Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Využití dithionikotinové kyseliny jako chromogenu pro spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz

Bc. Karolína Sejkorová

Diplomová práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Use of dithioninicotinic acid as a chromogen for spectrophotometric determination of cholinesterase activity

Bc. Karolína Sejkorová

Thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2018/2019**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Karolína Sejkorová**
Osobní číslo:	**C17451**
Studijní program:	**N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Bioanalytik**
Název tématu:	**Využití dithionikotinové kyseliny jako chromogenu pro spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Teoretická část:

1. Vypracovat literární rešerši na téma "cholinesterázy a jejich inhibitory".
2. Popsat strukturu, funkci a mechanismus katalytického působení cholinesteráz a možnosti ovlivnění jejich aktivity na různých úrovních.
3. Popsat jednotlivé analytické metody pro stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

Experimentální část:

1. V první části zpracovat odebranou krev a upravit ji do podoby vhodné pro další stanovení.
2. Testovat různé reakční podmínky za účelem získaní optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity cholinesteráz s využitím dithionikotinové kyseliny jako chromogenního činidla.
3. Porovnat chromogenní činidla, dithionikotinová kyselina a dithionitrobenzoová kyselina, a vyhodnotit vhodnost jejich použití.
4. Stanovit inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů a porovnat je se standardními látkami.
5. Stanovit rozdělovací koeficient vybraných látek v systému n-oktanol:voda.

Rozsah grafických prací:	**dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy:	**25 s.**
Forma zpracování diplomové práce:	**tištěná**
Seznam odborné literatury:	

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:	**21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce:	**10. května 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 jiného subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díly 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 2. 5. 2019

Karolína Sejkorová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. a Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce. Děkuji jim za cenné rady, trpělivost, ochotu aktivně řešit veškeré komplikace, které v průběhu tvorby práce vznikaly, za jejich cenný čas a vždy vřelý lidský přístup. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za veškerou podporu při studiu.

ANOTACE

Cílem teoretické části této diplomové práce je vypracování literární rešerše na téma cholinesterázy a jejich inhibitory. V jednotlivých podkapitolách se věnuje charakteristice jejich struktury, funkce a mechanismu katalytického působení cholinesteráz a možnostem ovlivnění jejich aktivity na různých úrovních. V poslední části se věnuje jednotlivým analytickým metodám, kterými lze stanovit aktivitu a inhibici cholinesteráz, z pohledu historie i současnosti.

Experimentální část práce se skládá z několika dílčích podcílů. V první části se věnuje zpracování odebrané krve a dalším úpravám před samotným stanovením. Dalším podcílem je testování různých reakčních podmínek za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity cholinesteráz s využitím dithionikotinové kyseliny (DTNA) jako chromogenního činidla. Dále se práce zabývá porovnáním chromogenních činidel DTNA a DTNB a vyhodnocením vhodnosti jejich použití. Součástí práce je také stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů a jejich porovnání se standardními látkami. Posledním podcílem experimentální části práce je stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda.

KLÍČOVÁ SLOVA

Acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, DTNA, DTNB, Alzheimerova choroba, Myasthenia gravis

ANNOTATION

The aim of the theoretical part of this thesis is to elaborate a literature review on the subject of cholinesterases and their inhibitors. The individual subchapters deal with the characteristics of its structure, function, and mechanism of the catalytic action of cholinesterases and the possibilities of influencing their activity at different levels. The last part describes individual analytical methods to determine the activity and inhibition of cholinesterases, in terms of history and the present.

The experimental part of the thesis consists of several sub-aims. The first part deals with the processing of the collected blood and other adjustments before the determination. Another objective is testing of different reaction conditions for the purpose of obtaining optimal conditions for the spectrophotometric measurement of cholinesterase activity using dithionicotinic acid (DTNA) as a chromogenic agent. Furthermore, the comparison of DTNA and DTNB chromogenic reagents and their suitability for use was tested. Also, the inhibitory activity of selected inhibitors was determined and compared with standard substances. The last part is the determination of the partition coefficient of selected substances in the *n*-octanol/water system.

KEY WORDS

Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors, DTNA, DTNB, Alzheimer's disease, Myasthenia gravis

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Porovnání závislostí aktivity na koncentraci substrátu a množství erytrocytů pro DTNA a DTNB 55

Graf 2 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce a koncentrace přidaného inhibitoru 5 56

Graf 3 Závislost dle Lineweavera a Burka pro inhibitor číslo 10 61

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy 23
Obrázek 2 Strukturní vzorec takrinu 29
Obrázek 3 Strukturní vzorec huperzinu A 29
Obrázek 4 Strukturní vzorec donepezilu 30
Obrázek 5 Strukturní vzorec galantaminu 30
Obrázek 6 Strukturní vzorec fysostigminu 31
Obrázek 7 Strukturní vzorec rivastigminu 32
Obrázek 8 Radiometrická metoda stanovení aktivity cholinesteráz dle Winteringhama a Disneyho 36
Obrázek 9 Princip Ellmanovy metoda stanovení aktivity AChE 39

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Referenční hodnoty cholinesteráz 35

Tabulka 2 Strukturní vzorce testovaných inhibitorů 44

Tabulka 3 Testované koncentrace inhibitorů, substrátů a objemy erytrocytů pro stanovení s DTNA a DTNB 47

Tabulka 3 (pokračování) Testované koncentrace inhibitorů, substrátů a objemy erytrocytů pro stanovení s DTNA a DTNB 48

Tabulka 4 Rozmezí koncentrací testovaných vzorků inhibitorů 48

Tabulka 4 (pokračování) Rozmezí koncentrací testovaných vzorků inhibitorů 49

Tabulka 5 Poměry poměrů rychlostí inhibovaných (v_i) a neinhibovaných (v_0) reakcí a koncentrace přidaného inhibitoru č. 5 56

Tabulka 6 Hodnoty IC_{50} pro standardy inhibitorů 57

Tabulka 6 (pokračování) Hodnoty IC_{50} pro standardy inhibitorů 58

Tabulka 7 Hodnoty IC_{50} pro vzorky inhibitorů 58

Tabulka 7 (pokračování) Hodnoty IC_{50} pro vzorky inhibitorů 59

Tabulka 8 Parametry K_M a V_{max} stanovené s činidly DTNB a DTNA 60

Tabulka 9 Kinetické parametry pro určení typu inhibice inhibitoru číslo 10 61

Tabulka 10 Hodnoty rozdělovacích koeficientů a tPSA testovaných inhibitorů 63

SEZNAM ZKRATEK

4-DAMP	1,1-dimethyl-4-difenylacetoxypiperidinium jodid
2-PDS	2,2'-dithiodipyridin
4-PDS	4,4’-dithiopyridin
Ac-CoA	acetylkoenzym A
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChR	acetylcholinový receptor
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer’s Disease)
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesteráza
BTCh	butyrylthiocholin
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNA	6,6'-dithiodinikotinová kyselina
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
ChAT	cholinacetyltransferáza
IC_{50}	střední inhibiční koncentrace
K_M	Michaelisova konstanta
MG	Myasthenia gravis
NMDA	*N*-methyl-*D*-asparagová kyselina
PSA	polární povrch molekuly
REM	rychlé oční pohyby (Rapid Eye Movement)
RS	reakční směs
TNB	2-nitro-5-thiobenzoová kyselina
tPSA	topologický polární povrch molekuly

UV/VIS	ultrafialová/viditelná oblast světla
V_{max}	mezní limitní rychlost

Obsah

ÚVOD *16*

1 TEORETICKÁ ČÁST *17*

1.1 Acetylcholin **17**

1.1.1 Výskyt 17

1.1.2 Význam 18

1.1.3 Syntéza a inaktivace 19

1.1.4 Acetylcholinové receptory 20

1.2 Charakteristika cholinesteráz **22**

1.2.1 Aktivní centrum cholinesteráz 23

1.2.2 Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7) 24

1.2.3 Butyrylcholinesteráza (EC 3.1.1.8) 25

1.3 Inhibitory cholinesteráz **27**

1.3.1 Inhibitory periferního a α-anionického a místa 28

1.3.2 Inhibitory esterové části aktivního centra 30

1.4 Alzheimerova choroba **32**

1.4.1 Léčba Alzheimerovy choroby 32

1.5 Myasthenia gravis **34**

1.5.1 Léčba Myasthenia gravis 34

1.6 Stanovení aktivity cholinesteráz **34**

1.6.1 Volba metody stanovení 35

1.6.2 Radiometrické metody 36

1.6.3 Fluorometrické metody 37

1.6.4 Metody založené na stanovení pH 37

1.6.5 Histochemické metody 38

1.6.6 Spektrofotometrické metody 39

1.6.7 Biosenzory 40

2 CÍL PRÁCE *42*

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST *43*

3.1 Chemikálie a roztoky **43**

3.2 Přístroje a pomůcky **44**

3.3 Zpracování odebrané krve **45**

3.4 Postupy stanovení **45**

3.4.1 Optimalizace reakčních podmínek stanovení enzymové aktivity pro DTNA a DTNB 45

3.4.2 Stanovení IC_{50} 46

3.4.3 Stanovení kinetických parametrů K_M, V_{max} neinhibované reakce 49

3.4.4 Určení typu inhibice 49

3.4.5 Stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda a tPSA 50

4 VÝSLEDKY A DISKUSE *53*

4.1 Optimalizace reakčních podmínek stanovení enzymové aktivity pro DTNA a DTNB **53**

4.2 Stanovení IC_{50} **56**

4.3 Stanovení kinetických parametrů K_M, V_{max} neinhibované reakce **59**

4.4 Typ inhibice **60**

4.5 Stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda a tPSA **62**

4.5.1 Výsledky rozdělovacího koeficientu 62
4.5.2 Výsledky tPSA 62
5 ZÁVĚR 64
6 ZDROJE 66

ÚVOD

Cholinesterázy, mezi něž řadíme acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BChE), jsou významné živočišné enzymy ze skupiny hydroláz. Acetylcholinesteráza hraje klíčovou úlohu v přenosu nervového vzruchu v cholinergním nervovém systému. Inaktivuje jeho mediátor, acetylcholin (ACh), který se uvolňuje na nervosvalových zakončeních a nervových synapsích, čímž acetylcholinesteráza ukončuje nervový impuls. Fyziologická funkce butyrylcholinesterázy prozatím není zcela objasněna [1,2].

V posledních letech jsou cholinesterázy spojované s mnoha fyziologickými i patologickými ději, např. vývojem organismu, diferenciací buněk v cholinergních tkáních, obezitou, stresem, demencí, Alzheimerovou chorobou, Myasthenií gravis a dalšími. Cholinergní systém se významným způsobem podílí na procesech spojených s učením a pamětí [2,3].

V současnosti se k léčbě Alzheimerovy nemoci využívají inhibitory cholinesteráz, jejichž podání vede k úpravě symptomů a zlepšení kognitivních funkcí, ale progresi onemocnění nezastaví. Dříve používaný takrin pro své nežádoucí účinky již není doporučovaným léčivem. V klinické praxi využívanými inhibitory jsou rivastigmin, donepezil a galantamin. [4].

Metody stanovení aktivity cholinesteráz a jejich inhibice jsou uplatnitelné v širokém spektru oborů – v medicíně, farmacii, zemědělském a potravinářském průmyslu, k monitorování životního prostředí, v laboratořích, armádě a dalších odvětvích. Patří mezi ně metody spektrofotometrické, pH-detekční, radiometrické, histochemické a jiné. V současnosti je nejpoužívanější Ellmanova metoda a její modifikace [5].

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Acetylcholin

Jako první z neurotransmiterů byl objeven acetylcholin. Působí jako neuromediátor v cholinergní nervové soustavě, ovlivňuje funkci centrální i periferní nervové soustavy pomocí muskarinových a nikotinových receptorů. V periferii zajišťuje putování nervového vzruchu na sympatických a parasympatických vláknech, jako neurotransmiter působí také na nervosvalové ploténce. Využívají jej všechny pre- a postgangliové parasympatické neurony, všechny pregangliové a část postgangliových sympatických neuronů [6–8].

1.1.1 Výskyt

Cholinergní neurony jsou rozšířeny v centrální nervové soustavě (CNS) a jsou jimi inervovány téměř všechny oblasti mozku. Vyskytují se nejvíce v míše, zadním mozku, střední habenule, mezopontinním regionu, bazálním předním mozku, striatu, aj. Významné množství ACh je přítomno i v epitelu rohovky, lidské placentě. ACh byl stanoven dokonce i v rostlinách, např. v kopřivě žahavce (*Urtica urens*). Novější výzkumy prokázaly, že cholinergní signalizace byla založena již od počátku života, tedy v primitivních jednobuněčných a mnohobuněčných organismech, v bakteriích, řasách, rostlinách a houbách [9–12].

U obratlovců je ACh syntetizován a ukládán v různých gliových buňkách, ze kterých je mediátor uvolňován parakrinním způsobem, ovlivňuje tedy buňky v nejbližším okolí. Postupně začíná být objasňován fyziologický význam a molekulární mechanismy tohoto typu ne-neuronální cholinergní signalizace, především v lymfocytech, vaskulárních endotelových buňkách, lidských alfa-buňkách pankreatu a v reprodukčním systému člověka aj. [13–16].

V rozmanitosti cholinergních mechanismů je rozhodujícím parametrem čas. Cholinergní zprostředkování může být extrémně rychlé (několik milisekund) nebo velmi pomalé (několik minut). Rychlý přenos spoléhá na rychlé fyzikálně-chemické reakce, které musí být charakterizované nízkou afinitou. Rychlost

chemické reakce je nepřímo spojena s její afinitou. Jinými slovy, čas se získává na úkor citlivosti [16,17].

1.1.2 Význam

ACh je zřejmě nejvýznamnějším mediátorem procesů, které se podílejí na fungování intelektuálních funkcí člověka. Vzhledem k jeho široké distribuci v mozku je zřejmé, že je cholinergní neuropřenos zodpovědný za modulaci důležitých nervových funkcí [2,8].

Tento systém je zapojen do fyziologických procesů, mezi něž patří pozornost, učení, paměť, reakce na stres, bdělost, spánek a senzorické procesy. Endogenní ACh je důležitý pro formování akvizice, kódování, konsolidaci, tedy upevnění paměťových stop, rekonsolidaci, zánik paměti a její vyhledávání. Usnadnění cholinergního přenosu pomocí inhibitorů cholinesterázy může zlepšit pozornost u lidí, čehož se využívá při léčbě Alzheimerovy choroby (AD) [8,18–25].

Cholinergní systém reguluje spánkové cykly a stimulace cholinergních neuronů v přesných oblastech mozkového kmene může v závislosti na dávce podporovat REM (rychlé oční pohyby) fázi spánku. ACh přispívá i k sluchovému synaptickému přenosu usnadněním thalamo-kortikální komunikace. Některé studie naznačují zapojení ACh v dospělé neurogenezi [26–29].

Další studie dokazují, že ACh hraje svou roli při potlačení uvolňování cytokinů prostřednictvím cholinergní protizánětlivé cesty, která je lokalizována především v krvi a sliznici. Tato dráha je regulační vazbou mezi nervovými zakončeními v krvi a makrofágy exprimujícími na svém povrchu α7 nikotinový acetylcholinový receptor. Objevení cholinergní protizánětlivé cesty tak umožnilo pochopit, jak se CNS podílí na regulaci vrozené imunity. Acetylcholinesteráza vázaná na erytrocyty hraje podstatnou roli při ukončení aktivace cholinergních protizánětlivých cest. Toto zjištění evokuje možné otázky o roli inhibitorů cholinesteráz v imunitním systému [12,30–33].

Acetylcholin má v CNS další mimořádnou úlohu. Reguluje výlev jiných aktivačních i inhibičních neuropřenašečů, mezi něž patří glutamát, glycin nebo dopamin, především v asociačních oblastech kůry předního mozku. Z tohoto

důvodu vede výpadek cholinergních jader a drah při Alzheimerově chorobě k rozpadu osobnosti a ztrátě kognitivních funkcí, lokalizovaných především v těchto předních lalocích [34].

Ačkoli je ACh velmi jednoduchá molekula, má schopnost řídit široké spektrum fyziologických funkcí, od ultrarychlého přenosu až po parakrinní difúzní působení. Díky své všudypřítomnosti a složitosti je ACh stále otevřeným polem pro nové výzkumy [16].

1.1.3 Syntéza a inaktivace

Acetylcholin je syntetizován z acetylkoenzymu A (Ac-CoA) a cholinu pomocí enzymu cholinacetyltransferáza (ChAT), který je lokalizován téměř výhradně v cytoplazmě cholinergních neuronů. Ac-CoA, který slouží jako donor, pochází z pyruvátu získaného v glukózovém metabolismu probíhajícím v mitochondriích. Cholin pochází ze zásob a fosfatidylcholinu. Kromě toho může být cholin dodáván z hydrolyzovaného ACh [35].

Acetylcholin se tvoří v cytoplasmě cholinergních neuronů. Následně je transportován vezikulárním acetylcholinovým transportérem z cytosolu do synaptických vezikulů, ve kterých je uskladňován v zakončeních cholinergních vláken. Jako odpověď na akční potenciál je uvolněn exocytózou do synaptické štěrbiny. Z ní difunduje do postsynaptického místa, kde interaguje s vhodnými receptory. To má za následek specifické účinky, závislé na typu receptoru (nikotinový nebo muskarinový) [8,35].

Acetylcholin přítomný v synaptické štěrbině je rychle inaktivován enzymem acetylcholinesteráza. AChE hydrolyzuje ACh na acetát a cholin. Cholinergní neurony vylučují AChE do synaptické štěrbiny, kde je enzym obvykle připojen k plazmatické membráně postsynaptického neuronu. Mechanismus inaktivace ACh je jedinečný. Ostatní neurotransmitery jsou obvykle reabsorbovány do presynaptického neuronu a následně inaktivovány specifickými enzymy [8,36–38].

