

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení aktivity cholinesteráz v krvi s využitím dithiodipyridinu
jako chromogenu

Bc. Dagmar Dorňáková

Diplomová práce

2019

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Determination of cholinesterase activity in blood using dithiodipyridine
as a chromogen

Bc. Dagmar Dorňáková

Thesis

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dagmar Dorňáková**
Osobní číslo: **C17431**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Stanovení aktivity cholinesteráz v krvi s využitím dithiodipyridinu jako chromogenu**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

Teoretická část:

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

Experimentální část:

1. V první části zpracovat odebranou krev a upravit ji do podoby vhodné pro další stanovení.
2. Testovat různé reakční podmínky za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity cholinesteráz s využitím dithiodipyridinu jako chromogenního činidla.
3. Stanovit inhibiční účinnosti u vybraných inhibitorů a porovnat je se standardními látkami.
4. Stanovit kinetické parametry a typ inhibice.
5. Stanovit rozdělovací koeficient vybraných látek v systému n-oktanol:voda.


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

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. 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

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 7.5. 2019

.....

Bc. Dagmar Dorňáková

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěla poděkovat své vedoucí diplomové práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za užitečné rady, vstřícnost a pomoc při psaní literární rešerše. Děkuji také konzultantce Mgr. Kataríně Vorčákové, Ph.D. za odborné vedení mé experimentální práce v laboratoři a za trpělivost při zpracování výsledků. Ráda bych poděkovala i své rodině a snoubenci za podporu a porozumění po celou dobu studia.

ANOTACE

Teoretická část se týká cholinesteráz, jejich struktury, funkce, stanovení inhibice i aktivity a také využití inhibitorů cholinesteráz při léčbě Alzheimerovy choroby. Experimentální část se zaměřuje na spektrofotometrické stanovení aktivity cholinesteráz s využitím chromogenu dithiopyridinu. Obsahuje zpracování krve, testování reakčních podmínek, stanovení inhibiční účinnosti, typu inhibice a stanovení rozdělovacího koeficientu spolu s polární povrchovou plochou molekuly.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cholinesteráza, dithiodipyridin, Alzheimerova choroba, spektrofotometrie, aktivita a inhibice enzymu.

ANNOTATION

The theoretical part deals with cholinesterases, their structure, function, determination of inhibitory efficiency and activity of enzyme, and also using of cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. The experimental part is focused on spectrophotometric determination of cholinesterase activity. It contains blood processing, testing of reaction conditions, determination of inhibitory activity, type of inhibition and determination of partition coefficient together with polar surface area of the molecule.

KEYWORDS

Cholinesterase, dithiodipyridine, Alzheimer's disease, spectrophotometry, activity and inhibition of enzyme.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Struktura aktivního místa AChE	18
Obrázek 2 Chemická struktura takrinu	21
Obrázek 3 Chemická struktura donepezilu	22
Obrázek 4 Chemická struktura rivastigminu	22
Obrázek 5 Chemická struktura galantaminu	23
Obrázek 6 Struktura PDS	41
Obrázek 7 Závislost absorbance na čase reakce	50
Obrázek 8 Závislost rychlosti reakce na koncentraci ATCh a PDS	51
Obrázek 9 Závislost rychlosti reakce na objemu erytrocytů a koncentraci ATCh	52
Obrázek 10 Závislost poměru reakčních rychlosti na koncentraci galantaminu.....	54
Obrázek 11 Závislost poměru reakčních rychlosti na koncentraci rivastigminu	54
Obrázek 12 Závislost poměru reakčních rychlosti na koncentraci takrinu	55
Obrázek 13 Závislost poměru reakčních rychlosti na koncentraci inhibitoru č. 10....	56
Obrázek 14 Příklad vyhodnocení typu inhibice pro inhibitor č. 1	58

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Testované inhibitory, obecná struktura a použité substituenty.	42
Tabulka 2 Koncentrační rozmezí standardů a vzorků inhibitorů	47
Tabulka 3 Výsledné hodnoty IC_{50}	56
Tabulka 4 Kinetické parametry	58
Tabulka 5 Rozdělovací koeficient pro testované látky a standardy	59
Tabulka 6 Topologická molekulární polární povrchová plocha	61

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AAV	adeno-asociovaný vir
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease)
ATCh	acetylthiocholin
APOE	apolipoprotein E
BACE-1	enzym β -sekretázy
BChE	butyrylcholinesteráza
BTCh	butyrylthiocholin
ChE	cholinesteráza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTNA	6,6'-dithiodinikotinová kyselina
DTNB	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
IL-1	interleukin
K_M	Michaelisova konstanta
logP	rozdělovací koeficient
MAO	monoaminoxidáza
NGF	nervový růstový faktor
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
PDS	dithiodipyridin
QDs	kvantové tečky
QCM	křemenné krystalové mikrováčky
SAChe	slinná acetylcholinesteráza
SBChe	slinná butyrylcholinesteráza
TNB	kyselina 5-thio-2-nitrobenzoová
TNF	tumor nekrotizující faktor
tPSA	topologická molekulární polární povrchová plocha
V_{max}	mezní rychlost

OBSAH

ÚVOD	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 ENZYMY	14
1.1.1 <i>Struktura enzymů</i>	14
1.1.2 <i>Izoenzymy</i>	14
1.1.3 <i>Mechanismus účinku</i>	14
1.1.4 <i>Faktory enzymové aktivity</i>	15
1.1.5 <i>Klasifikace enzymů</i>	16
1.1.6 <i>Typy inhibice enzymů</i>	16
1.2 CHOLINESTERÁZY	17
1.2.1 <i>Acetylcholinesteráza</i>	17
1.2.1.1 <i>Struktura aktivního místa acetylcholinu</i>	17
1.2.1.2 <i>Syntéza a hydrolýza acetylcholinu</i>	18
1.2.2 <i>Butyrylcholinesteráza</i>	18
1.3 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ	19
1.3.1 <i>Příklady inhibitorů cholinesteráz</i>	21
1.4 ALZHEIMEROVA CHOROBA	24
1.4.1 <i>Příznaky</i>	24
1.4.2 <i>Diagnóza</i>	25
1.4.3 <i>Léčba</i>	25
1.4.3.1 <i>Inhibitory cholinesteráz</i>	27
1.4.3.2 <i>Inhibitory monoaminoxidázy</i>	28
1.4.3.3 <i>Inhibitory β-sekretázy</i>	28
1.4.3.4 <i>Imunomodulace</i>	29
1.4.3.5 <i>Tumor nekrotizující faktor</i>	30

	1.4.3.6	Genová terapie virovým vektorem.....	30
	1.4.3.7	Nervový růstový faktor.....	31
	1.4.3.8	Využití 3D tisku.....	31
	1.5	SUBSTRÁTY PRO TESTY CHOLINESTERÁZ.....	32
	1.6	STANOVENÍ AKTIVITY A INHIBICE ENZYMŮ.....	32
1.6.1		<i>Spektrometrické testy</i>	33
	1.6.1.1	UV-VIS testy.....	33
	1.6.1.2	Fluorometrické testy.....	34
1.6.2		<i>Potenciometrie</i>	35
1.6.3		<i>Titrimetrie</i>	35
1.6.4		<i>Radioizotopové metody</i>	35
1.6.5		<i>Kapalinová chromatografie</i>	35
1.6.6		<i>Hmotnostní spektrometrie</i>	36
1.6.7		<i>Polarografie</i>	36
1.6.8		<i>Biosenzory</i>	36
	1.6.8.1	Elektrochemické biosenzory.....	36
	1.6.8.2	Optické biosenzory.....	37
	1.6.8.3	Fototermické biosenzory.....	37
	1.6.8.4	Biosenzory QCM (křemenné krystalové mikrováčky).....	37
1.6.9		<i>Mikročipy</i>	37
1.6.10		<i>Metoda suché kapky krve</i>	38
1.6.11		<i>Aktivita cholinesteráz v lidských slinách</i>	38
	1.7	APLIKACE TESTŮ.....	38
2		CÍL PRÁCE.....	40
3		EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
	3.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	41
	3.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY:.....	42

3.3	ZPRACOVÁNÍ KRVE	43
3.4	TESTOVÁNÍ REAKČNÍCH PODMÍNEK.....	43
3.4.1	<i>Testování různé koncentrace substrátu ATCh.....</i>	44
3.4.2	<i>Testování různých koncentrací činidla PDS</i>	44
3.4.3	<i>Testování různých koncentrací erytrocytů</i>	45
3.5	TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH INHIBITORŮ A STANDARDŮ	46
3.6	STANOVENÍ TYPU INHIBICE	47
3.7	STANOVENÍ ROZDĚLOVACÍHO KOEFICIENTU V SYSTÉMU N-OKTANOL:VODA ...	48
3.8	STANOVENÍ TOPOLOGICKÉ MOLEKULÁRNÍ POLÁRNÍ POVRCHOVÉ PLOCHY	49
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
4.1	TESTOVÁNÍ REAKČNÍCH PODMÍNEK.....	50
4.1.1	<i>Testování různých koncentrací substrátu a PDS.....</i>	50
4.1.2	<i>Testování různých koncentrací erytrocytů</i>	52
4.2	TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍ ÚČINNOSTI.....	53
4.3	STANOVENÍ TYPU INHIBICE	57
4.4	STANOVENÍ ROZDĚLOVACÍHO KOEFICIENTU.....	59
4.5	STANOVENÍ TOPOLOGICKÉ MOLEKULÁRNÍ POLÁRNÍ POVRCHOVÉ PLOCHY	60
5	ZÁVĚR	62
6	ZDROJE.....	63

ÚVOD

Acetylcholinesteráza (AChE) je enzym, který ukončuje přenos nervového signálu uvnitř neuronu hydrolýzou acetylcholinu. [1] Převážná část se vyskytuje v axonech. V motorických neuronech dosahuje vyšších hodnot aktivity než v neuronech senzoryckých. [2] AChE hraje důležitou roli i při dalších procesech, jako je například agregace β -amyloidu u Alzheimerovy choroby (AD). Proto se hledají nové typy inhibitorů cholinesteráz. [3]

Inhibitory cholinesteráz jsou látky, které blokují AChE v místě jejich působení a tím zabraňují odbourávání acetylcholinu. Díky tomu dochází ke zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s neurodegenerativním onemocněním. [4]

Za účelem sledování aktivity cholinesteráz bylo vyvinuto mnoho metod. Vyhodnocení může probíhat vizuálně nebo pomocí optických nebo elektrochemických technik. [5] Nejznámějším postupem je spektrofotometrická Ellmanova metoda. V současné době dochází k zavádění nových technik, jako jsou biosenzory, mikročipy a další. [6]

Alzheimerova choroba se řadí k nevléčitelným onemocněním. Jedná se o neurodegenerativní chorobu, která postihuje zejména pacienty starší 65 let. [7] Dochází k poškození cholinergního systému a ke sníženému uvolňování acetylcholinu. [8] Nejčastěji využívanými léky u AD jsou inhibitory cholinesteráz, které zlepšují acetylcholinergní transmisi. [9] V současné době dokáže léčba pouze zpomalit průběh onemocnění a ulevit pacientovi od příznaků. [10]

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Enzymy

Enzymy jsou látky, které působí jako biokatalyzátory různých reakcí. Svým působením zvyšují rychlost chemické reakce, ale chemickou rovnováhu nemění. Molekula enzymu se při reakci nespotřebuje. Díky nim lze provést reakce za snadno nastavitelných podmínek. [11]

1.1.1 Struktura enzymů

Enzymy se dle své struktury dělí na jednoduché a složené. Jednoduché enzymy obsahují jen bílkovinnou část. Patří mezi ně například hydrolázy. Jedná se o apoenzym. Pokud se spojí s kofaktorem (nebílkovinná část), vznikne molekula holoenzymu. Enzym může obsahovat několik peptidových řetězců a vytvářet tak multienzymový komplex. [11]

1.1.2 Izoenzymy

Tyto enzymy mají rozdílnou primární strukturu, protože vznikají expresí různých genů a proto se liší fyzikálně-chemickými vlastnostmi a místem výskytu. Nicméně katalyzují stejnou reakci. Díky tomu lze regulovat, za jakých podmínek bude reakce probíhat. Existují i izoformy enzymů, které jsou v primární struktuře DNA stejné, ale liší se posttranslačními modifikacemi. Takové izoformy dokáží katalyzovat různé reakce. [11]

1.1.3 Mechanismus účinku

Principem působení enzymů je, stejně jako u všech katalyzátorů, snížení aktivační energie. V prvním kroku vytvoří enzym se substrátem komplex. Jedná se o reakci reverzibilní a rychlou. V dalším kroku je substrát přeměněn na produkt za katalýzy enzymem. Dojde k rozpadu komplexu. Tato reakce je již ireverzibilní. Díky tomu, že má reakce několik kroků, je aktivační energie nižší, než kdyby vše probíhalo v jednom kroku. Místo, ve kterém enzym interaguje se substrátem, se nazývá aktivní centrum. Je tvořeno několika aminokyselinovými zbytky, které jsou z hlediska primární struktury od sebe vzdálené. Proto i malá změna struktury enzymu může

zapříčinit ztrátu kontaktu mezi aminokyselinami. Tímto způsobem může dojít i k denaturaci enzymu. [11, 12]

1.1.4 Faktory enzymové aktivity

a) Koncentrace substrátu

Ve většině případů je látková koncentrace substrátu vyšší než koncentrace enzymu. Změnou koncentrace substrátu lze ovlivnit rychlost reakce. Pokud je ale veškerý enzym již nasycený substrátem, k dalšímu zrychlení nedochází. Závislost rychlosti reakce katalyzované enzymem na koncentraci substrátu vyjadřuje také rovnice Michaelis-Mentenové:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Kde:

v_0 = (počáteční) rychlost reakce

V_{max} = maximální rychlost reakce

$[S]$ = koncentrace substrátu

K_M = Michaelisova konstanta (koncentrace substrátu, při které se reakční rychlost rovná polovině maximální rychlosti). [11, 13]

b) pH

Při vysoké nebo nízké koncentraci H^+ může dojít k denaturaci enzymu nebo ionizaci bazických i kyselých skupin účastnících se reakce.

c) Teplota

Při vysokých teplotách může dojít k denaturaci proteinové části enzymu. I nízké teploty mohou snížit aktivitu enzymu.

d) Struktura enzymu

e) Přítomnost inhibitorů (přirozených, nepřirozených) [11, 13]

1.1.5 Klasifikace enzymů

Enzymy mají různé funkce. Podle toho, o jaký typ katalyzované reakce se jedná, lze enzymy rozdělit do následujících sedmi tříd:

- a) Oxidoreduktázy – účastní se oxidačně-redukčních reakcí.
- b) Transferázy – přenáší chemické skupiny z donoru na akceptor.
- c) Hydrolázy – štěpí vazby pomocí H_2O .
- d) Lyázy – katalyzují eliminaci, kdy vzniká dvojná vazba, nebo adici na dvojnou vazbu.
- e) Isomerázy – katalyzují izomeraci.
- f) Ligázy – díky energii ze štěpení ATP dojde ke spojení dvou molekul.
- g) Translokázy – zprostředkovávají transport přes membránu. [14]

1.1.6 Typy inhibice enzymů

Podle vazby inhibitoru na cílový enzym existují čtyři hlavní typy inhibicí:

a) Kompetitivní

Při kompetitivní inhibici se inhibitor váže na volný enzym, a to hlavně na aktivním místě. Inhibitor přitom o toto místo soutěží se substrátem. Při tomto typu inhibice dochází ke zvýšení hodnoty Michaelisovy konstanty (K_M). Hodnota mezní rychlosti (V_{max}) ale zůstává stejná. Tento princip je ve farmaceutickém průmyslu nejvíce využíván.

b) Nekompetitivní

Inhibitor se může vázat buď na volný enzym, nebo na komplex enzym-substrát. Vazba je zprostředkována mimo aktivní místo enzymu. Nekompetitivní inhibitor snižuje hodnotu V_{max} , přičemž na hodnotu K_M nemá žádný vliv.

c) Akompetitivní

U akompetitivní inhibice se inhibitor váže pouze na komplex enzymu se substrátem. Vzniká tak inaktivní komplex. Hodnoty K_M i V_{max} při tomto typu inhibice klesají.

d) Smíšená

Jedná se o směs kompetitivních a nekompetitivních fenotypů u inhibitoru. Afinita takového inhibitoru je nerovnoměrná vůči volnému enzymu a komplexu se substrátem. Hodnota K_M se v průběhu reakce zvyšuje, zatímco hodnota V_{max} klesá. [15, 16]

1.2 Cholinesterázy

Cholinesterázy (ChE) se řadí k důležitým enzymům, které mají vliv na lidské zdraví. [17] Řadí se do skupiny esteráz. Tyto enzymy hydrolyzují cholinové estery vyšší rychlostí než jiné estery. [18]

1.2.1 Acetylcholinesteráza

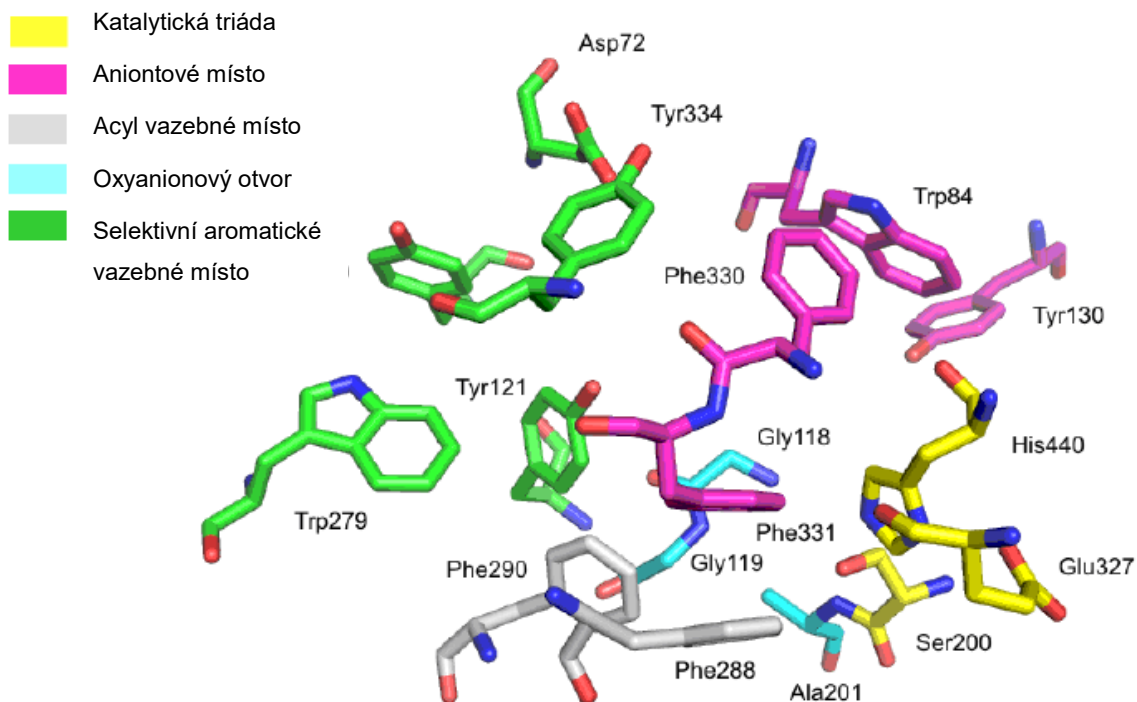
Acetylcholinesteráza se nachází především v centrální nervové soustavě, kde je vázána na buněčnou membránu tkání. Dále se vyskytuje na membránách erytrocytů. [17] Tento enzym katalyzuje hydrolýzu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Reakce je důležitá pro zprostředkování návratu cholinergního neuronu zpět do klidového stavu po předchozí aktivaci. [19] Enzym hydrolyzuje acetylcholin (ACh) rychleji než jiné cholinové estery. [20] V současné době patří AChE k nejdůležitějším terapeutickým cílům při symptomatické léčbě Alzheimerovy nemoci. [21] Čím je obsah AChE v buňce nižší, tím je větší šance, že bude buňka více zranitelná. [22]

1.2.1.1 Struktura aktivního místa acetylcholinu

Vazba substrátu je zprostředkována dvěma molekulami fenylalaninu. Jejich aromatické zbytky směřují do vazebného místa. [23] Aktivní centrum tvoří nejméně pět vazebných míst:

- a) Oxyanionový otvor vytváří stabilitu pro acetylové skupiny.
- b) Esteratické místo se skládá z aminokyselin serinu, histidinu a kyseliny glutamové (katalytická triáda).
- c) Ve vazebném aniontovém místě se váže amoniová část ACh s různými ligandy.
- d) Selektivní aromatické vazebné místo váže arylové substráty.

