

**UNIVERZITA PARDUBICE**

**Fakulta chemicko-technologická**

**STANOVENÍ INHIBIČNÍCH AKTIVIT VYBRANÝCH SCHIFFOVÝCH  
BÁZÍ VŮČI ENZYMŮM**

**Bc. Renato Lizarzaburo Ancajima**

**Diplomová práce**

**2019**

**UNIVERSITY OF PARDUBICE**  
**Faculty of Chemical Technology**

**DETERMINATION OF INHIBITORY ACTIVITIES OF SELECTED  
SCHIFF BASES TO ENZYMES**

**Bc. Renato Lizarzaburo Ancajima**

**Master thesis**

**2019**

Skenovani zadani



## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

---

Renato Lizarzaburo

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Vladimíru Pejchalovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále bych rad poděkoval Mrg. Šárce Štěpankové, Ph.D. za cenné rady, podporu a čas, který mi věnovala v průběhu měření. Poděkování patří také celé mé rodině za veškerou podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Moje diplomová práce se zabývala studiem enzymů cholinesteráz (acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy) a jejich možných inhibitorů. Teoretická část této práce se zabývá popisem jejich struktury, funkce a významu v organismu. Dále se věnuje inhibici cholinesteráz, klasifikaci a vlastní struktuře různých inhibitorů. V teoretické části této práce jsou popsány metody stanovení anticholinergních aktivit inhibitorů a také je popis Schiffových bází, které budou v této práci experimentovány.

V experimentální části se tato práce zabývá stanovením aktivity enzymového preparátu (acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy) a hodnot  $IC_{50}$  studovaných inhibitorů pomocí kolorimetrické Ellmanovy metody. Experimentální část je také věnována stanovení rozdělovacího koeficientu  $K_{ow}$  studovaných inhibitorů v systému 1-oktanol:voda.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, inhibitory cholinesteráz, Ellmanova metoda, Schiffovy báze, Alzheimerova choroba

## **ANNOTATION**

My diploma thesis dealt with the study of cholinesterase enzymes (Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase) and their possible inhibitors. The theoretical part of this work deals with the description of their structure, function and importance in the body. It also deals with cholinesterase inhibition, classification and structure of various inhibitors. In the theoretical part of this work are described methods of determination of anticholinergic activities of inhibitors and also the description of Schiff bases, which will be experimented in this work

In the experimental part, this work deals with the determination of the enzyme preparation activity (Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase) and  $IC_{50}$  values of the studied inhibitors using the colorimetric Ellman's method. The experimental part is also dedicated to the determination of the partition coefficient (P) of the studied inhibitors in the 1-octanol:water system.

## **KEYWORDS**

Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase, cholinesterase inhibitors, Ellman's method, Schiff bases, Alzheimer's disease

## **TITLE**

Determination of inhibitory activities of selected schiff bases to enzymes



## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
Acetyl-CoA	Acetyl-koenzym A
AD	Alzheimerova choroba
AEP	Aktivity enzymového preparátu
ATCh	Acetylthiocholin
ATChCl	Acetylthiocholin chlorid
BCh	Butyrylcholin
BChE	Butyrylcholinesteráza
CB	Karbamáty
Ch	Cholin
ChAT	Cholinacetyltransferáza
ChE	Cholinesteráza (cholinesterázy)
CNS	Centrální nervový systém
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
Da	Dalton (jednotka)
DM	Diabetes Mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
E-P	Komplex enzym-produkt
E-S	Komplex enzym-substrát
GIT	Gastrointestinální trakt

HA	Kyselina octová (acetic acid)
Hb	Hemoglobin
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HUGO	HUman Genome Organization
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace (způsobí 50% inhibici enzymu)
K <sub>ow</sub>	Rozdělovací koeficient
M <sub>r</sub>	Molekulová hmotnost
OP	Organofosfáty
OPP	Organofosfátové pesticidy
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
PSA	Polární povrch molekuly (polar surface area)
RS	Reakční směs
TEEP	Tetraethylpyrofosfát (insekticid)
TNB <sup>-</sup>	5-mekapto-2-nitrobenzoový aniont
VaD	Vaskulární demence
VX	Venomous agent X (jedovatý agens X)

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Mechanismus působení enzymu a tvorba komplexu .....	19
Obrázek 2 Struktura AChE.....	21
Obrázek 3 Role AChE na synaptické štěrbině .....	22
Obrázek 4 Strukturní vzorec ACh.....	23
Obrázek 5 Syntéza a degradace ACh.....	23
Obrázek 6 Struktura denezepilu.....	26
Obrázek 7 Struktura rivastigminu .....	27
Obrázek 8 Struktura galantaminu.....	28
Obrázek 9 Struktura takrinu .....	29
Obrázek 10 Struktury huperzinu A a B.....	29
Obrázek 11 Struktura karbamátů .....	30
Obrázek 12 Obecná struktura organofosfátů .....	31
Obrázek 13 Struktury vybraných nervových látek .....	35
Obrázek 14 Princip Ellmanovy metody .....	38
Obrázek 15 Princip fluorimetrického stanovení AChE.....	39
Obrázek 16 Strukturní vzorec Schiffových bází.....	42
Obrázek 17 Příprava Schiffových bází .....	42

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Příklad závislosti absorbance A na čase t při stanovení aktivity AChE .	66
Graf 2 Příklad závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I] č. 1 u AChE .....	68
Graf 3 Příklad závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I] č. 1 u BChE .....	68

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Výsledky změřených hodnot $IC_{50}$ .....	70
Tabulka 2 Hodnoty $K_{ow}$ testovaných inhibitorů .....	71

## OBSAH

1 ÚVOD.....	17
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	18
2.1 Enzymy.....	18
2.1.1 Role enzymů v organismu.....	18
2.1.2 Mechanismus působení .....	18
2.2 Cholinesterázy.....	19
2.2.1 Acetylcholinesteráza .....	20
2.2.1.1 Struktura AChE.....	20
2.2.1.2. Funkce AChE .....	21
2.2.1.3 Acetylcholin .....	22
2.2.1.3.1 Syntéza a degradace ACh .....	23
2.2.2 Butyrylcholinesteráza .....	24
2.2.2.1 Struktura BChE.....	24
2.3 Inhibice cholinesteráz .....	24
2.3.1 Význam inhibitorů cholinesteráz .....	25
2.3.2 Klasifikace inhibitorů cholinesteráz .....	25
2.3.2.1 Reverzibilní inhibitory .....	26
2.3.2.1.1 Donepezil .....	26
2.3.2.1.2 Rivastigmin .....	27
2.3.2.1.3 Galantamin.....	28
2.3.2.1.4 Takrin.....	28
2.3.2.1.5 Huperzin A a B.....	29
2.3.2.2 Pseudo-ireverzibilní inhibitory.....	30
2.3.2.3 Ireverzibilní inhibitory.....	31
2.3.2.3.1 Pesticidy.....	32

2.3.2.3.2 Organofosfátové nervové látky .....	33
2.4 Metody stanovení anticholinergních aktivit .....	35
2.4.1 Manometrická metoda.....	36
2.4.2 pH-statová metoda.....	36
2.4.3 Spektrofotometrické metody .....	37
2.4.3.1 Ellmanova metoda.....	37
2.4.3.2 Fluorimetrická metoda .....	39
2.4.3.3 Chemiluminiscenční metoda .....	39
2.4.4 Separační metody .....	40
2.4.5 Radiometrická metoda (radioizotopové stanovení) .....	40
2.4.6 Titrační metoda .....	41
2.4.7 Biosenzory .....	41
2.5 Schiffovy báze .....	41
2.5.1 Příprava Schiffových bází .....	42
2.5.2 Význam Schiffových bází .....	42
2.5.3 Anticholinergní aktivita Schiffových bází .....	43
<b>3. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>44</b>
4.1 Komerčně dostupná chemická činidla .....	44
4.2 Použité chemikálie a roztoky .....	45
4.3 Použité přístroje.....	45
4.4 Syntéza testovaných derivátů.....	46
4.4.1 Příprava 4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenolu.....	46
4.4.2 Příprava 4-[(2S)-2-(benzylamino)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenolu.....	48
4.4.3 Metody charakterizace .....	49
4.4.4 Přehled testovaných derivátů .....	50

4.5 Vlastní stanovení připravených derivátů (inhibitorů) .....	59
4.5.1 Stanovení aktivity enzymového preparátu (AEP) acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.....	59
4.5.1.1 Přístroje .....	59
4.5.1.2 Provedení reakce .....	59
4.5.2 Stanovení hodnoty $IC_{50}$ připravených derivátů (inhibitorů) .....	60
4.5.2.1 Ellmanova metoda.....	60
4.5.2.2 Měření $IC_{50}$ připravených derivátů (inhibitorů).....	60
4.5.2.3 Provedení reakce .....	61
4.5.3 Stanovení $K_{ow}$ připravených derivátů (inhibitorů) .....	63
4.5.3.1 Princip stanovení $K_{ow}$ .....	63
4.5.3.2 Provedení reakce .....	63
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	65
5.1 Aktivita enzymového preparátu (AChE a BChE) .....	65
5.1.1 Příklad přímkové závislosti absorbance na čase .....	65
5.1.2 Výpočet aktivity enzymového preparátu.....	66
5.1.3 Výpočet objemu enzymu přidávaného do reakční směsi .....	66
5.2 Stanovení hodnoty $IC_{50}$ připravených derivátů (inhibitorů) .....	67
5.2.1 Příklad přímkové závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I].....	68
5.2.2 Výpočet hodnoty $IC_{50}$ (z grafu 2 a 3).....	69
5.2.3 Získané hodnoty $IC_{50}$ všech inhibitorů.....	69
5.3 Stanovení rozdělovacího koeficientu $K_{ow}$ testovaných inhibitorů v systému 1-oktanol:voda.....	70
<b>6 DISKUZE</b> .....	72
6.1 Syntéza Schiffových bází.....	72
6.2 Syntéza redukovaných Schiffových bází .....	72
6.3 Stanovení inhibičních aktivit .....	73

<b>7 ZÁVĚR</b> .....	<b>77</b>
<b>8 POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>79</b>



# 1 ÚVOD

První studie o faktoru, který byl schopen hydrolyzovat acetylcholin (ACh) a jeho důsledky na úrovni centrálního nervového systému (CNS) pocházejí z roku 1914 a 1921, resp.

Henry Hallet Dale (1895-1968) byl anglický farmakolog a fyziolog. V roce 1936 získal společně s Otto Loewim (1873-1961) Nobelovu Cenu za fyziologii nebo lékařství, a to za výzkum role acetylcholinu při přenosu ve vegetativní nervové soustavě.

V roce 1921 Otto Loewi objevil, že látka umožňující přenos vzruchů na parasymptických spojích je Acetylcholin.

Edgar Stedman (1890-1975) a jeho tým našli cholinesterázovou aktivitu v krvi, a tak nazýval tento faktor cholinesterázou (ChE) [1].

Později byla popsána existence dvou cholinesteráz: jedna erytrocytární, aneb pravá Acetylcholinesteráza (AChE), a druhá plazmatická (pseudocholinesteráza) tzv. Butyrylcholinesteráza (BChE). AChE (E.C.3.1.1.7) se nachází v erythrocytech, nervových zakončeních a v šedé hmotě mozku. BChE (E.C.3.1.1.8) se nachází v játrech, pankreatu, srdci, bílé hmotě mozku a plazmě [2].

Analýza těchto enzymů a jejich aktivity je klinicky významná při diagnostice jaterních komplikací, studii nemocí jako Alzheimerova choroba (AD), ale i dalších metabolických poruch (např. Diabetes Mellitus typu 2).

Co se týče CNS, řada těchto sloučenin se také objevila jako léky pro léčbu AD a Myasthenia gravis. Tyto jsou založeny na předpokladu, že zvýšením dostupnosti ACh u acetylcholinových receptorů v mozku může vést k lepšímu přenosu signálů mezi neurony, který zlepší kognitivní funkci [3].

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Enzymy

Enzymy jsou buď jednoduché či složené bílkoviny, které mají katalytickou aktivitu. Tyto bílkoviny určují rychlost a povahu různých chemických reakcí a většiny biochemických procesů ve všech živých organismech [4].

Prakticky všechny čtené a složité biochemické reakce jsou regulovány enzymy. Tyto katalytické proteiny jsou účinné a specifické – to znamená, že urychlují rychlost jednoho druhu chemické reakce jednoho typu sloučeniny a dělají to mnohem účinněji než lidské katalyzátory.

Enzymy jsou řízeny aktivátory a inhibitory, které iniciují nebo blokují reakce. Všechny buňky obsahují enzymy, které se obvykle liší v počtu a složení, v závislosti na typu buňky [5].

#### **2.1.1 Role enzymů v organismu**

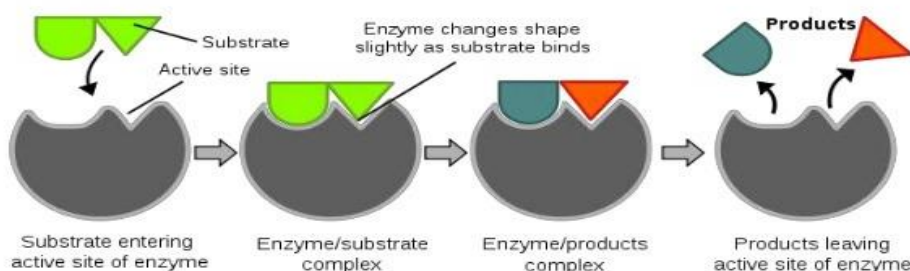
Enzymy pomáhají rozložit různé velké molekuly, jako jsou bílkoviny, tuky a sacharidy, na menší molekuly. Tento proces nastává během trávení potravin v žaludku a dále ve střevech. Enzymy také podporují tvorbu velkých, více komplexních molekul. Jsou odpovědné za řadu dalších funkcí, které zahrnují skladování a uvolňování energie, průběh reprodukce, procesy dýchání a zraku apod., jsou nepostradatelné pro život [6].

#### **2.1.2 Mechanismus působení**

Aby reakce nastala, molekuly reaktantů musí obsahovat dostatečnou energii k překročení potenciální energetické bariéry, tedy aktivační energie. Všechny molekuly mají různé množství energie, čím je potenciální bariéra pro reakci nižší, tím více reaktantů má dostatečnou energii, a tím rychleji dojde k reakci. Všechny katalyzátory, včetně enzymů, působí vytvořením přechodného stavu s reakčními složkami nižší volné energie, než by se nacházely v nekatalyzované reakci [7].

V prvním kroku dojde k tvorbě komplexu enzym-substrát (E-S), která probíhá rychle a reverzibilně. Dále se substrát za katalýzy enzymem přemění v produkt. Z komplexu vzniká komplex enzym-produkt (E-P), který se rozpadá za uvolnění produktu. Tato reakce probíhá pomalu a ireverzibilně (Obr. 1).

Reakce se dále rozděluje na několik postupných kroků, při kterých vzniká tzv. přechodný stav (transition state). Aktivační energie potřebná k vytvoření každého meziprojektu a k přeměně E-S na E-P je pořád nižší než při přímé přeměně substrátu na produkt, i když celkové energie obou reakcí jsou stejné [8].



Obrázek 1 Mechanismus působení enzymu a tvorba komplexu

## 2.2 Cholinesterázy

Jsou to enzymy, které patří do skupiny širší rodiny  $\alpha/\beta$  hydroláz. Mohou být rozděleny do dvou odlišných skupin: ty, které katalyzují hydrolýzu ACh na cholin a acetát (tedy AChE) a ty, které katalyzují přeměnu jiných acylcholinů na cholin a slabou kyselinou (tedy BChE) [9]. Tyto reakce jsou nezbytné pro umožnění návratu cholinergního neuronu do klidového stavu po aktivaci.

Tyto enzymy hydrolyzující estery cholinu jsou klasifikovány podle jejich lokalizace v tkáních, specifity substrátu a jejich inhibice různými dalšími sloučeninami. Také splňují různé funkce jako ukončení synaptické reakce ACh (AChE umožňuje přesnou kontrolu doby trvání synaptické aktivace) a regulaci přenosů nervových signálů v cholinergních synapsích [10].

Ale tyto enzymy s cholinesterázovou aktivitou mohou být inhibovány některými chemickými činidly, jako jsou insekticidy organického fosforu (OP) a karbamáty (CB), stejně jako některé těžké kovy a detergenty [11].

Cholinesterázy lze analyzovat ve velkém množství organických tkání, ale ukázalo se, že jejich stanovení v plné krvi představuje řadu výhod, jako

snadnost získávání a manipulace se vzorky, možnost analýzy AChE a BChE ve stejném vzorku, použití malého objemu vzorku a malá interference hemolýzy ve spektrofotometrických analýzách [9].

### **2.2.1 Acetylcholinesteráza**

Acetylcholinesteráza (se symbolem AChE; EC. 3.1.1.7) je enzym, který je kódován genem na chromozomu 7 (7q22). Je to primární cholinesteráza v organismu katalyzující rozklad Ach a některých dalších esterů cholinu, které slouží jako neurotransmitery.

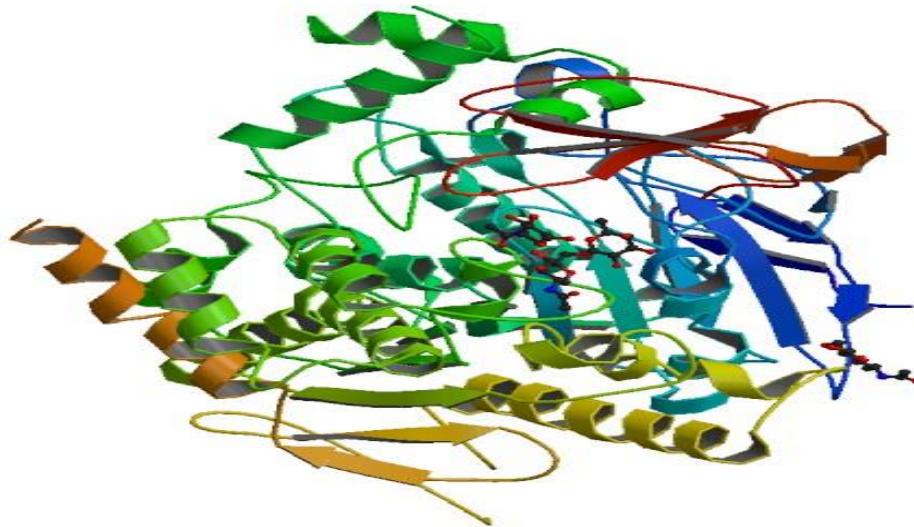
AChE se syntetizuje v kostní dřeni a nachází se v mnoha typech tkání: nervové a svalové, centrální a periferní tkáně, motorická a senzorická vlákna, cholinergní a necholinergní vlákna. Také se nachází na membráně neuronů a erytrocytů. Aktivita AChE je vyšší u motorických neuronů než u senzorických neuronů [12].

#### **2.2.1.1 Struktura AChE**

AChE je glykoprotein, který existuje v několika formách. V důsledku rozmanitosti v chemické struktuře jsou některé formy AChE hydrofobní, zatímco jiné jsou hydrofilní. Hydrofilní druhy obecně fungují v buňkách, kde štěpí nadbytečnou koncentraci intracelulárního AChE; hydrofobní (lipidově vázané) druhy jsou však primárními činiteli inaktivace Ach, pracují v synaptické štěrbině nebo v neuromuskulárním spojení, kde rozdělují Ach na jeho složky: acetát a cholin. Tyto hydrofobní AchE jsou vloženy do postsynaptické membrány a umístěny blízko receptorových molekul, aby se zajistila inaktivace ACh [13].

Stanovením krystalové struktury rentgenovou analýzou u parenojka *Torpedo Californica* v 90. letech se umožnila vizualizace trojrozměrné struktury AChE. To také umožnilo identifikaci aktivního místa AChE, které se nachází na dně prohlubně lemované převážně aromatickými zbytky [14, 15].

Jedná se o monomer,  $\alpha/\beta$  protein, který obsahuje 537 aminokyselin a skládá se z 12  $\beta$  skládaných listů obklopených 14  $\alpha$  helixy (šroubovicemi) [14]. Struktura 3D AChE je zobrazena na obr. 2.



