u BTCHI činí $0,1402 \text{ M}$ a hodnota V_m činí $93,4579 \mu\text{A}$. Nepodařilo se však určit hodnoty kinetických parametrů ACHE neinhibované reakce u substrátu

ATCHCl. Senzor nevykazoval stanovitelný signál výšky píku proudové odezvy, přesto že je ATCHCl doporučován jako nejvhodnější substrát pro stanovení elektrochemickým senzorem. Avšak Bucur a spol. ve své publikaci dále uvádí o možnosti využití i ATCHI jako vhodného substrátu pro elektrochemické stanovení, pokud by se důkladně optimalizovaly podmínky měření pro každý senzor, jako jsou např. vliv jodidu na elektrochemické chování senzoru během měření a vhodný vkládaný potenciál [88]. Dále byla také určena hodnota IC_{50} u inhibitoru č. 2 a 6, zástupce nehalogenovaného a halogenovaného derivátu. Avšak hodnota IC_{50} pro oba inhibitory byly větší jak $500 \mu\text{M}$. Elektrochemické senzory tedy nejsou vhodné pro stanovení hodnot IC_{50} těchto látek.

Veškeré hodnoty jednotlivých výsledků získané zmíněnými metodami je těžké mezi sebou porovnávat, neboť se u každé metody měřilo za různých podmínek, jako jsou např. koncentrace substrátu, koncentrace inhibitoru, aktivita enzymu, doba měření.

ZÁVĚR

Přesto že všechny tři použité metody, Ellmanova metoda, pH-statová metoda a elektrochemické senzory disponují svými výhodami, jako jsou např. jednoduchost, přesnost a velmi dobrá citlivost, tak jako nejvhodnější metoda pro stanovení kinetických parametrů ACHE neinhibované a inhibované reakce a pro stanovení hodnot IC_{50} a K_I se ukázala Ellmanova metoda. Ellmanova metoda je tedy nejvhodnější metodou pro kinetické měření enzymů, ale je taky velmi vhodná pro sledování inhibiční účinnosti a interakce mezi enzymem a inhibitorem. Ellmanova metoda je navíc časově nenáročná (jedna reakce trvá pouze 70 s) a poskytuje kontinuální zvyšování hustoty barvy v čase i u koncentrace substrátu a inhibitoru 10^{-5} M v RS. Měření s menšími koncentracemi je velmi výhodné, neboť se tolik neprojeví chyby způsobené lidským faktorem. Nevýhodou je ale to, že nepracuje s fyziologickým substrátem ACH, ale se syntetickým ATCH.

Pomocí pH-statové metody se nestanovovaly kinetické parametry ACHE inhibované reakce, neboť tato metoda je časově nejnáročnější metodou ze zmíněných metod. Jedna reakce totiž trvá 15 min.

Elektrochemickým senzorem se nepodařilo stanovit kinetické parametry neinhibované reakce u substrátu ATCHCl, přesto že je doporučován jako nejvhodnější substrát pro elektrochemické stanovení. Nicméně v tomto experimentu poskytoval ATCHI mnohem lepší signál výšky píku proudové odezvy než ATCHCl. Elektrochemickými senzory se také nepodařilo stanovit kinetické parametry ACHE inhibované reakce. Neúspěch byl také zaznamenán u stanovení hodnoty IC_{50} pro inhibitor č. 2 a 6, neboť hodnota IC_{50} pro oba inhibitory převyšovaly hodnotu 500 μ M. Elektrochemické senzory tedy nejsou nejvhodnější volbou pro stanovení kinetických parametrů a pro stanovení účinnosti testovaných inhibitorů. Několikrát se totiž stalo, že výška píku proudové odezvy u inhibované reakce byla téměř stejná nebo dokonce i větší než výška píku proudové odezvy neinhibované reakce.

Na závěr bych ráda podotkla, že se mi nejlépe měřilo Ellmanovou metodou, která ne jen tak náhodou je považována za zlatý standard mezi metodami.

