

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

Kolorimetrická analýza vybraných biochemických markerů
pomocí fotografické techniky

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Mackurová

Vedoucí práce: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Konzultant: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

2021

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

Colorimetric Analysis Of Biochemical Markers Using
Photography

Thesis

Author: Bc. Kateřina Mackurová

Supervisor: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Consultant: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

Logo Univerzity Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Mackurová**
Osobní číslo: **C19539**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Kolorimetrická analýza vybraných biochemických markerů pomocí fotografické techniky**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Popis vybraného biochemického markeru/markerů,
- 2) standardní metody jejich vyšetření,
- 3) principy využití digitální fotografie v analytické chemii.

Experimentální část:

- 1) měření za pomoci digitální techniky,
- 2) validace na standardní metodu,
- 3) testování interferencí,
- 4) diskuze výsledků a srovnání jednotlivých analytických metod.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Pohanka M., 2017. Small camera as a handheld colorimetric tool in the analytical chemistry. Chemical Papers, 71 (9): 1553-1561. doi:10.1007/s11696-017-0166-z
2. Pohanka M, 2020. Colorimetric hand-held sensors and biosensors with a small digital camera as signal recorder, a review. Reviews in Analytical Chemistry 39(1): 20-30, doi: 10.1515/revac-2020-0111.
3. Pohanka M, 2020. Biochemie. Učební texty Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, 2020, ISBN 978-80-7582-157-7
4. Pohanka M. Klinická biochemie. Učební texty Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, 2017, ISBN 978-80-7231-365-5
5. Pohanka M. Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens. Učební texty Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, 2009, Počet stran 56. ISBN 978-80-7231-336-5

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Miroslav Pohanka, PhD., DSc.**
Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

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

Prohlašuji:

Práci s názvem „Kolorimetrická analýza vybraných biochemických markerů pomocí fotografické techniky“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne

Kateřina Mackurová

Poděkování: Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce pplk. prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. za skvělé vedení, trpělivost a shovívavost při psaní mé diplomové práce za velmi těžké situace. Děkuji také své rodině, která mě po celou dobu mého studia plně podporovala.

Abstrakt

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická v Pardubicích

Vypracováno na: Univerzita obrany v Brně, Fakulta vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Katedra molekulární patologie a biologie

Studentka: Kateřina Mackurová

Vedoucí práce: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Konzultant: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Název diplomové práce: Kolorimetrická analýza vybraných biochemických markerů pomocí fotografické techniky

Klíčová slova: kolorimetrie, acetylcholinesteráza, takrin, fotometrická metoda

Za hlavní neurotransmitter v mozkových neuronech je považován acetylcholin (ACh), který je zodpovědný za přenos vzruchu. Je degradován dvěma enzymy, a to acetylcholinesterázou (AChE) (EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterázou (BChE) (EC 3.1.1.8) na cholin a acetát. Na inhibitory AChE je kladen velký důraz ve vědecké sféře, jelikož stále patří mezi hlavní léčiva při léčbě Alzheimerovy choroby či nemoci myastenia gravis.

Cílem této práce bylo ověřit fotometrickou techniku při stanovení reakce AChE se substrátem na pH papírcích, stanovit kinetické parametry AChE a optimalizovat metodu pro stanovení inhibitoru – takrinu. Dále pak bylo cílem zjistit vliv vybraných matric na AChE pomocí fotometrické techniky.

Pokus probíhal na pH papírcích MACHEREY-NAGEL a také na spektrofotometru metodou dle Ellmana. Použitá AChE byla z paúhoře elektrického.

Bylo zjištěno, že fotometrická technika je reprodukovatelná a vhodná pro použití stanovení aktivity AChE a je vhodná pro měření skutečných vzorků. Vliv vybraných matric na tento enzym byl minimální.

Abstract

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology in Pardubice

Performed at: University of defence in Brno, Faculty of Military Health Sciences in Hradec Králové, Department of Molecular Pathology and Biology

Student: Kateřina Mackurová

Leader of diploma thesis: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.

Consultant: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Colorimetric Analysis Of Biochemical Markers Using Photography

Keywords: colorimetry, acetylcholinesterase, tacrine, photometric method

Acetylcholine, which is responsible for synaptic transmission, is nowadays considered to be the main neurotransmitter in the brain. It is degraded into choline and acetate by two enzymes – acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE) (EC 3.1.1.8) AChE inhibitors represent an interesting subject of current scientific research since they belong to the main treatments for Alzheimer's disease or myasthenia gravis.

The aim of the thesis was to verify the photometric equipment while determining the reaction of AChE with the substrate on pH papers, to determine the kinetic parameters AChE, and to optimize the method for the determination of the takrin inhibitor. Furthermore, the goal was to determine the influence of selected matrices on AChE using the photometric technique.

The experiment was conducted on the pH paper from MACHEREY-NAGEL and also on the spectrophotometer using the Ellman method. The AChE, which has been used, comes from an electric eel.

The photometric technique was found to be reproducible and suitable for the determination of AChE activity as well as for the measurement of real samples. The influence of selected matrices on this enzyme was minimal.

Seznam použitých zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibitor acetylcholinesterázy
ATChCl	acetylthiocholinchlorid
BChE	butyrylcholinesteráza
CCD	senzor s nábojově vázanou strukturou (Charge Coupled Devices)
CMOS	komplementární polovodič oxidu kovu (Complementary Metal-Oxide-Semiconductor)
ChE	cholinesteráza
DIC	kolorimetrie digitálního obrazu (Digital Image Correlation)
DTNB	dithio-2-nitrobenzoová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza s enzymem vázaným na sorbentu (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, která snižuje aktivitu enzymu na 50 %
K _M	konstanta Michaelise a Mentenové – koncentrace substrátu v polovině limitní rychlosti
LOD	limit detekce (limit of detection)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
POC	analýza v místě péče (point of care)
RGB	červená, zelená, modrá (red, green, blue)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Teoretická část	12
2.1	Optické metody	12
2.1.1	Kolorimetrie.....	12
2.1.2	Kolorimetrie digitálního obrazu	13
2.1.3	Proces.....	13
2.1.4	Kvantifikace barev	16
2.2	Acetylcholin	18
2.3	Cholinesterázy	18
2.3.1	Acetylcholinesteráza	19
2.3.2	Inhibitory acetylcholinesteráz	21
2.3.3	Butyrylcholinesteráza.....	24
2.4	Reakční kinetika hydrolyzy ACh	25
2.5	Biomarker.....	28
2.6	Metody stanovení cholinesteráz	29
2.7	Ellmanova metoda.....	29
3	Cíl práce	31
4	Experimentální část.....	32
4.1	Ověření pH a fotometrické techniky	34
4.2	Optimalizace Ellmanovy metody	36
4.3	Saturační křivka na pH papírcích	37
4.4	Inhibice enzymu inhibitorem takrin na pH papírcích	38
4.5	Saturační křivka na spektrofotometru (měření aktivity AChE).....	39
4.6	Inhibice enzymu na spektrofotometru	40
4.7	Vliv vybraných matric na AChE	41
5	Výsledky	42
5.1	Ověření pH.....	42
5.2	Optimalizace Ellmanovy metody	42
5.3	Optimalizace fotometrické techniky.....	43
5.4	Reakce enzym + substrát na pH papírcích, zjištění afinity enzymu k substrátu a určení kinetických parametrů.....	48
5.5	Inhibice enzymu takrinem na pH papírcích a určení IC_{50} inhibitoru.....	52
5.6	Saturační křivka na spektrofotometru	54
5.7	Inhibice enzymu takrinem měřeno na spektrofotometru	55
5.8	Vliv vybraných matric na reakci enzym + substrát	56
6	Diskuze.....	57
7	Závěr	60
8	Seznam použité literatury.....	61