1.1.4 Acetylcholinové receptory

Acetylcholin působí aktivaci receptorů a podporuje buď stimulaci, nebo inhibici v závislosti na typu a neuronální lokalizaci receptoru. Tyto receptory jsou podle agonistické selektivity děleny, a dle zvyku starých farmakologů pojmenovány, podle přírodních látek, které na ně působí – nikotinové a muskarinové [8,34].

Muskarinový receptor, aktivovaný muskarinem z muchomůrek, zajišťuje především funkce parasympatické části autonomního nervového systému. Zpomaluje četnost srdečních stahů, podporuje činnost žláz s vnitřní i vnější sekrecí, dále ovlivňuje stahy hladké svaloviny v cévách, v močovém a dýchacím systému i jinde. Nikotinový receptor přenáší signál mezi motorickým nervem a svalovým vláknem. Díky němu se na nervosvalové synapsi přenese impulz z nervu na sval [34].

Nikotinové receptory

Nikotinové receptory jsou aktivovány nízkými koncentracemi nikotinu, ale vysoké koncentrace je blokují. Rozlišujeme dvě podtřídy těchto receptorů – neuronální a svalový typ [35].

Nejjednodušší formou tohoto receptoru je glykoprotein s molekulovou hmotností okolo 300 kDa. Je složen z hetero-oligomerního komplexu pěti odlišných proteinových podjednotek, které jsou klasifikovány dle jejich molekulových hmotností – α, β, δ a γ (fetální) nebo ε (dospělý). Pravděpodobné kvartérní uspořádání podjednotek se skládá z pentamerového komplexu z α2, β, δ a γ, které obklopují iontový kanál. Různé kombinace těchto podjednotek tvoří různé typy nikotinových receptorů. Svalový typ acetylcholinového receptoru (AChR) obsahuje α1, β1, δ a γ podjednotky u embryí nebo ε podjednotku u dospělých. Gangliotický podtyp AChR se skládá z α3, β4 a α5 podjednotek. Třebaže je podjednotkové složení některých nativních neuronálních nikotinových receptorů stále neznámé, předpokládá se, že rozdíly v podjednotkových kompozicích odpovídají rozptylu fyziologických a farmakologických vlastností receptorů [35,39,40].

Připojení dvou molekul ACh na α podjednotku vyvolá změnu konformace pentameru, což indukuje otevření iontového kanálu, které následně umožňuje příliv iontů. Tento příliv má za následek depolarizaci neuronu. Oproti muskarinovým receptorům, u těchto receptorů není do přenosu zapojena žádná další molekula. V periferním nervovém systému vede aktivace nikotinových receptorů k rychlému synaptickému přenosu. V CNS mají ACh receptory spíše modulační vliv než excitační či inhibiční [35,41].

Agonisty nikotinového receptoru jsou nikotin, 1,1-dimethyl-4-fenylpiperazinium, cystin, butyrylcholin, tetramethylammonium a karbachol. Citlivost receptoru na agonisty je ovlivněna složením podjednotek nikotinového receptoru. Antagonisty jsou kurare, hexamethonium, dihydro-β-erythroidin, mekamylamin a bungarotoxin [35,42,43].

Nikotinergní signalizace není v CNS tak výrazná jako signalizace muskarinická. Některé systémy, například limbický, zřejmě využívají výhradně muskarinové receptory. Nikotinové receptory se nacházejí v hippokampu, mozkové kůře, thalamu, hypothalamu, *superior colliculus*, cholinergních jádrech předního mozku a mozkového kmene. Byly také prokázány na presynaptických koncích kortikálních a mesostriatálních neuronů [35].

Muskarinové receptory

Muskarinové receptory patří mezi metabotropní receptory, což znamená, že jsou spřažené s G-proteiny a jsou schopné modulovat širokou škálu iontových kanálů [35,44].

V současné době jsou identifikovány geny pro pět izoforem muskarinových receptorů (M1-5). M1, M3 a M5 jsou připojeny k $G_{\alpha q}$, zatímco M2 a M4 se pojí s $G_{\alpha i}$. Stimulace muskarinových receptorů spojených s $G_{\alpha q}$ vede k uzavření K^+ kanálů, což usnadňuje buněčnou excitabilitu. Aktivace $G_{\alpha i}$ muskarinových receptorů vede k inhibici Ca^{2+} kanálů, čímž se excitabilita buněk naopak snižuje [45–50]. Stimulace těchto receptorů tedy podporuje otevírání nebo uzavírání Ca^{2+}, K^+ nebo Cl^- kanálů, které by mohly usnadnit buď depolarizaci nebo hyperpolarizaci, v závislosti na typu buňky, kde jsou tyto receptory exprimovány [51–53].

Receptory M1 a M3 se nacházejí především na postsynaptické úrovni. M2 a M4 receptory jsou obecně umístěny presynapticky. Působí jako autoreceptory a negativně regulují uvolňování ACh, a také jako heteroreceptory modulace synaptického přenosu, pomocí regulace aktivity Ca^{2+} kanálu [54–59].

Mezi selektivní agonisty muskarinových receptorů patří muskarin, arecholin, betanechol, karbachol, etacholin, oxotrimorin, oxoremorin a pilokarpin. Mezi selektivní antagonisty pak řadíme atropin, gallamin, pirenzepin, skopolamin, telenzepin, 4-DAMP (1,1-dimethyl-4-difenylacetoxypiperidinium jodid) a další [35].

Muskarinové receptory se nacházejí v kortexu, hippocampu, striatu, amygdale, mozkovém kmeni, čichovém bulbu, cholinergním jádru thalamu dále pak v oblasti *nucleus accumbens* a *superior colliculus* [35].

1.2 Charakteristika cholinesteráz

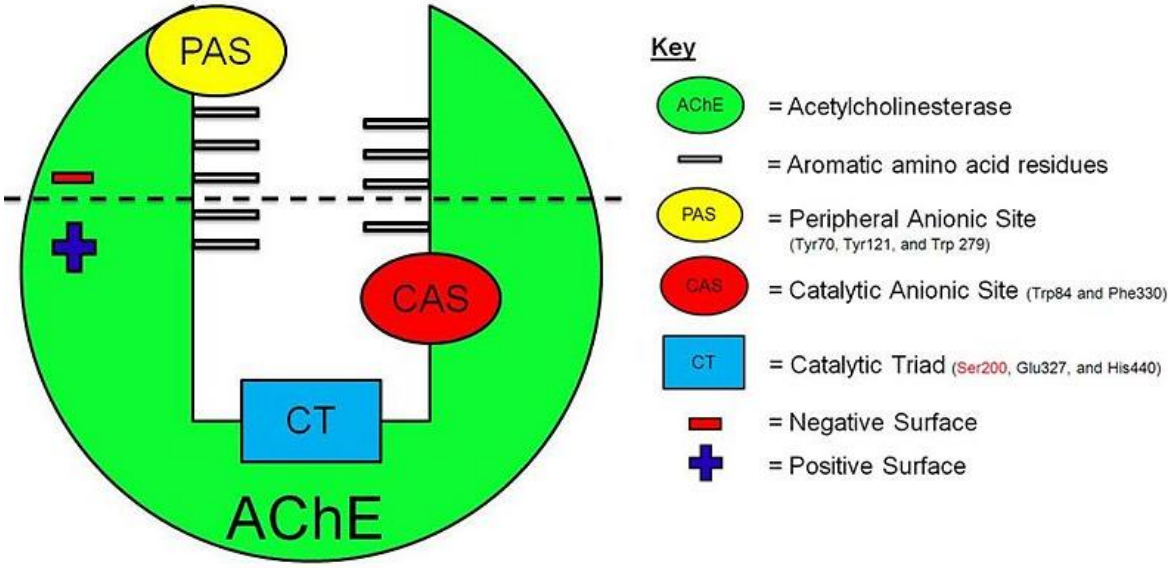
Do skupiny cholinesteráz řadíme enzymy acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu. Hydrolyzují estery cholinu, patří tedy mezi serinové hydrolázy, a jsou inhibovány organofosfáty a karbamáty. Oba enzymy se vyskytují u všech živočichů a jsou velmi konzervativní, což znamená, že rozdíly v jejich sekvenci jsou u různých druhů poměrně malé. Přirozeným substrátem AChE je ACh. BChE také hydrolyzuje ACh, ale mimo něj i butyrylcholin, propionylcholin, sukcinylcholin, heroin, aspirin, kokain, prokain, tetrakain, fenylacetát aj. Enzymy mají odlišnou kinetiku hydrolýzy ACh i molekulární strukturu [1].

V krevním řečišti se AChE vyskytuje na erytrocytech, BChE v plazmě, kam je sekretována z jater. Toho se využívá při diagnostice. AChE je snížena např. při předávkování léky používanými k léčbě AD, zatím co snížená hladina BChE značí poškození jater. Obě cholinesterázy mají sníženou aktivitu v případě otrav karbamáty a organofosfáty [60–63].

Pokud bychom úrovně aktivity enzymů násobili hmotností tkáně, nejvyšší množství enzymu AChE by bylo ve svalech, zatímco nejvyšší hladiny BChE bychom nalezli v plazmě a játrech. Celkově má dospělé lidské tělo desetkrát více proteinu BChE (680 nmol) než AChE (62 nmol) [64].

1.2.1 Aktivní centrum cholinesteráz

Aktivní centrum cholinesteráz je složeno z periferního anionického místa při vstupu do kavity, aromatického hrdla a vlastního katalytického (aktivního) centra, které obsahuje esterové a α-anionické místo (viz obrázek 1) [65].



Obrázek 1 Struktura aktivního místa acetylcholinesterázy [66]

Negativně nabité α-anionické místo, složené z aminokyselin tryptofan, tyrosin a fenylalanin, zodpovídá za správnou orientaci ACh. Díky navázání kvartérního dusíku substrátu a jeho správné orientaci umožní průběh první fáze enzymatické hydrolýzy. Esterové místo, složené z aminokyselin serinu, histidinu a kyseliny glutamové, hydrolyzuje esterovou vazbu ACh. Rozpoznání a navázání molekuly substrátu do esterového místa napomáhá karboxylová skupina. Vstup do aktivního centra enzymu je tvořen aromatickými aminokyselinami (tzv. aromatická štěrbina), které zajišťují větší selektivitu pro ACh. Periferní β-anionické místo se nachází na povrchu u vstupu do dutiny aktivního centra. Je prakticky prvním sítem, kterým musí substrát nebo inhibitor projít, pokud se má dostat k aktivnímu centru. Od počátku sloužilo jako cíl pro výzkum různých látek, které mají vliv na aktivitu AChE. Tato oblast se později ukázala být vhodným cílem pro různé toxiny a potenciální léčiva. AChE a BChE jsou strukturně podobné. Hlavním funkčním rozdílem je více vyvinuté periferní anionické místo AChE [65,67–69].

1.2.2 Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7)

Acetylcholinesteráza hydrolyzuje neurotransmiter ACh na cholin a acetát v nervových zakončeních. Její hlavní funkcí je ukončení přenosu signálu v cholinergním systému. Každá molekula AChE může hydrolyzovat 5000 molekul ACh za sekundu, což ji činí jedním z nejvíce kineticky účinných enzymů. Vyskytuje se také v erytrocytech, kde hydrolyzuje ACh uvolněný do krevního řečiště z nervových zakončení. Bývá tak někdy označována jako krevní cholinesteráza [7,70].

Studie dokládají vyšší hladiny AChE při apoptickém procesu v lidských fibroblastech, při leukémiích, karcinomech děložního čípku nebo u neuroblastomu. Rolí AChE v těchto buňkách je zřejmě regulace apoptózy. Sledování exprese AChE v neuronálních i ostatních buňkách vykazuje podobné hodnoty hladin AChE proteinu, ale jeho katalytická aktivita je významně vyšší v neuronálních buňkách [71,72].

Acetylcholinesteráza i BChE existují ve více molekulárních formách, které lze rozdělit na globulární (G) a asymetrické (A). AChE se vyskytuje ve třech globulárních formách obsahujících jednu (monomerní G1), dvě (dimerní G2) nebo čtyři (tetramerní G4) katalytické podjednotky. G1 AChE existuje výhradně v rozpustné formě, G4 AChE existuje jak v rozpustné, tak v membránově vázané formě. V mozku se AChE vyskytuje v G1 i G4 formě a jejich poměr se v různých oblastech mozku liší. Asymetrické formy AChE jsou složeny z jednoho (A_4), dvou (A_8), případně tří (A_{12}) tetramerů spojených peptidickými řetězci, které jsou podobné kolagenu. Tyto A formy se vyskytují především na nervosvalových ploténkách, kde jsou řetězcem zakotveny do bazální laminární membrány. Významnou úlohou asymetrických forem AChE je schopnost navázat se kovalentní vazbou na kolagenovou Q podjednotku [1,73].

Lidé mají pro AChE jeden gen na chromozomu 7q22.1 o velikosti 7,4 kb, který se skládá ze šesti exonů. Exony 2, 3 a 4 kódují katalytickou doménu AChE. Exony 5 a 6 kódují C-terminální peptidy AChE. Tyto dva exony se nazývají alternativní, protože AChE gen podléhá v průběhu transkripce alternativnímu sestřihu právě v místě exonu 5 nebo 6. Díky tomuto alternativnímu sestřihu dochází k tvorbě různých transkripčních variant, ze

kterých vznikají rozdílné podjednotky AChE. Jednotlivé podjednotky mají stejnou katalytickou doménu, ale rozdílnou C-terminální doménu (C-terminální peptid). U člověka se vyskytují 3 různé typy podjednotek AChE – $AChE_R$, $AChE_H$ a $AChE_T$ [74–77].

Ačkoli existují různé genetické varianty lidské AChE, škodlivé mutace jsou vzácné a vyskytují se pouze v heterozygotním stavu. Expresní profily pro lidské geny AChE a BChE jsou výrazně odlišné. Hladiny AChE jsou nejvyšší v mozku, a následně v kosterních svalech, v souladu s funkcí AChE při přenosu nervových impulzů. V ostatních tkáních jsou vytvářeny srovnatelně nízké hladiny AChE [78,79].

1.2.3 Butyrylcholinesteráza (EC 3.1.1.8)

BChE bývá ve starších pracích označována jako nepravá cholinesteráza, pseudocholinesteráza, popřípadě sérová cholinesteráza. Aktivita tohoto enzymu je v krevním séru vysoká. Její fyziologická funkce byla po dlouhá léta zpochybňována a panovalo přesvědčení, že ani žádnou nemá. Její inhibice, na rozdíl od inhibice AChE, nevyvolá u většiny lidí žádnou farmakologickou odezvu. U lidí s tzv. atypickou BChE je její aktivita v krevním séru silně snížena, či dokonce zcela chybí, bez jakéhokoli zdravotního dopadu na jedince. Myši s inaktivovanou AChE byly schopny běžného života, což přispívá k teorii, že je BChE schopna nahradit funkci AChE. Má vysokou afinitu k ACh. Kromě schopnosti katalyzovat hydrolýzu cholinových i necholinových esterů, tento enzym také zvyšuje aktivitu proteáz, jako je trypsin. BChE může být také spojena s buněčnou proliferací a růstem neuritů během vývoje nervového systému [1,7,80].

Jednou z úloh BChE je i snižování toxicity xenobiotik, se kterými přichází organismus do kontaktu. Jak je již uvedeno výše, mezi látky, které BChE hydrolyzuje, patří i drogy a léčiva, či případné zbytky pesticidů v potravě. Kromě toho jsou změny fyziologické hladiny BChE spojené s různými patologiemi, například s Alzheimerovou chorobou, dyslipidémií, diabetem mellitus a dalšími [75,76,81–83].

Butyrylcholinesteráza sestává z 574 aminokyselin. Existuje v několika různých molekulových formách, včetně monomerů a oligomerů, které se skládají z identických katalytických podjednotek. V lidském séru se nachází ve formě tetrameru. Ve zralém mozku převládá izoforma G4. [80,84].

Lidská BChE je kódována jedním genem na chromozomu 3q26.1 o velikosti přibližně 65 kb, který má 4 exony. Exon 1 obsahuje oblast nepodléhající translaci. Exon 2 kóduje 83 % sekvence aminokyselin dospělého proteinu, včetně větší části katalytické domény. Exon 3 je zodpovědný za kódování menší části katalytické podjednotky a exon 4 kóduje C-terminální peptid a oblast nepodléhající translaci. BChE, na rozdíl od AChE, existuje pouze v jedné transkripční variantě, jež následně tvoří pouze jeden typ podjednotek. Podjednotky BChE jsou podobné $AChE_T$ podjednotkám díky stejnému C-terminálnímu peptidu, který je zodpovědný za jejich vlastnosti [75,85,86].

Gen pro BChE vykazuje 34 funkčních ztrát mutací. Je zde tedy zjevná tolerance ke ztrátě funkčních mutací v tomto genu, což znamená, že i jedinci s nefunkční BChE jsou životaschopní. Tento závěr je podpořen mnoha zprávami o tiché BChE u lidí, kteří ji kvůli vzniklým mutacím nemají aktivní. Homozygotní lidé s tichou BChE jsou zdraví, plodní a dožívají se stáří [64,87].

V lidském mozku probíhá exprese BChE ve značných populacích neuronů, zejména v hlubokých vrstvách mozkové kůry, hippocampu, amygdaly a mnoha thalamických jádrech. V ostatních tkáních jsou nejvyšší hladiny BChE v játrech, tukové tkáni kolem břišních orgánů, jícnu, tlustém střevě, vejcovodech, děloze, děložním čípku a plicích, v souladu s funkcí BChE v detoxikaci jedů, které jsou konzumovány nebo inhalovány [79,80].

Butyrylcholinesteráza a Ghrelin

V roce 2004 De Vriese uvedla, že je BChE schopna hydrolyzovat acylovaný peptid ghrelin, který stimuluje hlad a hledání potravy. Ghrelin je převážně produkován žaludkem a dále sekretován do krevního oběhu. Prochází hematoencefalickou bariérou a ovlivňuje uvolňování růstového hormonu, chuti k jídlu, reakce na stres, citlivost na inzulín, zřejmě i délku života. Ovlivňuje

rozvoj a progresi několika typů rakoviny. V hypotalamu aktivuje obvody, které regulují hlad a teplotu těla. V amygdale ovlivňuje emoce, včetně strachu, úzkosti a agrese [88–93].