Na acyl vazebné místo se připojuje acetylová skupina ACh. Kromě těchto aktivních center se v AChE nachází periferní aniontové místo, na které se může navázat takrin a jeho příbuzné sloučeniny. [24] Struktura vazebného místa je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1 Struktura aktivního místa AChE [25]

1.2.1.2 Syntéza a hydrolýza acetylcholinu

Syntéza ACh probíhá v pre-synaptických neuronech z cholinu a acetyl-CoA. Je zprostředkována enzymem cholin-acetyltransferázou. Do synaptické štěrby je ACh uvolněn exocytózou. Vazba na receptor post-synaptického neuronu je reverzibilní. Pokud se acetylcholin nenaváže na receptor, zachytí jej AChE, která jej hydrolyzuje zpět na cholin. [26]

1.2.2 Butyrylcholinesteráza

Butyrylcholinesteráza (BChE) je známa jako pseudocholinesteráza. Vyskytuje se v plazmě, tkáních svalů nebo v játrech. Molekulární struktura je podobná AChE, avšak tento enzym má odlišné spektrum substrátových specifit. Zatímco AChE

hydrolyzuje nejprve acetylcholin, BChE přednostně hydrolyzuje butyrylcholin. [19, 27] Vyšší aktivitu vykazuje v játrech, srdci, střevě, plicích a ledvinách. [28]

Substrát se váže pomocí menších aminokyselin, kterými jsou valin a leucin. Tato konformace má za následek získání většího prostoru ve vazebném místě. Proto může BChE vázat větší substráty a inhibitory. [29] Jedná se o tetramerický glykoprotein. Je složen ze čtyř podjednotek, které jsou identické. Obsahují 574 aminokyselin. Molekulová hmotnost se blíží 85 kDa. [30, 31]

I když je aktivita BChE v lidském těle převládající, její deficit se většinou neprojeví známkami onemocnění. [32] Nicméně test na stanovení aktivity BChE může být využit jako ukazatel funkce jater. Vykazuje však nižší citlivost, a pokud došlo k intoxikaci některými látkami, může se objevit falešně pozitivní výsledek. [33]

BChE tělo využívá k detoxikaci toxických látek. [34] Za normálních podmínek nepřispívá svou aktivitou k hydrolyze acetylcholinu. Pouze v krizových situacích, kdy je narušena fyziologická funkce AChE. [32]

1.3 Inhibitory cholinesteráz

Jedná se o chemické sloučeniny, které mají schopnost inhibovat hydrolytickou aktivitu cholinesteráz. Inhibitory se mohou lišit v mechanismu inhibice nebo selektivitě vůči substrátu. Právě tato inhibice se stala hlavním cílem pro výrobu léčiv u Alzheimerovy choroby. [35] Ta působí na cholinergní systém a tím zmírňuje projevy nemoci. Tyto léky jsou z větší části selektivními inhibitory AChE. [36] Jejich účinek zahrnuje symptomatickou úlevu, nejedná se o kauzální léčbu. [37]

Cholinesterázy mohou také inhibovat přírodní toxiny, některé drogy, pesticidy i chemické bojové látky. [38]

Jejich účinek spočívá v nárůstu trvání účinku a koncentrace acetylcholinu, který se nachází v synaptické štěrbině. Tím dochází k zesílení aktivace cholinergních receptorů. [39]

Známé inhibitory se liší chemickou strukturou:

- a) Alkaloidy – huperzin
- b) Karbamáty – rivastigmin, eptastigmin fyzostigmin
- c) Deriváty piperidinu – galantamin, huperzin, donepezil
- d) Akridiny – takrin
- e) Organofosfáty - metrifonát [40]

Mezi reverzibilní inhibitory patří takrin a donepezil. Tyto látky se váží na enzym v blízkosti katalytického místa. Pro vazbu využívají slabé interakce, které se sice vytváří rychle, ale dají se snadno porušit. Proto je doba působení krátká a není docíleno trvalé inhibice enzymu. [41]

Pseudo-ireverzibilní inhibitory vytváří s enzymem kovalentní vazby. Enzym se však po chvíli stává opět dostupným. [35]

Ireverzibilní inhibitory mají dlouhodobý účinek. Inhibice je založena na fosforylaci nebo fosfonylaci serinové hydroxylové skupiny, která se nachází na esterovém místě aktivního místa na enzymu. [42] Tvoří se silné kovalentní vazby a deaktivace enzymu je trvalá. Vazby se ale tvoří pomaleji, než je tomu u reverzibilních inhibitorů. Míra inhibice stoupá s dobou, po kterou je inhibitor v kontaktu s daným enzymem. [41, 43]

Podle reakčního mechanismu lze inhibitory dále dělit:

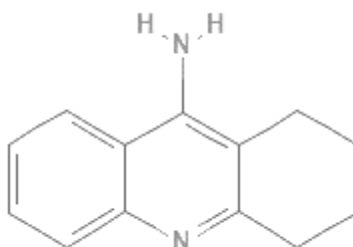
- a) Kompetitivní – inhibitor se substrátem soutěží o obsazení vazebného místa.
- b) Nekompetitivní – inhibitor se naváže na místo lišící se od katalytického místa. Substrát se sice naváže na enzym, ale kvůli konformačním změnám nedojde ke změně na produkt.
- c) Akompetitivní – vzniká komplex enzym – substrát – inhibitor, přičemž vazba inhibitoru je reverzibilní.
- d) Smíšené – v případě, že nejsou splněny přesné předpoklady předchozích typů. [40]

Dále lze inhibitory dělit podle afinity k BChE. Zatímco galantamin a donepezil inhibují pouze AChE, rivastigmin inhibuje oba enzymy. [44]

1.3.1 Příklady inhibitorů cholinesteráz

Takrin

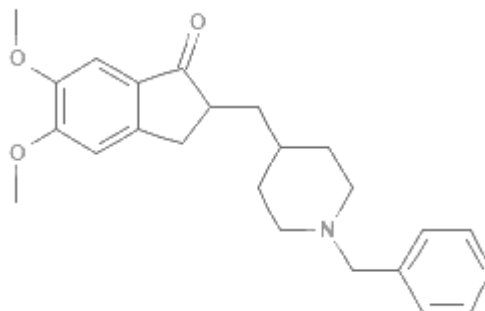
Takrin je chemická sloučenina 1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin. Jedná se o první léčivo, které bylo schválené pro léčbu mírnějšího stupně Alzheimerovy choroby. Objevili se u něj ale hepatotoxické účinky. [45] Struktura takrinu je znázorněna na obrázku 2.



Obrázek 2 Chemická struktura takrinu [46]

Donepezil

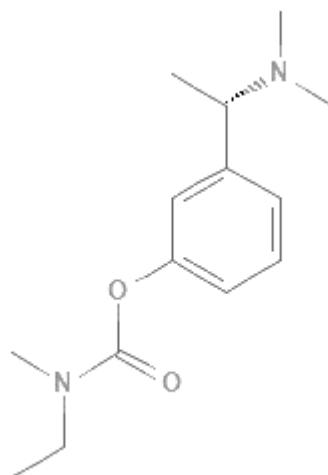
Jedná se o sloučeninu s názvem 2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-on a jeho chemická struktura je znázorněná na obrázku 3. Nepřímo stimuluje i nikotinové a muskarinové receptory, a to díky zvýšení koncentrace acetylcholinu v synapsích. Při tomto jevu dochází také ke zvýšení hladiny noradrenalinu a dopaminu. [47, 48]



Obrázek 3 Chemická struktura donepezilu [49]

Rivastigmin

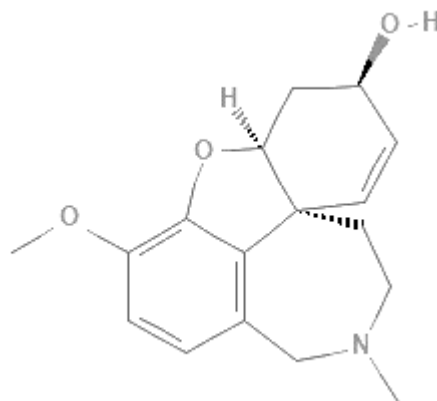
Rivastigmin je ((S)-N-ethyl-N-methyl-3-[1-(dimethylamino)ethyl] fenyلكarbamát hydrogen-(2R, 3R)-tartarát. Jeho účinek trvá déle než u předchozích zástupců. [50, 51] Na obrázku 4 je jeho chemická struktura.



Obrázek 4 Chemická struktura rivastigminu [52]

Galantamin

Sloučenina ((4aS, 6R, 8aS)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-4aH-[1]benzofuro[3a, 3,2-ef][2]benzazepin-6-ol) byla izolována z rostliny *Galanthus nivalis*. Selektivita pro AChE je víc než desetinásobná oproti BChE. [41, 53] Chemická struktura galantaminu je znázorněna na obrázku 5.



Obrázek 5 Chemická struktura galantaminu [54]

Fyzostigmin

Chemický název této látky je ((3a*R*, 8b*S*)-3,4,8b-trimethyl-2,3a-dihydro-1*H*-pyrrolo[2,3-*b*]indol-7-yl)*N*-methylkarbamát. U skupiny pacientů s AD má pouze malý příznivý účinek. [55]

Huperzin

Izolací z rostliny *Huperzia serrata* lze získat sloučeninu ((1 *R*, 9*S*, 13*E*)-1-amino-13-ethyliden-11-methyl-6-azatricyklo[7.3.1.0^{2,7}]trideca-2(7),3,10-trien-5-on, neboli Huperzin. Existuje typ A, který byl v Číně schválen jako léčivo u AD, a typ B. [56]

Eptastigmin

Jedná se o derivát fyzostigminu. Eptastigmin (heptylfyzostigmin) je selektivnější pro BChE. U pacientů s AD má významné funkční a kognitivní výhody. [57, 58]

Metrifonát

Tento neaktivní prekurzor se neenzymaticky transformuje na aktivní formu 2,2-dichlorvinylidimethylfosfát. I přesto, že se jedná o inhibitor s nejdelší dobou účinku, byla jeho žádost o použití jako léčiva stažena. Objevily se totiž u malého procenta pacientů významné svalové a respirační problémy. [35]

Další nové inhibitory

Sushant K. a kol. navrhli nové deriváty kyseliny *p*-aminobenzoové, které měly za cíl inhibovat cholinesterázy a přispět tak k léčbě Alzheimerovy choroby. Některé jejich sloučeniny vykazovaly inhibici srovnatelnou s donepezilem. [59]

Dihydropyrimidin a jeho deriváty mají mnoho terapeutických i farmaceutických vlastností. Mezi nimi je i inhibice AChE. [60] *Elumalai K. a kol.* použili deriváty 1,2,3,4,-tetrahydropyrimidinu. Většina sloučenin vykazovala dobrou až střední inhibici ChE a byla selektivnější pro AChE. [61]

1.4 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je ve vyspělých zemích čtvrtá nejčastější příčina úmrtí. Díky současnému zvyšování průměrné délky života roste počet lidí, kteří touto chorobou trpí. Jedná se o nejčastější formu demence. Jde o komplexní neurodegenerativní poruchu, která se vyznačuje mnohostrannou patogenezí. [62] Tato forma poruchy mozku znemožňuje osobám vykonávat každodenní činnosti. [63]

Těžké ztráty cholinergních neuronů vedou až k 90% snížení aktivity acetylcholintransferázy, což je enzym potřebný pro syntézu acetylcholinu jako neurotransmiteru. [64, 65]

Je charakterizována agregací peptidu β -amyloidu v placích, které se nachází v extracelulárním prostoru, a agregovaným hyperfosforylovaným tau proteinem, který tvoří neurofibrilární vlákna. Dále se vyskytuje ztráta cholinergních neuronů, synaptické změny a může dojít až k chronickému zánětu. [66] Kromě genetických predispozic mohou nastartovat vznik onemocnění i faktory životního stylu, jako je kouření, cukrovka, dieta, deprese, časté záněty a jiné. [67, 68]

1.4.1 Příznaky

Onemocnění je charakterizováno ztrátou paměti, zhoršenou schopností uvažovat a mluvit. Objevuje se neschopnost rozpoznávat obličeje, sociální stranění nebo stavy úzkosti. [69] Jde o komplexní onemocnění, které zahrnuje zánět, dysfunkci mitochondrií a s tím spojený oxidační stres, tvorbu reaktivních forem

kyslíku a dusíku. Patologický proces začíná mnoho let dříve, než se projeví první symptomy. [70]

První příznaky se začínají projevovat několik let před diagnostikovaným onemocněním. V časných stádiích se začíná objevovat apatie, stavy deprese a úzkosti. V pozdějším stádiu dochází ke zhoršení úsudku, dezorientaci, zmatenosti. Může se objevit agresivita, agitace, halucinace a další neuropsychiatrické poruchy. Lékař musí počítat i s tím, že takový pacient nemusí dodržovat lékařská doporučení. [71]

1.4.2 Diagnóza

Diagnóza je závislá na individuálním přístupu k anamnéze pacienta a k dalším vyšetřením. Celý diagnostický postup vyžaduje hodnocení příznaků a určení stupně postižení. Kromě biochemického vyšetření krve a genetických testů se využívá i neuropsychologické vyšetření a zobrazovací techniky, jako je například magnetická rezonance, pozitronová emisní tomografie, počítačová tomografie nebo jedno-fotonová emisní tomografie. [71]

1.4.3 Léčba

Jako první volbou bývá většinou nefarmakologická léčba související s problémovým chováním a neuropsychiatrickými obtížemi. [71] Dále se eliminují léky, které by mohli způsobit kontraindikaci s léčbou. Jsou to některé léky pro úlevu od bolesti, sedativní hypnotika, léky na úzkost a další. [72, 73]

S velkou opatrností lze zařadit do léčby antipsychotika. Pacient však musí být průběžně sledován a splňovat přísné podmínky. Užívání těchto látek může způsobit pokles kognitivních funkcí. Většinou se používají jako poslední možnost pro těžké poruchy chování, u kterých nebyla zjištěna příčina. Podávají se co nejnižší dávky po krátkou dobu. [74, 75]

Ačkoli se na nalezení způsobu léčby této choroby podílí už řadu let mnoho výzkumníků, stále nedošlo k zavedení účinného léku. Současné farmakologické přípravky pouze snižují progres klinických symptomů a poruch. [76]

Nové léky by měli cílit na látky, které mají na svědomí začátek primární kaskády patogeneze. Pro některé vědce je to beta-amyloidní peptid, pro druhé tau protein. [77] Amyloidní hypotéza se stala převládajícím typem. [78] Objevil se také důkaz, že roli v patogenezi AD hraje dysfunkce mitochondrií. [79] U pacientů s AD byla nalezena porucha tří klíčových enzymů, které se podílejí na respiračním řetězci. Navíc se zjistilo, že některé mitochondrie podléhají autofagické degradaci. [80] Mitochondrie mohou být vystaveny oxidačnímu stresu. Tento jev zmírňují antioxidanty. Proto byly vytvořeny antioxidanty, které cílily na mitochondrie. Předpokládalo se, že by tento krok mohl být prospěšný pro léčbu AD. [81]

Jedním takovým antioxidantem je orálně užívaný MitoQ, který při proniknutí do mitochondrie neutralizuje volné radikály u jejich zdroje. Rychlost procesu několiknásobně převyšuje přirozené antioxidanty. [82, 83]

Vytvoření takového systémového léčiva, které by bylo schopné rozpoznat různé cíle u kaskády multifaktoriálního onemocnění, nemusí být snadné. Existuje zde riziko vedlejších účinků, jako důsledek vazby na cíle, které nejsou spojené s onemocněním. [84]

Jedním ze schválených léčiv pro léčbu Alzheimerovy choroby je memantin. Působí jako antagonist *N*-methyl-*D*-aspartátu (NMDA). Memantin ovlivňuje glutamátergní transmissi. Jedná se o nízko- až středně afinitní blokátor NMDA-receptorů s otevřeným kanálem. Má jen několik mírných a přechodných vedlejších účinků. Doporučuje se podávat dvakrát denně dávku 10 mg memantinu s okamžitým uvolňováním nebo jednou denně 28 mg memantinu s prodlouženým uvolňováním. Pokud pacient trpí vážnou renální poruchou, snižuje se dávka na 5 mg dvakrát denně nebo 14 mg jednou denně. [71]

V pozdních fázích onemocnění je léčba zaměřena především na podporu základních psychomotorických funkcí, chování, pohybu, stravování, komunikace a podobně. V terminálním stádiu, kdy dochází k rozpadu osobnosti, dostávají pacienti péči, která poskytuje zmírnění bolesti a pohodlí. [85]