1 Úvod

Stanovení barvy lze provést vizuální lidskou kontrolou nebo pomocí barevného měřicího přístroje. I když je lidská kontrola poměrně robustní i za přítomnosti změn osvětlení, určení barvy je v tomto případě subjektivní a od pozorovatele k pozorovateli velmi variabilní. Z těchto důvodů se doporučuje určit barvu pomocí přístrojů pro měření barev. Nejčastěji používané přístroje pro měření barvy jsou takzvané kolorimetry. Aplikace digitálního zobrazování jako detektoru pro kolorimetrické reakce má velký potenciál pro mnoho aplikací, které zahrnují chemické barevné změny. Vysoké prostorové rozlišení digitálních obrazů, které lze pořídit moderními fotoaparáty, umožňuje použití extrémně malých reagenčních oblastí, což může šetřit drahé reagenty. Také použití mobilního telefonu je jednoduché a nevyžaduje vyškolený personál.

Barevný systém RGB (R – red, G – green, B – blue), reprezentovaný třemi složkovými intenzitami (červená, zelená, modrá), je důležitým indexem pro barevný obraz. Digitální fotoaparáty, integrované v mobilních telefonech a podobných zařízeních, se začaly používat jako detektory obrazu. Tyto telefony jsou nyní k dispozici za relativně nízkou cenu. Analýza obrazu je založena nejčastěji na barevném prostoru RGB, kde nejnižší oblastí barevného bodu je pixel, který informuje o třech barevných kanálech. Každý pixel lze považovat za senzor, který poskytuje vlastní sadu dat o analyzovaném vzorku.

Cholinesterázy (ChE) štěpí neurotransmitter ACh. Známe BChE a AChE (Pohanka M., 2011). AChE v těle ukončuje v cholinergním systému stimulaci hydrolyzou ACh na cholin a kyselinu octovou (Soreq H., Seidman S., 2001). Nejpoužívanější test aktivity AChE je obvykle založen na acetylthiocholinu a 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoové kyselině) jako chromogenním činidle. U Alzheimerovy choroby jsou pozorovány patologické změny u cholinergního nervového systému, kdy dochází k nedostatku cholinergního mediátoru ACh. ACh je štěpen pomocí cholinesteráz, proto je léčba zaměřená především na inhibitory těchto enzymů. Inhibitory ChE jsou látky přírodní nebo umělé a svým účinkem zasahují do rozpadu ACh a prodlužují jeho působení. Byl použit například fyzostigmin, který nebyl kvůli jeho vedlejším účinkům shledán za vhodného kandidáta pro léčbu. Dalším použitým inhibitorem byl takrin, který má dobrou syntetickou dostupnost nebo methoxyderivát (7-MEOTA), což je sloučenina, která vykazuje nízkou toxicitu.

2 Teoretická část

2.1 Optické metody

Mezi optické metody se například řadí kolorimetrie, fotometrie, refraktometrie, polarimetrie, nefelometrie, turbidimetrie či spektrofotometrie. Dělení těchto metod je na základě použité přístrojové techniky k detekci. Kolorimetrie patří mezi vizuální metody a je metodou subjektivní. Principem je měření koncentrace barevného roztoku o neznámé koncentraci a následné porovnání se standardním roztokem. Základem měření je Lambert-Beerův zákon. Ve fotometrii pracujeme s monochromatickým zářením z oblasti viditelného záření a detektorem je buď oko, nebo fotočlánek. U spektrofotometrie se setkáváme s viditelným nebo UV zářením, kde monochromatické záření vzniká průchodem světla hranolem nebo mřížkou. Jako detektor slouží fotočlánek nebo fotonka (Goliáš J., 2013).

2.1.1 Kolorimetrie

Stanovení různých substrátů se provádí pomocí kolorimetrických technik, a to za účasti měřicích spektrálních zařízení, anebo za pomoci vyšetření pouhým okem (Pohanka M., 2015). Vyhodnocení pouhým okem může způsobit nejistotu kvůli osobní subjektivitě a okolním podmínkám (Hong J., Chang B.-Y., 2014). Kolorimetrické testy jsou přímé a jednoduché metody pro stanovení množství analytu na základě barevné změny roztoku (Sajed S. et al, 2019). Kolorimetrie je jednou z nejjednodušších technik, kterou lze provádět s chytrým telefonem jako čtečkou signálu (Granica M., Tymecki L, 2019). Chytré telefony jsou schopny různých spektrometrických funkcí (Hong J., Chang B.-Y., 2014).

V posledních letech se stávají velmi populární papírové mikrofluidní analytické přístroje, vedoucí k vývoji praktické aplikace pro okamžité snímání více analytů point-of-care (POC) analýz, včetně HIV (Human Immunodeficiency Virus) čipů, papírové ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) metody a nízkonákladových kolorimetrických diagnostických testů. Jejich popularita je dána jednoduchostí a rychlostí screeningu nemocí. Výsledky těchto testů lze vyhodnotit pouhým okem, avšak je obtížné kvantifikovat množství analytu (Shen L., Hagen J.A., Papautsky I., 2012). Výzkum v oblasti POC se zaměřuje na miniaturizaci, integraci pro vyšší výkon, snížení nákladů na činidla a zvýšenou citlivost (Shen L. et al, 2011). V integrovaných zařízeních by měl proběhnout celý analytický proces, od předběžného zpracování až po měření a zpracování

dat (Zangheri M. et al, 2015). Testy POC se při kolorimetrické analýze často spoléhají na obrazové metody chytrých telefonů, ale výsledky těchto metod se často obtížně reprodukuje nebo standardizují. Problém se zhoršuje nepředvídatelnými podmínkami snímání obrazu, které představují významný problém při nízkém limitu detekce. Naproti tomu velkou výhodou je pohodlné používání této techniky, zařízení jsou kompaktní a ručně přenosná (Coleman B. et al., 2019).

