

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Inhibice cholinesteráz vybranými sulfonamidy

Bc. Barbora Dratvová

Diplomová práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

The inhibition of cholinesterases by selected sulfonamides

Bc. Barbora Dratvová

Thesis

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Dratvová**
Osobní číslo: **C16443**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Inhibice cholinesteráz vybranými sulfonamidy**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

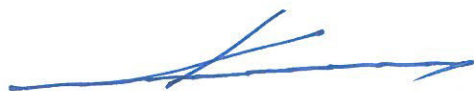
1. Vypracovat literární rešerši týkající se cholinesteráz, jejich funkce, struktury a mechanismu působení.
2. Shrnout poznatky o Alzheimerově chorobě, možnostech její léčby a souvislosti se změněnými hladinami cholinesteráz.
3. Popsat analytické metody vhodné stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz.

Experimentální část:

1. Spektrofotometrickou Ellmanovou metodou stanovit inhibiční účinnost vybraných sulfonamidů vůči acetylcholinesteráze a butyrylcholinesteráze.
2. Stanovit kinetické parametry, inhibiční konstanty a typ inhibice.
3. Stanovit rozdělovací koeficient vybraných látek v systému n-oktanol:voda.

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

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Katarína Vorčáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



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

V Pardubicích dne 28. února 2019

PROHLÁŠENÍ AUTORA

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Barbora Dratvová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za ochotu, trpělivost, odborné vedení a čas, který mi věnovala v průběhu vypracování a realizace diplomové práce. Mé díky patří též Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. za její čas a pomoc. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia.

ANOTACE

Tématem této diplomové práce je inhibice cholinesteráz vybranými sulfonamidy. Teoretická část práce je věnována popisu obecného charakteru cholinesteráz, popisu jejich struktury a funkce a také popisu a dělení jejich inhibitorů. Část práce je věnována Alzheimerově chorobě, procesům, které vedou k jejímu vzniku, příznakům, diagnostice a terapii. Nakonec jsou v teoretické části popsány metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz. V experimentální části je popsáno praktické řešení stanovení aktivity enzymů, stanovení hodnot IC_{50} zkoumaných inhibitorů, stanovení kinetických parametrů inhibované reakce, inhibičních konstant a typu inhibice a v neposlední řadě také stanovení rozdělovacího koeficientu v soustavě *n*-oktanol:voda a určení polárního povrchu molekuly.

KLÍČOVÁ SLOVA

acetylcholinesteráza, butyrylcholinesteráza, sulfonamidy, Alzheimerova choroba, Ellmanova metoda

Title: Determination of inhibitory activity of selected sulfonamides

ANNOTATION

This thesis is focused on the determination of inhibitory activity of selected novel sulfonamides. The theoretical part of this thesis contains description of cholinesterase characteristics, its structure and function. It also describes its inhibitors and divides them into different groups according to their characteristic mechanism of inhibition. A part of the thesis is dedicated to description of the Alzheimer's disease, the process leading to the condition, symptoms, diagnostics and available therapy. Lastly, the methods of enzyme activity and inhibition determination are described. The experimental part consists of practical approach to the enzyme activity determination, determination of IC_{50} of examined inhibitors, determination of kinetic parameters of inhibited reactions, dissociation constants and type of inhibition of given inhibitors. Finally, the partition coefficient between *n*-octanol and water and topological polar surface area are established.

KEYWORDS

acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, sulfonamides, Alzheimer's disease, Ellman's method

SEZNAM ZKRATEK

A β	amyloid beta
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACH	acetylcholin
ACHE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATCH	acetylthiocholin
BCH	butyrylcholin
BCHE	butyrylcholinesteráza
BTCH	butyrylthiocholin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
CDT	test hodin (clock drawing test)
CNS	centrální nervová soustava
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	kyselina 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová
ChAT	cholinacetyltransferáza
CHE	cholinesteráza
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% inhibici enzymu
K _i	inhibiční konstanta
K _m	Michaelisova konstanta
logP	logaritmus rozdělovacího koeficientu
mACHR	muskarinový acetylcholinový receptor
MMSE	mini-mental state examination
M _r	molekulová hmotnost
nACHR	nikotinový acetylcholinový receptor
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
OP	organofosfát (organophosphate)
PAS	periferní aniontové místo (peripheral anionic site)
PSA	polární povrch molekuly (polar surface area)

PBS	fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
tPSA	topologický polární povrch molekuly (topological polar surface area)
V_{\max}	mezní rychlost

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázky:

Obrázek 1 Schéma cholinergního přenosu vzruchu.....	17
Obrázek 2 3D struktura ACHE parejnoka kalifornského	20
Obrázek 3 Schéma prohlubně aktivního místa ACHE.....	21
Obrázek 4 Struktura lidské BCHE	22
Obrázek 5 Schéma prohlubně aktivního místa BCHE.....	23
Obrázek 6 Obecná struktura molekuly karbamátu	27
Obrázek 7 Strukturní vzorce inhibitorů klinicky významných pro léčbu AD	28
Obrázek 8 Obecný strukturní vzorec OP.....	29
Obrázek 9 Obecný strukturní vzorec sulfonamidu.....	30
Obrázek 10 Schéma mechanismu Ellmanovy metody	38

Tabulky:

Tabulka 1 Přehled vybraných inhibitorů	43
Tabulka 2 Výsledných hodnot IC_{50} pro vybrané inhibitory a standardní sloučeniny ..	54
Tabulka 3 Kinetické parametry neinhibovaných reakcí	57
Tabulka 4 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro ACHE s inhibitorem č. 7	58
Tabulka 5 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro BCHE z koňského séra s inhibitorem č. 7	59
Tabulka 6 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro BCHE z lidské plazmy s inhibitorem č. 7.....	60
Tabulka 7 Hodnoty rozdělovacího koeficientu vybraných sulfonamidů a standardů..	61
Tabulka 8 Hodnoty tPSA pro vybrané sulfonamidy a standardy	62

Grafy:

<i>Graf 1 Závislost změny absorbance A na čase t pro stanovení aktivity enzymu</i>	<i>52</i>
<i>Graf 2 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované rychlosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru č. 2 [I].....</i>	<i>53</i>
<i>Graf 3 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce ACHE.....</i>	<i>55</i>
<i>Graf 4 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce BCHE z koňského séra.....</i>	<i>56</i>
<i>Graf 5 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce BCHE z lidské plazmy.....</i>	<i>56</i>
<i>Graf 6 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ inhibované reakce BCHE z koňského séra pro jednotlivé koncentrace inhibitoru č. 7</i>	<i>59</i>
<i>Graf 7 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ inhibované reakce BCHE z lidské plazmy pro jednotlivé koncentrace inhibitoru č. 7</i>	<i>60</i>

OBSAH

1	ÚVOD	15
2	TEORETICKÁ ČÁST	16
	Cholinergní systém	16
	Cholinesterázy	18
	2.2.1 Acetylcholinesteráza	19
	2.2.2 Butyrylcholinesteráza	21
2.1	Inhibitory cholinesteráz	23
2.2	2.3.1 Reverzibilní inhibitory	25
	2.3.2 Pseudo-ireverzibilní inhibitory	26
2.3	2.3.3 Ireverzibilní inhibitory	29
	2.3.4 Sulfonamidy	30
	Alzheimerova choroba	31
2.4	2.4.1 Patologické změny	32
	2.4.2 Rizikové faktory	34
	2.4.3 Diagnostika	35
	2.4.4 Léčba	36
2.5	Metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz	37
	2.5.1 Spektrometrické metody	38
	2.5.2 Elektrochemické metody	39
3	CÍL PRÁCE	41
4.1	4	42
4.2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.3	Přístrojové vybavení a pomůcky	42
4.4	Použité látky, roztoky a chemikálie	42
4.5	Odběr krve pro stanovení s použitím lidské plazmy	43
4.6	Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz	44
4.7	Stanovení IC_{50} testovaných sulfonamidů a standardů	45
4.8	Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice	47
5.1	Stanovení rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě	
5.2	<i>n</i> -oktanol:voda	49
	Stanovení polárního povrchu molekuly	51
5	VÝSLEDKY	52
	Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz	52
	Stanovení IC_{50} testovaných sulfonamidů	53

	Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice	54
	Stanovení rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě <i>n</i> -oktanol:voda	61
	Stanovení polárního povrchu molekuly	62
6	DISKUZE	63
5.3	7 ZÁVĚR	66
5.4	8 ZDROJE	67
5.5		

1 ÚVOD

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější formou demence a u stárnoucí populace představuje komplexní medicínský, ale také ekonomicko-sociální problém. I přes desetiletí výzkumu se stále nepodařilo odhalit základní etiologii onemocnění a nejsou tudíž dostupná léčiva, která by byla schopna průběh onemocnění zvrátit či mu předcházet. Současná medicína může nabídnout pouze symptomatologickou léčbu. Skupinou léčiv, která se hojně využívají, jsou inhibitory cholinesteráz. Jedná se o látky, které mají příznivý vliv na kognitivní i behaviorální projevy choroby a jejich použití má základ v tzv. „cholinergní hypotéze“, kdy se předpokládá, že k rozvoji a progresi AD dochází kvůli poškození cholinergního neurotransmisního systému. Inhibitory cholinesteráz jsou pak širokou skupinou přírodních i syntetických látek o různých funkčních skupinách, které svou inhibiční aktivitou přispívají ke zlepšení transmise mezi neurony. Tato léčba má ale svá úskalí. Jsou jimi například časté nežádoucí účinky, neefektivita v určitých stádiích onemocnění a také fakt, že jejich hlavním úkolem je inhibice cholinesteráz a necílí na ostatní patologické děje, které AD doprovází. Proto je zde tlak na vývoj nových léčiv, která by se kromě inhibice cholinesteráz podílela také na inhibici tvorby patologických proteinů a jejich shluků, zamezovala zánětu, vychytávala volné radikály, ad. Jednou z testovaných skupin léčiv, jsou sulfonamidy.

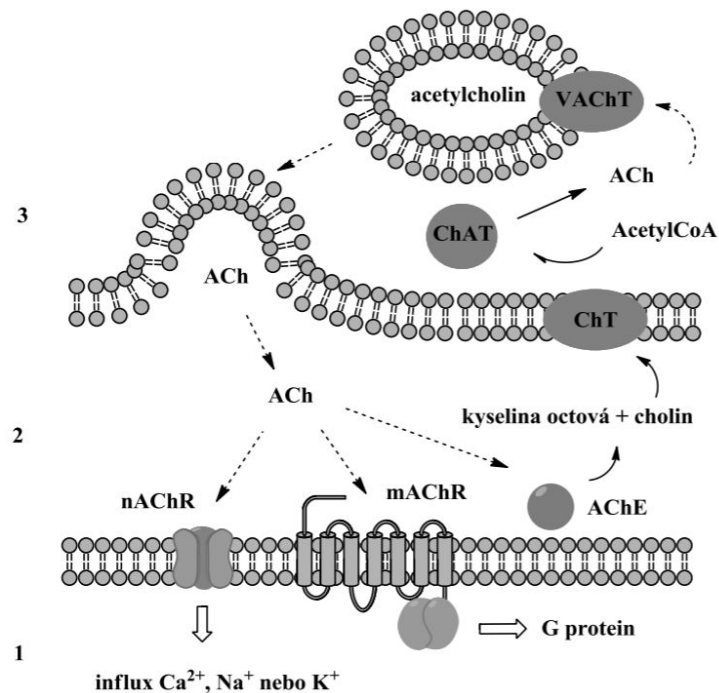
Sulfonamidy jsou rozmanitou skupinou látek, která je charakteristická obsahem sulfonamidové funkční skupiny. Tyto látky mají široké pole působnosti a v medicíně se uplatňují například jako antibiotika, antivirotika, diuretika, chemoterapeutika, aj. Tato diplomová práce je věnována nově syntetizovaným sulfonamidům. Její teoretická část shrnuje obecné poznatky ohledně cholinesteráz a jejich inhibitorů, obsahuje informace o Alzheimerově chorobě, ale věnuje se také metodám stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz. V praktické části jsou pak realizována jednotlivá stanovení pro určení základních vlastností nově syntetizovaných sulfonamidů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Cholinergní systém

2.1 K šíření vzruchu neuronem dochází pomocí depolarizace jeho membrány. V místě spojení dvou neuronů se však nachází synaptická štěrbina, kde se impulz nemůže přenést pomocí depolarizace a je potřeba ji překonat jinak. Slouží k tomu chemické mediátory, které jsou umístěny ve vezikulech v presynaptické membráně na konci axonu. Existuje množství těchto mediátorů a mezi nejčastější patří acetylcholin (ACH), noradrenalin, γ -aminomáselná kyselina, dopamin, glycin, glutamát, serotonin a další (Seidl, 2008). Cholinergní systém je jeden z mnoha mediátorových systémů centrální nervové soustavy člověka a jeho podstatou je přenos vzruchu pomocí acetylcholinu. Cholinergní synapse se nacházejí v celém lidském těle, ale jejich zvýšená koncentrace v thalamu, striatu, limbickém systému a mozkové kůře nasvědčuje tomu, že cholinerní transmise je důležitá pro paměť, učení, pozornost a další důležité kognitivní funkce mozku. Také se předpokládá, že má cholinergní systém vliv na udržování celkové homeostázy a neuroplasticity mozku (Hampel et al., 2018; Prado et al., 2017).

Acetylcholin vzniká přímo v cholinergních neuronech přenosem acetylu z acetyl-CoA na cholin za katalýzy cholinacetyltransferázou (ChAT). Cholin je syntetizován v játrech a vzniká trojnásobnou methylací ethanolaminu, což je dekarboxylovaný serin (Matouš, 2010). Pomocí specializovaného vezikulárního acetylcholinového transportéru jsou molekuly transportovány a uloženy do vezikulu, kde může být skladováno až 10 000 molekul ACH. K vylití vezikulu dochází po aktivaci presynaptické membrány, kdy iontovými kanály vstupující Ca^{2+} aktivuje proteinkinázy a dochází k fosforylaci synapsinu (bílkovina pojící vezikuly k cytoskeletu neuronu). Po fosforylaci vezikuly splynou s presynaptickou membránou a dochází k uvolnění neurotransmiteru a jeho difúzi (Matouš, 2010). Cílovou buňku může ACH ovlivnit pomocí dvou receptorů – muskarinových acetylcholinových receptorů (mAChR) a nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChR). Schéma cholinergního přenosu vzruchu je znázorněno na obrázku 1.



Obrázek 1 Schéma cholinergního přenosu vzruchu (Pohanka, 2013a)

Muskarinový receptor je tvořen glykoproteinovým řetězcem, který sedmkrát prochází membránou, na jednom konci je spřažen s G-proteinem a na N-konec se váže signální molekula. Prozatím bylo popsáno pět typů mAChR – M1–M5. Receptory M1 mají vyšší koncentraci v CNS, M2 jsou více v kardiomyocytech, hladkém svalstvu i neuronech, M3 se nachází v exokrinních žlázách a hladké svalovině a receptory M4 a M5 nebyly ještě dostatečně prozkoumány. Receptory spojené s G_q proteinem (M1, M3, M5) aktivují fosfolipázu C a vedou k tvorbě inositoltrisfosfátu a diacylglycerolu (tzv. „druzí poslové“) a mají stimulační efekt, zatímco receptory spojené s $G_{i/o}$ proteinem (M2, M4) působí inhibičně na adenylátcyklázu, což vede ke snížení produkce cAMP (cyklický adenosinmonofosfát; „druhý posel“) (Taylor a Brown, 1999). Jelikož se jedná o metabotropní typ receptoru (tj. nejprve musí dojít k několika chemickým dějům, než se kanál otevře), je spojen s delší dobou latence (100 ms), ale také delší dobou účinku (300–400 ms) (Picciotto et al., 2012; Matouš, 2010).

Nikotinové receptory jsou v podstatě ionotropní kationtové kanály. Jde o glykoproteiny tvořené pěti podjednotkami. Homo- nebo heteromer může být složený z α ($\alpha 2$ – $\alpha 7$), β ($\beta 2$ – $\beta 4$), γ , δ a ϵ podjednotek, přičemž jejich kombinace předurčuje selektivitu pro biogenní ionty (Na^+ , K^+ , případně Ca^{2+}) (Baenziger et al., 2015). Rozeznáváme dva typy nikotinových receptorů – muskulární, přítomné

na nervosvalových ploténkách, a neuronální, nacházející se na postsynaptické membráně a ve vegetativních gangliích (Picciotto et al., 2012).

Po navázání na receptory a předání impulzu cílové buňce je potřeba ACH ze synaptické štěrbině rychle odstranit. To zajišťuje přítomná acetylcholinesteráza, která hydrolyzuje ACH na cholin a acetát, a tím ukončuje transmisi.

Cholinesterázy

2.2 Cholinesterázy (CHEs) jsou skupinou serinových hydroláz, které katalyzují hydrolyzu esterů obsahující cholin na cholin a příslušnou karboxylovou kyselinu. U obratlovců jsou popsány dva typy CHEs, a to acetylcholinesteráza (ACHE; EC 3.1.1.7), která se nachází v synapsích cholinergního nervového systému, nervosvalových ploténkách a částečně také na vnější membráně erytrocytů, a butyrylcholinesteráza (BCHE; EC 3.1.1.8), která je zastoupena v plazmě a exprimována v mnoha orgánech, zejména však v játrech (Čolović et al., 2013; Pohanka, 2011a). Obě cholinesterázy jsou podmíněny odlišnými geny a liší se od sebe substrátovou specifitou a také odlišnou citlivostí k vybraným inhibitorům (Chen et al., 2011).

Cholinesterázy existují jako polymery katalytických podjednotek a nacházejí se v mnoha variantách jako monomery či heteromery, buďto v globulární či asymetrické podobě. Globulární formy označované G1, G2 a G4 obsahují jednu, dvě nebo čtyři podjednotky. Asymetrická forma má podlouhlejší tvar a je složena z jednoho až tří tetramerů (A4, A8 a A12), které jsou disulfidickými můstky spojeny s kolagenním vláknem, které je ukotveno v plazmatické membráně. Distribuce jednotlivých izomerů je v organismu různá. ACHE ve formě G1 je pouze rozpustná, kdežto ve formě G4 se vyskytuje v rozpustné i na membrány vázané formě. V mozku se ACHE vyskytuje jak v G1, tak v G4 formě, a to s různou distribucí v různých oblastech mozku. Forma G2 se pak nachází v erytrocytech. BCHE se v mozku vyskytuje nejčastěji ve formě G4 (Brunovský, 2007). V plazmě se také nachází především forma G4, monomery a dimery v plazmě jsou produkty rozpadu právě tetramerů. Asymetrické formy jsou přítomny v periferních nervech a svalech (Chatonnet, 1989; Chen, 2011). Cholinesterázy jsou značně polymorfní, a to díky alternativnímu sestřihu na 3' konci a posttranslačním modifikacím, zahrnujícím N-glykosylaci a oligomerizaci. Každá podjednotka je navíc složena z velké katalytické domény a malého C-terminálního

peptidu (propeptid prokolagenu), který se liší u obou typů cholinesteráz, ale také mezidruhově (Massoulié, 2005).