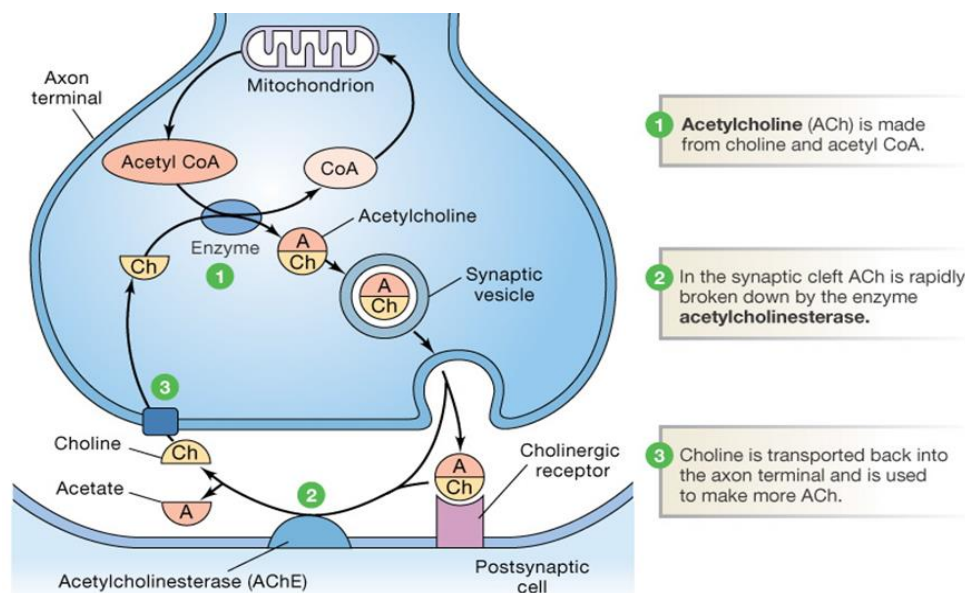
Obrázek 2 Struktura AChE

#### **2.2.1.2. Funkce AChE**

Účinek ACh na synapsi končí aktivitou enzymu AChE, který rychle hydrolyzuje ACh na acetát a cholin skoro jednu milisekundu poté, co byl uvolněn ACh, a tím reguluje koncentrace tohoto neurotransmiteru v synapsi.

Během neurotransmise je ACh uvolňován z presynaptického neuronu do synaptické štěrbině a váže se na receptory ACh na postsynaptické membráně, přičemž přenáší signál z nervu. AChE, také umístěný na postsynaptické membráně, ukončuje přenos signálu hydrolýzou ACh. Uvolněný cholin je opět vychytán presynaptickým neuronem a ACh je syntetizován kombinací s Acetyl-CoA působením acetylcholintransferázy [16].

Biologická funkce není omezena jen na hydrolýzu ACh. V CNS, AChE vykazuje širokou distribuci a ne vždy souvisí s aktivitou acetylcholintransferázy, což je markérem cholinergního systému [17]. Role AChE v synaptické štěrbině se zobrazuje na obr. 3.



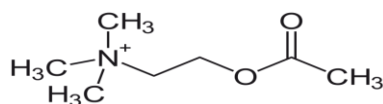
Obrázek 3 Role AChE na synaptické štěrbině

### 2.2.1.3 Acetylcholin

ACh je organická látka, která funguje v mozku a těle několik druhů zvířat, včetně člověka, jako neurotransmitter – chemická zpráva uvolněná nervovými buňkami pro vyslání signálů do jiných buněk. Splňuje fyziologické, farmakologické funkce a jejich receptory se nachází na obou koncích neuronů.

Také se podílí na podpoře bdělosti, pozornosti a učení. Je zodpovědný za neuromuskulární spojení. Pomáhá kontrakci kosterního svalstva a má mnoho zdravotních výhod [16].

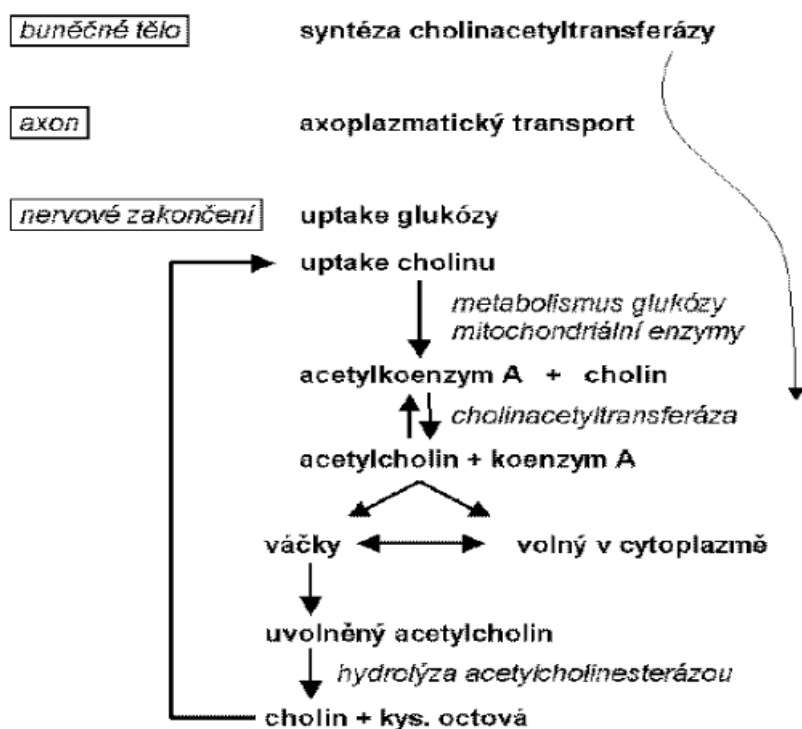
Proces, kterým jsou nervové signály sdělovány, se nazývá synaptický přenos a může být rozdělen do 4 kroků. Za prvé, ACh musí být syntetizován a uložen ve vezikulách, takže když se akční potenciál dostane na konec nervu, je buňka připravena předat jej dalšímu neuronu. Poté, když na terminál dorazí akční potenciál, musí být ACh rychle a účinně uvolněn z terminálu do synaptické štěrbiny. ACh musí pak být rozpoznán selektivním receptorem na postsynaptické buňce, aby mohl projít signálem a zahájit další akční potenciál. Nebo v některých případech, receptory blokuji signály jiných neuronů, které se také připojují k tomuto postsynaptickému neuronu [18]. Strukturní vzorec ACh je zobrazen na obr. 4.



Obrázek 4 Strukturní vzorec ACh

### 2.2.1.3.1 Syntéza a degradace ACh

ACh je syntetizován v cholinergních neuronech reakcí cholinu a acetylkoenzymu A (acetyl-CoA) katalyzovanou cholin-acetyltransferázou (ChAT). ACh je dále ukládán do synaptických vezikul, ale část ACh zůstává volná v cytoplazmě. Po uvolnění do synaptické štěrby je nenavázaný ACh velmi rychle hydrolyzován AChE na acetát a cholin (rychlostí  $10^4$  až  $10^5$  molekul za sekundu). Většina cholinu je poté přenesena vysokoafinitním přenosovým systémem závislým na  $\text{Na}^+$  zpět do presynaptického zakončení a použita při syntéze ACh. Je možné, že rychlost syntézy ACh je určena acetyl-CoA (jeho prekurzorem v mozku je pyruvát, produkt glykolýzy), popř. jeho přenosem z vnitřní membrány mitochondrií do cytoplazmy [19, 20]. Celý proces je popsán na obr. 5.



Obrázek 5 Syntéza a degradace ACh

### **2.2.2 Butyrylcholinesteráza**

Butyrylcholinesteráza (EC 3.1.1.8) známá také jako pseudocholinesteráza, je enzym schopný hydrolyzovat mnoho různých esterů na bázi cholinu. Syntetizuje se v játrech, a může se nacházet v plazmě, v játrech, hladkém svalstvu, střevech, pankreatu, srdečním svalu a nervové tkáni. Poločas BChE je přibližně 10 až 14 dnů [21].

Ačkoli BChE eliminuje neurotransmitter ACh, není nezbytný pro pohyb nebo jiné cholinergní funkce. Role BChE v organismu není dosud plně objasněna, ale může být fyziologickým regulátorem hormonu ghrelinu (také známý jako hladový hormon), který je produkován v gastrointestinálním traktu (GIT) a hraje významnou roli v regulaci energetické homeostázy [22]

#### **2.2.2.1 Struktura BChE**

Krystalová struktura BChE je velmi podobná struktuře AChE. Skládá se z periferního aniontového místa, které se nachází na povrchu enzymu; z úzké prohlubně, která je lemována 8 aromatickými zbytky aminokyselin; a z aktivního místa na dně prohlubně enzymu. Většinou se BChE vyskytuje jako tetramer, a celková hmotnost jedné podjednotky je 85kDa [21].

### **2.3 Inhibice cholinesteráz**

Aktivitu ChE (jak AChE, tak i BChE) lze zvyšovat (aktivací enzymu), modulovat nebo snižovat (inhibicí enzymu). Inhibice ChE může probíhat na 2 místech povrchu enzymu, jsou to aktivní místo (esterické) a aniontové místo, na kterém dojde k vzniku vazby kationické části molekuly.

Inhibitory AChE (často zkrácený AChEI), anebo anticholinesterázy jsou chemické látky, které inhibují enzym AChE z rozkladu Ach, čímž se zvyšuje jak hladina, tak doba trvání účinku neurotransmiteru ACh [23].

Anticholinesterázy jsou třídou chemikálií, které mohou zaujmout místo Ach v aktivním místě AChE, což významně snižuje schopnost neurotransmiteru vázat se na AChE a tím omezuje rychlost, kterou může být Ach rozdělen. Vzhledem k tomu, že neexistuje mechanismus presynaptického zpětného vychytávání k transportu Ach zpět do presynaptické buňky a že Ach nelze snadno rozpustit v okolním médiu, přítomnost inhibitorů AChE vede



k nadměrnému hromadění Ach na synapcích. Toto hromadění vede ke zvýšené hladině aktivity ACh u postsynaptických receptorových molekul a následně k nepřetržitému akčnímu potenciálu [24].

Inhibice ChE je využívána v lékařství, zemědělství, monitoringu životního prostředí a diagnostice mnoha nemocí. Inhibitorů ChE bylo bohužel zneužito i při teroristických útocích a vojenských operacích.

### **2.3.1 Význam inhibitorů cholinesteráz**

Současné přístupy k léčbě kognitivních symptomů různých nemocí zdůrazňují použití inhibitorů ChE. Změny hladin AChE a jejich vlastnosti byly hlášeny u několika neurodegenerativních onemocnění, jako AD, Parkinsonova choroba a Myasthenia Gravis. Tyto 3 onemocnění jsou nejvíce studované neuropatologie související se změnami AChE.

Mezi aplikace použití inhibitorů ChE patří:

- K léčbě Myasthenia gravis (zvýšení neuromuskulárního přenosu)
- K léčbě glaukomu
- Jako antidotum anticholinergní otravy
- K léčbě neuropsychiatrických symptomů onemocnění, jako AD, zejména apatie
- K léčbě kognitivních (většinou paměťových a poruch učení) symptomů demence
- K léčbě u pacientů se schizofrenií (existuje několik důkazů, které naznačují účinnost při léčbě pozitivních, negativních a afektivních symptomů)
- K léčbě autismu a ke zvýšení procenta rychlého pohybu očí u autistických dětí během spaní (podporují lucidní snění) [25]
- Vyskytují se přirozeně jako jedy
- Používají se jako zbraně ve formě nervových činidel
- Používají se jako insekticidy.

### **2.3.2 Klasifikace inhibitorů cholinesteráz**

Inhibitory ChE lze rozdělit do dvou skupin: ireverzibilní (nevratné) a reverzibilní. Reverzibilní inhibitory, kompetitivní nebo nekompetitivní, mají

většinou terapeutické aplikace, zatímco toxické účinky jsou spojeny s ireverzibilními modulátory aktivity AChE.

Účinek, který může mít specifický inhibitor na těle, závisí do jisté míry na chemických vlastnostech molekuly a síle vazby, kterou tvoří s AChE. Tyto vazby mohou odolávat hydrolytickému štěpení po dobu až několik hodin, zatímco inhibují veškerou normální aktivitu AChE a vedou k nadměrnému a možná i toxickému hromadění Ach u cholinergních synapsí [23].

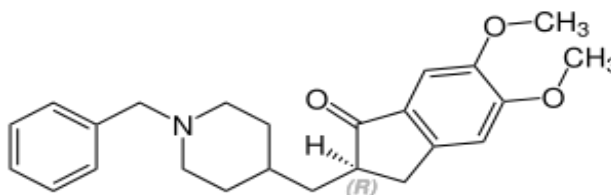
### **2.3.2.1 Reverzibilní inhibitory**

Reverzibilní inhibitory ChE hrají významnou roli ve farmakologické manipulaci enzymové aktivity. Tyto inhibitory zahrnují sloučeniny s různými funkčními skupinami (karbamáty, kvartérní nebo terciární amoniou skupinu) a jsou používány při diagnostice a léčbě různých onemocnění, jako jsou: Myasthenia gravis, AD, pooperační ileus, poruchy močového měchýře, glaukom a také jako antidotum k anticholinergnímu předávkování.

#### **2.3.2.1.1 Donepezil**

Jedná se o nekompetitivní, rychle reverzibilní inhibitor ChE (působí cca do 1ms), který se používá při symptomatické léčbě AD. Jeho účinek inhibuje hydrolýzu AChE, a kompenzuje tímto způsobem ztrátu funkce cholinergních neuronů, ke kterým dochází u tohoto onemocnění [26].

Struktura donepezilu (2- [(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on) je zobrazena na obr. 6.



Obrázek 6 Struktura donepezilu

Donepezil byl schválen v roce 1996 pro léčbu AD, byl navržen jako bivalentní inhibitor AChE z fyzostigminu [27]. Donepezil se může akumulovat v plazmě, má dlouhý poločas (zhruba 70 až 90 hodin) a je skoro úplně vázán na plazmatické proteiny (96%). Tento inhibitor je metabolizován jaterními

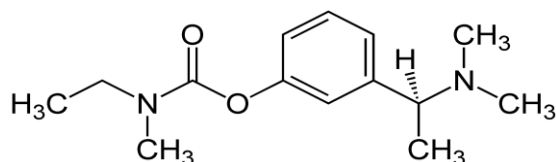
cytochromy a může interagovat s dalšími léčivými metabolizovanými stejnou dráhou [28]. Doporučovaná dávka je 5-10 mg/den.

Donepezil představuje nákladově efektivní léčbu, může poskytnout mírný přínos pro kognici, chování a aktivitu každodenního života v mírné i závažné AD, což přispívá ke zpomalení progresu onemocnění a k menšímu rozvoji. Pacienti s vaskulární demencí mohou mít také prospěch z donepezilu podobným způsobem jako pacienti s AD [29, 30].

Mezi nežádoucí účinky donepezilu patří gastrointestinální anomálie – nevolnost, průjem, anorexie, bolesti břicha, zvýšení srdečního vagálního tónu způsobujícího bradykardii.

### 2.3.2.1.2 Rivastigmin

Jedná se o nekompetitivní, velmi pomalu působící reverzibilní inhibitor (působí do 6 až 8 hodin). Je to účinný karbamát, který blokuje aktivitu ChE vazbou na esterické části aktivního místa enzymu. Dokáže inhibovat jak AChE, tak BChE. Rivastigmin byl schválen v roce 2000 a používá se při léčbě mírné až střední AD ve více jak 60 zemích [31]. Struktura rivastigminu je zobrazena na obr. 7.



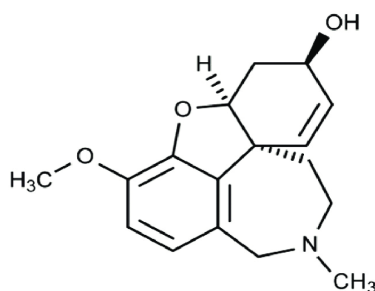
Obrázek 7 Struktura rivastigminu

Tento lék se podává orálně ve formě kapslí nebo transdermální náplasti, a má dobrou absorpci [32]. Rivastigmin mizí rychle z plazmy, s poločasem 1-2 hodiny, má relativní nízkou vazbu na plazmatické proteiny, není metabolizován v játrech a je vylučován močí. Na rozdíl od jiných inhibitorů, málo interaguje s dalšími léky [33]. Doporučená dávka je 3 mg/den.

Mezi nežádoucí účinky rivastigminu patří nauzea, nevolnost, nechutenství, bolesti hlavy, bolesti břicha a závratě. Může být taky aplikován při léčbě Lewyho tělísek a demence způsobené Parkinsonovou chorobou [34].

### 2.3.2.1.3 Galantamin

Je to terciární alkaloid, kompetitivní a rychle působící reverzibilní inhibitor (působí do 1ms), který inhibuje pouze AChE, a to vazbou na aniontovém místě cholinu a katalytickém vazebném místě [35]. Tento alkaloid se může izolovat z květin *Galanthus Caucasicus* (kavkazská sněženka), *Galanthus woronowii* (sněženka Voronovova) a některých dalších členů čeledi *Amaryllidaceae*, jako *Narcissus* (narcis) a *Leucojum Aestivum* (bledule) [36]. Může být také vyráběn synteticky. Struktura galantaminu je zobrazena na obr. 8



Obrázek 8 Struktura galantaminu

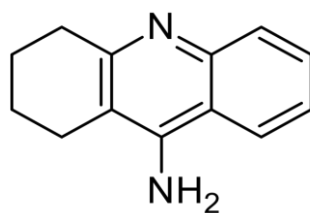
Tento lék se podává orálně, přes kapsule anebo transdermální náplasti. Počáteční dávka je 1,5 mg dvakrát denně. Potom se může dávka zvýšit až na 12 mg dvakrát denně, což je efektivní doporučená dávka. Galantamin se používá při léčbě symptomů mírné a střední AD a dalších poruch paměti, jako je demence. Také se používá při neuromuskulárních onemocněních nebo k antagonizaci dechové deprese vyvolané léky [37].

Podobně jako rivastigmin, galantamin se nekumuluje skoro v organismu, má krátký plazmatický poločas (5 až 6 hodin) a nízkou vazbu na proteiny. Je metabolizován jaterním cytochromem P450 [38].

Stejně jako ostatní inhibitory, může způsobovat gastrointestinální problémy.

### 2.3.2.1.4 Takrin

Takrin (aminoakridin takrin, 1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin) byl první lék schválený pro léčbu AD v roce 1993. Bohužel, podávání takrinu je spojeno s vysokým výskytem hepatotoxicity. Je účinným inhibitorem jak AChE, tak BChE [39]. Jedná se o nekompetitivní reverzibilní inhibitor ChE, který se váže na aniontové místo enzymu. Struktura takrinu je zobrazena na obr. 9.



Obrázek 9 Struktura takrinu

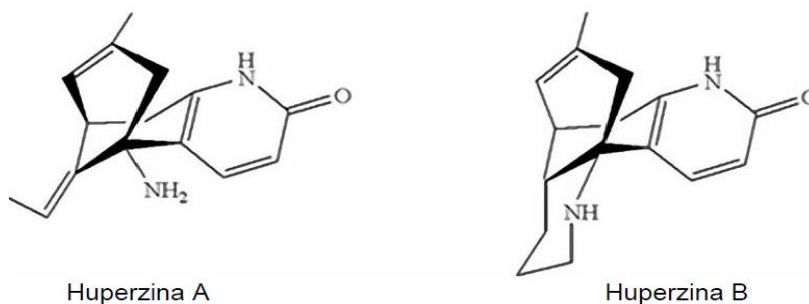
Vzhledem k tomu, že způsoboval řadu nežádoucích účinků jako je nevolnost, zvracení, závratě, záchvaty a další poruchy vědomí a že měl krátký poločas rozpadu (byl nutně podáván čtyřikrát denně), byla léčba Takrinem v USA v roce 2013 zrušena kvůli obavám o bezpečnost [40].

### 2.3.2.1.5 Huperzin A a B

Jedná se o přírodní alkaloidy, které pocházejí z čínské plavuně *Huperzia serrata* [41]. Jsou to přírodní inhibitory AChE, které prokázali, že mají mnohostranné farmakologické účinky: na rozdíl od ostatních inhibitorů ChE, huperzin A lépe přestupuje přes hematoencefalickou bariéru, inhibuje déle AChE a má vyšší biologickou dostupnost.

Různé klinické studie prokázaly, že podávání huperzinu A může významně zlepšit paměť, kognitivní schopnosti a denní životní schopnosti pacientů s AD bez závažných vedlejších účinků. Kromě toho, že je huperzin indikován pro AD, je také používán při léčbě poškození paměti u pacientů s vaskulární demencí (VaD), pacientů se schizofrenií a poruch spánku v trpících nespavostí [42].

Struktury huperzinu A a B jsou zobrazeny na obr. 10.

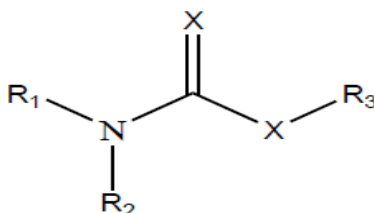


Obrázek 10 Struktury huperzinu A a B

### 2.3.2.2 Pseudo-ireverzibilní inhibitory

Jsou to takové inhibitory ChE, které se vážou kovalentně na enzym. Tato kovalentní vazba je pak pomalu přerušována a molekula enzymu může být zase k dispozici. Do této skupiny inhibitorů patří karbamáty, které vytváří karbamoylový komplex se serinovými zbytky AChE.