BChE v játrech, plazmě a mozku může hydrolyzovat ghrelin a přeměnit jej na deacylovanou formu. Lidé s genetickými mutacemi eliminující veškerou aktivitu BChE, jsou zcela normální a myši s knockoutovanou BChE také, s výjimkou rychlejšího přírůstku hmotnosti po stravě s vysokým obsahem tuků. Nadměrná exprese BChE vede k nízkým hladinám ghrelinu v krvi a jak je uvedeno výše, má pozitivní vliv na metabolismus, snižuje agresivitu a sociální stres u myší ve společných klecích. Za určitých okolností tyto kombinované účinky zvyšují dobu přežití zvířat chovaných ve skupinách například tím, že jsou méně pohryzaná. Tyto nálezy je možno zobecnit i na člověka, protože nedávné klinické studie prováděné několika výzkumníky ukazují, že u pacientů se závažným kardiovaskulárním onemocněním koreluje délka života se zvyšujícími se hladinami aktivity plazmatické BChE. Manipulace s osou BChE-ghrelin může tedy zmírnit obezitu, úzkost a agresi [89,94,95].

1.3 Inhibitory cholinesteráz

Léčba AD pomocí inhibitorů cholinesteráz cílí na udržení a posílení aktivity cholinergního systému. Ten je během onemocnění postižen nejvíce. Úbytek acetylcholinu způsobuje kognitivní poruchy, snížení pozornosti, koncentrace a poruchy chování nemocného. Jednou z možností, jak zvýšit hladinu mozkového ACh na úroveň nezbytnou pro fungování kognitivních funkcí, je inhibitory způsobené snížení aktivity mozkové AChE [96,97].

Tyto inhibitory, vhodné pro léčbu onemocnění, musí být centrálně účinné, tj. procházet přes hematoencefalickou bariéru a dostávat se tak do mozku při systémovém podávání. Musí také umožňovat kontrolované snížení aktivity mozkové AChE. Dále musí mít značnou terapeutickou šíři, což znamená co největší rozdíl mezi dávkou terapeuticky účinnou a toxickou. Protože budou tyto látky podávány dlouhodobě, měly by mít co nejméně nežádoucích účinků na organismus nemocného [2].

O inhibitory BChE není takový výzkumný zájem jako v případě AChE, z důvodu ne zcela objasněné fyziologické funkce a faktu, že osoby s geneticky podmíněnou disfunkcí BChE nevykazují prakticky žádné patologické projevy. Léčiva potlačující projevy AD tedy patří spíše do skupiny selektivních inhibitorů AChE. Ty hrají roli i v problematice otrav nervově paralytickými látkami (organofosfáty). Organofosfáty, mezi něž patří např. sarin, soman a tabun, jsou neobyčejně toxické látky, z důvodu jejich vysoké afinity k AChE a jen nepatrnému množství tohoto enzymu v organismu (např. v mozku člověka necelý 1 mg). Toxický účinek organofosfátů je smrtící a velmi rychlý [61,65,98,99].

Inhibice cholinesteráz terapeuticky využívanými inhibitory probíhá buď reverzibilním (vratným) nebo pseudoireverzibilním způsobem. V prvním případě je inhibitor (nebo jeho aktivní metabolity) odbouráván v játrech a jeho působení trvá po dobu jeho přítomnosti v plazmě. V druhém případě je inhibitor odbouráván přímo cholinesterázami a působí po delší čas než je jeho přítomnost (nebo přítomnost jeho aktivních metabolitů) v plazmě [100].

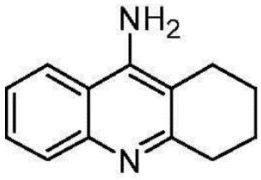
1.3.1 Inhibitory periferního a α-anionického a místa

Inhibitory anionického místa obsadí coulombickou interakcí anionické centrum enzymu, čímž brání přístupu ACh. Mezi inhibitorem a enzymem nevzniká kovalentní vazba, tento proces je tedy reverzibilní. Mezi inhibitory α-anionického místa řadíme takrin, berberin, huperzin A a B, donepezil, galantamin a dekamethonium. Mezi inhibitory periferního anionického místa patří aflatoxiny a huperzin [101].

Takrin

V roce 1993 byl pod názvem Cognex® uveden na trh 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin. Takrin (obr. 2) byl prvním synteticky vyrobeným inhibitorem používaným k léčbě AD. Působí alostericky, na enzym se váže v místě jeho hydrofobního centra. Působí nekompetitivně na AChE, v menší míře i na BChE. Dobře prostupuje hematoencefalickou bariérou. Jeho použití v klinické praxi komplikovala hepatotoxicita a gastrointestinální diskomfort při užívání léčiva. Z tohoto důvodu byl později stažen z trhu. V současné době jsou vyvíjeny méně

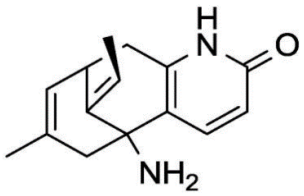
toxické alternativy takrinu, například 7-methoxytakrin, takrin-flavonoidy, takrin-kumariny, aj. [7,32,96,102–105].



Obrázek 2 Strukturní vzorec takrinu [106]

Huperzin A a B

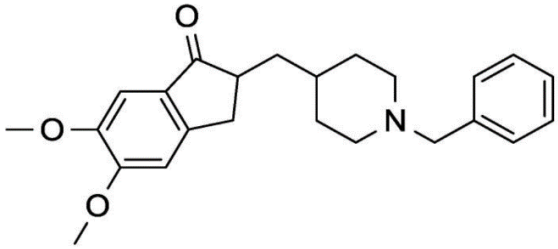
Huperzin je rostlinný alkaloid izolovaný z čínského rašeliníku *Huperzia serrata*. V této rostlině se vyskytuje ve formě A a B. Forma A (obr. 3) vykazuje lepší inhibiční účinek. Dobře prostupuje hematoencefalickou bariérou. Nekompetitivně inhibuje AChE v mozku, s nízkou intenzitou dráždí muskarinové receptory, neexcituje glutamátové receptory. V současné době se v některých zemích úspěšně využívá k léčbě AD. V mnohem menší míře inhibuje i BChE [2,7,32,107].



Obrázek 3 Strukturní vzorec huperzinu A [32]

Donepezil

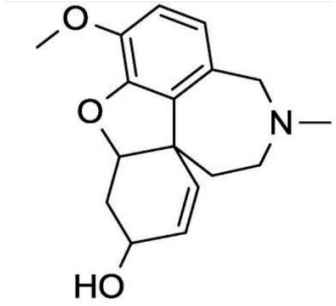
Donepezil (obr. 4) je syntetický přípravek prodávaný pod komerčním názvem Aricept®. Má obdobné účinky jako Huperzin a také působí nekompetitivně. Dobře prostupuje hematoencefalickou bariérou. V těle je dobře tolerován, pomalu se eliminuje, takže může být užíván po dlouhou dobu. Ve srovnání s jinými léky proti Alzheimerově nemoci, působí jednoduchou cestou založenou na inhibici AChE, BChE neinhibuje [65,69,108,109].



Obrázek 4 Strukturní vzorec donepezilu [32]

Galantamin

Galantamin (obr. 5) byl poprvé izolován na počátku padesátých let sovětskými vědci Mashkovským a Kruglikovou-Lvovou z cibulí sněženky kavkazské (*Galanthus* sp.). Chemicky se začal syntetizovat v následujících desetiletích. Je kompetitivním inhibitorem AChE, BChE neinhibuje. Dobře prochází hematoencefalickou bariérou. Galantamin se využívá k léčbě AD a příbuzných demencí. V současné době je alternativou k rivastigminu, lze jej podávat pacientům s podobnými stadii demence. Na trhu se prodává pod obchodními názvy Razadyne™, Nivanil®, Reminyl® aj. Po uvedení na trh nahradil takrin a stal se jedním z nejlepších léků na léčbu AD. Kromě svého inhibičního účinku na α-anionické místo AChE také moduluje afinitu nikotinových acetylcholinových receptorů k ACh [110–114].



Obrázek 5 Strukturní vzorec galantaminu [32]

1.3.2 Inhibitory esterové části aktivního centra

Jak je obsaženo již v názvu, inhibitory esterové části aktivního centra reagují právě s esteratickým centrem enzymu. Při interakci mezi inhibitorem a enzymem vzniká kovalentní vazba. Tato vazba může být za fyziologických podmínek velmi stabilní a může se tak jednat o inhibici nevratnou,

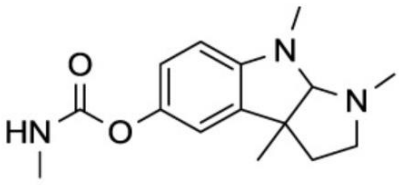
tzv. ireverzibilní. Tyto inhibitory dále rozlišujeme podle jejich chemické struktury na organofosforové a karbamátové [101].

Pro organofosforové inhibitory je typické, že tvoří stabilní kovalentní vazbu se serinovou hydroxy skupinou v esteratickém místě enzymu a jejich účinek je ireverzibilní. Mezi inhibitory, jejichž využití je spojené především s chemickými zbraněmi patří tabun, sarin, soman, cyklosarin a látka VX. Mezi další, které našly využití v zemědělství jako insekticidy a pesticidy, řadíme trichlorfon, malathion a metrifonát [65,115].

Karbamátové inhibitory, stejně jako organofosforové, tvoří kovalentní vazbu se serinovým zbytkem katalytické triády AChE (karbamoylový komplex). Tento komplex je později hydrolyticky štěpen, proto má vazba mezi inhibitorem a enzymem pouze dočasný charakter (tzv. pseudoireverzibilní). Mezi tyto látky řadíme fysostigmin (eserin), rivastigmin a karbofuran [65].

Fysostigmin

N-methylkarbamát fysostigmin (eserin, obr. 6) byl jedním z prvních inhibitorů AChE používaným jako léčivo při onemocnění Myasthenia gravis (MG) a AD. Inhibuje i BChE. Tento alkaloid se přirozeně vyskytuje v rostlině *Physostigma venosum* (tzv. kalabarových bobech). Dobře prochází hematoencefalickou bariérou, má ale malou terapeutickou šíři a jeho farmakologický účinek je pouze krátkodobý. Z toho důvodu nenalezl využití v klinické praxi [32,116,117].

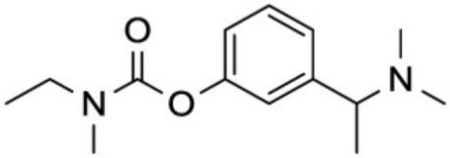


Obrázek 6 Strukturní vzorec fysostigminu [32]

Rivastigmin

Rivastigmin (obr. 7) je pseudoireverzibilní inhibitor AChE i BChE. Snadno prochází hematoencefalickou bariérou. Prodává se pod obchodním názvem Exelon. Toto léčivo se indikuje pro léčbu Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci v raných stadiích. Pomalu se eliminuje díky kovalentní vazbě v aktivním místě

enzymu, což je výhodou oproti jiným lékům. Podrobnější studie ukázaly, že rivastigmin může také potlačovat zánět [118–121].



Obrázek 7 Strukturní vzorec rivastigminu [32]

1.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je komplexní progresivní neurodegenerativní onemocnění s mnohočetnými mozkovými patologiemi. Mezi tyto patologie patří extracelulární ukládání amyloidních β–peptidových plaků, intracelulárních neurofibrilárních spletí, hyperfosforylace tau-proteinu a jeho agregace, progresivní ztráty cholinergních neuronů, ztráty nikotinových receptorů v kůře mozku a hippocampu, pokles aktivity ChAT, mitochondriální dysfunkce, zánět neuronů, glutamátová excitotoxicita, oxidační stres a zvýšená aktivita enzymů monoaminooxidázy [4,35,96,122].

V placích a spletích jsou přítomny významné hladiny BChE. Při AD se zvyšují i kortikální hladiny BChE a mění se její enzymatické vlastnosti a molekulární formy. Množství G1 izoformy BChE se v průběhu AD zvyšuje o 30–60 %, zatímco hladina G4 formy klesá nebo zůstává stejná jako ve zdravém mozku. Hladina membránově vázané G4 formy AChE je v některých oblastech mozku pacientů s AD selektivně snížena až o 90 %, zatímco hladiny G1 izoformy zůstávají z větší části nezměněny. Tyto změny exprese jsou pravděpodobně přímým následkem přítomnosti β-amyloidu. Účinnost inhibice cholinesteráz jednotlivými typy inhibitorů je v různých oblastech mozku významně odlišná, v důsledku rozdílné selektivity vůči molekulárním izoformám, a také při srovnávání inhibice u pacientů s AD a bez AD [80,123].

1.4.1 Léčba Alzheimerovy choroby

Terapie všech demencí zahrnuje dva kroky – farmakoterapii, která je základním krokem, a behaviorální (nebiologickou) léčbu, která je nezbytnou

podpůrnou součástí léčby. Behaviorální terapie se zaměřuje na motivaci nemocného, aktivizaci, kognitivní a tělesný trénink, každodenní aktivní kontakt, výživu, rehabilitaci a reaktivizaci mentální i somatické. Farmakoterapie demencí bývá dělena na farmakoterapii kognitivních funkcí (paměť, vnímání, pozornost aj.) a na farmakoterapii ostatních funkcí (poruch chování, emocí, spánku, léčbu přidružených delirií apod.). S kognitivními funkcemi, které jsou u demencí postiženy primárně, také úzce souvisí tzv. exekutivní funkce – schopnost naplánovat určitou akci, seřadit jednotlivé dílčí podúkoly akce správně za sebou, provést akci a zpětně ji zhodnotit. Kognitiva jsou látky, které zlepšují funkci centrálního acetylcholinergního systému. Řadíme mezi ně prekurzory tvorby ACh (sójové lecitiny, cholin alfoscerat), inhibitory cholinesteráz, které jsou v klinické praxi nejdůležitější, a agonisty muskarinových a nikotinových receptorů [97,100,124].

Podstatou působení léčiv u Alzheimerovy choroby je zablokování enzymů odbourávajících acetylcholin a tím prodloužení vazby acetylcholinu na svých receptorech s následujícím zvýšením acetylcholinergní transmise. Molekuly cholinesteráz se zřejmě podílejí na tvorbě a toxicitě β-amyloidu. Inhibitory acetylcholinesteráz zpomalují průběh AD a oddalují přechod onemocnění do těžkých stadií. Někteří pacienti pociťují přechodné výraznější zlepšení kognitivních i ostatních funkcí. Podáním inhibitorů cholinesteráz ovšem nelze očekávat vyléčení choroby. Nejčastějšími nežádoucími účinky těchto léčiv jsou: nechutenství, dyspepsie, průjmy, nauzea a zvracení, zpomalení tepové frekvence, křeče, bolesti hlavy a neklid v končetinách [100].

Kromě inhibitorů cholinesteráz se k léčbě AD využívá i memantin, což je nízkoafinitní nekompetitivní antagonista receptoru pro *N*-methyl-*D*-aspartát. Přednostně blokuje nadměrnou aktivitu těchto receptorů, ale zároveň umožňuje jejich fyziologickou aktivitu potřebnou pro paměť a učení. Dále chrání glutamátergní neurony před nekrózou, ke které dochází při prodlouženém vstupu vápenatých iontů do buňky. Na vznik oxidativního stresu a apoptózu neuronů nemá vliv. Výzkum se zaměřuje i na látky cílící na β-amyloid, tau-protein, na nové inhibitory cholinesteráz, monoaminooxidáz aj. [96,125].

1.5 Myasthenia gravis

Nejvýznamnějším onemocněním, které se projevuje na periferii (motorickém neuronu) a zahrnuje cholinergní transmisi je Myasthenia gravis. Autoprotilátky namířené proti nikotinovým acetylcholinovým receptorům motoneuronů v konečném důsledku způsobují jejich degradaci. Funkčním důsledkem onemocnění je snížení cholinergní transmise u kosterních svalů, což se u těchto pacientů projevuje svalovými slabostmi po namáhání svalů, především pak v odpoledních a večerních hodinách, dvojitým viděním, slabostmi v mimických a krčních svalech. Největší hrozbou onemocnění je možnost respiračního selhání [35,126].

1.5.1 Léčba Myasthenia gravis

K symptomatické léčbě se za účelem prodloužení účinku endogenního acetylcholinu využívají inhibitory cholinesteráz. Kromě inhibitorů jsou indikována imunosupresiva, případně je pacientovi provedena thymektomie. V akutním ohrožení respiračního selhání se přidává včasná respirační podpora a nahrazení plazmy. Pacienti by měli být léčeni tak účinně, že se stanou asymptomatickými, nebo mají pouze mírné až středně závažné příznaky. Většina nemocných tedy může žít plnohodnotným životem, pouze s mírným omezením při těžších fyzických úkonech. Přerušované dvojité vidění může i nadále přetrvávat. Průměrná délka života osob s Myasthenia gravis a bez tohoto onemocnění je stejná [35,126,127].

1.6 Stanovení aktivity cholinesteráz

Stanovení aktivity cholinesteráz má význam při diagnostice různých patologií. Řadíme mezi ně Alzheimerovu a Parkinsonovu chorobu, Myasthenii gravis, ischemickou chorobu srdce, diabetes mellitus, poruchy lipidového metabolismu, intoxikaci organofosfáty a karbamáty. Syntéza, a zároveň s ní i aktivita, BChE klesá při poškození parenchymu jater. Ve všech těchto případech je důležité jednoduše a správně stanovit aktivitu cholinesteráz. Volba metody závisí na typu enzymu a substrátu, hodnotě pH, teplotě, dostupných

přístrojích a roztocích. Referenční hodnoty cholinesteráz jsou u mužů a žen pro jednotlivé druhy substrátů různé (viz tabulka 1) [68,128–130].