2.2.1 Acetylcholinesteráza

Acetylcholinesteráza je jedním z nejúčinnějších enzymů. Má vysokou katalytickou aktivitu a je substrátově specifická pro svůj přirozený substrát – acetylcholin (Fang et al., 2011). Hlavním úkolem ACHE je ukončení přenosu signálu v cholinergních synapsích. K terminaci dochází okamžitou hydrolýzou neurotransmiteru, acetylcholinu. ACH je syntetizován z cholinu a acetyl-CoA a je uložen v postgangliových parasympatických nervových vláknech, gangliových synapsích a na nervosvalových ploténkách. Při přenosu vzruchu je aktivována presynaptická membrána, Ca^{2+} vstupuje napětím řízenými iontovými kanály do axoplazmy, kde dochází k aktivaci proteinkináz a fosforylaci synapsinu, což je bílkovina upevňující váčky obsahující ACH k cytoskeletu. Tím váčky splynou s presynaptickou membránou a volný ACH difunduje a interaguje s nikotinovými a muskarinovými receptory. Tady je pak téměř okamžitě, v řádu milisekund, hydrolyzován pomocí ACHE (nachází se na postsynaptických membránách), aby nedocházelo k nekontrolovanému dráždění receptorů a neuron se mohl vrátit do klidového stavu. ACH je degradován na cholin a acetát, přičemž cholin je transportován zpět do presynaptické oblasti a je z něj syntetizován další ACH (Rosenberry, 2009, s. 32; Matouš, 2010).

Kromě degradační funkce se ACHE uplatňuje i jinde. Výzkumy odhalily, že má ACHE i neenzymatický význam při embryonálním vývoji (Behra et al., 2002). ACHE je exprimována ve vyvíjejících se neuronech a během růstu axonů a její koncentrace ovlivňuje rychlost růstu nervové tkáně (Bigbee et al., 1999). ACHE se také nachází na vnější membráně erytrocytů, kde tvoří antigen Yt krevně skupinového systému Cartwright (Rao et al., 1993). Dalšími vlastnostmi, které se podařilo studii prokázat, jsou buněčná adheze, synaptogeneze, aktivace dopaminových neuronů, aktivita během hematopoézy a trombopoézy a také role v tvorbě amyloidních vláken (Soreq a Seidman, 2001).

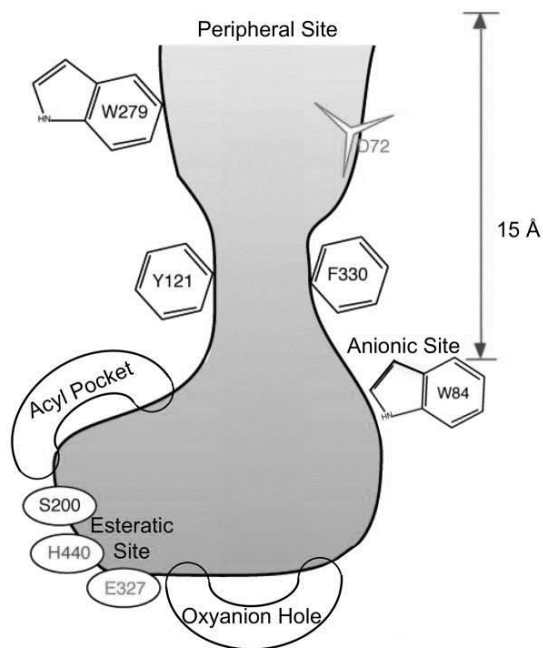
Struktura

Struktura ACHE byla zkoumána u purifikovaného enzymu paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) a rodu rejnoků (*Torpedo*). Enzymy izolované z těchto elektrických ryb jsou velmi podobné cholinesterázám ve svalech a neuronech vyšších obratlovců. Enzym patří do třídy α/β proteinů a jeho monomer je složen z 12 vláken β -skládaného listu, které obklopuje 14 vláken α -helixu. Jeho struktura je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2 3D struktura ACHE parejnoka kalifornského (Kryger, 2000)

Základní jednotka má tvar elipsoidu s rozměry cca 45 x 60 x 65 Å a zajímavá je na ní hluboká a úzká prohlubeň, na jejímž dně se nachází aktivní centrum enzymu, tzv. katalytická triáda. Ta se skládá z trojice kyselina glutamová, histidin a serin. Právě na serin se váže ACH a probíhá zde samotná hydrolýza esterové vazby. Při ústí prohlubně se nachází periferní aniontové místo (PAS), jehož funkcí je primární navázání ACH. Velká část povrchu prohlubně je tvořena 14 aromatickými zbytky, které pomáhají navést molekulu ACH k aktivnímu místu. Dno prohlubně se podle svého charakteru dělí na esteratickou a aniontovou část. Esteratická část je podobná ostatním serinovým hydrolázám. Tvoří ji planární katalytická triáda, tzv. acylová kapsa, kde se acyl ACH váže svou acylovou skupinou, a také oxyanionová jamka, kde interaguje karboxylový kyslík ACH s dusíky přítomných aminokyselin. Obě tyto struktury zajišťují substrátovou specifitu. Aniontová část pak slouží k navázání kladně nabitě kwarterní skupiny cholinu (Dvir et al., 2010; Pohanka, 2011a). Schéma prohlubně aktivního místa je znázorněno na obrázku 3.



Obrázek 3 Schéma prohlubně aktivního místa ACHE (Dvir et al., 2010)

Molekula ACHE má velký dipólový moment, kterým je pozitivně nabitý neurotransmitter přitažen, zachycen v PAS oblasti a díky π - π interakcím mezi kvarterním amonným kationem ACH a aromatickými jádry fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu, které lemují prohlubeň, vtažen do aktivního centra enzymu (Johnson a Moore, 2006). Tam se karbonylový uhlík ACH váže na kyslík serinu, aktivního místa triády. Zároveň se vodík serinu váže na kyslík ACH, tím se přeruší vazba mezi uhlíkem a vodíkem v molekule ACH a neurotransmitter je degradován. Volný cholin difunduje pryč, zatímco nově vzniklému meziprojektu acetyl-enzym daruje přítomná molekula vody proton. Dochází k hydrolyze, acetát utvoří novou vazbu se zbytkem molekuly vody a je uvolněn z aktivního místa, a tím je aktivní místo regenerováno (Soreq a Seidman, 2001).

2.2.2 Butyrylcholinesteráza

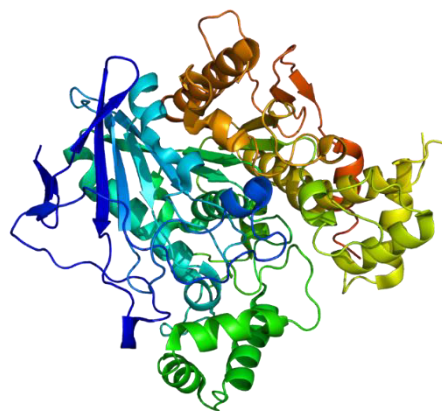
BCHE je velmi podobná ACHE, její sekvence je dokonce více než z poloviny totožná s ACHE. V organismu se nachází v zhruba desetkrát vyšší koncentraci než ACHE a je přítomna v játrech, střevech, srdci, plicích a ledvinách a játry je secernována do plazmy. Gen pro BCHE se nachází na krátkém raménku 3. chromozomu a je známo 7 alel (U, A, S, F, H, J, K). Její fyziologická funkce není dosud zcela objasněna, stále nebyl popsán její přirozený substrát, ale svou

přítomností v séru se jeví jako účinná obrana proti esterům různého původu. Účinná je proti organofosfátovým nervovým jedům, organofosfátovým pesticidům, karbamátovým pesticidům, lékům proti Alzheimerově nemoci (donepezil, rivastigmin), přírodním jedům jako je fysostigmin (eserin) z puchýřnatce jedovatého, kokain z rudodřeva koka, solanidin ze zelených brambor, huperzin A z mechu *Huperzia serrata*, anatoxin-a/-as z cyanobakterií a další. BCHE tyto jedy buďto přímo hydrolyzuje, anebo se na ně naváže, čímž dochází k její inhibici, ale zamezí inhibici ACHE (Lockridge, 2015). Bylo také zjištěno, že BCHE hydrolyzuje gherlin, tzv. hormon hladu, a tím ovlivňuje metabolismus tuků a emocionální chování (Boyko et al., 2019). Zároveň je BCHE schopna degradovat ACH. Při nižších koncentracích je méně účinná než ACHE, ale při vysokých koncentracích, kdy u ACHE dochází k inhibici nadbytkem substrátu, je její účinnost vysoká a není nadbytkem ACH ovlivněna. Proto by se mohlo jednat o záložní enzym pro degradaci tohoto neurotransmiteru (Masson a Lockridge, 2010).

Zajímavé je, že absence či mutace BCHE se projevuje pouze v ojedinělých případech, například při podání sukcinylcholinu, který se používá pro krátkodobou narkózu. Při absenci/nedostatečné aktivitě BCHE a podání myorelaxancia dochází k prodloužení apnoe, což může mít fatální následky (Pohanka, 2011a).

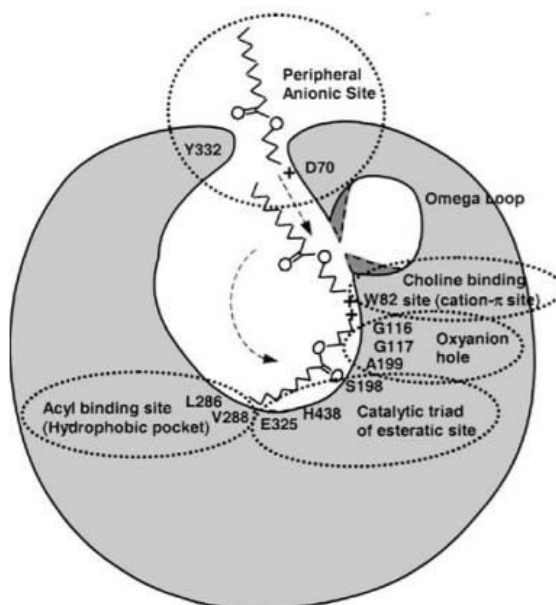
Struktura

Jedná se o α/β hydrolázu, která se vyskytuje nejčastěji ve formě tetrameru, přičemž každý monomer se skládá z 574 aminokyselin a devíti sacharidů, které jsou spojeny se zbytky asparaginu. Její struktura je zobrazena na obrázku 4.



Obrázek 4 Struktura lidské BCHE (Nicolet et al., 2003)

V PAS oblasti se nachází kyselina asparagová a tyrosin, které zajišťují první navázání nabitého substrátu. Ten pak putuje prohlubní k aktivnímu místu. Složení prohlubně je to, čím se BCHE nejvíce odlišuje od ACHE. Oproti ACHE prohlubeň lemuje pouze 8 aromatických zbytků a díky tomu je přístupná pro větší množství substrátů a katalyzuje hydrolýzu různých esterů oproti substrátově vyhraněné ACHE. Na dně prohlubně se nachází opět planární katalytická triáda – kys. glutamová, histidin a serin (Pohanka, 2013a). Schéma prohlubně aktivního místa BCHE je na obrázku 5.



2.3

Obrázek 5 Schéma prohlubně aktivního místa BCHE (Çokuğraş, 2003)

Inhibitory cholinesteráz

Inhibitory jsou látky, které svým působením snižují aktivitu enzymu. Inhibice je důležitý regulační mechanismus biochemických procesů a funguje na různých principech. Podle síly vazby, která se mezi inhibitorem a enzymem vytvoří, inhibici dělíme na reverzibilní (vratnou), kdy se inhibitor váže pouze nekovalentně a jde vyvázat například zvýšením koncentrace substrátu, a ireverzibilní (nevratnou), kdy je inhibitor na enzym navázán kovalentně. Speciálním typem je inhibice pseudo-ireverzibilní, kdy se inhibitor váže do aktivního místa kovalentně, ale vazba je nestabilní a časem dochází k jejímu spontánnímu rozpadu. Podle mechanismu, jakým inhibitor snížení aktivity způsobí, pak rozlišujeme inhibici:

- Kompetitivní – inhibitor je strukturně podobný substrátu a se substrátem soutěží o vazebné místo, ovšem po navázání inhibitoru nedochází k žádné reakci. Inhibitor je pak možné z místa vyvázat zvýšenou koncentrací substrátu. Mezní rychlost reakce V_{max}^1 není ovlivněna, ale je snížena K_m^2 , jelikož navázáním inhibitoru je zdánlivě snížena afinita enzymu k substrátu.
- Nekompetitivní – inhibitor se váže na alosterické/modulační místo mimo vazebné místo substrátu a změnou konformace enzymu je znemožněno navázání substrátu. Tím se množství dostupného enzymu sníží a s tím klesá i V_{max} . K_m se nemění. Komplex enzym-substrát není katalyticky aktivní, a jelikož inhibitor není navázán v aktivním místě, nelze ho odstranit zvýšenou koncentrací substrátu.
- Akompetitivní – inhibitor se váže pouze na komplex enzym-substrát a vzniká tím katalyticky neaktivní terciární komplex enzym-substrát-inhibitor. Dochází k poklesu V_{max} i K_m , ale oba parametry jsou sníženy ve stejném poměru. Inhibitor nejde vyvázat zvýšeným množstvím substrátu.
- Smíšenou – komplikovaný typ inhibice, kdy se inhibitor může vázat jak na samotný enzym, tak na komplex enzym-substrát. Mezní rychlost reakce V_{max} je snižena, zatímco K_m může být nižší (v případě, kdy má inhibitor vyšší afinitu k volnému enzymu a reakce má blíž ke kompetitivní inhibici), ale i vyšší (v případě, že se inhibitor přednostně váže na komplex enzym-substrát a připomíná více akompetitivní inhibici) (Matouš, 2010).

Inhibitory cholinesteráz působí v aktivním místě či oblasti PAS a svou přítomností blokují enzymatickou aktivitu. Tím znemožňují hydrolýzu ACH, což vede k akumulaci ACH a následnému zvýšení intenzity a prodloužení doby stimulace v postsynaptických cholinergních receptorech. Díky tomuto faktu se reverzibilní inhibitory používají jako terapeutika, kdežto ireverzibilní inhibitory jsou jedy, látky toxické, často využívané jako bojové látky.

^{1,2} Jedná se o základní parametry enzymové kinetiky, jejímž základem je rovnice Michaelis-Mentenové. V_{max} je teoreticky nejvyšší počáteční reakční rychlost, které může reakce při dané koncentraci enzymu dosáhnout, K_m je Michaelisova konstanta, která udává koncentraci substrátu, jež je pro danou koncentraci enzymu zapotřebí pro dosažení počáteční reakční rychlosti, která odpovídá polovině mezní rychlosti

2.3.1 Reverzibilní inhibitory

Díky reverzibilnímu účinku se tyto látky používají v laboratorní a praktické medicíně pro diagnostiku a terapii např. Alzheimerovy choroby, myasthenia gravis, glaukomu, pooperační neprůchodnosti střev, distenze močového měchýře, a dalších (Čolović et al., 2013). Skupina těchto látek je rozmanitá, obsahují různé funkční skupiny.

Donepezil je nekompetitivní selektivní inhibitor ACHE. Je to uměle syntetizovaný derivát piperidinu dostupný od firem Eisai a Pfizer pod komerčním názvem Aricept, Adonep, Yasnal, aj. Je indikován při lehkých a středně těžkých formách AD, ale několik klinických studií popisuje zlepšení kognitivních funkcí i u pacientů trpících těžkou formou AD. Molekula donepezilu se váže do oblasti PAS a má příznivé účinky nejen proti symptomům, ale i proti samotnému ukládání amyloidních plaků (Li et al., 2018). Je možné ho podávat ve formě rozpustných tablet či orálního roztoku. Jeho poločas rozpadu je 70 hodin, což umožňuje užívání pouze jednou denně a je dostupný ve dvou účinných dávkách, 5 a 10 mg, s doporučením začínat dávkování na 5 mg denně a terapeutickou dávku po týdnu zvýšit. Maximální denní dávka by neměla být vyšší než 23 mg denně, jelikož bylo prokázáno, že vyšší dávky poskytují jen nepatrné zlepšení kognitivních funkcí, ale silně zvyšují riziko nežádoucích účinků, mezi které patří nevolnosti, závratě, průjem, anorexie, bolesti břicha, bradykardie (Huaqing et al., 2019; Čolović et al., 2013; Cacabelos, 2007).

Galantamin je další z látek používaných pro léčbu AD. Jedná se o přirozeně syntetizovaný alkaloid, metabolit sněženky Woronovy (*Galanthus woronowii*). Galantamin je kompetitivní selektivní inhibitor ACHE, který se váže jak na PAS oblast, tak neobvykle také do samotné aromatické prohlubně enzymu. Je indikován při lehké a středně těžké formě AD a je k dostání pod komerčními názvy Razadyn, Reminyl, Nivalin, aj. Má kratší poločas rozpadu, zhruba 7–10 hodin, a proto je potřeba častější dávkování (obvykle dvakrát denně). Účinná dávka se pohybuje kolem 4–12 mg dvakrát denně. Oproti ostatním terapeutikům podávaným při AD je galantamin hůře snášen, protože vyvolává silné zažívací obtíže. Postupné zvyšování účinné dávky v intervalu několika měsíců a monitorování stavu pacienta, tzv. titrace, může riziko nežádoucích účinků snížit a vést k dlouhodobé snášenlivosti. Mimo to se galantamin alostericky váže na nikotinové cholinergní receptory a zvyšuje jejich senzitivitu k ACH (Razay a Wilcock, 2008). Svým alosterickým účinkem pomáhá také

ostatním neurotransmisním systémům (kyselina γ -aminomáselná, glutamát, monoaminy) a vede ke zlepšení kognitivních dysfunkcí a psychiatrických onemocnění jako jsou schizofrenie, depresivní porucha, bipolární porucha či alkoholismus (Pohanka, 2012; Čolović et al., 2013).

Hojně využívanou látkou pro terapii lehkých až středně těžkých forem AD byl **takrin**. Tato synteticky vytvořená látka byla prvním inhibitorem acetylcholinesterázy schváleným pro terapii AD a byla dostupná pod komerčním názvem Cognex. Skvělé biologické vlastnosti však doprovázela hepatotoxicita spolu s dalšími nežádoucími účinky, a proto byla pro účely terapie zakázána (Girek a Szymański, 2019). V rámci výzkumu je však syntetizováno množství sloučenin odvozených od takrinu. Některé z nich vykazují skvělé inhibiční vlastnosti a mnohonásobně nižší hepatotoxicitu. Příkladem může být 7-methoxytakrin, který vykazuje dokonce vyšší inhibiční aktivitu než samotný takrin (Korábečný et al., 2012; Čolović et al., 2013).

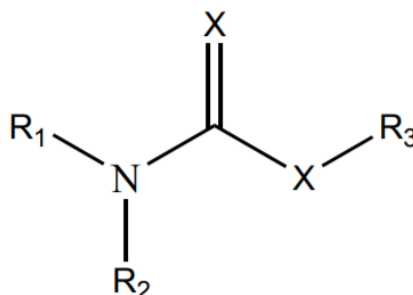
Huperzin je další látkou používanou při terapii AD. Jedná se o přírodní alkaloid izolovaný z rostliny jménem vranec zubatý (*Huperzia serrata*) a nachází se ve dvou hlavních formách – A a B. Huperzin A je účinnější, a proto se pro terapeutické účinky volí právě on. Jedná se o nekompetitivní inhibitor ACHE, váže se na oblast PAS a kromě pozitivního vlivu na projevy AD brání také vzniku amyloidních plaků (Zhang, 2012). Výzkumy ukazují, že nemá žádný toxický vliv a oproti galantaminu, donepezilu a takrinu vykazuje lepší prostupnost hematoencefalickou bariérou, delší dobu působení, méně nežádoucích účinků a další výhody (Xing et al., 2014; Pohanka, 2014; Čolović et al., 2013).