CITOVANÁ LITERATURA

- [1] Mendel B., Rudney H. Studies on cholinesterase: 1. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase, *Biochemical Journal*, 1943, 37(1), s. 59-63.
- [2] Kalow W., Lindsay H.A. A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1955, 33(4), s. 568-574.
- [3] Ellman G.L., Courtney D.K., Andres V., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7(2), s. 91-95.
- [4] Renneberg R., Pfeiffer D., Lisdat F., Wilson G., Wollenberger U., Ligler F., Turner A. Frieder Scheller and the short history of biosensors, *Biosensing for the 21st Century*, 2008, 109, s. 1-18.
- [5] Silman I., Sussman J.L. Acetylcholinesterase: How is structure related to function ?, *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175(1-3), s. 3-10.
- [6] Kaplay S.S. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain, *Neonatology*, 1976, 28, s. 65-73.
- [7] Masson P., Lockridge O. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 494(2), s. 107-120.
- [8] Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology, *Biomedical Papers*, 2011, 155(3), s. 219-230.
- [9] Soreq H., Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor, *Nature Reviews Neuroscience*, 2001, 2, s. 294-302.
- [10] Guillozet-Bongaarts A.L., Smiley J.F., Mash D.C., Mesulam M.M. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques, *Annals of Neurology*, 1997, 42(6), s. 909-918.

- [11] Dvir H., Silman I., Harel M., Rosenberry T.L., Sussman J.L., Acetylcholinesterase: From 3D structure to function, *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 187(1-3), s. 10-22.
- [12] <https://www.rcsb.org/structure/1QIH> (21.1.2018)
- [13] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii> (28.1.2018)
- [14] Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., Bondzic A.M., Vasic V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology, *Current Neuropharmacology*, 2013, 11(3), s. 315-335.
- [15] <https://mybiochemistry.wordpress.com/2013/03/22/published-paper-1-chemical-warfare-toxicity-of-nerve-agents/> (21.1.2018)
- [16] Pohanka M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker, *Bratislavské Lékařské Listy*, 2013, 114(12), s. 726-734.
- [17] Doctor B.P., Saxena A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 2005, 157-158, s. 167-171.
- [18] Manoharan I., Booparty R., Darvesh S., Lockridge O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India, *Clinica Chimica Acta*, 2007, 378(1-2), s. 128-135.
- [19] De Vriese C., Gregoire F., Lema-Kisoka R., Waelbroeck M., Robberecht P., Delporte C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: Identification of the cleavage sites, *Endocrinology*, 2004, 145(11), s. 4997-5005.
- [20] Inestrosa N.C., Dinamarca M.C., Alvarez A. Amyloid–cholinesterase interactions, *The FEBS Journal*, 2008, 275(4), s. 625-632.
- [21] Bachurin S.O. Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease, *Medicinal Research Reviews*, 2003, 23(1), s. 48-88.
- [22] Ittner L.M., Götz J. Amyloid- β and tau -- a toxic pas de deux in Alzheimer's

- disease, *Nature Reviews/Neuroscience*, 2011, 12(2), s. 65-72.
- [23] Ladner C.J., Lee J.M. Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: The cholinergi hypothesis revisited, *Journal of Neuropathology and Experimental*, 1998, 57(8), s. 719-731.
- [24] Rees T., Hammond P.I., Soreq H., Younkin S., Brimijoin S. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex, *Neurobiology of Aging*, 2003, 24(6), s. 777-787.
- [25] Kračmárová A., Drtinová L., Pohanka M. Possibility of acetlycholinesterase overexpression in Alzheimer disease patients after therapy with acetylcholinesterase inhibitors, *Acta Medica*, 2015, 58(2), s. 37-42.
- [26] Das U.N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation, *Medical Science Monitor*, 2007, 13(12), s. 214-221.
- [27] Orhan I., Sener B., Choudhary M.I., Khalid A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants, *Journal of Etnopharmacology*, 2004, 91(1), s. 57-60.
- [28] Mehta M., Adem A., Sabbagh M. New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *International Journal of Alzheimer's Disease* , 2011, 2012, s. 1-8.
- [29] Taylor P. Development of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease, *Neurology*, 1998, 51(1), s. 30-35.
- [30] Pohanka M., Kuca K., Kassa I. New performance of biosensor technology for Alzheimer's disease drugs: in vitro comparison of tacrine and 7-methoxytacrine, *Neuro Endocrinology Letters*, 2008, 29(5), s. 755-758.
- [31] Tayeb H.O., Yang H.D., Price B.H., Tarazi F.I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors, *Pharmacology & Therapeutics*, 2012, 134(1), s. 8-25.