Cholinesterázy hydrolyzují, kromě přírodního substrátu acetylcholinu, také mnoho dalších přírodních i syntetických esterů. Patří mezi ně estery thiocholinu, např. acetylthiocholin (ATCh), butyrylthiocholin (BTCh), propionylthiocholin, acetyl-*p*-methylthiocholin, *o*-nitrofenylacetát, indofenylacetát, benzoylcholin, sukcinylcholin, mivakurium, *p*-aminofenylacetát, α-naftylacetát aj. Mimo výše uvedené i lokální anestetika esterového typu, mezi něž patří prokain, chlorprokain, tetrakain, kokain a heroin [131–133].

Tabulka 1 Referenční hodnoty cholinesteráz [130]

substrát	muži	ženy
acetylthiocholinjodid	22–60 μkat/l	20–30 μkat/l
butyrylthiocholinjodid	38–120 μkat/l	35–110 μkat/l
propionylthiocholinjodid	50–125 μkat/l	50–115 μkat/l

1.6.1 Volba metody stanovení

Aktivita enzymů může být stanovena měřením rychlosti tvorby produktů, nebo úbytku substrátu během reakce. Pokud je nutné použít vysoké koncentrace substrátu, je často citlivější měřit vznik produktu, než úbytek substrátu, kvůli možným nepřesnostem při určování malého poklesu od velké počáteční hodnoty. Jak je uvedeno výše, volba typu analýzy závisí na více faktorech, mezi něž patří náklady, dostupnost vhodného vybavení a činidel, vhodnost a citlivost metody. V principu existují dva hlavní typy testovacích postupů – **průběžné testy**, které sledují změny koncentrací reaktantů v reálném čase, a **diskontinuální testy**, při kterých se reakce po stanovené době před separací produktu pro kvantifikaci zastaví (radiochemické testy a testy založené na HPLC). Mezi testy průběžné řadíme přímé metody, u nichž je měřen úbytek substrátu, nebo přírůstek produktu, a nepřímé, ve kterých se používají další reakce k přeměně produktu na látky, které lze snadno sledovat (např. Ellmanova metoda). Každý typ stanovení má své klady a zápory, a jejich

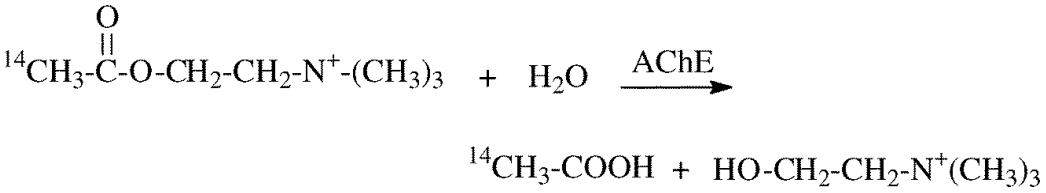
konečná volba závisí na zamýšleném použití. Přímé kontinuální testy jsou vhodné pro kinetické studie, diskontinuální stanovení jsou upřednostňována pro screening [134].

Aktivitu cholinesteráz lze stanovovat metodami kolorimetrickými, kalorimetrickými, elektrometrickými, manometrickými, histochemickými, radiometrickými, polarografickými, fluorometrickými aj. Některé výzkumy popisují i stanovení pomocí hmotnostní spektrometrie a difraktometrické metody. Vybrané metody budou popsány v následujících podkapitolách [135–138].

1.6.2 Radiometrické metody

Radiometrické metody se příliš nevyužívají z důvodu vysoké finanční náročnosti a problematiky práce s radioaktivním odpadem. Tyto metody jsou však jednoduché, reprodukovatelné, přesné a vysoce citlivé. Další výhodou je i využití přírodních substrátů [134,139,140].

Jedním z možných postupů je **metoda mikrodeterminace** aktivity AChE dle *Winteringhama a Disneyho*, při které je měřena C^{14} značená kyselina octová vznikající hydrolýzou značeného substrátu (viz obrázek 8). Tato metoda může být použita při relativně konstantním pH i pro velmi malé objemy vzorků, řádově 1 µl plné krve či plazmy [141–143].



Obrázek 8 Radiometrická metoda stanovení aktivity cholinesteráz dle Winteringhama a Disneyho [144]

Mezi další metody radiometrického stanovení aktivity cholinesteráz patří například stanovení dle *Johnsona a Russella*, vhodné pro analýzu velkého množství vzorků v krátkém čase, či dle *Gordona a kol*., při které je možné detekovat i tak nízké aktivity, které nezaznamenají kolorimetrické metody [145,146].

1.6.3 Fluorometrické metody

Fluorometrické testy poskytují vyšší citlivost (až 100krát) než odpovídající kolorimetrické metody. Fluorescenční reagencie jsou stabilní, mají vysoký stupeň intenzity dlouhodobé fluorescence a široké excitační vlnové délky. Je vhodné, aby byl substrát nefluorescenční a poskytoval vysoce fluorescenční produkt (indoxylacetát, resorufinové estery nebo naftylestery). Pokud je substrát i produkt fluorescenční, tak by se jejich spektra neměla rušit (test založený na 7-acetoxy-1-methylchinoliniu). Případně může být test založen na enzymové hydrolýze s další reakcí za získání vysoce fluorescenčního produktu [144,147].

Indoxylacetátová metoda je jednokroková reakce, při které dochází k hydrolýze indoxylacetátu cholinesterázou za vzniku zeleného zbarvení, které lze detekovat při vlnové délce 670 nm. To je výhodné oproti Ellmanově metodě, ve které vznikající zbarvení interferuje se zbarvením vzorku. Rychlost hydrolýzy indoxylacetátu je mnohem vyšší oproti rychlosti resorufinových esterů. Další výhody indoxylacetátu oproti acetátu nebo butyrátu resorufinu jsou jeho větší stabilita vůči spontánní hydrolýze a větší rozdíl mezi excitačními a emisními vlnovými délkami. Výhodou resorufinových esterů je větší fluorescence resorufinu, což umožňuje stanovení nižších koncentrací substrátu [144,148].

1.6.4 Metody založené na stanovení pH

Faktu, že enzymy cholinesterázy hydrolyzují estery cholinu za vzniku cholinu a příslušné kyseliny, využívají pH detekční stanovení. Řadíme mezi ně metodu titrační, Michelovu elektrometrickou, Acholestovu a pH-stat metodu [149].

Kyselina uvolněná enzymatickou hydrolýzou substrátu acetylcholinu může být sledována **titrací** standardním alkalickým roztokem při konstantním pH buď pomocí indikátoru, nebo potenciometru. Přidávané objemy zásady pro udržení požadované hodnoty pH roztoku jsou zaznamenávány v pravidelných časových intervalech. Postup je jednoduchý na provedení i vybavení, ale je zdlouhavý a výsledky mohou být ovlivněny podmínkami měření či používanými indikátory [144,147,149].

Michelova elektrometrická metoda byla poprvé popsaná v roce 1949 a také využívá stanovení kyseliny octové, která vyvolá změnu pH. pH roztoku se změří před a po inkubaci, která trvá 60 minut. V průběhu stanovení je třeba udržovat konstantní teplotu, např. použitím vodní lázně. Přesnost a citlivost není tak velká jako u metody titrační. Dalšími nevýhodami jsou dlouhá inkubační doba a velká spotřeba vzorku [149,150].

Automatizovaná **metoda pH-stat**, která je odvozena od Michelova stanovení, se ukázala být jednou z nejpříhodnějších pH detekčních metod. Je při ní kontinuálně zaznamenáváno uvolňování kyseliny. pH-stat nabízí lepší kontrolu podmínek testu, což vede k vyšší citlivosti a lepší reprodukovatelnosti [151].

Acholestova metoda využívá filtrační papír napuštěný indikátorem a substrátem (esterem cholinu), na který je nanesen vzorek krve. Při reakci enzym hydrolyzuje substrát a vzniká kyselina, což změní barvu indikátoru. Čím je delší doba změny barvy filtračního papíru, tím je aktivita cholinesteráz nižší. Metoda je jednoduchá, levná, rychlá, ale není při ní možné sledovat kinetiku enzymové hydrolýzy [144,152].

1.6.5 Histochemické metody

Již v roce 1949 *Koelle a Friedenwald* představili **thiocholinovou histochemickou metodu**, díky které se podařilo získat více informací o lokalizaci a distribuci cholinesteráz v tkáních. Metoda byla postupně modifikována samotným *Koellem*, *Naikem* v roce 1963, také *Karnovským a Rootsem* v roce 1964, *Tagem* v roce 1986 [153–156].

V současné době se hojně využívají i **imunohistochemické** metody. V roce 2003 byly představeny polyklonální protilátky proti AChE, později i specifické protilátky proti BChE. Některé studie využívají kombinace metod, při kterých se cholinesterázy vyváží ze vzorku protilátkami ukotvenými na imunologické destičce a následně se jejich aktivita stanoví Ellmanovou metodou [128,157–159].

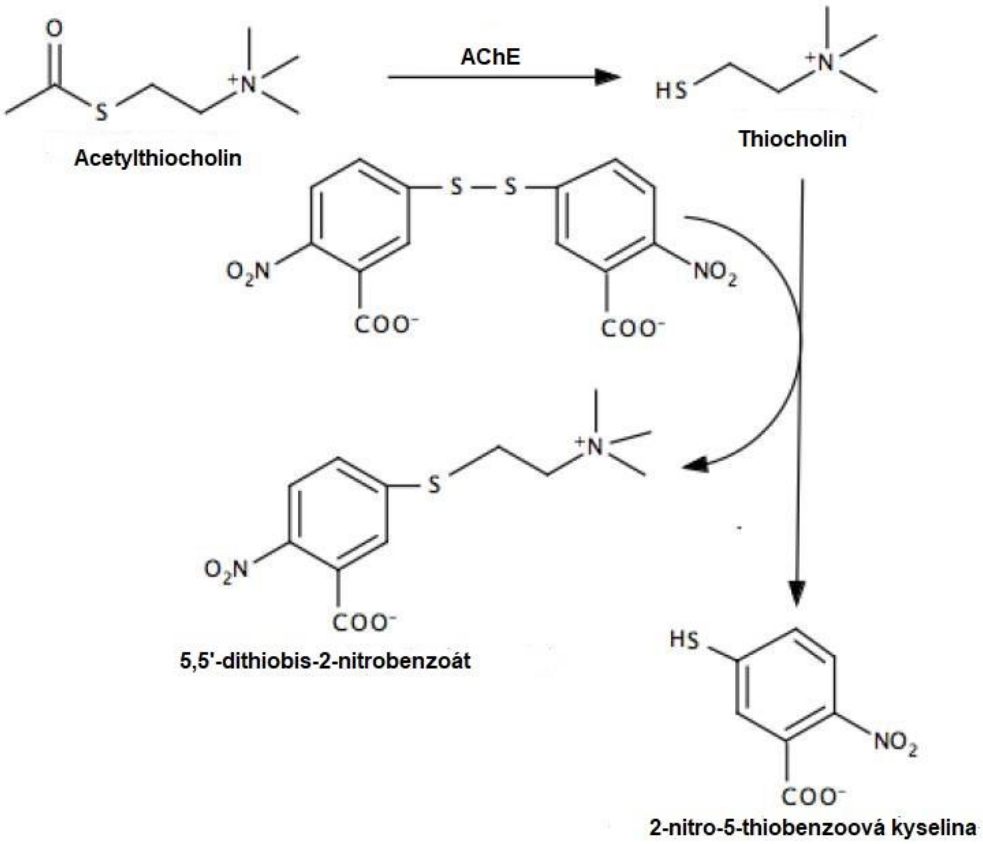
Firma ImmunoChemistry Technologies vyvinula komerční test pro přímou kvantifikaci a lokalizaci cholinesteráz v celých živých buňkách. V této metodě nejsou použity protilátky, ale inhibitor **fysostigmin** značený fluoresceinem.

Výhodou je, že se na inhibitor s fluorochromem váží pouze aktivní cholinesterázy [160].

1.6.6 Spektrofotometrické metody

Jako jedna z prvních spektrofotometrických stanovení aktivity cholinesteráz byla použita **Hestrinova metoda**. Ale brzy byla vytlačena modernějšími postupy, protože při ní nelze sledovat rychlost úbytku substrátu kontinuálně [149].

V současné době se aktivita cholinesteráz nejčastěji stanovuje **Ellmanovou metodou.** Principem testu (viz obrázek 9) je hydrolýza substrátu acetylthiocholinu, alternativního substrátu k fyziologickému ACh, na kyselinu octovou a thiocholin. Thiocholin reaguje s 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) za vzniku 2-nitro-5-thiobenzoové kyseliny (TNB). Reakce se projevuje vznikem žlutého zbarvení, které lze měřit spektrofotometricky při 412 nm. Pro stanovení aktivity BChE lze využít substrát BTCh [161,162].



Obrázek 9 Princip Ellmanovy metody stanovení aktivity AChE [134]

Toto kolorimetrické stanovení je jednoduché, levné, rychlé a spolehlivé, ale má také svá omezení. Problémy způsobuje DTNB (tzv. Ellmanovo činidlo), které je nestabilní, interaguje s volnými sulfhydrylovými skupinami v roztoku a může ovlivnit aktivitu cholinesterázy. Dalším problémem je interference s hemoglobinem při stanovení, protože absorpční maximum barevného indikátoru TNB (412 nm) se překrývá Soretovým pásem hemoglobinu. Pro vyloučení takto vzniklé chyby, je potřeba vzorek krve vhodně naředit [128,163].

Výše uvedené nedostatky vedly k mnoha modifikacím původní Ellmanovy metody. Pro snížení interference s hemoglobinem byly v některých studiích k měření použity odlišné vlnové délky, dvoupaprskové spektrofotometry, prodloužené inkubace nebo jiné chromogenní disulfidy, např. 4,4'-dithiopyridin (4-PDS), 2,2'-dithiodipyridin (2-PDS) či 6,6'-dithiodinikotinová kyselina (DTNA). Produkt reakce s 2-PDS absorbuje při vlnové délce 343 nm, což sice zmírňuje interferenci s hemoglobinem, ale později se zjistilo, že má 2-PDS inhibiční účinek na cholinesterázy. Produkt reakce s DTNA absorbuje při vlnové délce 344 nm [147,163–170].

Pro stanovení aktivity AChE lze použít i jiné chromogeny než pouze Ellmanovo činidlo. Patří mezi ně např. indofenol acetát, 2,6-dichloroindofenyl acetát, β-naftyl acetát a *N*-methylindoxyl acetát. Tato činidla poskytují modré zbarvení roztoku [162].

Mezi další spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz patří **Okabeho metoda**, která je přesná, citlivá, reprodukovatelná, ale oproti Ellmanově metodě je zdlouhavá, náročnější a dražší. Dalšími z možností stanovení jsou **Augustinssonova, nitrofenyl butyrátová metoda, kolorimetrie se zlatými nanočásticemi** aj. [144,171–173].

1.6.7 Biosenzory

Biosenzory, které se využívají pro stanovení aktivity cholinesteráz, jsou vysoce specifické, citlivé, levné, mají rychlou odezvu a relativně kompaktní velikost. Využívají se pro klinické, potravinářské a environmentální monitorování. V biosenzorech jsou cholinesterázy v kombinaci s různými měniči, buď elektrochemickými, optickými nebo piezoelektrickými.

Elektrochemické biosenzory se dále dělí na vodivostní, potenciometrické, amperometrické a voltametrické [144].

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce je testování různých reakčních podmínek za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity cholinesteráz s využitím DTNA jako chromogenního činidla. V první části se věnuje zpracování odebrané krve a dalším úpravám před samotným stanovením. Dále se zabývá porovnáním chromogenních činidel DTNA a DTNB a vyhodnocením vhodnosti jejich použití, stanovením inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů a jejich porovnáním se standardními látkami. Cílem poslední části práce je stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda.

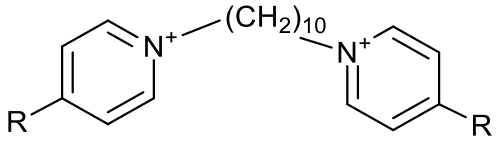
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie a roztoky

- acetylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich Praha)
    - 0,1 mol/l roztok ve fosfátovém pufru pH 7,4 (0,1 mol/l)
    - dále ředěno fosfátovým pufrem dle potřeby jednotlivých stanovení
- deionizovaná voda
- DMSO (dimethylsulfoxid) (PENTA s.r.o.)
- DTNA (Sigma-Aldrich Praha)
    - 5 mmol/l roztok ve fosfátovém pufru pH 7,4 (0,1 mol/l)
- DTNB (Sigma-Aldrich Praha)
    - 5 mmol/l roztok ve fosfátovém pufru pH 7,4 (0,1 mol/l)
- Galantamin hydrobromid (Sigma-Aldrich Praha)
    - 0,02 mol/l vodný roztok
- fosfátový pufr 0,1 mol/l pH 7,4 (PENTA s.r.o.):
    - 11,49 g Na_2HPO_4 bylo rozpuštěno v 810 ml destilované vody
    - 3,4 g KH_2PO_4 rozpuštěno v 250 ml destilované vody
    - roztok KH_2PO_4 byl pomalu přidáván k Na_2HPO_4 až do pH 7,4
- oktanol: 1-oktanol (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
- redestilovaná voda
- rivastigmin tartát (Sigma-Aldrich Praha)
    - 0,02 mol/l vodný roztok
- takrin hydrochlorid (Sigma-Aldrich Praha)
    - 0,02 mol/l vodný roztok
- vzorky deseti testovaných inhibitorů (látky byly připraveny a jejich čistota byla ověřena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Martina Krátkého, Ph.D.)

- rozpuštěny na koncentraci 0,01 mol/l v DMSO a dále ředěny dle potřeby deionizovanou vodou
- Strukturní vzorce jednotlivých inhibitorů (bispyridiniových solí) jsou uvedeny v tabulce 2

Tabulka 2 Strukturní vzorce testovaných inhibitorů



Číslo vzorku inhibitoru	R
1	-CH_2OH
2	-CN
3	-OH
4	-COOH
5	-CH_2CH_3
6	-$CH_2C_6H_5$
7	-$COOCH_3$
8	-OCH_3
9	-CO-CH_3
10	-CH_3

3.2 Přístroje a pomůcky

- centrifuga 5804/ 5804 R (Eppendorf, Německo)
- centrifuga MPW-56 (Unimed, Praha)
- třepačka Heidolph Multi Reax (Heidolph Instruments)

- UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Německo)
    - software – UV/VIS ChemStation

3.3 Zpracování odebrané krve

Krev využívaná pro všechna následující stanovení byla odebrána zdravým dárcům do odběrových zkumavek s obsahem EDTA.