Vzhledem k počtu účinných inhibitorů ACHE izolovaných z rostlin se část výzkumu zabývající se vývojem nové látky pro boj s AD stáčí právě sem. Většina z nově objevených látek izolovaných z rostlin spadá do skupiny alkaloidů, zahrnující jednoduché indolové, chinolizidinové, piperidinové a steroidní alkaloidy. Ovšem i další látky izolované z přírodních zdrojů, jako jsou terpenoidy, flavonoidy, fenoly, kumariny, aj., mají na ACHE inhibiční účinek (Murray et al., 2013).

2.3.2 Pseudo-ireverzibilní inhibitory

Do skupiny pseudo-ireverzibilních inhibitorů se řadí karbamáty. Karbamáty jsou organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové. Jejich obecná struktura je naznačena na obrázku 6, kdy na místě X bývá navázán kyslík či síra, jako R_1 a R_2

může být vodík či zbytky organických sloučenin a R₃ bývá zbytek organické sloučeniny či atom kovu.



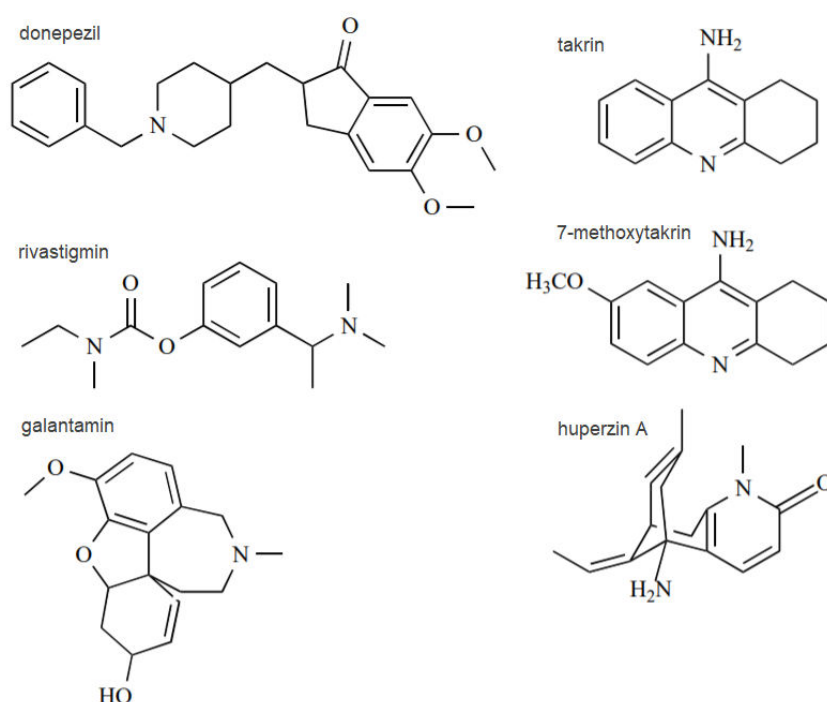
Obrázek 6 Obecná struktura molekuly karbamátu (Čolović, 2013)

Karbamáty jsou označovány jako pseudo-ireverzibilní (nebo také pomalu reverzibilní), protože ačkoliv se do aktivního místa enzymu váží kovalentně, vazba není stabilní a časem podléhá spontánní hydrolyze (Pohanka, 2014). Využívají se v zemědělství jako insekticidy (aldikarb, karbofuran, karbaryl, fenobukarb, propoxur, aj.), herbicidy (ferbam, mancozeb, thiram, aj.) a fungicidy (butylát, pebulát, metham, molinát, cykloát, vernolát, aj.). Díky reverzibilnímu účinku jsou považovány za bezpečnější a šetrnější k životnímu prostředí než například organofosfáty. Také jejich toxicita pro člověka je nižší a případná přílišná expozice se projevuje mírnějšími obtížemi, jako jsou kašel, vyrážka, podráždění očí, sliznice krku a nosu (Čolović, 2013).

Klinicky asi nejvýznamnější karbamát je **rivastigmin**. Jedná se o lék indikovaný při lehké až středně těžké formě AD a také Parkinsonově chorobě a demenci s přítomností Lewyho tělísek. Oproti donepezilu a galantaminu inhibuje oba typy cholinesteráz. Je komerčně dostupný pod názvy Exelon, Prometax, Ristidic, Vastigmex, Evertas, aj. a k sehnání je ve formě kapslí, orálního roztoku či transdermálních náplastí. Užívá se dvakrát denně v terapeutických dávkách 1,5 až 6 mg a mezi nežádoucí účinky patří nevolnost, zvracení, průjem, anorexie, bolesti hlavy, synkopa, bolesti břicha a závratě. Použití náplastí značně snižuje riziko nežádoucích účinků se zachováním stejného terapeutického efektu jako u kapslí s nejvyšší možnou předepsanou dávkou (Kandiah et al., 2017; Čolović et al, 2013; Onor et al., 2007).

Fysostigmin, též eserin, je přírodní alkaloid izolovaný ze semen rostliny puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*). Způsobuje dráždění parasymptických nervů, rozšíření zornic a snížení nitroočního tlaku. Z toho důvodu se používá například pro léčbu glaukomu. Historicky se fysostigmin používal jako antidotum při otravách spojených s anticholinergní toxicitou (Watkins et al., 2015). I současné studie ukazují pozitivní vliv při jeho aplikaci po požití antipsychotik, antihistaminik a cyklických antidepresiv (Arens et al., 2017). Fysostigmin není vhodným léčivem pro terapii AD, neboť podle studií nemá zásadní vliv na zlepšení symptomů (Coelho a Birks, 2001).

Dalšími zástupci ze skupiny karbamátů jsou pyridostigmin a neostigmin. Neprostupují přes hematoencefalitickou bariéru, a proto se hodí zejména k léčbě onemocnění postihující periferní nervovou soustavu jako je např. myasthenia gravis (Pohanka, 2014, s. 9816). Pyridostigmin se navíc používá jako protilátka při otravě organofosfáty (Čolović, 2013). Na obrázku 7 jsou znázorněny strukturní vzorce v klinice nejčastěji používaných inhibitorů.

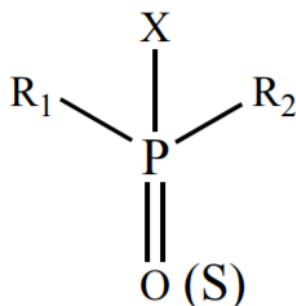


Obrázek 7 Strukturní vzorce inhibitorů klinicky významných pro léčbu AD (Colović, 2013)

2.3.3 Ireverzibilní inhibitory

Ireverzibilní inhibitory se na molekulu ACHE navazují kovalentně a působí trvalou, nevratnou inhibicí. Z této podstaty se k terapeutickým účelům většinou nehodí. Hlavní skupinou ireverzibilních inhibitorů jsou organofosfáty.

Organofosfáty (OP) nemají v medicíně takové uplatnění a využívají se především v zemědělství (pesticidy, herbicidy, insekticidy), anebo jako nervově paralytické chemické zbraně. Jsou to obecně estery nebo thioly kyseliny fosforečné. Dva ze tří zbytků (R_1 , R_2) navázaných na fosfor jsou alkyly či aryly a váží se přímo nebo přes atom kyslíku či síry, třetí zbytek (X) se váže přes atom kyslíku či síry a může jím být halogen, alifatická, aromatická či heterocyklická skupina (Ranjan et al., 2018). Obecný strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 8.



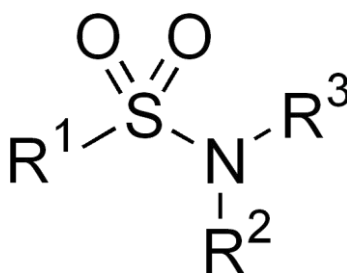
Obrázek 8 Obecný strukturní vzorec OP (Čolović, 2013)

OP jsou substrátovým analogem ACH, a proto jednoduše vstupují do prohlubně enzymu a kovalentně se váží na hydroxylovou skupinu serinu. OP je rozštěpen, jeden ze zbytků (X) opouští enzym a ACHE zůstává fosforylovaná. Na rozdíl od fyziologické deacylace k defosforylaci dochází velmi pomalu (desítky hodin až dny), acetylcholin tudíž není hydrolyzován, akumuluje se v synaptických štěrbinách a dochází k nadměrné stimulaci nikotinových i muskarinových receptorů (Wei et al., 2018). Mechanismus jejich toxicity tedy spočívá ve fosforylaci cholinesteráz. Trvalá fosforylace se dá odvrátit podáním látek obsahujících oximovou funkční skupinu (dostupné pod komerčními názvy obidoxim, trimedoxim, pralidoxim, asoxim), které dokáží OP vyvézt z aktivního místa. Tyto látky jsou účinné pouze při rychlém podání (interval je specifický pro každý OP, jedná se o minuty až hodiny), jakmile dojde k tzv. stárnutí, dealkylaci dalšího z navázaných zbytků (R_1/R_2), vazba mezi serinem a fosforem OP je příliš silná a nejde rozrušit (Pohanka, 2011a).

Otrava organofosfáty se projevuje například vnitřním třesem, svalovou slabostí, poruchou soustředění, zpomalenými reakcemi, zvýšeným sliněním, roztaženými zornicemi, bolestí hlavy, průjmem, hypertenzí ad. Těžké akutní stavy způsobené především nervovými chemickými látkami jsou spojeny s respiračním selháním, křečemi, bezvědomím a smrtí. Zástupci nervových chemických zbraní jsou například sarin, tabun, soman a VX. Jako pesticid se používá paraoxon, parathion, malaoxon, malathion a zástupci insekticidů jsou methiokarb, pirimikarb, karbofuran, dimethoát (Pohanka, 2012; Čolović, 2013). Pro terapeutické účely se OP uplatňují například v oftalmologii, kde se diisopropylfluorofosfát a echothiofát užívají při léčbě glaukomu (Čolović, 2013). Metrifonát (trichlorfon) se využíval k léčbě AD, ale musel být stažen pro své silné nežádoucí účinky (Pohanka, 2014).

2.3.4 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou rozsáhlou skupinou látek, která je charakteristická svou sulfonamidovou funkční skupinou (viz obrázek 9). Prvním objeveným sulfonamidem byl Prontosil. Byl objeven Gerhardem Domagkem v první polovině 20. století. Jednalo se o velký průlom v medicíně a za syntézu tohoto antibakteriálního chemoterapeutika získal Domagk dokonce Nobelovu cenu. Prontosil byl prvním sulfonamidem využívaným v klinické praxi a dá se říct, že odstartoval vlnu výzkumu a vývoj nových chemoterapeutik pro léčbu infekčních onemocnění (Otten, 1986).



Obrázek 9 Obecný strukturní vzorec sulfonamidu

Sulfonamidy mají široké pole působnosti a uplatňují se jako antibiotika, antivirotika, diuretika, chemoterapeutika, spasmolytika, antiepileptika, aj. (Gulçin a Taslimi, 2018). V současné době je snaha vytvořit multifunkční léčivo pro terapii AD, které by inhibovalo aktivitu CHEs, zároveň redukovalo tvorbu amyloidních plaků a zachytávalo volné radikály. Několik studií přináší dobré výsledky, např. Kumar et al. prezentují nové sulfonamidy, které se chovají jako agonisté muskarinových receptorů

s pozitivním vlivem na projevy AD (2008). Bag et al. zkoumali vlastnosti 28 komerčně dostupných i jimi nově syntetizovaných sulfonamidů a došli k závěru, že malé a cyklické deriváty jsou většinou neaktivní, kdežto dlouhé acyklické sulfonamidy vykazují dobrý potenciál ohledně inhibičních vlastností i vlivu na shlukování beta-amyloidu (2015). Mutahir et al. představili skupinu 18 nově syntetizovaných bifenylových bis-sulfonamidů, přičemž neúčinnější inhibitor ACHE vykazoval IC_{50}^3 $2,27 \pm 0,01 \mu\text{M}$ a neúčinnější BCHE inhibitor IC_{50} $7,74 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (2016). V práci Uluse et al. byla popsána tvorba nových takrin-sulfonamidových sloučenin za použití mikrovln. Všechny nově syntetizované sloučeniny vykazovaly inhibiční aktivitu pro ACHE i BCHE. Nejnadějnější inhibitor ACHE vykazoval IC_{50} $0,009 \mu\text{M}$, což znamená, že je (alespoň *in vitro*) 220x víc aktivní než galantamin a 6x aktivnější než takrin. Nejúspěšnější z inhibitorů BCHE s hodnotou IC_{50} $0,243 \mu\text{M}$ je 74x aktivnější než galantamin a 11x více aktivní než donepezil. Látky také projevily dobré vlastnosti ohledně antioxidantní aktivity (2017). Ultus et al. také syntetizovali a zkoumali nové hybridy akridin-sulfonamidů. Některé z nich vykazovaly dobré inhibiční účinky, neúčinnější z inhibitorů ACHE vykazoval IC_{50} $0,14 \mu\text{M}$ (2018).

2.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba byla poprvé popsána v roce 1906 profesorem Aloisem Alzheimerem. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění, které se vyznačuje charakteristickými klinickými příznaky a patofyziologickými změnami. Alzheimerova choroba je nejčastějším typem demence, zodpovídá za 60–80 % diagnostikovaných demencí (Crous-bou et al., 2017). Také se významně podílí na mortalitě – celosvětově je u zhruba 15 % žen a 10 % mužů AD primární příčinou smrti (Zvěřová, 2017). Jedná se o komplexní onemocnění, na jehož vzniku má pravděpodobně podíl několik souvisejících patofyziologických procesů, základní etiologie onemocnění je však doposud neznámá.

Onemocnění se rozvíjí pomalu a jeho průběh můžeme rozdělit do tří stádií – časné, střední a konečné. U postiženého se zprvu objevují problémy s krátkodobou pamětí a řečí. S rozvojem onemocnění dochází ke zhoršení osobnostních rysů. Postižený ztrácí své návyky, mění zvyklosti, ztrácí cit pro etiku a estetiku. Změna

³ Hodnota IC_{50} udává koncentraci inhibitoru, při níž dojde k poklesu aktivity enzymu na 50 %. V praxi se používá pro posouzení účinnosti inhibitoru.

jeho chování je již nápadná, začíná být zmatený, hádavý a podezřívavý, ztrácí zájem o své koníčky. Dochází k poruše soudnosti, schopnosti logického myšlení a chápání, ztrátě schopnosti učení a objevují se afázie (částečná či úplná ztráta řeči a porozumění), apraxie (ztráta schopnosti vykonávat koordinované pohyby), agnózie (ztráta rozpoznávací schopnosti týkající se věcí, zvuků, pachů, osob, aj.) a ztráta orientace v prostoru i v čase. Postižený není schopný plnit pracovní úkoly, má obtíže s vykonáváním běžných denních činností, nevyjímaje péči o svůj vzhled a hygienu. V pokročilých fázích dochází k rozpadu osobnosti, postižený nemá zájem o své okolí, blízké osoby či oblíbené činnosti, nepoznává blízké členy rodiny, mluví nesouvisle, s velkou námahou, věty nedávají smysl. Dochází k útlumu emocí, a pokud je zachována paměť, tak většinou pouze na dávnou minulost. V konečném stádiu je postižený zcela odkázán na své okolí, ošetrovatelská péče je nezbytná (Alzheimer's Association, 2016; Pidrman, 2007). Onemocnění trvá v rozmezí od 2 do 12 let od prvních příznaků, obvykle má plynulý průběh (nicméně jsou známy i případy s výrazně kolísavým průběhem). Jedná se o ireverzibilní letální onemocnění, dostupná léčba je pouze symptomatická (Pidrman, 2007; Zvěřová, 2017).

2.4.1 Patologické změny

Během AD dochází k ireverzibilnímu poškození mozkové tkáně, a to na mikroskopické i makroskopické úrovni.

Mezi stěžejní patogenetické faktory patří produkce a ukládání beta-amyloidu ($A\beta$) a fosforylace tau proteinu. Beta-amyloid vzniká z transmembránově vázaného amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za fyziologických podmínek štěpen α -sekretázou na krátké rozpustné fragmenty (β -peptidy; jejich funkce dosud nebyla plně objasněna, pravděpodobně se účastní tvorby nových synapsí). Část APP může být štěpena na delší fragmenty β - a γ -sekretázami. Během AD však převládají β - a γ -sekretázy, dochází k hromadění delších nerozpustných fragmentů, které oligomerují (oligomery jsou neurotoxické) a následně polymerují do samotného $A\beta$ (Bostancikloğlu, 2019; Murphy a LeVine, 2010). Shluky beta-amyloidu vytváří tzv. Alzheimerovské, nebo také senilní, plaky. Množství $A\beta$ přímo koreluje se závažností demence (Pidrman, 2007).

Druhou patologickou změnou je hyperfosforylace tau proteinu. Tau protein je intracelulární protein vážící se na mikrotubuly. Jeho funkcí je zajistit mikrotubulární

stabilitu, další funkce jsou prozatím předmětem výzkumu. Protein se nachází ve fosforylované formě, ale během AD dochází k jeho hyperfosforylaci, což vede k tvorbě helikálních vláken, která se dále shlukují do tzv. neurofibrilárních uzlíků a poškozený neuron zaniká (Iqbal et al., 2010). Hyperfosforylaci pravděpodobně spouští oligomery vznikajícího A β . Amyloidové plaky jsou prvním ze symptomů a mohou se objevit až 20 let před prvními klinickými příznaky (Weller a Budson, 2018; Hu, 2016).

Vlivem působení těchto patologických útvarů dochází k další degeneraci mozkové tkáně – objevuje se zánětlivá reakce doprovázená uvolněním interleukinu, cyklooxygenáz, volných radikálů a syntézou prostaglandinu. Uvolňují se excitační aminokyseliny, které způsobí otevření iontových kanálů, čímž dojde k rozrušení a destabilizaci vnitřního prostředí neuronů a následné apoptóze. Z apoptické buňky se však uvolní další excitační aminokyseliny, reakce se opakuje a poškození se kaskádovitě rozšiřuje (Jiráček, 2009; Pidrman, 2007).