1.4.3.1 Inhibitory cholinesteráz

Mezi nejslibnější možnosti léčby Alzheimerovy choroby patří zvýšení hladiny acetylcholinu v mozku za použití AChE inhibitorů. Dříve se používal takrin. Dnes je to například donepezil, rivastigmin a galantamin. Tyto látky jsou schváleny pro léčbu mírných až středně těžkých symptomů AD. V dnešní době je snaha najít další vhodné inhibitory. Bohatým zdrojem inhibitorů může být příroda. Pomocí kolorimetrické Ellmanovy metody bylo analyzováno 32 rostlin, které se používají v tradiční thajské medicíně. Extrakty z rostlin byly testovány na AChE inhibiční aktivitu. [63, 86]

Přidání memantinu k léčbě inhibitory urychlí nástup žádoucích účinků. Pokud pacient dostává přípravky s inhibitory cholinesteráz, neměla by se tato léčba přerušit. I dočasné přerušování způsobuje nevratné zhoršení stavu. [71] U většiny pacientů jsou inhibitory dobře snášeny a nemají závažné vedlejší účinky. [87] Negativní účinky na gastrointestinální trakt lze zmírnit podáváním léků po jídle nebo v kombinaci s memantinem. [71] Léčbu inhibitory lze zahájit u jakéhokoli stádia AD, na rozdíl od memantinu, který se předepisuje především u středně těžkého a těžkého stádia. [88, 89]

Kai-Xin Dou a kol. publikovali v roce 2018 svou studii, kde se zabývali metaanalýzou dostupných inhibitorů cholinesteráz. Z výsledků vyplývá, že denní dávka 24 mg galantaminu vykazuje rovnováhu mezi příznivými účinky a snášenlivostí u osob s mírnou až středně těžkou AD. Pro pacienty s těžší formou AD byla nejúčinnější kombinovaná léčba 10 mg donepezilu s 20 mg memantinu. Vyšší dávky donepezilu vykazovaly nižší bezpečnostní profil. U tobolek s 12 mg rivastigminu se objevil vysoký výskyt nežádoucích účinků. Lepší snášenlivosti a účinnosti dosáhla transdermální náplast s rivastigminem (15 cm²). Použitím náplasti je dosaženo rovnovážné plazmatické koncentrace v kratším čase a také snížení nežádoucích účinků gastrointestinálního traktu. [90]

Takrin se přestal používat kvůli zjištění, že iniciuje produkci reaktivních forem kyslíku a snižuje hladinu glutathionu v játrech. Uvedené jevy vedou až k hepatotoxicitě. Bylo však zjištěno, že lze zlepšit jeho účinnost i snížit vedlejší

účinky, a to jeho homo- nebo heterodimery. [91] Nové multifunkční merkaptoakrinové deriváty snižují hepatotoxicitu a zlepšují kognitivní i paměťové schopnosti. Další deriváty takrin-propargylaminu navíc inhibovaly AChE i BChE. [92] Hybridy takrin-hydroxyfenylbenzimidazolu jsou schopny inhibovat neurotoxicitu, která vzniká přítomností amyloidu v neurálních buňkách. [93]

Ladostigil byl vytvořen sloučením rivastigminu, rasagilinu a inhibitoru monoaminoxidázy (MAO). Díky tomu lze inhibovat AChE i BChE. Je také snížena tvorba peroxidu vodíku, proto nevzniká tolik volných radikálů. Inhibice MAO má navíc potenciální antidepresivní aktivitu. Ladostigil v průběhu výzkumu vykazoval i neuroprotektivní účinky. [94, 95]

Alieza Atri a kol. zjišťovali, jestli nová sloučenina idalopirdin (antagonista selektivního 5-hydroxytryptamin-6 receptoru) je účinná pro symptomatickou léčbu mírné až střední AD. Ve výzkumu přidávali různé koncentrace této látky nebo placebo k inhibitorům cholinesteráz. Ukázalo se, že během 24 týdnů léčby nedošlo ke zlepšení účinku ve srovnání s placebem. Proto nebyl idalopirdin doporučen pro léčbu Alzheimerovy choroby. [96]

1.4.3.2 Inhibitory monoaminoxidázy

Monoaminoxidáza hraje klíčovou roli při tvorbě amyloidních plaků. [97] Stejně jako inhibitory cholinesteráz mohou tyto látky zlepšit paměť a zmírnit další symptomy. Patří mezi ně například derivát homoisoflavonoidu spojený s pyridinovou skupinou [98] nebo neuroprotektivní sloučenina s názvem M30, která vykazuje mnoho pozitivních účinků. Zabraňuje ztrátě neuronů, podporuje neurální diferenciaci a příznivě ovlivňuje signální dráhy a mechanismy. Díky tomu, že snižuje akumulaci železa v mozku, dochází k redukci amyloidních plaků. M30 silně inhibuje MAO. [99]

1.4.3.3 Inhibitory β -sekretázy

Enzym β -sekretázy (BACE-1) katalyzuje štěpení amyloidního prekurzorového proteinu, který produkuje peptidy β -amyloidu po proteolýze. Inhibitory BACE-1 se jeví jako významná léčiva, avšak zatím bylo v klinických studiích potvrzeno mnoho vedlejších účinků. [100] Jako možné řešení se ukazuje využít duální inhibici AChE a BACE-1. [99]

1.4.3.4 Imunomodulace

Imunomodulační látky, které by mohly zpomalit imunitní a zánětlivé procesy u pacientů, byly testovány na myších a krysích modelech. Patologické znaky u těchto zvířat úzce napodobují procesy u lidí. Příčina AD nejpravděpodobněji vyplývá ze zánětlivé reakce, kterou vyvolávají amyloidní agregáty a později hromadění tau proteinu. Zánětlivou reakci řídí aktivovaná mikroglie. Proto terapie, která cílí na zánět, se jeví jako slibná k léčbě AD. *Bridget Martinez a Philip V. Peplow* shrnuli účinky několika imunomodulačních látek: [101]

- Fasudil – zlepšení paměti, snížení vzniku amyloidních plaků a fosforylace tau proteinu, snížení produkce protizánětlivých cytokinů.
- Kurkumin – zlepšení krátkodobé paměti, schopnosti rozpoznávání.
- Rozpustný inhibitor tumor nekrotizujícího faktoru (TNF) SPro1595 – snížení věkově závislého nárůstu aktivovaných imunitních buněk, snížení počtu plaků.
- Antagonista receptoru interleukinu IL-1 (IL-1RA) – zlepšení poruchy hustoty páteře.
- Pioglitazon – zlepšení prostorové orientace, snížení hyperfosforylace tau proteinu a zánětu.
- Rosiglitazon – snížení hyperfosforylace tau proteinu.
- Kvercetin – zlepšení učení a prostorové paměti, snížení β -amyloidu, tau proteinu a mikroglie.
- Nadměrná exprese IL-1 β – zlepšení patologie amyloidu, indukce periferních buněk imunitního systému do oblasti mozku.
- Memantin – léčba bránila rozvoji neurodegenerativních poruch a depresí.
- Makrofágy M2 – transplantací došlo ke zmírnění zánětu nervového systému a zlepšení kognitivního poškození mozku.
- CD4+, CD5+, Foxp3, Treg buňky – zlepšení kognitivních funkcí, snížení depozice amyloidních plaků.
- Th1 T buňky s anti-CD3 – podporují neurogenezi.
- Apolipoprotein 3 a buňky kostní dřeně – zmírnění behaviorálních a neuropatologických změn.

- Amniotické kmenové buňky – zlepšení prostorové orientace, snížení počtu plaků, snížení úrovně protizánětlivých cytokinů IL-1 a TNF- α , zvýšení hladiny cytokinu IL-10 a transformačního růstového faktoru β . [101]

1.4.3.5 Tumor nekrotizující faktor

Jeden z nejvíce studovaných proinflamatorních cytokinů je tumor nekrotizující faktor. Signalizuje prostřednictvím receptoru tumor nekrotizujícího faktoru (TNFR-1 a 2). V AD hraje významnou roli při synaptické funkci, tvorbě paměti a amyloidogenezi. Byl identifikován jako hlavní aktivovaný cytokin v choroidním plexu pacientů. [102] Choroidní plexus slouží jako selektivní brána mozku pro imunitní buňky. U pacientů s AD jsou jeho funkce a morfologie narušeny. [103] Změny v morfologii mohou podpořit zvýšení prostupu leukocytů do parenchymu mozku. Tím by došlo k většímu zánětu nervového systému. [104]

Sophie Steeland a kol. ve své studii uvedli, že inhibice TNFR1 má široké terapeutické účinky u Alzheimerovy choroby. Brání vzniku zánětu, chrání integritu bariéry a také snižuje amyloidogenezi. Test provedli na myších modelech. Vyhodnocovali paměť rozpoznáváním nových objektů. Lepších výsledků dosahovaly myši s nedostatkem TNFR1. [105]

1.4.3.6 Genová terapie virovým vektorem

Použitím adeno-asociovaného viru (AAV) lze přinést terapeutické geny přímo do centrálního nervového systému. [106] AAV obsahuje jednu jednovláknovou DNA s obrácenou terminální repeticí (jako virový genom) a proteinovou kapsidu. [107] Při dlouhodobé expozici vykazuje nízkou imunogenicitu i patogenitu. Některé sérotypy snadno prochází hematoencefalickou bariérou. [108]

AAV byl použit k testování léčby neurodegenerativních onemocnění kvůli jeho dlouhodobé expresi a minimu nežádoucích imunitních reakcí. [109] U těchto onemocnění je považován za regulátor zánětu interleukin-2. Ten může být vložen do AAV vektoru a aplikován pacientům s AD. [110] AAV-interleukin-2 je schopen přemodelovat hipokampus a zlepšit synaptickou plasticitu. Tím dochází k obnovení paměti. Vedlejší účinky jsou vzácné. [111]

Raikwar a kol. použili terapii AAV pro snížení exprese genů maturačního faktoru glia v reaktivní mikrogliaální linii buněk. Po úpravě genomu došlo k regulaci zánětu. [112]

Zánět u AD vyvolává také amyloid- β . *Kiyota a kol.* zjistili, že znak CD74 se může navázat na prekursorový protein amyloidu. Uvedli, že AAV-zprostředkovaná exprese tohoto znaku inhibovala produkci β -amyloidu. Dále se zlepšila mozková funkce u myších modelů. [113]

Pozitivních výsledků dosáhly kombinací s AAV i některé terapeutické enzymy. Mezi ně patří například asparagin endopeptidáza a neprilysin 2. Předpokládá se, že tyto látky mohou zamezit ztrátě synaptických funkcí a degradovat amyloidní plaky. [114]

Další možností je využití alel apolipoproteinu E (APOE). Jedna z alel APOE, konkrétně APOE4, výrazně přispívá k akumulaci β -amyloidu, zvyšuje pravděpodobnost vzniku onemocnění a snižuje věk nástupu. Oproti tomu má APOE2 příznivý účinek v AD. Na myším modelu bylo popsáno zmírnění symptomů onemocnění po podávání AAV-APOE. [115]

1.4.3.7 Nervový růstový faktor

U pacientů s AD je narušen metabolismus nervového růstového faktoru (NGF), na kterém jsou závislé cholinergní neurony. Jednou z možností léčby je lokální podání NGF do cholinergního bazálního mozku. Také je možné využít kratší chemické sloučeniny, které se podobají epitopům NGF a dokáží reagovat s příslušnými receptory. [116]

1.4.3.8 Využití 3D tisku

V současné době je možné díky 3D tisku konstruovat pokročilé mikrostruktury, které slouží k podávání léčiv. [117] Například *Lindvall a Wahlberg* vytvořili tobolku, kterou tvoří biokompatibilní vnější membrána na bázi polymeru. Ta chrání vnitřní obsah proti imunitnímu systému a zároveň umožňuje výměnu živin, kyslíku a dalších látek. Uvnitř se nacházejí buňky, které jsou schopné vylučovat terapeutické látky. Kapsle mohou být implantovány do potřebných částí mozku a aktivovány řízenou

regulací. Nová technologie je výhodná pro látky, které se samy nemohou dostat přes biologické membrány do potřebného místa v mozku. [118, 119]

1.5 Substráty pro testy cholinesteráz

Existuje mnoho přírodních substrátů a také přírodních i syntetických esterů. Nejznámější jsou estery thiocholinu, jako je acetylthiocholin (ATCh), butyrylthiocholin (BTCh). [120, 121] Dále mezi thiocholinové alkanoylové estery patří isobutyrylchlorid a cyklohexan-karboxylový ester. [122] Dalším velmi vhodným substrátem je propionylthiocholin. [123] Sukcinylcholin slouží jako substrát v metodách, kde se k měření cholinu uvolněného po reakci s cholinesterázou využívá cholinoxidáza. [124]

Při stanovení aktivity cholinesteráz existují tři způsoby použití substrátů. Pokud se použije přirozený substrát, může být aktivita měřena pomocí pH. Umělý substrát se využívá pro metody s činidly, která poskytují barevnou reakci a také při voltametii. U scintilačních technik se také používá umělý substrát. Ten je ale navíc označen radioaktivní značkou. [125]

1.6 Stanovení aktivity a inhibice enzymů

Hodnotu aktivity cholinesteráz má každý jedinec jinou. Je to způsobeno fyziologickými i genetickými dispozicemi a také expozicí škodlivých látek z okolí. [126] Kvůli tomu neexistuje referenční rozmezí AChE, které by limitovalo jejich normální hladinu. Proto bývá aktivita sledována v delším časovém rozmezí a porovnána v průběhu času. [127, 128]

Testy aktivity (ale i inhibice) mají široké využití v několika oblastech, jako například ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v odvětví životního prostředí a dalších. Výsledky testů mohou být sledovány vizuálně nebo pomocí optických a elektrochemických technik. [129, 130]

Stanovení aktivity cholinesteráz se také využívá ke sledování expozice pesticidů, toxických látek nebo léků. Pokud se krevní vzorky pacientů ponechají při pokojové teplotě, reakce mezi látkami budou pokračovat a může dojít k falešným výsledkům. Proto se doporučuje vzorky okamžitě zředit ledovou destilovanou vodou

a uchovat v mrazáku. Takto upravené vzorky mohou být skladovány několik měsíců. [131, 132]

BChE není inhibována nadbytkem substrátu, jako je tomu u AChE. Oba enzymy jsou ale inhibovány například cholinem, neostigminem, ethionamidem, amonnými solemi a dalšími. Inhibitory mohou být rozděleny na reverzibilní a ireverzibilní. [133] Cholinesterázy se navzájem liší v citlivosti na různé inhibitory. [134]

1.6.1 Spektrometrické testy

Dodnes zůstává tento typ testů jedním z nejpoužívanějších technik pro stanovení aktivity nebo inhibice enzymů. [5]

1.6.1.1 UV-VIS testy

Asi nejpoužívanější metodou pro stanovení aktivity a inhibice cholinesteráz je Ellmanova metoda. V tomto testu jsou používány thiolové estery, jako je ATCh nebo BTCh. Cholinesterázy hydrolyzují substrát za vzniku thiocholinu, který následně reaguje s dithiobisnitrobenzoátem (DTNB). Vzniká tak kyselina 5-thio-2-nitrobenzoová (TNB). Absorbance výsledného produktu se měří při vlnové délce 412 nm. Tato hodnota je úměrná enzymatické aktivitě. Metoda je oblíbená zejména pro svou jednoduchost, přesnost a nízké náklady. [133] Může být také přizpůsobena pro měření mimo laboratoř, pomocí kolorimetru, který je poháněn bateriemi. Zdrojem emitujícího světla je v tomto případě karbid křemíku. [135]

Nevýhoda Ellmanovy metody pro stanovení aktivity cholinesteráz v krvi spočívá v absorbanci hemoglobinu, který interferuje s reakčním produktem při 410 nm. Kvůli této skutečnosti byla použita reakce s myelárním chromoforem. [136] Alternativou je použití kyseliny 6,6'-dithionikotinové (DTNA) místo DTNB. Další možností je 2,2-dithiopyridin (2-PDS), jehož produkt se měří při 343 nm a tak nedochází k interferenci hemoglobinu. [137]

Ellmanovu kolorimetrii lze využít i u čtečky mikrotitračních destiček, při chromatografii na tenké vrstvě, u vysokoúčinné kapalinové chromatografie nebo

při identifikaci inhibitorů pomocí kolon monolitických enzymových reaktorů v nano kapalinové chromatografii. [138–141]

Bissbort a kol. navrhli jednoduchou kinetickou metodu pro stanovení AChE v erythrocytech. Princip je založen na enzymatické redukci 2,6-diflorfenolindofenolu. V oxidované formě se jedná o modrou látku, která se redukcí mění na bezbarvou. Změna barvy je sledována při 606 nm. Díky tomu, jsou vyloučeny interakce s jinými barevnými látkami. Metoda vyřešila problémy s vysokými koncentracemi hemoglobinu, kdy absorpční hodnoty překračovaly stanovenou mez. V této metodě se totiž absorpce nezvyšuje a hodnotí se odbourávání barvy. Test je možné využít k identifikaci neznámých látek, které mohou inhibovat AChE. Je možné ji zautomatizovat. [142]

Deriváty benzoylcholinu vykazují silnější absorpenci UV než jejich produkty po hydrolýze. Pokud se benzoyl cholin použije jako umělý substrát, měří se jeho úbytek během reakce při 235 nm. [143]

Dále je možné jako substrát použít indoxylacetát. Stanovuje se jeho indigový reakční produkt. Měří se ve vlnové délce 420 – 450 nm nebo fluorimetricky. Lze jej využít i pro stanovení plazmatické BChE. [144]

1.6.1.2 Fluorimetrické testy

Fluorimetrickými testy se dosahuje vyšší citlivosti. Mají také nižší mez detekce. Fluorescenční látky mají vysokou intenzitu fluorescence a také dlouhou životnost. Jako substrát mohou být použity látky jako například resorufin butyrát a indoxylacetát. [144] Cholinesterázy tyto látky hydrolyzují na vysoce fluorescenční materiály, přičemž hydrolýza indoxylacetátu má mnohem rychlejší průběh. [145]

Parvari a kol. vyvinuli vysoce citlivý mikrofluorimetrický test pro cholinesterázy. Hydrolýzou vzniklý thiocholin reaguje se sloučeninou *N*-[4-(7-diethylamino-4-methylkumarin-3-yl)fenyl]maleimid. Vzniká modrý fluorescenční produkt s emisí při 473 nm. [146]

Jedinečné fluorescenční vlastnosti mají i polovodičové nanočástice, tzv. kvantové tečky (QDs). Cholin oxidáza v reakční směsi oxiduje cholin za vzniku

betainu a peroxidu vodíku. To způsobuje luminiscenci QDs. Pokud se zvýší koncentrace inhibitoru, sníží se obsah generovaného enzymu a klesne rychlost zhášení QDs. [147]

1.6.2 Potenciometrie

Metoda využívá rozklad přirozeného substrátu - ACh. V systému pufru fosfát-hydrogenuhličitan se měří pokles pH v čase. Využívá se při měření biologických vzorků, je levná a jednoduchá. Hlavní nevýhoda spočívá v tom, že pH může být negativně ovlivněno vedlejšími procesy v průběhu reakce. [148–150]