V centrifuze byla oddělna plazma od krevních buněk při 3000 otáčkách za minutu po dobu 15 min při 4 °C. Plazma byla odpipetována do plastových mikrozkumavek a uchovávána při -80 °C. Buffy coat (vrstva krevních destiček a bílých krvinek) nad vrstvou erytrocytů byl odstraněn do odpadu.

K získaným erytrocytům byla přidána redestilovaná voda (v poměru 1:3). Takto naředěné erytrocyty byly znovu centrifugovány při 3000 otáčkách za minutu po dobu 20 min při 4 °C. Poté byly naředěné erytrocyty rozpipetovány do plastových mikrozkumavek a uchovávány v mrazáku při -80 °C.

Po vyjmutí z mrazáku před vlastním stanovením byly takto upravené erytrocyty ještě naposledy ředěny v poměru 1:1 redestilovanou vodou.

3.4 Postupy stanovení

Pro všechna stanovení enzymové aktivity byla využita Ellmanova metoda (popsaná v kapitole 1.1.6) s Ellmanovým činidlem DTNB nebo s DTNA. K měření byl využit UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 a křemenná kyveta s objemem 2 ml a optickou dráhou 1 cm. Postupně byly měřeny závislosti absorbance A na čase t. Celkový čas reakce byl 120 s, měření bylo zaznamenáváno v intervalu po 3 s. Reakce s DTNA byla měřena při vlnové délce 340 nm, reakce s DTNB při 436 nm.

3.4.1 Optimalizace reakčních podmínek stanovení enzymové aktivity pro DTNA a DTNB

Celkový objem reakční směsi (RS) v měřící kyvetě byl vždy 1 ml. Směs obsahovala v případě slepého vzorku (blanku) fosfátový pufr, DTNA, nebo DTNB a erytrocyty. Směs s probíhající reakcí obsahovala navíc substrát acetylthiocholin jodid, kterým byla reakce vždy spuštěna.

Optimalizace metody spočívala v určení nevhodnějšího objemu erytrocytů (5, 10, 15, 20 a 25 µl) a koncentrace substrátu v RS (4.10^{-5} mol/l, 8.10^{-5} mol/l, 2.10^{-4} mol/l, 4.10^{-4} mol/l, 5.10^{-4} mol/l a 8.10^{-4} mol/l).

RS vždy obsahovala:

- 200 µl DTNA nebo DTNB
- 5, 10, 15, 20, 25 µl erytrocytů
- 100 µl substrátu v požadované koncentraci
- fosfátový pufr v objemu zbylém do celkového 1 ml.

RS (obsahující fosfátový pufr, DTNA či DTNB a erytrocyty) byla vždy 1 minutu inkubována před přidáním substrátu, a tím spuštěním měřené enzymatické reakce. Každé měření bylo opakováno dle potřeby, obvykle 2–3x.

Z každého měření byla vypočtena reakční rychlost poměrem rozdílů absorbancí v čase 26 s a 86 s a času 60 s, výsledné hodnoty jednotlivých stanovení byly zprůměrovány a vneseny do grafů.

3.4.2 Stanovení IC_{50}

Hodnota IC_{50} odpovídá koncentraci inhibitoru potřebné k dosažení 50% inhibice enzymu. Často se používá jako prostředek pro vyjádření účinnosti inhibitoru [134].

K získání hodnoty IC_{50} daného inhibitoru lze použít, mimo jiné postupy, i závislost mezi poměrem rychlostí neinhibované a inhibované hydrolýzy (v_0/v_i) a koncentrací inhibitoru [I]. Rychlost hydrolýzy lze vypočítat jako změnu absorbance v čase ($v=\Delta A/t$). Pro plné kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené typy enzymatických inhibovaných reakcí je tato závislost přímková s úsekem rovným 1. Ze získané přímky (procházející body (1;0) a v_0/v_i; [I]) a rovnice regrese lze odečíst pro $v_0/v_i = 2$ hodnotu IC_{50} [174].

Postup stanovení

IC_{50} bylo stanoveno u standardů rivastigminu, takrinu a galantaminu. Koncentrace použitého substrátu byla zvolena 2.10^{-4} mol/l a 4.10^{-4} mol/l v RS. Pro DTNA byly vybrány objemy erytrocytů 15 a 25 µl, pro DTNB 15 µl. Pro

určení hodnoty IC_{50} u deseti vzorků inhibitorů byla vybrána koncentrace substrátu 2.10^{-4} mol/l v RS, 15 µl erytrocytů a činidlo DTNA.

Neinhibovaná reakce byla provedena dle postupu v kapitole 3.4.1, inhibovaná reakce také, ale navíc byl do RS přidán inhibitor. Inhibovaná směs pro slepý vzorek tedy obsahovala fosfátový pufr, DTNA nebo DTNB (200 µl), inhibitor a erytrocyty (15 nebo 25 µl). Směs s probíhající reakcí obsahovala navíc substrát acetylthiocholin jodid (100 µl), kterým byla reakce spuštěna. Objemy přidaných inhibitorů se měnily dle jejich požadované koncentrace v RS. Objem přidaného inhibitoru byl odečten od objemu fosfátového pufru, aby byl celkový objem RS vždy 1 ml. Testované koncentrace standardů inhibitorů, substrátů, objemy erytrocytů pro stanovení s DTNA a DTNB jsou uvedeny v tabulce 3. Po minutové inkubaci byla reakce spuštěna přidáním substrátu. Měření byla dle potřeby opakována, obvykle 3–4x.

Tabulka 3 Testované koncentrace inhibitorů, substrátů a objemy erytrocytů pro stanovení s DTNA a DTNB

inhibitor	objem erytrocytů (µl)	DTNB	DTNA	koncentrace substrátu (mol/l)	koncentrace inhibitoru (mol/l)
rivastigmin	15	x		2.10^{-4}	1.10^{-5}–$4{,}5.10^{-5}$
	15	x		4.10^{-4}	2.10^{-5}–6.10^{-5}
	15		x	2.10^{-4}	1.10^{-5}–1.10^{-4}
	15		x	4.10^{-4}	4.10^{-5}–1.10^{-4}
	25		x	4.10^{-4}	4.10^{-5}–1.10^{-4}
takrin	15	x		2.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	15	x		4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	15		x	2.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	15		x	4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	25		x	4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}

Tabulka 3 (pokračování) Testované koncentrace inhibitorů, substrátů a objemy erytrocytů pro stanovení s DTNA a DTNB

inhibitor	objem erytrocytů (µl)	DTNB	DTNA	koncentrace substrátu (mol/l)	koncentrace inhibitoru (mol/l)
galantamin	15	x		2.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	15	x		4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	15		x	2.10^{-4}	1.10^{-8}–7.10^{-6}
	15		x	4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}
	25		x	4.10^{-4}	1.10^{-8}–3.10^{-7}

Postupy stanovení deseti vzorků inhibitorů byly shodné s postupy stanovení třech standardů inhibitorů. Pro všechna stanovaní byl zvolen objem erytrocytů 15 µl, koncentrace substrátu 2.10^{-4} mol/l a činidlo DTNA. Rozmezí testovaných koncentrací vzorků inhibitorů je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Rozmezí koncentrací testovaných vzorků inhibitorů

číslo vzorku inhibitoru	koncentrace inhibitoru (mol/l)
1	1.10^{-7}–7.10^{-6}
2	3.10^{-8}–3.10^{-7}
3	3.10^{-7}–3.10^{-6}
4	1.10^{-7}–1.10^{-5}
5	3.10^{-8}–3.10^{-7}
6	3.10^{-8}–3.10^{-7}
7	3.10^{-8}–3.10^{-6}

Tabulka 4 (pokračování) Rozmezí koncentrací testovaných vzorků inhibitorů

číslo vzorku inhibitoru	koncentrace inhibitoru (mol/l)
8	3.10^{-8}–4.10^{-7}
9	1.10^{-7}–3.10^{-6}
10	1.10^{-8}–3.10^{-7}

3.4.3 Stanovení kinetických parametrů K_M, V_{max} neinhibované reakce

Stanovení kinetických parametrů K_M (Michaelisova konstanta) a V_{max} (mezní rychlost) bylo provedeno spektrofotometrickou metodou s využitím DTNA a DTNB. Pro stanovení byly zvoleny koncentrace substrátu v rozmezí 4.10^{-5}–8.10^{-4} mol/l v RS, objemy erytrocytů 5, 10, 15, 20 a 25 µl. Postup stanovení byl stejný jako v kapitole 3.4.2. Hodnoty K_M a V_{max} byly získány z rovnice regrese grafické závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti (1/v) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu (1/[S]). K_M odpovídalo hodnotě po dosazení do rovnice: y = 0; V_{max}, když x = 0.

3.4.4 Určení typu inhibice

Typ inhibice byl stanovován s činidlem DTNA u inhibitoru číslo 10 s objemem erytrocytů 15 µl. Nejprve byla měřena neinhibovaná reakce dle postupu v kapitole 3.4.1. Dále byly měřeny inhibované reakce (viz kapitola 3.4.2) s koncentrací inhibitoru 0,03, 0,05, 0,08 a 0,1 µmol/l v RS. Koncentrace substrátu byly následující: 0,06, 0,08, 0,2 a 0,4 µmol/l. Postup stanovení byl stejný jako v kapitole 3.4.2. Měření bylo dle potřeby opakováno 3-4x.

Pro všechny koncentrace substrátu byla sestrojena grafická závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti (1/v) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu ($1/c_{ATCh}$). Jedná se o grafickou závislost dle Lineweavera a Burka, ze které byl určen typ inhibice.

Z rovnice regrese grafu dle Lineweavera a Burka byly vypočteny hodnoty K_M a V_{max}, podle kterých lze také určit typ inhibice. Inhibice je kompetitivní, když inhibitor soutěží se substrátem o vazebné místo na enzymu, hodnota K_M se

zvyšuje, V_{max} je nezměněna. Při nekompetitivní inhibici má enzym specifické vazebné místo pro inhibitor, který tedy neovlivňuje vazbu substrátu na enzym. Hodnota K_M se tedy nezmění, V_{max} se sníží. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže na komplex enzym-substrát a hodnota K_M se snižuje, V_{max} se také snižuje. Při smíšené inhibici nelze použít tento kinetický model [175].

3.4.5 Stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda a tPSA

V soustavě *n*-oktanol:voda je hodnota rozdělovacího koeficientu P charakterizována jako podíl koncentrace chemické látky (inhibitoru) v nepolární organické fázi *n*-oktanolu a v polární fázi vodě. Rozdělovací koeficient je bezrozměrná veličina, nejčastěji vyjádřena v logaritmickém tvaru **logP**. Její hodnotu ovlivňuje pH, teplota a iontová síla [176].

U inhibitorů působících jako léčiva hodnoty logP podávají informaci o jejich propustnosti přes biologické membrány – čím je hodnota logP vyšší, tím více je daná látka lipofilní. Rozpustnost léčiva v tucích zlepšuje jeho prostupnost přes biologické membrány. U léčiv je důležité i zachování rozpustnosti ve vodě, protože jsou distribuovány na místo účinku krevním oběhem. Příliš vysoká rozpustnost léčiva ve vodě zase způsobuje jeho krátkodobou účinnost [176].

Christopher Lipinski a jeho kolegové analyzovali fyzikálně chemické vlastnosti přibližně 2000 léků. Společně došli k závěru, že látka bude pravděpodobněji schopná projít buněčnou membránou a hematoencefalickou bariérou a zachová si přijatelnou rozpustnost ve vodě, pokud vyhovuje následujícím požadavkům (tzv. Lipinskému pravidlu 5):

- její molekulová hmotnost (Mr) je ≤ 500,
- její logP je ≤ 5,
- počet skupin v molekule schopných předat atom vodíku do vodíkové vazby (obvykle součet hydroxylových a aminových skupin v molekule léku) je ≤ 5,
- počet skupin schopných přijímat vodíkové atomy za tvorby vodíkových vazeb (obvykle součet atomů kyslíku a dusíku) je ≤ 10 [176].

Mezi další rozhodující kritéria pro látky, které budou schopné procházet přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariérou, patří **polární povrch molekuly (PSA)**. Je definován jako součet všech povrchů polárních atomů v molekule, obvykle jde o atomy dusíku a kyslíku včetně jejich navázaných atomů vodíku. Rozměr PSA je v $Å^2$, kde 1 Å = 10^{-10} m. O CNS-aktivní sloučeniny se jedná, pokud je hodnota jejich PSA menší než 60-70 $Å^2$. Výpočet PSA klasickým způsobem je časově náročný, protože je pro něj nutné vytvořit přiměřený 3D model struktury molekuly. Z tohoto důvodu se přistoupilo k tzv. topologickému polárnímu povrchu molekuly (**tPSA**), který je relativně dobře přímo odhadnutelný. Pokud je počet atomů dusíku a kyslíku v molekule menší nebo roven pěti, má dané léčivo vysokou šanci vstoupit do mozku. Jestliže je hodnota rozdílu logP a součtu atomů dusíku a kyslíku pozitivní, daná sloučenina je CNS-aktivní [176–178].

Postup stanovení

Hodnoty logP i tPSA byly stanoveny pro standardní inhibitory galantamin, rivastigmin a takrin a všech deset vzorků inhibitorů.

K 1,5 ml *n*-oktanolu bylo přidáno 10 μl roztoku inhibitoru o koncentraci 1.10^{-2} mol/l, směs byla intenzivně 15 minut protřepávána pomocí třepačky. Do měrné kyvety byl odpipetován 1 ml této směsi a byla změřena její absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor (jako srovnávací roztok byl použit *n*-oktanol). Tak byla získána hodnota absorbance, která odpovídala 100 % daného inhibitoru v *n*-oktanolu.

Ke směsi *n*-oktanolu a demineralizované vody v poměru 1:1 (celkový objem 3 ml) bylo přidáno 10 μl roztoku daného inhibitoru o koncentraci 1.10^{-2} mol/l, směs byla intenzivně 15 minut protřepávána v třepačce a poté centrifugována při 3000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut. Do měrné kyvety byl odpipetován 1 ml oktanolové vrstvy. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Srovnávacím prostředím byl vždy *n*-oktanol. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě $(\%)_1$ a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě $100-(\%)_1$. Následně byly vypočteny rozdělovací koeficienty jednotlivých inhibitorů v soustavě *n*-oktanol:voda podle vztahu:

$$P = \frac{(\%)_1}{100-(\%)_1} = \frac{c_1}{c_2},$$

kde c_1 je koncentrace látky v organické fázi a c_2 je koncentrace látky ve vodné fázi.

Hodnoty tPSA pro jednotlivé inhibitory byly získány analýzou struktury jejich molekul pomocí počítačového programu ChemDraw.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace reakčních podmínek stanovení enzymové aktivity pro DTNA a DTNB

Pro všechna stanovení enzymové aktivity byla využita Ellmanova metoda s Ellmanovým činidlem DTNB, nebo DTNA. Postupně byly UV/VIS spektrofotometrem Agilent 8453 měřeny závislosti absorbance A na čase t (120 s). Z každého měření byla vypočtena reakční rychlost poměrem rozdílů absorbancí v čase 26 s a 86 s a času 60 s, výsledné hodnoty jednotlivých stanovení byly zprůměrovány (viz vzorový výpočet pro koncentraci substrátu 2.10^{-4} mol/l, 15 µl erytrocytů a činidlo DTNB):

1. měření:

$$v_1 = \frac{(A_{86} - A_{26})}{t}$$

$$v_1 = \frac{(0{,}22019 - 0{,}10595)}{60}$$

$$v_1 = 0{,}00190\ s^{-1}$$

2. měření:

$$v_2 = \frac{(A_{86} - A_{26})}{t}$$

$$v_2 = \frac{(0{,}17079 - 0{,}06656)}{60}$$

$$v_2 = 0{,}00174\ s^{-1}$$

Výsledná průměrná hodnota pro koncentraci substrátu 2.10^{-4} mol/l, 15 µl erytrocytů a činidlo DTNB:

$$v = \frac{v_1 + v_2}{2}$$

$$v = \frac{0{,}00190 + 0{,}00174}{2}$$

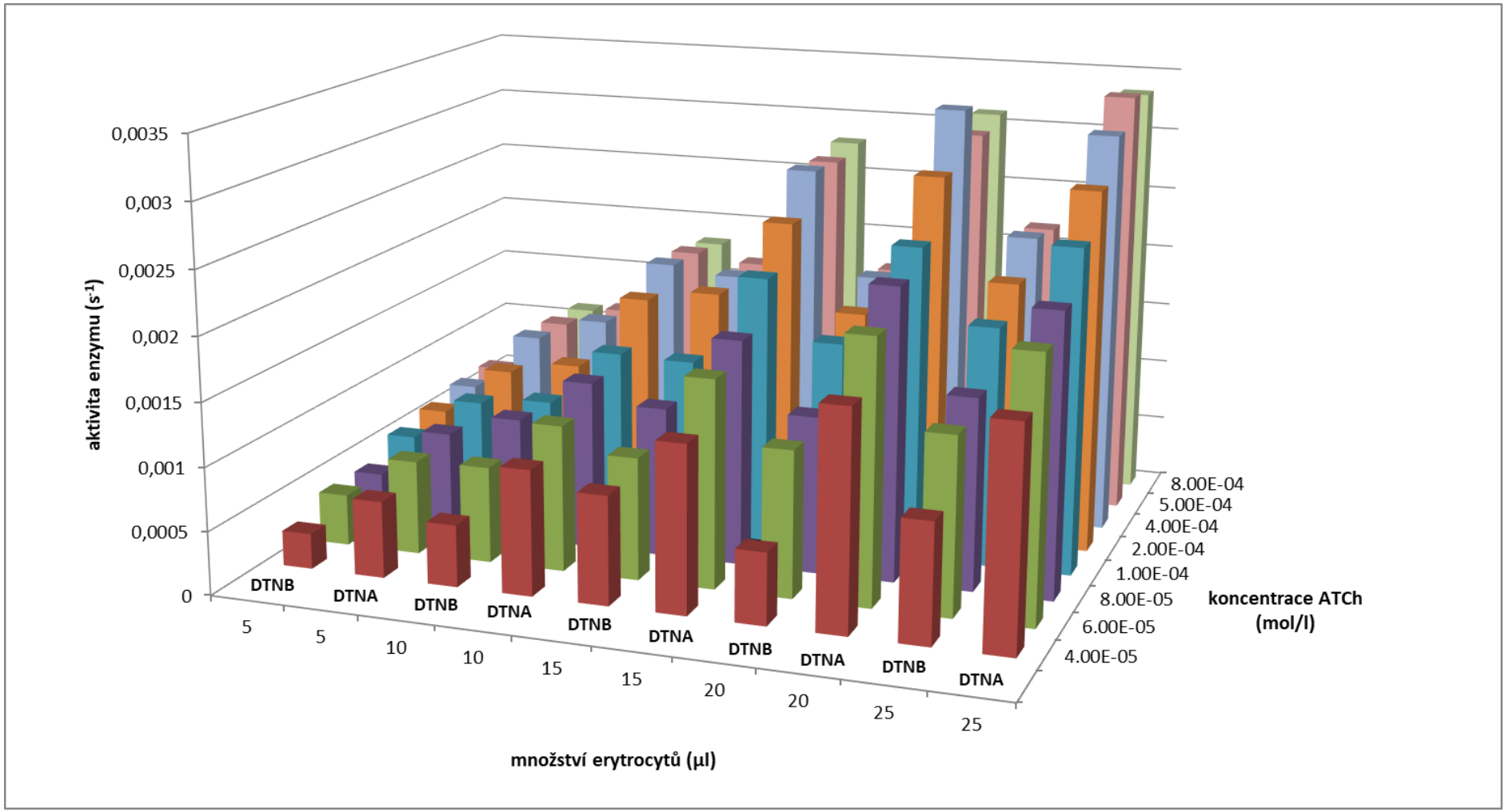
$$v = 0{,}00182\ s^{-1}$$

Z takto vypočtených průměrných reakčních rychlostí byl sestaven 3D graf porovnávající závislosti reakčních rychlostí (aktivity) na koncentraci substrátu a objemu erytrocytů pro DTNB a DTNA (viz graf 1).