- [32] Jakubík J., Michal P., Machová E., Doležal V. Importance and prospects for design of selective muscarinic agonists, *Physiological Research*, 2008, 57(3), s. 39-47.
- [33] Rössner P. Alzheimerova choroba – diagnostika a léčba, *Neurologie Pro Praxi*, 2004, 1, s. 11-16.
- [34] Quirion R. Cholinergic markers in Alzheimer disease and the autoregulation of acetylcholine release, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 1993, 18(5), s. 226-234.
- [35] Miao Y., He N., Zhus J. History and new developments of assays for cholinesterase activity and inhibition, *Chemical Reviews*, 2010, 110(9), s. 5216-5234.
- [36] Holas O., Musilek K., Pohanka M., Kuca K. The progress in the cholinesterase quantification methods, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2012, 7(12), s. 1207-1223.
- [37] Witter R.F., A critical study of the manometric assay of cholinesterase in rat blood, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1962, 4(3), s. 313-323.
- [38] Michel H.O. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1949, 34, s. 1564-1568.
- [39] Schwartz M., Myers T.C. Simple microtitrimetric constant-pH method for accurate enzyme assays, *Analytical Chemistry*, 1958, 30(6), s. 1150-1151.
- [40] Guilbault G.G., Kramer D.N. Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase, *Analytical Chemistry*, 1965, 37(1), s. 120-123.
- [41] Gill R., Bahshi L., Freeman R., Willner I. Optical detection of glucose and acetylcholine esterase inhibitors by H₂O₂-sensitive CdSe/ZnS quantum dots, *Angewandte Chemie*, 2008, 120(9), s. 1700-1703.
- [42] Birman S. Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate, *Biochemical Journal*, 1985,

- 225(3), s. 825-828.
- [43] Walker J.P., Asher S.A. Acetylcholinesterase-based organophosphate nerve agent sensing photonic crystal, *Analytical Chemistry*, 2005, 77(6), s. 1596-1600.
- [44] Ingkaninan K., De Best C.M., Van Der Heijden R., Hofte A.J.P., Karabatak B., Irth H., Tjaden U.R., Van Der Greef J., Verpoorte R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products, *Journal of Chromatography A*, 2000, 872(1-2), s. 61-73.
- [45] No H.Y., Kim Y.A., Lee Y.T., Lee H.S. Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphate and carbamate pesticides, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 594(1), s. 37-43.
- [46] Karnovsky M.J., Roots L. A direct-coloring thiocholine method for cholinesterases, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1964, 12, s. 219-221.
- [47] Marston A., Kissling J. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants, *Phytochemical Analysis*, 2002, 13(1), s. 51-54.
- [48] Winteringham F.P.W., Disney R.W. Radiometric assay of acetylcholinesterase, *Nature*, 1962, 195(4848), s. 1303.
- [49] Kikuchi T., Okamura T., Arai T., Obata T., Fukushi K., Irie T., Schiraishi T. Use of a novel radiometric method to assess the inhibitory effect of donepezil on acetylcholinesterase activity in minimally diluted tissue samples, *British Journal of Pharmacology*, 2010, 159(8), s. 1732-1742.
- [50] O'Farrell H.K., Chattopadhyay S.K., Brown H.D. Calorimetry of cholinesterase activity in serum, *Clinical Chemistry*, 1977, 23(10), s. 1853-1856.
- [51] Velasco-Garcia M.N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2009, 20(1), s. 27-33.

