

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Vliv reakčních podmínek na aktivitu enzymu  
a inhibiční koncentraci

Bc. Klára Faltusová

Diplomová práce

2019

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Effect of reaction conditions on enzyme activity  
and inhibitory concentration

Bc. Klára Faltusová

Thesis

2019

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

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Faltusová**  
Osobní číslo: **C17433**  
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Bioanalytik**  
Název tématu: **Vliv reakčních podmínek na aktivitu enzymu a inhibiční koncentraci**  
Zadávací 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 odebrané vzorky lidské krve a upravit je do podoby vhodné pro další stanovení.
2. Testovat různé reakční podmínky za účelem získání optimálních podmínek pro měření aktivity lidských cholinesteráz pomocí sledování změny pH.
3. Stanovit inhibiční účinnosti standardních látek na lidskou acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu.
4. Porovnat metodu změny pH s titrační pH-statovou metodou.
5. Stanovit rozdělovací koeficient 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

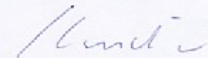
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, 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 jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

V Pardubicích dne:

Klára Faltusová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala Mgr. Kataríně Vorčákové, PhD. a Mgr. Šárce Štěpánkové, PhD. za jejich odborné vedení, cenné rady, pomoc při měření v laboratoři, a za čas, který mi věnovaly v průběhu celé diplomové práce.

Děkuji také své rodině a přátelům za veškerou podporu během studia.

# ANOTACE

Tématem této práce byl vliv reakčních podmínek na aktivitu enzymu a inhibiční koncentraci.

Teoretická část je věnována cholinesterázám a jejich inhibitorům. Zabývá se popisem struktury cholinesteráz, jejich funkcí a mechanismem katalytického působení a možnostmi ovlivnění jejich aktivity na různých úrovních. Dále je zde popsána řada onemocnění souvisejících s cholinesterázami a v poslední řadě také jednotlivé analytické metody pro stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

V experimentální části se práce zabývá testováním různých reakčních podmínek za účelem získání optimálních podmínek pro měření aktivity lidských cholinesteráz pomocí sledování změny pH. Práce porovnává metodu měření změny pH s titrační pH-statovou metodou a je také věnována stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v systému *n*-oktanol:voda.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, Alzheimerova choroba, metody stanovení, pH-stat, pH-metr

## **ANNOTATION**

The aim of this work was evaluating of the influence of reaction conditions on enzyme activity and inhibitory concentration.

The theoretical part describes cholinesterases and their inhibitors. It deals with the description of the structure of cholinesterases, their function and mechanism of catalytic action and the possibility of influencing their activity at different levels. Furthermore, a number of cholinesterase-related diseases are described, as well as individual analytical methods for determining cholinesterase activity and inhibition.

In the experimental part, the thesis deals with testing of different reaction conditions in order to obtain optimal conditions for measurement of human cholinesterase activity by monitoring pH change. The work also compare the pH change method with the pH-stat titration. At last, the partition coefficient of tested inhibitors in the n-octanol: water system was established.

## **KEY WORDS**

Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors, Alzheimer's disease, assay methods, pH – stat, pH-meter



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease)
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
ATCh	acetylthiocholin
BChE	butyrylcholinesteráza
CAT	cholinacetyltransferáza
DLB	demence s Lewyho tělísky
DS	Downův syndrom
HAc	kyselina octová
ChE	cholinesteráza
ChE-Is	inhibitory cholinesteráz (Cholinesterase Inhibitors)
ChO	cholinoxidáza
IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu
K <sub>ow</sub>	rozdělovací koeficient
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's Disease)
PSA	polární povrch molekuly
RS	reakční směs
tPSA	topologický polární povrch molekuly
VD	vaskulární demence

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Strukturní vzorce popsaných léků.....	19
Obrázek 2	Automatický titrátor 799 GPT Titrimo .....	36
Obrázek 3	pH/ORP metr HI3220.....	37
Obrázek 4	pH kombinovaná elektroda BA 25.....	37
Obrázek 5	Princip titrační metody stanovení aktivity/inhibice AChE .....	39

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Vzorový výpočet hodnoty $IC_{50}$ pro inhibitor takrin, substrát ACh a enzym AChE, metoda pH-metr (graf 5) .....	55
Tabulka 2 Hodnoty inhibiční koncentrace testovaných inhibitorů získané metodou pH-metr .....	55
Tabulka 3 Hodnoty $IC_{50}$ testovaných inhibitorů získané metodou pH-stat .....	56
Tabulka 4 Experimentální a teoretické hodnoty rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě <i>n</i> -oktanol:voda při laboratorní teplotě .....	57
Tabulka 5 Teoretické hodnoty topologického polárního povrchu molekuly testovaných inhibitorů .....	58

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrací acetylcholinu a množství erytrocytů v reakční směsi pro metodu pH-metr .....	46
Graf 2 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrací butyrylcholinu a množství plazmy v reakční směsi pro metodu pH-metr .....	48
Graf 3 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrace acetylcholinu a množství erytrocytů v reakční směsi pro metodu pH-stat .....	50
Graf 4 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrace butyrylcholinu a množství plazmy v reakční pro metodu pH-stat.....	52
Graf 5 Závislost $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I] pro inhibovanou hydrolýzu ACh katalyzovanou AChE a inhibovanou takrinem, metoda pH-metr.....	54
Graf 6 Závislost $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I] pro inhibovanou hydrolýzu BCh katalyzovanou BChE a inhibovanou galantaminem, metoda pH-metr .....	54
Graf 7 Příklad vyhodnocení inhibiční účinnosti rivastigminu na lidskou AChE, metoda pH-stat .....	56

# Obsah

<b>ÚVOD .....</b>	<b>14</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 ACETYLCHOLIN .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 CHOLINESTERÁZY .....</b>	<b>15</b>
1.2.1 Molekulární formy cholinesteráz .....	16
1.2.2 Acetylcholinesteráza .....	16
1.2.3 Butyrylcholinesteráza .....	17
<b>1.3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ .....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Typy inhibic .....	20
1.3.2 Rivastigmin .....	21
1.3.3 Galantamin .....	22
1.3.4 Donepezil .....	23
1.3.5 Takrin .....	23
1.3.6 Methansulfonylchlorid .....	24
<b>1.4 ONEMOCNĚNÍ SPOJENÉ S CHOLINESTERÁZAMI .....</b>	<b>24</b>
1.4.1 Alzheimerova choroba .....	24
1.4.2 Parkinsonova choroba .....	25
1.4.3 Demence s Lewyho tělísky .....	26
1.4.4 Vaskulární demence .....	26
1.4.5 Downův syndrom .....	26
<b>1.5 METODY STANOVENÍ .....</b>	<b>27</b>
1.5.1 Manometrické metody .....	28
1.5.2 Optické metody .....	28
1.5.3 Elektrochemické metody .....	30
1.5.4 Hmotnostní spektrometrie .....	32
1.5.5 Radioizotopové metody .....	32
1.5.6 Biosenzory .....	32
<b>2 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 POMŮCKY .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Použité chemikálie a roztoky .....	35
3.1.2 Laboratorní technika .....	36
<b>3.2 METODY .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Zpracování čerstvě odebraných vzorků lidské krve .....	37
3.2.2 Měření aktivity lidských ChE .....	38
3.2.3 Stanovení inhibiční účinnosti standardních látek při inhibici lidské AChE a BChE .....	40
3.2.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v systému n-oktanol:voda ..	43
<b>4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>45</b>
4.1.1 Měření aktivity lidských ChE .....	45
4.1.2 Stanovení inhibiční účinnosti standardních látek při inhibici lidské AChE a BChE .....	53
4.1.3 Stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v systému n-oktanol:voda a tPSA .....	57
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>CITOVANÁ LITERATURA .....</b>	<b>60</b>

## ÚVOD

Mozek savců obsahuje dvě hlavní formy cholinesteráz (ChE): acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BChE). Tyto dvě formy se liší geneticky, strukturálně a také kineticky [1].

Cholinesterázy je obecný termín používaný pro skupinu příbuzných enzymů, které za optimálních podmínek hydrolyzují estery cholinu rychleji než jiné estery. Jsou to serinové hydrolázy, které patří do esterázové rodiny v rámci vyšších eukaryot. Tato rodina působí na různé typy karboxylových esterů. Serinové hydrolázy a proteázy jsou všudypřítomnou skupinou enzymů, která je základem mnoha kritických životních funkcí. Lidské tkáně mají dvě odlišné ChE: AChE a BChE. AChE působí při přenosu nervových impulzů, zatímco fyziologická funkce BChE zůstává neznámá [2].

Demence je jedním z nejvýznamnějších zdravotních problémů spojených se stárnutím populace. Pouze minimální procento demencí je v současné době kauzálně léčeno. Terapie u většiny případů spočívá v symptomatické léčbě s cílem zlepšení kognitivních a nekognitivních funkcí [3].

Hlavní roli v etiopatogenezi demence hraje narušení acetylcholinové transmise. Léčba demence je komplexním procesem, vyžadujícím použití moderní farmakoterapie a včasnou a cílenou rehabilitaci a resocializaci. Čím dříve je demence diagnostikována, a léčba zahájena, tím pozitivnější výsledky lze očekávat. Léky první volby při léčbě demencí jsou inhibitory cholinesteráz (ChE-Is). Primární terapeutický efekt ChE-Is se zakládá na navýšení nabídky acetylcholinu (ACh) a tím cholinergní transmise v centrální nervové soustavě. Inhibitory tohoto dosahují tím, že blokují katabolické enzymy – AChE a BChE a tím dochází k zamezení či snížení katabolizmu ACh [4].

Stanovení aktivity AChE a BChE se stalo důležitým nástrojem při navrhování a objevování léčiv a také v medicíně a toxikologii. Existuje velké množství sloučenin, které jsou schopny modulovat aktivitu ChE. Tyto sloučeniny mohou být použity pro farmakologickou léčbu různých poruch - např. Alzheimerova choroba (AD) a Myasthenia gravis. Kromě toho je testem aktivity ChE často diagnostikována otrava organofosfátem [5].

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 ACETYLCHOLIN

Acetylcholin se vytváří v cholinergních neuronech z ko-substrátů cholinu a acetyl-koenzymu A reakcí katalyzovanou enzymem cholinacetyltransferázou (CAT) [6].

Je to běžný neurotransmitter, který se nachází v centrálním a periferním nervovém systému. Když se ACh uvolní z konce axonu, přestupuje přes synaptickou štěrbinu, aby se navázal na receptor na druhé straně synapse. V periferním nervovém systému se nachází na „neurosvalovém spojení“, kde působí jako regulátor svalové kontrakce. ACh je také přítomen v autonomním nervovém systému. Jeho intracelulární účinky jsou zprostředkovány aktivací nikotinových a muskarinových acetylcholinových receptorů. Jeho rychlou hydrolýzou ukončí přenos neuronálních impulsů AChE [2].

## 1.2 CHOLINESTERÁZY

Cholinesterázy představují skupinu enzymů, které katalyzují velmi jednoduchou reakci, hydrolýzu esterové vazby ACh a dalších cholinových esterů. Existují dva hlavní typy ChE s různými biochemickými vlastnostmi: pravá specifická ChE neboli AChE a pseuchocholinesteráza, nespecifická sérová ChE neboli BChE [7].

Kromě svých fyziologických substrátů mohou AChE a BChE rozložit následující látky: organofosforečné estery, karbamáty a organosulfonátové estery. Některé z těchto látek mohou inhibovat aktivitu enzymu. Inhibice způsobená fosforečnými a sulfonátovými estery je nevratná, ale inhibice způsobená karbamáty je reverzibilní. Inhibice nastává, protože poločas komplexu enzym-inhibitor je podstatně delší než poločas komplexu enzym-substrát [8].

Acetylcholinesteráza je přítomná převážně jako složka erytrocytů a je inhibována nadbytkem substrátu. BChE se vyskytuje z velké části v plazmě a není inhibována přebytkem substrátu. Aktivity AChE a BChE v krvi jsou považovány za biomarkery organofosfátového pesticidu nebo expozice nervového činidla, protože tato činidla inhibují obě ChE. Proto existuje naléhavá

potřeba jednoduché, rychlé, spolehlivé a reprodukovatelné metody pro přesné stanovení jak AChE, tak BChE aktivit v plné krvi [9].

### **1.2.1 Molekulární formy cholinesteráz**

Acetylcholinesteráza a butyrylcholinesteráza mají na molekulární úrovni z 65 % jednotnou homologii aminokyselin a kódují je různé geny na lidských chromozomech. AChE je kódována chromozomem 7, zatímco BChE chromozomem 3. Vždy pouze jediný gen rozhoduje o vzniku různých, avšak příbuzných molekulárních forem AChE a BChE, a to v důsledku alternativního sestřihu kódovacích oblastí původního transkriptu. Výsledkem je série AChE a BChE s podobnými katalytickými vlastnostmi, ale s odlišnou buněčnou a mimobuněčnou distribucí. Strukturální vlastnosti těchto dvou ChE určují rozdíly v jejich substrátové specifitě. AChE je vysoce selektivní pro hydrolyzu ACh, zatímco BChE je schopna metabolizovat několik různých molekul [10].

### **1.2.2 Acetylcholinesteráza**

Acetylcholinesteráza (acetylcholin acetylhydrolasa; EC 3.1.1.7), se nachází v centrálním a periferním nervovém systému, svalech, erythrocytech, plicích a slezině. Jedná se o enzym s vysokou afinitou pro ACh, inhibovaný při vysokých koncentracích ACh a s nízkou afinitou pro necholinové estery. Tento enzym je membránově vázaný glykoprotein a existuje v několika molekulárních formách [2,7].

Ačkoli AChE je esenciální enzym primárně exprimovaný v centrálním a periferním nervovém systému, různé její izoformy jsou také konstitutivní pro další typy buněk, včetně lidských fibroblastů, osteoblastů, erytrocytů, vaskulárních endoteliálních buněk a leukocytů, jakož i tkání, jako jsou nervová zakončení, mozek, plíce a slezina. AChE je také jeden z nejdůležitějších enzymů pro nervovou odezvu a funkci. Katalyzuje hydrolyzu esterů acylcholinu s relativní specifičností pro ACh [2].

Acetylcholinesteráza hraje klíčovou roli při katalytické hydrolyze cholinergních neurotransmiterů. Výzkum prokázal nejen zapojení tohoto proteinu do nových funkcí, jako je buněčná adheze, diferenciace a proliferace, ale také to, že AChE je potencionální marker a regulátor apoptózy [11].



Acetylcholinesteráza je serinová hydroláza, která je odpovědná za ukončení přenosu na cholinergních synapsích rychlou hydrolyzou neurotransmiteru ACh. Je cílem insekticidů a terapeutických léků, zejména první generace anti-Alzheimerových léků [12].

### 1.2.3 Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza (acylcholin acylhydrolázy; EC 3.1.1.8) je  $\alpha$ -glykoprotein nalezený v centrálním a periferním nervovém systému, játrech, hladkých svalech, střevech, pankreatu a srdci. Má nižší afinitu k ACh a není inhibován jeho vysokými koncentracemi. BChE hydrolyzuje jak cholinové, tak alifatické estery a má více než 11 izoenzymových variant [2,7].

Poločas BChE je přibližně 12 dnů a jeho normální hodnota se pohybuje v rozmezí od 5900 do 13200 IU/l. Zvýšená aktivita tohoto enzymu byla zaznamenána u obezity, diabetu, uremie a hypertyreózy [13,14].

Butyrylcholinesteráza hydrolyzuje butyrylcholin čtyřikrát rychleji než acetylcholin. Po dlouhou dobu byla fyziologická funkce BChE nejasná, avšak v současné době jsou její role navrženy například v metabolismu lipoproteinů, udržování myelinu, buněčné adhezi, neurogenezi, při odstraňování toxických molekul a při vzniku amyloidového prekursorového proteinu [2].

Při mnoha klinických stavech, jako jsou například akutní a chronické poškození jater, cirhóza a jaterní metastázy, záněty, poranění, infekce a podvýživa, se jeho hladina v séru snižuje [15].