Jsou to organické sloučeniny, které jsou odvozené od kyseliny karbamidové (NH<sub>2</sub>COOH). Struktura karbamátů je zobrazena na obr. 11., kde X může být kyslík nebo síra (thiokarbamát), R<sub>1</sub> a R<sub>2</sub> jsou obvykle organické nebo alkylové substituenty, ale R<sub>1</sub> nebo R<sub>2</sub> mohou být také vodík, a R<sub>3</sub> je většinou organický substituent nebo někdy i kov [43].



Obrázek 11 Struktura karbamátů

Mechanismem účinku karbamátových inhibitorů na ChE je acylace (karbamoylace) aktivního místa enzymu po rozštěpení esterové vazby – zbytek karbamové kyseliny se naváže na serinovou –OH skupinu aktivního místa. Poločas komplexů karbamátů se pohybuje v řádech desítek minut až hodin.

Známým zástupcem karbamátů je Fyzostigmin, který je izolován z kalabarových semen rostliny *Physostigma venenosum*, a má různé farmakologické účinky uplatňující se při léčbě Myasthenia gravis [44].

Nejpoužívanější zástupci karbamátů, v rámci terapeutického využívání, jsou:

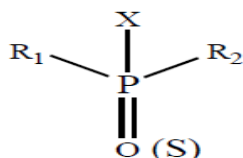
- Neostigmin (neostigmin bromid, neostigmin methylsulfát)
- Pyridostigmin (pyridostigmin bromid)
- Distigmin (distigmin bromid)
- Ambenonium [45].

Tyto inhibitory se používají k terapii postoperačních atonií močového měchýře a střev a k terapii Myasthenia gravis.

Dále se karbamáty používají jako insekticidy (primicarb, Sevin, karbaryl, karbofuran), herbicidy, moluskucidy, fumiganty a fungicidy [46, 47].

### 2.3.2.3 Ireverzibilní inhibitory

Ireverzibilní inhibitory jsou také známé jako inaktivátory enzymů. Do té skupiny patří organofosfáty. Organofosfáty (také známé jako fosfátové estery nebo OP) jsou třídou organofosforových sloučenin s obecnou strukturou  $O=P(OR)_3$ . Mohou být považovány za estery kyseliny fosforečné. Jejich inhibiční účinek je založen na fosforylaci serinové hydroxy skupiny v aktivním místě enzymů (jak AChE, tak BChE). Na rozdíl od reverzibilních inhibitorů, tyto sloučeniny reagují s enzymem a vytváří silnou kovalentní vazbu, a tím jejich reakce trvá déle [48]. Jejich struktura je zobrazena na obr. 12., kde R1 nebo R2 jsou arylové nebo alkylové skupiny, které jsou vázány k atomu fosforu buď přímo nebo prostřednictvím atomu kyslíku nebo síry.



Obrázek 12 Obecná struktura organofosfátů

OP mají své hlavní toxikologické účinky díky fosforylaci esteráz v CNS. Akutní toxické účinky jsou spojeny s ireverzibilní inaktivací AChE [49].

Tyto látky jsou absorbovány do těla všemi možnými cestami, včetně kůže, plic, GIT a spojivky; mohou také vstoupit do těla injekcí, i když se jedná o vzácný případ. Některé z těchto látek se používají k léčbě glaukomu a Myasthenia gravis. Nejtoxičtější OP sloučeniny jsou chemická bojová činidla, jejichž perorální letální dávka pro člověka se odhaduje na miligram nebo méně [50]. OP insekticidy patří mezi skupiny nejvíce toxických pesticidů.

Mezi příznaky a symptomy inhibice ChE před expozicí OP patří:

- V mírných případech (od 4 do 12 hodin kontaktu): únava, slabost, závratě, nevolnost, rozmazané vidění
- V mírných případech (od 12 do 24 hodin kontaktu): bolesti hlavy, pocení, slzení, slintání, zvracení, vidění tunelu, záškuby
- V těžkých případech (po pokračující denní absorpci): abdominální křeče, močení, průjem, svalové třesy, ohromující chůze, hypotenze, pomalý srdeční tep, potíže s dýcháním, smrt (pokud nejsou okamžitě léčeni lékařem) [51].

Typy a závažnost symptomů inhibice ChE závisí na toxicitě pesticidu, množství pesticidu, způsobu a trvání expozice.

### **2.3.2.3.1 Pesticidy**

Organofosfátové pesticidy (OPP) inhibují neuromuskulární enzym, který je nezbytný pro normální funkci u hmyzů, ale také u lidí a mnoha dalších zvířat. Tyto pesticidy mohou vstoupit do těla prostřednictvím absorpce kůže, inhalace nebo požití. Mohou ovlivnit aktivitu ChE jak v erythrocytech, tak v krevní plazmě. Mezi nejdůležitější OPP patří:

- Acephate (orthene)
- Aspon
- Carbophenothion (trithion)
- Coumaphos
- Demeton
- Dichlorvos (DDVP, Vapona)
- Diazinon
- Fenthion
- Mevinphos (phosdrin)
- Parathion
- Phosalone (Zolonc)
- TEPP
- Terfubos (Counter) atd.

OPP rychle degradují hydrolýzou při vystavení slunečnímu záření, půdě a vzduchu, i když v potravinách a pitné vodě lze zjistit malá množství OPP [52].



### 2.3.2.3.2 Organofosfátové nervové látky

Nervové látky, také známé jako nervové plyny, jsou třídou organických chemikálií, které narušují mechanismy, kterými nervy přenášejí signály do všech orgánů. Narušení je způsobeno blokadí AChE, která katalyzuje rozklad neurotransmiteru ACh.

Na začátku 20. století v Německu se syntetizovali při hledání nových insekticidů tetraethylpyrofosfát (TEPP), sarin, tabun a soman, a začaly se testovat jejich účinky na živé organismy. Z nich, tabun, sarin a soman patří k nejdéle známým zástupcům OP. Pro vysokou toxicitu jsou tyto látky používány jako nervově paralytické bojové chemické látky. Dále Britové později produkovali další nervový agens, pojmenovaný VX; Po druhé světové válce, americké společnosti syntetizovaly další látky, které byly používány jako pesticidy, jako malathion, azinfosmethyl, DDT, dieldrin [53].

**Sarin** (označení NATO GB, řada G, 'B') je extrémně toxická syntetická OP sloučenina, bezbarvá kapalina bez zápachu, která se používá jako chemická zbraň díky své extrémní účinnosti jako nervové činidlo. Expozice je smrtelná i při velmi nízkých koncentracích, kdy smrt může nastat během jedné až deseti minut po přímé inhalaci letální dávky v důsledku udušení z paralýzy plicních svalů. Lidé, kteří byli vystaveni neletální dávce a nedostávali okamžitou lékařskou péči, mohou trpět trvalým neurologickým poškozením [54, 55].

**Tabun** je extrémně toxická chemická látka, je čistá, bezbarvá a bez chuti tekutina se slabým ovocným zápachem. Jako nervové činidlo, smrtelně zasahuje do normální funkce CNS savců. Jeho výroba je přísně kontrolována a skladována. Tabun byl první z nervových agens, který byl syntetizován. Symptomy expozice Tabunem zahrnují nervozitu, neklid, nadměrné slinění, dušnost, pocení, bradykardie, ztráta vědomí, křeče, apnoe (zastavené dýchání) a puchýře [56, 57].

**Soman** je další extrémně toxická látka. Toto nervové činidlo interferuje s normální funkcí CNS savců inhibicí ChE (jak AChE, tak BChE). Je klasifikován jako zbraň hromadného ničení. Jeho výroba je přísně kontrolována a skladována. Soman byl třetí z takzvaných nervových agens řady G. Je to čistá, žíravá a bezbarvá kapalina se slabým zápachem. Je více letální a

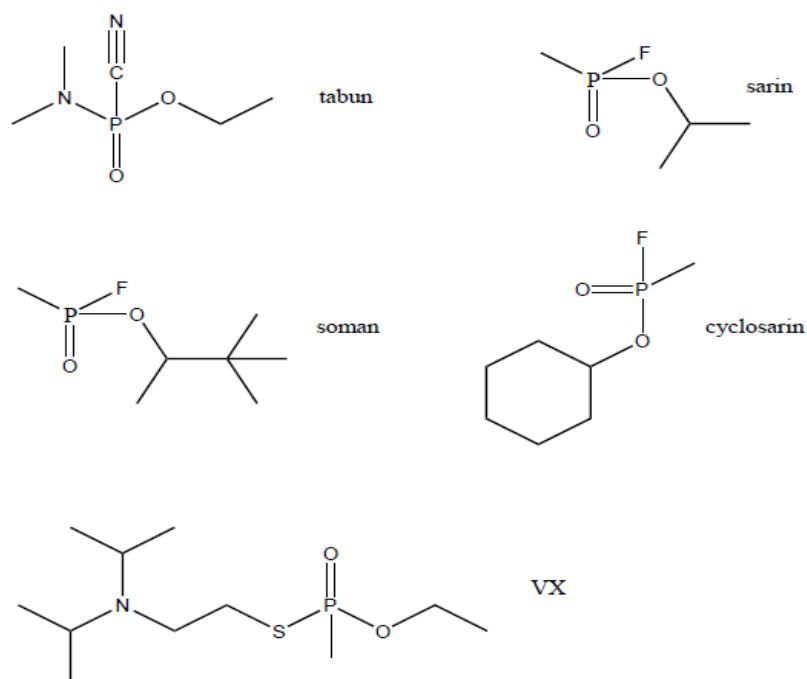
účinnější než sarin nebo tabun. Jedním z prvních pozorovatelných příznaků otravy je mióza (nadměrné zúžení zornice), dále jsou zvracení, extrémní bolest svalů. Tyto příznaky se projevují již 10 minut po expozici a mohou trvat mnoho dní [57, 58, 59].

**VX** bylo vyvinuto pro vojenské použití v chemické válce. V jeho čisté formě, je to olejnatá, relativně netěkavá kapalina. Vzhledem k nízké těkavosti, VX přetrvává v prostředí, kde je rozptýlen. VX, zkratka pro 'Venomous agent X' (Jedovatý agens X) je jeden z nejznámějších nervových agens a byl nejprve objeven v časných 50. letech během výzkumu nových pesticidů. Jako chemická zbraň je zařazena mezi zbraně hromadného ničení. VX blokuje působení AChE, což vede k hromadění Ach, na molekulární úrovni to vede k pokračující stimulaci a případné únavě postižených ACh receptorů. Včasné příznaky expozice zahrnují lokální pocení, svalové záškuby v oblasti expozice, nevolnost, zvracení, bronchiální konstriktce, mióza a popřípadě i smrt [54, 57, 60].

Stejně jako sarin, **cyklosarin** je kapalné OP nervové činidlo. Je to bezbarvá kapalina se sladkou vůní připomínající broskve nebo šelak. Na rozdíl od sarinu, cyklosarin je velice hořlavý a vykazuje podstatně vyšší toxicitu u člověka [57, 61].

Na základě akutní toxicity je VX nejtoxičtější sloučeninou mezi všemi nervovými látkami. Akutní otrava nervovým činidlem vede ke kontrakci zornic, hojnému slinění, křečím, nedobrovolnému močení a defekaci a případné smrti zadušením, protože kontrola je ztracena nad dýchacími svaly.

Struktury všech výše uvedených látek jsou zobrazeny na obr. 13.



Obrázek 13 Struktury vybraných nervových látek

#### 2.4 Metody stanovení anticholinergních aktivit

Všechny biologické pokusy, které měří aktivitu enzymu AChE, jsou v současné době používány v širokém spektru různých oborů, od medicíny po integrovanou ochranu proti hmyzu. Mnohé z těchto sloučenin jsou založeny na inhibitech tohoto enzymu, jako jsou organofosfátové a karbamátové sloučeniny. Metody, které se používají v současné době pro testování inhibiční schopnosti sloučenin, jsou založeny na různých reakcích a principech.

Je velice důležité mít spolehlivé metody pro měření aktivity AChE v biologických vzorcích nejen z důvodu jejich důležitosti ve fyziologických studiích, ale také při navrhování nových léků a léčiv a pro neurodegenerativní onemocnění, jako je AD; jako bioindikátory kontaminace životního prostředí a pro navrhování nových produktů používaných při hubení škůdců [62].

Při stanovení enzymových aktivit se musí respektovat určité podmínky. Mezi ně patří:

- Výsledek stanovení aktivity enzymu je závislý na použité metodě
- Aktivitu je nutno měřit za přesně definovaných experimentálních podmínek

- Podmínky měření je nutno optimalizovat (používat nejvhodnější typ pufru a jeho koncentrace, pH, přesný přírůstek aktivátorů, typ substrátu a jeho koncentrace, přesný objem vzorku v reakční směsi atd.)
- Enzymová reakce by měla probíhat pomalu (přeměna malého množství substrátu, konstantní rychlost enzymové reakce, naředění vzorku enzymu apod.)
- Substrát ani pufr nesmí obsahovat žádné kontaminující látky (musí se dbát na čistotu všech roztoků)
- Existují další faktory, které mohou ovlivnit výsledek měření, jako je teplota (enzymové reakce jsou citlivé na změny teploty, teplota ovlivňuje stabilitu enzymu a afinitu substrátu k danému enzymu) [63].

Aktivitu enzymu lze stanovovat sledováním úbytku koncentrace substrátu, či sledováním přírůstku koncentrace produktu. Podle použitého principu detekce a instrumentace můžeme rozdělit metody elektrometrické, titrační, manometrické, kolorimetrická stanovení nehydrolyzovaného substrátu, sledování změn pH pomocí barevného indikátoru, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické, enzymové a další [64].

#### **2.4.1 Manometrická metoda**

Warburgova manometrická metoda je založena na měření objemu  $\text{CO}_2$ . Metoda využívá vzniku kyseliny octové enzymatickou hydrolyzou substrátu, která potom reaguje s hydrogenuhličitanovým pufrem a tím vzniká plynný  $\text{CO}_2$ , který je měřen manometricky.

Warburgova metoda je finančně nákladná a složitá, i když je v praxi spolehlivá. Výhodou této metody je možnost měření v suspenzích, tkáních a pletivech. Velkou nevýhodou metody však je její omezená citlivost, je jen používána pro stanovení některých reverzibilních inhibitorů ChE, ale není vůbec vhodná pro stanovení enzymové kinetiky [65, 66].

#### **2.4.2 pH-statová metoda**

Tato metoda slouží ke sledování rychlosti enzymových reakcí. Tyto reakce vyvolávají určité změny pH v daném roztoku. Využívá neutralizaci

reakce hydrolýzou ACh, kterou vzniká kyselina octová. Změna pH je způsobená kyselinou octovou, produktem hydrolýzy ACh působením AChE. Tato kyselina je potom titrována roztokem silné zásady.

Během metody se měří množství přídavku zásaditého potřebného roztoku k neutralizaci této kyseliny. Rychlost přídavku je potom přímo úměrná aktivitě nebo inhibici ChE [67].

### **2.4.3 Spektrofotometrické metody**

Spektrofotometrické metody jsou analytické techniky, které slouží k měření různých vlastností vzorku (např. koncentrace určité látky v roztoku) na základě principu pohlcování světla různých vlnových délek spektra [68].

Principem je ozařování roztoku v měřící kyvetě určitým zdrojem záření, a světelné záření je pak pohlcované analyzovanou molekulou. Detektor záření zpracovává intenzitu dopadajícího záření neabsorbovaného roztokem. Množství absorbovaného záření je úměrné koncentraci látky v analyzovaném roztoku.

Spektrofotometrický přístroj měří absorbanci (přesněji měří přírůstek absorbance) při určité vlnové délce [68, 69].

Ze všech analytických metod, spektrofotometrické stanovení představuje nejpoužívanější způsob detekce cholinesterázové aktivity, vzhledem k jeho výhodám (nízká náročnost, časově nenáročná, snadná optimalizace měření)

#### **2.4.3.1 Ellmanova metoda**

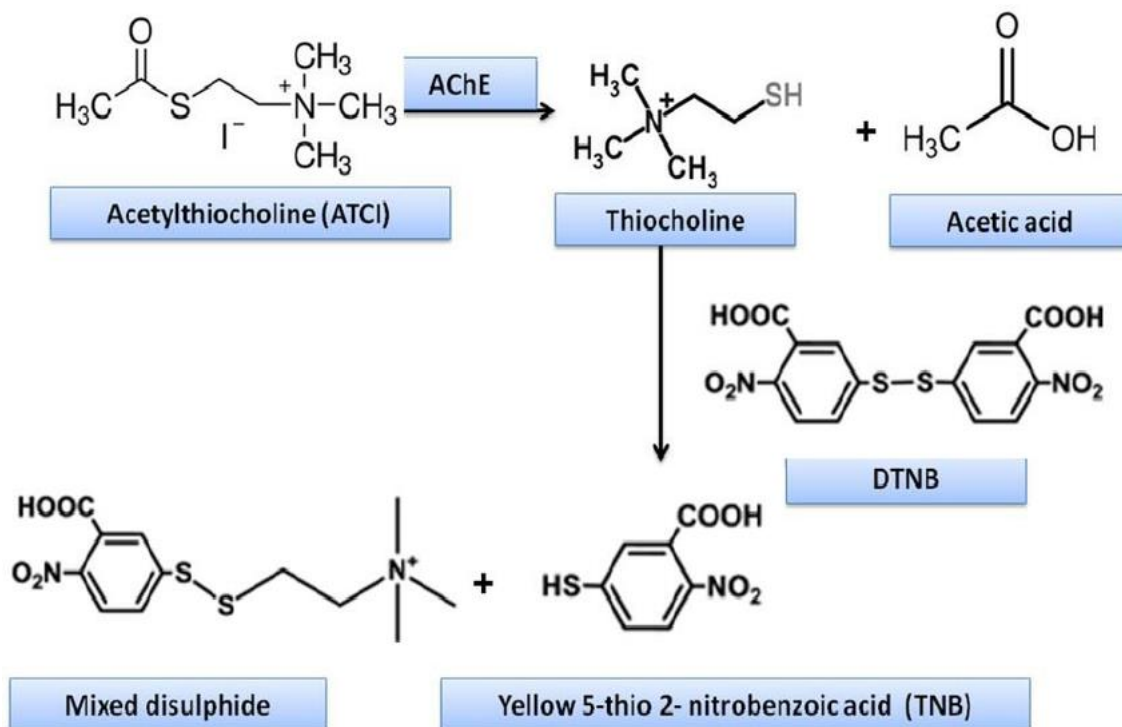
Ellmanova metoda se běžně používá pro stanovení aktivity ChE a také pro monitorování acetylcholinové hydrolýzy pomocí AChE nebo BChE. Ellmanovu metodu lze aplikovat také pro stanovení aktivity ChE tkáňových extraktů, homogenátů, buněčných suspenzí atd. [70]

Původní Ellmanův kolorimetrický princip je založen na hydrolýze esteru Thiocholinu (TCh), což je jeden z produktů enzymatické hydrolýzy Acetylthiocholinu (ATCh). V této metodě se používá Acetylthiocholin (ATCh) jako substrát, který je afinitní jak k AChE, tak k BChE. TCh reaguje s kyselinou 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoovou (DTNB), což je hlavní Ellmanovo činidlo, za

vzniku žlutého produktu (5-merkapto-2-nitrobenzoová kyselina a její disociované formy) při pH 8.

TCh obsahuje sulfanylovou skupinu (-SH) a je detekován během reakce pomocí Ellmanova činidla. Aniont vzniklý reakcí činidla s TCh je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm [70, 71].

Celý princip metody je zobrazen na obr. 14.



Obrázek 14 Princip Ellmanovy metody

Když se substrát (ATCh) hydrolyzuje, detektor zaznamenává zvýšení absorbance (A) při vlnové délce 412 nm, aktivita enzymu se vypočte jako reakční rychlost ze sklonu lineární části časové závislosti absorbance [70].

Reakce je velice rychlá (trvá cca 1 minutu) a tudíž neomezuje rychlost enzymatické hydrolýzy. V současné době, je to nejrozšířenější metoda detekce cholinesterázové aktivity.

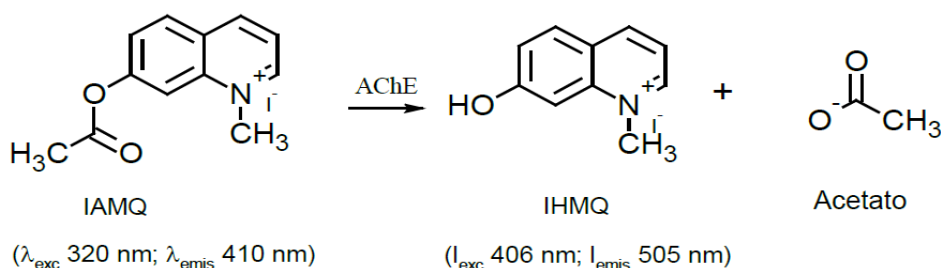
Mezi výhody této metody patří časová nenáročnost, jednoduchost, a že není finančně nákladná. Navíc je tato metoda nepoužívanější, protože UV-VIS spektrofotometr je dostupnější v mnoha laboratořích. Mezi nevýhody patří interference s hemoglobinem při měření aktivit ChE v krvi [72].