- [52] Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures, *Sensors*, 2008, 8(3), s. 1400-1458.
- [53] Abad J.M., Pariente F., Hernandez L., Abruna H.D., Lorenzo E. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor, *Analytical Chemistry*, 1998, 70(14), s. 2848-2855.
- [54] Danielsson B., Calorimetric biosensors, *Journal of Biotechnology*, 1990, 15(3), s. 187-200.
- [55] Hadd A.G., Jacobson S.C., Ramsey M.J. Microfluidic assays of acetylcholinesterase inhibitors, *Analytical Chemistry*, 1999, 71(22), s. 5206-5212.
- [56] Tan H.Y., Loke W.K., Tan Y.T., Nguyen N.T. A lab-on-a-chip for detection of nerve agent sarin in blood, *Lab on Chip*, 2008, 8(6), s. 885-891.
- [57] Caraway W.T. Photometric determination of serum cholinesterase activity, *American Journal of Clinical Pathology*, 1956, 26(8), s. 945-955.
- [58] Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application, *Journal of Biological Chemistry*, 1949, 180(1), s. 249-261.
- [59] Prokofieva D.S., Jenkins R.O., Goncharov N.V. Microplate biochemical determination of Russian VX: Influence of admixtures and avoidance of false negative results, *Analytical Biochemistry*, 2012, 424(2), s. 108-113.
- [60] Pavlov V., Xiao Y., Willner I. Inhibition of the acetylcholine esterase-stimulated growth of Au nanoparticles: Nanotechnology-based sensing of nerve gases, *Nano Letters*, 2005, 5(4), s. 649-653.
- [61] Wang M., Gu X., Zhang G., Zhang D., Zhu D. Continuous colorimetric assay for acetylcholinesterase and inhibitor screening with gold nanoparticles, *Langmuir*, 2009, 25(4), s. 2504-2507.
- [62] Padilla S., Wilson V.Z., Nostrandt A.C. A novel method that markedly increases the sensitivity of the erythrocyte acetylcholinesterase assay, suitable for use in

- pesticide-treated rats, *Toxicology Methods*, 1995, 5(1), s. 41-49.
- [63] Dietz A.A., Rubinstein H.M., Lubrano T., Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholinedithiobis (nitrobenzoic acid) procedure, *Clinical Chemistry*, 1973, 19(11), s. 1309-1313.
- [64] Pohanka M., Hrabínová M., Kuca K., Simonato J. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method, *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(4), s. 2631-2646.
- [65] Ormerod W.E. Hydrolysis of benzoylcholine derivatives by cholinesterase in serum, *Biochemical Journal*, 1953, 54(4), s. 701-704.
- [66] Abernethy M.H., George P.M., Melton V.E. A new succinylcholine-based assay of plasma cholinesterase, *Clinical Chemistry*, 1984, 30(2), s. 192-195.
- [67] Uete T., Migamoto Y., Ohnishi M., Shimano N. Spectrophotometric micromethod for measuring cholinesterase activity in serum or plasma, *Clinical Chemistry*, 1972, 18(5), s. 454-458.
- [68] Haigh J.R., Lefkowitz Z.J., Capacio B.R., Doctor B.P., Gordon R.K. Advantages of the WRAIR whole blood cholinesterase assay: Comparative analysis to the micro-Ellman, Test-mate ChE™, and Michel (Δ pH) assays, *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175(1-3), s. 417-420.
- [69] Willig S., Hunter D.L., Dass D.P., Padilla S. Validation of the use of 6,6'-dithiodinicotinic acid as a chromogen in the Ellman method for cholinesterase determinations, *Veterinary and Human Toxicology*, 1996, 38(4), s. 249-253.
- [70] Doctor B.P., Toker L., Roth E., Silman I. Microtiter assay for acetylcholinesterase, *Analytical Biochemistry*, 1987, 166(2), s. 399-403.
- [71] Vieira I.J.C., Medeiros W.L.B., Monnerat C.S., Souza J.J., Mathias L., Braz-Filho R., Pinto A.C., Sousa P.M., Rezende C.M., De Epifanio R.A. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures, *Annals of the Brazilian*