U malé části zdravé populace chybí v plazmě BChE kvůli genotypové aberaci. Studie provedené v Evropě ukazují na prevalenci vrozeného deficitu BChE v séru o 3-4 % [16].

Nově vzniká úloha BChE jako prognostického ukazatele onemocnění jater i podvýživy/obezity. Ve skutečnosti sérové koncentrace a aktivita BChE přesně odrážejí dostupnost aminokyselinových substrátů a/nebo poruchy syntézy bílkovin v důsledku hepatocelulárního poškození. Proto by mělo být posouzení sérové BChE zahrnuto do rutinních klinických diagnostických postupů k vyhodnocení klinických stavů pacienta, zejména v případech zánětu a/nebo nízkých hodnotách bílkovin a energie [15].

### 1.3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ

V současnosti představují cholinesterázové inhibitory standard v symptomatické léčbě mírného až středního stupně Alzheimerovy choroby tím, že zpomalují její progresi. Myšlenka léčby je založena na tom, že při AD je v mozku nedostatek ACh, což vykazuje degenerativní změny neuronů. Inhibicí jednoho nebo obou enzymů (AChE a BChE) odpovědných za hydrolyzu ACh v synaptické štěrbině, se zvyšují dostupné hladiny ACh a zlepšuje se neurotransmise. Lék, který inhibuje ChE, zapřičiňuje, že je k dispozici více ACh pro provádění komunikace mezi nervovými buňkami. První klinické pokusy s léčbou AD byly z velké části s fyzostigminem, ale prvním použitým léčivem v klinické praxi byl takrin [17,18].

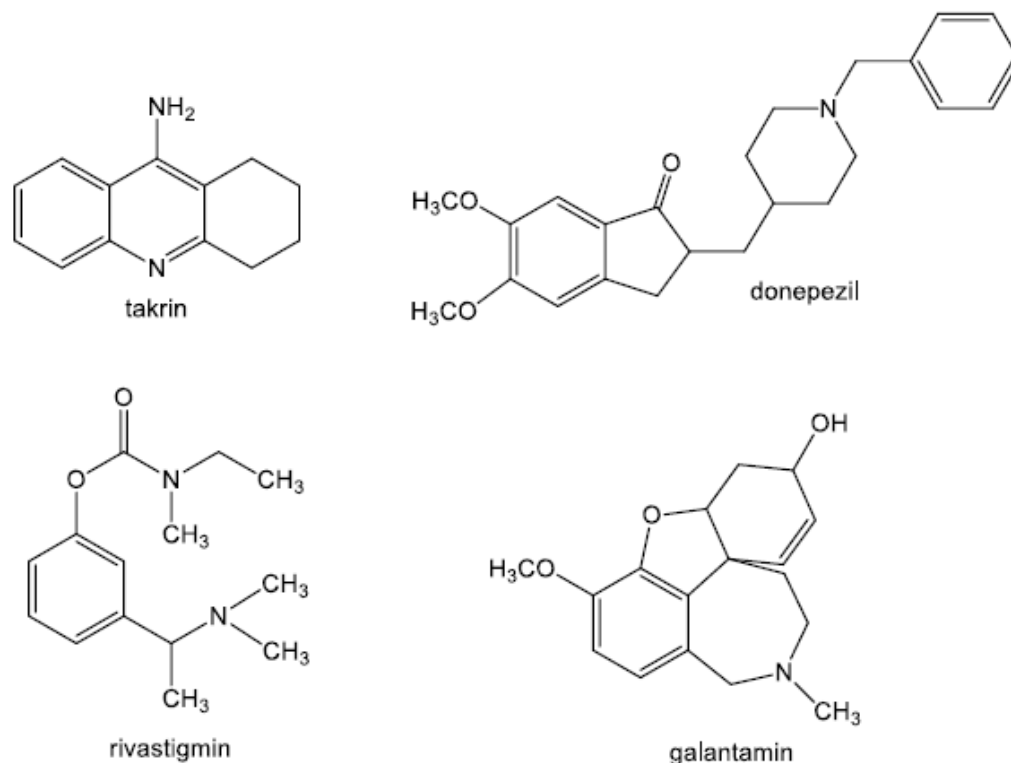
Nejstarším a nejčastěji užívaným inhibitorem AChE je přírodní alkaloid fyzostigmin, řadící se do skupiny karbamátů a pocházející z fazole Calabar, která roste v západní Africe. Poté, co byla objevena anticholinesterázová aktivita fyzostigminu a byl nalezen význam *N*-methylkarbamové skupiny jako podstatné části pro biologickou aktivitu, byly syntetizovány tisíce různých karbamátů. S několika výjimkami se jedná o *N*-methyl nebo *N,N*-dimethylkarbamáty. Některé z nich našli uplatnění jako insekticidy (karbaryl, moban, dimetan, izolan,...), jiné v humánní a veterinární medicíně (miotin, pyridostigmin, syntostigmin,...). Karbamáty působí karbamoylaci AChE a ruší její fyziologickou funkci. Inhibice AChE karbamáty má charakter pseudo-reverzibilní reakce [2].

Inhibitory cholinesteráz působí na enzymy, které po synaptickém uvolnění hydrolyzují ACh. Ve zdravém mozku převažuje AChE (80 %) nad BChE. V mozku s AD se aktivita BChE zvyšuje, zatímco aktivita AChE zůstává nezměněna nebo klesá. Proto jsou oba enzymy zapojeny do regulace hladin ACh a představují terapeutické cíle pro zmírnění cholinergního deficitu [19].

Inhibitory cholinesteráz oddalují progresi symptomů AD, zlepšují neuropsychiatrické symptomy a každodenní aktivity. Během klinických studií tyto inhibitory stabilizovaly funkce pacientů s mírnou až střední AD po dobu nejméně 6 měsíců [20].

Na obrázku 1 jsou zobrazeny nejběžněji užívané ChE-Is – donepezil, rivastigmin a galantamin, včetně z terapie vyřazeného takrinu. Tyto inhibitory

prokázaly svou účinnost při zlepšování kognitivního chování u pacientů trpících mírnými až těžkými formami AD a jiných forem demence (vaskulární demence, demence u Parkinsonovy nemoci či demence s Lewyho tělísky) [21,22].



**Obrázek 1** Strukturální vzorce popsaných léků [23].

Ačkoli ChE-Is patří do stejné skupiny léčiv, mají odlišnou strukturu, mechanismus působení a nežádoucí účinky. Efektivita jednotlivých typů ChE-Is není u všech pacientů stejná a existují značné rozdíly v oddálení i v rychlosti progresu symptomů AD – pacient, u kterého jeden typ ChE-Is neprofituje, může zaznamenat pozitivní efekt při přechodu na jiný. Rozdíly mezi ChE-Is souvisí hlavně s jejich působením na klíčové enzymy – ChE. Donepezil a galantamin vykazují selektivitu vůči AChE, zatímco takrin a rivastigmin koinhibují jak AChE tak BChE [24–27].

Některé ChE-Is vykazují vztah mezi dávkou a odpovědí, přičemž vyšší dávky léků korelují s větší inhibicí enzymu. Vzhledem k tomu, že AD je progresivní neurodegenerativní porucha, u které se pacienti v průběhu času zhoršují, je jedním z cílů v klinické praxi dosažení vyšších dávek, které

maximalizují účinnost léčby. Výskyt nežádoucích účinků spojených s perorálními ChE-Is, zejména nevolnosti a zvracení, se však také zvyšuje s vyššími dávkami. V důsledku toho může být dosažení a udržení vysokých terapeutických dávek v klinické praxi obtížné [28].

Léčba pomocí ChE-Is má 2 fáze. V první fázi dochází ke zvyšování dávky až do dosažení klinického účinku nebo maximálně tolerované terapeutické dávky. Druhou fází je dlouhodobá udržovací fáze – jakmile dojde k dosažení maximální účinné dávky. Obě tyto fáze jsou spojeny s odlišně specifickými vedlejšími účinky, přičemž všechny aktuálně používané ChE-Is (donepezil, galantamin a rivastigmin) vykazují různé profily snášenlivosti a bezpečnosti [26].

Zatímco může dojít k dočasné stabilizaci choroby, existuje typicky jen mírné zlepšení oproti výchozímu stavu a vedlejší účinky léčby ChE-Is může být pro některé pacienty příliš těžké tolerovat. Proto je třeba vyvinout další terapie AD, které zahrnují více tolerovatelných látek s alternativními mechanismy účinku a širší účinností [29].

### **1.3.1 Typy inhibic**

Inhibitor je sloučenina, která snižuje rychlost enzymaticky katalyzované reakce. Pro sledování inhibice ChE ve tkáni, je výhodné minimální ředění vzorků tkáně, aby se zabránilo reaktivaci karbamylovaných ChE a zředění reverzibilních inhibitorů. Navíc hodnoty koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu ( $IC_{50}$ ) ve vysoce zředěné tkáni by byly odlišné od hodnot v minimálně zředěné tkáni, protože inhibitor, jako je donepezil, vykazuje nespecifickou vazbu na tkáňové složky s vysokou frakcí. Jako výsledek by pak mohl interagovat s malou frakcí inhibitoru ChE v neporušené tkáni [30,31].

### **KOMPETITIVNÍ INHIBICE**

Kompetitivní inhibice nastává, když soutěží inhibitor o katalyticky aktivní vazebné místo se substrátem, čímž zabraňuje tvorbě komplexu mezi enzymem a substrátem. Předpokládá se, že inhibitor by měl sdílet určitý stupeň strukturní podobnosti s látkou, jejíž metabolismu je inhibován. Samotný inhibitor může nebo nemusí být metabolizován enzymy, které inhibuje [32,33].

## **AKOMPETITIVNÍ INHIBICE**

Při tomto typu inhibice sloučenina interaguje pouze s komplexem enzym-substrát (ne s volným enzymem) v místě jiném, než je aktivní místo [31].

## **NEKOMPETITIVNÍ INHIBICE**

Nekompetitivní inhibitory jsou obvykle strukturně odlišné od substrátu a váží se na alosterické místo enzymu (jiné místo, než aktivní). Substrát i inhibitor se tedy teoreticky mohou vázat na enzym současně. Inhibitor však obvykle deformuje aktivní místa, čímž mění konformaci jejich katalytických zbytků, což snižuje účinnost komplexu enzym-substrát [34].

## **REVERZIBILNÍ INHIBICE**

Jak naznačuje název, reverzibilní inhibitor funguje vázáním reverzibilně (obecně nekovalentně) na cílový enzym a tvoří s ním komplex. Když je inhibitor přítomen v likvoru a v plazmě, dochází k blokování molekul ChE. Poté, co se v játrech zmetabolizuje, vytratí se z plazmy i likvoru, blokáda enzymu ustane a dojde k obnovení činnosti ChE [4,35].

## **IREVERZIBILNÍ INHIBICE**

Ireverzibilní neboli nevratná inhibice enzymu nastává, když sloučenina blokuje enzymovou aktivitu po delší časové období, obecně vytvářením kovalentní vazby [35].

## **PSEUDO(I)REVERZIBILNÍ INHIBICE**

Tyto inhibitory se chovají jako kvazi-substráty, protože jsou akceptovány jako substráty po navázání na aktivní místo enzymu. Následně enzym začíná svůj normální mechanismus katalýzy a vzniká kovalentní vazba mezi enzymem a inhibitorem. Kovalentní vazba však není příliš stabilní. Účinnost tohoto typu inhibitoru, a tedy jejich potenciál jako léčiv, závisí na poločasu kovalentního aduktu, stejně jako na snadnosti tvorby vazby [36].

### **1.3.2 Rivastigmin**

Rivastigmin má dvojí inhibiční účinek – inhibuje současně AChE i BChE a naznačuje potenciální terapeutické přínosy v AD a související demence. Je pseudo-ireverzibilní inhibitor – to znamená, že inhibice enzymu sice trvá až 12 hodin, ale molekula rivastigminu je vázána na receptor pouze 0,5 – 1 hodinu, pak

je zmetabolizována. Má relativně nízkou vazbu na plazmatické proteiny (40 %), což snižuje možnost jeho akumulace. V játrech nedochází k jeho metabolizaci – metabolismus probíhá přímo na místě receptoru. Dále ani neinteraguje s cytochromovým systémem, proto vykazuje jen malý potenciál k lékovým interakcím a tak minimálně zatěžuje organismus [4,19,37].

Byl poskytnut důkaz o tom, že rivastigmin zlepšuje některé kognitivní deficity i u HIV pacientů s mírnou neurokognitivní poruchou. Výrazně zpomaluje aktivaci mikroglie, demyelinizaci a poškození axonů u experimentální autoimunní encefalomyelitidy [38].

Jednou z hlavních překážek účinného léčení AD s perorálními ChE-Is byla snášenlivost, která může zabránit mnoha pacientům v dosažení účinných terapeutických dávek v klinické praxi. Až donedávna byly všechny ChE-Is podávány perorálně, avšak byla vyvinuta a schválena nová transdermální náplast s rivastigminem pro léčbu mírné až středně závažné AD. Ta překonává tuto překážku snášenlivosti použitím jiné dávkovací cesty a může poskytnout podstatnou klinickou výhodu [39].

Náplast rivastigminu poskytuje nepřetržité podávání léků za 24 hodin a podobnou účinnost jako nejvyšší doporučená dávka perorálního rivastigminu se zlepšenou snášenlivostí. Tato cesta podávání léku by proto mohla umožnit optimální terapeutické dávkování, což může dále zvyšovat účinnost a dobu léčby. Přípravek rivastigminu může být optimálním způsobem podání rivastigminu k léčbě AD a může být prvním z několika transdermálních možností v "nové generaci" formulací inhibitorů cholinesterázy [28].

### **1.3.3 Galantamin**

Galantamin je reverzibilní kompetitivní a jediný inhibitor AChE, který vykazuje dvojitý mechanismus účinku – inhibici AChE a modulaci nikotinového receptoru. Vykazuje příznivé účinky na poznávání, činnosti každodenního života a chování. Studie demonstrují jeho účinnost a bezpečnost u pacientů s AD, vaskulární demencí a AD s cerebrovaskulárními komponentami. Nežádoucí účinky pozorované při užívání tohoto inhibitoru jsou zpravidla mírné až středně závažné, přechodné a gastrointestinální povahy. Z důvodu svého jedinečného

mechanismu účinku může mít galantamin potenciální přínosy oproti konvenčním činidlům inhibujícím enzymy [21].

Galantamin má podobně jako rivastigmin malý potenciál k akumulaci, protože vykazuje krátký plazmatický poločas (4–6 hodin) a nízkou vazbu na proteiny (20 %). Je však metabolizován jaterním cytochromem P450, proto je někdy nutné snížit jeho maximální dávky, jsou-li současně podávány i inhibitory cytochromového systému (např. některá antidepresiva) nebo když pacient trpí onemocněním jater a ledvin [40].

#### **1.3.4 Donepezil**

Donepezil je reverzibilním nekompetitivním inhibitorem AChE, který se naopak akumulovat v plazmě může. Jeho plazmatický poločas je dlouhý – až 3 dny, s čímž souvisí možnost podávat ho pouze v jediné denní dávce. Téměř úplně se váže na plazmatické proteiny (96 %), je metabolizován jaterními cytochromy a může interagovat s léčivými metabolizovanými stejnou dráhou. U tohoto léku je prokázán pozitivní vliv na kognitivní funkce, behaviorální symptomy i aktivity denního života. I přesto, že gastrointestinální trakt donepezil toleruje nejlépe, jeho lékové interakce představují jedny z nejčastějších vedlejších účinků v klinické praxi [4,41].

#### **1.3.5 Takrin**

Takrin je kompetitivní reverzibilní inhibitor jak AChE, tak BChE, zvyšující dostupnost ACh v muskarinových neuronech. Jeho poločas rozpadu je kolem 3 hodin a byl prvním schváleným lékem pro léčbu AD. Přestože takrin může u pacientů s mírnou až středně závažnou poruchou zlepšit výsledky psychometrických testů, není všelékem. Pacienti musí být pečlivě sledováni na zvýšení transaminázy, cholinergní nežádoucí účinky a interakci s léky metabolizovanými prostřednictvím jedné z izoform cytochromu P-450, P-450IA2 [42].