### 2.4.3.2 Fluorimetrická metoda

Fluorimetrická metoda představuje nejvíce citlivý způsob měření aktivity ChE. Tato metoda je založena na tvorbě fluoreskující sloučeniny v průběhu enzymové reakce.

Termín fluorescence je aplikován na emisi dříve absorbovaného záření. Touto metodou se měří sekundární záření fluorescence. Fluorimetrická metoda ukazuje mnoho charakteristik podobným fotometrickým metodám, ačkoliv má jako zvláštní vlastnost svou vysokou citlivost (skoro 100 násobně citlivější než kolorimetrické metody).

Principem této metody je hydrolýza 7-acetát-1-methylchinolinu jodidu (IAMQ, fluorigenní substrát) pomocí AChE za vzniku 7-hydroxy-1-methylchinolinu jodidu (IHMQ), což je vysoce fluorescenční sloučenina, která je detekována fluorimetricky [73]. Celý princip je zobrazen na obr. 15.



Obrázek 15 Princip fluorimetrického stanovení AChE

Díky citlivosti této metody a možnosti poskytnutí důležitých kinetických údajů, metoda se používá i pro navrhování a identifikaci možných nových inhibitorů

### 2.4.3.3 Chemiluminiscenční metoda

Tato metoda slouží k měření záření, které vzniká enzymovou reakcí. Využívá přirozeného substrátu ACh, který je hydrolyzován AChE na cholin, který je potom oxidován.

Při této reakci vzniká peroxid vodíku, který oxiduje luminol za katalýzy křenové peroxidázy za vzniku chemiluminiscenčního 3-aminofthalátu.

Aktivita AChE se měří zvýšením emise světla produkovaných akumulací cholinu nebo stanovením množství cholinu vytvořeného po krátkém intervalu. Celý proces je rychlý a citlivý a používá přirozený substrát enzymu [74].

#### **2.4.4 Separační metody**

V roce 2000 byla vyvinuta metoda, která zahrnuje účinnost vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie (MS) a biochemické detekce inhibiční aktivity AChE. Kombinací separační síly HPLC, vysoké selektivity biochemické detekce a schopnosti poskytovat molekulovou hmotnosti a strukturní informace MS, mohou být rychle identifikovány inhibitory AChE. Biochemická detekce aktivity enzymů je založena na výše uvedené Ellmanově metodě, kde se používá DNTB jako vhodné činidlo.

Tato detekční metoda se používá pro identifikaci inhibitorů AChE v rostlinných extraktech a dalších komplexních směsích [75].

Inhibici AChE lze také detekovat měřením poklesu tvorby produktů pomocí hmotnostní spektrometrie. Jedná se tedy o stanovení inhibice AChE více detektory najednou.

#### **2.4.5 Radiometrická metoda (radioizotopové stanovení)**

V roce 1962 byla vyvinuta radiometrická metoda, která umožňuje rychlé a jednoduché měření ChE v lidské krvi. Tato metoda zahrnuje minimální ředění vzorku a použití velmi nízkých koncentrací substrátu, a proto je citlivější na inhibici ChE reverzibilními inhibitory, jako jsou karbamáty, než manometrické metody nebo metody, kde se měří změny pH [76].

Principem je mísení malého množství vzorku (20  $\mu$ l) hemolyzované krve s  $^{14}$ C-označeným ACh na sklíčku mikroskopu. Po 1 minutě se směs okyselí a vysuší, za těchto podmínek je radioaktivní acetát uvolněný enzymaticky zcela těkavý, zatímco radioaktivní nehydrolyzovaný substrát není. Ztráta radioaktivity při okyselení a sušení je tedy přímo úměrná aktivitě AChE.

Metoda vyžaduje značený substrát, jeden přípravek postačuje pro několik set tisíc enzymatických testů [76, 77].



#### **2.4.6 Titrační metoda**

Titrační metoda je založena na titraci kyseliny, která je uvolněná enzymatickou hydrolýzou substrátu pomocí zásaditého roztoku hydroxidu. Aktivita enzymu se vyjadřuje jako spotřeba hydroxidu v ml v závislosti na čase [78].

Rychlost reakce se stanovuje titračním měřením kyseliny uvolněné během hydrolýzy ACh. Jedna jednotka způsobuje hydrolýzu jednoho mikromolu Ach za minutu při 25°C a pH 7,4 za specifických podmínek. Používá se Tris-HCl pufr a titruje se roztokem NaOH 0.01 M [79].

Titraci lze měřit buď automatickým titrátorem, nebo laboratorním pH-metrem. Reakční nádoba by měla být udržována na 25°C.

#### **2.4.7 Biosenzory**

Biosenzory jsou dalším způsobem detekce a charakterizace specifických inhibitorů různých enzymů. Existují biosenzory založené na AChE nebo BChE. K vývoji specifických testů s použitím biosenzorů se prováděly zkoušky na inhibici vybraných enzymů různými sloučeninami, jako jsou organofosfátové nebo karbamátové pesticidy, nervová činidla (sarin nebo VX) a další přírodní toxiny (např. Aflatoxiny) [80].

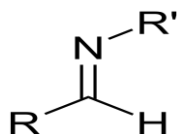
Během posledních desetiletí, biosenzory založené na inhibici AChE se ukázaly jako jednoduché a citlivé nástroje pro analýzu pesticidů v monitorování životního prostředí, bezpečnosti potravin a kontroly kvality. Tyto moderní biosenzory mají potenciál nahradit klasické analytické metody možným budoucím zjednodušením přípravy vzorků nebo rychlejší testování v rámci snížení nákladů na analýzy [81, 82]

#### **2.5 Schiffovy báze**

V roce 1864, německý chemik Hugo Schiff syntetizoval sloučeniny, které byly po něm pojmenovány, Schiffovy báze. Jsou to organické sloučeniny s obecným vzorcem  $R_1R_2C=N-R_3$ . Patří do podskupiny iminů.

Tyto báze obsahují funkční skupinu s dvojnou vazbou uhlík-dusík s atomem dusíku spojeným s arylou nebo alkylovou skupinou, ale bez

vodíku.  $R_3$  je arylová nebo alkylová skupina, díky které je Schiffova báze stabilním iminem. Struktura Schiffovy báze je zobrazena na obr. 16.



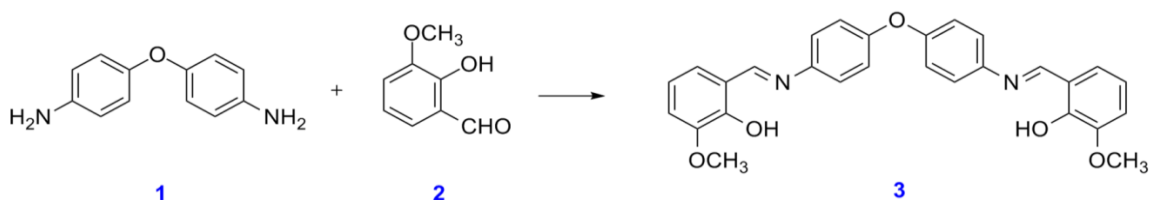
Obrázek 16 Strukturní vzorec Schiffových bází

### 2.5.1 Příprava Schiffových bází

Schiffovy báze mohou být syntetizovány z aromatického aminu a karbonylové sloučeniny nukleofilním přidáním, tvořícím hemiaminal, následovaný dehydratací za vzniku iminu. V typické reakci reaguje 4'-diaminodifenyletherem s o-vanilinem.

Směs 4'-diaminodifenyletheru (1g, 5 mmol) a o-vanilinu (1,52g, 10 mmol) v methanolu (40 ml) je míchána při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny za vzniku oranžové sraženiny. Po filtraci a promytí methanolem vzniká čistá Schiffova báze (2,27g, 97%) [83].

Celý proces přípravy je zobrazen na obr. 17.



Obrázek 17 Příprava Schiffových bází

### 2.5.2 Význam Schiffových bází

Schiffovy báze se používají jako ligandy pro vytvoření koordinačních komplexů s kovovými ionty. Většina bází je umělá a používá se k tvorbě různých důležitých katalyzátorů. Také se používá k tvorbě inhibitorů ChE, jako je galantamin, což je reverzibilní inhibitor.

Hledání nových inhibitorů ChE je stále slibným přístupem k léčbě AD. Schiffovy báze jsou považovány za důležitou třídu organických sloučenin, které mají široké spektrum použití včetně inhibitorů enzymů. Schiffovy báze jsou zkoumány v rámci studií antimikrobiální, antivirové a protinádorové aktivity [84].

### **2.5.3 Anticholinergní aktivita Schiffovýchází**

Některé Schiffovy báze obsahují benzthiazolový blok. Benzthiazoly jsou heteroaromatické sloučeniny, odvozené od thiazolů, a mají ve své struktuře atom síry a dusíku. Na rozdíl od thiazolů, benzthiazoly mají benzenové jádro.

Tyto sloučeniny jsou součástí mnoho biologicky aktivních látek a mají různé účinky farmakologické, antivirové, antinádorové i anticholinesterázové [85].

Tyto benzthiazolové deriváty mohou interagovat s peptidy a jsou použity jako činidla pro zobrazování AD v mozku. V roce 2013 se syntetizovala řada nových multifunkčních sloučenin, které nesou dvě farmakologické skupiny: takrin a benzthiazolovou skupinou spojenou různými markery, které obsahují amidovou vazbu, alkylový nebo arylalkylový řetězec.

Tyto nové hybridy takrin-benzthiazol vykazují vysoké *in vitro* aktivity s hodnotami  $IC_{50}$  v rozmezí nízkých mikromolárních až submikromolárních koncentrací (0,34-1,84  $\mu$ M) k inhibici AChE [86].

Tyto heterocyklické sloučeniny jsou často vystaveny různým studiím objevování léčiv, některé klinicky dostupné léky nesoucí tyto látky se používají při léčbě několika onemocnění CNS. Účinky těchto sloučenin na enzym AChE byly zkoumány pomocí Ellmanovy kolorimetrické metody, a různé studie ukázaly, že některé sloučeniny mají srovnatelnou anticholinesterázovou aktivitu se standardním lékem donepezilem [87].

## **3. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce je stanovit hodnoty aktivity Acetylcholinesterázy a Butyrylcholinesterázy u vybraných připravených derivátů spektrofotometricky. Dále se musí stanovit hodnoty  $IC_{50}$  připravených derivátů (inhibitorů), což vyjadřuje hodnotu koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu.

Další součástí práce je stanovení hodnoty rozdělovacího koeficientu připravených derivátů v systému 1-oktanol:voda.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Komerčně dostupná chemická činidla

*n*-Hexan 95% - Sigma-Aldrich Co. LLC.

Kyselina chlorovodíková p.a. – PENTA s.r.o.

*N*-ethyl-diisopropylamin 99 % - abcr GmbH

Methanol p.a. – Lach-Ner s.r.o.

Benzaldehyd 99 % - Sigma-Aldrich Co. LLC.

2-Methylbenzaldehyd 97 % - Sigma-Aldrich Co. LLC.

3-Nitrobenzaldehyd 99 % - Sigma-Aldrich Co. LLC.

3-Fluorbenzaldehyd 97 % - Sigma-Aldrich Co. LLC.

4-Methoxybenzaldehyd 98 % - Sigma-Aldrich Co. LLC.

Tetrahydridoboritan sodný 97 % - ABCR GmbH

## 4.2 Použité chemikálie a roztoky

Pokud není uvedeno jinak, všechny roztoky jsou vodné.

Seznam použitých chemikálií a roztoků:

- Enzym Acetylcholinesteráza (AChE, rozpuštěný v 0,1M PBS)
- Acetylthiocholin jodid (ATChI): 0,1M roztok rozpuštěný v 0,1M PBS, pro měření aktivity AChE
- Acetylthiocholin (ATCh): substrát pro oba enzymy, 0,001M, pro měření hodnoty  $IC_{50}$  vybraných inhibitorů Ellmanovou metodou
- 0,1M roztok fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4: pro přípravu 500ml pufru bylo použito 4g NaCl; 0,1g  $KH_2PO_4$ ; 1,45g  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ ; 0,1g KCl, všechno naředěno do 500ml redestilované vody
- Ellmanovo činidlo (DTNB,  $5 \times 10^{-4} M$ ): 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina), pro stanovení aktivity enzymového preparátu a stanovení hodnoty  $IC_{50}$  vybraných inhibitorů Ellmanovou metodou
- Enzym Butyrylcholinesteráza (BChE, rozpuštěný v 0,1M fosfátového pufru)
- Demineralizovaná voda (pro ředění a přípravu vybraných inhibitorů)
- Demineralizovaná voda (pro stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných derivátů v systému 1-oktanol:voda)
- Roztok 1-oktanolu (pro stanovení hodnoty rozdělovacího koeficientu vybraných derivátů v systému 1-oktanol:voda)

## 4.3 Použité přístroje

Všechny použité přístroje byly k dispozici na laboratořích Univerzity Pardubice.

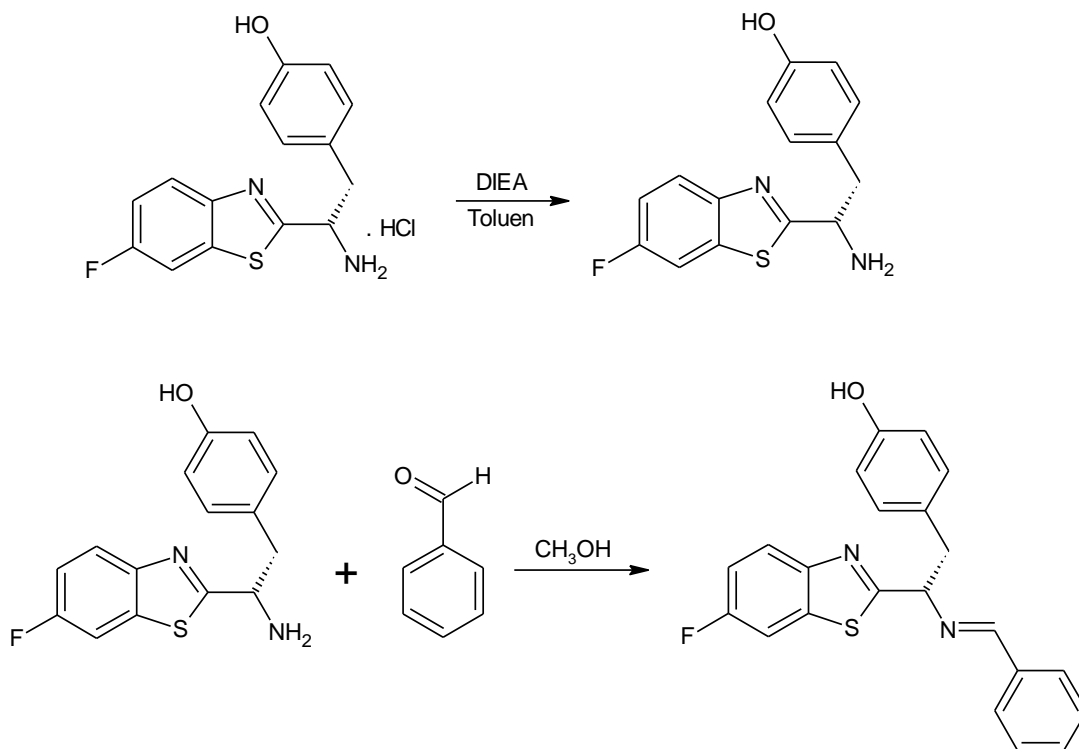
Seznam použitých přístrojů:

- Spektrofotometr s diodovým polem Hewlett-Packard 8453, USA
- Centrifuga MPW-340, Polsko
- Třepačka Heidolph Multi Reax

## 4.4 Syntéza testovaných derivátů

### 4.4.1 Příprava 4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenolu

#### Reakční schéma:



#### Násada:

(1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)ethanamin hydrochlorid	1,3 g (0,004 mol)
Toluen	40 ml
Methanol	30 ml
Benzaldehyd	0,42 g (0,004 mol) 0,41 ml
Hexan	30 ml

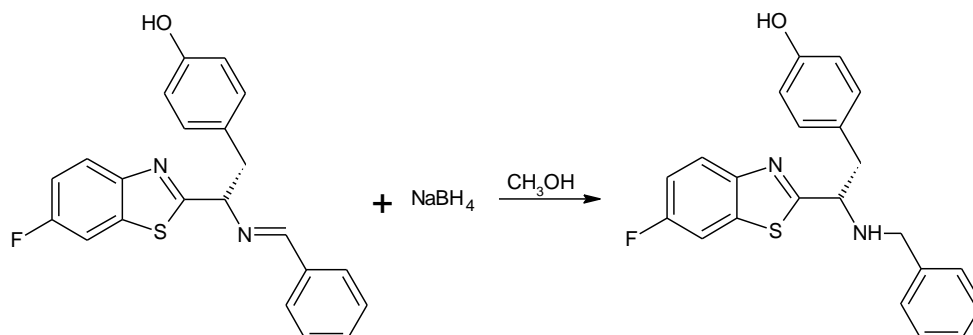
#### Pracovní postup:

Do 250 ml baňky bylo předloženo 1,3 g (1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)ethanamin hydrochloridu, 40 ml toluenu a 30 ml destilované vody. Následně byla za míchání přidávkem *N,N*-diisopropyl-*N*-ethylaminu upravena hodnota pH na 9 – 10. Horní toluenová vrstva obsahující uvolněnou bázi aminu byla oddělena a přefiltrována do 100 ml kulaté baňky. Z

takto získané reakční směsi byl destilací za sníženého tlaku (50°C/ 60 - 80 mbar) oddestilován veškerý toluen. K takto získanému olejovitému destilačnímu zbytku bylo následně přidáno 30 ml methanolu a 0,41 ml benzaldehydu. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Po této době byl z reakční směsi destilací za sníženého tlaku (50°C/ 160 - 200 mbar) oddestilován veškerý methanol. Takto získaný olejovitý destilační zbytek byl za horka rozpuštěn v 30 ml hexanu. Ochlazením na teplotu 0 – 5°C byl získán smetanově žlutý krystalický produkt. Produkt byl izolován filtrací a byl promyt 5 ml vychlazeného hexanu. Izolovaný produkt byl sušen stáním na vzduchu při laboratorní teplotě. Bylo připraveno 1,1 g produktu (73 % výtěžek). Stejnou metodou byly syntetizovány i ostatní Schiffovy báze. Výtěžky jsou uvedeny v kapitole 4.4.4.

#### 4.4.2 Příprava 4-[(2S)-2-(benzylamino)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenolu

##### Reakční schéma:



##### Násada:

4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenol	1 g (0,0026 mol)
Tetrahydridoboritan sodný	0,4 g (0,011 mol)
Methanol	40 ml

##### Pracovní postup:

Do 100 ml baňky bylo předloženo 1 g 4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenolu, který byl rozpuštěn v 40 ml methanolu. Následně bylo do reakční směsi v malých dávkách postupně přidáno 0,4 g tetrahydridoboritanu sodného. Reakční směs byla dále míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Poté byla reakční směs přelita do 250 ml baňky, do které z reakční směsi bylo přidáno 60 ml vody. Reakční směs byla následně hodinu míchána a po té byla ochlazena na teplotu 0 – 5°C. Vyloučený produkt byl izolován filtrací a byl promyt 2 x 10 ml vody. Izolovaný produkt byl sušen stáním na vzduchu při laboratorní teplotě. Bylo připraveno 0,92 g produktu (91 % výtěžek). Stejnou metodou byly syntetizovány i ostatní redukované Schiffovy báze. Výtěžky jsou uvedeny v kapitole 4.4.4.



### **4.4.3 Metody charakterizace**

#### **Bod tání**

Teplota tání byla stanovena pomocí bodotávku Büchi Melting Point B - 540. U bodotávku je možnost sledovat proces tání přes zvětšovací sklo a průběh reakce je viditelný na LCD displeji.

#### **NMR spektroskopie**

NMR spektra byla měřena v hexadeuteriodimethylsulfoxidu při teplotě 300 K na přístroji Bruker Avance 400 MHz v pulzním módu s Fourierovou transformací. Spektra byla měřena v 5-ti milimetrové širokopásmové laditelné sondě a frekvence použité při měření byly u  $^1\text{H}$  spekter 400,13 MHz, pro  $^{13}\text{C}$  spektra pak 100,62 MHz, a  $^{19}\text{F}$  spektra 376,46 MHz. Všechna NMR spektra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a  $^{19}\text{F}$ ) byla měřena standardním způsobem. Hodnoty  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  chemických posunů byly vztaženy vůči signálu rozpouštědla ( $\delta(^1\text{H}) = 2,5$  ppm ( $\delta(^{13}\text{C}) = 39,5$  ppm (DMSO) a přepočteny do  $\delta$ -stupnice.