Optimalizace metody spočívala v určení nejvhodnějšího objemu erytrocytů (5, 10, 15, 20, 25 μl) a koncentrace substrátu v RS (4.10^{-5} mol/l, 8.10^{-5} mol/l, 2.10^{-4} mol/l, 4.10^{-4} mol/l, 5.10^{-4} mol/l a 8.10^{-4} mol/l).

Z grafu 1 je patrné, že s činidlem DTNA lze při měření použít větší objemy erytrocytů. U DTNB dochází k poklesu aktivity již u objemu 20 μl, u DTNA aktivita neklesá ani u objemu 25 μl erytrocytů. Dále je ze získaných experimentálních dat patrné, že při uvedených koncentracích substrátu ATCh stanovení s DTNA poskytuje vyšší odezvu (aktivitu) ve srovnání s činidlem DTNB. Při koncentraci substrátu 8.10^{-4} mol/l u stanovení s činidlem DTNB dochází k poklesu aktivity enzymu, zatímco u DTNA tomu tak není.

Na základě získaných výsledků byla pro další měření vybrána koncentrace substrátu 2.10^{-4} mol/l a 4.10^{-4} mol/l a objem erytrocytů 15 μl. Za těchto podmínek byla odezva dostatečná.



Graf 1 Porovnání závislostí aktivity na koncentraci substrátu a množství erytrocytů pro DTNA a DTNB

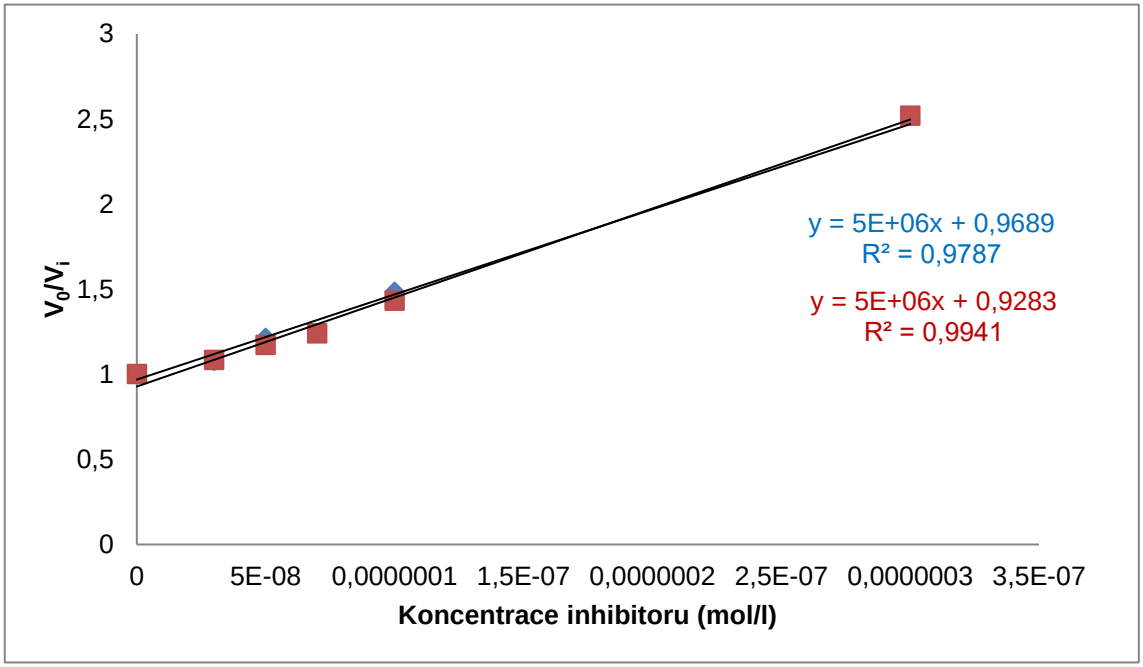
4.2 Stanovení IC_{50}

Hodnoty IC_{50}, které nám poskytují informaci o účinnosti jednotlivých inhibitorů, byly změřeny a vypočteny dle postupu popsaném v kapitole 3.4.2.

Z poměru vypočtených rychlostí inhibovaných a neinhibovaných rychlostí reakcí a koncentrací přidaného inhibitoru (viz tabulka 5) byly sestaveny grafy pro jednotlivé inhibitory (viz vzorový graf 4 pro inhibitor 5).

Tabulka 5 Poměry poměrů rychlostí inhibovaných (v_i) a neinhibovaných (v_0) reakcí a koncentrace přidaného inhibitoru č. 5

koncentrace inhibitoru (mol/l)	v_0/v_i 1	v_0/v_i 2
0	**1**	**1**
3.10^{-8}	1,083393	1,125702
5.10^{-8}	1,171125	1,198791
7.10^{-8}	1,239827	1,243215
1.10^{-7}	1,432041	1,424566
3.10^{-7}	2,519336	2,799102



Graf 2 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce a koncentrace přidaného inhibitoru 5

Z rovnic regrese byly vypočítány jako *x* hodnoty IC_{50} pro jednotlivé sady měření dosazením 2 za *y* (vychází z definice IC_{50}). Jednotlivé hodnoty IC_{50} byly následně zprůměrovány ve výslednou hodnotu IC_{50} pro každý inhibitor. Výsledné hodnoty IC_{50} a směrodatné odchylky pro standardy inhibitorů jsou uvedeny v tabulce 6. Vzorový výpočet pro inhibitor 5:

Rovnice regrese 1:

$$y = 5 \cdot 10^6 x + 0{,}9689$$

$$2 = 5 \cdot 10^6 x + 0{,}9689$$

$$x = \frac{2 - 0{,}9689}{5 \cdot 10^6}$$

$$IC_{50(1)} = 2{,}06 \cdot 10^{-7} mol/l$$

Rovnice regrese 2:

$$y = 5 \cdot 10^6 x + 0{,}9283$$

$$2 = 5 \cdot 10^6 x + 0{,}9283$$

$$x = \frac{2 - 0{,}9283}{5 \cdot 10^6}$$

$$IC_{50(2)} = 2{,}14 \cdot 10^{-7} mol/l$$

Výsledná průměrná hodnota IC_{50} pro inhibitor 5:

$$IC_{50} = \frac{(IC_{50(1)} + IC_{50(2)})}{2}$$
$$IC_{50} = 2{,}10 \cdot 10^{-7} mol/l$$

Tabulka 6 Hodnoty IC_{50} pro standardy inhibitorů

inhibitor	objem erytrocytů (µl)	DTNB	DTNA	koncentrace substrátu (mol/l)	IC_{50} (µmol/l)
rivastigmin	15	x		2.10^{-4}	86,5700 ± 7,5800
	15	x		4.10^{-4}	171,4100 ± 4,0500
	15		x	2.10^{-4}	221,2900 ± 18,8600

Tabulka 6 (pokračování) Hodnoty IC_{50} pro standardy inhibitorů

inhibitor	objem erytrocytů (µl)	DTNB	DTNA	koncentrace substrátu (mol/l)	IC_{50} (µmol/l)
rivastigmin	15		x	4.10^{-4}	156,7800 ± 6,4400
	25		x	4.10^{-4}	171,9000 ± 21,2800
takrin	15	x		2.10^{-4}	0,1130 ± 0,0060
	15	x		4.10^{-4}	0,0100 ± 0,0033
	15		x	2.10^{-4}	0,1270 ± 0,0001
	15		x	4.10^{-4}	0,1970 ± 0,0028
	25		x	4.10^{-4}	0,1608 ± 0,0065
galantamin	15	x		2.10^{-4}	0,3360 ± 0,0030
	15	x		4.10^{-4}	0,3220 ± 0,0080
	15		x	2.10^{-4}	0,4410 ± 0,0016
	15		x	4.10^{-4}	0,4790 ± 0,0168
	25		x	4.10^{-4}	0,4760 ± 0,0350

Postupy stanovení a výpočtů deseti vzorků inhibitorů byly shodné s postupy třech standardů inhibitorů. Pro všechna stanovaní byl zvolen objem erytrocytů 15 µl, koncentrace substrátu 2.10^{-4} mol/l a činidlo DTNA. Výsledné hodnoty IC_{50} vzorků inhibitorů a směrodatné odchylky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Hodnoty IC_{50} pro vzorky inhibitorů

číslo vzorku inhibitoru	IC_{50} (µmol/l)
1	1,218 ± 0,072
2	0,459 ± 0,036
3	1,719 ± 0,036

Tabulka 7 (pokračování) Hodnoty IC_{50} pro vzorky inhibitorů

číslo vzorku inhibitoru	IC_{50} (µmol/l)
4	7,988 ± 0,357
5	0,210 ± 0,004
6	0,135 ± 0,008
7	1,482 ± 0,022
8	0,344 ± 0,012
9	2,138 ± 0,160
10	0,174 ± 0,001

Hodnota IC_{50} klesá se zvyšující se účinností inhibitoru. Nejnižší hodnotu IC_{50} má inhibitor č. **6** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-benzylpyridin-1-ium), který by měl být tedy nejúčinnější. Podobných hodnot dosáhly i inhibitory č. **10** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methylpyridin-1-ium), **5** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-ethylpyridin-1-ium), **8** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium), **2** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-cyanopyridin-1-ium). Nejvyšší hodnotu IC_{50} a tedy nejnižší účinnost při inhibice AChE z lidských erytrocytů má inhibitor č. **4** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium).

4.3 Stanovení kinetických parametrů K_M, V_{max} neinhibované reakce

Stanovení kinetických parametrů K_M a V_{max} bylo provedeno spektrofotometrickou metodou s využitím činidel DTNA a DTNB. Pro stanovení byly zvoleny objemy erytrocytů 5, 10, 15, 20 a 25 µl, koncentrace substrátu ATCh v rozmezí 4.10^{-5}–8.10^{-4} mol/l v RS. Postup stanovení je popsán v kapitole 3.4.2. Hodnoty K_M a V_{max} byly vypočteny z rovnice regrese grafické závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti (1/v) na převrácené hodnotě koncentrace substrátu (1/[S]). K_M odpovídalo hodnotě po dosazení do rovnice: y = 0;

V_{max}, když x = 0. Výsledky pro DTNB a DTNA jsou uvedeny v tabulce 8. Výsledky uvedené v tabulce 8 jsou průměry minimálně ze dvou měření.

Tabulka 8 Parametry K_M a V_{max} stanovené s činidly DTNB a DTNA

objem erytrocytů (µl)	DTNB		DTNA	
	K_M (mol/l)	V_{max} (1/s)	K_M (mol/l)	V_{max} (1/s)
5	$7{,}13.10^{-5}$	$8{,}25.10^{-4}$	$4{,}20.10^{-5}$	$1{,}25.10^{-3}$
10	$1{,}02.10^{-4}$	$1{,}88.10^{-3}$	$4{,}55.10^{-5}$	$2{,}09.10^{-3}$
15	$6{,}88.10^{-5}$	$2{,}25.10^{-3}$	$5{,}59.10^{-5}$	$3{,}16.10^{-3}$
20	$5{,}72.10^{-5}$	$2{,}28.10^{-3}$	$4{,}39.10^{-5}$	$3{,}60.10^{-3}$
25	$7{,}93.10^{-5}$	$2{,}75.10^{-3}$	$4{,}13.10^{-5}$	$3{,}50.10^{-3}$

Z výsledků v tabulce 8 je patrné, že při stanovení s činidlem DTNA, v porovnání s činidlem DTNB, je při stejných objemech přidaných erytrocytů (tedy množství enzymu) dosaženo vyšších hodnot mezní rychlosti. Hodnoty K_M jsou téměř srovnatelné.

4.4 Typ inhibice

Typ inhibice byl stanovován dle postupu v kapitole 3.4.4 s činidlem DTNA u inhibitoru číslo 10, s objemem erytrocytů 15 µl a substrátem ATCh o koncentraci 2.10^{-4} mol/l v RS.

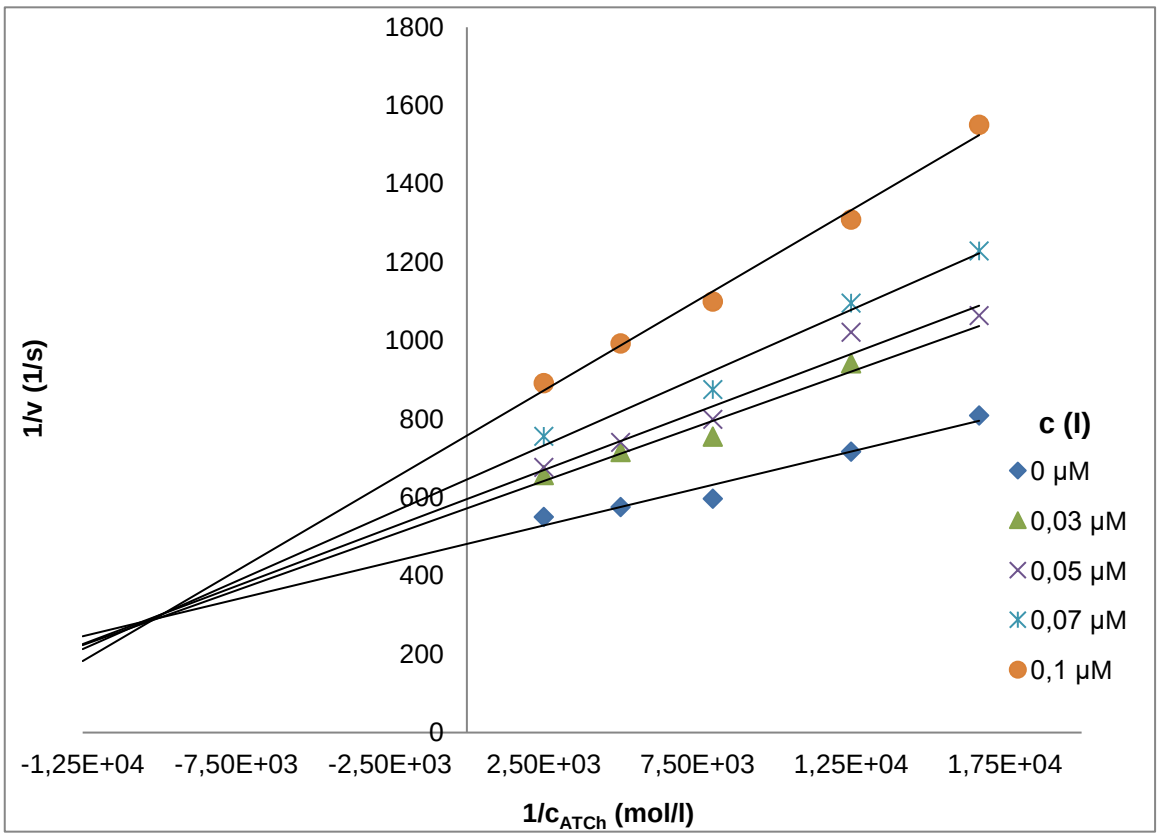
Nejprve byl sestaven graf závislosti změřené absorbance A na čase t. Pro jednotlivé koncentrace inhibitoru byla vypočtena rychlost neinhibované reakce v_0 a reakce inhibované v_i stejným postupem jako v kapitole 4.1 (tedy jako poměr rozdílů absorbancí v čase 26 s a 86 s a v čase 60 s, výsledné hodnoty jednotlivých stanovení byly zprůměrovány). Dále byl sestaven graf dle Lineweavera a Burka závislosti převrácené hodnoty rychlosti reakce 1/v na převrácené hodnotě koncentrací substrátu $1/c_{ATCh}$. Z grafu je možné určit typ inhibice. Z rovnic regrese lze vypočítat K_M a V_{max}. Změny těchto kinetických parametrů vypovídají o typu inhibice (viz tabulka 9). Hodnoty K_M se se zvyšující koncentrací inhibitoru zvyšují, V_{max} naopak klesají (viz tabulka 9) – jedná se

tedy o typ smíšenou inhibici, což je patrné i z grafu dle Lineweavera a Burka (viz graf 3).