U takrinu může zvýšení cholinergní neurotransmise vyvolávat kromě žádoucího terapeutického efektu řadu vedlejších a nežádoucích účinků. Ty mohou být natolik závažné, že mohou vést až k vyřazení preparátu ze seznamu doporučených léčiv. Nežádoucím vedlejším účinkem aplikace takrinu je jeho hepatotoxicita, proto se hledají méně škodlivé deriváty. Jako zástupce můžeme

uvést preparát obsahující methoxy skupinu (methoxytakrin; 7-MEOTA), který chrání vlastní aromatický skelet před metabolickou aktivací a tím zvýšenou hepatotoxicitou [27,43].

### **1.3.6 Methansulfonylchlorid**

Methansulfonylfluorid je jediný skutečně ireverzibilní cholinesterázový inhibitor, který byl navržen pro terapii AD. Navíc vazba mezi 2,2-dichlorvinylidimethylfosfátem, aktivním metabolitem metrifonátu, a katalytickým místem ChE podléhá významné spontánní hydrolyze, jejímž důsledkem je inhibice s poločasem rozpadu jen několik hodin. Vývoj metrifonátu byl omezován kvůli výskytu svalové a respirační paralýzy a dalším nežádoucím účinkům [44].

## **1.4 ONEMOCNĚNÍ SPOJENÉ S CHOLINESTERÁZAMI**

První indikace pro ChE-Is byla AD, avšak s časem byla tato indikace rozšířena tak, aby zahrnovala nejen jiné typy demencí, ale také další poruchy centrální nervové soustavy, jako je delirium a traumatické poranění mozku [1].

Demence je syndrom – skupina příznaků, která má řadu příčin. Charakteristické příznaky demence jsou obtíže s pamětí, jazykem, řešením problémů a dalšími kognitivními schopnostmi, které ovlivňují schopnost jedince vykonávat každodenní činnosti. Tyto obtíže nastávají, protože nervové buňky v částech mozku, které se účastní kognitivních funkcí, jsou poškozeny nebo dokonce zničeny [45].

### **1.4.1 Alzheimerova choroba**

Alzheimerova choroba je degenerativní onemocnění mozku a nejběžnější forma demence – představující 60-80 % všech případů. Předpokládá se, že prevalence AD se do roku 2050 zvýší o 225 % a postihne více než 115 miliónů lidí na celém světě [46].

U AD dochází v části mozku k poškození a zničení neuronů, včetně těch, které umožňovaly vykonávání základních tělesných funkcí, jako jsou například chuze a polykání. Lidé v závěrečných stádiích onemocnění jsou připoutáni na lůžko a vyžadují nepřetržitou péči. AD je nakonec fatální [45].



Klinický obraz AD je charakterizován třemi hlavními patologickými příznaky: výskytem beta-amyloidních plaků, neurofibrilárních klubek a ztrátou cholinergních neuronů. Za jednu z hlavních příčin poruch paměti u pacienta je považován deficit v cholinergní neurotransmisi [2].

Nedostatek cholinergních neuronů přispívá ke kognitivním poruchám, snížení pozornosti a koncentrace, rychlosti zpracování informací, ale nemalou mírou také k poruchám chování. U pacientů s AD dochází k postižení všech oddílů cholinergního systému mozku – nalézáme snížené celkové množství neuromediátorů ACh, deficit CAT – enzymu odpovědného za syntézu ACh, a také AChE – enzymu odbourávající ACh [47].

AD je spojena s počáteční ztrátou paměti, následovanou poruchami v kognitivní funkci a řeči, a také se změnami chování [48].

Neuropsychiatrické příznaky jsou klíčovou složkou AD, která postihuje téměř všechny pacienty během onemocnění. Více než 90 % pacientů s AD vykazuje behaviorální nebo neuropsychiatrické symptomy, včetně deprese, úzkosti, psychózy, halucinace, apatie, poruch stravování a poruch spánku [49,50].

Odhaduje se, že 5,7 milionu Američanů trpí AD, a že do poloviny století jejich počet naroste na 13,8 milionu. V roce 2015 se zaznamenalo 110 561 úmrtí z AD, čímž se AD stala šestou hlavní příčinou úmrtí ve Spojených státech a pátou hlavní příčinou smrti u Američanů ve věku  $\geq 65$  let. Mezi lety 2000 a 2015, úmrtí způsobené mrtvicí, srdečními chorobami a rakovinou prostaty se snížily, zatímco úmrtí z AD vzrostly o 123 % [45].

#### **1.4.2 Parkinsonova choroba**

Kognitivní porucha a demence jsou společné rysy Parkinsonovy nemoci (PD). Pacienti s demencí Parkinsonovy choroby mají často významné cholinergní defekty, které mohou být léčeny ChE-Is [51].

Parkinsonova choroba je chronické degenerativní neurologické onemocnění charakterizované třesem, svalovou rigiditou, bradykinézou a posturální nestabilitou. Odhadované prevalence demence u pacientů s PD je 30 %. Průměrná délka trvání od počátku PD k rozvoji demence je přibližně 10 let [52].

Pacienti s PD mohou trpět též poruchami chování, jako je apatie, změnou osobnosti a zrakovými halucinacemi. Pozorování, že pacienti s PD demencí mají rozsáhlé cholinergní deficity, vedlo k hypotéze, že ChE-Is mohou pomoci při její léčbě [53].

#### **1.4.3 Demence s Lewyho tělísky**

Demence s Lewyho tělísky (DLB) je považována za druhou nejčastější příčinu demence po AD. Porucha je charakterizována progresivním kolísáním kognitivních poruch, vizuálními halucinacemi a motorickými rysy parkinsonismu. U DLB je neokortikální cholinergní aktivita výrazněji snížena než u AD a dává tak vznik halucinacím, které jsou charakteristické pro toto onemocnění. Vzhledem k tomu, že typická neuroleptická léčba je u DLB kontraindikována, používá se cholinergní léčba rivastigminem. Tolerance ChE-Is u DLB se podobá AD s některými gastrointestinálními účinky a svalovými křečemi [54].

Použití ChE-Is se u DLB zvyšuje, neboť mají pozitivní účinky na kognitivní, psychiatrické příznaky. Obvykle se používají ChE-Is: donepezil, galantamin a rivastigmin. Všechny tři léky zvyšují cholinergní účinky, přestože existují malé rozdíly v mechanismu působení. Tyto farmakodynamické rozdíly vytvářejí možnost různých farmakologických účinků [55].

#### **1.4.4 Vaskulární demence**

Vaskulární demence (VD) představuje přibližně 20-30 % případů demence a existuje vysoký stupeň klinického a patologického překrývání mezi VD a AD. Zvýšení dostupnosti endogenního ACh inhibicí ChE zvyšuje cerebrální průtok krve. Jeden z prvních pokusů o léčbu VD s rivastigminem měl povzbudivé výsledky a později byly pozitivní nálezy hlášeny i s galantaminem a donepezilem [1].

#### **1.4.5 Downův syndrom**

Léčba ChE-Is může být také indikována u Downova syndromu (DS). Genetické (chromozom 21), neuropatologické a neurochemické podobnosti mezi DS a AD, stejně jako přítomnost kognitivního poškození, motivovali použití cholinergní terapie v této poruše [56].

## 1.5 METODY STANOVENÍ

Pro stanovení aktivity ChE byla vyvinuta řada testovacích metod – kolorimetrické, elektrochemické, radiometrické a manometrické. Některé z těchto metod využívají více substrátů nebo ChE-Is pro kvantifikaci AChE a BChE aktivit z plné krve [9].

Existují dva přístupy k měření aktivity AChE a BChE přítomné v plné krvi. Prvním z nich je separace erytrocytů, obsahujících pouze AChE, a plazmy, která obsahuje pouze BChE – zde se měří jejich aktivity jednotlivě. Druhým přístupem je použití inhibitoru specifického pro BChE k měření aktivity AChE v plné krvi. Nicméně inhibitory, které se používají k úplné inhibici aktivity BChE rovněž inhibují aktivitu AChE, což vede k chybám ve vykazovaných hodnotách [57].

Měření aktivity ChE v krvi lze použít k vyhodnocení funkce jater, ke studiu relativní účinnosti a toxicity některých lokálních anestetik a k měření inhibice tohoto enzymu některými insekticidy (obsahujícími organické fosfáty) a potencionálními chemickými bojovými látkami (sarin, soman). Proto je důležité mít k dispozici jednoduché a rychlé kvantitativní metody pro stanovení této aktivity [58].

Optimální metoda stanovení aktivity ChE potřebuje splnit několik požadavků. Je nutná selektivita pro aktivitu AChE a BChE. Měla by být schopna posoudit biologické vzorky i kinetické studie a objevy nových léčiv, přičemž by neměla být drahá. V posledních desetiletích došlo k velkému rozvoji ChE testu s rostoucími nároky na pochopení efektu modulace enzymů. Velký potenciál spočívá v dalším využití čipových metod, mikroelektrod a nanotechnologií, které v této oblasti otevírají nové možnosti [5].

Obecně se vychází z toho, že do pufované reakční směsi (RS) je dán enzym z různých zdrojů a vlastní reakce je zahájena přidáním substrátu. Po určité době, popř. kontinuálně, se sleduje úbytek nerozloženého substrátu nebo přírůstek reakčních produktů [59].

Obecně existují tři principy, které mohou být použity při stanovení aktivity ChE. První je použití přirozeného substrátu ACh. Při jeho hydrolýze se stanoví enzymatická aktivita a hodnotí se pH (stanovení okyselení uvolněným acetátem). Druhým principem je použití umělého substrátu – obvykle acetylthiocholinu

(ATCh). Produktem rozkladu substrátu je thiocholin, který může být kvantifikován reakcí s chemickými činidly poskytujícími barevnou reakci nebo s použitím voltametrie. Třetí princip využívá též umělý substrát, ale radioaktivně značený – obvykle ACh s radioaktivně značenou acetylovou částí. Rozložený nebo nezreagovaný substrát se dále stanoví scintilační technikou [5].

První testy ChE byly pro výzkumné účely, kde se spoléhalo na pomalé, ale přesné metody – např. makro-Warburgova manometrie. Dnes se nejvíce používají 3 techniky – radiometrická, Ellmanova a pH. Nejrozšířenější metodou je Ellmanova metoda, která má mnoho variant [60].

### **1.5.1 Manometrické metody**

Pro stanovení inhibice ChE byla dříve využívána převážně Warburgova metoda. Princip manometrického stanovení je založen na měření objemu CO<sub>2</sub> uvolněného z hydrogenuhličitanového pufru. Tento pufr se rozkládá kyselinou octovou (HAc), vznikající při hydrolýze substrátu. Warburgova metoda je schopna stanovit relativně malou aktivitu ChE ve všech tkáních. Nevýhody této metody spočívají v omezeném použití pufrů (vhodný pouze hydrogenuhličitanový) a nemožnosti změny pH během měření. Ačkoliv se jedná o velmi elegantní a přesnou metodu, je vhodnější pro výzkumné činnosti než pro rutinní stanovení velkého počtu vzorků [5,61].

### **1.5.2 Optické metody**

#### **FOTOMETRIE**

Podstatou fotometrického stanovení aktivity ChE je produkt chemické reakce, který je schopný interferovat se světlem o specifické vlnové délce [5].

Fotometrické metody jsou založeny na změně barvy acidobazického indikátoru, který měří rychlost uvolňování HAc do pufrovaného roztoku. Avšak tyto metody mají tu nevýhodu, že se indikátor může selektivně kombinovat se sérovými proteiny. V důsledku toho dochází ke změnám v počáteční absorbanci a pak je platnost kalibračních křivek sporná. Proto je nezbytné pracovat s velmi zředěnými roztoky séra pro účely fotometrických měření hladin sérové ChE, ale pak jsou stanovení citlivá na stopy kontaminantů a na absorpci oxidu uhličitého ve vzduchu [58].

Tyto metody jsou univerzálně doporučované pro stanovení enzymových aktivit, ale nejsou vhodné pro zakalené nebo hemolytické materiály. Přijatelnou alternativou jsou elektrochemické metody využívající generování protonů nebo thio sloučenin v reakci katalyzované ChE [62].

### Kolorimetrie

Kolorimetrické metody jsou nejčastěji používány pro stanovení aktivity AChE i BChE z plné krve, protože jsou jednoduché a lze je snadno přizpůsobit pro analýzu. Rychlost hydrolýzy ATCh katalyzované ChE se stanoví pomocí automatizované čtečky mikrotitračních destiček a kolorimetrického činidla, které detekuje sulfhydrylové skupiny (-SH) [9,60].

### Ellmanova metoda

V současné době je tato metoda nejpoužívanější technikou stanovení aktivity ChE. Je to zlatý standard pro hodnocení aktivity ChE. Umožňuje širokou škálu provedených experimentů. Je vhodná pro hodnocení biologických vzorků, pro identifikaci modulátorů ChE a stanovení jejich účinnosti. Princip této metody lze používat v různých modifikacích. Může být miniaturizován v přenosném přístroji schopném vyhodnocovat expozici polních pesticidů nebo nervových látek. Ve spojení s HPLC umožňuje měření aktivity ChE v reálném čase. Je vhodný pro mikrotitrační destičky i vícenásobná paralelní měření. Její omezení spočívá v silné interakci s hemoglobinem během analýzy plné krve [5].

Spektrofotometrie podle Ellmana patří mezi nejpoužívanější fotometrické metody. Tato metoda používá umělé substráty (thiocholinové estery). Aktivita ChE se měří nepřímo kvantifikací koncentrace iontů kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB) vzniklých při reakci mezi thiolovým činidlem 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) a thiocholinem, produktem enzymatické hydrolýzy substrátu (ATCh). Průběh reakce, tedy vznik žlutého zabarvení, je měřen obvykle při vlnové délce  $\lambda = 412 \text{ nm}$  pomocí spektrofotometru [63].

## **FLUORIMETRIE**

V současné době je široce používán princip ChE testu založeného na tvorbě fluorescenčního produktu. Fluorimetrický test je ve většině případů až 100× citlivější než kolorimetrická technika. Substrát je optimálně nefluorescenční (např. indoxylacetát nebo naftylestery) a poskytuje vysoce fluorescenční

hydrolytický produkt. Když jsou substrát i produkt fluorescenční sloučeniny, jejich spektra by neměla vzájemně interferovat [5].

### 1.5.3 Elektrochemické metody

Zde se měří změna potenciálu, způsobená  $H^+$  ionty kyseliny, uvolňované při hydrolýze substrátu ve slabě pufovaném prostředí. Tato metoda je mnohostranná, a ačkoliv je méně přesná než Warburgova technika, hodí se lépe pro rutinní stanovení aktivity ChE v biologickém materiálu. Nevýhodou metody je požadavek na kapacitu pufru udržet pH v daném rozmezí a zabránit tak poklesu pH do hodnot redukcí aktivity enzymu [59].

#### pH-METR

Tato metoda je založena na měření změny pH v čase a vyžaduje pouze pH metr s vhodnou celou pro měření pH, malý termostat a vsádkový míchaný reaktor. Je jednodušší a univerzálně použitelná, protože je vhodná jak pro ACh, tak pro ATCh, oproti metodám pH-stat, kdy lze pro hydrolýzu použít pouze ACh, nebo Ellmanova - pouze ATCh. Ačkoliv je tato metoda jednoduchá, může být prováděno pouze jedno stanovení najednou a postup je zdlouhavý, proto se nedoporučuje pro rutinní stanovení [64,65].

Během enzymatické hydrolýzy ACh nebo ATCh cholinesterázami vzniká HAc. Proto se v ne-pufované RS ve vodném prostředí hodnota pH v čase snižuje podle kinetiky hydrolýzy a disociační konstanty slabé kyseliny HAc. Tento pokles je v přítomnosti inhibitoru pomalejší. Z rozdílu mezi příslušnými hodnotami lze vypočítat hodnotu  $IC_{50}$ . V důsledku změny pH reakční směsi se průběžně aktivita AChE mění. Změna hodnoty pH posouvá aktivitu AChE během neinhibované a inhibované hydrolýzy ACh a ATCh stejným způsobem. Hodnoty získané touto metodou jsou srovnatelné s hodnotami získanými nezávislými, komplikovanějšími a dražšími metodami (Ellmanova a pH-stat) [64].