#### **Optická otáčivost**

K měření byl použit Polarimetr M341 Perkin-Elmer. Polarimetr má zabudovanou sodíkovou výbojku (Na 589 nm) a rtuťovou výbojku (Hg 578, 546, 436 a 365 nm). Přístroj byl kalibrován na methanol.

$$[\alpha]_{\text{D}^{25}} = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot l}$$

$$l = 1$$

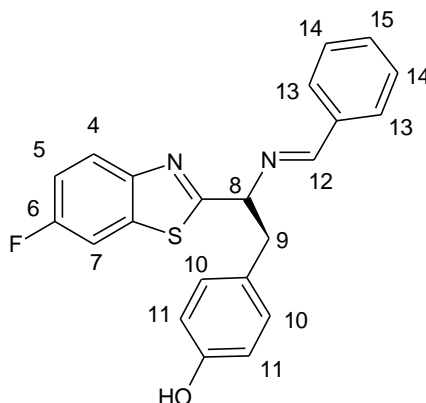
$$c = [\text{g}/100\text{ml}]$$

#### **Elementární analýza**

Elementární analýza byla stanovena na analyzátoru Flash 2000 CHNS Analyzer od firmy ThermoFisher Scientific.

#### 4.4.4 Přehled testovaných derivátů

##### 1. 4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenol



**Vzhled:** Bílá krystalická látka

**Výtěžek:** 75 %

**B.t.:** 149 – 152 °C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>:** - 26,7 (c = 1, methanol)

**<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9,22 (1H, s, OH); 8,09 (1H, s, H12); 8,00 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,9 Hz, H4); 7,98 (1H, dd, <sup>4</sup>J = 2,7 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 8,7 Hz, H7); 7,73 (2H, dd, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, <sup>4</sup>J = 1,9 Hz, H13); 7,48 (3H, m, H14, H15); 7,37 (1H, dt, <sup>4</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 2,6 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, H5); 6,94 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,4 Hz, H11); 6,60 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,4 Hz, H10); 5,00 (1H, m, H8); 3,22 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 9,3 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 3,6 Hz, H9); 3,21 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 9,5 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 3,8 Hz, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 175,0 (d, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 3,1 Hz); 163,3; 159,5 (d, <sup>1</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 242,4 Hz); 155,9; 149,7; 135,7 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 12,4 Hz); 135,4; 131,3; 130,8; 128,8; 128,1; 127,1; 123,7 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 9,7 Hz); 115,0; 114,5 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 24,8 Hz); 108,6 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C)) = 26,8 Hz); 72,8; 42,7.

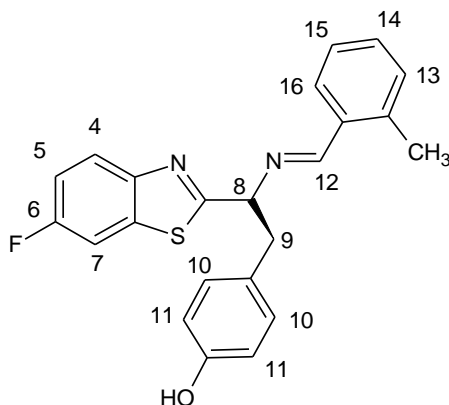
**<sup>19</sup>F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = -117,0

**Elementární analýza:** C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 376,45)

Vypočteno: C (70,19 %), H (4,55 %), N (7,44 %), S (8,52 %)

Stanovenno: C (77,32 %), H (4,43 %), N (7,26 %), S (8,68 %)

**2. 4-((2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(E)-(2-methylbenzyliden)amino]ethyl)fenol**



**Vzhled:** Bílá krystalická látka

**Výtěžek:** 77 %

**B.t.:** 149 - 151 °C

$[\alpha]_D^{25}$ : - 29,2 (c = 1, methanol)

**$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 9,23 (1H, s, OH); 8,24 (1H, s, H12); 8,01 (1H, dd,  $^3J = 9,0$  Hz,  $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 5,0$  Hz, H4); 7,98 (1H, dd,  $^4J = 2,7$  Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 8,7$  Hz, H7); 7,79 1H, dd,  $^3J = 7,6$  Hz,  $^4J = 1,4$  Hz, H16); 7,37 (1H, dt,  $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 2,7$  Hz,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 9,1$  Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 9,1$  Hz, H5); 7,79 (1H, dt,  $^3J = 7,6$  Hz,  $^4J = 1,6$  Hz, H15); 7,27 (1H 7,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 7,6$  Hz, H14); 7,20 (1H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 7,6$  Hz, H13); 6,96 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 8,4$  Hz, H11); 6,63 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H}) = 8,4$  Hz, H10); 5,02 (1H, m, H8); 3,22 (1H, dd,  $^2J = 9,5$  Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 3,7$  Hz, H9); 3,21 (1H, dd,  $^2J = 9,8$  Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H}) = 3,9$  Hz, H9); 2,27 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 175,4 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 3,0$  Hz); 162,3; 159,5 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 242,2$  Hz); 155,9; 149,8 (d,  $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 1,4$  Hz); 137,9; 135,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 11,6$  Hz); 133,2; 130,8; 130,7; 127,6; 127,0; 126,1; 123,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 9,6$  Hz); 114,9; 114,5 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 24,8$  Hz); 108,6 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C}) = 26,8$  Hz); 72,9; 42,8; 18,8.

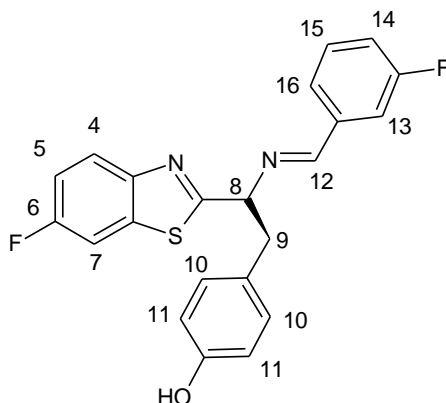
**$^{19}\text{F NMR}$  (376,46 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = -116,8

**Elementární analýza:** C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 390,47)

Vypočteno: C (70,75 %), H (4,90 %), N (7,17 %), S (8,21 %)

Stanoveno: C (70,89 %), H (4,84 %), N (7,32 %), S (8,12 %)

**3. 4-((2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(E)-(3-fluorbenzyliden)amino]ethyl)fenol**



**Vzhled:** Bílá krystalická látka

**Výtěžek:** 70 %

**B.t.:** 134 - 136°C

$[\alpha]_D^{25}$ : - 24,0 (c = 1, methanol)

**$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 9,24 (1H, s, OH);  $\square$ 8,09 (1H, s, H12); 8,01 (1H, dd,  $^3J$  = 8,9 Hz,  $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 4,9 Hz, H4); 7,97 (1H, dd,  $^4J$  = 2,6 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 8,8 Hz, H7); 7,53 (3H, m, H13, H14, H16); 7,37 (1H, dt,  $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 2,6 Hz,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz, H5); 7,33 (1H, m, H14); 6,95 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H11); 6,60 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H10); 5,01 (1H, m, H8); 3,22 (1H, dd,  $^2J$  = 9,3 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 3,8 Hz, H9); 3,21 (1H, dd,  $^2J$  = 9,3 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 4,0 Hz, H9).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 174,6 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 3,2 Hz); 162,3 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 3,2 Hz); 162,3 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 244,5 Hz); 162,1 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 2,4 Hz); 159,5 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 242,8 Hz); 155,9; 149,8 (d,  $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 1,5 Hz); 137,8 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 7,4 Hz); 135,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 11,7 Hz); 131,0 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 8,2 Hz); 130,8; 127,0; 124,6 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 2,5 Hz); 123,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 9,6 Hz); 118,2 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 21,5 Hz); 115,0; 114,5 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 24,7 Hz); 113,8 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 21,9 Hz); 108,6 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$ ) = 27,0 Hz); 72,7; 42,6.

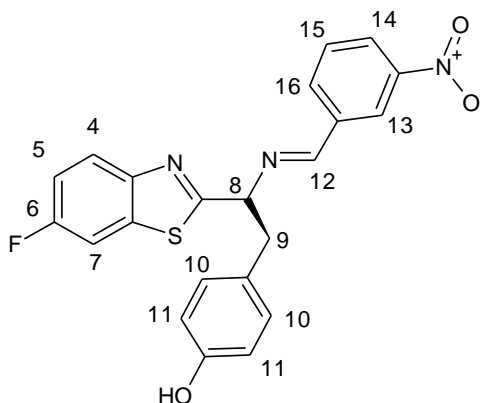
**$^{19}\text{F NMR}$  (376,46 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = -112,7; -116,8

**Elementární analýza:** C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 394,44)

Vypočteno: C (66,99 %), H (4,09 %), N (7,10 %), S (8,13 %)

Stanoveno: C (66,87 %), H (4,02 %), N (7,28 %), S (8,24 %)

**4. 4-{(2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(E)-(3-nitrobenzyliden)amino]ethyl}fenol**



**Vzhled:** Světle žlutá krystalická látka

**Výtěžek:** 78 %

**B.t.:** 172 – 174 °C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>:** - 34,7 (c = 1, methanol)

**<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9,23 (1H, s, OH); 8,56 (1H, m, H13); 8,33 (1H, dd, <sup>4</sup>*J* = 1,0 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 8,2 Hz, H14); 8,26 (1H, s, H12); 8,13 (1H, d, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 7,7 Hz, H16); 8,01 (1H, dd, <sup>3</sup>*J* = 9,0 Hz, <sup>4</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,9 Hz, H4); 7,98 (1H, dd, <sup>4</sup>*J* = 2,7 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 8,8 Hz, H7); 7,77 (1H, t, <sup>3</sup>*J* = 7,9 Hz, H15); 7,37 (1H, dt, <sup>4</sup>*J*(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 2,7 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 9,0 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 9,0 Hz, H5); 6,96 (2H d, <sup>3</sup>*J*(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,4 Hz, H11); 6,60 (2H d, <sup>3</sup>*J*(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,4 Hz, H10); 5,07 (1H, m, H8); 3,26 (1H, dd, <sup>2</sup>*J* = 9,3 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,3 Hz, H9); 3,25 (1H, dd, <sup>2</sup>*J* = 9,3 Hz, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,0 Hz, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 174,2 (d, <sup>4</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 3,1 Hz); 161,5; 159,5 (d, <sup>1</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 242,4 Hz); 155,9; 149,6; 148,2; 136,8; 135,7 (d, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 11,7 Hz); 134,4; 130,8; 130,6; 126,8; 125,7; 123,7 (d, <sup>3</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 9,7 Hz); 121,9; 115,0; 114,5 (d, <sup>2</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 24,7 Hz); 108,6 (d, <sup>2</sup>*J*(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C)) = 27,1 Hz); 72,7; 42,6.

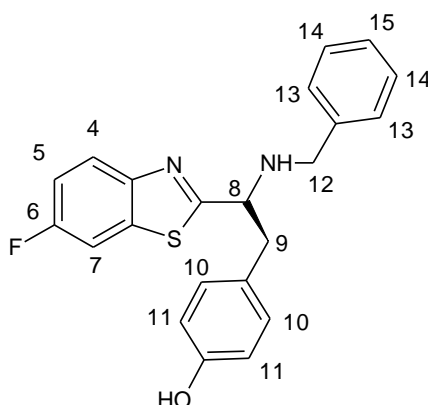
**<sup>19</sup>F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = -116,9

**Elementární analýza:** C<sub>22</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S (M<sub>r</sub> = 421,44)

Vypočteno: C (62,70 %), H (3,83 %), N (9,97 %), S (7,61 %)

Stanoveno: C (62,88 %), H (3,88 %), N (10,12 %), S (7,52 %)

## 5. 4-((2S)-2-(benzylamino)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl] fenol



**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Výtěžek:** 88 %

**B.t.:** 86 - 88 °C

**$[\alpha]_D^{25}$ :** - 46,7 (c = 1, methanol)

**$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 9,22 (1H, s, OH); 7,96 (1H, dd,  $^4J$  = 2,6 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 8,8 Hz, H7); 7,91 (1H, dd,  $^3J$  = 8,9 Hz,  $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 4,9 Hz, H4); 7,31 (1H, dt,  $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 2,6 Hz,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz, H5); 7,23 (5H, m, H13, H14, H15); 6,94 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H11); 6,62 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H10); 4,19 (1H, m, H8); 3,66 (1H, dd,  $^2J$  = 7,3 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 6,2 Hz, H12); 3,62 (1H, dd,  $^2J$  = 7,3 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 6,2 Hz, H12); 3,03 (1H, dd,  $^2J$  = 7,8 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,8 Hz, H9); 3,02 (1H, dd,  $^2J$  = 7,8 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,8 Hz, H9); 2,83 (1H, m, NH).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 178,5 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 3,1 Hz); 159,4 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 241,9 Hz); 155,9; 149,9 (d,  $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 1,4 Hz); 139,9; 136,0 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 11,7 Hz); 130,1; 128,1; 127,8; 127,4; 126,7; 123,5 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 9,5 Hz); 115,0; 114,1 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 24,9 Hz); 108,5 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 26,7 Hz); 61,4; 51,0; 41,5.

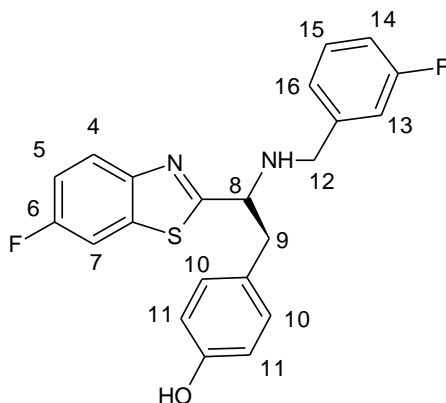
**$^{19}\text{F NMR}$  (376,46 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = -117,0

**Elementární analýza:** C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 378,46)

Vypočteno: C (69,82 %), H (5,06 %), N (7,40 %), S (8,47 %)

Stanoveno: C (69,97 %), H (5,00 %), N (7,27 %), S (8,61 %)

**6. 4-((2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(3-fluorbenzyl)amino]ethyl)fenol**



**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Výtěžek:** 85 %

**B.t.:** 124 - 126 °C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>:** - 49,8 (c = 1, methanol)

**<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9,24 (1H, s, OH); 7,95 (1H, dd, <sup>4</sup>J = 2,6 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 8,8 Hz, H7); 7,91 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 9,0 Hz, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 5,0 Hz, H4); 7,31 (1H, dt, <sup>4</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 2,6 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, H5); 7,28 (1H, m, H15); 7,01 (3H, m, H13, H14, H16); 6,94 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,5 Hz, H11); 6,62 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,5 Hz, H10); 4,18 (1H, m, H8); 3,69 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 7,2 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 5,0 Hz, H12); 3,68 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 6,7 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,8 Hz, H12); 3,04 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 7,8 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 5,8 Hz, H9); 3,02 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 7,7 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 5,8 Hz, H9); 2,95 (1H, m, NH).

**<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 178,3 (d, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 2,9 Hz); 162,2 (d, <sup>1</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 243,4 Hz); 159,5 (d, <sup>1</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 242,0 Hz); 156,0; 149,9 (d, <sup>5</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 1,5 Hz); 143,2 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 7,0 Hz); 136,0 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 11,5 Hz); 130,2; 129,9 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 8,3 Hz); 127,4; 123,7 (d, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 2,3 Hz); 123,5 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 9,6 Hz); 115,1; 114,3 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 21,3 Hz); 114,1 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 24,8 Hz); 113,4 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 21,0 Hz); 108,6 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C)) = 26,8 Hz); 61,4; 50,3; 41,5.

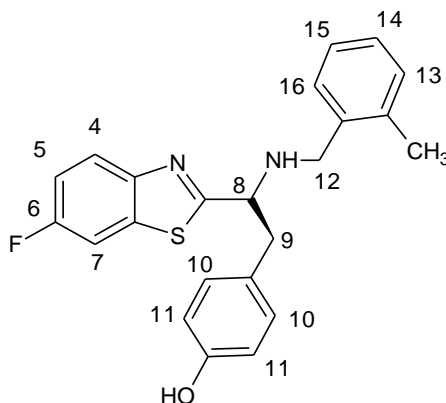
**<sup>19</sup>F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = -113,6; -116,9

**Elementární analýza:** C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 396,45)

Vypočteno: C (66,65 %), H (4,58 %), N (7,07 %), S (8,09 %)

Stanoveno: C (66,81 %), H (4,52 %), N (6,95 %), S (8,24 %)

**7. 4-((2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)2-[(2-methylbenzyl)amino]ethyl}fenol**



**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Výtěžek:** 87 %

**B.t.:** 71 – 74 °C

$[\alpha]_D^{25}$ : - 51,2 (c = 1, methanol)

**$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 9,24 (1H, s, OH); 7,98 (1H, dd,  $^4J$  = 2,6 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 8,8 Hz, H7); 7,93 (1H, dd,  $^3J$  = 8,9 Hz,  $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 4,9 Hz, H4); 7,32 (1H, dt,  $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 2,6 Hz,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz, H5); 7,17 – 7,07 (4H, m, H13, H14, H15, H16); 6,98 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,4 Hz, H11); 6,63 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,4 Hz, H10); 4,24 (1H, m, H8); 3,62 (1H, dd,  $^2J$  = 7,7 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,4 Hz, H12); 3,61 (1H, dd,  $^2J$  = 7,7 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,6 Hz, H12); 3,04 (1H, dd,  $^2J$  = 8,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,6 Hz, H9); 3,02 (1H, dd,  $^2J$  = 8,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,5 Hz, H9); 2,53 (1H, m, NH); 2,11 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 178,6 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 3,1 Hz); 159,5 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 241,9 Hz); 156,0; 149,9 (d,  $^5J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 1,4 Hz); 137,7; 136,1; 136,0 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 11,6 Hz); 130,1; 129,9; 128,4; 127,4; 126,8; 125,6; 123,5 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 9,5 Hz); 115,1; 114,2 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 25,0 Hz); 108,6 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 26,8 Hz); 61,8; 49,2; 41,4; 18,4.

**$^{19}\text{F NMR}$  (376,46 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = -116,9

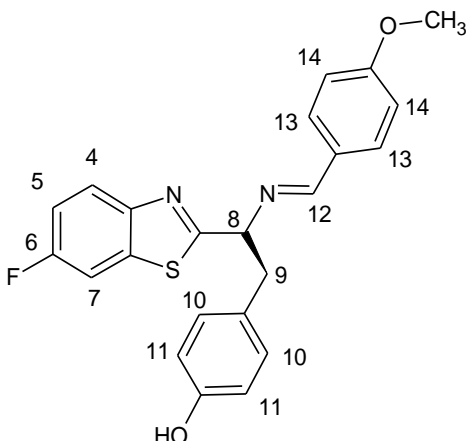
**Elementární analýza:** C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>FN<sub>2</sub>OS (M<sub>r</sub> = 392,49)

Vypočteno: C (70,38 %), H (5,39 %), N (7,14 %), S (8,17 %)

Stanoveno: C (70,49 %), H (5,30 %), N (7,30 %), S (8,05 %)



**8. 4-((2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(4-methoxybenzyl)amino]ethyl)fenol**



**Vzhled:** Nažloutlá pevná látka

**Výtěžek:** 88 %

**B.t.:** 152 - 154°C

**$[\alpha]_D^{25}$ :** - 30,5 (c = 1, methanol)

**$^1\text{H NMR}$  (400,13 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 9,21 (1H, s, OH); 8,00 (1H, dd,  $^3J$  = 8,9 Hz,  $^4J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 5,0 Hz, H4); 7,99 (1H, s, H12); 7,97 (1H, dd,  $^4J$  = 2,7 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 8,7 Hz, H7); 7,67 (2H, d,  $^3J$  = 8,8 Hz, H13); 7,36 (1H, dt,  $^4J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 2,7 Hz,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 9,1 Hz, H5); 7,00 (2H, d,  $^3J$  = 8,8 Hz, H14); 6,94 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H11); 6,60 (2H d,  $^3J(^1\text{H}, ^1\text{H})$  = 8,5 Hz, H10); 4,92 (1H, m, H8); 3,80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 3,22 (1H, dd,  $^2J$  = 9,6 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 3,7 Hz, H9); 3,21 (1H, dd,  $^2J$  = 9,9 Hz,  $^3J(^{19}\text{F}, ^1\text{H})$  = 4,0 Hz, H9).

**$^{13}\text{C NMR}$  (100,62 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = 175,4 (d,  $^4J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 3,2 Hz); 162,4; 161,7; 159,5 (d,  $^1J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 242,3 Hz); 155,8; 149,7; 135,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 11,8 Hz); 130,7; 129,8; 128,2; 127,2; 123,7 (d,  $^3J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 9,5 Hz); 114,9; 114,5 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 24,5 Hz); 108,6 (d,  $^2J(^{19}\text{F}, ^{13}\text{C})$  = 26,8 Hz); 72,8; 55,3; 42,7.