2.1.2 Kolorimetrie digitálního obrazu

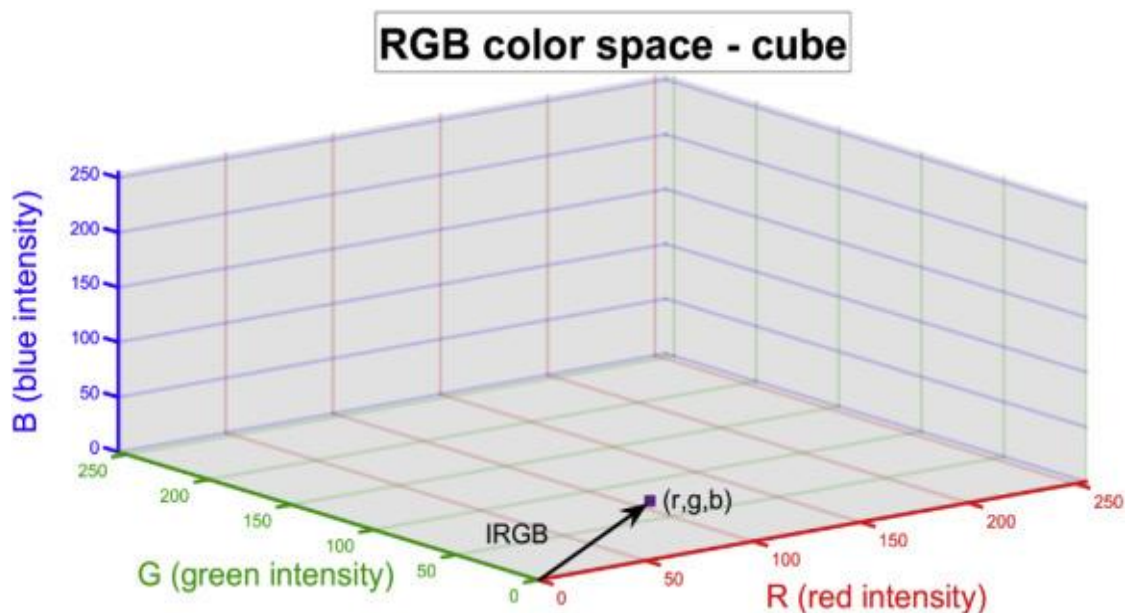
Novým typem kolorimetrické metody je kolorimetrie digitálního obrazu (DIC – Digital Image Correlation) (Lin B. et al., 2018). Digitální kolorimetrie je chemicko-instrumentální metoda založená na zpracování barevných obrázků analyzovaného vzorku. Jednoduchost, expresivita, nízké náklady a přístupnost umožňují použití této metody pro analýzu různých subjektů, například léčivých rostlinných surovin, barev, potravin, textilu, skla a dalších farmaceutických či průmyslových produktů (Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V., 2019). Data DIC jsou získávána z obrazového softwaru, což výrazně zvyšuje přesnost výsledků detekce (Granica M., Tymecki L, 2019). Avšak má i některá omezení, mezi která patří: nízká reprodukovatelnost, citlivost a selektivita. Mnoho z těchto problémů lze vyřešit vylepšením technologie digitální fotografie, vytvořením konzol s posuvným adaptérem založeným na principu plochého skeneru a také optimalizací podmínek měření analytického signálu. Pro zvýšení selektivity je vhodné použít molekulární senzory (Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V., 2019). DIC byl původně koncipován a vyvinut skupinou vědců na Univerzitě v Jižní Karolíně v 80. letech 20. století jako metoda vhodná pro měření rovinné deformace nominálně planárního objektu, jinak nazývaná 2D DIC. Luo P.F. (Luo P.F., Chao Y.J., Sutton M.A., Peters W.H., 1993), pro překonání omezení měření pouze v rovinných objektech, navrhl trojrozměrný 3D DIC (Shao X. et al., 2018).

2.1.3 Proces

DIC zahrnuje dva procesy, a to získávání obrazu a odečet barev. Pro analýzu barvy nasbíraného obrazu se používá software, který zlepšuje přesnost výsledků, jelikož detekce je výrazně zlepšena. Pro získání obrázku lze použít fotoaparát, skener, počítačovou kameru či chytrý telefon. Vzhledem k výhodám fotografických funkcí je nejlepším nástrojem chytrý telefon, ze kterého se obrázky získávají nejlépe (Lin B. et al., 2018).

Mobilní chytré telefony se ve společnosti staly všudypřítomné a dnes je již většina z nich vybavena digitálním fotoaparátem s vysokým rozlišením, který lze snadno použít k vytvoření obrazu. U chytrých telefonů jsou také k dispozici různé možnosti fotoaparátu, jako je autofokus, digitální zoom či vyvážení bílé barvy (Choodum A. et al, 2013). Tato zařízení jsou tedy jednoduchým nástrojem umožňující zpracování dat v analytické chemii. Další výhodou je cenová dostupnost ve srovnání s jinými analytickými přístroji, používanými jak v terénních, tak domácích podmínkách (Pohanka M., 2015). Navíc použití chytrých telefonů nevyžaduje vyškolený personál a analýza proběhne za relativně krátký čas (Shen L., Hagen J.A., Papautsky I., 2012). Pro výzkumy digitálního zpracování jsou obvykle preferovány dva barevné modely – RGB a CIELAB (Monogarova O.V., Chaplenko A.A., Oskolok K.V., 2019). Analýza obrazu DIC je založena především na barevném prostoru RGB, kde nejnižší oblast barevného bodu se nazývá pixel a každý pixel obsahuje informace o těchto třech barevných kanálech (Lin B. et al., 2018). Během zobrazovacího procesu je odražené světlo z předmětu kolorimetrického produktu vedeno přes RGB filtry a rozděleno do tří spektrálních rozsahů. Poté jsou detekovány a zaznamenány jako jednotlivé hodnoty RGB pomocí obrazového senzoru umístěného za filtrem (Wongniramaikul W., Limsakul W., Choodum A., 2018). Tyto barevné vrstvy jsou aditivně kombinovány a vytvářejí barevný obraz, který subjektivně reprodukuje původní barvy (Choodum A. et al. 2015). Hodnoty RGB se následně použijí a výsledná barva se skládá z aditivních dat tří filtrů RGB. Dále pak tato data slouží k vytvoření kalibračního grafu pro rychlou kvantifikaci (Wongniramaikul W., Limsakul W., Choodum A., 2018). Hlavní výhody modelu RGB je viditelnost a jednoduchost. Jakákoli barva může být rozložena na tři základní barvy a následně načtena softwarem pro zpracování obrazu. Pro každou základní barvu je hodnota intenzity u 8bitové fotografie vyjádřena celým číslem v intervalu od 0 do 255. Hodnota RGB souvisí s jasnou barvy a vysoká hodnota znázorňuje silnější jas (Lin B. et al., 2018). Hodnoty R, G a B se u různých modelů telefonů liší v důsledku rozdílů v pixelech a ohniskových délkách (Sajed S. et al, 2019). Každý barevný kanál má své konkrétní číslo. Informace v digitálním záznamu jsou uloženy v binárním čísle složeném z číslic 0 a 1. Bit je vyjádřen jako jednotka informace pro fotografování, to znamená číslo vyjádřené v binárních číslicích pro každý konkrétní kanál. 8bitový obrázek poskytuje 256 variací na barevný kanál, 12bitový obrázek má 4096 barevných odstínů, 14bitový má 16384 variací. Většina digitálních fotoaparátů má standardní jpeg formát, který má obvykle 8 bitů. Formát jpeg a gif má nízkou barevnou hloubku, lépe je na tom formát

tiff, který je zpracován v 16bitových barevných hloubkách (Pohanka M., 2017). Barvy vrácené každým ze tří kanálů se označují jako subtraktivní barva, protože selektivně absorbují určité vlnové délky světla, a tím ovlivňují viděnou barvu (Maleki N., Safavi A., Sedaghatpour F., 2004). Oko vidí obrácenou složku barvy, která je primárně absorbována, například pokud se objekt jeví jako červený, je to proto, že objekt tuto barvu odráží nebo přenáší a absorbuje se modrá část spektra. Tímto je vysvětlen i rozdíl mezi světlými a barevnými barvivy – přidáním červeného, zeleného a modrého světla ve stejném poměru se vytvoří bílá, zatímco přidáním azurového, žlutého a purpurového barviva ve stejném poměru se vytvoří černá (Byrne L. et al., 2000). Model barevného prostoru RGB je založen na kartézském systému, ve kterém jsou kombinovány barvy červené, modré a zelené (obr. 1). RGB model je aditivním systémem barev, který pracuje s abstraktními hodnotami obrazu a není ovlivněn mezí lidského oka. V tomto modelu lze barvu vyjádřit pomocí intenzity dané vztahem: $I_{RGB}^2 = I_R^2 + I_G^2 + I_B^2$ (Ioan M.-R., 2018). Celkové hodnoty RGB lze vypočítat buď z hlediska intenzity, nebo z hlediska absorbance: $A_{CELKEM} = A_R + A_G + A_B$ (Choodum A. et al., 2014).