### **POTENCIOMETRIE**

Původní potenciometrická metoda se nazývala Michelova avšak měla řadu nedostatků – relativní necitlivost, dlouhá inkubační doba a nízká výkonnost [66].

Potenciometrické metody využívají rozklad přírodního substrátu ACh na cholin a kyselinu octovou. Enzymová aktivita se stanoví pomocí pH. Tato metoda je užitečná pro rutinní měření biologických vzorků a je relativně levná

a jednoduchá. Pro stanovení aktivity ChE v plné krvi, erythrocytech a plazmě byla použita elektrometrická metoda [5].

### ELEKTROMETRIE

Elektrometrie je nepřímou metodou. Největší nevýhodou této metody je proto měření pH, což je logaritmická funkce koncentrace acetátu (nikoli jeho produkce). Hodnota pH může být tedy ovlivněna dalšími procesy probíhajícími při měření. Rychlá změna pH je další nevýhodou této techniky, protože pH může rychle klesat ve vzorcích s vysokou aktivitou ChE. V důsledku toho může změna pH ovlivnit měření aktivity ChE. Tento problém byl v poslední době kompenzován novou metodou používající elektrodu selektivní pro ACh [67,68].

### **TITRAČNÍ METODY**

Titrační metody byly převzaty z výše uvedených potenciometrických metod. HAc, která je enzymatickou reakcí uvolněná z ACh, se kontinuálně neutralizuje standardním alkalickým roztokem. Hodnota pH reakčního systému se tak udržuje konstantní [5,65].

### pH-STAT

Technika kontinuální titrace kyseliny octové uvolněné z ACh enzymem ChE překonává mnohé z nežádoucích vlastností jiných metod. Enzymová aktivita je vyjádřena spotřebou hydroxidu v ml v závislosti na čase. Tato metoda nevyužívá pufrů, je teplotně a atmosféricky řízená, rychlá, přesná a jednoduchá na provoz. Podmínky reakce jsou snadno reprodukovatelné, což eliminuje většinu variací pozorovaných při některých jiných metodách. Navíc mohou být koncentrace substrátu a enzymu upraveny a udržovány na úrovních, které umožňují optimální enzymatickou aktivitu. Automatický titrátor se v toxikologické laboratoři pro stanovení ChE v lidské krvi používá již několik let a ukázalo se, že výsledky této metody jsou velmi uspokojivé [69].

Největší nevýhoda v závislosti na rychlých změnách pH je podobná elektrometrickým metodám. Tyto nevýhody jsou také spojeny s nutností používat nepufrovaná nebo slabě pufrovaná média. Objem přidané zásady by neměl významně zvyšovat reakční objem [5].

Ačkoliv použití zařízení pro měření pH vyžaduje pečlivou údržbu a dovednosti vyškoleného laboratorního personálu, citlivost

a reprodukovatelnost této techniky je srovnatelná se standardními spektrofotometrickými metodami a její rychlost je srovnatelná s rychlostí nejrychlejšího screeningu [70].

#### 1.5.4 Hmotnostní spektrometrie

Tato metoda je primárně používána pro identifikaci AChE inhibitorů v přírodních extraktech za použití HPLC/MS technik. AChE aktivita složek vzorku je monitorována postkolonovým biochemickým testem, který je založen na odděleném, postupném míchání AChE a ACh s HPLC eluátem. Inhibitory AChE jsou detekovány sníženou rychlostí biochemické reakce za použití ionizace elektronovým sprejem. Pro dosažení optimální kompatibility mezi biochemickými testy a MS detekčními podmínkami byl použit jako pufr hydrogenuhličitan amonný [71,72].

#### 1.5.5 Radioizotopové metody

Stanovení radioizotopové aktivity ChE je založeno na hodnocení  $^3\text{H}$  nebo  $^{14}\text{C}$  značeného ACh. Tyto metody jsou velmi podobné, protože se obvykle liší pouze kvantifikací značeného nehydrolyzovaného ACh nebo uvolněného acetátu. Radiometrický test není vhodný pro kinetické studie, protože je vždy posledním krokem měření. Radiometrický přístup je nejcitlivějším přístupem schopným vyhodnotit velmi nízkou aktivitu enzymů. Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu vysoké náklady na radioaktivně značený substrát a komplikace spojené s manipulací s radioaktivním materiálem [5].

Nové radioizotopové metody pro stanovení inhibice ChE byly zavedeny za použití radioaktivně značených substrátů *N*-[ $^{14}\text{C}$ ]-methylpiperidin-4-ylacetátu a (*R*)-*N*-[ $^{14}\text{C}$ ]-methylpiperidin-3-ylbutyrátu pro AChE a BChE. Tyto substráty byly původně vyvinuty jako *in vivo* sondy cerebrální AChE a BChE pomocí pozitronové emisní tomografie. Tato metoda by účinně monitorovala inhibiční vlastnosti ChE-Is používaných jako léčiva, pesticidy a chemické bojové látky [73].

#### 1.5.6 Biosenzory

Biosenzory jsou analytická zařízení využívající citlivost a selektivitu bioreceptoru připojeného na povrch fyzikálně-chemického převodníku. Biosenzory na bázi ChE představují velmi užitečnou techniku pro analytické a klinické účely – používají se v medicínské chemii i v toxikologických aplikacích.



V posledních desetiletích se biosenzory staly systémem s možností nahradit klasické testovací techniky. Jejich miniaturizace, jednoduchost a přenosnost představují nejvýznamnější výhody [5].

První generací ChE biosenzorů byl amperometrický bienzymatický senzor založený na dvou enzymech – ChE a cholin oxidáze (ChO). Cholin nevede elektrický proud, ale je zde využívána ChO, která tvoří peroxid vodíku, který je během redukce na vodu amperometricky detekován [74,75].

Další generace senzorů používá jako substráty thiocholinové estery. Thiocholin uvolněný během enzymatické reakce je snadno oxidovatelný na dithio- formu. Systém je založen na přímé amperometrické detekci thiocholinu [5].

## 2 CÍL PRÁCE

Mezi cíle této práce patřilo testování různých reakčních podmínek za účelem získání optimálních podmínek pro měření aktivity lidských cholinesteráz pomocí změny pH.

Součástí práce bylo také stanovení inhibiční účinnosti standardních látek na lidskou acetylcholinesterázu a butyrylcholinesterázu a to za účelem zjištění, zda mohou být vybrané metody využity při testování inhibiční účinnosti neznámých látek.

Dalším úkolem bylo porovnání testovaných metod, metody změny pH s titrační pH-statovou metodou.

V poslední části práce byl pro standardní látky stanoven rozdělovací koeficient ( $K_{ow}$ ) v systému *n*-oktanol:voda.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 POMŮCKY

#### 3.1.1 Použité chemikálie a roztoky

- Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny roztoky vodné.

#### ENZYMY

ACETYLCHOLINESTERÁZA – z erytrocytů

BUTYRYLCHOLINESTERÁZA – z plazmy

- Vzorke krve byly odebrány od dobrovolných dárců do odběrových zkumavek s obsahem kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a následně zpracovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.1.

#### SUBSTRÁTY

ACETYLCHOLIN CHLORID, 99% (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

- Pro metodu změny pH a titrační pH-statovou metodu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,1 M.

BUTYRYLCHOLIN CHLORID, 99% (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

- Pro metodu změny pH a titrační pH-statovou metodu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 0,1 M.

#### DESTILOVANÁ VODA

#### TESTOVANÉ INHIBITORY – STANDARDNÍ LÁTKY

TAKRIN HYDROCHLORID, (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

RIVASTIGMIN TARTÁT, (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

GALANTAMIN HYDROBROMID, (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

- Testované standardní látky byly rozpuštěné v destilované vodě na koncentraci 0,02 M a následně ředěny destilovanou vodou dle potřeby měření.

#### CHLORID DRASELNÝ – KCl (Penta s.r.o)

- Pro potřeby stanovení u pH-statové metody byl připraven roztok o koncentraci 0,5 M.

## HYDROXID DRASELNÝ – KOH (Penta s.r.o)

- Pro potřeby stanovení u pH-statové metody byl připraven roztok o koncentraci 0,1 M.

## 1-oktanol, p.a. (Sigma-Aldrich, Praha, ČR)

- Organické prostředí pro stanovení rozdělovacího koeficientu.

### 3.1.2 Laboratorní technika

- centrifuga Eppendorf 5804/ 5804 R
- centrifuga MPW-56 (Unimed, Praha)
- třepačka Heidolph Multi Reax (Heidolph Instruments)
- UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Německo)
- elektromagnetické míchadlo
- automatický titrátor 799 GPT Titrino (Metrohm, Švýcarsko), viz obrázek 2



Obrázek 2 Automatický titrátor 799 GPT Titrino, vlastní zdroj

- pH/ORP metr HI3220 (Hanna instruments, USA), viz obrázek 3



Obrázek 3 pH/ORP metr HI3220, vlastní zdroj

- pH kombinovaná elektroda BA 25 (BOECO, Německo), viz obrázek 4
  - o gelový elektrolyt, pH 0 -14, t -5 – 80 ° C



Obrázek 4 pH kombinovaná elektroda BA 25, vlastní zdroj

## 3.2 METODY

### 3.2.1 Zpracování čerstvě odebraných vzorků lidské krve

Krev byla odebrána zdravým dobrovolným dárcům do odběrových zkušev s obsahem EDTA.

Plazma byla oddělena od krevních buněk v centrifuze Eppendorf 5804/ 5804 R. Centrifugace byla prováděna při 3000 otáčkách/minutu po dobu 15 min při 4 °C. Poté byla plazma odpipetována do plastových mikrozkušev a uchovávána v mrazáku při -80 °C. Blanka („baficoat“) nad vrstvou erytrocytů byla odstraněna do odpadu.

K erytrocytům byla přidána redestilovaná voda, která erytrocyty naředila v poměru 1:3. Byla provedena opětovná centrifugace erytrocytů, probíhající při 3000 otáčkách/minutu po dobu 20 min při 4 °C. Poté byly erytrocyty dále ředěny podle potřeby, rozpipetovány do plastových mikrozkušavek a uchovávány při - 80 °C.

### **3.2.2 Měření aktivity lidských ChE**

V prvním kroku se sledovala aktivita lidských ChE za využití dvou metod, které sledovali změnu pH.

#### **pH – METR**

##### Princip

Tato metoda je založena na měření změny pH v čase pomocí pH metru s vhodnou celou pro měření pH, malého termostatu a vsádkového míchaného reaktoru. Během enzymatické hydrolýzy substrátu (ACh/BCh) cholinesterázami (AChE/BChE) vzniká kyselina. Hodnota pH v čase se snižuje podle kinetiky hydrolýzy a disociační konstanty slabé kyseliny.

##### Postup

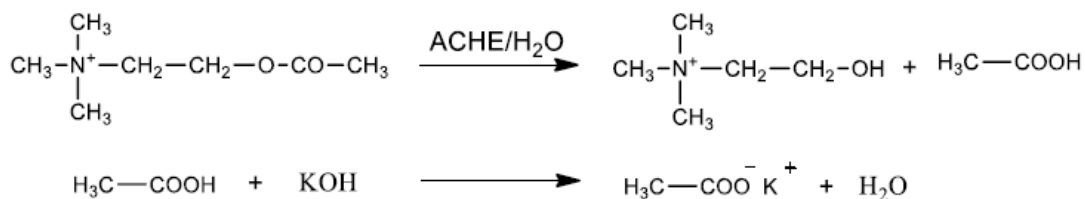
Pro stanovení pH v RS byl použit pH metr (HI3220, Hanna instruments, USA) s kombinovanou elektrodou (BA 25, pH BOECO, Německo). K získání optimálních podmínek pro měření aktivity lidských ChE bylo navrženo několik různých kombinací substrátu a biologického materiálu. Celkově byly testovány 4 různé objemy biologického materiálu a 7 různých koncentrací substrátu ve vzájemných kombinacích. Počáteční RS byla připravena do 100ml kádinky v následujícím pořadí: destilovaná voda (dopočítána vždy tak, aby celkový objem RS po přidání substrátu byl 25000  $\mu$ l) a 100, 300, 500 nebo 700  $\mu$ l erytrocytů/plazmy. Poté byla kádinka postavena na elektromagnetické míchadlo a byla do ní vložena pH elektroda. Za stálého míchání se čekalo, až dojde k ustálení pH reakční směsi. Po stabilizaci hodnoty pH bylo do RS napipetováno příslušné množství substrátu (ACh/BCh 0,1 M), kterým se reakce odstartovala. Pro všechny testované objemy biologického materiálu byly testovány koncentrace substrátu v rozmezí ( $4 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-5}$  M).

Všechny koncentrace substrátu byly vždy proměřeny v duplikátu. Celková doba jedné analýzy trvala 600 s. Změna pH byla zaznamenávána během první minuty po 10 s (z důvodů rychlých změn pH) a poté vždy po 60 s. Ze získané závislosti změny pH na čase se následně spočítala rychlost reakce.

## pH – STAT

### Princip

Pro stanovení enzymatické aktivity ve vzorku je třeba posoudit rychlost enzymové reakce, s jakou dochází k přeměně substrátu na produkt. Tato metoda využívá pro stanovení aktivity enzymů elektrolýzu, díky níž dochází k přesnému dávkování požadovaného kyselinového nebo bazického titrantu pro stanovení pH vzorku. Rychlost reakce může být tak snadno získána, protože se rovná rychlosti přidávání titrantu v ustáleném stavu. Během enzymatické reakce katalyzované cholinesterázami dochází k titraci vznikající kyseliny odměrným roztokem KOH. Automatický titrátor dává pokyn automatické byretě k přidávkům roztoku KOH na základě aktuálního pH RS, která je kontinuálně sledována článkem skleněná-argentochloridová elektroda [76]. Pomocí této metody byla měřena aktivita AChE (v erythrocytech) a BChE (v plazmě) za využití substrátů ACh a BCh. Princip této metody je znázorněn na obrázku 5.



**Obrázek 5** Princip titrační metody stanovení aktivity/inhibice AChE [5]

### Postup

K získání optimálních podmínek pro měření aktivity lidských ChE bylo navrženo též několik různých kombinací substrátu a biologického materiálu (stejných jako u metody pH – metr). Celkově byly testovány 4 různé objemy biologického materiálu a 7 různých koncentrací substrátu ve vzájemných kombinacích. Každá RS byla připravena napipetováním 3300  $\mu\text{l}$  KCl (0,5 M), 100, 300, 500 nebo 700  $\mu\text{l}$  erythrocytů/plazmy a po odečtení objemu testované koncentrace substrátu ACh/BCh doplněna destilovanou vodou na celkový objem

15000  $\mu$ l. Poté byla titrátorem automaticky provedena pretitrace roztokem KOH (0,1 M), dokud se pH reakční směsi neustálilo na hodnotě pH 7,4 pro erythrocyty a pH 8 pro plazmu. Po stabilizaci hodnoty pH nastal 15 s interval, po jehož uplynutí bylo do RS napipetováno příslušné množství substrátu (0,1 M), kterým se reakce odstartovala. Reakce probíhala ve dvouplášťové nádobce o objemu 50 ml a daná RS byla míchána elektromagnetickým míchadlem. Pro všechny testované objemy biologického materiálu byly použity koncentrace substrátu v rozmezí ( $4 \times 10^{-3} - 4 \times 10^{-5}$  M).

Po odstartování reakce probíhala titrace vznikající kyseliny roztokem KOH. Všechny testované koncentrace substrátu byly proměřeny alespoň dvakrát. Měření probíhali pomocí automatického titrátoru 799 GPT Titrimo. Celková doba jedné analýzy trvala 900 s. Ze získané závislosti změny objemu KOH na čase se následně spočítala rychlost reakce.