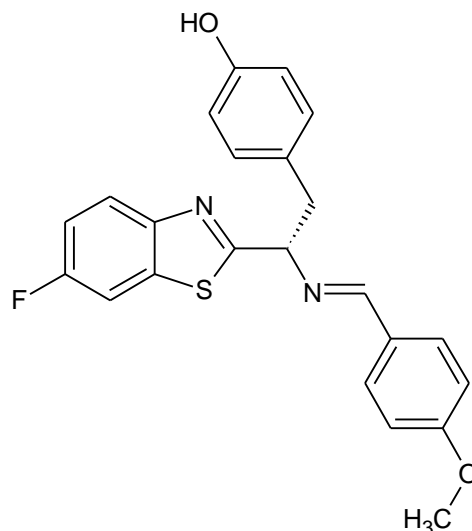
**$^{19}\text{F NMR}$  (376,46 MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  = -116,90

**Elementární analýza:** C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (M<sub>r</sub> = 408,49)

Vypočteno: C (67,96 %), H (4,71 %), N (6,89 %), S (7,89 %)

Stanoveno: C (67,80 %), H (4,74 %), N (7,04 %), S (7,72 %)

**9. 4-[(2S)-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-[(E)-(4-methoxybenzyliden)amino]ethyl]fenol**



**Vzhled:** Bílá krystalická látka

**Výtěžek:** 70 %

**B.t.:** 51 - 53°C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>:** - 30,5 (c = 1, methanol)

**<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 9,21 (1H, s, OH); 8,00 (1H, dd, <sup>3</sup>J = 8,9 Hz, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 5,0 Hz, H4); 7,99 (1H, s, H12); 7,97 (1H, dd, <sup>4</sup>J = 2,7 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 8,7 Hz, H7); 7,67 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8,8 Hz, H13); 7,36 (1H, dt, <sup>4</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 2,7 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 9,1 Hz, H5); 7,00 (2H, d, <sup>3</sup>J = 8,8 Hz, H14); 6,94 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,5 Hz, H11); 6,60 (2H d, <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H) = 8,5 Hz, H10); 4,92 (1H, m, H8); 3,80 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); 3,22 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 9,6 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 3,7 Hz, H9); 3,21 (1H, dd, <sup>2</sup>J = 9,9 Hz, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>1</sup>H) = 4,0 Hz, H9).

**<sup>13</sup>C NMR (100,62 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = 175,4 (d, <sup>4</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 3,2 Hz); 162,4; 161,7; 159,5 (d, <sup>1</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 242,3 Hz); 155,8; 149,7; 135,7 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 11,8 Hz); 130,7; 129,8; 128,2; 127,2; 123,7 (d, <sup>3</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 9,5 Hz); 114,9; 114,5 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C) = 24,5 Hz); 108,6 (d, <sup>2</sup>J(<sup>19</sup>F, <sup>13</sup>C)) = 26,8 Hz); 72,8; 55,3; 42,7.

**<sup>19</sup>F NMR (376,46 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):**  $\delta$  = -116,90

**Elementární analýza:** C<sub>23</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S (M<sub>r</sub> = 406,47)

Vypočteno: C (67,96 %), H (4,71 %), N (6,89 %), S (7,89 %)

Stanovenno: C (67,78 %), H (4,77 %), N (7,07 %), S (7,70 %)

## 4.5 Vlastní stanovení připravených derivátů (inhibitorů)

### 4.5.1 Stanovení aktivity enzymového preparátu (AEP)

#### **Acetylcholinesterázy a Butyrylcholinesterázy**

Pro stanovení aktivity enzymového preparátu (AEP) AChE a BChE se používaly následující roztoky:

- Ellmanovo činidlo (DTNB)  $5 \times 10^{-4}$  M
- 0,1 M fosfátový pufr (PBS) o pH 7,4: pro přípravu 500ml pufru bylo použito 4g NaCl; 0,1g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,45g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,1g KCl, všechno naředěno do 500ml redestilované vody
- 0,1 M ATChI (rozpuštěný v PBS)
- Enzym AChE rozpuštěný v 0,1 M PBS

Pro měření AEP se používala spektrofotometrická metoda. Principem metody je přidání enzymu do pufrované reakční směsi, která obsahuje substrát. Po přidání enzymu, enzymatická reakce je zahájena. Měří se spektrofotometricky závislost absorbance  $A$  na čase  $t$  po dobu 70 sekund.

#### **4.5.1.1 Přístroje**

K měření AEP byl použit spektrofotometr s diodovým polem...., a skleněná kyveta s objemem 3,5 ml a optickou dráhou 1 cm.

#### **4.5.1.2 Provedení reakce**

Nejprve se provádělo měření slepého pokusu (blanku). Do srovnávací kyvety bylo napipetováno 1,192 ml fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4; 0,8 ml Ellmanova činidla (DTNB) o  $5 \cdot 10^{-4}$  M; a 0,008 ml ATChI.

Spektrofotometricky se přístroj nuluje na blank, proti kterému se změřily další vzorky.

Následně se provádělo vlastní měření AEP. Do měrné kyvety, o objemu 3,5 ml s optickou dráhou 1 cm, bylo napipetováno 1,184 ml PBS; 0,8 ml DTNB; 8  $\mu\text{l}$  ATCh.Cl. Enzymatická reakce byla zahájena pipetováním 8  $\mu\text{l}$  AChE (nebo BChE). Spektrofotometricky byla měřena hodnota absorbance  $A$  při vlnové délce 412 nm po dobu 70 sekund. Ze získané přímkové závislosti  $A$  vs.  $t$ , byla vypočtena hodnota  $y$  pro  $x = 60$  s (z definice 1 U).

Aktivita enzymového preparátu (AEP) je tedy dána rovnicí:

$$AEP_{AChE} = y \cdot 17,67 [U]$$

kde v přepočítávacím faktoru 17,67 je zahrnuta hodnota ředění enzymu, celkový objem reakční směsi (RS) 2 ml, molární absorpční koeficient 14150 mol.l<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a optická dráha kyvety 1 cm.

#### **4.5.2 Stanovení hodnoty IC<sub>50</sub> připravených derivátů (inhibitorů)**

##### **4.5.2.1 Ellmanova metoda**

Ellmanova metoda patří do spektrofotometrických metod. Tato kolorimetrická metoda slouží k měření enzymové aktivity jak AChE, tak BChE.

Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu TCh (Acetylthiocholin slouží jako substrát jak pro AChE, tak pro BChE). Po vlastní enzymové hydrolýze je uvolněná příslušná kyselina a thiocholin. Molekula TCh obsahuje funkční skupinu –SH, která je pak detekována pomocí Ellmanova činidla (DTNB) spektrofotometricky tím, že po reakci s TCh dojde k uvolnění 5-merkapto-2-nitrobenzoového aniontu (TNB<sup>-</sup>). Tento aniont je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.

Při enzymové reakci dojde k vzniku žlutého zbarvení, toto zbarvení naznačuje start reakce po styku substrátu s enzymem.

Celý postup Ellmanovy metody a všechny chemické reakce jsou zobrazeny v kapitole 2.4.3.1 v obr. 14.

I když je Ellmanova metoda velice jednoduchá a přesná, při analýze biologických vzorků je nevýhodou Ellmanovy metody možná interference s hemoglobinem (Hb). Hb obsahuje –SH skupiny, na které se Ellmanovo činidlo (DTNB) může taky navázat.

##### **4.5.2.2 Měření IC<sub>50</sub> připravených derivátů (inhibitorů)**

Hodnota IC<sub>50</sub> popisuje účinnost inhibitoru. IC<sub>50</sub> je taková koncentrace inhibitoru, které způsobí 50% inhibici enzymu (anebo také pokles enzymové aktivity na 50%). Čím je hodnota IC<sub>50</sub> menší, tím účinnější je daný inhibitor.

Pro stanovení hodnoty  $IC_{50}$  daného inhibitoru lze použít závislosti, která platí mezi poměrem rychlostí neinhibované a inhibované hydrolýzy a koncentrací inhibitoru. Platí následující vztah:

$$\frac{V_0}{V_i} \text{ vs } [I]$$

kde  $V_0$  je rychlost neinhibované hydrolýzy;  $V_i$  je rychlost inhibované hydrolýzy; a  $[I]$  je koncentrace daného inhibitoru v reakční směsi.

Někdy se  $IC_{50}$  uvádí jako záporný dekadický logaritmus molární koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu, platí:

$$pI_{50} = -\log IC_{50}$$

Pro všechny typy uni-uni enzymatických inhibovaných reakcí (kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšená) je tato závislost přímková s úsekem rovným 1. Z takto získané přímky, procházející body (0;1) tedy ( $v_0/v_i$  vs  $[I]$ ), lze odečíst pro  $v_0/v_i = 2$  hodnotu  $IC_{50}$ .

#### **4.5.2.3 Provedení reakce**

Před vlastním měřením hodnoty  $IC_{50}$ , byla změřena aktivita enzymu AChE (BChE) 5 krát. Poté se provádělo měření slepého pokusu (blanku). Do srovnávací kyvety se napipetovalo 0,8 ml PBS; 0,4 ml DTNB a takové množství enzymového preparátu (AChE, resp. BChE), aby výsledná aktivita v reakční směsi byla 0,2 U. Reakční směsi byla nakonec doplněna fosfátovým pufrům o pH 7,4 tak, aby celkový objem reakční směsi byl 2 ml a změřena spektrofotometricky.

Následovalo měření enzymatické reakce bez inhibitorů (neinhibované reakce). Do měrné kyvety bylo napipetováno 0,8 ml PBS o pH 7,4; 0,4 ml DTNB ( $5 \cdot 10^{-4}$  M); 80  $\mu$ l ATCh (0,001 M) a takové množství enzymu, aby jeho aktivita ve výsledné reakční směsi byla 0,2 U. Reakční směsi je pak doplněna fosfátovým pufrům, aby reakční směs měla celkový objem 2 ml. Enzym byl pipetován jako poslední, protože jeho pipetováním do reakční směsi je zahájena enzymová reakce. Měří se hodnota absorbance při vlnové délce 412

nm po dobu 70 sekund na spektrofotometru s diodovým polem. Měření byla provedena v triplikátu nebo podle potřeby.

Dále bylo provedeno měření enzymatické reakce s inhibitory (inhibované reakce). Ze začátku bylo potřeba připravit roztoky inhibitorů na měření (bylo jich 9 k dispozici). Tyto roztoky byly nejprve rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na koncentraci 0,01 M a pak dál ředěny podle potřeby vodou, a to v poměru 1:9 (bylo napipetováno 0,1 ml vzorku daného inhibitoru a 0,9 ml destilované vody, ředění se dělalo pro každý z těch 9 vzorků). Do měrné kyvety bylo napipetováno 0,8 ml PBS; 0,4 ml DTNB; a 80  $\mu$ l ATCh. Připravené roztoky inhibitorů č.1 – č.9 byly nepipetovány v různých množstvích (10  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 50  $\mu$ l a 70  $\mu$ l o koncentraci 0,001 M). Do reakční směsi bylo napipetováno také takové množství enzymu, aby jeho aktivita ve výsledné reakční směsi byla 0,2 U (pro měření  $IC_{50}$  AChE, bylo napipetováno 6  $\mu$ l AChE; pro měření  $IC_{50}$  BChE bylo napipetováno 10  $\mu$ l BChE). Nakonec byla reakční směs doplněna fosfátovým pufrům, aby reakční směs měla celkový objem 2 ml. Enzym byl napipetován jako poslední, protože jeho pipetováním do reakční směsi je zahájena enzymová reakce. Měří se hodnota absorbance při vlnové délce 412 nm po dobu 70 sekund na spektrofotometru s diodovým polem. Měření byla provedena alespoň v duplikátu.

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

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

kde  $v$  je reakční rychlost;  $A$  je absorbance; a  $t$  je čas v sekundách. Poté byly sestaveny jednotlivé závislosti  $v_0/v_i$  vs.  $[I]$ , kde  $v_0$  je rychlost neinhibované reakce,  $v_i$  je rychlost inhibované reakce a  $[I]$  je molární koncentrace daného inhibitoru. Z rovnice lineární regrese byly potom určeny hodnoty  $IC_{50}$ . Stanovení rychlosti neinhibované a inhibované reakce bylo prováděno minimálně 3 krát.

### **4.5.3 Stanovení $K_{ow}$ připravených derivátů (inhibitorů)**

#### **4.5.3.1 Princip stanovení $K_{ow}$**

Rozdělovací koeficient  $K_{ow}$  v systému 1-oktanol:voda je definován jako poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému omezeně mísitelných rozpouštědel: n-oktanol a voda.

Jedná se o podíl koncentrace chemické látky (v tomto případě daného inhibitoru) v nepolární fázi 1-oktanolu a v polární vodné fázi.  $K_{ow}$  je bezrozměrná veličina a je obvykle vyjádřena v logaritmickeém tvaru log P. Platí vztah:

$$K_{ow} = \frac{C_o}{C_w}$$

kde  $C_o$  je koncentrace látky v n-oktanolu a  $C_w$  je koncentrace látky ve vodě.

Hodnota  $K_{ow}$  závisí na reakčních podmínkách jako je pH, teplota, iontová síla apod. Je tedy nezbytné vždy definovat experimentální podmínky pro správnou interpretaci dat  $K_{ow}$ .

$K_{ow}$  dále podává informaci o propustnosti těchto inhibitorů přes biologické membrány. Čím je větší hodnota  $K_{ow}$ , tím více je daná látka více lipofilní, teda látka bude lépe procházet skrz biologickou membránu.

#### **4.5.3.2 Provedení reakce**

Nejprve bylo k 1,5 ml 1-oktanolu napipetováno 10  $\mu$ l oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M. Poté byla směs intenzivně protřepávána 15 minut pomocí třepačky. Do měrné kyvety byl odpipetován 1 ml této směsi a byla změřena její hodnota absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Takto získaná hodnota absorbance odpovídala 100% daného inhibitoru v 1-oktanolu. Měření byla provedena v duplikátu.

Potom byla provedena druhá část měření. Ke směsi 1-oktanolu a demineralizované vody (v poměru 1:1, a celkový objem 3 ml) bylo napipetováno 10  $\mu$ l oktanolového roztoku daného inhibitoru o koncentraci 0,01 M, směs byla intenzivně protřepávána 15 minut a centrifugována při 3000 ot./min po dobu 10

minut. Do měrné kyvety bylo odpipetováno 1 ml oktanové vrstvy a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Srovnávacím prostředím byl vždy 1-oktanol. Takto byl určen procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě  $(\%)_1$ , dopočtem do 100% byl určen obsah inhibitoru ve vodné vrstvě  $100 - (\%)_1$ .

Poté byly vypočteny rozdělovací koeficienty jednotlivých inhibitorů v systému 1-oktanol:voda podle vztahu:

$$K_{ow} = \frac{(\%)_1}{100 - (\%)_1} = \frac{C_1}{C_2}$$

kde  $C_1$  je koncentrace daného inhibitoru v 1-oktanolu a  $C_2$  je koncentrace daného inhibitoru v deionizované vodě.



## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Aktivita enzymového preparátu (AChE a BChE)

Aktivita enzymů byla vždy změřena nejméně 3 krát. Aktivita enzymového preparátu (AChE nebo BChE) se stanovovala po rozmrazení enzymového preparátu, který byl v PBS, a roztoku enzymového preparátu ve fosfátovém pufru o pH 7,4, a to každý den měření. Aktivita enzymového preparátu byla měřena spektrofotometricky Ellmanovou metodou.

Z naměřených hodnot absorbance byly nejprve sestrojeny závislosti absorbance A na čase t. Příklad přímkové závislosti absorbance A na čase t pro stanovení aktivity enzymu AChE je zobrazen v grafu 1. Poté byly závislosti proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese. Pomocí rovnic lineární regrese a přepočítávacího faktoru 17,67 byly vypočteny enzymové aktivity AChE za časový úsek  $t = 60$  s.

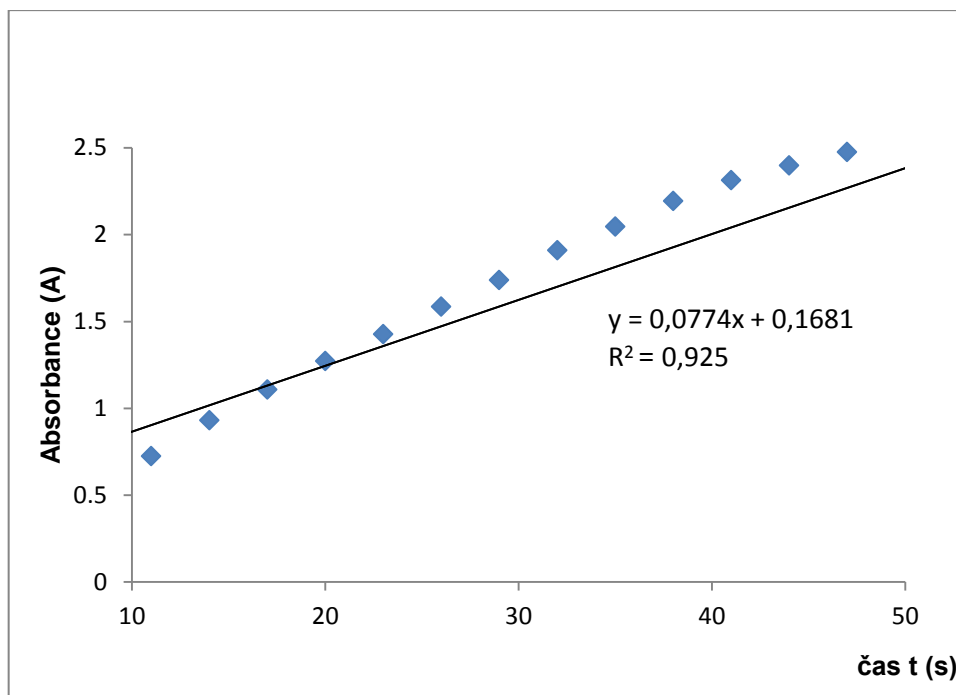
Všechny naměřené hodnoty aktivity enzymového preparátu byly potom zprůměrovány. Tyto zprůměrované hodnoty aktivity EP byly považovány za aktuální aktivity EP:  $AE_{AChE}$ . Aktivita EP byla vypočtena podle vztahu:

$$AEP = y \cdot 17,67 \left[ \frac{U}{ml} \right]$$

Dále bylo vypočteno množství enzymu, které bylo napipetováno do reakční směsi, aby jeho aktivita ve výsledné reakční směsi byla 0,2 U pro stanovení  $IC_{50}$  při inhibici AChE (resp. BChE). Příklad na výpočet přesného množství enzymu  $V_{AChE}$ , aby jeho aktivita v reakční směsi (o objemu 2 ml) byla 0,2 U je ukázán níže.

#### 5.1.1 Příklad přímkové závislosti absorbance na čase

Ze získaných hodnot absorbance byly sestrojeny závislosti absorbance A na čase t (při vlnové délce 412 nm) pro všechna 3 měření. Poté byly zobrazeny rovnice lineární regrese a vypočteny všechny hodnoty y. Pro tento vztah platí, že  $x = 60$  s. Příklad přímkové závislosti A na t je zobrazen v grafu 1.



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

### 5.1.2 Výpočet aktivity enzymového preparátu

Pro výpočet aktivity EP se považuje časový úsek t 60 s. Platí, že x = 60s:

$$y = 0,0774x + 0,1681$$

$$y = 0,0774 * 60 + 0,1681$$

$$y = 4,8121$$

Dále se vypočítala skutečná aktivita EP pro AChE:

$$AEP_{AChE} = y * 17,67 (U)$$

$$AEP_{AChE} = 4,8121 * 17,67 = 85,03 U$$

### 5.1.3 Výpočet objemu enzymu přidávaného do reakční směsi

Získané hodnoty aktivity EP všech měření byly:

- $AEP_{1.měření} = 85,03 U$
- $AEP_{2.měření} = 84,44 U$
- $AEP_{3.měření} = 86,31 U$

Nejdříve se zprůměrovaly všechny hodnoty aktivity EP z 3 měření.

$$\Delta AEP = \frac{85,03 + 84,44 + 86,31}{3} = 85,26 U$$

Pro měření aktivity AChE (resp. BChE) se používala přesná množství, a to 6  $\mu$ l (pro enzym AChE) a 10  $\mu$ l (pro enzym BChE) u všech inhibitorů. Měření bylo provedeno každý den před měřením  $IC_{50}$  vybraných inhibitorů.

## 5.2 Stanovení hodnoty $IC_{50}$ připravených derivátů (inhibitorů)

Hodnota  $IC_{50}$  byla stanovena pro všechny inhibitory (bylo jich 9 vzorků k dispozici), které jsou upřesněny v kapitole 4.3. Měření bylo provedeno minimálně 2 krát u všech inhibitorů, ale u některých vzorků bylo potřeba měřit vícekrát, podle potřeby.

Používala se Ellmanova metoda pro stanovení  $IC_{50}$ . Byla vypočtena reakční rychlost pro neinhibovanou reakci a reakční rychlost inhibovaných reakcí ze změny absorbance v čase.