Poškozené jsou také neurotransmitterové systémy. Tzv. cholinergní hypotéza předpokládá, že právě poškození cholinergních nervů vede k výraznému zhoršení paměti a ostatních kognitivních funkcí. Zakládá se na pozorování, že jako první dochází k postižení a atrofii právě cholinergních jader mozku (*nucleus basalis Meynerti*) (Mesulam, 2012; Bartus, 1982). Snižuje se syntéza acetylcholinu v důsledku deficitu enzymu cholinacetyltransferázy, ACH není řádně uvolňován a také transport cholinu ze synaptické štěrby zpět do neuronu je narušen (Pidrman, 2007). Je také zvýšena tvorba BCHE aktivována neurogliemi v blízkosti plaků. Zajímavé je, že dochází k hromadění obou enzymů – ACHE i BCHE – přímo v samotných útvarech (Giacobini, 2003). Příčina tohoto procesu není známa, ale jejich přítomnost byla potvrzena. Studie ukazují, že se ACHE snadno váže na A β a dokonce díky interakcím A β s PAS oblastí podporuje agregaci A β a vznik amyloidních vláken. Popsána byla také nadměrná glykosylace, která by mohla usnadňovat tvorbu plaků (Chen et al., 2011). ACHE vázaná s A β či v amyloidních placích má také rozdílné vlastnosti – liší se její enzymatická aktivita, je odolnější vůči nižšímu pH, inhibici přebytkem substrátu a je méně citlivá vůči inhibitorům. BCHE také tvoří komplexy s A β , ale na rozdíl od ACHE neurychluje tvorbu amyloidních vláken (Inestrosa et al., 2008). Během AD klesá aktivita ACHE zhruba na polovinu,

zatímco aktivita BCHE roste až na jedenáctinásobek původní hodnoty ACHE (Onor et al., 2007).

Dalším z výrazně poškozených neurotransmiterových systémů je glutamátergní systém. Jednou z uvolňovaných excitačních aminokyselin je právě glutamát, který se pak nadměrně váže na ionotropní NMDA-receptory (*N*-methyl-*D*-aspartát) a působí tak otevření kalciových kanálů, což vede ke kaskádě událostí končící apoptózou neuronu. Zároveň NMDA-receptory souvisejí s tzv. dlouhodobou potenciací, mechanismem důležitým pro schopnost učení se, který je dlouhodobou excitací NMDA-receptorů rušen (Pidrman, 2007; Jiráček, 2009).

Dochází také k nižší produkci nervových růstových faktorů, např. CREB (z anglického *cAMP response element binding protein*), BDNF (z anglického *brain-derived neurotrophic factor*) a dalších. Mimo jiné dochází také k úbytku receptorů TrK (tyrozinkinázu aktivující receptory) pro tyto faktory. Obojí vede ke snížení tvorby nových synapsí a neuronových okruhů (Lulita a Cuello, 2014; Jiráček, 2009). Poškozen je také dýchací řetězec v mitochondriích, což vede ke snížení syntézy makroergních sloučenin a snížení energického metabolismu CNS. Uvolněné volné radikály vedou k poškození jak samotné mitochondrie, tak neuronových membrán (Zvěřová, 2017).

Makroskopicky se poškození tkáně projeví úbytkem mozkové hmoty, a to zejména atrofií mozkové kůry, rozšířením sulců a mozkových komor. Míra atrofie však není přímo úměrná míře demence (Pidrman, 2007).

2.4.2 Rizikové faktory

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem vzniku AD je jednoznačně věk. Dalším neovlivnitelným faktorem je pak genetická zátěž. Přestože nebyl objeven gen, který by sám o sobě zapříčiňoval vznik AD, jsou známy genetické predispozice, které riziko zvyšují. Například přítomnost apolipoproteinu E ve formě $\epsilon 4$ je významným faktorem. Zatímco jedinci, kteří nenesou alelu pro ApoE $\epsilon 4$ mají 9% riziko rozvinutí AD, u heterozygotů je to už 29 % a u homozygotů je to dokonce 83 %. Familiární forma AD (postižený mladší 65 let), která souvisí se zhruba 10 % případů, se pojí s výskytem bodových mutací, a to na chromozomech 21, 14 a 1. Mutace na 21. chromozomu souvisí s formací abnormálního amyloidního prekurzoru APP, mutace na 1. a 14. chromozomu vede ke vzniku abnormálního presenilinu, což je

jeden ze základních strukturních proteinů sekretáz (Lane et al., 2017). Také například výskyt Downova syndromu v rodině je neovlivnitelným rizikovým faktorem. Mezi ovlivnitelné faktory pak patří špatný životní styl, nízká úroveň vzdělání, kouření, vysoká konzumace alkoholu, tzv. metabolický syndrom spojený s obezitou, hypertenzí, diabetem a vysokým cholesterolem, opakované úrazy hlavy, ad. Vliv by pravděpodobně mohl mít i perinatální vývoj (Zvěřová, 2017; Panpalli Ates et al., 2016; Tayeb, 2012).

2.4.3 Diagnostika

Diagnostika může být zvláště v počátcích onemocnění problematická. Diagnóza AD se opírá zejména o klinický obraz a první obtíže mohou být připisovány vyššímu věku pacienta a mohou být zaměněny za fyziologické projevy stárnutí. Přitom právě včasná diagnóza má velký vliv na průběh léčby (Small a Bullock, 2011). Důležité je nejprve vyřadit jiné možné příčiny demence. Následuje posouzení rodinné anamnézy a testy kognitivních funkcí (Ressner et al., 2008). Jedním z nich je MMSE test (z angl. *mini-mental state examination*), složený z jednoduchých úkolů – odpovídání na jednoduché otázky typu „Jaké je dnes datum?“ či „V jakém jsme městě?“, hláskování, počítání, pojmenovávání předmětů, plnění jednoduchých příkazů, zapamatování si několika slov a podobně. Každý úkol je bodován a stav pacienta je hodnocen podle dosaženého skóre. Je nutné zdůraznit, že se jedná pouze o orientační test. Dalším v praxi používaným testem je Test hodin/CDT (z angl. *clock drawing test*), kdy je pacient požádán, aby na prázdný papír nakreslil ciferník hodin s čísly a ručičkami a aby hodiny ukazovaly určený čas. Test CDT je vhodným doplňujícím testem k MMSE. Mezi další testy kognitivních funkcí patří Rey-Osterriethova komplexní figura, kdy pacient překresluje strukturovaný geometrický obrazec. Jsou používány také různé hodnotící škály (např. BCRS – *brief cognitive rating scale*, GDS – *global deterioration scale*) a testy pro hodnocení aktivit denního života (DAD – *disability assessment for dementia*, FAST – *functional assessment staging*) (Ressner, 2004).

Používaná zobrazovací vyšetření nemají velký význam, jelikož jak již bylo zmíněno, míra atrofie nekoreluje se závažností demence. Mezi využívané zobrazovací metody patří počítačová tomografie, magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie a jednofotonová emisní výpočetní tomografie. Poslední dvě zmíněné metody mohou zaznamenat změny v mozkovém metabolismu, ale i tento

výsledek je příliš nespecifický. Speciálně upravený typ pozitronové emisní tomografie je schopen zobrazit shluky amyloidních plaků, je však finančně náročný, a proto se ve větší míře neuplatňuje. (Weller a Budson, 2018; Ressler, 2004).

Možností je také detegovat přímo tau protein či A β v mozkomíšním moku. Toto vyšetření se ale rutinně nepoužívá kvůli invazivnímu způsobu odběru vzorku (Weller a Budson, 2018; Ressler, 2004).

Diagnostika AD vždy pracuje pouze s mírou pravděpodobnosti. S jistotou se dá AD potvrdit až *post mortem* biopsií mozku.

2.4.4 Léčba

V současné době neexistuje kauzální léčba a uplatňuje se pouze léčba symptomatická. K terapii jsou schváleny dvě skupiny léčiv – inhibitory cholinesteráz a antagonisté glutamatergických NMDA-receptorů. Do první skupiny patří inhibitory donepezil, rivastigmin a galantamin. Inhibice enzymů degradujících ACH vede ke zvýšení koncentrace ACH v synaptických štěrbinách a bojuje tak proti porušené acetylcholinergní transmisi. Zároveň také ovlivňují tvorbu amyloidních plaků, na jejichž vzniku se cholinesterázy podílejí. Informace o jednotlivých léčivech byly podrobněji rozvedeny v kapitole 2.3.1. Tato léčiva jsou indikována u lehkých a středně těžkých forem AD (Jiráček, 2009).

Ze skupiny antagonistů NMDA-receptorů se pak využívá memantin. Jedná se o nekompetitivního antagonistu NMDA-receptorů, chráníciho neurony před nadměrnou aktivitou glutamátu působícího excitotoxicky (Takahashi-Ito, 2017). Zároveň pravděpodobně podporuje dlouhodobou potenciaci (nezbytná pro schopnost učení se) a snižuje hyperfosforylaci tau proteinu (Tayeb et al., 2012). Memantin, pod komerčním názvem Ebixa, je indikován u středně těžkých až těžkých forem AD.

Přestože kombinace inhibitorů CHEs s memantinem má dobré výsledky, zlepšuje kognitivní funkce a výrazně zvyšuje kvalitu života, jedná se pouze o symptomatické zlepšení, progresi onemocnění není možné zastavit (Tayeb et al., 2012)

Mezi další používaná farmaka mohou patřit antidepresiva, antipsychotika, neuroleptika a další. Jejich indikace je čistě individuální a závisí na konkrétních symptomech pacienta. Je nutné volit léčiva bez anticholinergní aktivity (Ressler,

2004). Jako podpůrná léčba, která však není podložena výsledky studií, se používají extrakt ginkgo biloby, antioxidanty ve formě vitamínu E, β -karotenu, kys. lipové, Nicergolin (zlepšuje krevní cirkulaci), Cerebrolysin (hydrolyzát vepřových mozků, který by měl sloužit jako prekurzor pro tvorbu nervových růstových faktorů), estrogeny (u žen po klimakteriu), nesteroidní antirevmatika (potlačují zánětlivou reakci), koenzym Q10 a mnohé další (Jiráček, 2009; Sheardová et al., 2007).

Současné výzkumy se upínají k vývoji léčiv, která by cílila na samotné abnormální proteiny a kaskádu jejich vzniku. Testovány byly monoklonální protilátky proti A β , žádné z vyvíjených léčiv však nepřineslo zlepšení kognitivních funkcí, a to ani při užití ve velmi raném stádiu AD bez klinických projevů. Další z cest výzkumu je cílení na β -sekretázu a vývoj jejích inhibitorů. Studie z roku 2014 prokázala, že kombinace monoklonálních protilátek a inhibitorů β -sekretázy značně redukuje hromadění A β (Weller a Budson, 2018).

Neúspěch při vývoji konkrétních účinných léčiv vede k hypotéze, že primárním projevem AD sice jsou shluky abnormálních proteinů, ale k progresi onemocnění vede celková dysfunkce komunikace mezi neurony. Nedávné studie na myších prokázaly redukcí shluků A β a zlepšení kognitivních funkcí po expozici gama vlněním (vysokofrekvenční vlnění spojované s komunikací mezi neurony). Nyní je studie v počáteční fázi testování na lidech (Weller a Budson, 2018).

2.5

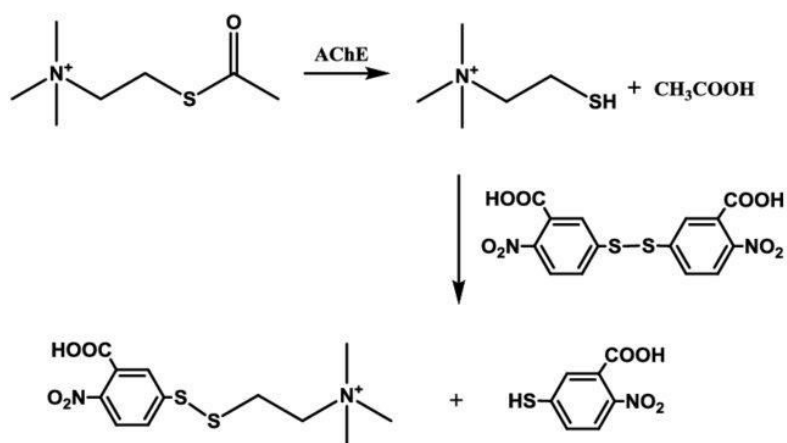
Metody stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz

Stanovení aktivity cholinesteráz a inhibičního účinku je důležité pro neurobiologii, farmakologii a toxikologii, ale také například pro potravinářství, zemědělství, monitoring životního prostředí a mnoho dalších odvětví. Existuje velké množství metod, přičemž každá je vhodná pro jinou aplikaci a je třeba vždy zvážit faktory jako je původ a čistota enzymu, volba substrátu, pufru, pH nebo metody imobilizace. Oba enzymy – ACHE a BCHE – mají různou substrátovou specifitu. ACHE nejúčinněji hydrolyzuje acetylcholin, ale štěpí také acetylthiocholin, propionylcholin či acetyl- β -methylcholin. BCHE hydrolyzuje butyrylcholin, a také butyrylthiocholin, propionylcholin, acetylcholin, benzoylcholin, sukcinylcholin, mivakurium a esterová anestetika. Pro stanovení inhibiční účinnosti se nejčastěji používají CHEs izolované z paúhoře elektrického (*Electrophorus electricus*) či octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Podstata stanovení spočívá

v kvantifikaci vznikajícího produktu nebo nezreagovaného substrátu, a to především pomocí spektrálních nebo elektrochemických metod. Trend miniaturizace vede také k výrobě biosenzorů a čipů (Miao et al., 2010).

2.5.1 Spektrometrické metody

Nejpoužívanější spektrální metodou je pravděpodobně Ellmanova metoda. Jedná se o spektrofotometrické stanovení CHEs, které v roce 1961 představil George L. Ellman. Metoda spočívá v reakci acetylthiocholinu s ACHE, kdy vzniklý thiocholin spontánně reaguje s tzv. Ellmanovým činidlem (kyselina 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoová)) za vzniku konjugátu thiocholinu s kyselinou 5-thio-2-nitrobenzoovou a volné kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové. Mechanismus reakce je znázorněn na obrázku 10. Volná kyselina, resp. její disociovaná forma, je žlutá. Intenzita zabarvení je měřena při vlnové délce 412 nm a odpovídá aktivitě enzymu. Výhodou této metody je její jednoduchost, přesnost, možnost automatizace a relativně nízká cena, nevýhodou jsou pak možné interference látek obsahujících sulfanylovou či oximovou funkční skupinu či interference hemoglobinu při dané vlnové délce (Miao et al., 2010; Komersová et al., 2005; Šinko et al., 2007).



Obrázek 10 Schéma mechanismu Ellmanovy metody (Pohanka, 2011b)

Existují také alternativní metody, které využívají jiných činidel (DTNA – 6,6'-dithionikotinová kyselina, 2-PDS – 2,2'-dithiodipyrudin, ad.) pro vznik barevného produktu nebo je využito chromogenních esterů, kterým je například indoxylacetát. Ten po štěpení CHE podléhá spontánní oxidaci za přeměny v modré indigo (Pohanka, 2013b). Zajímavé jsou nové metody s použitím kovových polovodivých nanočástic, kdy po hydrolýze ATCH vzniklý thiocholin svými redukujícími účinky stimuluje katalytické zvětšení zlatých nanočástic v přítomnosti aniontu kyseliny chlorozlatité (AuCl_4^-), což je spojeno se změnou absorpance (Miao et al., 2010).

Využívá se také fluorometrických metod. Jako substrát se používá nefluorescenční látka (např. rusorufin, indoxylacetát), která je hydrolýzou CHE přeměněna ve vysoce fluorescenční produkt, jehož emise je zachycena detektorem. Na základě fluorescence fungují také kvantové tečky. Jedná se o polovodivé nanokrystaly, jejichž elektrony jsou po excitaci elektromagnetickým zářením schopny přejít na energeticky vyšší hladinu a tuto energii po chvíli uvolnit ve formě elektromagnetického záření o delší vlnové délce. Využití mají hlavně pro stanovení ultra malých množství OP (Hlaváček a Skládal, 2011; Miao et al., 2010).

2.5.2 Elektrochemické metody

Elektrochemické metody jsou jednoduché, nenáročné na přípravu vzorku, vysoce citlivé a finančně méně náročné.

Základem elektrochemických metod je fakt, že při hydrolýze acetyl(thio)cholinu či butyryl(thio)cholinu vzniká kyselina, která snižuje pH roztoku. Tato změna lze sledovat přímo pomocí indikačního činidla, nebo je možné provést acidobazickou titraci s kolorimetrickým nebo potenciometrickým vyhodnocením (Pohanka, 2013b).

Oblíbenou technikou je pH-stat. Je založen na Michelově metodě publikované v polovině 20. století, kdy se ACH nechá hodinu volně hydrolyzovat ACHE a enzymatická aktivita se pak posuzuje jako změna pH za hodinu. Metoda byla oblíbená pro stanovení ACHE v krvi, ale není tak citlivá a přesná jako metody titrační. U pH-statu je vznikající kyselina kontinuálně titrována standardním alkalickým roztokem a konstantní pH je monitorováno potenciometrem. Je zaznamenávána závislost spotřeby titračního roztoku na čase, která je pak převedena na závislost koncentrace kyseliny na čase. Ta může být následně upravena do podoby kinetického modelu (Komersová et al., 2005; Miao et al., 2010).

Další typ elektrochemických metod je založený na oxidaci vzniklého thiocholinu pomocí napětí. Napětí může být aplikováno konstantně, pak se jedná o amperometrii, nebo pulsně, potom jde o voltometrii. Zástupcem voltametrické techniky je square wave voltametrie. Při ní dochází k oxidaci thiocholinu na pracovní platinové elektrodě při aplikovaném napětí 0–1 V. Jako referentní slouží argentchloridová elektroda. Měří se proudová odezva na změnu napětí, která je poté zpracována elektrochemickým převodníkem a signál je zaznamenán potenciostatem. Amperometrické stanovení je založeno na oxidaci cholinu pomocí cholinoxidázy za vzniku betainu a peroxidu vodíku, který může být amperometricky detegován. Obě dvě metody se hodí a využívají pro tvorbu biosenzorů (Miao et al., 2010).

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo ověření inhibičního účinku vybraných sulfonamidů na aktivitu ACHE a BCHE. Pro stanovení bylo použito celkem devět sulfonamidů, které byly porovnány se třemi standardními sloučeninami – galantaminem, takrinem a rivastigminem. Prostřednictvím Ellmanovy metody byly určeny hodnoty IC_{50} , tj. koncentrace inhibitoru, která způsobí 50% pokles aktivity enzymu, dále byly vypočteny hodnoty kinetických parametrů V_{max} , K_m . Cílem práce bylo také určit typ inhibice u vybraných inhibitorů, stanovit hodnotu rozdělovacího koeficientu v soustavě *n*-oktanol:voda a vypočítat topologické polární povrchy molekul *tPSA*.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Přístrojové vybavení a pomůcky

- 4.1
 - UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Německo)
 - software – UV/VIS ChemStation
 - kyvety plastové – měrná tloušťka 1 cm
 - jednokanálové pipety (Eppendorf, Německo; Sartorius Stedim Biotech, Německo)
 - centrifuga MPW-340 (Polsko)
 - třepačka Heidolph Multi Reax
 - kádinky, odměrné baňky
 - centrifuga 5804/ 5804 R (Eppendorf, Německo)
 - zkumavky s EDTA

Použité látky, roztoky a chemikálie

- 4.2
 - acetylthiocholin jodid (ATCh) (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
– 0,1M (rozpuštěn v PBS 0,1M, pH 7,4)
 - acetylcholinesteráza (ACHE) (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
– z paúhoře elektrického, rozpuštěna v 0,1M fosfátovém pufru (PBS, pH 7,4)
 - butyrylcholinesteráza (BCHE) (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
– koňské sérum, rozpuštěna v 0,1M fosfátovém pufru (PBS, pH 7,4)
– lidská plazma
 - Ellmanovo činidlo – kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová (DTNB) (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
 - $5 \cdot 10^{-4}$ M vodný roztok
 - fosfátový pufr (PBS)
 - 0,1M, pH 7,4
 - připraven z 4 g NaCl, 0,1 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,45 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,1 g KCl v 500 ml redestilované H_2O (reagencie od Penta, ČR)
 - dimethylsulfoxid (DSMO, Penta, ČR)

- *n*-oktanol (Sigma-Aldrich Praha, ČR)
- deionizovaná voda
- standardní inhibitory – galantamin, rivastigmin, takrin
 - zásobní roztok 0,02M, v případě potřeby ředěn destilovanou vodou
- sulfonamidy (viz tabulka 1)
 - zásobní roztok 0,01M (sulfonamidy rozpuštěny v DMSO), v případě potřeby ředěn destilovanou vodou

Tabulka 1 *Přehled vybraných inhibitorů*

Označení pro DP	R ₁	R ₂	R ₃	Obecná struktura
1	H	H	H	
2	H	CH ₃	H	
3	H	CH ₃	NO ₂	
4	H	CH ₃	F	
5	H	H	F	
6	F	H	F	
7	H	CH ₃	Cl	
8	H	H	Cl	
9	Cl	H	Cl	

4.3

Odběr krve pro stanovení s použitím lidské plazmy

Krev byla odebrána zdravým dárčům do odběrových zkumavek s obsahem EDTA. V centrifuze Eppendorf 5804/5804 R byla oddělena plazma od krevních buněk. Centrifugace byla prováděna při 3 000 otáčkách/minutu po dobu 15 min při 4 °C. Následně byla plazma odpipetována do plastových mikrozkušek a uchovávána v mrazáku při -80 °C. Blanka (tzv. „*buffy coat*“) nad vrstvou erytrocytů byla odstraněna do odpadu.