### **3.2.3 Stanovení inhibiční účinnosti standardních látek při inhibici lidské AChE a BChE**

Inhibiční účinnost standardních látek byla měřena oběma výše popsanými metodami. Účinnost inhibitorů popisuje hodnota  $IC_{50}$ . Ke stanovení této hodnoty u daného inhibitoru lze použít závislost mezi poměrem rychlosti neinhibované a inhibované hydrolýzy a koncentrací inhibitoru.

#### **pH – METR**

##### Princip

S využitím pH-metrové metody byly také měřeny hodnoty  $IC_{50}$  pro testované inhibitory. Již výše bylo zmíněno, že v ne-pufrované RS ve vodném prostředí se hodnota pH v čase snižuje podle kinetiky hydrolýzy a disociační konstanty slabé kyseliny. Tento pokles je v přítomnosti inhibitoru pomalejší a z rozdílu v rychlostech změny pH v čase neinhibované a inhibované reakce lze vypočítat hodnotu  $IC_{50}$ .

##### Postup

Reakce byla měřena opět za využití vzorků erythrocytů a krevní plazmy a jako substrát byl použit ACh (pro erythrocyty) a BCh (pro plazmu). K měření



sloužil pH–metr s kombinovanou elektrodou a RS byla promíchávána elektromagnetickým míchadlem. Měření jedné reakce probíhalo po dobu 600 s.

Nejdříve byla dvakrát změřena neinhibovaná reakce a z vypočítaných rychlostí stanovena hodnota aritmetického průměru rychlosti neinhibované reakce. Do 100ml kádinky bylo napipetováno 24300  $\mu\text{l}$  destilované vody a 500  $\mu\text{l}$  erytrocytů/plazmy. Poté byla kádinka postavena na elektromagnetické míchadlo a byla do ní vložena pH elektroda. Za stálého míchání se čekalo, až dojde k ustálení pH reakční směsi. Po stabilizaci hodnoty pH bylo do RS napipetováno 200  $\mu\text{l}$  substrátu (ACh/BCh 0,1 M), kterým se reakce odstartovala.

Po změření neinhibované reakce následovalo měření reakce inhibované, kde se navíc přidával inhibitor (0,02 M), který byl dle potřeby ředěn destilovanou vodou. Testované koncentrační rozmezí daného inhibitoru je uvedeno v závorce. Testovány byly tři inhibitory (standardní látky): rivastigmin ( $10^{-5}$  -  $10^{-7}$  M), galantamin ( $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  M) a takrin ( $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  M). U každého z inhibitorů byly vybrány nejméně čtyři koncentrace, ve kterých byl daný inhibitor měřen. Každá testovaná koncentrace byla změřena alespoň dvakrát. Koncentrace inhibitoru v RS se postupně zvyšovala. RS byla připravena do 100ml kádinky v následujícím pořadí: destilovaná voda (dopočítána vždy tak, aby celkový objem RS po přidání 200  $\mu\text{l}$  0,1 M substrátu činil 25000  $\mu\text{l}$ ), 500  $\mu\text{l}$  erytrocytů/plazmy a příslušné množství inhibitoru. Poté byla kádinka postavena na elektromagnetické míchadlo a byla do ní vložena pH elektroda. Za stálého míchání se čekalo, až dojde k ustálení pH reakční směsi. Po stabilizaci hodnoty pH bylo do RS napipetováno příslušné množství substrátu (ACh/BCh 0,1 M), kterým se reakce odstartovala.

Tímto měřením byla získána závislost pH na čase  $t$ , která sloužila na výpočet rychlosti reakce neinhibované ( $v_0$ ) a reakce inhibované ( $v_i$ ). Následně byly sestaveny závislosti  $v_0/v_i$  na koncentraci testovaného inhibitoru. Ze sestavené přímkové závislosti byla vypočtena rovnice regrese, která sloužila na výpočet inhibiční koncentrace testovaných standardů.

## pH – STAT

### Postup

Nejdříve byla v duplikátu změřena neinhibovaná reakce a z vypočítaných rychlostí stanovena hodnota aritmetického průměru rychlosti neinhibované reakce. Do reakční nádoby bylo napipetováno 3300  $\mu\text{l}$  KCl (0,5 M), 500  $\mu\text{l}$  erytrocytů/plazmy a 11080  $\mu\text{l}$  destilované vody. Poté byla spuštěna reakce a titrátorem automaticky provedena pretitrace roztokem KOH (0,1 M), dokud se pH reakční směsi neustálilo na hodnotě pH 7,4 pro erytrocyty a pH 8 pro plazmu. Po stabilizaci hodnoty pH nastal 15 s interval, po jehož uplynutí bylo do RS napipetováno 120  $\mu\text{l}$  substrátu (0,1 M), kterým se reakce odstartovala.

Po změření neinhibované reakce následovalo měření reakce inhibované, kde se navíc přidával inhibitor (0,02 M), který byl dle potřeby ředěn destilovanou vodou. Testované koncentrační rozmezí daného inhibitoru je uvedeno v závorce. Testovány byly opět tyto tři inhibitory: rivastigmin ( $10^{-5}$  –  $10^{-6}$  M), galantamin ( $10^{-6}$  –  $10^{-8}$  M) a takrin ( $10^{-8}$  –  $10^{-9}$  M). U každého z inhibitorů byly vybrány nejméně čtyři koncentrace, ve kterých byl daný inhibitor měřen, a každá koncentrace byla změřená alespoň dvakrát. Koncentrace inhibitoru v RS se postupně zvyšovala. RS obsahovala 3300  $\mu\text{l}$  KCl (0,5 M), 500  $\mu\text{l}$  vzorku (erytrocyty nebo plazma), vhodné množství inhibitoru a odpovídající množství destilované vody, aby celkový objem této směsi po přidání 120  $\mu\text{l}$  substrátu činil 15000  $\mu\text{l}$ . Pro dosažení optimálního pH RS byla opět spuštěna pretitrace. Poté nastal 15 s interval, po jehož uplynutí byl do RS směsi přidán substrát (0,1 M). Tím byla zahájena reakce a vznikající kyselina byla titrována roztokem KOH (0,1 M).

Tímto měřením byla získána závislost přidávaného objemu KOH na čase  $t$ . Z této závislosti byly vypočítány rychlosti jednotlivých reakcí a sestaveny závislosti  $v_0/v_i$ .  $V_0$  představuje rychlost neinhibované reakce,  $v_i$  pak odpovídá rychlosti reakce inhibované inhibitorem. Ze sestavené přímkové závislosti byla vypočtena rovnice regrese, ze které byla následně spočítána hodnota  $IC_{50}$ .

### 3.2.4 Stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v systému *n*-oktanol:voda

#### Princip

Pokud působí dané inhibitory jako léčiva, tak hodnoty jejich  $K_{ow}$  podávají informaci o propustnosti těchto inhibitorů přes biologické membrány. Pro zjištění, jak rychle prostupují léčiva přes biologické membrány, je důležité znát jejich rozpustnost v tucích a s tím související hodnotu rozdělovacího koeficientu. Čím více je daná látka lipofilní, tím větší je hodnota  $K_{ow}$ . Rozpustnost léčiva v tucích tedy zlepšuje jeho prostupnost přes biologické membrány. Distribuce na místo účinku je zprostředkována krví, proto je důležité též zachování rozpustnosti ve vodě (ale její příliš vysoká hodnota způsobuje krátkodobou účinnost léčiva). Lékařský chemik Christopher Lipinský a jeho kolegové analyzovali fyzikálně chemické vlastnosti 2000 léků. Přišli na to, že látka bude pravděpodobněji schopná projít buněčnou membránou a hematoencefalickou bariérou se zachováním si přijatelné rozpustnosti ve vodě, pokud vyhoví následujícím požadavkům, tzv. **Lipinského pravidlu 5**:

- hodnota  $K_{ow}$  resp.  $\log P$  je ideálně v rozmezí 4 – 5
- její molekulová hmotnost bude  $\leq 500$
- počet skupin v molekule schopných předat atom vodíku do vodíkové vazby (obvykle součet hydroxylových a aminových skupin v molekule léku) bude  $\leq 5$
- počet skupin schopných přijímat vodíkové atomy za tvorby vodíkových vazeb (obvykle součet atomů kyslíku a dusíku) bude  $\leq 10$  [77,78].

Ke správnému účinku orálně podávaného léčiva je kromě lipofility důležitý i polární povrch molekuly (PSA). PSA je dalším rozhodujícím faktorem pro látky schopné procházet přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariérou a je definován jako součet povrchů polárních atomů v molekule. Obvykle se jedná o atomy dusíku a kyslíku včetně jejich navázaných atomů vodíku. Výpočet PSA klasickým způsobem je velmi časově náročný, neboť je nutné vytvořit přiměřený 3D model struktury molekuly. Proto se přistoupilo k tzv. topologickému polárnímu povrchu molekuly (tPSA), který je poměrně dobře odhadnutelný přímo ze strukturního vzorce molekuly. Vypočtením hodnoty tPSA lze zjistit její schopnost vytvářet vodíkové vazby a predikovat tak její střevní absorpci i penetraci

hematoencefalickou bariérou. Rozměr PSA je v  $\text{\AA}^2$ , kde  $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ . Hodnota  $\text{PSA} \leq 70 \text{ \AA}^2$  by měla být upřednostňována pro zvýšení pravděpodobnosti propustnosti přes buněčné membrány a hematoencefalickou bariéru [77].

### Postup

K 1,5 ml *n*-oktanolu bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M a směs byla intenzivně protřepávána 15 min. Následně byl do křemenné kyvety odpipetován 1 ml této směsi a byla změřena její absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Takto získána hodnota absorbance odpovídala 100 % daného inhibitoru v *n*-oktanolu.

Ke směsi *n*-oktanolu a demineralizované vody (poměr 1:1, celkový objem 3 ml) bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Tato směs byla intenzivně protřepávána 15 min a poté centrifugována při 3000 ot./min po dobu 10 min. Následně byl do kyvety odpipetován 1 ml oktanolové vrstvy a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Srovnávacím prostředím byl vždy *n*-oktanol. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě  $(\%)_1$  a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě  $100 - (\%)_1$ . Ze získaných dat byly následně vypočteny hodnoty rozdělovacího koeficientu jednotlivých inhibitorů v soustavě *n*-oktanol:voda podle vztahu:

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

$c_1$ .....molární koncentrace inhibitoru v *n*-oktanolu

$c_2$ .....molární koncentraci inhibitoru ve vodě

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

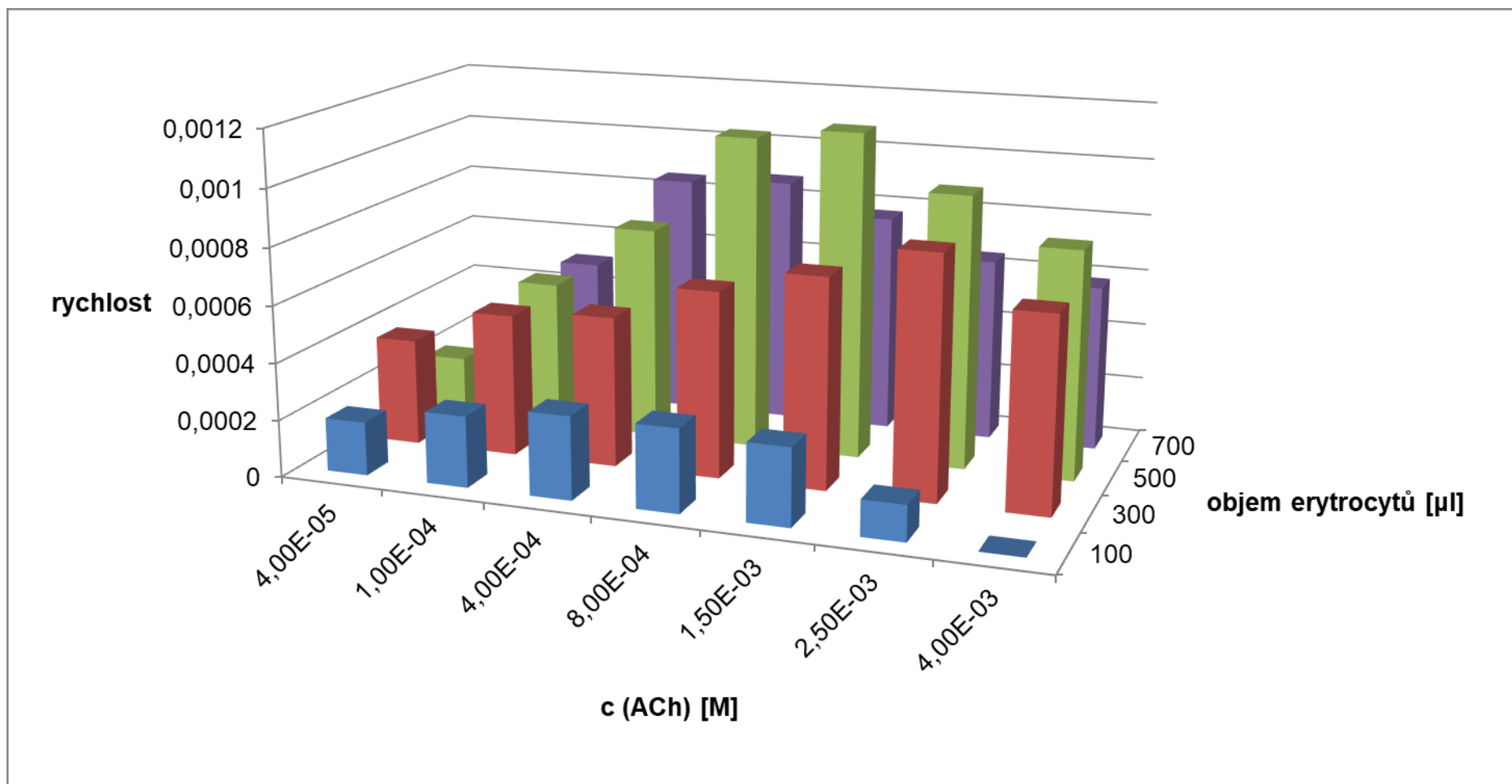
### 4.1.1 Měření aktivity lidských ChE

#### pH – METR

Za použití pH metru s kombinovanou elektrodou byly sledovány změny pH v jednotlivých reakčních směsích. Ze získaných změn pH na čase se následně spočítala rychlost reakce pro všechny testované kombinace substrátu a biologického materiálu. Celkem byly testovány 4 různé objemy biologického materiálu (erytrocyty nebo plazma) a 7 různých koncentrací substrátu (ACh nebo BCh). Z vypočtené rychlosti reakce byl sestrojen graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu a objemu biologického materiálu (pro erytrocyty a ACh graf 1, pro plazmu a BCh graf 2).

Při testování různých reakčních podmínek, pro získání optimálního měření aktivity lidských ChE, byla z těchto grafů vyhodnocena nevhodnější kombinace koncentrace substrátu a množství biologického materiálu v reakční směsi, která byla dále použita pro stanovení inhibiční účinnosti třech standardních inhibitorů cholinesteráz.

Obecně platí, že s rostoucí koncentrací substrátu roste rychlost enzymové reakce – do té doby, než se obsadí všechna aktivní centra daného enzymu. Rychlost reakce též vzrůstá společně s množstvím enzymu – za předpokladu dostatečného množství substrátu.