Z naměřených závislostí absorbance na čase byly nejprve zjištěny rychlosti neinhibované ( $v_0$ ) a inhibované ( $v_i$ ) reakce a byly vypočteny jejich poměry (viz kapitola 4.4.2.2). Rychlost neinhibované reakce byla vždy zprůměrována minimálně z 2 měření. Rychlost inhibované reakce byla také vždy měřena 2 krát pro každé přesné dávkované množství testovaného inhibitoru.

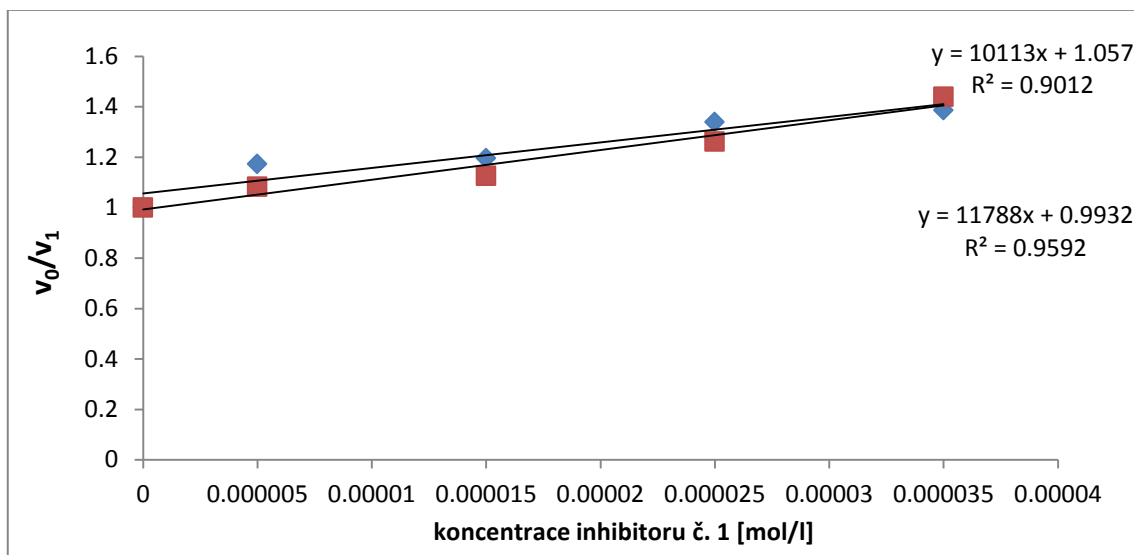
Poté byly sestrojeny všechny závislosti  $v_0/v_i$  vs.  $[I]$ , kde  $v_0$  je rychlost reakce bez inhibitoru,  $v_i$  je rychlost reakce s daným inhibitorem a  $[I]$  je molární koncentrace daného inhibitoru v reakční směsi. Následně byly všechny závislosti proloženy lineární spojnici trendu a byly zobrazeny rovnice lineární regrese.

Ze všech získaných přímkových závislostí, procházejících body (0;1) tedy ( $[I]$  ;  $v_0/v_i$ ), lze odečíst po zobrazení rovnic lineární regrese pro  $v_0/v_i = 2$  hodnotu  $IC_{50}$ .

Získané hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých inhibitorů byly nakonec zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou. Hodnoty  $IC_{50}$  všech inhibitorů jsou níže uvedeny.

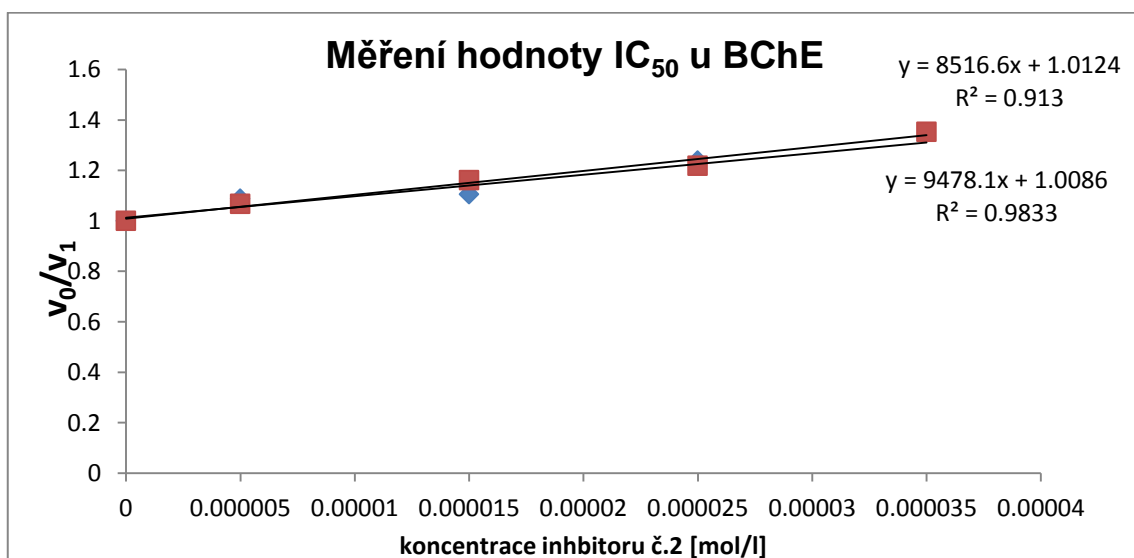
### 5.2.1 Příklad přímkové závislosti poměru rychlostí neinhibované a inhibované reakce $v_0/v_i$ na koncentraci inhibitoru [I]

Hodnota  $IC_{50}$  byla dopočtena z rovnice regrese. Příklady závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] jsou znázorněny na grafu 2 a grafu 3.



Graf 2 Příklad závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] č. 1 u AChE

Data byla získána měřením Ellmanovou metodou.



Graf 3 Příklad závislosti poměru neinhibované a inhibované reakce  $v_0/v_i$  na koncentraci inhibitoru [I] č. 1 u BChE

Data byla získána měřením Ellmanovou metodou.

### 5.2.2 Výpočet hodnoty $IC_{50}$ (z grafu 2 a 3)

Nejdříve se prováděl výpočet všech získaných dat z rovnic lineární regrese. Platí vztah:

- Pro první lineární regresi u měření s AChE ( $y = 2$ ):

$$y = 10113x + 1,057$$

$$2 = 10113x + 1,057$$

$$x = 9.324 * 10^{-5}M = 93.24 \mu M$$

- Pro druhou lineární regresi u měření s AChE ( $y = 2$ )

$$y = 11788x + 0,9932$$

$$2 = 11788x + 0,9932$$

$$x = 8.541 * 10^{-5}M = 85.41 \mu M$$

Následně se zprůměrovaly získané hodnoty  $IC_{50}$  pro inhibitor č.1 u AChE.

$$IC_{50} = \frac{93.24 + 85.41}{2} = 89.33 \mu M$$

Hodnota  $IC_{50}$  pro měření inhibitoru č.1 s BChE byla dopočtena stejným způsobem. Obě získané hodnoty z rovnic lineární regrese byly také zprůměrovány.

Pro všechny inhibitory č.1 až č.9 (jak u AChE, tak u BChE) byla dopočtena hodnota  $IC_{50}$  a výsledky byly zprůměrovány. Výsledky jsou uvedeny níže v tabulce.

### 5.2.3 Získané hodnoty $IC_{50}$ všech inhibitorů

Hodnoty  $IC_{50}$  jednotlivých inhibitorů byly zprůměrovány a vyjádřeny jako hodnoty se směrodatnou odchylkou.

Hodnoty  $IC_{50}$  inhibitorů č.1 až č.9 u obou enzymů (AChE a BChE) jsou uvedeny níže v Tabulce 1. Také jsou zahrnuté i výsledky ze standardů rivastigmin, galantamin a takrin.

Tabulka 1 Výsledky změřených hodnot IC<sub>50</sub>

Označení	IC <sub>50</sub> μM AChE	IC <sub>50</sub> μM BChE
SF1	89,33±3,92	110,28±5,68
SF2	199,60±2,21	45,72±2,12
SF3	250,37±18,74	31,54±0,99
SF4	96,49±2,29	30,24±1,99
SF5	171,45±5,87	136,82±3,98
SF6	141,12±7,12	74,24±0,39
SF7	278,66±34,70	11,98±0,58
SF8	> 500	35,89±0,91
SF9	114,60±0,75	62,66±4,44
Rivastigmin	98,43±4,23	15,31±0,18
Galantamin	1,58±0,05	0,95±0,01
Takrin	0,03593±0,00021	0,005±0,0001

### 5.3 Stanovení rozdělovacího koeficientu K<sub>ow</sub> testovaných inhibitorů v systému 1-oktanol:voda

Hodnoty rozdělovacího koeficientu studovaných inhibitorů nám poskytují informaci o jejich lipofilitě, což je míra schopnosti pronikat přes biologické membrány (např. hematoencefalickou membránu).

Hodnoty K<sub>ow</sub> byly stanoveny pro všechny studované inhibitory. Změřené hodnoty absorbance odpovídají 100 % daného inhibitoru v 1-oktanolu. Potom byly změřeny hodnoty absorbance, které odpovídají procentuálnímu obsahu inhibitoru v oktanolové vrstvě (%)<sub>1</sub> v soustavě 1-oktanol:voda. Z toho byly dopočtem určeny hodnoty absorbance daného inhibitoru ve vodné vrstvě do 100 %. To znamená 100-(%)<sub>1</sub>.

Následně byly vypočteny rozdělovací koeficienty jednotlivých inhibitorů v systému 1-oktanol:voda podle vztahu:

$$K_{ow} = \frac{(\%)_1}{100 - (\%)_1} = \frac{C_1}{C_2}$$

Všechny hodnoty  $K_{ow}$  jednotlivých inhibitorů jsou uvedeny níže v Tabulce 2 jako hodnoty log P. Tyto experimentálně získané hodnoty  $K_{ow}$  jsou porovnávány s hodnotami  $K_{ow}$  získané pomocí programu Chemdraw.

Čím má daný inhibitor větší hodnotu rozdělovacího koeficientu, tím lépe proniká přes lipofilní membrány.

Tabulka 2 Hodnoty  $K_{ow}$  testovaných inhibitorů

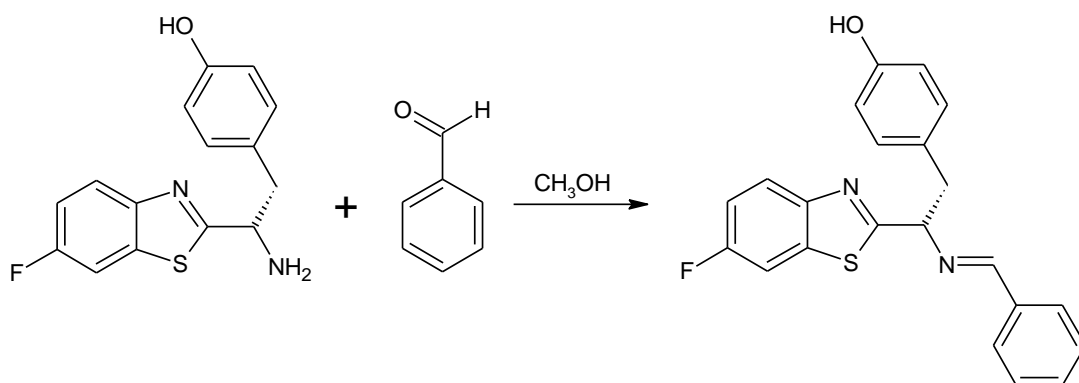
Inhibitor	$K_{ow}$ (logP) experimentální	$K_{ow}$ (logP) (Program Chemdraw)
SF1	6,32±0,42	6,6
SF2	6,99±0,50	7,09
SF3	6,82±0,35	6,76
SF4	6,16±0,47	6,36
SF5	5,99±0,33	6,1
SF6	6,39±0,36	6,26
SF7	6,31±0,33	6,59
SF8	5,79±0,29	5,97
SF9	6,58±0,41	6,47

## 6 DISKUZE

V první fázi této diplomové práce byla provedena syntéza derivátů určených k testování inhibičních aktivit vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.

### 6.1 Syntéza Schiffových bází

Vývoj syntézy Schiffových bází, kde se jako výchozí suroviny používá ((1S)-1-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)-2-(4-hydroxyfenyl)ethanamin hydrochlorid byl popsán v bakalářské práci (Kratochvíl). Podle této práce byla syntetizována řada Schiffových bází s cílem stanovení jejich biologických aktivit. Tyto látky byly syntetizovány reakcí aminu s vybraným aromatickým aldehydem v methanolu.

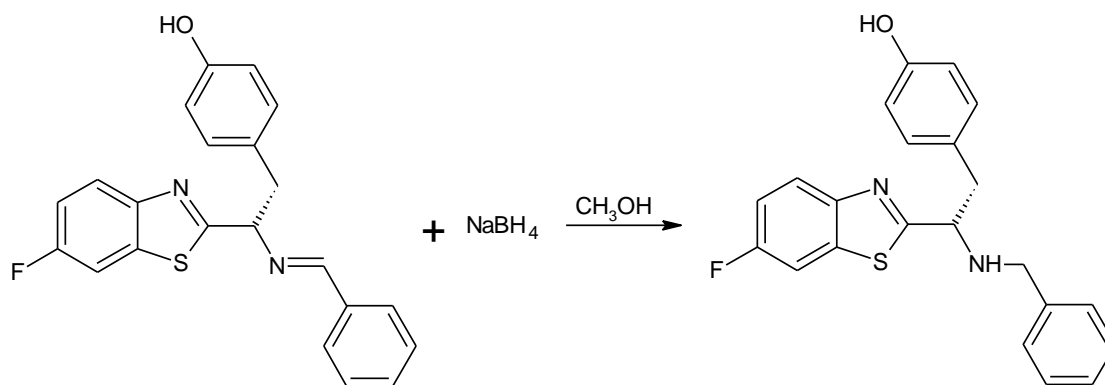


Reakcí aminu s aldehydem vzniká také voda. Proto byl jako rozpouštědlo zvolen methanol, který je s vodou mísitelný. Reakce probíhala 24 hodin. Následně byl z reakční směsi destilací za sníženého tlaku oddestilován veškerý metanol. Požadované produkty byly izolovány krystalizací z hexanu a následnou filtrací. Připravené sloučeniny byly charakterizovány bodem tání, NMR spektrometrií. Optická čistota byla sledována měřením optické otáčivosti.

### 6.2 Syntéza redukovaných Schiffových bází

Redukce připravených Schiffových byla prováděna tetrahydridboritanem sodným v methanolu podle práce (Kratochvíl).





Redukce Schiffových bází byla prováděna tetrahydridoboritanem sodným, který byl použit v 4 molárním nadbytku. Po rozpuštění Schiffovy báze v methanolu bylo toto redukční činidlo opatrně v malých dávkách postupně vnášeno do reakční směsi. Reakce probíhala 24 hodin. Po ukončení reakce byla do reakční směsi přidána voda, čímž proběhla hydrolýza nezreagovaného tetraboritanu sodného a byly rozpuštěny anorganické produkty reakce. Po ochlazení na teplotu 0 – 5°C a následné krystalizaci byl produkt izolován filtrací. Připravené sloučeniny byly charakterizovány bodem tání, NMR spektrometrií. Optická čistota byla opět sledována měřením optické otáčivosti.

### 6.3 Stanovení inhibičních aktivit

Je známo, že jakýkoliv výzkum podléhá vnějším podmínkám, volbě kritérií a parametrů, přístupu výzkumníka apod. Také je známo, že enzym AChE má mnohem vyšší afinitu k ACh než enzym BChE, což odpovídá větší rychlosti AChE hydrolyzovat svůj vlastní substrát ACh.

V první části experimentálního měření této diplomové práce, stanovovala se hodnota aktivity enzymového preparátu.

Hodnoty aktivity enzymového preparátu u AChE se substrátem ATChI byly vždy určeny měřením spektrofotometricky, a to každý den před vlastním měřením IC<sub>50</sub>. Tyto hodnoty byly považovány za aktuální hodnoty aktivity EP. Celková hodnota aktivity EP vyšla 85,26 U.

Pro měření IC<sub>50</sub> se používala přesná množství pro oba enzymy (6 µl pro AChE a 10 µl pro BChE). Po kalibraci přístroje na spektrofotometrické měření bylo zjištěno, že při menších množstvích enzymů než ty výše uvedené, vlastní

enzym nezreagoval vůbec se specifickým substrátem, což se neprojevovalo vznikem žlutého zbarvení v měrné kyvetě.

Dále byly stanoveny hodnoty  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů. Pro vlastní měření hodnoty  $IC_{50}$  se používalo 9 různých vzorků. Tyto syntetizované látky byly změřeny spektrofotometricky Ellmanovou metodou. Pro měření  $IC_{50}$  se používal stejný substrát: Acetylthiocholin (ATCh), a to jak pro AChE, tak pro BChE.

Všechny vzorky inhibitorů byly změřeny spektrofotometricky proti slepému vzorku (blanku). Měření bylo provedeno několikrát u některých vzorků, např. u vzorku č. 4, 5 a 6. A to z důvodu lidského faktoru. Došlo k chybě při manipulaci se vzorky během vlastního měření. Pro lepší vizualizaci enzymatické reakce, používaly se různé koncentrace inhibitorů (10  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 50  $\mu$ l). U vzorku č. 4, 7 a 8 se používaly i větší koncentrace inhibitorů (70  $\mu$ l a 100  $\mu$ l), protože při menších koncentracích vybrané inhibitory málo zreagovaly s enzymy.

Z naměřených hodnot se zjistilo, že se hodnoty  $IC_{50}$  vzorků inhibitorů u AChE pohybují v rozmezí 89-278  $\mu$ M. Z vybraných inhibitorů, nejlepší hodnotu vykazuje vzorek č.1, jehož hodnota  $IC_{50}$  činila  $89,33 \pm 3,92 \mu$ M. Hodnoty  $IC_{50}$  inhibitorů u BChE se pohybují v rozmezí 11-110  $\mu$ M. Bylo zjištěno, že inhibitory při měření vykazují mnohem lepší účinnost při inhibici BChE. Z používaných inhibitorů, vzorek č. 7 vykazoval nejlepší výsledek, jehož hodnota  $IC_{50}$  činila  $11,98 \pm 0,58 \mu$ M.

V porovnání zde studovaných inhibitorů a standardních vzorků klasických inhibitorů (rivastigmin, galantamin a takrin), můžeme pozorovat určité charakteristiky. Hodnoty  $IC_{50}$  u rivastigminu vykazují nejlepší účinnost u BChE s hodnotou  $15,31 \pm 0,18 \mu$ M. Ze studovaných inhibitorů, inhibitor č. 7 vykazuje podobné výsledky při měření s BChE. Inhibitor galantamin je účinnější než rivastigmin, a nejlepší účinnost vykazuje u BChE; inhibitor takrin se považuje za nejúčinnější z daných standardů, a vykazuje nejlepší hodnotu  $IC_{50}$  při inhibici BChE s hodnotou  $IC_{50} 0,005 \pm 0,0001 \mu$ M.

Z měření výše uvedených inhibitorů vyplývá, že inhibitor č. 7 celkem vykazuje nejlepší hodnoty  $IC_{50}$  při inhibici BChE. Stejně jako klasické standardy rivastigmin, galantamin a takrin, může se považovat za vhodný inhibitor.

V roce 2012, v Pakistanu se dokázala syntetizovat další Schiffova báze, 3-thiazolocoumarinyl, která byla testována proti AChE a BChE [88]. Bylo zjištěno, že tato sloučenina byla neúčinnější proti AChE s hodnotou  $1,05 \pm 0,3 \mu\text{M}$  a ukázala vynikající účinek proti BChE s hodnotou  $0,041 \pm 0,002 \mu\text{M}$ . Hlavním cílem této studie bylo vyvinout nové účinné a selektivní látky, které by mohly být dále optimalizovány, aby se zabránilo progresi různých onemocnění, jako AD, a mohly by poskytnout symptomatickou léčbu.

Nakonec byly určeny hodnoty  $K_{ow}$  testovaných inhibitorů jak experimentálně, tak i s pomocí programu Chemdraw. Ze získaných hodnot  $K_{ow}$  se zjistilo, že výsledky získané oběma způsoby se od sebe moc nelišily. Podle získaných výsledků se určilo, že inhibitor č. 2 má nejlepší hodnotu  $K_{ow}$ , která činí  $6,99 \pm 0,50$ .

Pro určení toho, zda-li daná chemická látka splňuje určitou farmakologickou funkci nebo biologickou aktivitu, platí Lipinského pravidlo 5. Podle toho pravidla, které zformuloval lékařský chemik Christopher Lipinski v roce 1997, se hodnotí jak by musela být chemická sloučenina a jaké charakteristiky musí splnit. Toto pravidlo je důležité pro vývoj nových léčiv ze sloučenin s dříve prokázanými farmakologickými vlastnostmi. Určitá látka bude pravděpodobněji schopná projít buněčnou membránou, pokud její molární hmotnost je menší než 500 a její lipofilita (tedy logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi vodou a 1-oktanolem) je menší než 5.