K erytrocytům byla přidána redestilovaná voda (v poměru 1:3). Takto naředěné erytrocyty byly znovu centrifugovány při 3 000 otáčkách/minutu po dobu 20 min při 4 °C. Poté byly naředěné erytrocyty rozpipetovány do plastových mikrozkušavek a uchovávány v mrazáku při -80 °C.

Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz

4.4 Při zkoumání enzymu nás v rámci biochemických dějů spíše zajímá jeho aktivita, než samotná koncentrace. Aktivita enzymu je definována jako rychlost, kterou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt v daném časovém intervalu. Pokud je vhodně zvolena koncentrace substrátu a metoda stanovení rychlosti přeměny, jde o citlivou, specifickou a přesnou metodu.

Pracovní postup

Stanovení aktivity enzymů bylo prováděno za použití Ellmanovy metody (viz kapitola 2.5.1). Jako první byla určena absorbance srovnávacího roztoku pro odečtení barevného pozadí. Srovnávací roztok byl pipetován do plastové kyvety s optickou dráhou 1 cm a objemem 3,5 ml a byl tvořen:

- 1,192 ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,8 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- 8 μ l ATCH (0,1M).

Pro samotné měření aktivity enzymu bylo do kyvety napipetováno:

- 1,184 ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,8 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- 8 μ l ATCH (0,1M),
- 8 μ l ACHE/BCHE.

Reakce byla odstartována přidáním enzymu. Celkový reakční objem směsi byl vždy 2 ml. Během reakce byla spektrofotometrem s diodovým polem měřena absorbance při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s. Závislost absorbance A na čase t byla poté vynesena do bodového grafu, body byly proloženy regresní přímkou a z rovnice přímky byla vypočtena hodnota y , a to tak, že za x byla dosazena hodnota 60 ($t = 60$ s vyplývá z definice jednotky enzymové aktivity). Získaná hodnota y byla následně vynásobena přepočítávacím faktorem 17,67, ve kterém je zahrnut

molární absorpční koeficient ($14\ 150\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), optická dráha kyvety (1 cm), celkový objem reakční směsi (2 ml) a objem přidaného enzymu (8 μl). Takto byla vypočtena aktivita enzymu. Měření bylo provedeno vždy 5x a výsledné hodnoty zprůměrovány. Od průměrné hodnoty aktivity enzymu se pak odvíjelo množství enzymu v reakční směsi pro další stanovení tak, aby byla aktivita enzymu ve výsledné reakční směsi 0,2 U. Odlišná situace byla v případě BCHE, kdy koncentrace BCHE v lidské plazmě byla velmi nízká a do reakční směsi bylo přidáváno fixně 200 μl .

Stanovení IC_{50} testovaných sulfonamidů a standardů

4.5 Pro hodnocení inhibičního účinku sulfonamidů bylo využito hodnoty IC_{50} , která udává koncentraci inhibitoru, při které dojde k poklesu aktivity enzymu na polovinu. Čím menší tato hodnota je, tím je inhibitor účinnější. Pro stanovení hodnoty IC_{50} lze použít závislost mezi poměrem rychlostí neinhibované a inhibované reakce a koncentrací inhibitoru.

Pracovní postup

Ke stanovení byla využita Ellmanova spektrofotometrická metoda. Nejprve byl připraven srovnávací roztok pro odečtení pozadí smísením:

- 1,520 ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5\cdot 10^{-4}\text{M}$)
- 80 μl ATCH (0,001M)

V dalším kroku bylo provedeno měření neinhibované katalytické reakce, kdy reakční směs tvořilo:

- x ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5\cdot 10^{-4}\text{M}$),
- 80 μl ATCH (0,001M),
- y μl ACHE/BCHE.

Množství enzymu y bylo vypočteno vždy před samotným měřením, a to podle aktuální aktivity daného enzymu tak, aby v celkovém objemu reakční směsi byla enzymatická aktivita 0,2 U a množství pufru x bylo dopočteno jako zbývající objem do 2 ml. Pro stanovení s BCHE z lidské plazmy byla hodnota y 200 μl . Reakce byla

odstartována přidáním enzymu a absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s. Měření bylo provedeno vždy 3x. Ze změny absorbance v čase byla vypočtena rychlost neinhibované reakce podle následujícího vztahu:

$$v_0 = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Následovalo měření reakce inhibované. Reakční směs tvořilo:

- x ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- 80 μ l ATCH (0,001M),
- y μ l ACHE/BCHE,
- z μ l inhibitoru (0,001M).

Pro stanovení inhibičního účinku bylo zvoleno 5 koncentrací inhibitoru tak, aby celková koncentrace inhibitoru v reakční směsi byla v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ M až $3,5 \cdot 10^{-5}$ M (objem ve vzorku byl 10, 20, 30, 50 a 70 μ l), množství enzymu y bylo odvozeno od stanovené enzymatické aktivity (v případě stanovení s BCHE z lidské plazmy bylo použito 200 μ l) a množství pufru x bylo dopočteno do celkového objemu 2 ml. Opět bylo provedeno měření absorbance při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s (reakce zahájena přidáním enzymu) a pro každou koncentraci inhibitoru bylo prováděno alespoň 2x. Ze změny absorbance v čase byla vypočtena rychlost reakce inhibované, a to ze vztahu:

$$v_i = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Poté byly vypočteny poměry v_0/v_i a byl vytvořen graf závislosti poměru rychlostí a molárních koncentrací inhibitoru [I] s úsekem rovným 1 ($[I]; v_0/v_i = 0;1$), body byly proloženy regresní přímkou a z rovnice přímky byla vypočtena molární koncentrace inhibitoru, potřebná pro 50% inhibici enzymu, a to dosazením hodnoty 2 za y (podle definice IC_{50}). Výpočet byl proveden pro obě opakování a hodnoty byly zprůměrovány.

Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice

Jeden z nejpoužívanějších modelů kinetiky enzymů je model Michaelis-Mentenové. Jedná se o matematické vyjádření vztahu mezi počáteční rychlostí reakce a koncentrací substrátu. Rovnice popisující tento vztah vypadá takto:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Michaelisova konstanta K_m vyjadřuje míru afinity enzymu k substrátu a je rovna koncentraci substrátu, která je při dané koncentraci enzymu nutná k dosažení poloviny mezní rychlosti V_{max} . Hodnota K_m se udává v jednotkách molární koncentrace a obvykle se pohybuje v rozmezí 10^{-1} – 10^{-6} M. Rychlost V_{max} je mezní rychlostí reakce, kdy je enzym zcela nasycen substrátem, a tudíž už nemůže vznikat další komplex enzym-substrát.

Jelikož je určení K_m a V_{max} kvůli hyperbolickému průběhu křivky náročné, volí se postup linearizace dat. Nejčastěji používaným způsobem je pak transformace dat podle Lineweavera a Burka, kdy převrácením hodnot rychlosti reakce v a koncentrace substrátu S získáme lineární závislost:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Tato rovnice reprezentuje přímku, kterou v praxi získáme, pokud naměřené hodnoty vyneseme do grafu jako závislost $1/v$ na $1/[S]$ a proložíme je regresní přímkou. Tato přímka pak protíná osu y v bodě $1/V_{max}$, osu x v bodě $-1/K_m$ a její směrnice odpovídá K_m/V_{max} a můžeme z ní kinetické parametry jednoduše vypočítat (Murray, 2012).

Ze získaných kinetických parametrů a charakteru Lineweaver-Burkova grafu můžeme určit typ inhibice, a to porovnáním hodnot K_m a V_{max} neinhibované a inhibované reakce.

Inhibiční konstanta K_i vyjadřuje koncentraci inhibitoru, při které dochází k 50% inhibici enzymu, na rozdíl od IC_{50} však neposkytuje informace o samotné účinnosti inhibitoru, ale dává nám představu o afinitě inhibitoru k enzymu. Hodnota K_i udává koncentraci inhibitoru, při které je 50 % enzymu přítomného v reakční směsi vázáno

v komplexu enzym-inhibitor a čím je hodnota nižší, tím je afinita inhibitoru k danému enzymu vyšší. Hodnotu K_i můžeme získat sestavením závislosti převrácené rychlosti reakce $1/v$ na hodnotě koncentrace inhibitoru $[I]$ za použití alespoň dvou koncentrací substrátu (tzv. Dixonův výnos). Závislost vynesena do bodového grafu a proložená regresními přímkami již polohou průsečíku přímek vypovídá o typu inhibice, ze souřadnic průsečíku pak můžeme odečíst hodnotu K_i . Pro kompetitivní inhibice platí, že průsečík má souřadnice $(-K_i; 1/V_{max})$, pro nekompetitivní jsou souřadnice $(-K_i; 0)$, pro akompetitivní inhibici se hodnota K_i nedá určit, jelikož jsou přímky rovnoběžné a tudíž se neprotínají a u inhibice smíšené jsou výpočty pro získání K_i velmi komplikované.

Pracovní postup

Pro stanovení typu inhibice bylo využito Ellmanovy metody. Průběh měření byl v podstatě stejný jako u stanovení IC_{50} s tím rozdílem, že kromě změny koncentrací inhibitoru docházelo také ke změnám koncentrace substrátu. Nejprve byl připraven srovnávací roztok pro odečtení pozadí smícháním:

- x ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- y μ l ATCH (0,001M),

kdy množství substrátu ATCH y bylo 40, 80, 120 či 160 μ l. S tím se měnilo množství pufru x tak, aby celkový objem reakční směsi byl 2 ml.

V dalším kroku probíhalo měření neinhibované reakce ve směsi:

- x ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- y μ l ATCH (0,001M),
- z μ l ACHE/BCHE,

přičemž množství substrátu ATCH y bylo pro jednotlivá měření 40, 80, 120 či 160 μ l, množství enzymu z vyplývalo z dříve určené aktuální aktivity enzymu (u stanovení z lidské plazmy použito opět fixních 200 μ l) a množství pufru x bylo dopočteno do celkového objemu 2 ml. Přidáním enzymu byla spuštěna reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s a měření byla provedena vždy 3x.

Jako další byla měřena reakce inhibovaná. Reakční směs byla tvořena:

- x ml PBS (0,1M, pH 7,4),
- 0,4 ml DTNB ($5 \cdot 10^{-4}$ M),
- y μ l ATCH (0,001M),
- z μ l ACHE/BCHE,
- w μ l inhibitoru.

Množství substrátu y bylo opět 40, 80, 120 nebo 160 μ l, množství enzymu z záviselo na aktivitě enzymu (u stanovení z lidské plazmy fixně 200 μ l), množství inhibitoru w bylo voleno typicky 20, 30, 50 a 70 μ l tak, aby jeho koncentrace v reakční směsi byla v rozmezí $5 \cdot 10^{-6}$ M až $2,5 \cdot 10^{-5}$ M a množství pufru x bylo dopočteno do celkového objemu 2 ml. Přidáním enzymu byla spuštěna reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm po dobu 70 s a měření bylo provedeno vždy 2x.

Pro vyhodnocení byly nejprve vypočteny rychlosti jednotlivých reakcí, inhibovaných i neinhibovaných. Z převrácených hodnot rychlostí a převrácených hodnot koncentrací substrátu byla sestrojena závislost $1/v$ na $1/[S]$, která byla vynesena do grafu. Body byly proloženy regresní přímkou a z rovnice přímky a vztahu linearizované rovnice Michaelis-Mentenové byly vypočteny kinetické parametry K_m a V_{max} . Nakonec byly hodnoty neinhibovaných a inhibovaných reakcí porovnány a byl stanoven typ inhibice.

4.7

Stanovení rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě n -oktanol:voda

Rozdělovací koeficient je definován jako podíl koncentrací rozpuštěné látky v systému dvou rozpouštědel – v nepolární organické fázi n -oktanolu a v polární vodné fázi, a může posloužit k odhadu lipofility látky. Výsledná hodnota je bezrozměrná a často bývá vyjádřena pomocí logaritmického tvaru $\log P$. Hodnota nezávisí pouze na charakteru látky, ale také na teplotě, pH a iontové síle. Protože jsou inhibitory používány jako léčiva, tak nás právě tato hodnota zajímá, jelikož čím je větší hodnota $\log P$, tím více je látka lipofilní a lepší rozpustností léčiva v tucích se zlepšuje i jeho prostupnost přes biologické membrány. Problematika rozpustnosti léčiv je ovšem komplikovanější. Je třeba, aby byla látka lipofilní kvůli průchodu skrz membrány, ale zároveň její transport do místa účinku je zprostředkován krví, takže musí být zachována i rozpustnost ve vodě, avšak příliš vysoká rozpustnost ve vodě vede ke krátkodobější účinnosti léčiva. Touto problematikou se zabýval Christopher

Lipinski, který se svými kolegy zanalyzoval stovky léčiv a došel k závěru, že látka bude pravděpodobně schopna vyhovět oběma požadavkům na rozpustnost a zachovat si biologickou účinnost, pokud vyhoví následujícím parametrům: molekulová hmotnost je ≤ 500 , $\log P \leq 5$, počet skupin v molekule schopných předat atom vodíku do vazby (obvykle součet hydroxylových a aminových skupin) je ≤ 5 a počet skupin schopných přijímat vodíkové atomy za tvorby vodíkových vazeb (obvykle součet atomů kyslíku a dusíku) je ≤ 10 . Tento soubor pravidel je označován jako tzv. Lipinského pravidlo pěti, v cizojazyčných zdrojích je pak používána zkratka RO5 (z angl. *rule of five*) (Lipinski, 2004).

Pracovní postup

Nejdříve bylo k 1,5 ml *n*-oktanolu přidáno 10 μ l roztoku inhibitoru o koncentraci 0,01M a směs byla 15 minut intenzivně protřepávána. Poté byl odpipetován 1 ml této směsi do křemenné kyvety a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor (srovnávací roztok byl *n*-oktanol). Tímto způsobem byla získána hodnota absorbance, která odpovídala 100 % inhibitoru v *n*-oktanolu.

Následovala příprava směsi *n*-oktanolu a demineralizované vody v poměru 1:1 (celkový objem 3 ml) s přídávkem 10 μ l roztoku inhibitoru o koncentraci 0,01M. Směs byla opět intenzivně protřepávána po dobu 15 minut a poté byla centrifugována při 3 000 otáčkách/minutu po dobu 10 minut. Poté byl do kyvety odpipetován 1 ml oktanolové vrstvy a byla změřena absorbance při vlnové délce absorpčního maxima pro daný inhibitor. Jako srovnávací roztok byl použit *n*-oktanol. Takto byl stanoven procentuální obsah inhibitoru v oktanolové vrstvě a dopočtem do 100 % byl určen obsah inhibitoru ve vrstvě vodné. Nakonec byly vypočteny rozdělovací koeficienty jednotlivých inhibitorů v soustavě podle vztahu:

$$P = \frac{(\%)_o}{100 - (\%)_o} = \frac{c_o}{c_w}$$

kde c_o je koncentrace inhibitoru v *n*-oktanolu a c_w je koncentrace daného inhibitoru v demineralizované vodě.

Stanovení polárního povrchu molekuly

Dalším důležitým parametrem, který se týká výzkumu léčiv, je polární povrch molekuly (*PSA*). *PSA* je definován jako součet povrchů polárních atomů v molekule (primárně atomy dusíku a kyslíku a na ně vázané vodíky) a jednotkou je Å² (1 Å = 10⁻¹⁰ m). Jedná se o další z faktorů důležitý pro lékařskou chemii a farmakologii, jelikož hodnota *PSA* vypovídá o pravděpodobnosti prostupu látky buňkami a hematoencefalickou bariérou a aby toho dosáhla, měla by hodnota *PSA* být méně než 60–70 Å² (Lipinski, 2004)

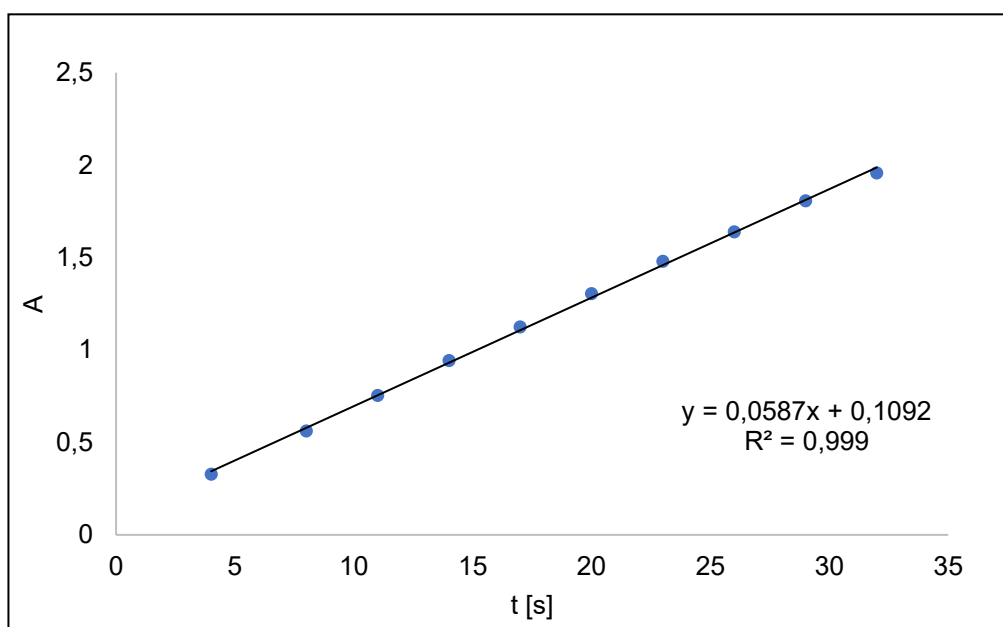
Jelikož je výpočet *PSA* závislý na vytvoření relativně přesné 3D struktury, a kvůli tomu je časově náročný, přistoupilo se k tzv. topologickému polárnímu povrchu molekuly (*tPSA*), který se dá odhadnout ze strukturního vzorce molekuly.