K určení typu inhibice slouží i hodnoty poměrů K_M a V_{max}. U akompetitivní inhibice se poměr K_M a V_{max} inhibované reakce v porovnání s neinhibovanou reakcí nemění, u smíšené se tyto poměry u reakce inhibované a neinhibované liší. Hodnoty poměrů uvedené v tabulce v tabulce 9 také vypovídají o smíšeném typu inhibice.

Tabulka 9 Kinetické parametry pro určení typu inhibice inhibitoru číslo 10

c (I) µmol/l	K_M (mol/l)	V_{max} (1/s)	K_M/V_{max}
0	$3{,}93.10^{-5}$	$2{,}08.10^{-3}$	$1{,}89.10^{-2}$
0,03	$4{,}88.10^{-5}$	$1{,}75.10^{-3}$	$2{,}79.10^{-2}$
0,05	$4{,}97.10^{-5}$	$1{,}68.10^{-3}$	$2{,}96.10^{-2}$
0,08	$5{,}36.10^{-5}$	$1{,}55.10^{-3}$	$3{,}46.10^{-2}$
0,1	$6{,}07.10^{-5}$	$1{,}32.10^{-3}$	$4{,}60.10^{-2}$



Graf 3 Závislost dle Lineweavera a Burka pro inhibitor číslo 10

4.5 Stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda a tPSA

4.5.1 Výsledky rozdělovacího koeficientu

Dle postupu v kapitole 3.4.5 byly získány logaritmické hodnoty rozdělovacího koeficientu. V tabulce 10 jsou uvedena data se směrodatnými odchylkami, která byla získána experimentálně a data získaná s využitím počítačových programů ChemDraw a ChemSketch. Hodnoty získané těmito třemi postupy jsou velmi podobné, což ověřuje správné provedení experimentu.

Záporné hodnoty logP vypovídají o hydrofilitě vzorků inhibitorů, tedy dobré rozpustnosti ve vodném prostředí. Díky jejich hydrofilitě budou ale vzorky hůře přecházet přes biologické membrány, budou tedy účinnější na periferii. LogP zároveň charakterizují i lipofilitu inhibitorů – se zvyšující se hodnotou logP se zvyšuje lipofilita látek, tedy jejich prostupnost přes membrány. Nejvyšší hodnoty logP mají inhibitory číslo 6, 5 a 10 (budou tedy nejlépe procházet přes biologické membrány), naopak nejnižších hodnot dosahují inhibitory číslo 1, 2 a 9.

4.5.2 Výsledky tPSA

Hodnoty tPSA uvedené v tabulce 10 byly získány výpočtem v programu ChemDraw. tPSA také vypovídá o hydrofilitě látky a o její prostupnosti přes hematoencefalickou bariéru, či vstřebatelnosti v gastrointestinálním traktu. Z našich získaných dat vyplývá, že inhibitory by mohly dobře procházet přes biologické membrány. Sloučeniny jsou CNS aktivní, pokud je hodnota jejich tPSA menší než 60-70 $Å^2$. Kromě inhibitoru č. 4 tuto podmínky splňují všechny vzorky i standardy. V kapitole 4.5.1 nám však hodnoty logP dokazují, že vzorky inhibitorů jsou hydrofilní a budou pravděpodobně špatně procházet přes biologické membrány. Dle literatury jsou směrodatnější hodnoty logP, proto předpokládáme spíše vyšší účinnost bis(pyridiniových) solí na periferii [179].

Tabulka 10 Hodnoty rozdělovacích koeficientů a tPSA testovaných inhibitorů

inhibitor	logP experiment	logP chemsketch	ClogP chemdraw	tPSA [A^2] chemdraw
rivastigmin	1,21±0,21	2,14	1,401	32,78
galantamin	1,43±0,10	1,74	0,23	41,93
takrin	2,45±0,25	3,32	1,80	0
1	-6,45±0,57	-6,99	-6,04	46,48
2	-5,69±0,41	-5,75	-5,99	53,6
3	-5,20±1,08	-6,10	-3,44	46,48
4	-5,08±0,38	-5,27	-4,46	80,62
5	-2,86±0,39	-2,64	-2,80	6,02
6	-0,72±0,09	-0,65	-0,73	6,02
7	-4,58±0,98	-4,67	-4,92	58,62
8	-3,99±0,25	-4,80	-3,72	24,48
9	-5,86±0,71	-5,73	-5,28	40,16
10	-3,91±0,51	-3,71	-3,86	6,02

5 ZÁVĚR

Experimentální část této diplomové práce se věnuje optimalizaci různých reakčních podmínek pro spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz s využitím DTNA jako chromogenního činidla. Dostatečné odezvy bylo dosaženo při koncentracích substrátu 2.10^{-4} mol/l a 4.10^{-4} mol/l a objemu erytrocytů 15 µl.

Podmínky stanovení s činidlem DTNA byly srovnávány s častěji vyžívaným Ellmanovým činidlem DTNB. U DTNA lze v porovnání s DTNB použít větší objemy erytrocytů (20 a 25 µl) a větší koncentrace substrátu ATCh (8.10^{-4} mol/l), aniž by klesala aktivita enzymu. Při stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce s činidlem DTNA, v porovnání s činidlem DTNB, bylo při stejných objemech přidaných erytrocytů dosaženo vyšších hodnot mezní rychlosti. Hodnoty K_M byly téměř srovnatelné.

Další část této práce se věnuje stanovení inhibičních účinností vybraných deseti vzorků bis(pyridiniových) solí jako potenciálních inhibitorů acetylcholinesterázy z lidských erytrocytů a jejich porovnání se standardními látkami. O účinnosti jednotlivých inhibitorů vypovídá hodnota IC_{50}. Čím je IC_{50} nižší, tím je daný inhibitor účinnější. Nejúčinnější byl inhibitor č. **6** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-benzylpyridin-1-ium). Podobných hodnot dosáhly i inhibitory č. **10** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methylpyridin-1-ium), **5** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-ethylpyridin-1-ium), **8** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium), **2** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-cyanopyridin-1-ium). Nejnižší účinnost při inhibici AChE z lidských erytrocytů vykazoval inhibitor č. **4** (1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-karboxypyridin-1-ium). Žádný inhibitor nebyl účinnější než standard takrin, ale vzorky č. 10 a 6 se mu blížily. Inhibitory č. 8, 5, 10 a 6 byly účinnější než standard galantamin. Všechny inhibitory byly účinnější než rivastigmin.

V další části byl stanovován typ inhibice vzorku inhibitoru č. 10. Podle grafu dle Lineweavera a Burka, kinetických parametrů K_M a V_{max} a jejich vypočtených poměrů se jedná o smíšený typ inhibice.

Posledním cílem experimentální části práce bylo stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných látek v systému *n*-oktanol:voda. Naměřené záporné hodnoty logP vypovídají o hydrofilitě vzorků inhibitorů. Budou tedy hůře

procházet přes biologické membrány, jejich účinnost bude vyšší na periferii. Přes biologické membrány budou pravděpodobně nejlépe procházet inhibitory č. 6, 5 a 10, nejhůře inhibitory č. 1, 2 a 9.

6 ZDROJE

1. Patočka, J.; Strunecká, A.; Řípová, D. Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy nemoci. *Československ. fyziol.* **2001**, *50*, 4–10.
2. Patočka, J. Inhibitory acetylcholinesterasy – od nervových plynů k léčivům Alzheimerovy choroby. *Chem. List.* **1998**, *92*, 1016–1019.
3. Kučera, M.; Hrabovská, A. Molekulové formy cholinesteráz a ich kotviace proteíny. *Chem. List.* **2013**, *107*, 695–700.
4. Brunovský, M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. pro praxi* **2007**, 112–117.
5. Dingová, D.; Hrabovská, A. Metódy stanovenia aktivity cholinesteráz. *Československ. fyziol.* **2015**, *64*, 79–83.
6. Loewi, O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* **1921**, *189*, 239–242.
7. Kostelník, A.; Martínková P.; Čegan, A.; Pohanka, M. Využití cholinesteras v současné diagnostice. *Zprav. Vojen. Zdr.* **2015**, *25*, 20–24.
8. Ferreira-Vieira, T.H.; Guimaraes, I.M.; Silva, F.R.; Ribeiro, F.M. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, *14*, 101–115.
9. Armstrong, D.M.; Saper, C.B.; Levey, A.I.; Wainer, B.H.; Terry, R.D. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: Demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J. Comp. Neurol.* **1983**, *216*, 53–68.
10. Woolf, N.J.; Butcher, L.L. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behav. Brain Res.* **2011**, *221*, 488–498.
11. Misawa, H.; Moriwaki, Y.; Fujii, Y.X.; Fujii, T.; Horiuchi, Y.; Yamada, T.; Imanaka, T.; Kamekura, M. Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci.* **2007**,

80, 2206–2209.

12. Wessler, I.; Kirkpatrick, C.J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1558–1571.

13. Fujii, T.; Takada-Takatori, Y.; Horiguchi, K.; Kawashima, K. Mediatophore regulates acetylcholine release from T cells. *J. Neuroimmunol.* **2012**, *244*, 16–22.

14. Kirkpatrick, C.J.; Bittinger, F.; Nozadze, K.; Wessler, I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells. *Life Sci.* **2003**, *72*, 2111–2116.

15. Rodriguez-Diaz, R.; Dando, R.; Jacques-Silva, M.C.; Fachado, A.; Molina, J.; Abdulreda, M.H.; Ricordi, C.; Roper, S.D.; Berggren, P.-O.; Caicedo, A. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 888–892.

16. Dunant, Y.; Gisiger, V.; Dunant, Y.; Gisiger, V. Ultrafast and Slow Cholinergic Transmission. Different Involvement of Acetylcholinesterase Molecular Forms. *Molecules* **2017**, *22*, 1300–1315.

17. Katz, B. Looking back at the neuromuscular junction. *Neuromuscul. Junction* **1989**, 3–9.

18. Pepeu, G.; Giovannini, M.G.; Bracco, L. Effect of cholinesterase inhibitors on attention. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 361–364.

19. Bracco, L.; Bessi, V.; Padiglioni, S.; Marini, S.; Pepeu, G. Do Cholinesterase Inhibitors Act Primarily on Attention Deficit? A Naturalistic Study in Alzheimer's Disease Patients. *J. Alzheimer's Dis.* **2014**, *40*, 737–742.

20. Blokland, A.; Honig, W.; Raaijmakers, W.G.M. Effects of intra-hippocampal scopolamine injections in a repeated spatial acquisition task in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* **1992**, *109*, 373–376.

21. Winters, B.D.; Bussey, T.J. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 2263–2270.

22. Power, A.E.; Vazdarjanova, A.; McGaugh, J.L. Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2003**, *80*, 178–193.

23. Boccia, M..; Acosta, G..; Blake, M..; Baratti, C.. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* **2004**, *124*, 735–741.

24. Boccia, M.M.; Blake, M.G.; Baratti, C.M.; McGaugh, J.L. Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2009**, *91*, 93–97.

25. Boccia, M.M.; Blake, M.G.; Acosta, G.B.; Baratti, C.M. Atropine, an anticholinergic drug, impairs memory retrieval of a high consolidated avoidance response in mice. *Neurosci. Lett.* **2003**, *345*, 97–100.

26. Jasper, H.H.; Tessier, J. Acetylcholine Liberation from Cerebral Cortex during Paradoxical (REM) Sleep. *Science.* **1971**, *172*, 601–602.

27. Baghdoyan, H.A.; Rodrigo-Angulo, M.L.; McCarley, R.W.; Hobson, J.A. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.* **1984**, *306*, 39–52.

28. Metherate, R.; Cox, C.L.; Ashe, J.H. Cellular bases of neocortical activation: modulation of neural oscillations by the nucleus basalis and endogenous acetylcholine. *J. Neurosci.* **1992**, *12*, 4701–4711.

29. Paez-Gonzalez, P.; Asrican, B.; Rodriguez, E.; Kuo, C.T. Identification of distinct ChAT+ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **2014**, *17*, 934–942.

30. Pohanka, M. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2219–2238.

31. Rosas-Ballina, M.; Tracey, K.J. Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* **2009**, *265*, 663–679.

32. Pohanka, M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 9809–9825.

33. Silva-Herdade, A.S.; Saldanha, C. Effects of acetylcholine on an animal mode of inflammation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2013**, *53*, 209–216.

34. Ganong, W.F. *Přehled lékařské fyziologie*; 20. vydání.; Galén: Praha, **2005**; ISBN 8072623117.

35. Bohlen und Halbach, O. von.; Dermietzel, R. *Neurotransmitters and neuromodulators : handbook of receptors and biological effects*; Wiley-VCH: Weinheim, **2006**; ISBN 3527313079.

36. Augustinsson, K.B.; Nachmansohn, D. Distinction between Acetylcholine-Esterase and Other Choline Ester-splitting Enzymes. *Science* **1949**, *110*, 98–99.

37. Hall, Z.W. Multiple forms of acetylcholinesterase and their distribution in endplate and non-endplate regions of rat diaphragm muscle. *J. Neurobiol.* **1973**, *4*, 343–361.

38. McMahan, U.J.; Sanes, J.R.; Marshall, L.M. Cholinesterase is associated with the basal lamina at the neuromuscular junction. *Nature* **1978**, *271*, 172–174.

39. Cooper, E.; Couturier, S.; Ballivet, M. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **1991**, *350*, 235–238.

40. Nai, Q.; McIntosh, J.M.; Margiotta, J.F. Relating neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes defined by subunit composition and channel function. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 311–324.

41. Role, L.W.; Berg, D.K. Nicotinic Receptors in the Development and Modulation of CNS Synapses. *Neuron* **1996**, *16*, 1077–1085.

42. Luetje, C.W.; Patrick, J. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 837–845.

43. Chavez-Noriega, L.E.; Crona, J.H.; Washburn, M.S.; Urrutia, A.; Elliott, K.J.; Johnson, E.C. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h

alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in Xenopus oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 346–356.

44. Nathanson, N.M. A multiplicity of muscarinic mechanisms: enough signaling pathways to take your breath away. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6245–6247.

45. Kubo, T.; et al. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett.* **1986**, *209*, 367–372.

46. Bonner, T.I.; Buckley, N.J.; Young, A.C.; Brann, M.R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **1987**, *237*, 527–532.

47. Hammer, R.; Berrie, C.P.; Birdsall, N.J.; Burgen, A.S.; Hulme, E.C. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **1980**, *283*, 90–92.

48. Caulfield, M.P.; Birdsall, N.J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 279–290.

49. Egan, T.M.; North, R.A. Acetylcholine hyperpolarizes central neurones by acting on an M2 muscarinic receptor. *Nature* **1986**, *319*, 405–407.

50. Ehlert, F.J.; Delen, F.M.; Yun, S.H.; Tran, P. Differential coupling of subtypes of the muscarinic receptor to signaling mechanisms in brain and peripheral tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, *287*, 301–312.

51. Kudo, Y.; Ogura, A.; Iijima, T. Stimulation of muscarinic receptor in hippocampal neuron induces characteristic increase in cytosolic free Ca2+ concentration. *Neurosci. Lett.* **1988**, *85*, 345–350.

52. Brown, D.A.; Selyanko, A.A. Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion. *J. Physiol.* **1985**, *365*, 365–387.

53. Krnjević, K.; Pumain, R.; Renaud, L. The mechanism of excitation by acetylcholine in the cerebral cortex. *J. Physiol.* **1971**, *215*, 247–268.

54. Levey, A.I.; Kitt, C.A.; Simonds, W.F.; Price, D.L.; Brann, M.R. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* **1991**, *11*, 3218–3226.

55. Mrzljak, L.; Levey, A.I.; Goldman-Rakic, P.S. Association of m1 and m2 muscarinic receptor proteins with asymmetric synapses in the primate cerebral cortex: morphological evidence for cholinergic modulation of excitatory neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5194–5198.

56. Porter, A.C.; Bymaster, F.P.; DeLapp, N.W.; Yamada, M.; Wess, J.; Hamilton, S.E.; Nathanson, N.M.; Felder, C.C. M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res.* **2002**, *944*, 82–89.

57. Douglas, C.L.; Baghdoyan, H.A.; Lydic, R. M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in prefrontal cortex of C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 960–966.

58. Segal, M. Presynaptic cholinergic inhibition in hippocampal cultures. *Synapse* **1989**, *4*, 305–312.

59. Van der Zee, E..; Luiten, P.G.. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog. Neurobiol.* **1999**, *58*, 409–471.

60. Patocka, J.; Kuca, K.; Jun, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. *Acta medica (Hradec Kral).* **2004**, *47*, 215–228.

61. Giacobini, E. Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Drugs Aging* **2001**, *18*, 891–898.

62. Çokuğraş, A.N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turkish J. Biochem.* **2003**, *28*, 54–61.

63. Liston, D.R.; Nielsen, J.A.; Villalobos, A.; Chapin, D.; Jones, S.B.; Hubbard, S.T.; Shalaby, I.A.; Ramirez, A.; Nason, D.; White, W.F.

Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *486*, 9–17.

64. Manoharan, I.; Boopathy, R.; Darvesh, S.; Lockridge, O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta* **2007**, *378*, 128–135.

65. Pavliš, O.; Pohanka, M. Rozdělení inhibitorů cholinesteráz. *Zprav. Vojen. Zdr.* **2013**, *23*, 32–36.

66. Allison Granberry Image:AChE-Page-schematic-gorge.jpg Available online: https://proteopedia.org/wiki/index.php/Image:AChE-Page-schematic-gorge.jpg (accessed on Apr 3, 2019).

67. Pohanka, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 871–886.

68. Pohanka, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratisl. Lek. Listy* **2013**, *114*, 726–734.

69. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219–223.