Obrázek č. 1: Krychle barevného prostoru – od počátku [(0, 0, 0) souřadnice] do určitého bodu [(r, g, b) souřadnice] označuje ekvivalentní intenzitu spojenou s určitou barvou (Ioan M.-R., 2018)

V 8bitových souřadnicích lze získat barevný prostor $256 \times 256 \times 256$ hodnot, což znamená více než 16 milionů barevných tónů. Bod mající souřadnice 0, 0, 0 představuje čistě černou barvu, bod se souřadnicemi 256, 256, 256 představuje čistě bílou barvu (Ioan M.-R., 2018). Použití digitálních obrazů otevírá možnost zvýšeného využití

zpracování počítačovým softwarem bez nutnosti časově náročného skenování obrazů, vytvořených běžnými fotografickými technikami (Byrne L. et al., 2000). Univerzálním softwarem pro získání barev, který je používán na chytrých telefonech, je Touch Color. Aplikace Touch Color analyzuje barvu obrázků a během jedné sekundy převede barvy na data RGB (Lin B. et al., 2018). Jednotlivé intenzity RGB pro každý pixel digitálního barevného obrazu lze také extrahovat pomocí dalšího programů, jako je Matlab, Kylix, Visual Basic, Corel Draw, GIMP a Adobe Photoshop. Rozdíly mezi těmito programy nejsou podstatné (Choodum A. et al., 2015). Klíčovou nevýhodou všech těchto metod je potřeba specializovaného vybavení a analýzy pomocí počítače (Shen L., Hagen J.A., Papautsky I., 2012).

2.1.4 Kvantifikace barev

V letech 1928 až 1932 provedli první experimenty Wright a Guild ve snaze kvantifikovat každou vnímatelnou barvu z hlediska tří základních barev. Tyto experimenty vedly k prvnímu barevnému modelu XYZ, kde jsou ke každé barvě přiřazeny tři hodnoty odpovídající relativní intenzitě, kde jedna z hodnot může být záporná. Model XYZ lze transformovat do souřadnic barev CIELAB (L^* , a^* , b^*) pomocí nelineární transformace (Schaefer S., 2012).

Obrazový snímač je jedním z hlavních stavebních kamenů v digitálním zobrazovacím systému, jako je například digitální fotoaparát nebo videokamera. Plošný obrazový snímač se skládá z řady pixelů, z nichž každý obsahuje fotodetektor, který převádí dopadající světlo na fotoproud (El Gamal A., Eltoukhy H., 2005). Objekty selektivně absorbují a odrážejí určité vlnové délky světla. Odražené světlo prochází při fotografování objektu filtrem fotoaparátu a je snímáno obrazovými senzory (Choodum A. et al., 2014). Obrazový snímač je jedním z hlavních stavebních kamenů v digitálním zobrazovacím systému, jako je například fotoaparát nebo videokamera (El Gamal A., Eltoukhy H., 2005). Fotoaparáty chytrých telefonů využívají buď CMOS (Complementary Metal-Oxid-Semiconductor/komplementární polovodič oxidu kovu) či CCD (Charge – Coupled Devices/senzor s nábojově vázanou strukturou) obrazové snímače, které převádí světlo na elektrické náboje a dále na elektrické signály a snadno integrují řadu automatizovaných funkcí, jako je například Auto White Balance. Tato funkce zajišťuje kvalitní reprodukci barev pomocí úpravy detekovaných RGB signálů v různých poměrech. Výsledné obrázky jsou jasnější a příjemnější pro naše oči. U kvantitativního měření však úprava hodnot RGB může vést ke zkreslení měření (Shen

L., Hagen J.A., Papautsky I., 2012). Každý pixel CCD přenáší náboj jako analogový signál, který má být převeden na napětí mimo pixelový senzor, zatímco CMOS má vlastní inherentní konverzi náboje na napětí. Snímače CCD jsou teoreticky vynikající a jsou široce používané jako detektory, naproti tomu systémy CMOS jsou menší, rychlejší a levnější (Choodum A. et al., 2015). Jedna z největších výhod CMOS senzorů oproti CCD je schopnost integrovat snímání s analogovým a digitálním zpracováním až na úroveň pixelu (El Gamal A., Eltoukhy H., 2005).

Kamera CMOS je dvourozměrná matice vyrobená z polovodivých komponent, která poskytuje informace o intenzitě světla, které lze převést na analytický signál. Jedná se o monochromatické zařízení, které není schopno rozlišovat blízko umístěné vlnové délky. Může indikovat pouze intenzitu světla po filtrování barev (Granica M., Tymecki L., 2019). Fotoaparáty některých výrobců poskytují vysoké rozlišení, které je schopno detekovat rozdíly barev v malé oblasti obrazu. Sensory těchto aparátů poskytují větší oblast obrazových bodů, a proto jsou obrázky jasné a ostré i při vyšším zoomu. Takové senzory jsou vhodné pro kvantitativní i kvalitativní analýzu sledovaných látek. Digitální kolorimetr obrazu se rozlišuje ve dvou systémech, a to otevřený a uzavřený systém. Otevřený systém používá pro analýzu pouze mobilní telefon. Na snímky budou mít vliv vnější faktory, jako je vysoký jas okolního světla, poloha vzorku a zaostřovací vzdálenost. Uzavřený systém používá mobilní telefon spojený s vytvořeným světelným boxem pro fotografování, kterým lze omezit vnější faktory, proto je uzavřený systém lepší než otevřený (Masawat P., Harfield A., Namwong A., 2015).

2.2 Acetylcholin

ACh je první objevený neurotransmitter, který byl poprvé popsán ve 20. letech 20. století fyziologem Otto Loewim jako „vagový materiál“, díky jeho schopnosti napodobit elektrickou stimulaci nervu vagu (Loewi O., 1921). ACh byl nalezen v mnoha organismech, například u prvoků (*Trypanosoma rhodesiense*), v bakteriích (*Lactobacillus plantarum*), ale také v rostlinách. Proto existují domněnky, že je ACh fylogeneticky velmi starou molekulou, která v těchto primitivnějších strukturách zastává funkci, jako je regulace transportních procesů přes buněčnou membránu (Kawashima K., Fujii T., 2000). Dnes je považován za hlavní neurotransmitter, který iniciuje reakci interakcí s muskarinovými a nikotinovými receptory ACh, v mozkových neuronech. ACh je degradován na cholin a acetát dvěma blízkými homologními enzymy, a to AChE a BChE (Soreq H., Seidman S., 2001). Navzdory dlouhé historii studia je o původu nebo funkci ACh v krvi známo jen málo (Kawashima K., Fujii T., 2000). Je extrémně nestabilní a obtížně měřitelný v oběhu, proto se jako nepřímé měření parasymptické funkce používá jeho hydrolyzující enzymy AChE a BChE (Shenhar – Tsarfaty S. et al., 2020). Je syntetizován v presynaptických neuronech z cholinu pomocí enzymu cholin-acetyltransferáza a acetyl-CoA je uvolněn díky exocytóze do synaptické štěrbině. Reverzibilní vazba ACh na ACh receptor na postsynaptickém neuronu iniciuje signál a přenos pokračuje. Nevyvázaný ACh je zachycen AChE, následně je hydrolyzován a cholin se vrací zpět do presynaptického neuronu k opětovnému použití (Štěpánková Š., Komers K., 2008).