Hodnoty *tPSA* pro jednotlivé inhibitory byly stanoveny analýzou struktury molekul pomocí počítačového programu ChemDraw.

5 VÝSLEDKY

Stanovení enzymové aktivity cholinesteráz

5.1 Stanovení aktivity probíhalo podle postupu uvedeného v kapitole 4.4 pomocí Ellmanovy spektrofotometrické metody. Bylo připraveno a proměřeno vždy alespoň pět vzorků. Naměřené hodnoty byly vyneseny do grafu a byly proloženy regresní přímkou (viz graf 1). Ta graficky znázorňuje závislost absorbance A na čase t a z rovnice spojnice trendu bylo vypočtena hodnota y a vynásobením přepočítávacím faktorem byla získána hodnota aktivity enzymu. Hodnoty aktivity jednotlivých měření byly zprůměrovány a tato průměrná hodnota byla považována za aktuální aktivitu daného enzymu.



Graf 1 Závislost změny absorbance A na čase t pro stanovení aktivity enzymu

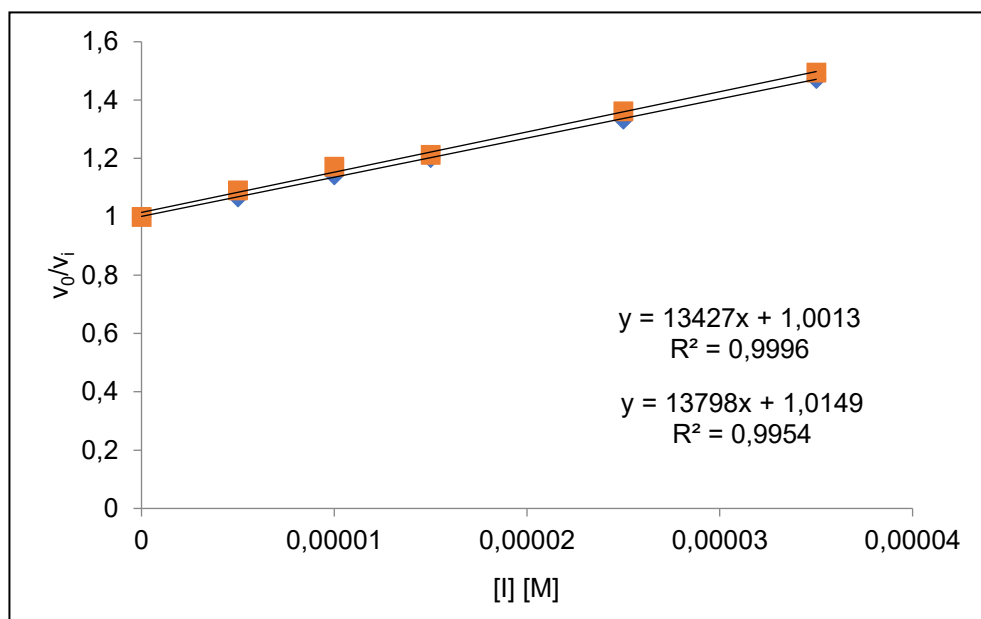
Se stejným postupem se měření provádělo pro ACHE a pro BCHE z koňského séra. Stanovení aktivity enzymu předcházelo každému měření, jelikož výsledná aktuální aktivita enzymu sloužila k výpočtu množství potřebného enzymu do směsi pro určení inhibičního účinku inhibitorů a kinetických parametrů. Množství enzymu bylo do reakční směsi přidáno tolik, aby výsledná aktivita ve směsi byla 0,2 U. Aktivita BCHE v lidské plazmě byla řádově nižší a pro stanovení s BCHE z lidské plazmy byl do reakční směsi přidáván objem 200 μ l. Tento objem byl zvolen s přihlédnutím k tomu, aby byla dostatečná odezva při měření absorbance.

Stanovení IC_{50} testovaných sulfonamidů

Stanovení inhibiční koncentrace vybraných sulfonamidů a standardů probíhalo pomocí Ellmanovy metody podle postupu popsaného v kapitole 4.5.

5.2 Nejprve byla měřena změna absorbance v čase neinhibované reakce, a to alespoň 3x. Z naměřených hodnot byla ze vztahu $v = \Delta A / \Delta t$ byla vypočtena rychlost reakce. Hodnoty rychlostí tří reakcí byly zprůměrovány a dál se pracovalo pouze s tímto průměrem.

Poté byla měřena závislost změny absorbance A na čase t reakce inhibované s přídávkem 10, 20, 30, 50 a 70 μl inhibitoru (typicky 0,001M; pro inhibici BCHE koncentrace řádově nižší) a to vždy v duplikátu a z naměřených hodnot byly pomocí výše zmíněného vzorce vypočteny rychlosti reakcí. Byly vypočteny poměry v_0/v_i a následně byl vytvořen graf závislosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru v reakční směsi $[I]$ pro obě měření. Výsledkem byly dvě přímky znázorňující rostoucí hodnotu poměru rychlostí se zvyšujícím se přídávkem inhibitoru (viz graf 2). ;



Graf 2 Závislost poměru rychlostí neinhibované a inhibované rychlosti v_0/v_i na koncentraci inhibitoru č. 2 $[I]$

Do rovnice přímky byla za y dosazena hodnota 2 (z definice IC_{50}) a vypočteno x odpovídající koncentraci inhibitoru ve směsi, která je třeba pro 50% snížení aktivity enzymu.

Postup byl stejný pro všechny testované inhibitory i pro rozdílné enzymy, tj. ACHE, BCHE z koňského séra a BCHE z lidské plazmy. Ke změnám docházelo v případě nedostatečné nebo přílišné odezvy, a to zejména úpravou aplikovaného objemu inhibitoru během stanovení pro BCHE (změna koncentrace inhibitoru byla vždy zahrnuta v příslušných výpočtech). Při stanovení za použití BCHE z lidské plazmy bylo poupraveno aplikované množství enzymu na fixních 200 μ l. Výsledné hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce 2.

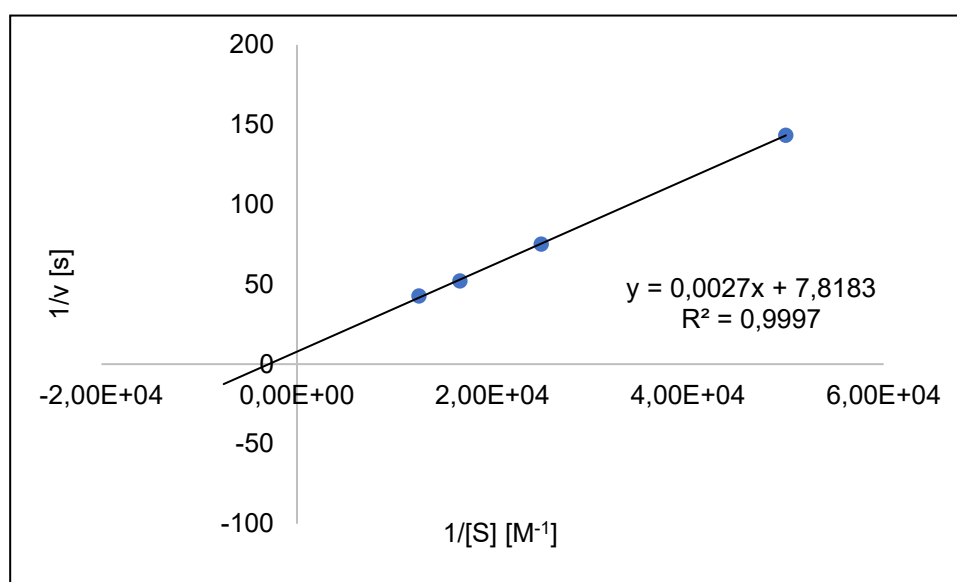
Tabulka 2 Výsledných hodnot IC_{50} pro vybrané inhibitory a standardní sloučeniny

Inhibitor č.	ACHE paúhoř elektrický [μ M]	BCHE koňské sérum [μ M]	BCHE lidská plazma [μ M]
1	50,75 \pm 2,08	1,62 \pm 0,01	18,64 \pm 0,13
2	72,89 \pm 1,49	4,54 \pm 0,07	36,15 \pm 0,16
3	24,92 \pm 0,88	15,32 \pm 0,50	53,15 \pm 0,19
4	23,06 \pm 0,09	7,43 \pm 0,01	54,44 \pm 2,25
5	27,66 \pm 0,47	6,96 \pm 0,14	37,07 \pm 1,06
6	56,17 \pm 2,97	14,04 \pm 0,31	60,87 \pm 0,84
7	20,32 \pm 0,32	5,31 \pm 0,09	66,84 \pm 4,28
8	139,30 \pm 6,80	7,26 \pm 0,04	89,04 \pm 1,20
9	69,92 \pm 0,52	3,05 \pm 0,01	56,38 \pm 0,27
rivastigmin	98,43 \pm 4,23	63,12 \pm 0,33	15,31 \pm 0,18
galantamin	1,58 \pm 0,05	3,19 \pm 0,06	0,95 \pm 0,01
5.3 takrin	0,03593 \pm 0,00021	0,0109 \pm 0,00012	0,005 \pm 0,0001

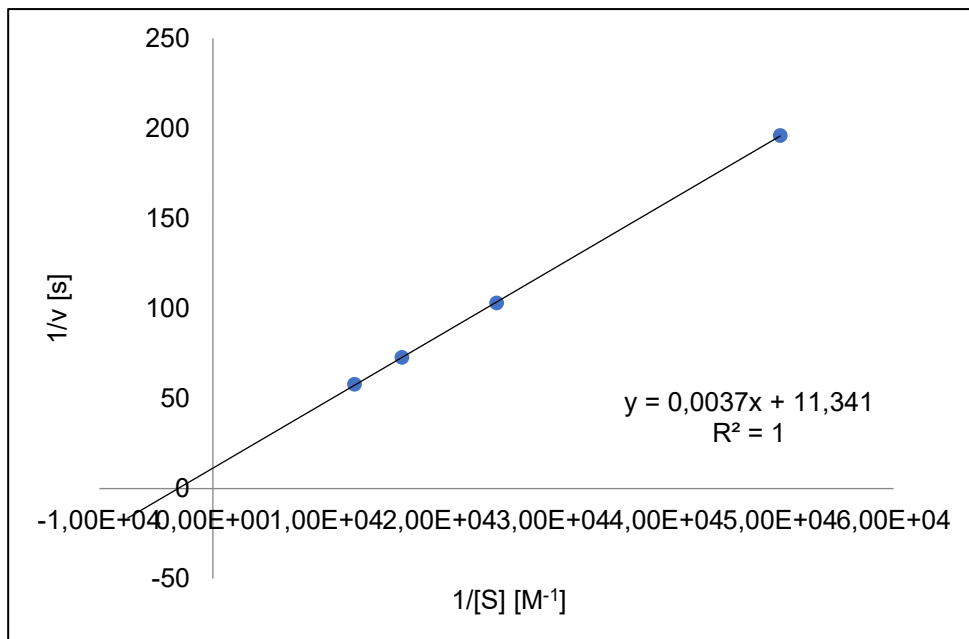
Stanovení kinetických parametrů, inhibiční konstanty a typu inhibice

Stanovení probíhalo pomocí Ellmanovy metody podle postupu popsaného v kapitole 4.6. Abychom získali hodnoty kinetických parametrů neinhibovaných reakcí byla měřena změna absorbance A v čase t ve vzorcích se čtyřmi vybranými koncentracemi substrátu – 40, 80, 120 a 160 μ l 0,001M ATCh, a to vždy 3x. Z hodnot byly podle vztahu $v = \Delta A / \Delta t$ vypočteny rychlosti dané reakce a ze tří měření byla vždy spočtena průměrná hodnota. Jelikož se výpočty kinetických parametrů

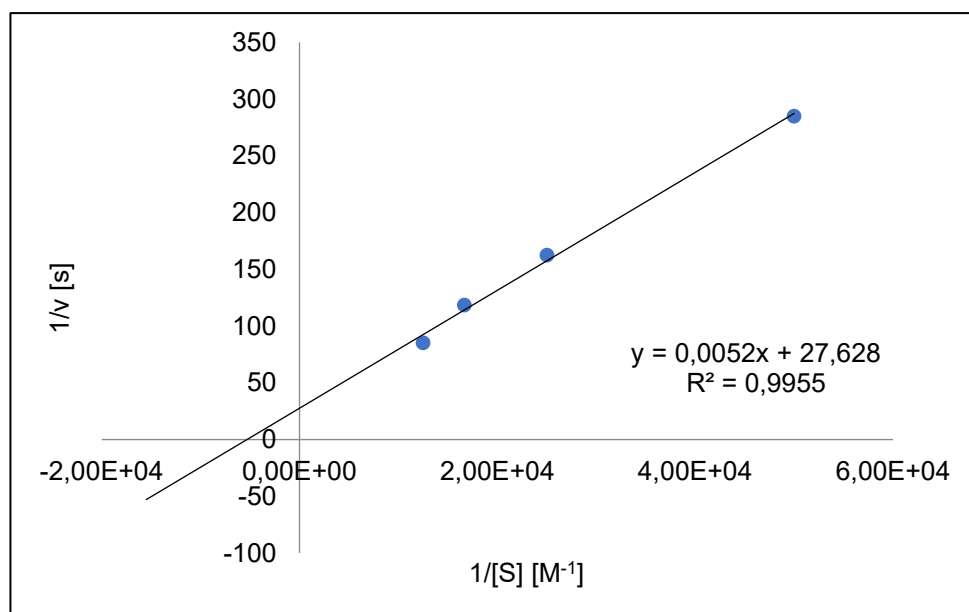
provádějí z linearizované rovnice Michaelise-Mentenové podle Lineweavera a Burka, je potřeba pracovat s převrácenými hodnotami všech dat. Do grafu tedy byla vynesena závislost převrácené hodnoty rychlosti reakce na převrácené hodnotě koncentrace substrátu. Stanovení kinetických parametrů neinhibované reakce bylo provedeno pro všechny použité enzymy, tj. ACHE, BCHE z koňského séra a BCHE z lidské plazmy. Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti $1/v$ na převrácené hodnotě koncentrace substrátu $1/[S]$ pro substrát ATCH za použití ACHE je zobrazena na grafu 3, za použití BCHE z koňského séra je zobrazena na grafu 4 a za použití BCHE z lidské plazmy je na grafu 5. Body byly proloženy regresní přímkou, jejíž rovnice odpovídá linearizované rovnici Michaelis-Mentenové podle Lineweavera a Burka a lze z ní dopočítat kinetické parametry K_m a V_{max} .



Graf 3 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce ACHE



Graf 4 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce BCHE z koňského séra



Graf 5 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ neinhibované reakce BCHE z lidské plazmy

Příklad výpočtu kinetických parametrů neinhibované reakce (viz graf 3):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$y = 0,0027x + 7,8183$$

$$\frac{1}{v} = 0,0027 \cdot \frac{1}{[S]} + 7,8183$$

$$\frac{1}{v_{\max}} = 7,8183$$

$$V_{\max} = \frac{1}{7,8183} = \underline{0,1279 \text{ s}^{-1}}$$

$$\frac{K_m}{v_{\max}} = 0,0027$$

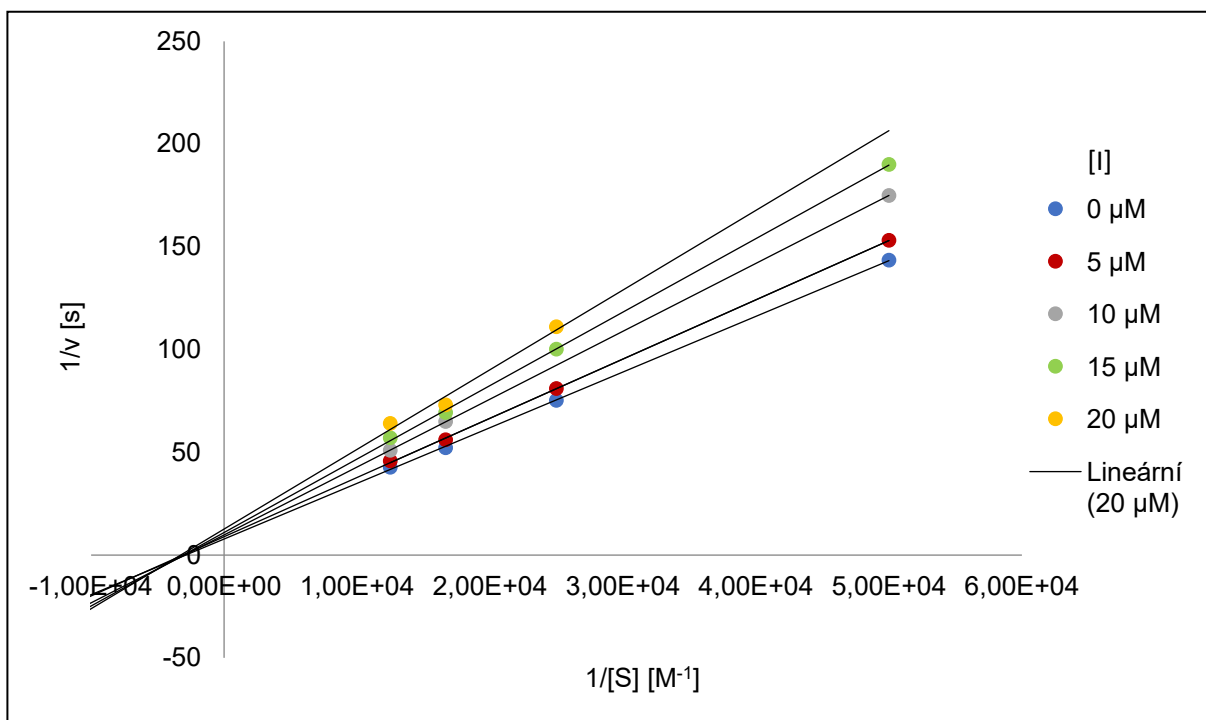
$$K_m = 0,0027 \cdot V_{\max} = \underline{3,45 \cdot 10^{-4} \text{ M}}$$

Výsledky vypočtených kinetických parametrů pro neinhibované reakce jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 Kinetické parametry neinhibovaných reakcí

	ACHE paúhoř elektrický	BCHE koňské sérum	BCHE lidská plazma
K_m [M]	3,45·10 ⁻⁴	3,26·10 ⁻⁴	1,88·10 ⁻⁴
V_{max} [s⁻¹]	1,28·10 ⁻¹	8,82·10 ⁻²	3,62·10 ⁻²