1.6.3 Titrimetrie

Kyselina octová, která se uvolňuje při enzymatické reakci, je neutralizována alkalickým roztokem při konstantním pH. K rozpoznání bodu ekvivalence lze použít barevný indikátor nebo potenciometr. [151]

1.6.4 Radioizotopové metody

Acetylcholin lze značit ^3H nebo ^{14}C . Měří se značený nehydrolyzovaný ACh nebo značený uvolněný acetát. Radiometrie je vhodná pro velmi nízkou aktivitu enzymu. Náklady na provoz jsou ale velmi vysoké. Je zde i riziko spojené s manipulací s radioaktivními látkami. [152]

1.6.5 Kapalinová chromatografie

Měření uvolněného cholinu může být negativně ovlivněno jeho zvyšováním v plazmě, nezávisle na aktivitě ChE. [153] Proto se ukázalo jako výhodné měřit spotřebu substrátu. To využívá například metoda, která ve vzorcích séra měří současně substrát sukcinylcholin a sukcinylmonocholelin. [154]

Spencer a kol. vyvinuli rychlou metodu pro stanovení hydrolýzy sukcinylcholinu cholinesterázou ve vzorku séra. Použili kapalinovou chromatografii spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií a iontoměničovou kolonu s přímým vstříkáním. Navíc porovnávali dva substráty: sukcinylcholin a propionylthiocholin. Tato technika je důležitá pro identifikaci pacientů, kteří jsou citliví k sukcinylcholinu. [155]

1.6.6 Hmotnostní spektrometrie

Aktivita AChE ve vzorku se sleduje pomocí postkolonového biochemického testu. Ten je založen na mísení AChE a acetylcholinu s eluátem vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Inhibitory se detekují měřením poklesu tvorby produktu. Využívá se elektrosprejový hmotnostní spektrometr. Metoda byla využita pro stanovení rivastigminu. [156] Výsledky výzkumu ukazují, že lze přesně stanovit koncentraci rivastigminu, který se nachází v lidské plasmě s EDTA. [157]

1.6.7 Polarografie

Metodou se stanovuje zvýšení tvorby thiocholinu. Údaje jsou k dispozici velmi rychle. Nevýhodou je používání rtuti, která je toxická. Rychlost hydrolyzy je zkoumána aplikací konstantního napětí mezi nasycenou kalomelovou elektrodou a kapkou rtuťové elektrody umístěné v polarografické cele. Zaznamenává se zvýšení oxidačního proudu jako funkce času. [158, 159]

1.6.8 Biosenzory

Biosenzory jsou většinou snadno použitelné a cenově dostupnější ve srovnání s jinými analytickými metodami. [160] Nejvíce rozšířené jsou biosenzory, které jako rozpoznávací biologický prvek využívají enzymy. Jsou založeny na metodě elektrochemické transdukce. [161]

1.6.8.1 Elektrochemické biosenzory

a) Konduktometrické

Využívají měření malé změny vodivosti, které jsou způsobeny enzymatickou reakcí. Metoda nevyžaduje použití referenční elektrody. [162]

b) Potenciometrické

Detekuje se rychlost změny pH. Byla navržena membrána z polyvinylchloridu, v kombinaci s plazmovým zářením. Na povrchu membrány se nachází film obsahující aminoskupiny.

[163, 164]

c) Amperometrické

Jedná se o nepřímou detekci cholinesteráz pomocí oxidačního proudu peroxidu vodíku. Biosenzor může být založený na elektrodepozici bimetalových nanočástic zlata a platiny na elektrodě ze skleněného uhlíku. Povrch elektrody tvoří 3-aminopropyltriethoxy silan. [165, 166]

d) Square-Wave voltametrické

Využívají impulsní průběh. Opakovanou oxidací a redukcí analytu stejného druhu se zvyšuje detekce. Jedná se o velmi rychlou metodu. [167]

1.6.8.2 Optické biosenzory

Tyto senzory se dají využít i pro dálkové měření, jelikož využívají optická vlákna. Nejsou rušeny elektrickým polem, proto je snadné vytvořit více senzorů. Většina přístrojů je přenosných, proto je lze použít rovnou v terénu. Velká část optických biosenzorů obsahuje barevné indikátory, které jsou zaměřeny na změnu pH. [167]

1.6.8.3 Fototermické biosenzory

Společnosti *Pogacnik* a *Franko* vyvinuli fotočlánekový biosenzor pro AChE, který dosahuje nízkých detekčních limitů. Do kolony z polyetheretherketonu byly vloženy skleněné kuličky s AChE, které měly kontrolované velikosti pórů. Detekuje se změna indexu lomu vzorku po zvýšení teploty. [168]

1.6.8.4 Biosenzory QCM (křemenné krystalové mikrováčky)

Citlivost senzoru je zesílena díky srážení enzymatických produktů. Enzymy se nachází na povrchu elektrod ze zlata, nebo zlato-křemičitých krystalech. Aktivitu enzymu je možné sledovat v reálném čase, a to měřením změn hmotnosti na krystalovém povrchu. [169, 170]

1.6.9 Mikročipy

Reagencie jsou smíchávány v mikročipových kanálech, pomocí elektrokinetického transportu, který je řízen počítačem. Produkt je detekován

laserovou fluorescencí. Fluorescenční signál je snižován díky inhibitorům. Čipy měří několik čtverečních milimetrů až centimetrů a umožňují mnoho laboratorních funkcí s extrémně malým objemem kapalin. [167, 171]

1.6.10 Metoda suché kapky krve

Pomocí aktivity acetylcholinesterázy se snadno měří například expozice organofosfátů. U dětí je však problém s odběrem žilní krve a také se skladováním vzorků. Zkumavky s tekutou krví jsou však náchylné na okolní podmínky, proto může být transport do vzdálené laboratoře spojen s určitými problémy. Proto se dá použít krevní skvrna na speciálním filtračním papíře. Krevní skvrna se vysuší, vykrojí se její příslušná část a vloží do pufru. Dále se postupuje podle Ellmanovy metody. *Hilborn E. a Padilla S.* srovnávaly metodu suché kapky krve s žilním odběrem. V jejich práci byla aktivita ChE v krevní kapce o 40 % nižší než naměřená hodnota ze zkumavky s žilní krví. Proto tyto hodnoty nelze spolu srovnávat. Nicméně metoda je výhodná pro měření expozice látek v terénních podmínkách u dětí v průběhu času, kdy je možné sledovat nárůst nebo pokles expozice. [172]

1.6.11 Aktivita cholinesteráz v lidských slinách

Thiphom a kol. použili pro měření aktivity ChE lidské sliny pomocí upravené Ellmanovy metody. Měřili nepřímo aktivitu slinné acetylcholinesterázy (SACHE) a butyrylcholinesterázy (SBChE) pomocí iontů kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové. Tyto ionty vznikly reakcí thiolového činidla a thiocholinem. Jako substrát sloužili acetylthiocholin a butyrylthiocholin. [173]

1.7 Aplikace testů

Testy aktivity a inhibice cholinesteráz se využívají v mnoha oblastech, jako například v klinické diagnostice nemocí, v hodnocení životního prostředí nebo při výrobě léků. [174]

a) Klinická diagnostika

V lidské plazmě se nachází méně než 2 % AChE. Lidská krev obsahuje 5 různých esteráz. Každá z nich se podílí na hydrolýze různých substrátů. [175]

Například karbamátové pesticidy a organofosfáty nevratně inhibují aktivitu ChE. Acetylcholin se díky tomu hromadí a může dojít až ke zvýšenému slinění, bolestem hlavy, křečím nebo špatnému dýchání. Proto jsou tyto testy zařazeny do diagnostiky pro posouzení expozice látek pro člověka. [176]

Stanovení BChE v plazmě nebo séru se provádí častěji než stanovení AChE v erythrocytech. Zatím neexistuje pravidlo, které by rozlišilo, jaký enzym bude více inhibován danou sloučeninou. Proto se nejčastěji měří aktivita obou enzymů v plné krvi. Tento postup mimo jiné eliminuje potřebu separace jednotlivých složek krve. [177]

b) Hodnocení životního prostředí

Výše zmíněné pesticidy a karbamáty se běžně používají v zemědělství. Mohou se tedy snadno dostat do ovzduší, vody nebo kontaminovat potraviny. Svým toxickým účinkem inhibují ChE u bezobratlých i obratlovců. Tyto pesticidy jsou poměrně těkavé, ale jejich inhibující účinky mohou přetrvávat déle. [178, 179]

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zavést spektrofotometrickou metodu s využitím dithiodipyridinu jako chromogenu, aby ji bylo možné použít pro testování inhibitorů cholinesteráz s použitím erytrocytů jako zdroje AChE.

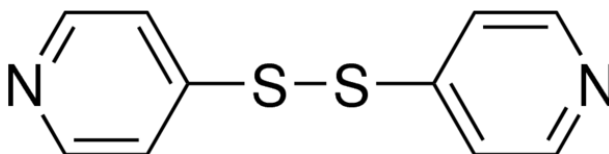
Dithiodipyridin byl testován z důvodu své absorpční vlnové délky, při které nebyl výsledek ovlivněn absorpcí hemoglobinu. Díky tomu lze použít více koncentrované vzorky krve než při použití DTNB a docílit tím lepší přesnosti detekce.

Dalším úkolem bylo stanovení inhibiční účinnosti u deseti bis(pyridiniových) solí a jejich porovnání se standardy (galantamin, rivastigmin, takrin). Dále stanovit typ inhibice a rozdělovací koeficient spolu s topologickou molekulární polární povrchovou plochou.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a roztoky

- **Acetylthiocholin jodid** (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - Navážka 28,92 mg ATCh byla rozpuštěna v 1 ml fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4). Takto připravený roztok (0,1M) byl podle potřeby měření dále ředěn fosfátový pufr.
- **Demineralizovaná voda**
- **Dimethylsulfoxid** – DMSO (Penta, Česká republika)
 - Organické rozpouštědlo použito pro rozpouštění vzorků inhibitorů.
- **4,4'-dithiodipyridin** - PDS (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)
 - Roztok PDS byl rozpuštěn v destilované vodě s přídavkem etanolu (1% etanol v RS) a výsledná koncentrace byla 1mM.
 - Chemická struktura PDS je uvedena na obrázku 6.



Obrázek 6 Struktura PDS [180]

- **Erytrocyty od dobrovolných dárců**
 - Krev pro získání erytrocytů byla zpracována dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.
 - Pro analýzu byly použity erytrocyty ředěné v poměru 1:4.
- **Fosfátový pufr (0,1M, pH 7,4)**
 - 11,49 g Na₂HPO₄ bylo rozpuštěno v 810 ml destilované vody
 - 3,4 g KH₂PO₄ rozpuštěno v 250 ml destilované vody
 - roztok KH₂PO₄ byl pomalu přidáván k Na₂HPO₄ až do pH 7,4
- **Inhibitory č. 1-10**
 - Látky byly připraveny a jejich čistota byla ověřena na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové pod vedením doc. PharmDr. Martina Krátkého, Ph.D.

- Testované inhibitory byly rozpuštěné v DMSO na koncentraci 0,01M a následně ředěny destilovanou vodou dle potřeby. Seznam testovaných inhibitorů je uveden v tabulce 1.

- **1-oktanol** (Sigma-Aldrich Praha, ČR)

- **Standardy:**

Rivastigmin tartát, (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)

Takrin hydrochlorid, (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)

Galantamin hydrobromid, (Sigma Aldrich s.r.o., Česká republika)

Standardy byli rozpouštěné v destilované vodě na koncentraci 0,02M a následně ředěny dle potřeby měření.

Tabulka 1 Testované inhibitory, obecná struktura a použité substituenty.

Číslo inhibitoru	R
1	CH ₂ OH
2	OH
3	COOH
4	CN
5	Et
6	Me
7	COOMe
8	COMe
9	CH ₂ C ₆ H ₅
10	OMe

3.2 Přístroje a pomůcky:

- centrifuga (Eppendorf 5804/5804 R, Německo)
- centrifuga MPW-56 (Unimed, Praha)

- spektrofotometr Agilent 8453, UV/VIS (Agilent Technologies, Německo)
- vortex (Heidolph multi reax, Německo)
- skleněné kyvety – vnitřní průměr 1 cm
- mikropipety (Eppendorf, Německo)
- odměrné baňky, kádinky, plastové zkumavky

3.3 Zpracování krve

Postup:

Čerstvá krev byla odebrána zdravým dobrovolným dárcům do odběrových zkumavek s obsahem EDTA.

Pomocí centrifugy byly krevní buňky odděleny od plazmy. Centrifugace byla prováděna při 3000 otáčkách za minutu. Teplota byla nastavena na 4 °C a cyklus trval 15 minut. Oddělená plazma byla odpipetována do plastových mikrozkušavek a v mrazáku uchovávána při -80 °C. Blanka nad vrstvou erytrocytů, obsahující leukocyty a trombocyty, byla odstraněna do biologického odpadu.

Erytrocyty byly ředěny redestilovanou vodou v poměru 1:3. Takto upravené erytrocyty byly opět centrifugovány při 3000 otáčkách za minutu. Teplota byla nastavena opět na 4 °C, ale doba centrifugace byla prodloužena na 20 minut. Následně byly erytrocyty dle potřeby analýzy naředěny a rozpipetovány do plastových mikrozkušavek. Byly uchovány v mrazáku při teplotě -80 °C pro pozdější analýzu.

3.4 Testování reakčních podmínek

V prvním kroku se stanovovaly optimální podmínky, kdy byla sledována různá koncentrace substrátu, činidla PDS a erytrocytů.

Tyto parametry byly testovány za účelem získání optimálních podmínek pro spektrofotometrické měření aktivity cholinesteráz. Jako chromogenní činidlo při reakcích sloužil roztok PDS.

Pro jednotlivá měření byly nastaveny níže uvedené podmínky a byla měřena závislost absorbance (A) na čase (t):

- vlnová délka 324 nm
- doba analýzy 150 s
- start time (odložený start) 5 s
- interval měření 5 s
- celkový objem reakční směsi 1000 μ l

3.4.1 Testování různé koncentrace substrátu ATCh

Postup:

- Srovnávací roztok:

Do skleněné kyvety bylo napipetováno 50 μ l PDS (1mM), 945 μ l fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4) a 5 μ l erytrocytů (ředění 1:4). Směs byla inkubována 2 minuty při pokojové teplotě a poté vložena do spektrofotometru.

- Vzorek:

Do kyvety bylo napipetováno 50 μ l PDS (1mM), 845 μ l fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4) a 5 μ l erytrocytů (ředění 1:4). Po dvou minutách inkubace byl vzorek vložen do spektrofotometru a při spuštění analýzy bylo rychle napipetováno 100 μ l příslušné koncentrace substrátu (ATCh). Tím byla spuštěna enzymatická reakce. Celkem bylo testováno 7 různých koncentrací substrátu v rozmezí $3 \cdot 10^{-5}$ až $2 \cdot 10^{-4}$ M a každá koncentrace byla měřena alespoň dvakrát. Následně byl sestrojen graf závislosti rychlosti na koncentraci substrátu a koncentraci PDS (obrázek 8).

3.4.2 Testování různých koncentrací činidla PDS

Postup:

- Srovnávací roztok:

Příslušný objem PDS (1mM) byl pipetován podle zvolené výsledné koncentrace v celkové reakční směsi. K němu bylo přidáno 5 μ l erytrocytů

(ředěny 1:4). Celkový objem byl doplněn fosfátovým pufrém (0,1M, pH 7,4) na 1000 μ l. Inkubace probíhala 2 minuty. Pro každou testovanou koncentraci PDS byl připraven nový srovnávací roztok.

- Vzorek:

K testovanému objemu PDS (1mM) bylo přidáno 5 μ l erytrocytů (ředěny 1:4). Fosfátovým pufrém (0,1M, pH 7,4) byl objem doplněn na 900 μ l. Po 2minutové inkubaci bylo přidáno k reakční směsi 100 μ l ATCh o požadované koncentraci v rozmezí $3 \cdot 10^{-5}$ až $2 \cdot 10^{-4}$ M. Koncentrace PDS v reakční směsi byly zvoleny v rozmezí od $2,5 \cdot 10^{-5}$ do $7,5 \cdot 10^{-5}$ M. Celkem bylo testovaných 6 různých koncentrací PDS, a to v duplikátu. Vyhodnocení probíhalo společně s testováním koncentrace ATCh (obrázek 8).

3.4.3 Testování různých koncentrací erytrocytů

Postup:

- Srovnávací roztok:

Do kyvety bylo napipetováno 50 μ l PDS (1mM) a testovaný objem erytrocytů (ředěny 1:4). Objem byl doplněn fosfátovým pufrém (0,1M, pH 7,4) na 1000 μ l. Pro každý testovaný objem erytrocytů byl připraven nový srovnávací roztok.

- Vzorek:

K 50 μ l roztoku PDS (1mM) byl přidán příslušný objem erytrocytů (ředěny 1:4). Fosfátovým pufrém (0,1M, pH 7,4) byl objem doplněn na 900 μ l. Po spuštění analýzy bylo k reakční směsi napipetováno 100 μ l ATCh v rozmezí koncentrací $3 \cdot 10^{-5}$ až $2 \cdot 10^{-4}$ M.

Testovány byly 4 objemy erytrocytů, a to 5, 7, 10 a 15 μ l. Byla sestrojena závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu a objemu erytrocytů (obrázek 9).

3.5 Testování inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů a standardů

Příprava standardů a testovaných inhibitorů:

Jednotlivé standardy a vzorky inhibitorů (1-10) byly pro potřeby analýzy naředěny destilovanou vodou na požadovanou koncentraci.

Postup:

- Srovnávací roztok:

K 50 μl PDS (1mM) bylo přidáno 940 μl fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4) a 10 μl erytrocytů (ředěny 1:4). Inkubace probíhala 2 minuty. Srovnávací roztok byl pro všechny testované inhibitory stejný.

- Neinhibovaná reakce:

Do kyvety bylo napipetováno 50 μl PDS (1mM), 840 μl fosfátového pufru (0,1M, pH 7,4) a 10 μl erytrocytů (ředěny 1:4). Směs byla inkubována 2 minuty. Po spuštění analýzy bylo přidáno 100 μl substrátu ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$). Neinhibovaná reakce byla změřena 3x.

- Inhibovaná reakce:

Bylo pipetováno 50 μl PDS (1mM) a 10 μl erytrocytů (ředěny 1:4). Následně byl ke směsi přidán roztok standardu nebo testovaného inhibitoru 1-10 dle testované koncentrace. Koncentrační rozmezí je uvedeno v tabulce 2. Objem byl doplněn na 900 μl fosfátovým pufrem (0,1M, pH 7,4). Inkubace trvala 2 minuty. Na začátku analýzy bylo přidáno 100 μl ATCh ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$). Bylo testováno 5 různých koncentrací od každého standardu a inhibitoru. Každá koncentrace inhibitoru/standardu byla proměřena 3x.