2.3 Cholinesterázy

ChE patří do skupiny hydroláz, které štěpí esterovou vazbu. Podle afinity k substrátu a inhibitoru dělíme esterázy na A, B a C. A-esterázy, aromatické esterázy a arylerázy hydrolyzují aromatické estery rychleji než alifatické estery. B-esterázy, alifatické esterázy, aliesterázy, karboxyesterázy hydrolyzují alifatické estery rychleji než aromatické estery. C-esterázy, ChE hydrolyzují estery cholinu rychleji než jiné estery (Bajgar J., 2004). ChE jsou klíčové enzymy při přenosu centrálních a periferních cholinergních nervových impulzů. Patří zde dva enzymy, a to AChE a BChE (Pezzementi L., Chatonnet A., 2010). AChE a BChE jsou shodné více než v 50 %, avšak jejich význam a umístění v těle se liší, rozlišují se především na základě jejich substrátové specifity (Fujii T. et al., 1997). AChE se podílí na hydrolýze neurotransmiteru ACh, zatímco fyziologická funkce BChE, není příliš známá (Nicolet Y. et al., 2003). Výchozím

substrátem pro AChE je ACh, BChE hydrolyzují estery, jako je butyrylcholin a propionylcholin. Oba enzymy mohou být inhibovány některými organofosfáty, estery karbamátu a dalšími chemickými sloučeninami. Jedním z prvních studovaných inhibitorů ChE byl fyzostigmin, což je alkaloid z kalabarského bobu (*Physostigma venenosum*). Brzy poté se u neostigminu prokázaly léčivé účinky u nemoci myasthenia gravis (Wilson B.W., 2014). Aktivita ChE je ovlivněna pohlavím, věkem, výživou, hormonálními faktory, zářením aj. Pro biochemické vyšetření se jako hlavní zdroj materiálu uvádí krev, popřípadě moč (Bajgar J., 2004).

2.3.1 Acetylcholinesteráza

AChE je serinová hydroláza. Velikost podjednotky AChE je 69 kDa (Pohanka M., 2017). Hlavní funkcí AChE je rozštěpení ACh a tím se ukončí cholinergní neurotransmise (Fukuto T R., 1990). Druhou významnou rolí je cholinergní protizánětlivá cesta v krevních buňkách, a to zejména v makrofázích (Pohanka M. et al., 2010). AChE je hlavní ChE v mozku a provádí hydrolýzu ACh podstatně rychleji než BChE (Loewenstein-Lichttenstein Y. et al., 1995). AChE se tedy nachází především v mozku a na nervosvalových ploténkách kosterních svalů, ale dále je přítomna také v různých extraneuronálních tkáních a orgánech, jako je například plodová voda, placenta, slezina, epiteliální buňky v dýchacím a trávicím systému a také v krvi. Navzdory dlouhé historii studia je o původu nebo funkci ACh v krvi známo jen málo (Kawashima K., Fujii T., 2000). Z důvodu výskytu AChE na erytrocytech je tento enzym možno použít jako standardní biochemický marker nebo se dá využít při rozpoznání otrav (Santarpia L. et al., 2013). Poměrně vysoká hladina AChE může být pravděpodobně zodpovědná za degradaci plazmatického ACh (Fujii T. et al., 1997). Acetylcholinesteráza byla identifikována v mononukleárních leukocytech z lidské krve, lidských leukemických T buněčných liniích a lymfocytech potkanů. Spolu s BChE to jsou izoenzymy patřící do rodiny cholinesterázových hydroláz (Kawashima K., Fujii T., 2000). AChE je velmi účinný enzym s obratem 10^3 – 10^4 s⁻¹, pracující rychlostí blízké hranici difúze (Colletier J.-P. et al., 2006).

Struktura AChE je široce zkoumána od 90. let. První experimenty byly provedeny na modelovém organismu parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*), jelikož je snadno dostupný. Struktura molekuly AChE se skládá z 12 β -skládaných listů, okolo kterých je 14 α -helixů (Sussman J.L. et al., 1991). Aktivní centrum AChE

je umístěno uprostřed enzymu poblíž hluboké rokle a skládá se z pěti hlavních vazebných míst:

1) oxyaniontová díra, která je součástí esteratického místa a stabilizuje navázanou acetylovou skupinu,

2) esteratické nebo též esterové místo, které je složeno z katalytické triády Ser200-His440-Glu327 u paúhoře elektrického a Ser203-His447-Glu334 u AChE lidského původu,

3) aniontové vazebné místo pro substrát, v něm se nacházejí zbytky aminokyselin Trp84, Tyr121, Phe330 u AChE paúhoře elektrického a Gly121, Gly122 a Ala204 u AChE člověka, toto místo obsahuje malý počet záporných nábojů, ale mnoho aromatických zbytků, kde se kvartérní amoniová část ACh váže s π elektrony aromatických skupin,

4) aktivní selektivní aromatické vazebné místo, kde se selektivně vážou arylové sloučeniny,

5) acylové vazebné místo, které váže acetylovou skupinu ACh.

Kromě 5 vazebných míst má AChE paúhoře elektrického také periferní aniontové místo (PAS) neboli β -anionické místo (Trp279, Tyr70, Tyr121, Asp72, Glu199, Phe290), které může vázat takrin a příbuzné sloučeniny (Lin G., Lai Ch.-Y., Liao W.-Ch., 1999). Aktivní místo se nachází ve 20 Å (2 nm) aromatické štěrbině, což je hluboká úzká rokle (dutina). Zde se nachází také anionické místo. Obě tato místa jsou od sebe odlišná. Struktura katalytické triády je podobná v AChE, BChE, lipázách a jiných serinových proteázách (Sussman J.L. et al., 1991). Přenos substrátu v AChE zahrnuje alespoň dvě vazebná místa, katalytická a periferní aniontová místa, o nichž se předpokládá, že jsou alostericky příbuzná (Colletier J.-P. et al., 2006). Existují také náznaky, že AChE může působit i na jiné substráty. Možnost, že AChE může mít i jiné substráty by mohlo vysvětlit, proč se nejvyšší koncentrace ACh a AChE vždy neshodují (Kerkut G.A., 1984).

2.3.2 Inhibitory acetylcholinesteráz

Mezi inhibitory acetylcholinesteráz (AChEI) patří široká škála chemických sloučenin, které se liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Patří zde například přírodní toxiny, léky, bojové chemické látky, pesticidy a další (Pohanka M., 2011). Inhibitory AChE mohou inhibovat aktivitu AChE kompetitivním mechanismem prostřednictvím interakce s katalytickým centrem enzymu vazbou na periferní aniontové místo nebo dvojitou inhibicí vazby AChE (Francis P.T. et al., 1999). Inhibitory AChE jsou stále hlavním léčivem k léčbě Alzheimerovy choroby (Goncalves K.G. et al., 2020). Používají se také jako léčba nemoci myastenia gravis. Nežádoucí vedlejší účinky acetylcholinesterázových inhibitorů zahrnují svalové křeče, záškuby, nadměrné pocení, slinění, slzení, inkontinenci a gastrointestinální potíže (Katz N.K., Barohn R.J., 2020).