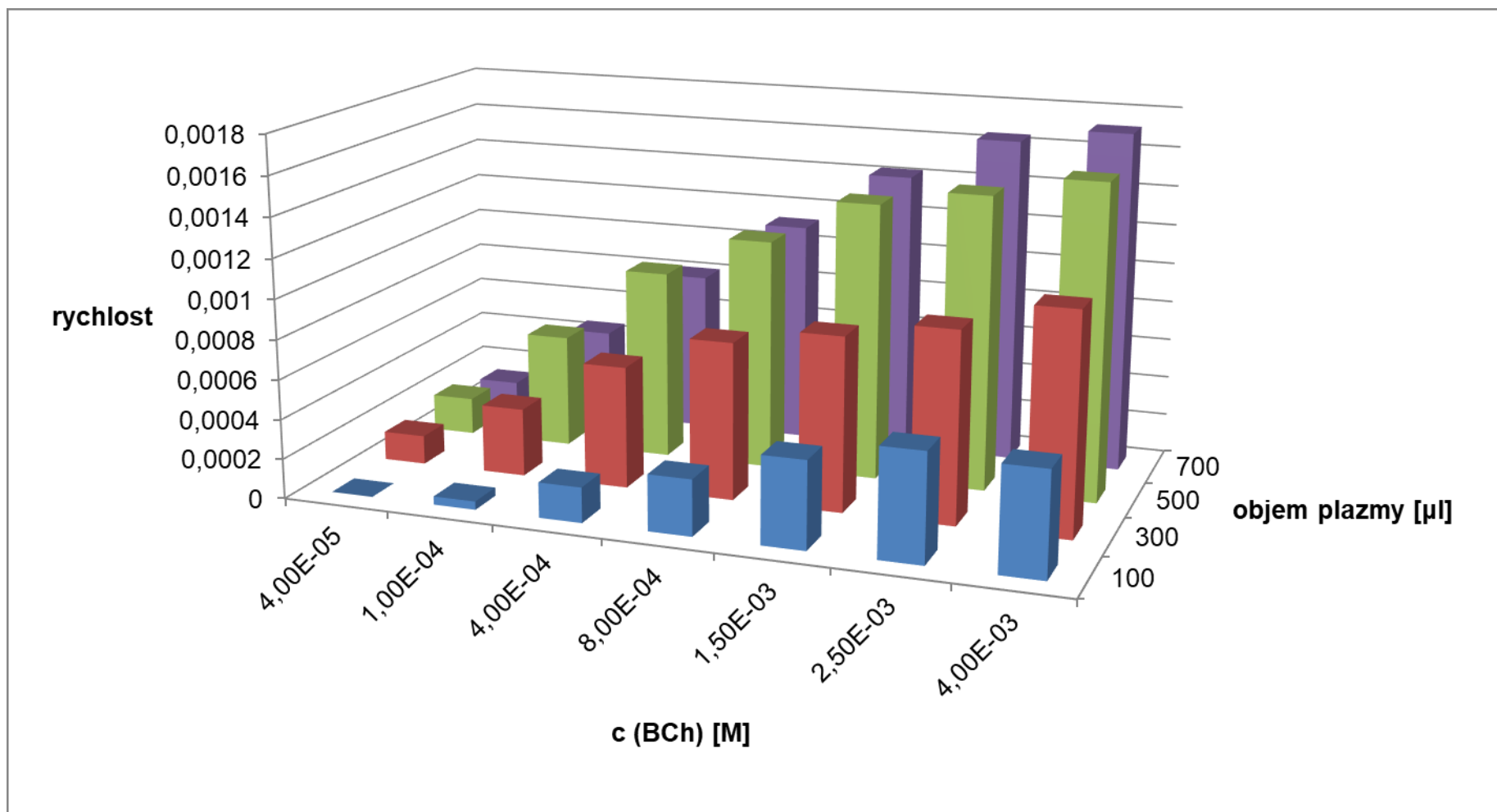
Graf 1 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrací acetylcholinu a množství erytrocytů v reakční směsi pro metodu pH-metr

Z grafu 1 je patrné, že s rostoucí koncentrací substrátu ACh vzrůstá rychlost enzymové reakce. Na druhou stranu, od určité koncentrace ACh však dochází u erytrocytů k poklesu reakční rychlosti (např. pro objem erytrocytů 500  $\mu\text{l}$  je to od koncentrace ACh  $2,5 \times 10^{-3}$  M). Tento fakt je zapříčiněn tím, že AChE, na rozdíl od BChE, podléhá substrátové inhibici (podrobný popis viz kapitola 1.2.2). To znamená, že při vysokých koncentracích substrátu, je daný enzym substrátem inhibován.

Rychlost reakce také roste společně s množstvím biologického materiálu (tedy objemem erytrocytů), dokud je v reakci dostatečné množství substrátu. Z grafu 1 je patrné, že ve většině případů při prvních třech objemech erytrocytů dochází k růstu rychlosti reakce, ale při objemu erytrocytů 700  $\mu\text{l}$  je reakční rychlost ve většině případů menší než u objemu erytrocytů 500  $\mu\text{l}$ .

Na základě grafického vyhodnocení byla vybrána nejvhodnější koncentrace substrátu a to  $8 \times 10^{-4}$  M v RS. Při této koncentraci ACh rychlost reakce stále roste, a to u všech testovaných objemů erytrocytů. Jako nejvhodnější objem erytrocytů byla vybrána hodnota 500  $\mu\text{l}$ , kde byly zaznamenány nejvyšší rozdíly reakční rychlosti mezi jednotlivými koncentracemi substrátu.

Tato kombinace množství erytrocytů (enzymu) a substrátu byla následně použita při měření inhibiční koncentrace standardních látek.



Graf 2 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrací butyrylcholinu a množství plazmy v reakční směsi pro metodu pH-metr



Je známo, že s rostoucí koncentrací substrátu vzrůstá společně rychlost enzymové reakce, tohoto jevu si můžeme všimnout i u grafu 2. U plazmy (enzymu BChE) nedochází k substrátové inhibici jako u erytrocytů (enzymu AChE, graf 1), proto nedochází při vyšších koncentracích k poklesu odezvy. Čím vyšší je koncentrace substrátu, tím více je reakce stimulována, avšak v okamžiku saturace enzymu substrátem by už k dalšímu zvyšování koncentrace substrátu nedocházelo. Odezva by zůstávala konstantní a rychlost enzymové reakce by nerostla.

Rychlost reakce roste i společně s množstvím enzymu (tedy objemem plazmy), pokud je v reakci dostatečné množství substrátu. Z grafu 2 je patrné, že k výraznému nárůstu reakční rychlosti dochází (ve většině případů) pouze u prvních čtyř koncentrací substrátu. S dalším zvyšováním koncentrace BCh dochází k pomalejšímu růstu reakční rychlosti.

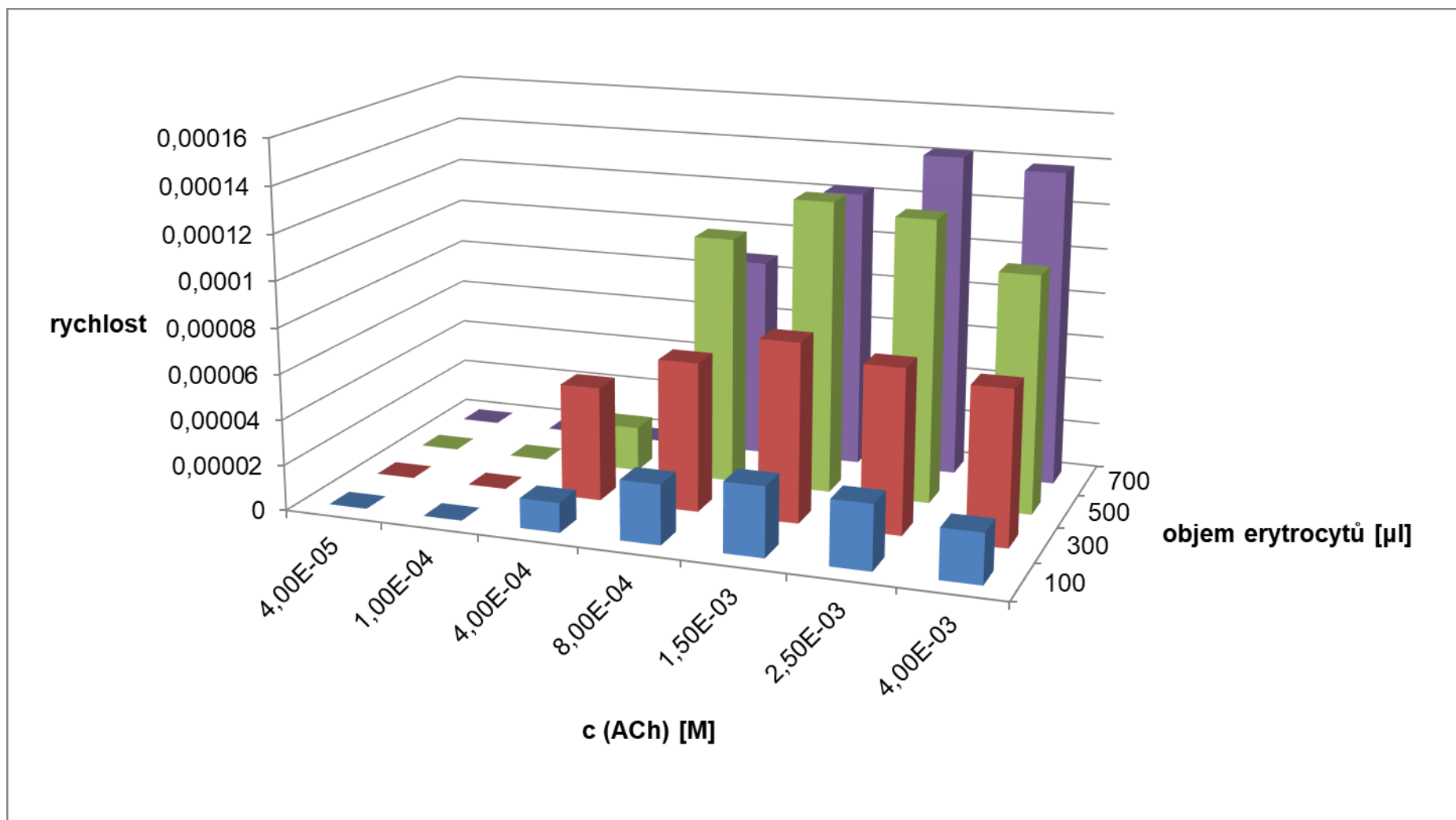
Abychom mohli porovnat inhibiční účinnosti testovaných standardních látek mezi enzymy, byla taktéž jako nejlepší kombinace vybrána koncentrace BCh  $8 \times 10^{-4}$  M a objem plazmy 500  $\mu$ l. Tato kombinace enzymu a substrátu byla následně použita při měření 50% inhibiční koncentrace standardních látek.

## **pH – STAT**

U této metody probíhalo měření pomocí automatického titrátoru, kdy docházelo ke kontinuální titraci vznikající kyseliny roztokem KOH. Z jeho objemové změny v čase byla následně vypočítaná reakční rychlost.

Na základě změřených dat byly spočítány rychlosti reakce u 4 různých objemů biologického materiálu a 7 různých koncentrací substrátu ve vzájemných kombinacích. Z vypočtené rychlosti reakce byl sestaven graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu a objemu biologického materiálu (pro erytrocyty a ACh graf 3, pro plazmu a BCh graf 4).

Pro získání optimálního měření aktivity lidských ChE, byla opět z grafů vyhodnocena nevhodnější kombinace koncentrace substrátu a množství enzymu v RS.



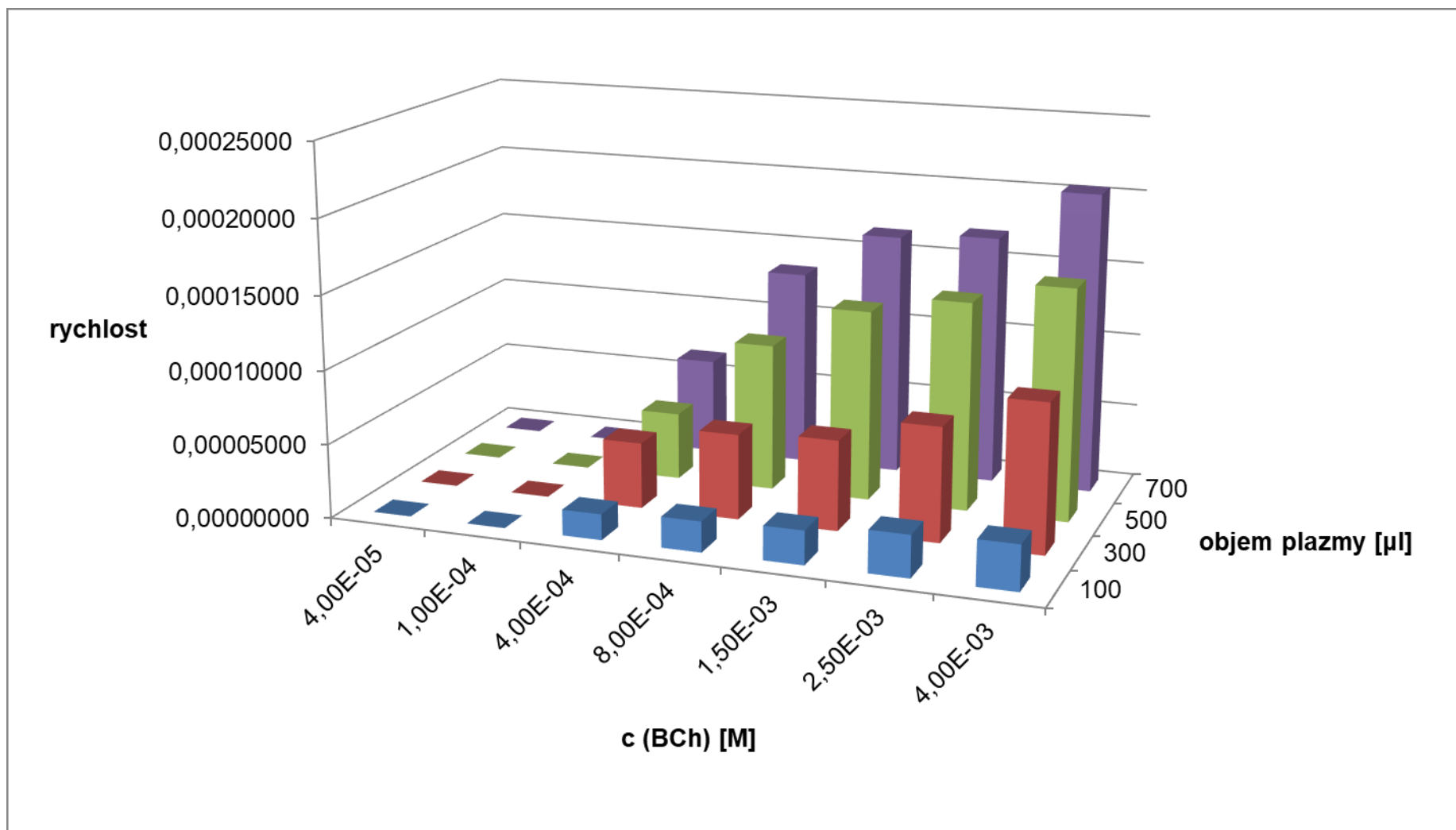
Graf 3 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrace acetylcholinu a množství erytrocytů v reakční směsi pro metodu pH-stat

Je známo, že s rostoucí koncentrací substrátu vzrůstá společně rychlost enzymové reakce. V grafu 3 si však můžeme všimnout, že u prvních dvou nejnižších koncentrací nedocházelo k žádné odezvě. Tato skutečnost mohla být způsobena tím, že změna pH při těchto koncentracích substrátu byla tak nízká, že ji přístroj nedokázal vyhodnotit. U dvou posledních nejvyšších koncentrací ACh můžeme opět pozorovat pokles reakční rychlosti (mimo objem 700  $\mu$ l), protože AChE podléhá substrátové inhibici – je inhibována substrátem.

Rychlost reakce je také úměrná koncentraci enzymu, to znamená, že roste společně s množstvím enzymu (tedy objemem erytrocytů), dokud je v reakci dostatečné množství substrátu.

V porovnání s pH-metr metodou jsou zde rychlosti reakce téměř o řád nižší. To může být způsobeno například jiným reakčním prostředím (přítomnost KCl a KOH).

Abychom metodu pH-stat mohly porovnat s metodou pH-metr, byla i zde vybrána jako nejvhodnější kombinace koncentrace substrátu ACh  $8 \times 10^{-4}$  M a 500  $\mu$ l erytrocytů, která byla následně použita pro stanovení 50% inhibiční koncentrace standardních látek.