Ze získaných hodnot absorbancí byla vypočítána reakční rychlost, jako změna absorbance za určitý čas. Následně byl vypočítán poměr reakčních rychlostí neinhibované reakce (v_0) k inhibované reakci (v_i). Byl sestrojen graf závislosti poměru reakčních rychlostí na koncentraci inhibitoru v reakční směsi. Z rovnice regrese byla

vypočítána 50% inhibiční koncentrace (IC_{50}). Její hodnota se rovná koncentraci inhibitoru, která sníží rychlost enzymatické reakce na 50 %. [181]

Tabulka 2 Koncentrační rozmezí standardů a vzorků inhibitorů

Inhibitor	Koncentrační rozmezí (M)
1	$1,5 \cdot 10^{-8}$ - $10 \cdot 10^{-8}$
2	$4 \cdot 10^{-7}$ - $2 \cdot 10^{-6}$
3	$1 \cdot 10^{-7}$ - $1,5 \cdot 10^{-6}$
4	$6 \cdot 10^{-8}$ - $1,5 \cdot 10^{-7}$
5	$1,5 \cdot 10^{-8}$ - $4 \cdot 10^{-8}$
6	$1 \cdot 10^{-8}$ - $1 \cdot 10^{-7}$
7	$1,5 \cdot 10^{-8}$ - $2,5 \cdot 10^{-7}$
8	$3 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$
9	$1,5 \cdot 10^{-9}$ - $2 \cdot 10^{-8}$
10	$2 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-6}$
Takrin	$1 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-8}$
Galantamin	$3 \cdot 10^{-8}$ - $1,5 \cdot 10^{-7}$
Rivastigmin	$1 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-5}$

3.6 Stanovení typu inhibice

Typ inhibice byl stanoven u vzorku číslo 1. Pro analýzu byly použity 4 různé koncentrace ATCh: $1 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $2 \cdot 10^{-4}$ a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Při každé koncentraci ATCh bylo testováno 5 různých koncentrací inhibitoru v koncentračním rozmezí od $1,5 \cdot 10^{-8}$ do $9,8 \cdot 10^{-8}$ M. K reakční směsi bylo přidáno vždy 5 μ l erytrocytů (1:4) Z vypočítaných hodnot rychlosti neinhibované reakce v_0 a inhibované reakce v_i , byly určeny jejich převrácené hodnoty $1/v_0$ a $1/v_i$. Byla sestrojena grafická závislost převrácené hodnoty rychlosti reakce na převrácené hodnotě koncentrace substrátu $1/[S]$ (tj. výnos podle Lineweavera a Burka), jak je znázorněno na obrázku 10.

Podle výsledného grafu a vypočítaných hodnot Michaelisovy konstanty K_M a mezní rychlosti V_{max} byl určen typ inhibice.

Postup:

Postup měření byl stejný jako u testování inhibiční účinnosti. Podrobný popis je uveden v kapitole 3.5.

3.7 Stanovení rozdělovacího koeficientu v systému *n*-oktanol:voda

Rozdělovací koeficient ($\log P$) představuje poměr koncentrací látek rozpuštěných v systému dvou nemísitelných rozpouštědel. Popisuje lipofilitu látky. Čím nižší je hodnota rozdělovacího koeficientu, tím nižší je rozpustnost látky v organické fázi. [182]

Rozdělovací koeficient je bezrozměrná veličina. Většinou je vyjádřena v logaritmickém tvaru. Jeho hodnota závisí na okolních podmínkách a určuje schopnost prostupu přes biologické membrány. Rozpustnost ve vodě je však také důležitá vlastnost, protože dopravu léčiva na místo potřeby zprostředkovává krev. Pokud je však léčivo velmi rozpustné ve vodě, snižuje se jeho doba účinku. [183]

Lipinski a kol. definovali tzv. Lipinského pravidlo 5. To znamená, že aby byla látka hodnocena jako účinná, měla by splňovat následující kritéria:

- molekulová hmotnost ≤ 500
- $\log P \leq 5$
- ≤ 5 skupin v molekule, které jsou schopné předat atom vodíku
- ≤ 10 skupin, které přijmou vodíkové atomy a vytvoří vodíkové vazby. [183]

Postup:

- Srovnávací roztok:

Pro spektrofotometrické stanovení absorbance byl použit jako srovnávací roztok 1 ml *n*-oktanolu.

- Stanovení koncentrace inhibitoru v oktanolové fázi:

K 1,5 ml *n*-oktanolu bylo přidáno 10 μ l daného inhibitoru, který byl naředěn na koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ M roztokem DMSO. Zkumavky byly intenzivně protřepávány po

dobu 15 minut. Ze směsi byl následně odpipetován 1 ml do kyvety. Byla změřena absorbance A_1 , která odpovídá 100 % inhibitoru v organické fázi. Vlnová délka byla nastavena podle absorpčního maxima inhibitoru. Každý vzorek byl vyhodnocen 2x.

- Stanovení koncentrace inhibitoru ve vodné fázi:

Do každé zkumavky byly připraveny 3 ml směsi *n*-oktanolu a demineralizované vody v poměru 1:1. Ke směsi bylo pipetováno 10 μ l roztoku inhibitorů o koncentraci $1 \cdot 10^{-2}$ M. Zkumavky byly 15 minut intenzivně protřepávány. Následovala 10minutová centrifugace při 3000 otáček za minutu. Do připravených kyvet byl odpipetován 1 ml vrchní oktanolové vrstvy a byla změřena její absorbance A_2 . Hodnota absorbance odpovídala procentuálnímu obsahu inhibitoru v organické fázi. Obsah inhibitoru ve vodné fázi byl určen dopočítáním do 100 %. Dále byla vypočítána hodnota logP pro jednotlivé inhibitory jako poměr koncentrace inhibitoru v organické fázi ke koncentraci ve vodné fázi.

Stanovení rozdělovacího koeficientu bylo provedeno pro všechny standardy a testované inhibitory.

3.8 Stanovení topologické molekulární polární povrchové plochy

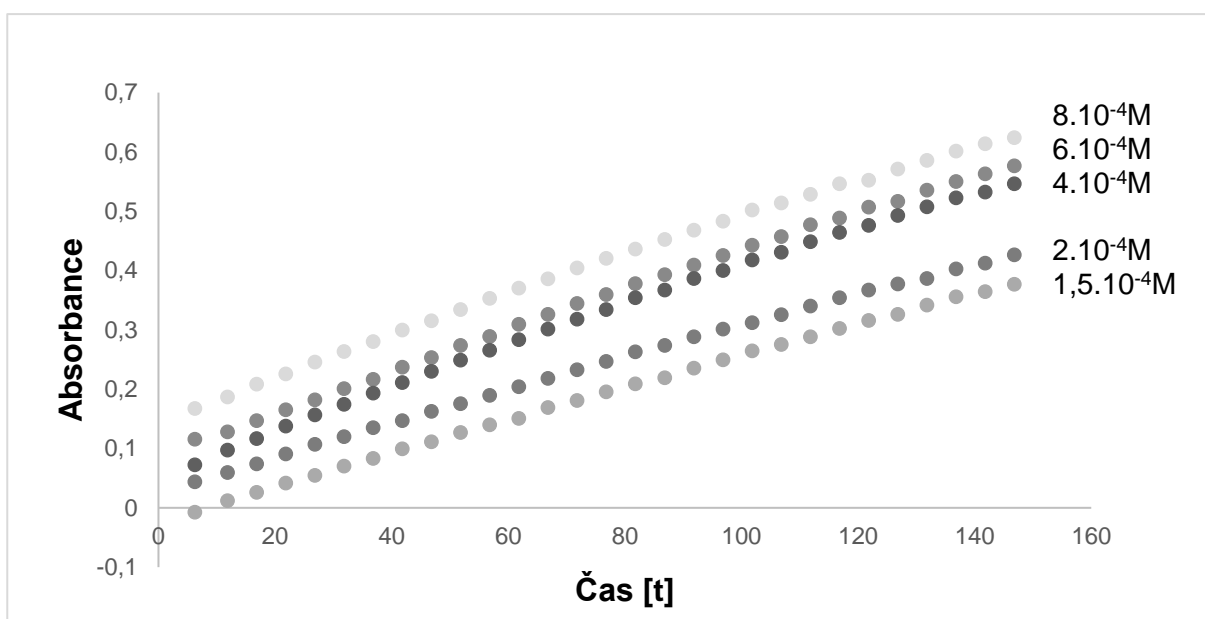
Topologická molekulární polární povrchová plocha (tPSA) představuje vedle lipofility jednu z významných vlastností orálně podávaného léčiva, aby bylo dosaženo co nejvíce správného účinku. Výpočet vychází z 2D struktury molekuly. Lze jím zjistit, zda má molekula schopnost vytvářet vodíkové můstky, které umožňují absorpci ve střevech a prostup přes hematoencefalickou bariéru. Polární povrch molekuly označuje součet povrchů polárních atomů v molekule. Rozměr je udáván v jednotce \AA^2 , přičemž $1 \text{\AA} = 10^{-10} \text{ m}$. Látky se zvýšenou propustností přes biologické membrány mají hodnotu tPSA menší nebo rovnu 70\AA^2 . [183]

Výpočet tPSA pro dané inhibitory byl proveden společně s rozdělovacím koeficientem pomocí programu ChemDraw (kapitola 3.7).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Testování reakčních podmínek

Jak je uvedeno v kapitole 3.4, byly testovány různé podmínky pro stanovení aktivity a inhibice AChE z lidských erytrocytů. Měření probíhalo pomocí spektrofotometrické metody, kde jako chromogen sloužil roztok PDS. Absorbance byla měřena při vlnové délce 324 nm. Byly testovány různé koncentrace ATCh, PDS a erytrocytů. Vhodnost testovaných podmínek byla posuzována dle reakčních rychlostí. Závislost změny absorbance na čase reakce je znázorněna na obrázku 7.



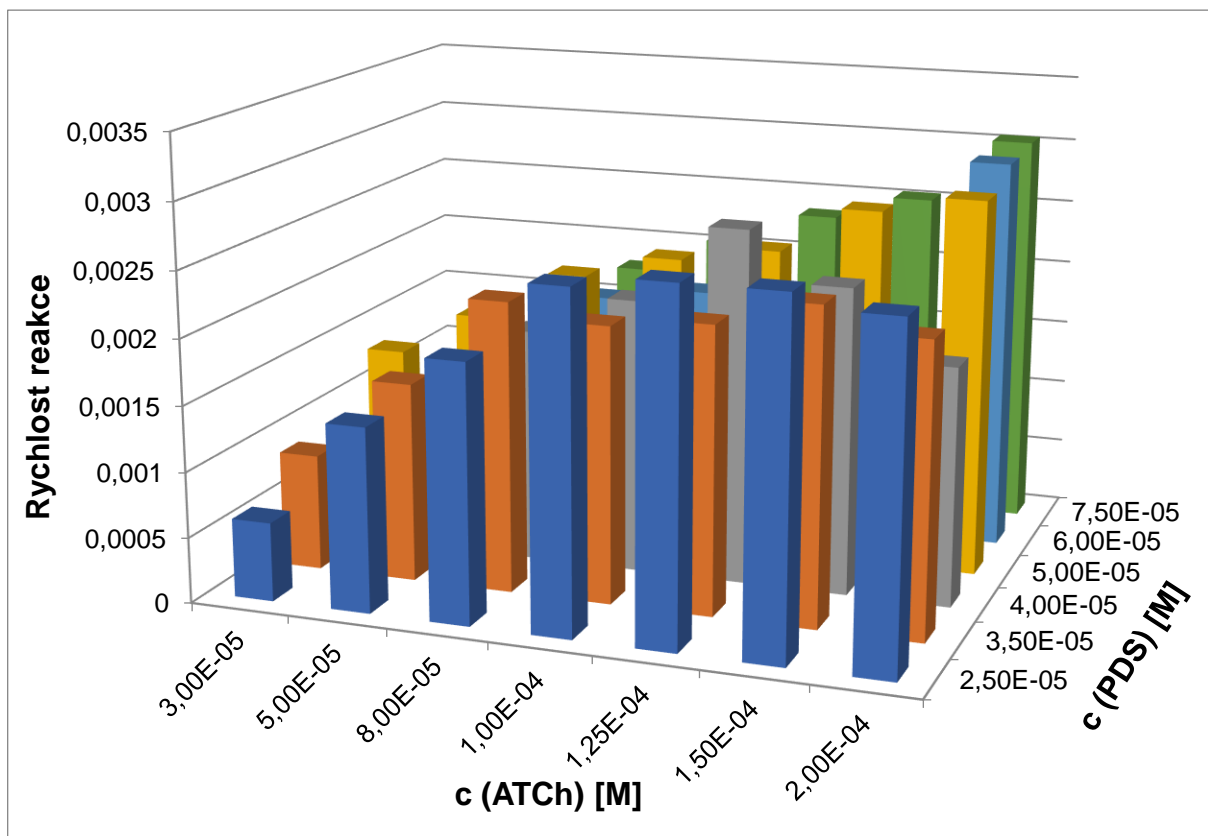
Obrázek 7 Závislost absorbance na čase reakce

V tomto případě bylo testováno 50 μ l PDS (1mM), 5 μ l erytrocytů (ředění 1:4) a různé koncentrace ATCh. Podle průběhu reakce bylo poté vybráno několik koncentrací ATCh pro další testování. Se zvyšující se koncentrací substrátu dochází při stejných podmínkách k nárůstu hodnot absorbance.

4.1.1 Testování různých koncentrací substrátu a PDS

Podrobný postup měření je uveden v kapitole 3.4.1 a 3.4.2. Při analýze byl používán objem 5 μ l erytrocytů (ředěny 1:4).

Z hlediska toho, že se zvyšujícím se objemem erytrocytů byla odezva měření téměř stejná, byl pro další testování zvolen objem 5 μl . Výsledný graf je znázorněn na obrázku 8.



Obrázek 8 Závislost rychlosti reakce na koncentraci ATCh a PDS

Z grafu je patrné, že pokud roste koncentrace substrátu, zvyšuje se u většiny případů i rychlost reakce. Nejvyšších hodnot rychlosti je dosaženo při koncentraci ATCh $2 \cdot 10^{-4} \text{M}$ společně s koncentracemi PDS $5 \cdot 10^{-5}$, $6 \cdot 10^{-5}$ a $7,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Proto byla tato koncentrace substrátu využívána v dalších měřeních této práce.

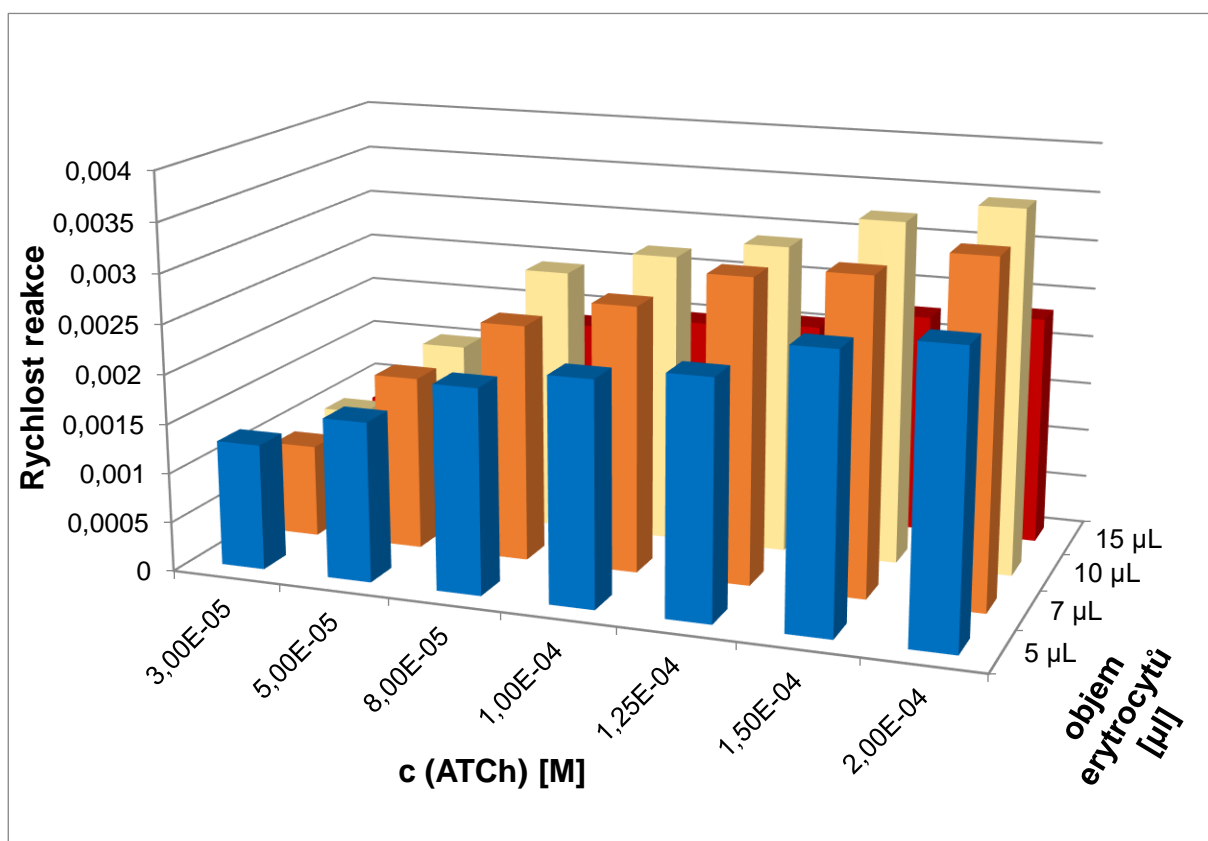
Někteří autoři ve svých pracích uvádí koncentraci PDS $8 \cdot 10^{-5} \text{M}$ [184, 185]

Nám se podařilo získat relevantní výsledky při nižší koncentraci PDS, konkrétně $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Při použití této koncentrace dosahovala rychlost reakce ve většině případů při použití různých koncentrací ATCh nejvyšších hodnot vůči ostatním koncentracím PDS a proto byla vybrána pro další testování.

4.1.2 Testování různých koncentrací erytrocytů

Pro určení optimální koncentrace erytrocytů byly testovány celkem 4 různé objemy podle postupu v kapitole 3.4.3. Při reakcích byl používán roztok PDS o koncentraci $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$, která vyšla z předchozího testování jako optimální.