Sloučeniny, které inhibují AChE, můžeme rozdělit do 3 základních skupin:

- 1) sloučeniny, které se vážou v aktivním místě, buď s esterovým, nebo aniontovým místem,
- 2) sloučeniny reagující s aromatickou roklí,
- 3) sloučeniny, které se vážou na periferní neboli β -aniontové místo (Pohanka M., 2011).

Příklady inhibitorů jsou organofosfátové sloučeniny (metrifonát), fluoroketony, karbamáty (rivastigmin, fyzostigmin), aminosloučeniny (donepezil), akridiny (takrin) a alkaloidy (huperzin A). AChEI vážající se na aktivní místo jsou 9-aminoakridin, takrin a jeho deriváty a propidium (Lin G., Lai Ch.-Y., Liao W.-Ch., 1999). Vazba mezi AChE a těmito inhibitory může být reverzibilní, pseudo-ireverzibilní nebo nevratná v kinetickém smyslu. Avšak všechny reakce jsou termodynamicky nevratné (ireverzibilní) (Štěpánková Š., Komers K., 2008).

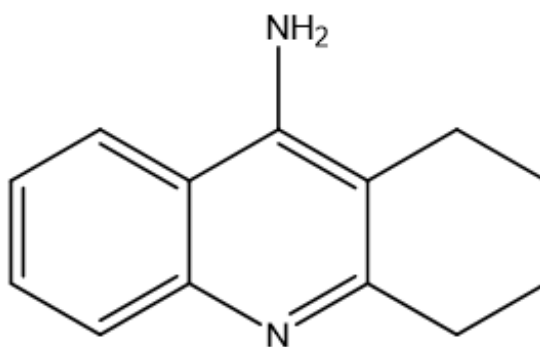
Reverzibilní inhibitory

Mezi reverzibilní a krátkodobě působící inhibitory patří obecně aminoakridiny, alkaloidy, N-benzylpiperidiny a konkrétně například takrin nebo donepezil, které interagují s enzymem poblíž svého katalytického místa, aniž by produkoval kovalentní komplex (Camps P., Munoz-Torrero D., 2002). Tyto vazby se tvoří rychle a také se snadno rozpadají. Z toho vyplývá, že reverzibilní inhibitory účinkují okamžitě, ale dočasně deaktivují enzym a jejich doba působení je velmi krátká (v rámci minut).

Donepezil má, oproti jiným inhibitorům, afinitu pouze k AChE (Štěpánková Š., Komers K., 2008).

Takrin

Takrin (1,2,3,4-tetrahydro-9-akridinamin-monohydrochlorid) (obr. 2) ve formě monohydrochloridu byl v roce 1993 prvním schváleným lékem Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států pro paliativní léčbu Alzheimerovy choroby (Mehta M., Adem A., Sabbagh M., 2012). Dnes je však použití takrinu omezené kvůli významnému výskytu hepatotoxicity a poškození kardiovaskulárního systému (Gniazdowska E. et al., 2019). I přes vedlejší účinky je takrin stále atraktivní sloučeninou díky své syntetické dostupnosti, nízké molekulové hmotnosti a relativně snadné modifikaci (Nepovimova E. et al., 2015). Proto byl takrin v minulosti a v novějších studiích široce používán k navrhování hybridních nebo víceúčelových sloučenin, aby bylo možné kombinovat jeho silnou inhibici AChE s dalšími farmakologickými vlastnostmi. Například se jedná o hybridy takrin-rhein, takrin-kumarin, donepezil-takrin nebo takrin-melatonin aj. (Romero A. et al., 2013). Takrin se váže na aniontové místo enzymu AChE, inhibuje enzym a tím prodlužuje cholinergní aktivitu. Při vysokých koncentracích má takrin další účinky včetně blokování sodíkových a draselných kanálů a přímý účinek na muskarinové receptory (Davis K.L., Powchick P., 1995). Dále inhibuje monoaminoxidázu, ve větší míře monoaminoxidázu A než monoaminoxidázu B. Takrin se rychle vstřebává, absolutní biologická dostupnost je přibližně $17\% \pm 13\%$, je to pravděpodobně kvůli velmi vysokému metabolismu prvního průchodu. Jídlo snižuje absorpci takrinu a systémovou dostupnost (Wilson B. et al., 2010). Stimuluje žaludeční sekreci, což může zvýšit podráždění žaludku a případné žaludeční krvácení, tzn., že pacienti s anamnézou gastrointestinálního krvácení nejsou vhodnými kandidáty pro užívání léků obsahující takrin. Z 55 % je vázán na plazmatické bílkoviny a je značně metabolizován v játrech cytochromem P450, přičemž hlavním metabolitem je 1-hydroxytakrin (Davis K.L., Powchick P., 1995).



Obrázek č. 2: Molekula takrinu

Pseudo-ireverzibilní inhibitory

Středně působící inhibitory se vážou s enzymem pomocí kovalentní vazby. Tato skupiny zahrnuje karbamáty, které tvoří komplex se serinovým zbytkem katalytické triády AChE. Zde patří první zkoumaná sloučenina fyzostigmin. Pro nedostatečnou účinnost byly však klinické studie zastaveny. Eptastigmin je AChEI druhé generace, má nižší toxicitu a delší dobu působení, avšak ani tento inhibitor v klinických studiích neuspěl. I přes mnoho zkoumaných karbamátů byl schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby pouze rivastigmin (Camps P., Munoz-Torrero D., 2002). Vzniklý konjugát je nestabilní a pomalou hydrolýzou dochází k návratu aktivity ChE, což je hlavním rozdílem oproti ireverzibilním inhibitorům (Pohanka M., 2017).

Ireverzibilní inhibitory

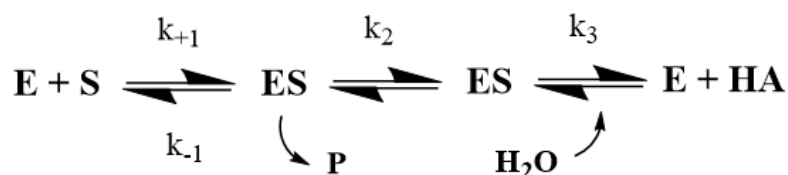
Jsou to dlouhodobě působící látky známé jako inaktivátory enzymu. Zde patří látky zvané organofosfáty (Camps P., Munoz-Torrero D., 2002). Ty se vážou pomocí kovalentní vazby do aktivního místa, konkrétně na hydroxylovou skupinu serinu, a tím trvale blokují aktivitu enzymu. Organofosfáty mohou inhibovat oba enzymy, jedná se o látky nervově paralytické, používané ve vojenství. Patří zde sarin, soman, tabun a další (Pohanka M., 2017). Jediným zástupcem, který prošel rozsáhlou klinickou studií je metrifonát. Jedná se o neaktivní proléčivo, které se *in vivo* neenzymaticky transformuje na aktivní formu, avšak ani ten, po klinické fázi III, nebyl schválen (Camps P., Munoz-Torrero D., 2002).