Graf 4 Výsledný graf testovaných kombinací koncentrace butyrylcholinu a množství plazmy v reakční pro metodu pH-stat

Z grafu 4 je patrné, že s rostoucí koncentrací substrátu vzrůstá společně rychlost enzymové reakce. U prvních dvou nejnižších koncentrací však nedocházelo k žádné odezvě. To mohlo být opět způsobeno tím, že při takto malých koncentracích substrátu byla změna pH tak nízká, že ji přístroj nedokázal vyhodnotit. U plazmy (enzymu BChE) nedochází k substrátové inhibici jako u erytrocytů (enzym AChE), proto při vyšších koncentracích není přítomen pokles reakční rychlosti. Čím vyšší je koncentrace substrátu, tím více je reakce stimulována.

Víme také, že rychlost reakce roste společně s množstvím enzymu (tedy objemem plazmy), pokud je v reakci dostatečné množství substrátu. Z grafu 4 je patrné, že ve všech případech dochází k růstu rychlosti reakce v závislosti na objemu plazmy.

V porovnání s pH-metr metodou jsou zde rychlosti reakce opět téměř o řád nižší – příčinou může být jiné reakční prostředí (přítomnost KCl a KOH).

Abychom mohli porovnat inhibiční účinnost testovaných standardů mezi metodami a zároveň jejich působení na AChE a BChE, byla i pro tuto metodu vybrána kombinace koncentrace substrátu  $8 \times 10^{-4}$  M a 500  $\mu$ l plazmy. Tato kombinace byla následně použita při měření 50% inhibiční koncentrace standardních látek.

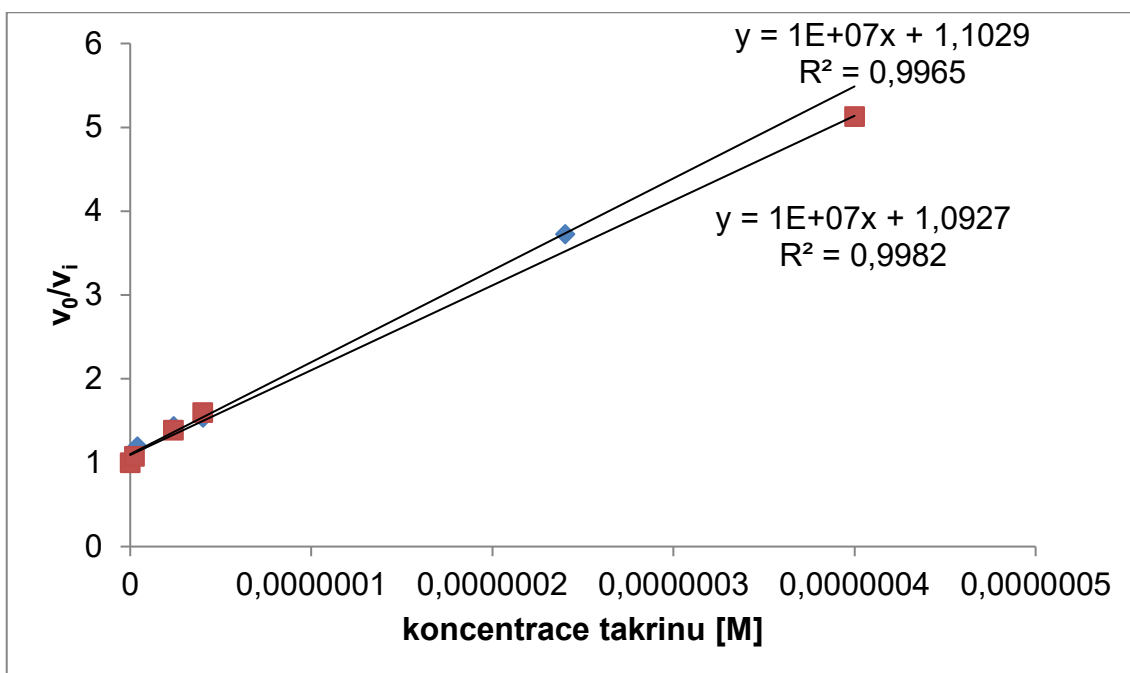
#### **4.1.2 Stanovení inhibiční účinnosti standardních látek při inhibici lidské AChE a BChE**

Z definice  $IC_{50}$  vyplývá, že nejúčinnější inhibitor je takový, který má nejnižší hodnotu  $IC_{50}$ . Pro pH-metrovou a pH-statovou metodu se výsledky inhibiční koncentrace mírně lišily, a to pro obě cholinesterázy.

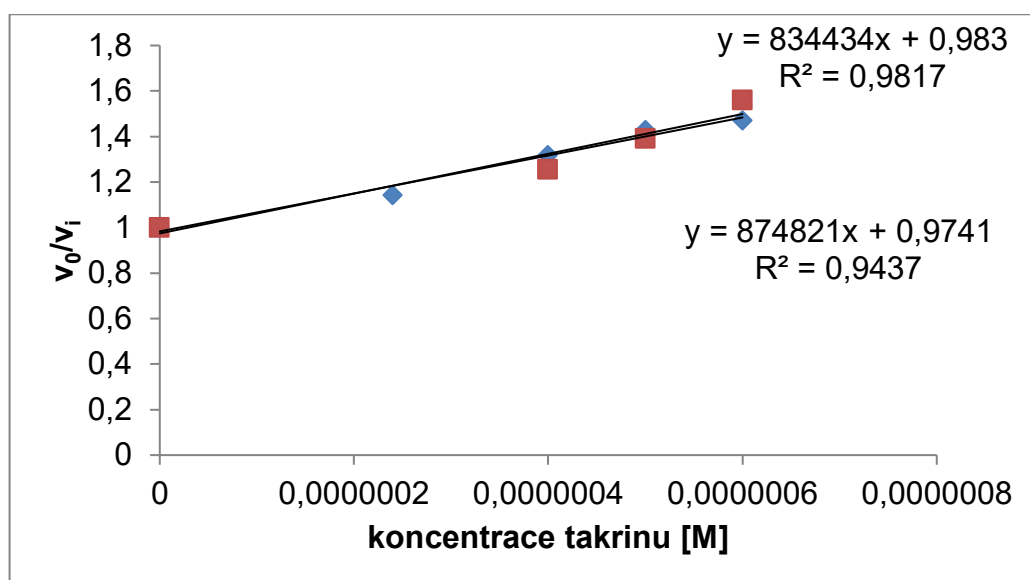
#### **pH – METR**

Pomocí metody pH-metr byly ze změny pH v čase vypočteny hodnoty rychlosti neinhibované a inhibované reakce. Ze závislosti  $v_0/v_i$  vs.  $[I]$  byly určeny hodnoty  $IC_{50}$ , a to pro tři standardní inhibitory (galantamin, rivastigmin a takrin).

Příklad přímkové závislosti  $v_0/v_i$  vs.  $[I]$  pro stanovení inhibiční účinnosti takrinu (při inhibici lidské AChE) a galantaminu (při inhibici lidské BChE) je zobrazen v grafu 5 a 6.



Graf 5 Závislost  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] pro inhibovanou hydrolýzu ACh katalyzovanou AChE a inhibovanou takrinem, metoda pH-metr



Graf 6 Závislost  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] pro inhibovanou hydrolýzu BCh katalyzovanou BChE a inhibovanou galantaminem, metoda pH-metr

Sestrojené přímkové závislosti byly proloženy lineární spojnicí trendu a byly zobrazeny rovnice regrese – viz Tabulka 1.

**Tabulka 1 Vzorový výpočet hodnoty IC<sub>50</sub> pro inhibitor takrin, substrát ACh a enzym AChE, metoda pH-metr (graf 5)**

měření 1	měření 2
rovnice regrese	
$y = 1 \times 10^7 x + 1,1029$	$y = 1 \times 10^7 x + 1,0927$
$2 = 1 \times 10^7 x + 1,1029$	$2 = 1 \times 10^7 x + 1,0927$
$x = 8,97 \times 10^{-8} \text{ M}$	$x = 9,07 \times 10^{-8} \text{ M}$
aritmetický průměr z obou měření	
<b>IC<sub>50</sub> = 9,02 × 10<sup>-8</sup> M</b>	

Hodnoty IC<sub>50</sub> lze vypočítat z rovnice přímky, procházející body (0;1) tedy ([I]; v<sub>0</sub>/v<sub>i</sub>), pro v<sub>0</sub>/v<sub>i</sub> = 2 (vyplývá z definice IC<sub>50</sub>). Hodnoty IC<sub>50</sub> testovaných inhibitorů byly zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou – viz Tabulka 2.

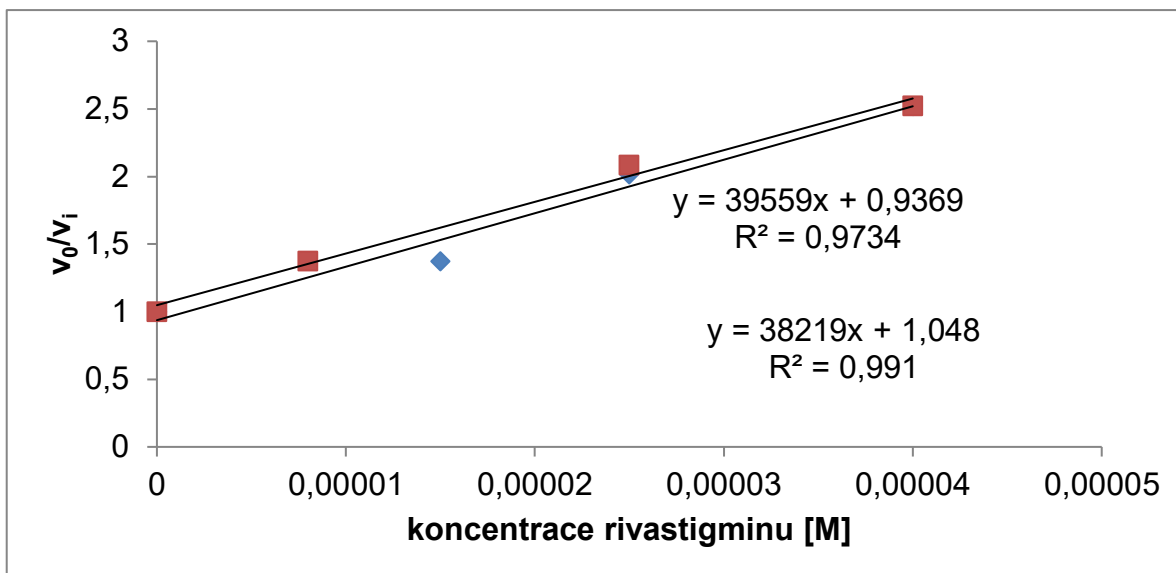
**Tabulka 2 Hodnoty inhibiční koncentrace testovaných inhibitorů získané metodou pH-metr**

inhibitor	hodnoty IC <sub>50</sub> [μM]	
	AChE	BChE
<b>rivastigmin</b>	14,00 ± 0,16	0,70 ± 0,30
<b>galantamin</b>	0,31 ± 1,89 × 10 <sup>-3</sup>	1,20 ± 0,03
<b>takrin</b>	0,09 ± 7,21 × 10 <sup>-4</sup>	0,02 ± 6,23 × 10 <sup>-4</sup>

U pH-metr metody u obou použitých enzymů byl nejúčinnějším z testovaných inhibitorů takrin. U zbylých dvou inhibitorů – galantaminu a rivastigminu docházelo k účinnější inhibici AChE v kombinaci s ACh.

### **pH – STAT**

Ze získaných hodnot reakčních rychlostí byl sestaven graf závislosti podílu reakčních rychlostí v<sub>0</sub>/v<sub>i</sub> na koncentraci inhibitoru [I]. Příklad závislosti poměru rychlostí v<sub>0</sub>/v<sub>i</sub> na koncentraci inhibitoru [I] pro AChE je znázorněn v grafu 7.



Graf 7 Příklad vyhodnocení inhibiční účinnosti rivastigminu na lidskou AChE, metoda pH-stat

Hodnota  $IC_{50}$  byla následně vypočtena z rovnice regrese stejným postupem jako u metody pH-metr a získané hodnoty inhibičních koncentrací jsou uvedené v Tabulce 3.

Tabulka 3 Hodnoty  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů získané metodou pH-stat

inhibitor	hodnoty $IC_{50}$ [ $\mu M$ ]	
	AChE	BChE
rivastigmin	$25,89 \pm 1,39$	$10,58 \pm 1,33$
galantamin	$0,31 \pm 5,61 \times 10^{-3}$	$6,48 \pm 0,07$
takrin	$0,05 \pm 8,34 \times 10^{-4}$	$0,04 \pm 3,39 \times 10^{-4}$

Z výsledků 50% inhibiční koncentrace získaných pH-statovou metodou je patrné, že takrin působil největší inhibiční silou na oba testované enzymy.

Řádově jsou hodnoty  $IC_{50}$  u galantaminu a takrinu stejné jako u pH-metr metody, ale hodnoty rivastigminu jsou u obou použitých enzymů o řád vyšší. Odlišnosti mezi výsledky hodnot  $IC_{50}$  získaných těmito dvěma metodami mohou být způsobeny několika příčinami. Například použití různých reakčních podmínek může mít na měření velký vliv. Oproti pH-metr metodě, kde RS obsahovala pouze



vodu, krev/plazmu, substrát případně inhibitor se u pH-statové metody navíc přidávaly KCl a KOH, které mohly měření ovlivnit.

Jelikož se jednalo o vzorky lidské krve, je nutné vzít v úvahu také obsah různých látek v krvi a jejich vliv na výsledné hodnoty.

Nicméně i přes rozdílné výsledky u obou metod lze dojít k jednoznačnému závěru ohledně nejúčinnějšího inhibitoru pro AChE a BChE a tím je takrin. Také lze jednoznačně říci, že z těchto tří inhibitorů je nejméně účinný rivastigmin.

#### 4.1.3 Stanovení rozdělovacích koeficientů testovaných inhibitorů v systému *n*-oktanol:voda a tPSA

Hodnota  $K_{ow}$  v soustavě *n*-oktanol:voda je definována jako podíl koncentrace chemické látky (v našem případě daného inhibitoru) v nepolární organické fázi *n*-oktanolu a v polární vodné fázi.  $K_{ow}$  mezi vodnou a nepolární fází udává poměr, v jakém se léčivo rozdělí mezi vodnou fázi a lipidovou dvojvrstvou biomembrány.  $K_{ow}$  je bezrozměrná veličina a obvykle je vyjádřena v logaritmickeém tvaru  $\log P$ . Její hodnota závisí na pH, teplotě a iontové síle [77,78].

Hodnoty  $K_{ow}$  (resp.  $\log P$ ) pro testované inhibitory byly vypočteny dle již zmíněného vztahu (viz kapitola 3.2.4) a jsou uvedeny v tabulce 4. Kromě experimentálních výsledků  $\log P$  jsou zde uvedeny i teoretické hodnoty spočítané programy ChemSketch a ChemDraw pro jednotlivé inhibitory.

**Tabulka 4 Experimentální a teoretické hodnoty rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě *n*-oktanol:voda při laboratorní teplotě**

Testovaný inhibitor	$\log P$	$\log P$	$C\log P$
	experiment	ChemSketch	ChemDraw
rivastigmin	1,21 ± 0,21	2,14	1,401
galantamin	1,43 ± 0,10	1,74	0,23
takrin	2,45 ± 0,25	3,32	1,80

Hodnoty  $\log P$  získané těmito třemi způsoby se od sebe u některých inhibitorů lišily. Ideální rozmezí hodnot 4-5 podle pravidla Lipinského tyto inhibitory nesplňují, budou tedy hydrofilní (dobře rozpustné v krvi).

Hodnoty tPSA jednotlivých inhibitorů byly stanoveny na základě analýzy struktury jejich molekuly pomocí počítačového programu ChemDraw – viz tabulka 5.