Každé měření bylo provedeno vždy 3x. Z hodnot absorbancí byly vypočítány rychlosti reakcí. Z jejich průměrných hodnot byl sestrojen graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci ATCh a objemu erytrocytů (obrázek 9).



Obrázek 9 Závislost rychlosti reakce na objemu erytrocytů a koncentraci ATCh

Z grafu na obrázku 9 lze vyčíst, že při použití 5, 7 a 10 μl erytrocytů byly rychlosti reakcí při dané koncentraci substrátu přibližně stejné. U objemu 15 μl erytrocytů však došlo k jejich výraznému poklesu. Tenhle pokles reakční rychlosti může být způsoben skutečností, že při tomto objemu erytrocytů docházelo při měření k částečně nelineárnímu průběhu reakce. Tato skutečnost mohla být způsobena vyšší koncentrací hemoglobinu. Proto se jako vhodné množství erytrocytů pro další

měření vybral objem 5 μl , a to hlavně z důvodu, že odezva u jiných objemů erytrocytů se významně nelišila. Proto byl vybrán co nejnižší objem erytrocytů.

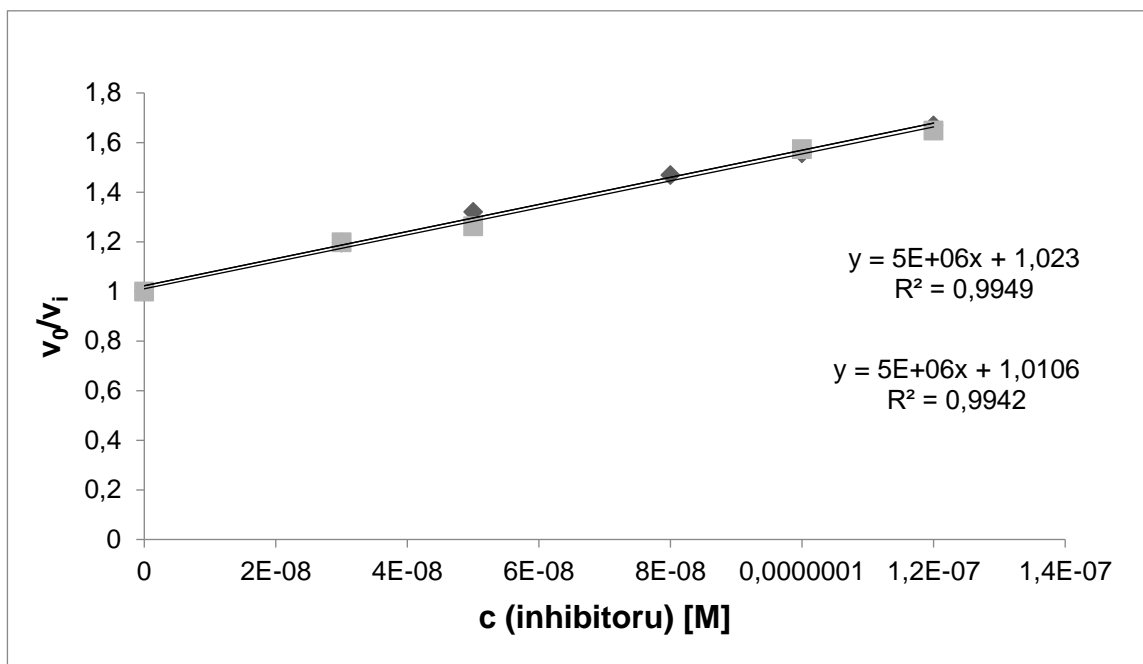
V předchozím měření, kdy byla testována optimální koncentrace substrátu, byla pro měření vybrána koncentrace $2 \cdot 10^{-4}\text{M}$. U objemu 5 μl erytrocytů dosahuje tato koncentrace ATCh nejvyšší hodnoty rychlosti reakce.

Dále je možné si všimnout, že nejvyšší použitá koncentrace ATCh s hodnotou $8 \cdot 10^{-4}\text{M}$, způsobila snížení reakční rychlosti u všech testovaných objemů erytrocytů oproti předchozí nižší koncentraci. Je tedy možné zhodnotit, že u vyšších koncentrací ATCh než je $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ dochází k substrátové inhibici. Tenhle jev je často diskutován i v literatuře. [186–189]

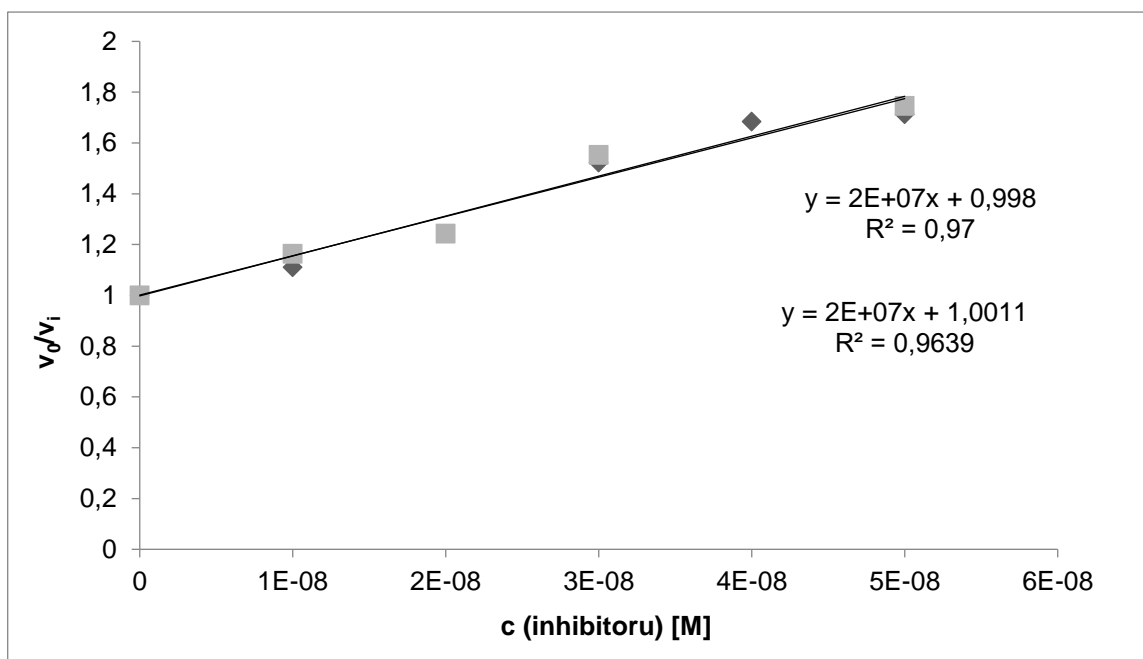
4.2 Testování inhibiční účinnosti

Celkem byla spektrofotometrickou metodou měřena změna absorbance v čase pro různé koncentrace 10 bispyridiniových solí a 3 standardů. Ze závislosti A vs. t neinhibovaných a inhibovaných reakcí byl vypočten poměr reakčních rychlostí, který sloužil pro sestavení grafické závislosti, a následně byla vypočtena inhibiční koncentrace všech testovaných látek. Detailní popis stanovení IC_{50} je uveden v kapitole 3.5.

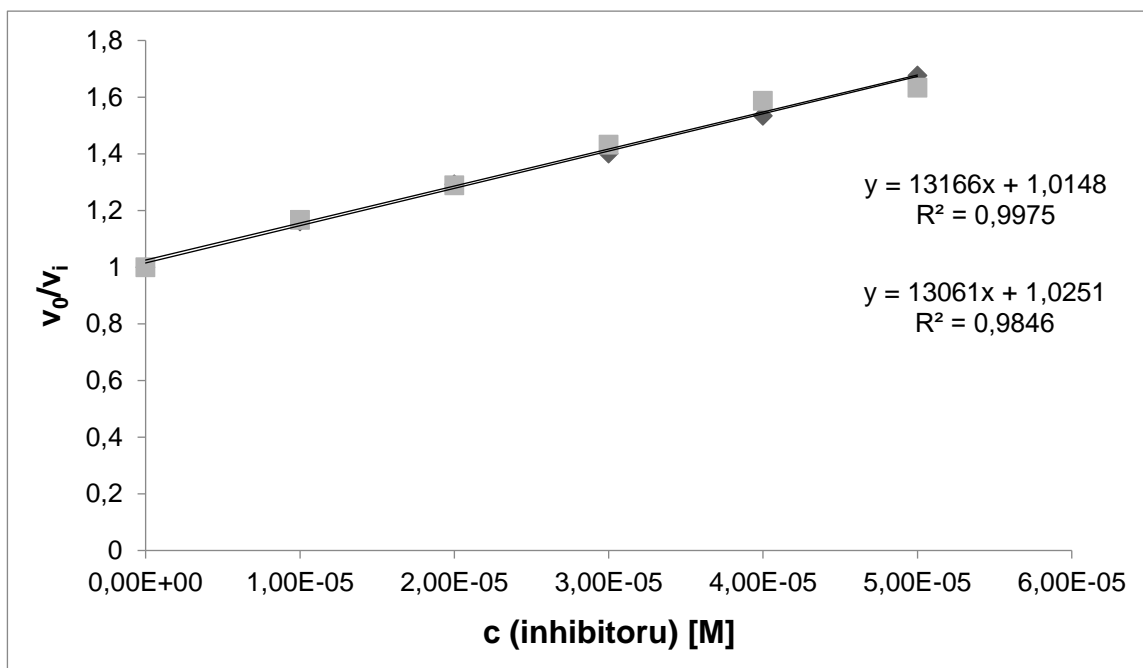
Jednotlivé grafy vyhodnocení standardů jsou znázorněny na obrázcích 10 (galantamin), 11 (rivastigmin) a 12 (takrin).



Obrázek 10 Závislost poměru reakčních rychlostí na koncentraci galantaminu



Obrázek 11 Závislost poměru reakčních rychlostí na koncentraci rivastigminu



Obrázek 12 Závislost poměru reakčních rychlostí na koncentraci takrinu

Z rovnic regrese přímkové závislosti jednotlivých grafů byla vypočítána hodnota IC_{50} jako x , kdy $y = 2$ (podle definice IC_{50}). Pomocí Excelu byla vypočítána i směrodatná odchylka.

Zde je uveden příklad výpočtu IC_{50} pro rivastigmin:

a)

$$y = 13166x + 1,0148$$

$$2 = 13166x + 1,0148$$

$$x = 7,48 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

b)

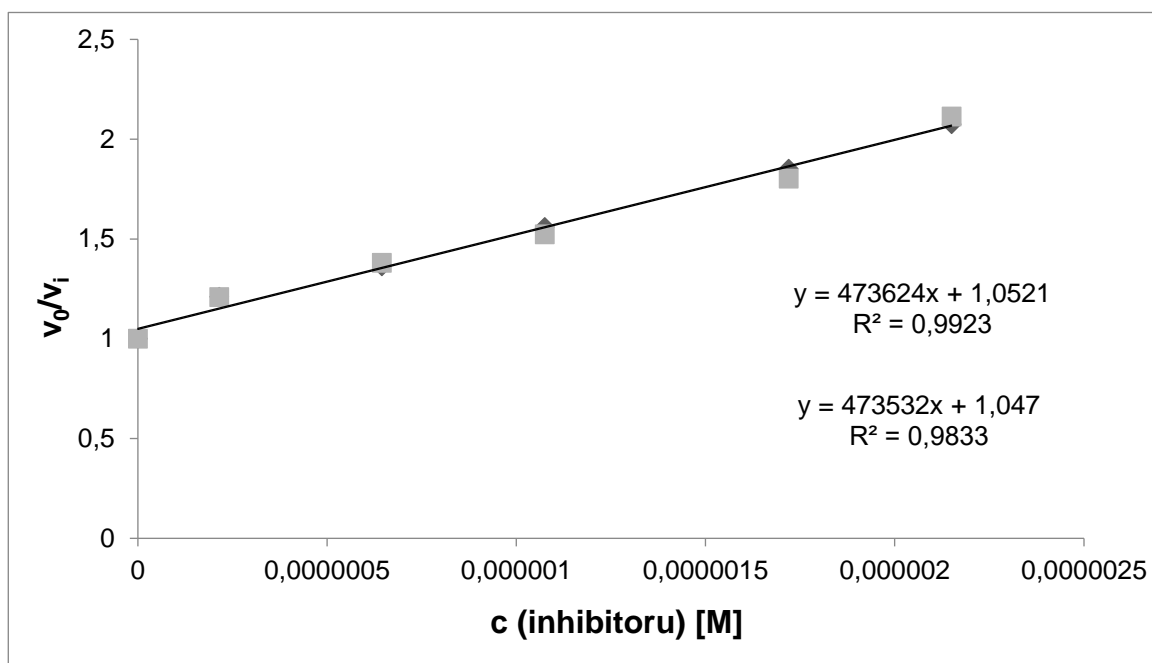
$$y = 13061x + 1,0251$$

$$2 = 13061x + 1,0251$$

$$x = 7,46 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$\underline{\underline{\text{Průměr } IC_{50} = 7,47 \cdot 10^{-5} \text{ M}}}$$

Stejným způsobem byly vyhodnoceny i všechny další standardy a testované inhibitory s číslem 1-10. Na obrázku 13 je znázorněna závislost poměru rychlosti reakcí na koncentraci inhibitoru číslo 10.



Obrázek 13 Závislost poměru reakčních rychlostí na koncentraci inhibitoru č. 10

Výsledné hodnoty inhibičních koncentrací IC₅₀ pro všechny vzorky a standardy včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 Výsledné hodnoty IC₅₀

Inhibitor	IC ₅₀ (μM) ± STD
1	0,09 ± 0,01
2	1,27 ± 0,06
3	1,10 ± 0,03
4	0,25 ± 0,01
5	0,05 ± 0,01
6	0,10 ± 0,01
7	0,30 ± 0,001
8	19,03 ± 0,41

Tabulka 3 (pokračování) Výsledné hodnoty IC₅₀

Inhibitor	IC ₅₀ (μM) ± STD
9	0,01 ± 0,001
10	2,01 ± 0,01
Galantamin	0,20 ± 0,01
Rivastigmin	74,74 ± 0,13
Takrin	0,05 ± 0,001

Všechny testované látky, které byly použity v experimentu, způsobovali inhibici AChE. Reakční rychlost se snižovala s rostoucí koncentrací jednotlivých inhibitorů.

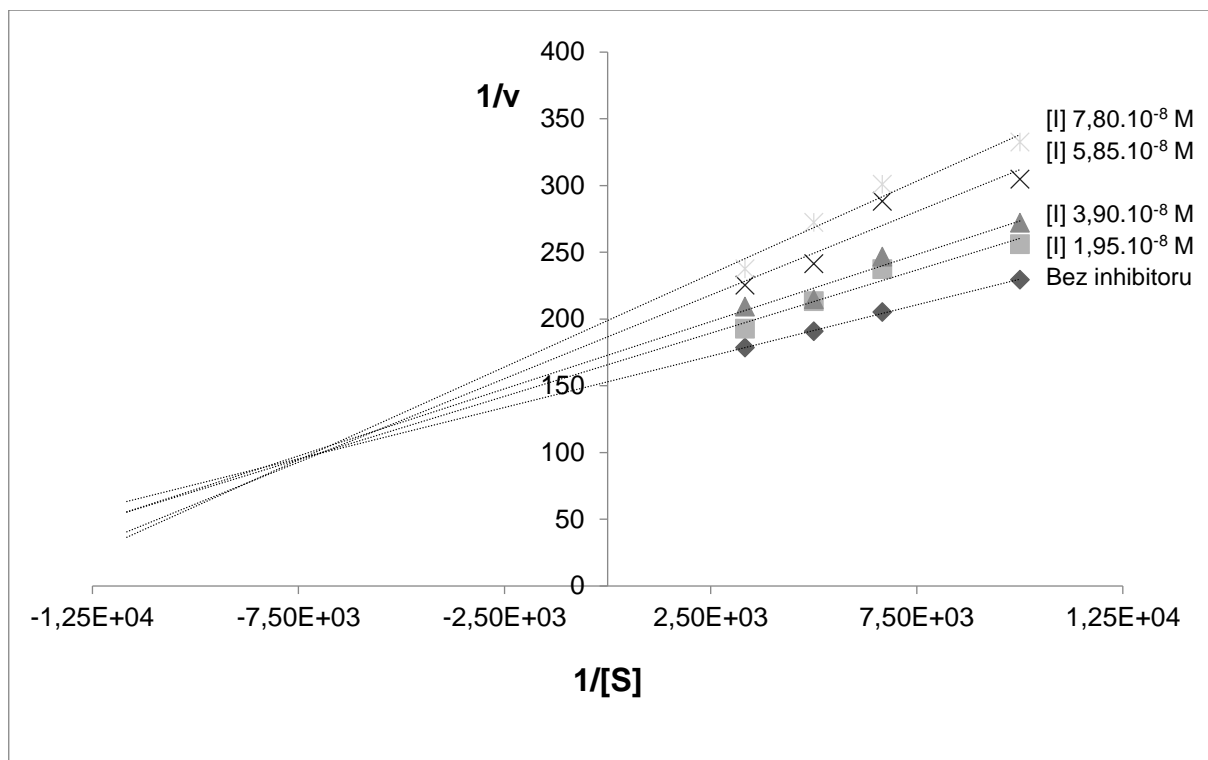
Čím menší je hodnota IC₅₀, tím je inhibitor účinnější. Z 10 testovaných inhibitorů má podle výsledků nejlepší inhibiční účinnost vzorek číslo **9** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-benzylpyridin-1-ium)). Za další velmi dobré inhibitory lze považovat vzorky s číslem **1**, **5** a **6**. Vzorek 5 má stejnou inhibiční účinnost jako takrin. Naproti tomu vzorek číslo **8** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)) vykazoval nejnižší inhibici ze všech testovaných vzorků. Ani jeden inhibitor však nebyl méně účinný než Rivastigmin.

V porovnání se standardy vykazují testované látky příznivé hodnoty IC₅₀. Proto lze říci, že jsou účinnými inhibitory a lze je považovat za potenciální léčiva, která by se mohla využít při léčbě Alzheimerovy choroby. Nicméně je potřeba provést další testování těchto látek, ať už na karcinogennost nebo další faktory, které by mohly mít vliv na lidské zdraví.

4.3 Stanovení typu inhibice

Pro určení typu inhibice byl použit inhibitor číslo **1** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium)). Celkem bylo testováno 5 různých koncentrací inhibitoru při 4 různých koncentracích AChE. Při stanovení reakčních rychlostí bylo postupováno stejně jako při určení inhibiční koncentrace. Podrobný popis je uveden v kapitole 3.6.

Výsledná závislost převrácené hodnoty rychlosti na převrácené hodnotě koncentrace substrátu pro inhibitor č. 1 je znázorněn na obrázku 14.