Když porovnáváme výsledky získané z měření  $K_{ow}$  vybraných inhibitorů, můžeme sledovat, že jejich molární hmotnosti se pohybují v rozmezí 367-421 g/mol, a to odpovídá danému pravidlu. Ale podle získaných výsledků bylo zjištěno, že dané inhibitory přesahují hodnotu 5 (ze všech vzorků, inhibitor č. 2 vykazuje nejlepší hodnotu  $K_{ow}$   $6,99 \pm 0,50$ , a inhibitor č. 5 vykazuje nejmenší hodnotu  $K_{ow}$   $5,99 \pm 0,33$ ). Toto neodpovídá pravidlu, ale inhibitor č. 2, oproti ostatním testovaným inhibitorům, bude více schopný procházet přes biologickou membránu.

Musíme vzít ale také v úvahu, že Lipinského pravidlo však nepředpokládá, zda bude určitá sloučenina farmakologicky aktivní nebo ne.

## 7 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium enzymů cholinesteráz a jejich možných inhibitorů. V rámci experimentální části byly připraveny Schiffovy báze a jejich redukované formy. U těchto derivátů bylo dále provedeno stanovení inhibičních aktivit vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.

Hledání nových inhibitorů ChE je stále slibným přístupem k léčbě různých onemocnění, jako je AD. Schiffovy báze jsou považovány za důležitou třídu organických sloučenin, které mají široké spektrum použití včetně inhibitorů enzymů. V současné době byla vyvinuta další syntéza Schiffových bází jako potenciální inhibitory ChE, které se taky změřily modifikovanou Ellmanovou metodou.

Pro stanovení inhibiční aktivity těchto inhibitorů se používala Ellmanova metoda, která se stále uplatňuje jako nejpoužívanější metoda díky svým výhodám, jako jsou např. přesnost, jednoduchost, časově nenáročnost a citlivost metody. Tato metoda je velice vhodná pro stanovení a sledování inhibiční účinnosti inhibitorů.

Aktivita enzymů byla inhibována skoro všemi používanými koncentracemi inhibitorů, sledovalo se rychle žluté zbarvení roztoku hned po kontaktu enzymu se substrátem přítomným v roztoku. Aktivita enzymu byla vždy změřena před vlastním měřením  $IC_{50}$  a použitá množství enzymů byla přesně definována, stejně jako parametry přístroje a vlastní postup měření.

Podle získaných hodnot  $IC_{50}$  testovaných inhibitorů se zjistilo, že nejúčinnějším inhibitorem při inhibici AChE je inhibitor č. 1: *4-[(2S)-2-benzylidenamino]-2-(6-fluor-1,3-benzthiazol-2-yl)ethyl]fenol*. Jeho hodnota  $IC_{50}$  činila  $89,33 \pm 3,92 \mu\text{M}$ . Tento inhibitor vykazoval podobné výsledky jako standardní inhibitor rivastigmin. Stejným způsobem se zjistilo, že nejlepším inhibitorem při inhibici BChE je inhibitor č. 7: *4-[(2S)-2-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-[(2-methylbenzyl)amino]ethyl]fenol*. Jeho hodnota  $IC_{50}$  činila  $11,98 \pm 0,58 \mu\text{M}$ .

Při měření hodnoty  $IC_{50}$  se také zjistilo, že došlo k neúspěchu, který byl zaznamenáván u inhibitoru č. 8, jehož hodnota  $IC_{50}$  převyšovala hodnotu 500

$\mu\text{M}$ . Musí se také zdůraznit, že tyto Schiffovy báze jsou velice nestabilní látky. Po měření bylo konstatováno, že dané studované inhibitory vykazovaly lepší výsledky u měření  $\text{IC}_{50}$  pro BChE, kde se některé výsledky inhibitorů od sebe moc nelišily.

V rámci stanovení rozdělovacího koeficientu se určovalo, že nejlepší výsledek vykazuje inhibitor č. 2: *4-((2S)-2-(6-fluoro-1,3-benzothiazol-2-yl)-2-[(E)-(2-methylbenzylidene)amino]ethyl}fenol*. Hodnota  $K_{ow}$  činila  $6,99 \pm 0,50$ . Ze všech testovaných inhibitorů, inhibitor č. 2 nejlépe prostupuje přes biologické membrány.

Na závěr lze tedy konstatovat, že studované inhibitory vykazují středně dobrou anticholinesterázovou aktivitu, a že se tyto inhibitory mohou uplatňovat jako vhodné inhibitory obou enzymů AChE a BChE.

## 8 POUŽITÁ LITERATURA

[1] STEDMAN, E.; EASSON, L. (1932) An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem J.* **26:** 2056-2066  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1261137/>

[2] KUTTY, M. (1980) Biological function of cholinesterase. *Review, Clin Biochem.* **13:** 239-243  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912080800014>

[3] HASSELMO, M. (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol.* **16:** 710-715  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2659740/>

[4] VODRÁŽKA, Z.; RAUCH, P.; KÁŠ, J. (1991) Enzymologie. *Praha Vysoká Škola Chemicko-Technologická.* **2**

[5] COOPER, G. (2000) The cell: A molecular approach. *Sunauer Associates.* **2** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9921/>

[6] MARTINEZ, S.; RAHMAN, S.; FURNHAM, N.; THORNTON, J. (2015) The classification and evolution of enzyme function. *Biophys J.* **109 (6):** 1082-1086 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4576142/>

[7] KHAN ACADEMY (2016) Activation energy. *Activation energy, transition state and reaction rate.* Available online: <https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-energy-and-transport/hs-enzymes/a/activation-energy> [25.02.19]

[8] ENCYCLOPEDIA BRITANNICA (2019) Biochemistry. *Protein.* Available online: <https://www.britannica.com/science/protein/The-mechanism-of-enzymatic-action> [25.02.19]

[9] TECLES, F.; SUBIELA, S.; BERNAL, L.; CERON, J. (2000) Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *Vet J.* **160:** 242-249  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023300904994> Abstract [28.02.19]

[10] LOTTI, M. (1995) Cholinesterase inhibition. *Complexities in interpretation. Clin Chem.* **41:** 1814-1818  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7497638>

[11] GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M.; SOARES, A. (1998) Should the use of inhibition of cholinesterases as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? *Biomarkers.* **3:** 157-163

[12] CHACHO, L.; CERF, J. (1960) Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section. *J Anat.* **94:** 74-81

[13] SILMAN, I.; SUSSMAN, J. (2008) Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions.* **175:** 3-10  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279708003153>

[14] SUSSMAN, J.; HAREL, M.; FROLOW, F.; OEFNER, C.; GOLDMAN, A.; TOKER, L.; SILMAN, I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* **23:** 872-879  
<http://science.sciencemag.org/content/253/5022/872>

[15] DVIR, H.; SILMAN, I.; HAREL, M.; ROSENBERRY, T. (2010) Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. **187:** 10-22  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279710000669?via%3Dihub>

[16] MASSOULIC, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol.* **41:** 31-91

[17] SANCHEZ, G.; SALCEDA, R. (2008) Enzimas polifuncionales: El caso de la acetilcolinesterasa. *Reb.* **27:** 44-51  
[http://www.academia.edu/31309058/ENZIMAS\\_POLIFUNCIONALES\\_EL\\_CASO\\_DE\\_LA\\_ACETILCOLINESTERASA](http://www.academia.edu/31309058/ENZIMAS_POLIFUNCIONALES_EL_CASO_DE_LA_ACETILCOLINESTERASA)



[18] NEUROHACKER (2018) What is acetylcholine? An exploration of the cholinergic system – Functions, neurochemistry and support. <https://neurohacker.com/what-is-acetylcholine>

[19] SIEGEL, G.; AGRANOFF, B.; ALBERS, R. (1999) Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. *Lippincott-Raven*. **6**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28051/>

[20] AMENTA, F.; TAYEBATI, S. (2008) Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction. **15** <http://www.eurekaselect.com/66371/article>

[21] SANZ, P.; RODRIGUEZ, M.; DIAZ, D.; REPETTO, J.; REPETTO, M. (1991) Red blood cell and total blood acetylcholinesterase and plasma pseudochoolinesterase in humans. *Clin. Toxicol.* **29**: 81-90

[22] PING, V.; GAO, Y.; GENG, L.; PARKS, R.; BRIMIJOIN, S. (2015) Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. *Proc Natl Acad Sci USA*. **112**: 2251-2256  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4343161/>

[23] SANSON, B.; NACHON, F.; COLLETIER, J.; TOKER, L.; GREENBLATT, H.; SUSSMAN, J.; SILMAN, I.; WEIK, M. (2009) Crystallographic snapshots of nonaged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugated with pralidoxime. *J Med Chem.* **23**: 7593-7603  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19642642>

[24] POHANKA, M. (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biochemical Papers*. **155**: 219-230

[25] HANDEN, B.; JOHNSON, C.; MCAULIFFE-BELLIN, S.; MURRAY, P.; HARDAN, A. (2011) Safety and efficacy of donepezil in children and adolescents with autism. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. **21**: 43-50

[26] BIRKS, J.; HARVEY, R. (2006) Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. **1**.

[27] CAMPS, P.; FORMOSA, X.; GALDEANO, C.; GOMEZ, T.; RAMIREZ, L.; ISAMBERT, N.; BARTOLINI, M. (2010) Tacrine-based dual binding site acetylcholinesterase inhibitors as potential disease-modifying anti-Alzheimer drug candidates. *Chemico-Biological Interactions*. **187**: 411-415

[28] CARCENAC, D.; MARTIN-HUNYADI, C.; KIESMANN, M. (2000) Extra-pyramidal syndrome induced by donepezil. *Presse Med*. **18**: 992-993

[29] CACABELOS, R. (2007) Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatr Dis Treat*. **3**: 303-333  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654795/>

[30] MEHTA, S.; CHANDERSEKHAR, K.; PRASADRAO, G.; DUTT, L. (2012) Safety and efficacy of donepezil hydrochloride in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: Findings of an observational study. *Indian J Psychiatry*. **54**: 337-343

[31] BOLOGNESI, M.; BARTOLINI, M.; CAVALLI, A.; ANDRISANO, V.; ROSINI, M. (2004) Design, synthesis and biological evaluation of conformationally restricted rivastigmine analogues. *Journal of Medical Chemistry*. **47**: 5945-5952

[32] DESAI, A.; GROSSBERG, G. (2005) Rivastigmine for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurotherap*. **5**: 563-580

[33] GROSSBERG, T.; STAHELIN, H.; MESSINA, J. (2000) Lack of adverse pharmacodynamic drug interactions with rivastigmine and twenty-two classes of medications. *Int J Geriatr Psychiatry*. **15**: 242-247

[34] CHITNIS, S.; RAO, J. (2009) Rivastigmine in Parkinson's disease dementia. *Expert Opinion Drug Metab. Toxicol*. **5**: 941-955

[35] SCOTT, L.; GOA, K. (2000) Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs*. **60**: 1095-1122  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129124>

[36] KHONAKDARI, M.; MIRJAJILI, M.; GHOLIPOUR, A.; REZADOOST, H. (2017) Quantification of galantamine in *Narcissus tazetta* and *Galanthus*

nivalis populations growing wild in Iran. **16:** 188-192  
<https://www.cambridge.org/core/journals/plant-genetic-resources/article/quantification-of-galantamine-in-narcissus-tazetta-and-galanthus-nivalis-amaryllidaceae-populations-growing-wild-in-iran/3B109A2A0FA7C49E08588240A38F86C6>

[37] LILIENFELD, S. (2002) Galantamine – A novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Drug Reviews*. **8:** 159-176

[38] LANE, R. (1996) Pharmacokinetic drug interaction potential of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int Clin Psychopharmacol*. **5:** 31-61

[39] WAGSTAFF, A.; MCTAVISH, D. (1994) Tacrine: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* **6:** 510-540

[40] MEHTA, M.; ADEM, A.; SABBAGH, M. (2011) New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's disease*. **1:** 1-8

[41] ZHONG, M.; YA, K. (2014) Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease? *Lab. of Neuropharmacology*. **6:** 1-6

[42] ZHANG, H. (2012) New insights into huperzine A for the treatment of Alzheimer's disease. *Acta Pharmacol Sin*. **33:** 1170-1175  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4003111/>

[43] DARVESH, S.; MCDONALD, R.; MATAIJA, D.; WALSH, R.; MOTHANA, S.; LOCKRIDGE, O.; MARTIN, E. (2008) Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J Med Chem*. **51:** 4200-4212  
<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm8002075?src=recsys&journalCode=jmcmr>

[44] TRIGGLE, D.; MITCHELL, J.; FILLER, R. (1998) The pharmacology of physostigmine. *CNS Drug Reviews*. **4:** 87-136  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1527-3458.1998.tb00059.x>

[45] AQUILONIUS, S.; ECKERNAS, S.; HARTVIG, P.; OSTERMAN, P.; STALBERG, E. (1983) Clinical pharmacology of pyridostigmine and neostigmine in patients with myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. **46**: 929-935 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1027607/>

[46] FUKUTO, T. (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*. **87**: 245-254

[47] STRUGER, J.; GRABUSKI, J.; CAGAMPAN, S.; SVERKO, E.; MARVIN, C. (2016) Occurrence and distribution of carbamate pesticides and metalaxyl in southern Ontario surface waters 2007-2010. *Bull Environ Contam Toxicol*. **96**: 423-431 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4799256/>

[48] MARRS, T.; MAYNARD, R. (2013) Neurotransmission system as targets for toxicants. *Cell Biol. Toxicol*. **29**: 381-396

[49] PAPPANO, A. (2015) Cholinergic receptor-activating and cholinesterase-inhibiting drugs. *Basic and Clinical Pharmacology*. **13**.

[50] NAMBA, T. (1971) Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. **44**: 289-307

[51] EXTTOXNET (2018) Cholinesterase inhibition. [online: 08.04.19] <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/TIB/cholinesterase.html>

[52] SMITH, S.; WILLIAM, G. (1983) Cholinesterase. Chemical pesticide program. *New York State College of Agriculture and Life Science, Cornell University*.

[53] SIDDEL, F.; TAKAFUJI, E.; FRANZ, D. (1997) Medical aspects of chemical and biological warfare. *Textbook of Military Medicine*. **1**: 129-179

[54] CHAI, P.; BOYER, E.; AL-NAHHAS, H.; ERICKSON, T. (2017) Toxic chemical weapons of assassination and warfare: nerve agents VX and sarin. *Toxicol Commun*. **1**: 21-23

[55] ThroughCo. (2018) How sarin nerve gas works and what to do if exposed?. Article: <https://www.thoughtco.com/how-sarin-gas-works-609278>

[56] JOKANOVIC, M. (2009) Handbook of toxicology of chemical warfare nerve agents. *Academic Press*. **52**: 799-810

[57] CHEMICAL HAZARD EMERGENCY MEDICAL MANAGEMENT (2019) Organophosphorus pesticides and nerve agents – Tabun, sarin, soman, VX and fourth generation agents. *U.S. Department of Health and Human Services*. [online 08.04.19] <https://chemm.nlm.nih.gov/nerveagents.htm>

[58] ELSPETH, J.; JAMES, O.; SIMPSON, J.; SCIUTO, A.; EDDLESTON, M. (2014) Respiratory complications of organophosphorus nerve agent and insecticide poisoning. Implications for respiratory and critical care. **190**.

[59] EDSON, X.; EDNA, F.; ARACAVAL, Y.; FAWCETT, W.; OLIVEIRA, M.; RANDALL, W.; HAMILTON, T. (2006) Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **35**: 13220-13225 <https://www.pnas.org/content/103/35/13220>

[60] BAJGAR, J. (1992) Biological monitoring of exposure to nerve agents. *J Ind Med*. **49**: 648-653 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1039310/pdf/brijindmed00021-0050.pdf>

[61] BARAKAT, N.; ZHENG, X.; GILLEY, C.; MACDONALD, M.; OKOLOTOWICZ, K.; CASHMAN, J. (2009) Chemical synthesis of two series of nerve agent model compounds and their stereoselective interaction with human acetylcholinesterase and human butyrylcholinesterase. *Chem Res Toxicol*. **22**: 1669-1679

[62] POHANKA, M. (2011) Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc*. **155**: 219-230

[63] BERGMEYER, H. (1974) Book: Methods of enzymatic analysis. **2**. ISBN: 978-0-12-091302-2

[64] HARRIS, T.; KESHWANI, M. (2009) Methods of enzymology: Measurement of enzyme activity. *University of Miami*. **463**: 57-71

- [65] SILVER, A. (1974) The biology of cholinesterase. **1**: 59-67
- [66] HOLMSTEDT, B. (1971) Distribution and determination of cholinesterases in mammals. *World Health Organization*. **44**: 99-107  
<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC2428020&blobtype=pdf>
- [67] MICHEL, H. (1949) An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J Lab Clin Med*. **34**: 1564-1568
- [68] GOLDRING, J. (2015) Spectrophotometric methods to determine protein concentration. *Methods Mol Biol*. **1**: 41-47
- [69] AGARWAL, D.; SCHWENKENBECHER, S.; SRIVASTAVA, L.; GOEDDE, H. (1975) A spectrophotometric method for the determination of serum cholinesterase variants with succinyl choline as substrate. *Klin Biochem*. **13**: 133-135
- [70] SINKO, G.; CALIC, M.; BOSAK, A.; KOVARIK, Z. (2007) Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry*. **370**: 223-227
- [71] ELLMAN, G.; COURTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol*. **7**: 88-95
- [72] SHETAB-BOUSHEHRI, S. (2018) Ellman's method is still an appropriate method for measurement of cholinesterase activities. **17**: 798-799
- [73] RHEE, I.; APPELS, N.; LUIJENDIJK, H.; VERPOORTE, R. (2003) Determining acetylcholinesterase inhibitory activity in plants extracts using a fluorimetric flow assay. *Phytochemical Analysis*. **14**: 145-149
- [74] BIRMAN, S. (1985) Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochem Journal*. **225**: 825-828

[75] INGGANINAN, K.; BEST, D.; HEIJDEN, V.; HOFTE, A.; KARABATAK, B.; TJADEN, U.; VERPOORTE, R. (2000) High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *J Chromat.* **872**: 61-73

[76] WINTERINGHAM, F.; DISNEY, R. (1964) A radiometric method for estimating blood cholinesterase in the field. *World Health Organization.* **30**: 119-125 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2554900/pdf/bullwho00286-0125.pdf>

[77] MARCHART, H. (1968) Radiometric determination of nanogram quantities of cholinesterase inhibitors. *Microchimica Acta.* **56**: 669-673 <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01224082>

[78] JENSEN-HOLM, J.; LAUSEN, H.; MILTHERS, K.; MOLLER, K. (1959) Determination of the cholinesterase activity in blood and organs with automatic titration. With some observations on serious errors of the method and remarks of the photometric determination. *University of Copenhagen.* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0773.1959.tb00307.x#accessDenialLayout>

[79] POHANKA, M.; HRABINOVA, M.; KUCA, K.; SIMONATO, J. (2011) Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method. *Intern J. Mol Science.* **12**: 2631-2640 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3127138/pdf/ijms-12-02631.pdf>

[80] POHANKA, M.; MUSILEK, K.; KUCA, K. (2009) Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition. *Curr Med Chem.* **16**: 1790-1798

[81] PUNDIR, C.; CHAUHAN, N. (2012) Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. *Analytic Biochemistry.* **429**: 19-31

[82] STEPANKOVA, S.; VORCAKOVA, K. (2016) Cholinesterase-based biosensors. *Journal of enzyme inhibition and medical chemistry*. **1**: 180-193 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2016.1204609>

[83] BHAGAT, S.; SHARMA, N.; CHUNDAWAT, T. (2012) Synthesis of some salicylaldehyde-based schiff bases in aqueous media. *Journal of Chemistry*. **2013**: 1-4 <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2013/909217/>

[84] RAZIK, B.; OSMAN, H.; EZZAT, M.; BASIRI, A.; SALHIN, A.; MURUGAIYAH, V. (2016) Efficient synthesis and discovery of schiff bases as potent cholinesterase inhibitors. *Med Chem*. **12**: 527-536

[85] CALETA, I.; KARMINSKI-ZAMOLA, G. (2008) Synthesis and biological activity of substituted benzothiazole derivatives. *Journal of Chemists and Chemical Engineers*. **57**: 307-319

[86] KERI, R.; QUINTANOVA, C.; MARQUES, S. (2013) Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine-benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Med Chem*. **21**: 4559-4569

[87] OZKAY, U. (2016) Synthesis and anticholinesterase effects of new 2-substituted benzothiazole derivatives. *Pharmaceutical Chemistry*. **6**: 1-8

[88] RAZA, R.; SAEED, A.; ARIF, M.; MAHMOOD, S.; MUDDASSAR, M.; IGBAL, J. (2012) Synthesis and biological evaluation of 3-thiazolocoumarinyl Schiff-base derivatives as cholinesterase inhibitors. *Chem Biol Drug Des*. **4**: 605-615