**Tabulka 5 Teoretické hodnoty topologického polárního povrchu molekuly testovaných inhibitorů**

<b>Testovaný inhibitor</b>	<b>tPSA [Å<sup>2</sup>] ChemDraw</b>
rivastigmin	32,78
galantamin	41,93
takrin	0

Stanovením hodnoty tPSA bylo určeno, do jaké míry se molekula léku bude vstřebávat v gastrointestinálním traktu, či zda bude naopak procházet hematoencefalickou bariérou.

Porovnáním vypočtených hodnot tPSA a experimentálně stanovených hodnot  $K_{ow}$  bylo usouzeno, že testované inhibitory budou dobře absorbovány ve střevech. Nízké hodnoty tPSA u testovaných inhibitorů sice naznačují opak, ale směrodatnějším ukazatelem je právě hodnota rozdělovacího koeficientu, podle níž jsou i tyto látky hydrofilní.

## ZÁVĚR

Tato diplomová práce je věnovaná cholinesterázám a jejich inhibitorům. Jsou zde popsány analytické metody pro stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz. Hlavní důraz je kladen na dvě metody – pH-metr a pH-stat, které jsem využívala v experimentální části.

Pomocí změny pH jsem za použití výše zmíněných metod testovala různé reakční podmínky za účelem získání optimálních podmínek, které byly následně použité pro stanovení aktivity lidských cholinesteráz a inhibiční účinnost standardních látek. Pro obě testované metody byl vyhodnocen také nejúčinnější inhibitor, kterým byl takrin.

Metoda pH-metr měla oproti metodě pH-stat řadu výhod. Byla časově méně náročná, nebyly zde přidávány roztoky KCl a KOH, které mohly měření ovlivnit, a celková odezva rychlosti reakce byla lepší. Metoda pH-stat měla však výhodu automatického zaznamenávání hodnot během měření.

Pro studované inhibitory byl také stanoven rozdělovací koeficient a polární povrch molekuly. Testované látky měly hodnoty nižší než 6, ale ke snadnému přestupu přes membrány potřebují mít hodnotu vyšší. Tyto látky jsou proto lipofóbní a tedy dobře rozpustné ve vodném prostředí – tedy krvi.

## CITOVANÁ LITERATURA

1. Giacobini, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacological research* **2004**, *50*, 433–440.
2. Patocka, J.; Kuca, K.; Jun, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. *Acta medica (Hradec Kralové)* **2004**, *47*, 215–228.
3. Vališ, M.; Kalnická, D. Novinky ve farmakoterapii demencí. *Neurologie pro praxi* **2011**, *12*, 33–35.
4. Pidrman, V. Farmakoterapie demencí. *Solen* **2008**, *5*, 407–409.
5. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7*, 1207–1223.
6. Rylett, R.J.; Schmidt, B.M. Chapter 18: Regulation of the synthesis of acetylcholine. *Progress in Brain Research* **1993**, *98*, 161–166.
7. Davis, L.; Britten, J.J.; Morgan, M. Cholinesterase. Its significance in anaesthetic practice. *Anaesthesia* **1997**, *52*, 244–260.
8. Lewalter, J.; Domik, C. Acetylcholinesterase (AChE; Acetylcholine-Acetylhydrolase EC 3.1.1.7) and Cholinesterase (ChE; Acylcholine-Acylhydrolase EC 3.1.1.8) [Biomonitoring Methods, 1991]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety* **2012**; 45–61.
9. Naik, R.S.; Liu, W.; Saxena, A. Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals. *Journal of Applied Toxicology* **2013**, *33*, 290–300.
10. Rakonczay, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica* **2003**, *54*, 183–189.
11. Xi, H.J.; Wu, R.P.; Liu, J.J.; Zhang, L.J.; Li, Z.S. Role of acetylcholinesterase in lung cancer. *Thorac Cancer* **2015**, *6*, 390–398.
12. Silman, I.; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinion in pharmacology*

**2005**, 5, 293–302.

13. Ostergaard, D.; Viby-Mogensen, J.; Hanel, H.K.; Skovgaard, L.T. Half-life of plasma cholinesterase. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **1988**, 32, 266–269.
14. Paes, A.M.; Carniatto, S.R.; Francisco, F.A.; Brito, N.A.; Mathias, P.C. Acetylcholinesterase activity changes on visceral organs of VMH lesion-induced obese rats. *The International Journal of neuroscience* **2006**, 116, 1295–1302.
15. Santarpia, L.; Grandone, I.; Contaldo, F.; Pasanisi, F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **2013**, 4, 31–39.
16. Rosenman, K.D.; Guss, P.S. Prevalence of Congenital Deficiency in Serum Cholinesterase. *Archives on environ.mental health* **1997**, 52, 42–44.
17. Coelho F.; Birks, J. Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease. The *Cochrane database of systematic reviews* **2001**, CD001499.
18. Anand, R.; Gill, K.D.; Mahdi, A.A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology* **2014**, 76, 27–50.
19. Greig, N.H.; Utsuki, T.; Yu, Q.; Zhu, X.; Holloway, H.W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D.K.; Lahiri, D.K. A New Therapeutic Target in Alzheimer's Disease Treatment: Attention to Butyrylcholinesterase. *Current medical research opinion* **2001**, 17, 159–165.
20. Birks, J.S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2006**, CD005593.
21. Corey-Bloom, J. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease and vascular dementia. *International journal of clinical practise* **2003**, 57, 219–223.
22. Lemstra, A.W.; Eikelenboom, P.; van Gool, W.A. The Cholinergic Deficiency Syndrome and Its Therapeutic Implications. *Gerontology* **2003**, 49, 55–60.
23. Mohamed, L.W.; Abuel-Maaty, S.M.; Mohammed, W.A.; Galal, M.A.

- Synthesis and biological evaluation of new oxopyrrolidine derivatives as inhibitors of acetyl cholinesterase and  $\beta$  amyloid protein as anti – Alzheimer's agents. *Bioorganic chemistry* **2018**, 76, 210–217.
24. Inglis, F. The tolerability and safety of cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *International journal of clinical practise. Supplement* **2002**, 45–63.
  25. Lane, R.M.; Potkin, S.G.; Enz, A. Targeting acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in dementia. *The international journal of neuropsychopharmacology* **2005**, 9, 101-124.
  26. Poirier, J. Evidence that the clinical effects of cholinesterase inhibitors are related to potency and targeting of action. *International journal of clinical practise. Supplement* **2002**, 6–19.
  27. Waldemar, G.; Dubois, B.; Emre, M.; Georges, J.; McKeith, I.G.; Rossor, M.; Scheltens, P.; Tariska, P.; Winblad, B. Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European journal of neurology* **2007**, 14, 1-26.
  28. Kurz, A.; Farlow, M.; Lefèvre, G. Pharmacokinetics of a novel transdermal rivastigmine patch for the treatment of Alzheimer's disease: a review. *International journal of clinical practise* **2009**, 63, 799–805.
  29. Doody, R.S. Current treatments for Alzheimer's disease: cholinesterase inhibitors. *The journal of clinical psychiatry* **2003**, 64 9, 11–17.
  30. Kikuchi, T.; Okamura, T.; Arai, T.; Obata, T.; Fukushi, K.; Irie, T.; Shiraishi, T. Use of a novel radiometric method to assess the inhibitory effect of donepezil on acetylcholinesterase activity in minimally diluted tissue samples. *British journal of pharmacology* **2010**, 159, 1732–1742.
  31. Marangoni, A.G. *Enzyme Kinetics*; John Wiley & Sons **2002**, 248, ISBN: 978-0-471-15985-8.
  32. Hollenberg, P.F. *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications*; John Wiley & Sons **2009**, 1064, ISBN: 978-0-470-11803-0.
  33. Krupka, R.M.; Laidler, K.J. *Molecular Mechanisms for Hydrolytic Enzyme*

- Action. I. Apparent Non-competitive Inhibition; Acetylcholinesterase and Non-competitive Inhibition. *Journal of the American Chemical Society*, **1961**, 83, 1445-1447.
34. Engelking, L.R. Enzyme Kinetics. *Textbook of veterinary physiological chemistry* **2015**, 32–38.
35. Silverman, R.B. Enzyme Inhibition. *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*; **2008**, 1–19.
36. Muscate, A.; Levinson, C.L.; Kenyon, G.L. Enzyme Inhibitors. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons **2000**.
37. Grossberg, G.T.; Stahelin, H.B.; Messina, J.C.; Anand, R.; Veach, J. Lack of adverse pharmacodynamic drug interactions with rivastigmine and twenty-two classes of medications. *International journal geriatric psychiatry* **2000**, 15, 242–247.
38. Perrotta, G.; Bonnier, G.; Meskaldji, D.E.; Romascano, D.; Aydarkhanov, R.; Daducci, A.; Simioni, S.; Cavassini, M.; Metral, M.; Lazeyras, F.; et al. Rivastigmine decreases brain damage in HIV patients with mild cognitive deficits. *Annals of clinical transition neurology* **2017**, 4, 915–920.
39. Cummings, J.; Lefevre, G.; Small, G.; Appel-Dingemanse, S. Pharmacokinetic rationale for the rivastigmine patch. *Neurology* **2007**, 69, 10–13.
40. Lane, R.M. Pharmacokinetic drug interaction potential of selective serotonin reuptake inhibitors. *International clinical psychopharmacology* **1996**, 11 Supplement 5, 31–61.
41. Carcenac, D.; Martin-Hunyadi, C.; Kiesmann, M.; Demuynck-Roegel, C.; Alt, M.; Kuntzmann, F. Extra-pyramidal syndrome induced by donepezil. *Presse medicale* **2000**, 29, 992–993.
42. Crismon, M.L. Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease. *The Annals of pharmacotherapy* **1994**, 28, 744–751.
43. Pavliš, Oto; Pohanka, M. Rozdělení Inhib. cholinesteráz. *Zpravodaj vojenského zdravotnictví* **2013**, 23, 32–36.

44. Moss, D.E.; Fariello, R.G.; Sahlmann, J.; Sumaya, I.; Pericle, F.; Braglia, E. A randomized phase I study of methanesulfonyl fluoride, an irreversible cholinesterase inhibitor, for the treatment of Alzheimer's disease. *British journal of Clinical Pharmacology* **2013**, *75*, 1231–1239.
45. Alzheimer's Association. 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *The journal of the Alzheimer's Association* **2018**, *14*, 367–429.
46. Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures. *The journal of the Alzheimer's Association* **2014**, *10*, 47-92.
47. 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. *Journal of neurochemistry* **1986**, *47*, 263–277.
48. Cummings, J.L.; Cole, G. Alzheimer disease. *JAMA* **2002**, *287*, 2335–2338.
49. Geda, Y.E.; Schneider, L.S.; Gitlin, L.N.; Miller, D.S.; Smith, G.S.; Bell, J.; Evans, J.; Lee, M.; Porsteinsson, A.; Lanctôt, K.L.; et al. Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Past progress and anticipation of the future. *Alzheimer's Dementia* **2013**, *9*, 602–608.
50. Fernández, M.; Gobartt, A.L.; Balañá, M.; COOPERA Study Group Behavioural symptoms in patients with Alzheimer's disease and their association with cognitive impairment. *BMC neurology* **2010**, *10*, 87-96.
51. van Laar, T.; De Deyn, P.P.; Aarsland, D.; Barone, P.; Galvin, J.E. Effects of Cholinesterase Inhibitors in Parkinson's Disease Dementia: A Review of Clinical Data. *CNS Neuroscience and Therapeutics* **2011**, *17*, 428–441.
52. Jankovic, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery and psychiatry* **2008**, *79*, 368–376.
53. Werber, E.A.; Rabey, J.M. The beneficial effect of cholinesterase inhibitors on patients suffering from Parkinson's disease and dementia. *Journal of neural transmission* **2001**, *108*, 1319–1325.
54. Perry, E.; McKeith, I.; OF, R.P.I.J. Undefined Dementia with Lewy bodies: a common cause of dementia with therapeutic potential. *Stockton* **1998**.



55. Bhasin, M.; Rowan, E.; Edwards, K.; McKeith, I. Cholinesterase inhibitors in dementia with Lewy bodies—a comparative analysis. *International journal of geriatric psychiatry* **2007**, *22*, 890–895.
56. Kishnani, P.S.; Sullivan, J.A.; Walter, B.K.; Spiridigliozzi, G.A.; Doraiswamy, P.M.; Krishnan, K.R. Cholinergic therapy for Down's syndrome. *Lancet* **1999**, *353*, 1064–1065.
57. Naik, R.S.; Doctor, B.P.; Saxena, A. Comparison of methods used for the determination of cholinesterase activity in whole blood. *Chemico-biological interactions* **2008**, *175*, 298–302.
58. American Society of Clinical Pathologists. American journal of clinical pathology, *Williams & Wilkins* **1931**, *26*, 8, 945-955.
59. Bajgar, J. Intoxikace organofosforovými inhibitory cholinesteráz: účinek, diagnóza a terapie. *Avicenum* **1985**.
60. Wilson, B.W.; Henderson, J.D. Determination of Cholinesterase in Blood and Tissue. *Current Protocols in Toxicology* **2007**; *34*, 12-13.
61. Silver, A. The biology of cholinesterases; *North-Holland Publishing company* **1974**; ISBN 9780444106520.
62. Gruss, R.; Scheller, F.; Shao, M.J.; Liu, C.C. Electrochemical Determination of Cholinesterase Activity and Indication of Its Inhibitors Using A Thick-Film Metallized Platinum Electrode. *Analytical letteres* **1989**, *22*, 1159–1169.
63. Šinko, G.; Čalić, M.; Bosak, A.; Kovarik, Z. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical biochemistry* **2007**, *370*, 223–227.
64. Komersa, K.; Kovářová, M.; Štěpánková, Š.; Čegan, A.; Pařík, P. New Method for the Determination of the Half Inhibition Concentration (IC50) of Cholinesterase Inhibitors. *Zeitschrift für Naturforsch* **2015**, *68*, 133–138.
65. Aldridge, W.N.; Davies, D.R. Determination of cholinesterase activity in human blood. *British medical journal* **1952**, *1*, 945–947.
66. Mohammad, F.K.; Alias, A.S.; Ahmed, O.A.H. Electrometric measurement

- of plasma, erythrocyte, and whole blood cholinesterase activities in healthy human volunteers. *Journal of medical toxicology* **2007**, *3*, 25–30.
67. Chatonnet, A.; Lockridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemistry journal* **1989**, *260*, 625–634.
  68. Augustinsson, K.B.; Axenfors, B. Aromatic thiol esters as substrates in quantitative esterase determinations. *Analytical biochemistry* **1972**, *48*, 428–436.
  69. Nabb, D.P.; Whitfield, F. Determination of Cholinesterase by an Automated pH Stat Method. *Archives on Environmental Health: An International journal* **1967**, *15*, 147–154.
  70. Ashby, T.M.; Suggs, J.E.; Jue, D. Detection of Atypical Cholinesterase by an Automated pH Stat Method Report of a Family with Both Atypical and Silent Gene Alleles. *Clinical chemistry* **1970**, *16*, 503–506.
  71. Ingkaninan, K.; de Best, C.M.; van der Heijden, R.; Hofte, A.J.; Karabatak, B.; Irth, H.; Tjaden, U.R.; van der Greef, J.; Verpoorte, R. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A* **2000**, *872*, 61–73.
  72. de Jong, C.F.; 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. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 303–310.
  73. Kikuchi, T.; Okamura, T.; Arai, T.; Obata, T.; Fukushi, K.; Irie, T.; Shiraishi, T. Use of a novel radiometric method to assess the inhibitory effect of donepezil on acetylcholinesterase activity in minimally diluted tissue samples. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *159*, 1732–1742.
  74. Kumaran, S.; Morita, M. Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil. *Talanta* **1995**, *42*, 649–655.
  75. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K. Amperometric Biosensors for Real Time Assays of Organophosphates. *Sensors* **2008**, *8*, 5303–5312.

76. Kao, L.T.-H.; Gratzl, M. Serum cholinesterase assay using a reagent-free micro pH-stat. *Analytical Biochemistry* **2009**, *389*, 93–96.
77. Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technology* **2004**, *1*, 337–341.
78. Dostálek, M. Farmakokinetika; *Grada Publishing a.s.* **2006**; ISBN 8024766620.