2.3.3 Butyrylcholinesteráza

BChE, jinak nazývána nespecifická cholinesteráza, sérová cholinesteráza nebo pseudocholinesteráza, je α -glykoprotein syntetizovaný v játrech a dále pak secernován do krevního oběhu (Santarpia L. et al., 2013). Může se nacházet v plazmě i séru a slouží jako biochemický marker pro některé patologické děje v organismu (Pohanka M., 2014). BChE je hlavním ACh hydrolyzujícím enzymem v oběhu (Loewenstein-Lichttenstein Y. et al., 1995). Proto byla v minulosti BChE nazývána též plazmatická ChE. Název je odvozen od umělé chemické sloučeniny butyrylcholinu, která není tělu vlastní (Pohanka M., 2017). BChE hydrolyzuje butyrylcholin, ale také ACh. Butyrylcholin se používá jako substrát na rozlišení mezi dvěma typy ChE (Štěpánková Š., Komers K., 2008). Předpokládá se, že BChE nemá v organismu příliš velký význam. Velikost podjednotky BChE je 85 kDa (Pohanka M., 2017). Bylo zjištěno, že někteří jedinci nemají žádnou aktivní BChE, a i že přes úplnou absenci jsou zdraví, tato informace vedla k myšlence, že BChE nemá žádnou fyziologickou funkci, a proto nebyla dostatečně studována (Lockridge O., 2015). Lidská BChE však dnes přitahuje pozornost, jelikož může hydrolyzovat toxické estery, jako je kokain, nebo zachytávat organické fosforové pesticidy a nervové látky. BChE se vyskytuje hojně v plazmě, asi 3 mg/l a může degradovat velké množství sloučenin obsahující estery. Proto hraje důležitou farmakologickou a toxikologickou roli. Například je potencionální detoxikační enzym, který se používá profylakticky proti neurotoxickým organofosforečnanům, jako je nervový plyn soman (Nicolet Y. et al., 2003). Aktivita BChE je nevratně inhibována organofosforovými sloučeninami, například nervovým činidlem sarinem, v lidské plazmě je aktivita BChE snížena při těhotenství, onemocnění jater, u lidí s podvýživou, karcinomem a dalších patologických stavů, naopak vysoká aktivita se nachází v plazmě obézních jedinců (Lockridge O., 2015). Aktivita BChE se obvykle měří spektrofotometrickou Ellmanovou metodou (Pohanka M., 2014).

2.4 Reakční kinetika hydrolýzy ACh

Hydrolýzu ACh působením AChE lze při nízkých koncentracích substrátu vyjádřit jako:



E – volný enzym,

S – substrát (ACh),

P – cholin,

ES – komplexní enzym – substrát,

EA – acylovaný enzym,

ks – reakční rychlost konstanty,

HA – kyselina octová (Hofer P., Fringeli U.P., 1981).

Proces hydrolýzy ACh je vícestupňová reakce, která zahrnuje vznik reverzibilního komplexu enzym-substrát, acylaci katalytického místa enzymu, hydrolýzu komplexu enzym-substrát za vzniku kyseliny octové, cholinu a regenerovaného enzymu (Wilson B.W., 2014).

Za předpokladu ustáleného stavu pro všechny druhy enzymů se rychlost reakce vyjadřuje jako:

$$v = \frac{V_m [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{cat} [E]_t [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

$V_m = k_{cat} \times [E]_t$ – maximální reakční rychlost při vysoké koncentraci substrátu,

$[E]_t$ – celková koncentrace enzymu, která je rovna totální koncentraci aktivního místa,

K_M – Michaelisova konstanta:

$$K_M = \frac{k_3 \times (k_{-1} + k_2)}{k_1 \times (k_2 + k_3)} \quad (2)$$

k_{cat} – číslo obratu:

$$k_{cat} = \frac{k_2 \times k_3}{k_2 + k_3} \quad (3)$$

Pokud se reakce katalyzovaná enzymem chová podle schématu 1, pak se reakční rychlost blíží maximální hodnotě $V_m = k_{cat} \times [E]_t$. Aktivita AChE však takového limitu nedosahuje, ale vykazuje fenomén substrátové inhibice (Hofer P., Fringeli U.P., 1981).

Důležitým rysem K_M je její nezávislost na koncentraci enzymu $[E]_t$. Podle reakčního mechanismu neboli kinetiky inhibice dělíme inhibitory na kompetitivní, nekompetitivní, akompetitivní a smíšené. Kompetitivní inhibice je charakterizována vazbou inhibitoru na aktivní místo enzymu a inhibici lze zvrátit. Rychlost reakce závisí na koncentraci substrátu a inhibitoru a na jejich afinitě k enzymu. Nekompetitivní inhibice nelze zvrátit a inhibitor reaguje s jinými částmi enzymu raději než s aktivním místem. Enzymatická reakce může být nevratná, pokud je relativně vysoká hodnota koncentrace inhibitoru oproti koncentraci enzymu (Bajgar J., 2004).

Kompetitivní inhibice

Kompetitivní inhibitor se může vázat na katalyzující místo enzymu určené pro substrát, jelikož je inhibitor strukturně podobný substrátu. Inhibitor soutěží se substrátem o obsazení vazebného místa pro substrát. V plné (čisté) kompetitivní inhibici se předpokládá, že se inhibitor váže na volný enzym, a ne na komplex enzym-substrát (Štěpánková Š., Komers K., 2008). Inhibici lze zvrátit zvýšením koncentrace substrátu, a tudíž se jedná o reverzibilní inhibici. Rychlost reakce závisí na koncentraci substrátu a inhibitoru a na jejich množství vůči enzymu. Maximální rychlost je v porovnání s maximální rychlostí neinhibované reakce neměnná, ale Michaelisova konstanta se zvyšuje (Bajgar J., 2004).

Nekompetitivní inhibice

Nekompetitivní inhibitor se váže na místo odlišné od místa katalytického. To umožňuje vazbu substrátu do katalytického místa. Nicméně vazba inhibitoru způsobí takové konformační změny, které neumožňují změnu komplexu enzym-substrát-inhibitor na produkt nebo je znemožněna vazba substrátu na enzym. Při plné nekompetitivní inhibici se inhibitor váže se stejnou afinitou jak na volný enzym, tak na komplex enzym-substrát. Tato inhibice vytváří nejjednodušší příklad alosterického efektu – změna

struktury mimo katalytické místo způsobí změnu reakční rychlosti. Takrin patří mezi nekompetitivní reverzibilní inhibitory ChE, váže se na aniontové místo enzymu (Štěpánková Š., Komers K., 2008). Tuto reakci nelze zvrátit (Bajgar J., 2004).

Akompetitivní inhibice

Inhibitor se reverzibilně váže na komplex enzym-substrát. Vznikající komplex enzym-substrát-inhibitor nelze při plné inhibice převést na produkt (Štěpánková Š., Komers K., 2008). Poměr Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti je neměnný v porovnání s kinetickými parametry neinhibované reakce.

Smíšená inhibice

Inhibitor mění afinitu enzymu k substrátu (K_M) a katalytickou rychlost změny substrátu na produkt (V_m). Tento typ inhibice nastává v případech, kdy nejsou splněny přesné podmínky výše zmíněných tří typů inhibice. Výsledek je složitější k vyjádření K_M a V_m . Smíšená inhibice nemusí vést pouze k hyperbolické závislosti reakční rychlosti vs koncentrace substrátu při konstantní koncentraci inhibitoru, ale také k závislosti sigmoidální (Štěpánková Š., Komers K., 2008).