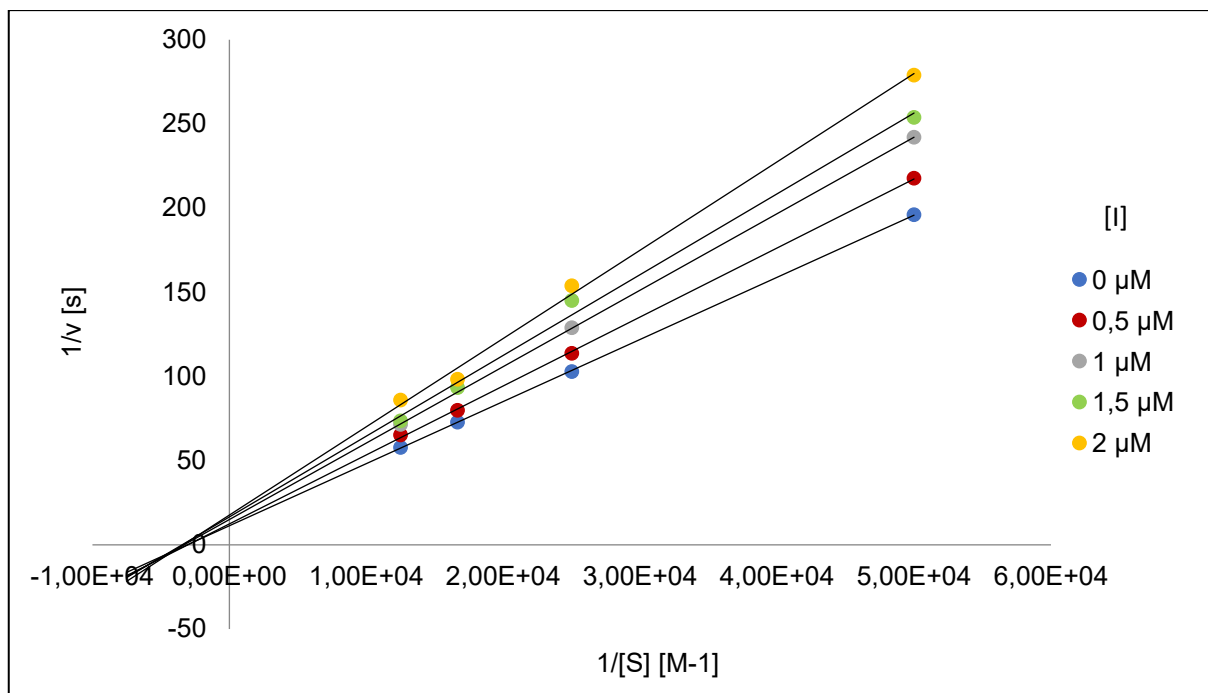
Pro stanovení kinetických parametrů inhibovaných reakcí a typu inhibice byl použit inhibitor č. 7. Do grafu byla vynesena závislost převrácené hodnoty rychlosti reakce $1/v$ na převrácené hodnotě koncentrace substrátu $1/[S]$ pro různé koncentrace inhibitoru $[I]$. Body byly proloženy regresní přímkou, z jejíž rovnice byly dopočteny kinetické parametry K_m a V_{\max} (viz výpočet parametrů neinhibované reakce). Závislost převrácené hodnoty reakční rychlosti $1/v$ na převrácené hodnotě koncentrace substrátu $1/[S]$ pro různé koncentrace inhibitoru za použití ACHE je zobrazena na grafu 6, za použití BCHE z koňského séra je zobrazena na grafu 7 a za použití BCHE z lidské plazmy je na grafu 8. Kinetické parametry K_m a V_{\max} pro jednotlivé enzymy jsou pak v tabulkách 4–6. Byly vypočteny také poměry K_m/V_{\max} pro usnadnění určení typu inhibice.



Graf 6 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ inhibované reakce ACHE pro jednotlivé koncentrace inhibitoru č. 7

Tabulka 4 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro ACHE s inhibitorem č. 7

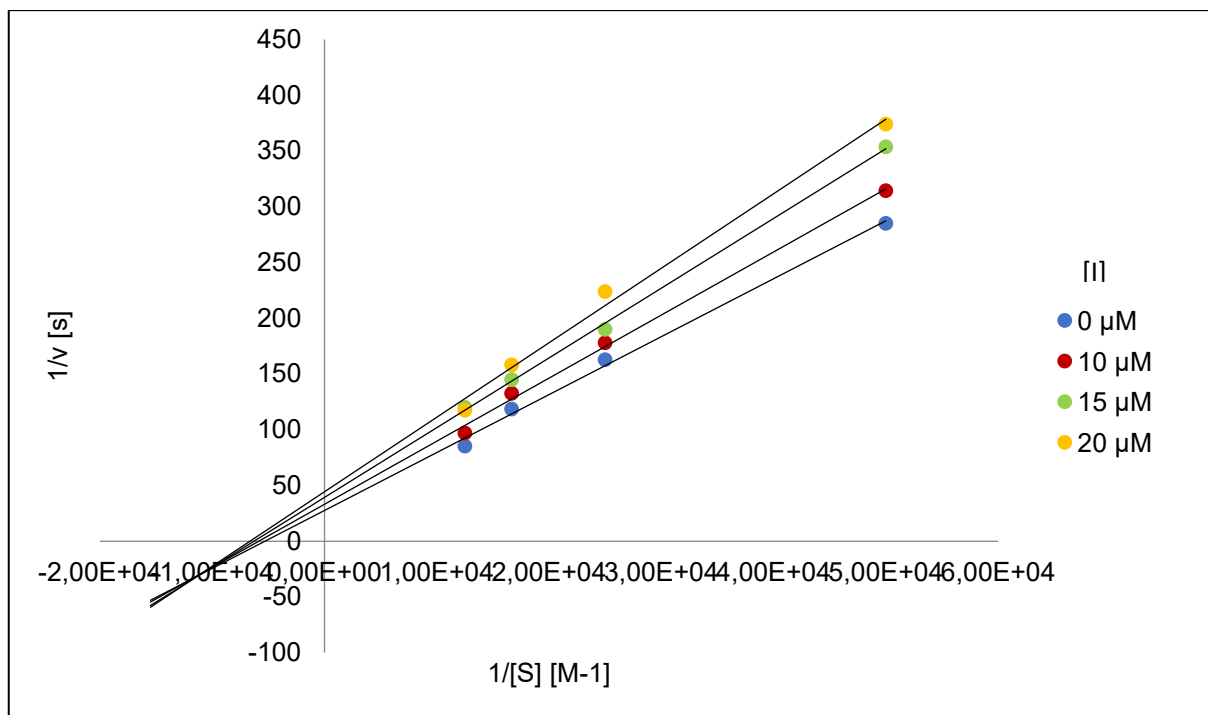
[I] [μM]	K_m [M]	V_{\max} [s^{-1}]	K_m/V_{\max}
0	$3,45 \cdot 10^{-4}$	$1,28 \cdot 10^{-1}$	$2,80 \cdot 10^{-3}$
5	$3,24 \cdot 10^{-4}$	$1,12 \cdot 10^{-1}$	$2,90 \cdot 10^{-3}$
10	$3,36 \cdot 10^{-4}$	$1,02 \cdot 10^{-1}$	$3,30 \cdot 10^{-3}$
15	$3,28 \cdot 10^{-4}$	$9,10 \cdot 10^{-2}$	$3,60 \cdot 10^{-3}$
20	$3,08 \cdot 10^{-4}$	$7,89 \cdot 10^{-2}$	$3,90 \cdot 10^{-3}$



Graf 6 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ inhibované reakce BCHE z koňského séra pro jednotlivé koncentrace inhibitoru č. 7

Tabulka 5 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro BCHE z koňského séra s inhibitorem č. 7

[I] [μM]	K_m [μM]	V_{\max} [s^{-1}]	K_m/V_{\max}
0	$3,26 \cdot 10^{-4}$	$8,82 \cdot 10^{-2}$	$2,80 \cdot 10^{-3}$
0,5	$3,29 \cdot 10^{-4}$	$8,04 \cdot 10^{-2}$	$4,10 \cdot 10^{-3}$
1	$2,99 \cdot 10^{-4}$	$6,65 \cdot 10^{-2}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$
1,5	$2,89 \cdot 10^{-4}$	$6,03 \cdot 10^{-2}$	$4,80 \cdot 10^{-3}$
2	$2,93 \cdot 10^{-4}$	$5,65 \cdot 10^{-2}$	$5,20 \cdot 10^{-3}$



Graf 7 Závislost převrácených hodnot reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci substrátu $1/[S]$ inhibované reakce BCHE z lidské plazmy pro jednotlivé koncentrace inhibitoru č. 7

Tabulka 6 Hodnoty kinetických parametrů inhibované reakce pro BCHE z lidské plazmy s inhibitorem č. 7

[I] [μM]	K_m [μM]	V_{\max} [s^{-1}]	K_m/V_{\max}
0	$1,88 \cdot 10^{-4}$	$3,62 \cdot 10^{-2}$	$2,80 \cdot 10^{-3}$
10	$1,72 \cdot 10^{-4}$	$3,01 \cdot 10^{-2}$	$5,70 \cdot 10^{-3}$
15	$1,60 \cdot 10^{-4}$	$2,54 \cdot 10^{-2}$	$6,30 \cdot 10^{-3}$
20	$1,51 \cdot 10^{-4}$	$2,25 \cdot 10^{-2}$	$6,70 \cdot 10^{-3}$

Stanovení rozdělovacího koeficientu testovaných inhibitorů v soustavě *n*-oktanol:voda

5.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu vybraných sulfonamidů a standardů mezi fázemi *n*-oktanol:voda probíhalo podle postupu v kapitole 4.7. Každé měření proběhlo v duplikátu a v následující tabulce jsou výsledky vypočítané z naměřených hodnot experimentu ve srovnání s hodnotami vypočtenými počítačovými programy Chemdraw a Chems sketch. Hodnoty vypočteného i experimentálně změřeného *logP* jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7 Hodnoty rozdělovacího koeficientu vybraných sulfonamidů a standardů

Inhibitor č.	<i>logP</i> experiment	<i>logP</i> chemsketch	<i>logP</i> chemdraw
1	4,62 ± 0,67	4,58	4,03
2	4,83 ± 0,69	5,04	4,53
3	5,03 ± 0,78	5,26	4,84
4	5,55 ± 0,69	5,46	4,98
5	4,49 ± 0,38	5,00	4,48
6	5,22 ± 0,74	5,46	4,73
7	6,10 ± 0,67	6,00	5,55
8	4,96 ± 0,33	5,54	5,05
9	6,16 ± 0,64	6,52	5,87
rivastigmin	1,21 ± 0,21	2,14	1,40
galantamin	1,43 ± 0,10	1,74	0,23
takrin	2,45 ± 0,25	3,32	1,80

Stanovení polárního povrchu molekuly

Hodnota tPSA závisí na prostorové konformaci molekuly a lze ji dopočítat pomocí strukturní analýzy. V tabulce 8 jsou uvedeny hodnoty tPSA pro testované sulfonamidy vypočítané pomocí programu Chemdraw.

5.5

Tabulka 8 Hodnoty tPSA pro vybrané sulfonamidy a standardy

Inhibitor č.	tPSA [Å ²] chemdraw
1	58,53
2	58,53
3	104,3
4	58,53
5	58,53
6	58,53
7	58,53
8	58,53
9	58,53
rivastigmin	32,78
galantamin	41,93
takrin	0*

* chybný výpočet; tabulkový údaj 38,9 Å² (PubChem)

6 DISKUZE

Účinnost inhibitorů se v praxi posuzuje podle hodnoty IC_{50} , což je hodnota, při které dochází ke snížení aktivity enzymu na polovinu. Z definice tudíž vyplývá, že čím je hodnota IC_{50} menší, tím je inhibitor účinnější. Inhibiční účinnost byla stanovována na třech enzymech – ACHE vyizolované z paúhoře elektrického, BCHE z koňského séra a BCHE z lidské plazmy. Pro ACHE se jako nejefektivnější jevil inhibitor č. 7 ((R)-3-chloro-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbenszensulfonamid) s hodnotou IC_{50} $20,32 \pm 0,32 \mu\text{M}$, což je zhruba 5x méně než stanovené IC_{50} standardního rivastigminu. I ostatní inhibitory, kromě inhibitoru č. 8 ((R)-3-chloro-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)benszensulfonamid), prokázaly ve srovnání s rivastigminem lepší inhibiční aktivitu. Ovšem oproti galantaminu a takrinu byly výsledky řádově horší.

Při stanovení inhibiční účinnosti na BCHE z koňského séra měly všechny testované inhibitory lepší inhibiční účinnost než rivastigmin. Účinnější než galantamin byly pouze dva inhibitory - č. 1 (S)-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)benszensulfonamid) a č. 9 ((R)-3,5-dichloro-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)benszensulfonamid). Inhibiční účinky takrinu pak byly řádově vyšší a to i oproti ostatním standardním sloučeninám. Nejlepším inhibitorem BCHE je podle výsledků inhibitor č. 1 s IC_{50} $1,62 \pm 0,01 \mu\text{M}$.

Konečně stanovení inhibiční účinnosti na BCHE z lidské plazmy nebylo tak úspěšné. Žádná z testovaných látek nepřevýšila inhibiční aktivitu standardů. Nejlepší výsledek měl inhibitor č. 1 s IC_{50} $18,64 \pm 0,13 \mu\text{M}$, který se alespoň přiblížil hodnotě IC_{50} rivastigminu.

Pro účely terapie AD je vhodné, aby inhibitor účinkoval na ACHE i BCHE a pokud bychom brali v potaz pouze hodnoty pro ACHE a BCHE z koňského séra, všechny testované sulfonamidy, kromě inhibitoru č. 8, projevíly lepší inhibiční účinky než má používané léčivo rivastigmin a inhibují oba enzymy. Mezi ty nejúčinnější patří:

- inhibitor č. 7 (IC_{50} pro ACHE $20,32 \pm 0,32 \mu\text{M}$, pro BCHE $5,31 \pm 0,09 \mu\text{M}$),
- inhibitor č. 4 (IC_{50} pro ACHE $23,06 \pm 0,09 \mu\text{M}$, pro BCHE $7,43 \pm 0,01 \mu\text{M}$),
- inhibitor č. 5 (IC_{50} pro ACHE $27,66 \pm 0,47 \mu\text{M}$, pro BCHE $6,96 \pm 0,14 \mu\text{M}$) a

- inhibitor č. 3 (IC_{50} pro ACHE $24,92 \pm 0,88 \mu\text{M}$, pro BCHE $15,32 \pm 0,50 \mu\text{M}$).

Pro srovnání hodnota IC_{50} rivastigminu je za daných reakčních podmínek pro ACHE $98,43 \pm 4,23 \mu\text{M}$ a pro BCHE $63,12 \pm 0,33 \mu\text{M}$.

Pokud bychom měli hodnotit účinky v terapii standardně používaných látek, nejúčinnějším je rozhodně takrin (ten se v současnosti kvůli hepatotoxickým účinkům nepoužívá, ale využívá se pro syntézu nových sloučenin s potenciálem pro vývoj účinných léčiv AD). Za ním následuje galantamin s hodnotami IC_{50} v jednotkách μM . Posledním je pak rivastigmin,

Jako další byly stanoveny kinetické parametry neinhibovaných a inhibovaných reakcí K_m a V_{max} , které se dále použily pro určení typu inhibice. Pro stanovení byl vybrán inhibitor č. 7 ((R)-3-chloro-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbensulfonamid). U inhibované reakce s enzymem ACHE si můžeme s přibývajícím koncentrací inhibitoru všimnout výrazně klesajících hodnot reakční rychlosti. Hodnota Michaelisovy konstanty také klesá, ale pouze mírně. Pokud by se jednalo o akompetitivní typ inhibice, hodnoty by klesaly ve stejném poměru, což se v tomto případě podle poměru K_m/V_{max} rozhodně neděje. Jedná se tedy o inhibici smíšeného typu. Tomu ostatně nasvědčuje i samotný graf průběhu reakcí, kde se jednotlivé regresní přímky protínají ve třetím kvadrantu⁴. U inhibice enzymu BCHE z koňského séra docházelo opět k poklesu reakční rychlosti i hodnoty Michaelisovy konstanty a poměr jejich snížení nebyl stejný, tudíž se také jedná o smíšený typ inhibice a napovídá tomu i graf. U inhibice enzymu BCHE z lidské plazmy také docházelo k mírnému snížení obou kinetických parametrů bez známky zachování poměru K_m/V_{max} a proto i tato reakce měla charakter smíšené inhibice. Průsečík grafu také odpovídal charakteru smíšené inhibice. Můžeme tedy říci, že inhibitor č. 7 působil inhibici smíšeného charakteru pro všechny použité enzymy.

V práci měla být řešena také inhibiční konstanta K_i jednotlivých sulfonamidů. Inhibiční konstanta udává koncentraci inhibitoru, při níž je dosaženo 50% inhibice enzymu, ovšem na rozdíl od IC_{50} popisuje koncentraci inhibitoru, při níž je 50 % enzymu vázáno v komplexu enzym-inhibitor. Nepopisuje tedy přímo účinnost

⁴ Pro kompetitivní typ inhibice je typické, že se přímky protínají na ose y, u nekompetitivního typu inhibice se přímky protínají v počátku a průsečík leží na ose x a pro akompetitivní typ inhibice platí, že jsou přímky rovnoběžné, tudíž se neprotínají. U smíšeného typu inhibice se přímky protínají a to ve 2. nebo 3. kvadrantu grafu

inhibitoru, ale jedná se o disociační konstantu komplexu enzym-inhibitor. Čím menší je hodnota K_i , tím větší je vazebná afinita inhibitoru k enzymu a je ho třeba menší množství, aby došlo k jeho navázání na enzym. Hodnotu K_i lze získat sestrojením grafu závislosti převrácené hodnoty reakční rychlosti $1/v$ na koncentraci $[I]$ (tzv. Dixonův výnos), případně přepočtem z IC_{50} . Ovšem pro smíšený typ inhibice je typické, že má inhibitor afinitu jak k enzymu, tak ke komplexu enzym-substrát a stanovení K_i by bylo velmi obtížné. Proto se v praxi pro smíšenou inhibici používá pouze hodnota IC_{50} .

Další stanovovanou vlastností nových sulfonamidů byl rozdělovací koeficient v soustavě rozpouštědel *n*-oktanol:voda. Stanovení hodnot $\log P$ proběhlo experimentálně, ale pro srovnání byly porovnány také s hodnotami vypočtenými pomocí programů Chems sketch a Chemdraw. Hodnoty získané různými způsoby se od sebe nepatrně liší. Pokud budeme brát v potaz pouze experimentální hodnoty, vyhověly Lipinskému pravidlu hodnoty $\log P$ inhibitorů č. 1, 2, 5 a 8. U inhibitorů č. 3, 4 a 6 byla hodnota $\log P$ jen mírně nad žádanými 5. Hodnoty inhibitorů č. 7 a 9 byly již vyšší než 6. Nejnižší hodnoty $\log P$ měly standardní sloučeniny.

Jako další z parametrů Lipinského pravidla 5 byla pomocí strukturní analýzy v programu Chemdraw vypočtena hodnota topologického polárního povrchu molekuly. Požadavku nevyhovuje pouze inhibitor č. 3. Jedná se o inhibitor, který jako jediný obsahuje nitroskupinu $-\text{NO}_2$. Všechny ostatní sulfonamidy pak měly stejnou hodnotu $tPSA$, což je pravděpodobně způsobeno jejich téměř shodnou strukturou. Hodnota $tPSA$ pro tyto sulfonamidy byla $58,53 \text{ \AA}^2$, což znamená, že by požadavku vyhověly. Hodnoty $tPSA$ rivastigminu a galantaminu byly o něco nižší. U výpočtu hodnoty $\log P$ pro takrin došlo pravděpodobně k chybě.