Academy of Science, 2008, 80(3), s. 419-426.

- [72] Andrisano V., Bartolini M, Gotti R., Cavrini V., Felix G. Determination of inhibitors' potency (IC50) by a direct high-performance liquid chromatographic method on an immobilised acetylcholinesterase column, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 753(2), s. 375-383.
- [73] Rajapakse B.N., Thiermann H., Eyer P., Worek F., Bowe S.J., Dawson A.H., Buckley N.A. Evaluation of the Test-mate CHE (cholinesterase) field kit in acute organophosphorus poisoning, *Annals of Emergency Medicine*, 2011, 58(6), s. 559-564.
- [74] Cuartero M., Ortuno J.A., García M.S., García-Cánovas F. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine, *Analytical Biochemistry*, 2012, 421(1), s. 208-212.
- [75] Nabb D.P., Whittfield F. Determination of cholinesterase by an automated pH stat method, *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 1967, 15(2), s. 147-154.
- [76] Sassolas A., Blum L.J., Leca-Bouvier B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnology Advances*, 2012, 30(3), s. 489-511.
- [77] Andreescu S., Marty J.L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications, *Biomolecular Engineering*, 2006, 23(1), s. 1-15.
- [78] Mostafa G.A.E. Electrochemical biosensors for the detection of pesticides, *The Open Electrochemistry Journal*, 2010, 2, s. 22-42.
- [79] Dzydevich S.V., Shulga A.A., Soldatkin A.P., Hendji A.M.N., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. Conductometric biosensors based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides, *Electroanalysis*, 1994, 6(9), s. 752-758.
- [80] La Rosa C., Pariente F., Hernández L., Lorenzo E. Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase

- amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate, *Analytica Chimica Acta*, 1994, 295(3), s. 273-282.
- [81] Ghindilis A.L., Morzunova T.G., Barmin A.V., Kurochkin I.N. Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on mediatorless bioelectrocatalysis, *Biosensors & Bioelectronics*, 1996, 11(9), s. 873-880.
- [82] Andreescu S., Noguer T.M.V., Marty J.L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents, *Talanta*, 2002, 57(1), s. 169-176.
- [83] Andreescu D., Andreescu S., Sadik O.A. New materials for biosensors, biochips and molecular bioelectronics, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2005, 44, s. 285-327.
- [84] Lipinski Ch.A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004, 1(4), s. 337-341.
- [85] Pohanka M. Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds, *Chemical Papers*, 2015, 69(1), s. 4-16.
- [86] Krátký M., Štěpánková Š., Vorčáková K., Navrátilová L., Trejtnar F., Stolaříková J., Vinšová J. Synthesis of readily available fluorophenylalanine derivatives and investigation of their biological activity, *Bioorganic Chemistry*, 2017, 71, s. 244-256.
- [87] Krátký M., Volková M., Novotná E., Trejtnar F., Stolaříková J., Vinšová J. Synthesis and biological activity of new salicylanilide N,N-disubstituted carbamates and thiocarbamates, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, 22(15), s. 4073-4082.
- [88] Bucur M.P., Bucur B., Radu G.L. Critical evaluation of acetylthiocholine iodide and acetylthiocholine chloride as substrates for amperometric biosensors based on acetylcholinesterase, *Sensors*, 2013, 13(2), s. 1603-1613.