Obrázek 14 Příklad vyhodnocení typu inhibice pro inhibitor č. 1

Podle místa, kde se setkávají spojnice bodů, lze určit, o jaký typ inhibice se jedná. V tomto případě jde o smíšenou inhibici, protože se přímky protínají mimo osy x a y . [190]

Z rovnic regrese pro jednotlivé závislosti byly vypočítány kinetické parametry K_M a V_{max} , které mimo grafického vyhodnocení také slouží pro vyhodnocení typu inhibice. Vypočítané hodnoty kinetických parametrů jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Kinetické parametry

Koncentrace inhibitoru (M)	K_M (M)	V_{max} (s ⁻¹)
7,80.10 ⁻⁸	6,99.10 ⁻⁵	5,03.10 ⁻³
5,85.10 ⁻⁸	6,70.10 ⁻⁵	5,36.10 ⁻³
3,90.10 ⁻⁸	5,84.10 ⁻⁵	5,78.10 ⁻³
1,95.10 ⁻⁸	5,73.10 ⁻⁵	6,03.10 ⁻³
0	5,03.10 ⁻⁵	6,54.10 ⁻³

Z tabulky 4 lze vyčíst, že pokud se zvyšuje koncentrace inhibitoru v reakční směsi, zvyšují se i hodnoty K_M . Naopak parametr V_{max} se snižuje. Proto je hodnota V_{max} u neinhibované reakce nejvyšší. Poměr K_M a V_{max} se mění s koncentrací inhibitoru. Z obecných znalostí o typu inhibice lze usoudit, že se opravdu jedná o smíšený inhibitor. [190]

Jelikož jsou všechny testované inhibitory strukturně velmi podobné, dá se předpokládat, že všechny tyto látky působí na principu smíšené inhibice.

Inhibitory, které způsobují smíšenou inhibici, vykazují odlišnou afinitu k volnému enzymu a ke komplexu enzym-substrát. Ve většině případů se takovýto inhibitor váže do alosterického místa. Hodnota K_M se zvyšuje kvůli tomu, že inhibitor narušuje vazbu mezi substrátem a enzymem. Inhibitor navíc zabraňuje katalýze, proto hodnota V_{max} klesá s rostoucí koncentrací inhibitoru v reakční směsi. [189]

4.4 Stanovení rozdělovacího koeficientu

Rozdělovací koeficient $\log P$ byl stanoven u všech standardů i testovaných inhibitorů. Postup je uveden v kapitole 3.7. Stanovení probíhalo jak experimentálně, tak pomocí počítačových programů ChemDraw a ChemSketch. U experimentálních dat byla také vypočítána směrodatná odchylka.

Výsledné hodnoty rozdělovacího koeficientu vyjádřené pomocí logaritmického tvaru pro tři standardy a 10 testovaných inhibitorů jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 Rozdělovací koeficient pro testované látky a standardy

Inhibitor	$\log P$ experiment	$\log P$ ChemSketch	$\log P$ ChemDraw
1	$-6,92 \pm 0,59$	-7,31	-6,57
2	$-4,85 \pm 0,48$	-6,41	-3,97
3	$-5,22 \pm 0,63$	-5,59	-4,99
4	$-5,99 \pm 0,47$	-6,06	-6,52
5	$-3,48 \pm 0,31$	-2,95	-3,33
6	$-4,30 \pm 0,30$	-4,02	-4,39

Tabulka 5 (pokračování) Rozdělovací koeficient pro testované látky a standardy

Inhibitor	logP experiment	logP ChemSketch	logP ChemDraw
7	-5,13 ± 1,18	-4,98	-5,45
8	-5,69 ± 0,52	-6,04	-5,81
9	-1,21 ± 0,009	-0,96	-1,26
10	-4,83 ± 0,36	-5,11	-4,25
Galantamin	1,43 ± 0,10	1,74	0,23
Rivastigmin	1,21 ± 0,21	2,14	1,40
Takrin	2,45 ± 0,25	3,32	1,80

Z tabulky 5 je zřejmé, že experiment byl proveden správně, protože experimentální hodnoty jsou přibližně stejné, jako výsledky z počítačových programů.

Výsledné záporné hodnoty u jednotlivých inhibitorů prokazují, že se jedná o velmi hydrofilní látky. Některé z nich byly speciálně navrženy tak, aby dosáhly určité hydrofility a byly dobře rozpustné ve vodném prostředí. To naznačuje i fakt, že se strukturně jedná o soli. Všechny testované inhibitory jsou více hydrofilní než standardy.

Ze vzorků vykazuje nevyšší hydrofilitu inhibitor číslo 1. Také vzorky 4 (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-kyanopyridin-1-ium)) a 8 (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-acetylpyridin-1-ium)) jsou velmi hydrofilní. Z toho vyplývá, že všechny inhibitory byly více rozpustné ve vodné fázi než v *n*-oktanolu.

4.5 Stanovení topologické molekulární polární povrchové plochy

Jak již bylo napsáno v kapitole 3.8, tPSA určuje propustnost přes biologické membrány. Je to důležitá vlastnost léčivých látek. Proto byl u standardů a všech testovaných inhibitorů stanoven tento parametr.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu ChemDraw, spolu s rozdělovacím koeficientem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 Topologická molekulární polární povrchová plocha

Inhibitor	tPSA (Å ²) ChemDraw
1	46,48
2	46,48
3	80,62
4	53,60
5	6,02
6	6,02
7	58,62
8	40,16
9	6,02
10	24,48
Galantamin	41,93
Rivastigmin	32,78
Takrin	0

Látka, která má hodnotu tPSA nižší než 70 Å², jak je uvedeno v kapitole 3.8, je dobře propustná přes biologickou membránu. Tuto podmínku splňují standardy i všechny testované inhibitory, s výjimkou látky číslo 3, která má sníženou propustnost.

Velmi zvýšenou propustnost přes biologické membrány mají látky s číslem 5, 6 a 9. Ostatní látky mají podobnou míru prostupnosti jako standardy.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo nastavit optimální reakční podmínky pro stanovení inhibice AChE z lidských erytrocytů. Jako optimální byla vybrána koncentrace substrátu ATCh $2 \cdot 10^{-4}$ M a koncentrace PDS $5 \cdot 10^{-5}$ M při objemu 5 μ l erytrocytů.

Byly porovnány inhibiční účinnosti deseti bispyridiniových solí se standardy. Použité standardy, konkrétně galantamin a rivastigmin, se používají při léčbě Alzheimerovy choroby. Nejlepší inhibiční účinek vykazoval vzorek číslo **9** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-benzylpyridin-1-ium)), jehož hodnota IC_{50} $0,01 \pm 0,001$ μ M byla nejnižší ze všech testovaných látek. Také vzorky **1**, **5** a **6** měly vysoký inhibiční účinek. Nejnižší míru inhibice vykazoval vzorek **8**, a to $19,03 \pm 0,41$ μ M. Většina vzorků měla podobné hodnoty IC_{50} jako takrin a galantamin.

Grafickým vyhodnocením a určením kinetických parametrů bylo prokázáno, že testované inhibitory vykazovaly smíšený typ inhibice.

Pomocí rozdělovacího koeficientu bylo prokázáno, že všechny testované inhibitory jsou více hydrofilní než standardy. Nejvíce hydrofilní byl vzorek **1** (1,1'-(nonan-1,9-diyl)bis(4-methoxypyridin-1-ium)), jehož hodnota $\log P$ byla -6,92.

Inhibitory byly také testovány na prostupnost biologickými membránami. Kromě vzorku číslo 3, vykazují inhibitory dobrou prostupnost.

Závěrem lze říci, že testovaná metoda se ukázala jako vhodná pro stanovení aktivity cholinesteráz. Všechny testované inhibitory způsobovaly dobrou inhibici lidské acetylcholinesterázy. Proto mohou být dále testovány jako potenciální léčiva pro některá neurodegenerativní onemocnění.

6 ZDROJE

- [1] GOODSELL, D. S. Acetylcholinesterase. *RCSB Protein Data Bank* [online]. 2004. Dostupné z: <http://pdb101.rcsb.org/motm/54>
- [2] TRIPATHI, A., et al. Acetylcholinesterase: a versatile enzyme of nervous system. *Annals of Neurosciences*. 2008, **15**(4), 106–111.
- [3] BAJDA, M., et al. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *International Journal of Molecular Science*. 2013, **14**, 5608-5632. ISSN 1422-0067.
- [4] JEGER, R. V. Mens sana in corpore sano revisited. *European Heart Journal*. 2013, **34**, 2580–2581.
- [5] MIAO, Y., et al. History and new development of assays for cholinesterase activity and inhibition. *Chemical Reviews*. 2010, **110**, 5216–5234.
- [6] POHANKA, M. Biosenzory založené na cholinesterázách. *Chemické Listy*. 2013, **107**, 121–125.
- [7] FRANCIS, P. T., et al. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* [online]. 1999, **66**, 137–147. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1736202/pdf/v066p00137.pdf>
- [8] JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *REMEDIA*. 2009, **19**(5), 342–345.
- [9] JIRÁK, R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurológia pre prax* [online]. 2008, **4**, 224–227. Dostupné z: http://www.neurologiapreprax.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3301&magaz%0Aine_id=3
- [10] VALIŠ, M., et al. Farmakoterapie demencií – pokroky v léčbě a aktuální doporučení. *Remedia*. 2013, **6**(23), 396–399.

- [11] FONTANA, et al. Funkce buněk a lidského těla. *Enzymy* [online]. 2015. Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
- [12] KOTYZA., et al. Vlastnosti enzymů, stanovení enzymové aktivity, Michaelisova konstanta. *Úvod do klinické biochemie a enzymologie pro studující lékařství, Univerzita Karlova* [online]. 2007, ISBN: 978-80-246-1350-5, 108-135. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/biochemie/pages/vyuuka/materialy/Enzymologie_skripta.pdf
- [13] JANSKÁ, K. Sledování kinetiky inhibitorů acetylcholinesterasy in vitro. *Diplomová práce* [online]. 2014, Hradec Králové. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/72354/DPTX_2012_1_11160_0_290663_0_130693.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [14] KODÍČEK, M., et al. *Biochemické pojmy - výkladový slovník* [online]. 2004. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/enzymy_-_rozdeleni_do_trid.html
- [15] AHERN, K., et al. Enzyme inhibition. *LibreTexts* [online]. 2019. Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_and_Easy_\(Ahern_and_Rajagopal\)/04%3A_Catalysis/4.10%3A_Enzyme_Inhibition](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_and_Easy_(Ahern_and_Rajagopal)/04%3A_Catalysis/4.10%3A_Enzyme_Inhibition)
- [16] STRELOW, J., et al. Mechanism of Action Assays for Enzymes. *Assay Guidance Manual* [online]. 2012. Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92001/#_enzymemoa_References_
- [17] PADILLA, S., et al. Methods in Molecular Medicine. *Humana Press: NJ*. 1999, **22**, 237.
- [18] AUGUSTINSSON, K.-B., et al. Comparative Aspects of the Purification and Properties of Cholinesterases. *Bulletin of the World Health Organization*. 1971, **44**, 81–89.
- [19] HOLMSTEDT, B., et al. Distribution and Determination of Cholinesterases in

- Mammals. *Bulletin of the World Health Organization*. 1971, **44**, 99–107.
- [20] GIACOBINI, E.A., et al. Valid Alternative for Therapy of Alzheimer's Disease? *Drugs & Aging*. 2001, **18**, 891–898.
- [21] GIACOBINI, E., et al. Cholinesterase inhibitors: From the Calabar bean to Alzheimer therapy. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. 2000, 181–226.
- [22] SHEN, Z.-X., et al. Brain cholinesterases: I. The clinico-histopathological and biochemical basis of Alzheimer's disease. *Medical Hypotheses*. 2004, **63**, 285–297.
- [23] SUSSMAN, J.L., et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic binding protein. *Science*. 1991, **253**, 872–879.
- [24] LIN, G., et al. Molecular Recognition by Ace-tylcholinesterase at the Peripheral Anioni Site: Structure-Activity Relationships for Inhibitions by Aryl Carbamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1999, **7**, 2683–2689.
- [25] ResearchGate, https://www.researchgate.net/figure/Active-site-of-acetylcholinesterase-Torpedo-californica-acetylcholinesterase-TcAChE_fig1_235905395. nedatováno, staženo 6.4.2019.
- [26] BRUFANI, M., et al. Rational design of cholinesterase inhibitors. *Cholinesterases and Cholinesterase inhibitors*. 2000, 27–46.
- [27] LAWSON, A. A., et al. Acetylcholinesterase in red blood cells. *American Journal of Hematology*. 1987, **26**, 101–112.
- [28] DAVE, K.R., et al. Tissue cholinesterases. A comparative study of their kinetic properties. *Zeitschrift für Naturforschung*. 2000, **55**(1–2), 100–108.
- [29] VELLOM, D.C., et al. Amino acid residues controlling acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase specificity. *Biochemistry*. 1993, **32**, 12–17.
- [30] BLONG, RM., et al. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is

at the C-terminus. *Biochemical Journal*. 1997, **327**, 747–757.

- [31] LOCKRIDGE, O., et al. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987, **262**, 549–557.
- [32] MANOHARAN, I., et al. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clinica Chimica Acta*. 2007, **378**, 128–135.
- [33] YUAN, J., et al. Characterization of procaine metabolism as probe for the butyrylcholinesterase enzyme investigation by simultaneous determination of procaine and its metabolite using capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2007, **1154**, 368–372.
- [34] MAHMOOD, N.A., et al. Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon*. 1987, **25**, 1221–1227.
- [35] CAMPS, P., et al. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2002, **2**, 11–25.
- [36] VILLARROYA, M., et al. New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interests for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2004, **10**, 3177–3184.
- [37] STERN, Y., et al. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*. 2012, **11**(11), 1006–1012.
- [38] ADLER, M., et al. Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. *FEBS Letters*. 1990, **267**, 107–110.
- [39] BACHURIN, S. O., et al. Medicinal Chemistry Approaches for the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease. *Medicinal Research Reviews*. 2003, **23**, 44–88.
- [40] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., et al. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors.

Current Enzyme Inhibition. 2008, **4**, 165.

- [41] JANN, M.W., et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cholinesterase Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. 2002, **41**, 719–739.
- [42] KUČA, K., et al. Synthesis of a New Reactivator of Tabun-Inhibited Acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003, **13**, 3545–3547.
- [43] AMENTA, F., et al. Treatment of cognitive dysfunction associated with Alzheimer's disease with cholinergic precursors. Ineffective treatments or inappropriate approaches? *Mechanisms of Ageing and Development*. 2001, **122**, 2025–2040.
- [44] DAVIS, K.L., et al. Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. 5th ed., *Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia*. 2002, **17**(8), ISBN: 0-7817-2837-1, 433-434.
- [45] WATKINS, P.B., et al. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 1994, **271**, 992–998.
- [46] Pubchem,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tacrine#section=Structures>.
nedatováno, staženo 2.5.2019.
- [47] NIGHTINGALE, S.L., et al. Donepezil approved for treatment of Alzheimer's disease. *JAMA*. 1997, **277**(1), 10.
- [48] ŠVESTKA, J., et al. Cognitive enhancer donepezil. *Psychiatry*. 1999, **1**, 26–42.
- [49] Pubchem,
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3152#section=Structures>.
nedatováno, staženo 2.5.2019.
- [50] WEINSTOCK, M., et al. *Advances in Behavioral Biology*. *Plenum Press: New York*. 1986, **29**, 539–551.

- [51] ENZ, A., et al. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase. A novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research*. 1993, **98**, 431–438.
- [52] Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77991>. nedatováno, staženo 2.5.2019.
- [53] COYLE, J., et al. Galanthamine, a Cholinesterase Inhibitor that Allosterically Modulates Nicotinic Receptors: Effects on the Course of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*. 2001, **49**, 289–299.
- [54] Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9651#section=Structures>. nedatováno, staženo 2.5.2019.
- [55] THAL, L.J., et al. A multicenter double-blind study of controlled-release physostigmine for the treatment of symptoms secondary to Alzheimer's disease. *Neurology*. 1996, **47**, 1389–1295.
- [56] GREENBLATT, H.M., et al. Acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2003, **20**, 369–383.
- [57] SRAMEK, J.J., et al. A multi-dose safety trial of eptastigmine in Alzheimer's disease, with pharmacodynamic observations of red blood cell cholinesterase. *Life Science*. 1995, **56**, 319–326.
- [58] IMBIMBO, B.P., et al. Efficacy and safety of eptastigmine for the treatment of patients with Alzheimer's disease. *Neurology*. 1999, **53**, 700–708.
- [59] SHRIVASTAVA, S., et al. Design and development of novel p-aminobenzoic acid derivatives as potential cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*. 2019, **82**, 211–223.
- [60] BASIRI, A., et al. An expedient, ionic liquid mediated multi-component synthesis of novel piperidone grafted cholinesterase enzymes inhibitors and their molecular modeling study. *European Journal of Medicinal Chemistry*.

- 2013, **67**, 221–229.
- [61] ELUMALAI, K., et al. Acetylcholinesterase enzyme inhibitor activity of some novel pyrazinamide condensed 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines. *Biotechnology Reports*. 2015, **5**, 1–6.
- [62] POPESCU, BO., et al. Still debating a cause and diagnostic criteria for Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007, **11**, 1225–1226.
- [63] INGGANINAN, K., et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003, **89**(2–3), 261-264
- [64] LAHIRI, D.K., et al. Current Drug Targets for Alzheimer's Disease Treatment. *Drug Development Research*. 2002, **56**(3), 267–281.
- [65] SRAMEK, J.J., et al. Review of drug Development and Therapeutic Role of Cholinesterase Inhibitors in Alzheimer's Disease. *Drug Development Research*. 2002, **56**, 347–353.
- [66] SPIRES-JONES, TL., et al. The intersection of amyloid beta and tau synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014, **82**, 756–771.
- [67] QIU, C., et al. Vascular and psychosocial factors in Alzheimer's disease: epidemiological evidence toward intervention. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2010, **20**, 689–697.
- [68] SCHELTENS, P., et al. Alzheimer's disease. *Lancet*. 2016, **388**, 505–517.
- [69] CHUNG, JA., et al. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurologic Clinics*. 2000, **18**, 829–846.
- [70] RIEDEL, WJ. Preventing cognitive decline in preclinical Alzheimer's disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 2014, **14**, 18–22.