70. Potter, P.E.; Hadjiconstantinou, M.; Meek, J.L.; Neff, N.H. Measurement of Acetylcholine Turnover Rate in Brain: An Adjunct to a Simple HPLC Method for Choline and Acetylcholine. *J. Neurochem.* **1984**, *43*, 288–290.

71. Zhang, X.J.; Yang, L.; Zhao, Q.; Caen, J.P.; He, H.Y.; Jin, Q.H.; Guo, L.H.; Alemany, M.; Zhang, L.Y.; Shi, Y.F. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ.* **2002**, *9*, 790–800.

72. Thullbery, M.D.; Cox, H.D.; Schule, T.; Thompson, C.M.; George, K.M. Differential localization of acetylcholinesterase in neuronal and non-neuronal cells. *J. Cell. Biochem.* **2005**, *96*, 599–610.

73. Atack, J.R.; Perry, E.K.; Bonham, J.R.; Candy, J.M.; Perry, R.H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.* **1986**, *47*, 263–277.

74. Gross, M.B.; McKusick, V.A. Acetylcholinesterase; AChE. *OMIM* 2011.

75. Massoulié, J. The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *Neurosignals* **2002**, *11*, 130–143.

76. Massoulié, J.; Bon, S.; Perrier, N.; Falasca, C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157–158*, 3–14.

77. Sikorav, J.L.; Duval, N.; Anselmet, A.; Bon, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Osterlund, M.; Reimund, B.; Massoulié, J. Complex alternative splicing of acetylcholinesterase transcripts in Torpedo electric organ; primary structure of the precursor of the glycolipid-anchored dimeric form. *EMBO J.* **1988**, *7*, 2983–2993.

78. Valle, A.M.; Radic, Z.; Rana, B.K.; Mahboubi, V.; Wessel, J.; Shih, P.B.; Rao, F.; O'Connor, D.T.; Taylor, P. Naturally occurring variations in the human cholinesterase genes: heritability and association with cardiovascular and metabolic traits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338*, 125–133.

79. Lockridge, O.; Norgren, R.B.; Johnson, R.C.; Blake, T.A.; Blake, T.A. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 1381–1392.

80. Darvesh, S.; Hopkins, D.A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.

81. Lockridge, O.; Masson, P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology 21*, 113–126.

82. Appleyard, M.E.; McDonald, B. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimer type. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1992**, *55*, 1074–1078.

83. Abbott, C.A.; Mackness, M.I.; Kumar, S.; Olukoga, A.O.; Gordon, C.; Arrol, S.; Bhatnagar, D.; Boulton, A.J.; Durrington, P.N. Relationship

between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridaemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clin. Sci. (Lond).* **1993**, *85*, 77–81.

84. Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E.; Johnson, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 549–557.

85. McAlpine, P.J.; Dixon, M.; Allderdice, P.W.; Lockridge, O.; La Du, B.N. The butyrylcholinesterase gene (BChE) at 3q26.2 shows two RFLPs. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5088.

86. Arpagaus, M.; Kott, M.; Vatsis, K.P.; Bartels, C.F.; La Du, B.N.; Lockridge, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* **1990**, *29*, 124–131.

87. Consortium, E.A.; et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. Nature **2016**, *536*, 285-291.

88. 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*, 4997–5005.

89. Brimijoin, S.; Chen, V.P.; Pang, Y.-P.; Geng, L.; Gao, Y. Physiological roles for butyrylcholinesterase: A BChE-ghrelin axis. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *259*, 271–275.

90. Tong, J.; Prigeon, R.L.; Davis, H.W.; Bidlingmaier, M.; Kahn, S.E.; Cummings, D.E.; Tschöp, M.H.; D'Alessio, D. Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* **2010**, *59*, 2145–2151.

91. Tschöp, M.; Smiley, D.L.; Heiman, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **2000**, *407*, 908–913.

92. Kirchner, H.; Heppner, K.M.; Tschöp, M.H. The Role of Ghrelin in the Control of Energy Balance. In; Springer, Berlin, Heidelberg, **2012**, 209, 161–184.

93. Walpole, C.; Seim, I.; Cunningham, P.; Murray, R.; Whiteside, E.; Josh, P. Ghrelin and cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *340*, 65–69.

94. Gahete, M.D.; Córdoba-Chacón, J.; Kineman, R.D.; Luque, R.M.; Castaño, J.P. Role of ghrelin system in neuroprotection and cognitive functions: implications in Alzheimer's disease. *Peptides* **2011**, *32*, 2225–2228.

95. Brimijoin, S.; Tye, S. Favorable Impact on Stress-Related Behaviors by Modulating Plasma Butyrylcholinesterase. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38*, 7–12.

96. Hroudová, J. Aktuální možnosti a nové naděje farmakoterapie Alzheimerovy nemoci. *ZN plus* **2017**, *66*, 6–8.

97. Sikora, J.; Fišar, Z.; Petrovický, P.; Jirák, R. *Biologické podklady psychických poruch*; Galén: Praha, **1997**; ISBN 8085824620.

98. Villarroya, M.; García, A.G.; Marco, J.L. New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 3177–3184.

99. Matoušek, J.; Bajgar, J. Extrémně toxické nízkomolekulární syntetické jedy.; VLVDÚ JEP: Hradec Králové, **1979**, 151.

100. Jirák, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2004**, *18*, 212–214.

101. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol. Res.* **2004**, *50*, 433–440.

102. Summers, W.K.; Majovski, L.V.; Marsh, G.M.; Tachiki, K.; Kling, A. Oral Tetrahydroaminoacridine in Long-Term Treatment of Senile Dementia, Alzheimer Type. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 1241–1245.

103. Patocka, J.; Bajgar, J.; Bielavsky, J.; Fusek, J. Kinetics of inhibition of cholinesterases by 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine in vitro. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 816–824.

104. Patocka, J.; Fusek, J. Tacrine in Alzheimer's disease. *Homeost. Health Dis.* **1991**, *33*, 161.

105. Davis, K.L.; Powchick, P. Tacrine. *Lancet* **1995**, *345*, 625–630.

106. Wu, W.-Y.; Dai, Y.-C.; Li, N.-G.; Dong, Z.-X.; Gu, T.; Shi, Z.-H.; Xue, X.;

Tang, Y.-P.; Duan, J.-A. Novel multitarget-directed tacrine derivatives as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 572–587.

107. Cheng, D.H.; Tang, X.C. Comparative Studies of Huperzine A, E2020, and Tacrine on Behavior and Cholinesterase Activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1998**, *60*, 377–386.

108. Cheewakriengkrai, L.; Gauthier, S. A 10-year perspective on donepezil. *Expert Opin. Pharmacother.* **2013**, *14*, 331–338.

109. Bai, D.L.; Tang, X.C.; He, X.C. Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 355–374.

110. Bond, M.; et al. The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of Alzheimer's disease (review of Technology Appraisal No. 111): a systematic review and economic model. *Health Technol. Assess.* **2012**, *16*, 460–470.

111. Heinrich, M.; Lee Teoh, H. Galanthamine from snowdrop—the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *92*, 147–162.

112. Rainer, M. Galanthamine in Alzheimer's disease: a new alternative to tacrine? *CNS Drugs* **1997**, *7*, 89–97.

113. Lilienfeld, S. Galantamine - a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. *CNS Drug Rev.* **2006**, *8*, 159–176.

114. Woodruff-Pak, D.S.; Vogel, R.W.; Wenk, G.L.; Wenk, G.L. Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 2089–2094.

115. Kuca, K.; Pohanka, M. Chemical warfare agents. *EXS* **2010**, *100*, 543–558.

116. Drachman, D.A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* **1977**, *27*, 783–790.

117. Keesey, J.C. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. *Muscle Nerve* **2004**, *29*, 484–505.

118. Darreh-Shori, T.; Soininen, H. Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review of recent clinical studies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, *7*, 67–73.

119. Kandiah, N.; Pai, M.-C.; Senanarong, V.; Looi, I.; Ampil, E.; Park, K.W.; Karanam, A.K.; Christopher, S. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin. Interv. Aging* **2017**, *12*, 697–707.

120. Field, R.H.; Gossen, A.; Cunningham, C. Prior pathology in the basal forebrain cholinergic system predisposes to inflammation-induced working memory deficits: reconciling inflammatory and cholinergic hypotheses of delirium. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 6288–6294.

121. Tayeb, H.O.; Yang, H.D.; Price, B.H.; Tarazi, F.I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 8–25.

122. Weinreb, O.; Amit, T.; Bar-Am, O.; Youdim, M.B.H. Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β-amyloid in ageing and Alzheimer's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *173*, 2080–2094.

123. Rakonczay, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol. Hung.* **2003**, *54*, 183–189.

124. Pidrman, V.; Látalová, K. Inhibitory cholinesteráz v léčbě demence – jejich bezpečnost a možná úskalí. *Interní med.* **2003**, *5*, 18–22.

125. Annweiler, C.; Fantino, B.; Parot-Schinkel, E.; Thiery, S.; Gautier, J.; Beauchet, O. Alzheimer's disease - input of vitamin D with memantine assay (AD-IDEA trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **2011**, *12*, 230-240.

126. Gilhus, N.E.; Kerty, E.; Løseth, S.; Mygland, Å.; Tallaksen, C. Myasthenia gravis – diagnostikk og behandling. *Tidsskr. Den Nor. legeforening* **2016**, *136*, 1089–1094.

127. Kobzanová, R. Myasthenia gravis. *Temp. medicor.* **2011**, *20*, 28–29.

128. Dingova, D.; Leroy, J.; Check, A.; Garaj, V.; Krejci, E.; Hrabovska, A. Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: Modifications to the standard Ellman's assay. *Anal. Biochem.* **2014**, *462*, 67–75.

129. Randell, E.W.; Mathews, M.S.; Zhang, H.; Seraj, J.S.; Sun, G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 799–805.

130. Dzúrik, R. *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*; 2. vydanie.; Osveta: Žilina, **1996**; ISBN 8021702567.

131. Brestkin, A.P.; Rozengart, E. V; Abduvakhabov, A.A.; Sadykov, A.A. Carboxylic Acid Esters as Substrates of Cholinesterases. *Russ. Chem. Rev.* **1983**, *52*, 931–943.

132. Abduvakhabov, A.A.; Azlyarova, M.A.; Brestkin, A.P.; Maizel, E.B.; Rozengart, E. V.; Sadykov, A.A.; Sadykov, A.S. Iodomethylates of β-(N-morpholino- and N-pipecolino) ethyl esters of carboxylic acids as substrates of cholinesterase. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **1983**, *32*, 2227–2231.

133. Abdallah, C.; Udomtecha, D. Pseudocholinesterase activity: determination and interpretation in pediatric anesthesia. *Middle East J. Anaesthesiol.* **2007**, *19*, 423–428.

134. Ramsay, R.R.; Tipton, K.F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* **2017**, *22*, 1192-1238.

135. Bajgar, J. Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojen. Zdrav. Listy* **1972**, *41*, 78–80.

136. Jong, C.F. de; Derks, R.J.E.; Bruyneel, B.; Niessen, W.; Irth, H. High-performance liquid chromatography–mass spectrometry-based

acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 303–310.

137. Frankfort, S. V.; Ouwehand, M.; van Maanen, M.J.; Rosing, H.; Tulner, L.R.; Beijnen, J.H. A simple and sensitive assay for the quantitative analysis of rivastigmine and its metabolite NAP 226-90 in human EDTA plasma using coupled liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3330–3336.

138. Walker, J.P.; Asher, S.A. Acetylcholinesterase-Based Organophosphate Nerve Agent Sensing Photonic Crystal. **2005**, *77*, 1596-1600.

139. Frady, C.H.; Knapp, S.E. A radioisotopic assay of acetylcholinesterase in Fasciola hepatica. *J. Parasitol.* **1967**, *53*, 298–302.

140. Reed, D.J.; Goto, K.; Wang, C.H. A direct radioisotopic assay for acetylcholinesterase. *Anal. Biochem.* **1966**, *16*, 59–64.

141. Winteringham, F.P.W.; Disney, R.W. Radiometric Assay of Acetylcholinesterase. *Nature* **1962**, *195*, 1303–1303.

142. Guilarte, T.R.; Donald Burns, H.; Dannals, R.F.; Wagner, H.N. A Simple Radiometric In Vitro Assay for Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 90–92.

143. Potter, L.T. A radiometric microassay of acetlycholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1967**, *156*, 500-506.

144. Miao, Y.; He, N.; Zhu, J.-J. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5216–5234.

145. Johnson, C.D.; Russell, R.L. A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 229–238.

146. Gordon, R.K.; Doctor, B.P.; Chiang, P.K. A radioactive assay for acetylcholinesterase using anion-exchange disk. *Anal. Biochem.* **1982**, *124*, 333–337.

147. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*,

1207–1223.

148. Pohanka, M.; Hrabinova, M.; Kuca, K.; Simonato, J.-P. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2631–2640.

149. Aldridge, W.N.; Davies, D.R. Determination of cholinesterase activity in human blood. *Br. Med. J.* **1952**, *1*, 945–947.

150. Michel, H.O. Electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **1949**, *34*, 1564–1568.

151. Ellin, R.I.; Burkhardt, B.H.; Hart, R.D. A time-modified method for measuring red blood cell cholinesterase activity. *Arch. Environ. Health* **1973**, *27*, 48–49.

152. Wang, R.I. Determining cholinesterase activity in human plasma. Simple test-strip method. *JAMA* **1963**, *183*, 792–794.

153. Koelle, G.B.; Friedenwald, J.S. A Histochemical Method for Localizing Cholinesterase Activity. *Exp. Biol. Med.* **1949**, *70*, 617–622.

154. Naik, N.T. Technical Variations in Koelle's Histochemical Method for Demonstrating Cholinesterase Activity. *Q. J. Microsc. Sci.* **1963**, *104*, 89–100.

155. Karnovsky, M.J.; Roots, L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.* **1964**, *12*, 219–221.

156. Tago, H.; Kimura, H.; Maeda, T. Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J. Histochem. Cytochem.* **1986**, *34*, 1431–1438.

157. George, K.M.; Schule, T.; Sandoval, L.E.; Jennings, L.L.; Taylor, P.; Thompson, C.M. Differentiation between acetylcholinesterase and the organophosphate-inhibited form using antibodies and the correlation of antibody recognition with reactivation mechanism and rate. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 45512–45518.

158. Hrabovska, A.; Bernard, V.; Krejci, E. A novel system for the efficient

generation of antibodies following immunization of unique knockout mouse strains. *PLoS One* **2010**, *5*, 12892-12899.

159. Mrvova, K.; Obzerova, L.; Girard, E.; Krejci, E.; Hrabovska, A. Monoclonal antibodies to mouse butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *203*, 348–353.

160. Huang, X.; Lee, B.; Johnson, G.; Naleway, J.; Guzikowski, A.; Dai, W.; Darzynkiewicz, Z. Novel Assay Utilizing Fluorochrome-Tagged Physostigmine (Ph-F) to In Situ Detect Active Acetylcholinesterase (AChE) Induced during Apoptosis. *Cell Cycle.* **2005**, *4*, 140–147.

161. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.

162. Pohanka, M.; Vlček, V.; Žďárová Karasová, J.; Kuča, K.; Cabal, J. Kolorimetrické detektory založené na acetylcholinesterase a jejich konstrukce. *Vojen. Zdrav. Listy* **2010**, *79*, 9–14.

163. Karasová, J.Ž.; Kuča, K.; Jun, D.; Bajgar, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesterás při in vivo hodnocení účinku reaktivátorů. *Chem. List.* **2010**, *104*, 46–50.

164. Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology.* **2008**, *243*, 311–316.

165. George, P.M.; Abernethy, M.H. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin. Chem.* **1983**, *29*, 365-368.

166. Jiménez-Díaz, M.; Martínez-Monge, V. Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Rev. Biomédica.* **2000**, *11*, 161–168.

167. Rodriguez-Mozaz, S.; Marco, M.-P.; de Alda, M.J.L.; Barceló, D. Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 723–752.

168. Ceron, J.J.; Fernandez Del Palacio, M.J.; Bernal, L.J.; Gutierrez, C.

Automated spectrophotometric method using 2,2'-dithiodipyridine acid for determination of cholinesterase in whole blood. *J. AOAC Int.* **1996**, *79*, 757–763.

169. Tecles, F.; Panizo, C.G.; Subiela, S.M.; Cerón, J.J. Effects of Different Variables on whole Blood Cholinesterase Analysis in Dogs. *J. Vet. Diagnostic Investig.* **2002**, *14*, 132–139.

170. Augustinsson, K.B.; Eriksson, H. The effects of two disulphides on cholinesterase activity in the spectrophotometric assay. *Biochem. J.* **1974**, *139*, 123–127.

171. Hiroaki, O.; Kazuyo, S.; Nobuyuki, N.; Akio, N. New enzymatic assay of cholinesterase activity. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *80*, 87–94.

172. Main, A.R.; Miles, K.E.; Braid, P.E. The determination of human-serum-cholinesterase activity with o-nitrophenyl butyrate. *Biochem. J.* **1961**, *78*, 769–776.

173. Pavlov, V.; Xiao, Y.; Willner, I. Inhibition of the Acetycholine Esterase-Stimulated Growth of Au Nanoparticles: Nanotechnology-Based Sensing of Nerve Gases. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 649–653.

174. Komers, K. *Biofyzikální chemie (vybrané kapitoly)*; 1. edition.; Univerzita Pardubice: Pardubice, **2003**; ISBN 80-7194-534-X.

175. Kodíček, M. *Biochemické pojmy výkladový slovník*; Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, **2004**; ISBN 9788070805510.

176. Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341.

177. Hitchcock, S.A.; Pennington, L.D. Structure−Brain Exposure Relationships. *Med. Chem. (Los. Angeles).* **2006**, *49*, 7559–7583.

178. Kelder, J.; Grootenhuis, P.D.J.; Bayada, D.M.; Delbressine, L.P.C.; Ploemen, J. Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. *Pharm. Res.* **1999**, *16*, 1514–1519.

179. Zhong, H.A.; Mashinson, V.; Woolman, T.A.; Zha, M. Understanding the

molecular properties and metabolism of top prescribed drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1290–1307.