Pokud bychom brali v potaz pouze tyto dva parametry Lipinského pravidla 5, hypoteticky by sulfonamidy č. 1, 2, 5 a 8 měly být schopny prostupovat buněčnými membránami a hematoencefalitickou bariérou a zároveň jsou také dostatečně rozpustné ve vodě.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo ověření inhibičního účinku vybraných sulfonamidů na aktivitu ACHE a BCHE. Inhibiční účinek se podařilo prokázat u všech testovaných sulfonamidů.

Nejúčinnějším inhibitorem vůči ACHE byl inhibitor č. 7 ((R)-3-chloro-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbenzensulfonamid) s hodnotou IC_{50} $20,32 \pm 0,32 \mu\text{M}$. Nejúčinnějším vůči oběma BCHE byl inhibitor č. 1 ((S)-N-(1-(6-fluorobenzo[d]thiazol-2-yl)-2-methylpropyl)benzensulfonamid) s hodnotou IC_{50} $1,62 \pm 0,01 \mu\text{M}$ pro BCHE z koňského séra a IC_{50} $18,64 \pm 0,13 \mu\text{M}$ pro BCHE z lidské plazmy. Pro teoretickou průchodnost mezi membránami a prostup hematoencefalitickou bariérou se podle dvou stanovovaných parametrů – $\log P$ a $tPSA$ – nejvíce hodí inhibitor č. 1, 2, 5 a 8.

Nově syntetizované sulfonamidy se zdají býti slibnými inhibitory cholinesteráz a jistě by bylo vhodné pokračovat ve výzkumu těch, které projevily svůj potenciál a mohly by se v budoucnu uplatnit při léčbě AD.

8 ZDROJE

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. 2016, 12(4), 459-509. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.03.001. ISSN 15525260. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526016000856>
- BAENZIGER, J. E., C. M. HÉNAULT, J. P. D. THERIEN a J. SUN. Nicotinic acetylcholine receptor–lipid interactions: Mechanistic insight and biological function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2015, 1848(9), 1806-1817. DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.03.010. ISSN 00052736. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273615000899>
- BAG, S., R. TULSAN, A. SOOD, et al. Sulfonamides as multifunctional agents for Alzheimer's disease. 2015, 25(3), 626-630. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.006. ISSN 0960894X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X14013031>
- BARTUS, R. T., R. DEAN, B. BEER a A. LIPPA. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982, 217(4558), 408-414. DOI: 10.1126/science.7046051. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7046051>
- BEHRA, M., X. COUSIN, Ch. BERTRAND, J. CONESCH, D. BIELLMANN, A. CHATONNET a U. STRAHLE. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*. 2002(5), 111-118. Dostupné také z: <https://www.nature.com/articles/nn788>
- BIGBEE, J. W., K. V. SHARMA, J. J. GUPTA a J. L. DUPREE. Morphogenic role for acetylcholinesterase in axonal outgrowth during neural development. *Environmental Health Perspectives*. 1999, 107(suppl 1), 81-87. DOI: 10.1289/ehp.99107s181. ISSN 0091-6765. Dostupné také z: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.99107s181>
- BOSTANCIKLIOĞLU, Mehmet. An update on the interactions between Alzheimer's disease, autophagy and inflammation. *Gene*. 2019, 705, 157-166. DOI: 10.1016/j.gene.2019.04.040. ISSN 03781119. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111919303932>
- BOYKO, K. M., T. N. BAYMUKHAMETOV, Y. M. CHESNOKOV, et al. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie*. 2019, 156, 196-205. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.10.017. ISSN 03009084. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908418302992>

- BRUNOVSKÝ, M. INHIBITORY CHOLINESTERÁZ V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY NEMOCI. *Neurologie pro praxi*. 2007, 2007(2), 112-117.
- CACABELOS, R. Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric disease and treatment*. 2007, 2007(3), 303-333. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654795/>
- COELHO FILHO, J. M. C. a J. BIRKS. Physostigmine for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007. DOI: 10.1002/14651858.CD001499. ISSN 14651858. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001499>
- COLOVIC, M. B., D. Z. KRSTIC, T. D. LAZAREVIC-PASTI, A. M. BONDZIC a V. M. VASIC. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. 2013, 11(3), 315-335. DOI: 10.2174/1570159X11311030006. ISSN 1570159X.
- CROUS-BOU, M., C. MINGUILLÓN, N. GRAMUNT a J. L. MOLINUEVO. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. 2017, 9(1), 1-9. DOI: 10.1186/s13195-017-0297-z. ISSN 1758-9193. Dostupné také z: <http://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0297-z>
- ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Türk Biyokimya Dergisi: Turk J Biochem*. 2003, 28(2), 54-61. ISSN 1303-829X. Dostupné také z: http://www.turkjbiochem.com/2003/054_061.pdf
- DVIR, H., I.SILMAN, M. HAREL, T. L. ROSENBERRY a J. L. SUSSMAN. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*. 2010, 187(1-3), 10-22. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.01.042. ISSN 00092797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279710000669>
- FANG, L., Y. PAN, J. L. MUZYKA a Ch. ZHAN. Active Site Gating and Substrate Specificity of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2011, 115(27), 8797-8805. DOI: 10.1021/jp112030p. ISSN 1520-6106. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp112030p>
- GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res*. 2003, 28(3-4), 515-522. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12675140>

- GIREK, M. a P. SZYMAŃSKI. Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chemical Papers*. 2019, 73(2), 269-289. DOI: 10.1007/s11696-018-0590-8. ISSN 2585-7290. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s11696-018-0590-8>

- GULÇIN, İ. a P. TASLIMI. Sulfonamide inhibitors: a patent review 2013-present. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2018, 28(7), 541-549. DOI: 10.1080/13543776.2018.1487400. ISSN 1354-3776. Dostupné také z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543776.2018.1487400>

- HAMPEL, H., M. MESULAM, A. C. CUELLO, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018, 141(7), 1917-1933. DOI: 10.1093/brain/awy132. ISSN 0006-8950. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/brain/article/141/7/1917/5023826>

- HU, W., X. ZHANG, Y. Ch. TUNG, S. XIE, F. LIU a K. IQBAL. Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology. 2016, 12(10), 1066-1077. DOI: 10.1016/j.jalz.2016.01.014. ISSN 15525260. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526016301893>

- CHATONNET, A. a O. LOCKRIDGE. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989,260: 625-634. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138724/pdf/biochemj002050010.pdf>

- CHEN, V. P., K. W. LUK, W. K. B. CHAN, et al. Molecular Assembly and Biosynthesis of Acetylcholinesterase in Brain and Muscle: the Roles of t-peptide, FHB Domain, and N-linked Glycosylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2011, (4), 1-8. DOI: 10.3389/fnmol.2011.00036. ISSN 1662-5099. Dostupné také z: [http:// readcube.com/articles/10.3389/fnmol.2011.00036](http://readcube.com/articles/10.3389/fnmol.2011.00036)

- INESTROSA, N. C., M. C. DINAMARCA a A. ALVAREZ. Amyloid-cholinesterase interactions. *FEBS Journal*. 2008, 275(4), 625-632. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x. ISSN 1742464X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.06238.x>

- IULITA, M. F. a A. C. CUELLO. Nerve growth factor metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014, 35(7), 338-348. DOI: 10.1016/j.tips.2014.04.010. ISSN 01656147. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614714000728>

- IQBAL, K., F. LIU, Ch. GONG a I. GRUNDKE-IQBAL. Tau in Alzheimer Disease and Related Tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010, 7(8), 656-664. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090074/>
- JOHNSON, G. a S. W. MOORE. The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design. *Current Pharmaceutical Design.* 2006(12), 217-225.
- KANDIAH, N., M. PAI, V. SENANARONG, I. LOOI, E. AMPIL, K. W. PARK, A. K. KARANAM a S. CHRISTOPHER. Rivastigmine: the advantages of dual inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and its role in subcortical vascular dementia and Parkinson's disease dementia. *Clin Interv Aging.* 2017n. I., 2017(12), 697-707. DOI: 10.2147/CIA.S129145. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5402908/>
- KOMERSOVÁ, A., K. KOMERS a P. ZDRAŽILOVÁ. Kinetics of hydrolysis of acetylthiocholine and acetylcholine by cholinesterases. *Chemico-Biological Interactions.* 2005, 157-158, 387-388. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.068. ISSN 00092797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279705003091>
- KORÁBEČNÝ, J., K. ŠPILOVSKÁ, O. BENEK, K. MUSÍLEK, O. SOUKUP a K. KUČA. Takrin a jeho deriváty v terapii Alzheimerovy choroby. *Česká a slovenská farmacie.* 2012, 2012(5), 210-221.
- KRYGER, G., M. WEIK a R. B. G. RAVELLI. Biological assembly of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* [online]. In: . 28. 01. 2000 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/1QIH>
- KUMAR, Y. C. S., M. MALVIYA, J. N. S. CHANDRA, et al. Effect of novel N-aryl sulfonamide substituted 3-morpholino arecoline derivatives as muscarinic receptor 1 agonists in Alzheimer's dementia models. 2008, 16(9), 5157-5163. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.03.019. ISSN 09680896. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968089608002320>
- LANE, C. A., J. HARDY a J. M. SCHOTT. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology.* 2018, 25(1), 59-70. DOI: 10.1111/ene.13439. ISSN 13515101. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ene.13439>
- LI, Q., S. HE, F. FENG, W. QU a H. SUN. Donepezil-based multi-functional cholinesterase inhibitors fortreatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2018, (158), 463-477.

- LIPINSKI, Ch. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004, 1(4), 337-341. DOI: 10.1016/j.ddtec.2004.11.007. ISSN 17406749. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1740674904000551>

- LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. 2015, 148, 34-46. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011. ISSN 01637258. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814002113>

- MASSON, P. a O. LOCKRIDGE. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010, 494(2), 107-120. DOI: 10.1016/j.abb.2009.12.005. ISSN 00039861. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986109004056>

- MASSOULIÉ, J., S. BON, N. PERRIER, et al. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chemico-Biological Interactions*. 2005, 157-158, 3-14. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.10.002. ISSN 00092797. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279705002425>

- MATOUŠ, B. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.

- MESULAM, M. Cholinergic Aspects of Aging and Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. 2012, 71(9), 760-761. DOI: 10.1016/j.biopsych.2012.02.025. ISSN 00063223. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322312001527>

- MIAO, Y., N. HE a J. ZHU. History and New Developments of Assays for Cholinesterase Activity and Inhibition. *Chemical Reviews*. 2010, 110(9), 5216-5234. DOI: 10.1021/cr900214c. ISSN 0009-2665. Dostupné také z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr900214c>

- MURPHY, M. P., H. LEVINE a M. A. LOVELL. Alzheimer's Disease and the Amyloid- β Peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, 19(1), 311-323. DOI: 10.3233/JAD-2010-1221. ISSN 18758908.

- MURRAY, A., M. FARAONI, M. CASTRO, N. ALZA a V. CAVALLARO. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Current Neuropharmacology*. 2013, 11(4), 388-413. DOI: 10.2174/1570159X11311040004. ISSN 1570159X.

- MURRAY, R. K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén, c2012. ISBN 978-80-7262-907-7
- MUTAHIR, S., J. JOŃCZYK, M. BAJDA, et al. Novel biphenyl bis -sulfonamides as acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors: Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies. *Bioorganic Chemistry*. 2016, 64, 13-20. DOI: 10.1016/j.bioorg.2015.11.002. ISSN 00452068. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004520681530033X>
- NICOLET, Y., O. LOCKRIDGE, P. MASSON, J. C. FONTECILLA-CAMPS a F. NACHON. Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, 278(42), 41141-41147. DOI: 10.1074/jbc.M210241200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M210241200>
- ONOR, M. L., M. TREVISIOL a E. AGUGLIA. Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update. *Clinical Interventions in Aging*. 2007, 2(1), 17-32. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2684084/>
- OTTEN, H. Domagk and the development of the sulphonamides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1986, 1986(17), 689-696.
- PANPALLI ATEES, M., Y. KARAMAN, S. GUNTEKIN a M.A. ERGUN. Analysis of genetics and risk factors of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*. 2016, 325, 124-131. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.051. ISSN 03064522. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452216300306>
- PICCIOTTO, M. R., M. J. HIGLEY a Y. S. MINEUR. Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron*. 2012, 76(1), 116-129. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.08.036. ISSN 08966273. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627312008021>
- PIDRMAN, V. Demence. Praha: Grada, 2007. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-1490-5.
- POHANKA, M. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15(6), 9809-9825. DOI: 10.3390/ijms15069809. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/6/9809>

- POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. Bratislava Medical Journal. 2013a, 114(12), 726-734. DOI: 10.4149/BLL_2013_153. ISSN 1336-0345. Dostupné také z: https://pdfs.semanticscholar.org/b4db/6af2cd9b9f770460c0a47622c183bf4fb506.pdf?_ga=2.143457084.845535321.1554844372-1139050007.1554844372

- POHANKA, M. Cholinesterasy v analýze a diagnostice. Brno, 2013b. Disertační práce. Akademie věd ČR.

- POHANKA, M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present). Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2012, 22(8), 871-886. DOI: 10.1517/13543776.2012.701620. ISSN 1354-3776. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543776.2012.701620>

- POHANKA, M. CHOLINESTERASES, A TARGET OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY. Biomedical Papers. 2011a, 155(3), 219-223. DOI: 10.5507/bp.2011.036. ISSN 12138118. Dostupné také z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2011.036.html>

- POHANKA, M, M. HRABINOVA, K. KUCA a J. SIMONATO. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. International Journal of Molecular Sciences. 2011b, 12(4), 2631-2640. DOI: 10.3390/ijms12042631. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/4/2631>

- PubChem [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tacrine#section=Computed-Properties&fullscreen=true>

- PRADO, V. F., H. JANICKOVA, M. A. AL-ONAIZI a M. A. PRADO. Cholinergic circuits in cognitive flexibility. Neuroscience. 2017, 345, 130-141. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.09.013. ISSN 03064522. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452216304511>

- RANJAN, A., A. CHAUHAN a T. JINDAL. In-silico and in-vitro evaluation of human acetylcholinesterase inhibition by organophosphates. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2018, 57, 131-140. DOI: 10.1016/j.etap.2017.12.014. ISSN 13826689. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668917303356>

- RAO, N., C. F. WHISETT, S. M. OXENDINE a M. J. TELEN. Human erythrocyte acetylcholinesterase bears the Yt blood group antigen and is reduced or absent in the Yt (a-b-) phenotype. *Blood*. 1993, Vol 81(No 3), 815-819. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/81/3/815.full.pdf?sso-checked=true>

- RAZAY, G. a G. K. WILCOCK. Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2014, 8(1), 9-17. DOI: 10.1586/14737175.8.1.9. ISSN 1473-7175. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.8.1.9>

- RESSNER, P., J. HORT, I. REKTOROVÁ, A. BARTOŠ, R. RUSINA, V. LÍNEK a K. SHEARDOVÁ. Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk Slov Neurol N*. 2008, 71/104(4), 494-501. Dostupné také z: http://www.nudz.cz/adcentrum/publikace/DoporuceniDiagnostikaANdalsiDemence_CSNN08.pdf

- RESSNER, P. ALZHEIMEROVA CHOROBA – DIAGNOSTIKA A LÉČBA. *Neurologie pro praxi*. 2004, (1), 11-16.

- ROSENBERRY, T. L., S. BON, N. PERRIER, et al. Strategies to Resolve the Catalytic Mechanism of Acetylcholinesterase: Cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2010, 40(1-2), 32-39. DOI: 10.1007/s12031-009-9250-3. ISSN 0895-8696. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12031-009-9250-3>

- SEIDL, Z. *Neurologie pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2733-2.

- SHEARDOVÁ, K., J. HORT, R. RUSINA, A. BARTOŠ, V. LÍNEK, P. RESSNER a I. REKTOROVÁ. Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Cesk Slov Neurol N*. 2007, 70/103(5), 589-594. Dostupné také z: http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/doporucene-postupy-pro-lecibu-alzheimerovy-nemoci-a-dalsich-onemocneni-spojnych-s-demenci-52475?confirm_rules=1

- SMALL, G. a R. BULLOCK. Defining optimal treatment with cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. 2011, 7(2), 177-184. DOI: 10.1016/j.jalz.2010.03.016. ISSN 15525260. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1552526010001019>

- SOREQ, H. a S. SEIDMAN. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature reviews: neuroscience*. 2001, (Volume 2), 294-302. Dostupné také z: <http://cbm.msoe.edu/teacherWorkshops/ddtyResources/documents/acheNewRoles.pdf>

- ŠINKO, G., M. ČALIĆ, A. BOSAK a Z. KOVARIK. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry*. 2007, 370(2), 223-227. DOI: 10.1016/j.ab.2007.07.023. ISSN 00032697. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326970700471X>

- TAYEB, H. O., H. D. YANG, B. H. PRICE a F. I. TARAZI. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. 2012, 134(1), 8-25. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.12.002. ISSN 01637258. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725811002257>

- TAKAHASHI-ITO, K.i, M. MAKINO, K. OKADO a T. TOMITA. Memantine inhibits β -amyloid aggregation and disassembles preformed β -amyloid aggregates. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2017, 493(1), 158-163. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.09.058. ISSN 0006291X. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17318181>

- TAYLOR, P. a H. BROWN. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition [online]. [cit. 2019-05-01]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28014/>

- ULUS, R., İ. ESIRDEN, B. ADAY, G. Ç. TURGUT, A. ŞEN a M. KAYA. Synthesis of novel acridine-sulfonamide hybrid compounds as acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. *Medicinal Chemistry Research*. 2018, 27(2), 634-641. DOI: 10.1007/s00044-017-2088-2. ISSN 1054-2523. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00044-017-2088-2>

- ULUS, R., B. ZENGİN KURT, I. GAZIOĞLU a M. KAYA. Microwave assisted synthesis of novel hybrid tacrine-sulfonamide derivatives and investigation of their antioxidant and anticholinesterase activities. *Bioorganic Chemistry*. 2017, 70, 245-255. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.01.005. ISSN 00452068. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206816303017>

- WEI, Z., H. BI, Y. LIU, et al. Design, synthesis and evaluation of new classes of nonquaternary reactivators for acetylcholinesterase inhibited by organophosphates. *Bioorganic Chemistry*. 2018, 81, 681-688. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.09.025. ISSN 00452068. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045206818308241>

- WELLER, J. a A. BUDSON. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. F1000Research. 2018, 7, 1-9. DOI: 10.12688/f1000research.14506.1. ISSN 2046-1402. Dostupné také z: <https://f1000research.com/articles/7-1161/v1>

- XING, S., Ch. ZHU, R. ZHANG a L. AN. Huperzine A in the Treatment of Alzheimer's Disease and Vascular Dementia: A Meta-Analysis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2014, 2014, 1-10. DOI: 10.1155/2014/363985. ISSN 1741-427X. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/363985/>

- ZHANG, H., Y. ZHAO, M. YU, et al. Reassembly of native components with donepezil to execute dual-missions in Alzheimer's disease therapy. Journal of Controlled Release. 2019, 296, 14-28. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.01.008. ISSN 01683659. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365919300240>

- ZVĚŘOVÁ, M. Alzheimerova demence. Praha: Grada Publishing, 2017. Psyché (Grada). ISBN 978-80-271-0561-8.