- [71] ALIREZA A., et al. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum , Diagnosis and Management. *Medical Clinics of North America*. 2019, **103**(2), 263–293.
- [72] RUDOLPH, JL., et al. The anticholinergic risk scale and anticholinergic adverse effects in older persons. *Archives of Internal Medicine*. 2008, **168**(5), 508–513.
- [73] American Geriatrics Society updated Beers Criteria for potentially inappropriate medication use in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2012, **60**(4), 616–631.
- [74] BALLARD, C., et al. Prescription of antipsychotics in people with dementia. *The British Journal of Psychiatry*. 2014, **205**(1), 4–5.
- [75] KALES, HC., et al. Assessment and management of behavioral and psychological symptoms of dementia. *British Medical Journal*. 2015, **350**, 369.
- [76] ABBOTT, A., et al. Neuroscience: the plaque plan. *Nature*. 2008, **456**, 161–164.
- [77] MUDHER, A., et al. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? *Trends in Neurosciences*. 2002, **25**, 22–26.
- [78] CITRON, M., et al. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004, **5**, 677–685.
- [79] STARKOV, AA., et al. Portal to Alzheimer's disease. *Nature Medicine*. 2008, **14**, 1020–1021.
- [80] CHATURVEDI, RK., et al. Mitochondrial approaches for neuroprotection. *Annals of the New York Academy of Science*. 2008, **1147**, 395–412.
- [81] SMITH, RA., et al. Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Annals of the New York Academy of Science*. 2008, **1147**, 105–111.
- [82] TAUSKELA, JS., et al. MitoQ — a mitochondria-targeted antioxidant. *The Investigational Drugs Journal*. 2007, **10**, 399–412.
- [83] AZZI, A., et al. Oxidative stress: a dead end or a laboratory hypothesis?

- Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, **362**, 230–232.
- [84] CAVALLI, A., et al. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008, **51**, 347–372.
- [85] VAN DER STEEN, JT., et al. White paper defining optimal palliative care in older people with dementia: a Delphi study and recommendations from the European Association for Palliative Care. *Palliative Medicine*. 2014, **28**(3), 197–209.
- [86] WILKINSON, D., et al. Pharmacotherapy of Alzheimer’s disease. *Psychiatry*. 2007, **7**, 9–14.
- [87] TRICCO, AC., et al. Comparative effectiveness and safety of cognitive enhancers for treating alzheimer’s disease: systematic review and network metaanalysis. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2018, **66**(1), 170–178.
- [88] SANO, M., et al. A controlled trial of selegiline, alpha- tocopherol, or both as treatment for Alzheimer’s disease. The Alzheimer’s Disease Cooperative Study. *The New England Journal of Medicine*. 1997, **336**(17), 1216–1222.
- [89] DYSKEN, MW., et al. Effect of vitamin E and memantine on functional decline in Alzheimer disease: the TEAMAD VA cooperative randomized trial. *JAMA*. 2014, **311**(1), 33–44.
- [90] DOU, K-X., et al. Comparative safety and effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for Alzheimer’s disease: a network metaanalysis of 41 randomized controlled trials. *Alzheimer’s Research & Therapy*. 2018, **10**(1), 126.
- [91] QIAN, S., et al. Synthesis, biological activity, and biopharmaceutical characterization of tacrine dimers as acetylcholinesterase inhibitors. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014, **477**, 442–453.
- [92] MAO, F., et al. Tacrine-propargylamine derivatives with improved

- acetylcholinesterase inhibitory activity and lower hepatotoxicity as a potential lead compound for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2015, **30**, 995–1001.
- [93] HIREMATHAD, A., et al. Novel tacrine-hydroxyphenylbenzimidazole hybrids as potential multitarget drug candidates for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **148**, 255–267.
- [94] YOUDIM, MB., et al. The path from anti Parkinson drug selegiline and rasagiline to multifunctional neuroprotective anti Alzheimer drugs ladostigil and m30. *Current Alzheimer Research*. 2006, **3**, 541–550.
- [95] YOUDIM, MB., et al. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2005, **26**, 27–35.
- [96] ALIREZA A., et al. Effect of Idalopirdine as Adjunct to Cholinesterase Inhibitors on Change in Cognition in Patients With Alzheimer Disease Three Randomized Clinical Trials. *JAMA*. 2018, **319**(2), 130–141.
- [97] SCHEDIN-WEISS, S., et al. Monoamine oxidase B is elevated in Alzheimer disease neurons, is associated with gamma-secretase and regulates neuronal amyloid beta-peptide levels. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2017, **9**, 57.
- [98] WANG, Y., et al. Dual functional cholinesterase and MAO inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: synthesis, pharmacological analysis and molecular modeling of homoisoflavonoid derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016, **31**, 389–397.
- [99] MOSTAFA, M.I., et al. Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2019, **14**(3), 437–440.
- [100] PRATI, F., et al. BACE-1 inhibitors: from recent single-target molecules to multitarget compounds for Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **61**, 619–637.

- [101] MARTINEZ, B., et al. Amelioration of Alzheimer's disease pathology and cognitive deficits by immunomodulatory agents in animal models of Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*. 2019, **14**(7), 1158–1176.
- [102] STEELAND, S., et al. A new venue of TNF targeting. *International Journal of Molecular Science*. 2018, **19**(E), 1442.
- [103] BALUSU, S., et al. The choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in Alzheimer's disease: more than just a barrier. *Neural Regeneration Research*. 2016, **11**, 534–537.
- [104] BRKIC, M., et al. Amyloid β oligomers disrupt blood-CSF barrier integrity by activating matrix metalloproteinases. *Journal of Neuroscience*. 2015, **35**, 12766–12778.
- [105] STEELAND, S., et al. Choroid plexus tumor necrosis factor receptor 1: a new neuroinflammatory piece of the complex Alzheimer's disease puzzle. *Neural Regeneration Research*. 14n. 1., **7**, 1144–1147.
- [106] KOTTERMAN, MA., et al. Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2015, **17**, 63–89.
- [107] CASSINOTTI, P., et al. Organization of the adeno-associated virus (AAV) capsid gene: mapping of a minor spliced mRNA coding for virus capsid protein 1. *Virology*. 1988, **167**, 176–184.
- [108] MCCOWN, TJ., et al. Adeno-associated virus (AAV) vectors in the CNS. *Current Gene Therapy*. 2011, **11**, 181–188.
- [109] QU, Y., et al. Characteristics and advantages of adeno-associated virus vector-mediated gene therapy for neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*. 2019, **14**(6), 931–938.
- [110] SAADOUN, D., et al. Regulatory T-cell responses to lowdose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *The New England Journal of Medicine*. 2011, **365**, 2067–2077.

- [111] ALVES, S., et al. Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. *Brain*. 2017, **140**(3), 826–842.
- [112] RAIKWAR, SP., et al. Targeted gene editing of glia maturation factor in microglia: a novel Alzheimer's disease Therapeutic Target. *Molecular Neurobiology*. 2019, **56**(1), 378–393.
- [113] KIYOTA, T., et al. AAV2/1 CD74 gene transfer reduces beta-amyloidosis and improves learning and memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Therapy*. 2015, **23**, 1712–1721.
- [114] SASMITA, AO. Current viral-mediated gene transfer research for treatment of Alzheimer's disease. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2018, 1–20.
- [115] ZHAO, L., et al. Intracerebral adeno-associated virus gene delivery of apolipoprotein E2 markedly reduces brain amyloid pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Neurobiology of Aging*. 2016, **44**, 159–172.
- [116] MITRA, S., et al. Innovative therapy for Alzheimer's disease-with focus on biodelivery of NGF. *Frontiers in Neuroscience*. 2019, **13**(38), 1–13.
- [117] SON, A. I., et al. An implantable micro-caged device for direct local delivery of agents. *Scientific Reports*. 2017, **7**(1), 1–13.
- [118] LINDVALL, O., et al. Encapsulated cell biodelivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neuroregeneration in Parkinson's disease? *Experimental Neurology*. 2008, **209**, 82–88.
- [119] WINN, S. R., et al. Polymer-encapsulated genetically modified cells continue to secrete human nerve growth factor for over one year in rat ventricles: behavioral and anatomical consequences. *Experimental Neurology*. 1996, **140**, 126–138.
- [120] BRESTKIN, A. P., et al. . *Russian Chemical Reviews*. 1983, **52**, 1624–1647.
- [121] ABDUVAKHABOV, A. A., et al. . *Russian Journal of Physical Chemistry B*.

2005, **32**, 2227.

- [122] LIU, H., et al. Substrate specificity of brain acetylcholinesterase and its sensitivity to carbamate insecticides in *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2007, **33**, 29–34.
- [123] EVANS, R. T., et al. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clinical Chemistry*. 1978, **24**, 1762-1766.
- [124] AGARWAL, DP., et al. A note on suxamethonium sensitivity and serum cholinesterase variants. *Human Genetics*. 1976, **32**, 85–88.
- [125] HOLAS, O., et al. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012, **7**(12), 1207–1223.
- [126] AKGUR, SA., et al. Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in humans exposed to organophosphorous compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 1999, **58**, 469–474.
- [127] Biological monitoring of workers exposed to organophosphorous pesticides. *Health and Safety Executive, MS17, Sudbury, UK: HSE Books*. 1987.
- [128] RAMA, DBK., et al. Cholinesterase estimations and pesticide exposure. *South African Medical Journal*. 1991, **80**(9), 461–462.
- [129] MOHAMMED, F. K., et al. Modifications of Michel's electrometric method for rapid measurement of blood cholinesterase activity in animals: a minireview. *Veterinary and Human Toxicology*. 1982, **24**(2), 119–121.
- [130] HODGSON, A. J., et al. A method for the detection and quantitation of secretory acetylcholinesterase. *Neurochemical Pathology*. 1983, **1**, 211-218.
- [131] WOREK, F., et al. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*. 1999, **288**, 73–90.
- [132] WOREK, F., et al. Diagnostic aspects of organophosphate poisoning.

- Toxicology*. 2005, **214**, 182–189.
- [133] RAKONCZAY, Z., et al. Neuromethods, Neurotransmitter Enzymes. *Humana Press: NJ*. 1986, **5**, 319.
- [134] ALDRIDGE, W. N., et al. The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organo-phosphorus compounds. *Biochemical Journal*. 1953, **53**(1), 62–67.
- [135] MAGNOTTI, R. A., et al. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clinical Chemistry*. 1987, **33**, 1731-1735.
- [136] GEORGE, P. M., et al. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clinical Chemistry*. 1983, **29**(2), 365–368.
- [137] UETE, T., et al. Spectrophotometric micromethod for measuring cholinesterase activity in serum or plasma. *Clinical Chemistry*. 1972, **18**(5), 454–458.
- [138] LASSITER, TL., et al. Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. *Toxicology*. 2003, **186**, 241–253.
- [139] VIEIRA, IJ., et al. Two fast screening methods (GC-MS and TLC-ChEI assay) for rapid evaluation of potential anticholinesterasic indole alkaloids in complex mixtures. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2008, **80**, 419–426.
- [140] INGKANINAN, K., et al. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *Journal of Chromatography A*. 2000, **872**, 61–73.
- [141] FORSBERG, EM., et al. Continuous flow immobilized enzyme reactor-tandem mass spectrometry for screening of AChE inhibitors in complex mixtures. *Analytical Chemistry*. 2011, **83**, 5230–5236.
- [142] BISSBORT, SH., et al. Novel test and its automation for the determination of erythrocyte acetylcholinesterase and its application to organophosphate exposure. *Clinica Chimica Acta*. 2001, **303**, 139–145.

- [143] KALOW, W., et al. A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1955, **33**, 568–574.
- [144] GUILBAULT, G., et al. Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Analytical Chemistry*. 1965, **37**, 120-123.
- [145] SADAR, M. H., et al. Trace analysis of pesticides using cholinesterase from human serum, rat liver, electric el, bean leaf beetle, and white fringe beetle. *Analytical Chemistry*. 1970, **42**(14), 1770-1774.
- [146] PARVARI, R., et al. A microfluorometric assay for cholinesterases, suitable for multiple kinetic determinations of picomoles of released thiocholine. *Analytical Biochemistry*. 1983, **133**(2), 450-456.
- [147] GILL, R., et al. Optical detection of glucose and acetylcholine esterase inhibitors by H₂O₂-sensitive CdSe/ZnS quantum dots. *Angewandte Chemie International Edition*. 2008, **47**(9), 1676–1679.
- [148] HO, M. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1949, **34**, 1564–1568.
- [149] MOHAMMAD, F., et al. Electrometric measurement of plasma, erythrocyte, and whole blood cholinesterase activities in healthy human volunteers. *Journal of Medical Toxicology*. 2007, **3**, 25–30.
- [150] MOHAMMAD, FK., et al. Application of an electrometric method for measurement of in vitro inhibition of blood cholinesterases from sheep, goats and cattle by dichlorvos and carbaryl. *Veterinary Medicine*. 2006, **51**, 45–50.
- [151] SCHWARTZ, M., et al. Simple microtitrimetric constant-pH method for accurate enzyme assays. *Analytical Chemistry*. 1958, **30**, 1150–1151.
- [152] WINTERINGHAM, FP., et al. Radiometric assay of acetylcholinesterase. *Nature*. 1962, **195**, 1303.

- [153] YUE, B., et al. Choline in whole blood and plasma: sample preparation and stability. *Clinical Chemistry*. 2008, **54**, 590–593.
- [154] ROY, JJ., et al. Measurement of succinylcholine concentration in human plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*. 2001, **290**, 238–244.
- [155] SPENCER, JD., et al. A simple liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry method for measurement of serum cholinesterase activity using succinylcholine as substrate. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2010, **47**, 217–222.
- [156] FRANKFORT, S., et al. A simple and sensitive assay for the quantitative analysis of rivastigmine and its metabolite NAP 226-90 in human EDTA plasma using coupled liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2006, **20**(22), 3330.
- [157] LIESENER, A., et al. Screening of acetylcholinesterase inhibitors in snake venom by electrospray mass spectrometry. *Pure and Applied Chemistry*. 2007, **79**(12), 2339–2349.
- [158] RIDGWAY, TH., et al. A polarographic method for following the rates of cholinesterase-catalyzed hydrolyses of acetylthiocholine. *Analytical Biochemistry*. 1965, **12**, 357–366.
- [159] FRASCO, MF., et al. Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *The FEBS Journal*. 2007, **274**, 1849–1861.
- [160] AMINE, A., et al. How to extend range linearity in enzyme inhibition-based biosensing assays. *Talanta*. 2018, **189**, 365–369.
- [161] ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., et al. Cholinesterase- based biosensors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016, **31**(sup3), 180–193.
- [162] JAFFREZIC-RENAULT, N., et al. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*. 2008, **8**(4), 2569–2588.

- [163] NABB, D., et al. Determination of cholinesterase by an automated Delta pH Stat method. *Archives of Environmental & Occupational Health*. 1967, **15**, 147-154.
- [164] LIU, B., et al. A potentiometric acetylcholinesterase biosensor based on plasma-polymerized film. *Sensors and Actuators*. 2005, **104**, 186-190.
- [165] BAJGAR, J., et al. Laboratory diagnosis of organophosphates/nerve agent poisoning. *Clinical Biochemistry and Metabolism*. 2005, **13**(40), 40–47.
- [166] UPADHYAY, S., et al. Immobilization of acetylcholinesterase-choline oxidase on a gold-platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, **25**(4), 832–840.
- [167] YUQING, M., et al. Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chemical Reviews*. 2010, **110**(5), 2709–2728.
- [168] POGAČNIK, L., et al. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetables samples by a photothermal biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003, **18**, 1–9.
- [169] ALFONTA, L., et al. Sensing of acetylcholine by a tricomponent-enzyme layered electrode using Faradaic impedance spectroscopy, cyclic voltametry, and microgravimetric quartz crystal microbalance transduction methods. *Analytical Chemistry*. 2000, **72**, 927-935.
- [170] ABAD, J., et al. Determination of Organophosphorus and Carbamate Pesticides Using a Piezoelectric Biosensor. *Analytical Chemistry*. 1998, **70**(14), 2848–2855.
- [171] TAN, H. Y., et al. A lab-on-a-chip for detection of nerve agent sarin in blood. *Lab on a Chip*. 2008, **8**, 885-891.
- [172] HILBORN, ED., et al. A dried blood spot method to evaluate cholinesterase activity in young children. *Archives of Environmental Health: An International*

- Journal*. 2004, **59**(9), 467–470.
- [173] THIPHOM, S., et al. A method for measuring cholinesterase activity in human saliva and its application to farmers and consumers. *Analytical Methods*. 2013, **5**, 4687–4693.
- [174] HAI, A., et al. Acetylcholinesterase–ISFET based system for the detection of acetylcholine and acetylcholinesterase inhibitors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, **22**, 605-612.
- [175] UNDERHAY, E., et al. The hydrolysis of indoxyl esters by esterases of human blood. *Biochemical Journal*. 1957, **66**, 383-390.
- [176] REINER, E., et al. Comparison of protocols for measuring of human blood cholinesterases by the Ellman method. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2000, **51**, 13-18.
- [177] TECLES, F., et al. Use of whole blood for spectrophotometric determination of cholinesterase activity in dogs. *The Veterinary Journal*. 2000, **160**, 242-249.
- [178] KUMARI, K., et al. . *Journal of Ecophysiology and Occupational Health*. 2006, **6**(73).
- [179] RODRIGUEZ-CASTELLANOS, L., et al. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science*. 2007, **32**, 360–371.
- [180] SigmaAldrich,
https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/143057?lang=en®ion=CZ&cm_sp=Insite-_noResults_alditriol-_noResults9-2. nedaťováno, staženo 6.4.2019.
- [181] STEVENS, E. Enzymes, Measuring Inhibition. *Davidson College: Medicinal Chemistry* [online]. 2017. Dostupné z: https://courses.edx.org/c4x/DavidsonX/001x/asset/Ch_4_clip_3_summary.pdf

- [182] BANNAN, C. C., et al. Calculating partition coefficients of small molecules in octanol/water and cyclohexane/water. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2016, **12**(8), 4015–4024.
- [183] LIPINSKI, C.A., et al. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004, **1**(4), 337–341.
- [184] CERÓN, J.J., et al. Comparison of different diluents and chromophores for spectrophotometric determination of livestock blood cholinesterase activity. *Research in Veterinary Science*. 1999, **67**, 261–266.
- [185] TECLES, F., et al. Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2002, **14**(2), 132–139.
- [186] DIXON, M., et al. Enzymes. (3rd edition) Longman, London. 1979, 126.
- [187] BISSWANGER, H. Enzyme assays. *Perspectives of Science*. 2014, **1**(1–6), 41–55.
- [188] BHAGAVAN, N.V., et al. Enzymes and Enzyme Regulation. *Essentials of Medical Biochemistry, Elsevier*. 2011, (ISBN: 978-0-12-416687-5), 63–84.
- [189] KENAKIN, T. P. Enzymes as Drug Targets. *Pharmacology in Drug Discovery and Development, Elsevier* [online]. 2012, 131–156. Dostupné z: isbn:9780128037539
- [190] BARTOVSKÁ, L. Chemická kinetika. Ver. 1.0: VŠCHT Praha. 2008, (ISBN: 978-80-7080-670-8), 207–215.