2.5 Biomarker

Biomarker byl definován v roce 1998 podle Biomarkers Definitions Working Group jako určitá měřitelná charakteristika, která odráží fyziologické, farmakologické nebo patologické procesy. V zásadě se jedná o biologické látky, které lze použít k indikaci určité choroby. Dobrý biomarker by proto měl být přesný, spolehlivý a levný, snadno rozlišitelný mezi fyziologickými a patologickými tkáněmi (Rachakonda V., Pan T.H., LE W.D., 2004). Klinické studie naznačují, že cholinergní parametry se stávají čím dál tím více důležitými a relevantními jako biomarkery nemoci než kdy dříve (Shenhar – Tsarfaty S. et al., 2014). Například u Alzheimerovy choroby dochází nejen k depleci ACh, ale také můžeme pozorovat změny AChE a BChE. Kombinované použití těchto dvou markerů poskytuje více než 90% citlivost a specifitu při detekci této nemoci. Kombinace několika biomarkerů vede ke zvýšení přesnosti, specifity a citlivosti. (Rachakonda V., Pan T.H., LE W.D., 2004).

Během patogeneze Alzheimerovy choroby prochází AChE dynamickými změnami. Snížení mozkové aktivity AChE bylo prokázáno u pacientů s mírnou kognitivní poruchou, tak u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Snížená aktivita AChE byla také zaznamenána v mozkomíšním moku u pacientů s těžkou demencí, proto má velký potenciál jako biomarker pro predikci depozice β -amyloidu v mozku u jedinců v kognitivně normálním stavu (Han S-H. et al., 2019).

Tento enzym lze tedy také využít jako biomarker při hodnocení kvality vodního prostředí, při hodnocení účinků insekticidů na ryby, krevety a další vodní živočichy. AChE je při toxikologických testech velmi důležitá, protože může vypovídat o přímých negativních účincích na organismus (Thanomsit Ch. et al., 2021).

Aktivita BChE se využívá jako biochemický marker při hodnocení funkce jater v klinické diagnóze. Nedávné studie ukázaly, že se BChE také podílí na různých dalších onemocněních, jako je cukrovka, kardiovaskulární choroby, Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Proto se pracuje na vývoji spolehlivých testů pro přesně sledování aktivity BChE v reálném čase v klinické diagnostice (Ma J. et al., 2020). BChE je také vhodný pro diagnostiku otrav organofosfátovými a karbamátovými neurotoxiny (Pohanka M., 2017).

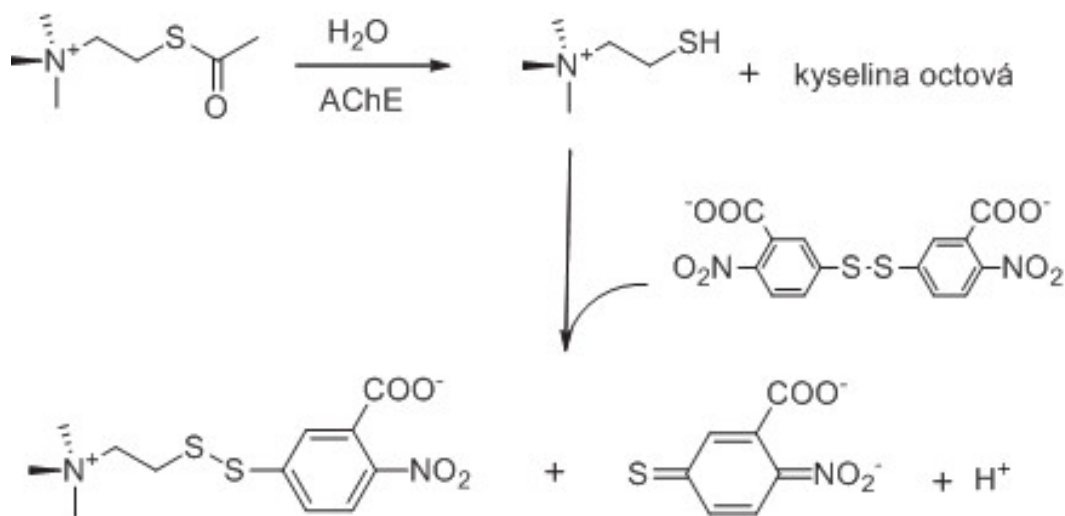
2.6 Metody stanovení cholinesteráz

Stanovení aktivity cholinesterázy je založeno na mnoha principech. Obecně se k pufované směsi přidá enzym a enzymatická reakce je zahájena přidáním substrátu. Kvůli různým faktorům musí být podmínky reakce velmi pečlivě zvoleny. Podle postupu a laboratorního vybavení se mohou použít pro stanovení AChE různé metody (Bajgar J., 2004). Pro analýzu aktivity AChE byla vyvinuta řada analytických technik, včetně kolorimetrických, spektrofotometrických, chemiluminiscenčních, elektrochemických a fluorescenčních (Šinko G., 2007). Tyto metody jsou také vhodné pro detekci inhibitorů ChE pomocí biosenzorů nebo pro detekci chemických bojových látek (Bajgar J., 2004). Jedním z příkladů metody určení ACh je Hestrinova metoda, která využívá reakci ACh s hydroxylaminem a chloridem železitým za vzniku červenofialového komplexu (Wilson B.W., 2014). Tato metoda je spíše vhodná pro stanovení hladiny ChE v malém množství buněk kultivovaných *in vitro* (Ellman G.L., 1961). Několik testů používá radioaktivní ACh, ale nevýhodou je nákladná likvidace radioaktivního odpadu (Wilson B.W., 2014).

2.7 Ellmanova metoda

Obligátním testem, jak stanovit aktivitu ChE je tzv. Ellmanova metoda. Spetrofotometricky stanovuje aktivitu jak AChE, tak i BChE za použití acetylthiocholinu nebo butyrylthiocholinu, v závislosti na enzymu (Pohanka M., 2011). Tato metoda je vhodná pro korelaci s jinými metodami, protože je dostatečně specifická a citlivá, proto se používá pro různé účely po celém světě (Bajgar J., 2004).

Aktivita ChE se měří nepřímo kvantifikací koncentrace iontu kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové (TNB) vytvořené reakcí mezi thiolovým chromogenním činidlem 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DTNB) a thiocholinem. Thiocholin vzniká hydrolyzou thioesteru za přítomnosti působení enzymu a vzniku příslušné kyseliny (obr. 3). Výsledek je měření žlutého iontu TNB při vlnové délce 412 nm (Ellman G.L., 1958). Ellman stanovil molární absorpční koeficient 4-nitrofenylthiolátu $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ při 412 nm v 50% vodném acetonu obsahujícím 20 mmol/l fosfátu, při pH 8 a tuto hodnotu použil také pro TNB. V průběhu let byly reakční podmínky upraveny, aby bylo možné ChE stanovit také v plné krvi, nebo při jiné teplotě a molární absorpční koeficient byl stanoven na $\epsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Eyer P. et al., 2003).



Obrázek č. 3: Princip Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE (Pohanka M., 2017)

Tradiční spektrofotometrická Ellmanova metoda je rychlá, jednoduchá a levná, avšak má i řadu nevýhod, jako je velká odchylka v zakalených roztocích a silná závislost na hodnotě pH (Beveridge T., Toma S.J., Nakai S., 1974). Nevýhodou Ellmanovy metody je interference látek obsahující oximy a thioly (Šinko G., 2007). Mezi další látky, které mohou zkreslovat výsledky stanovení patří například hemoglobin při dané vlnové délce (Pohanka M., 2017). Při skladování roztoků s DTNB je třeba tyto vzorky chránit před světlem, aby se zabránilo tvorbě žlutých produktů fotodegradace a nedošlo tak k dalšímu zkreslení výsledků (Eyer P. et al., 2003).

Vyjádření aktivity se velmi liší, obvykle je vyjádřena jako μmol substrátu hydrolyzovaného za minutu (jednotku času) na ml zkoumaného materiálu (například plazmy nebo séra) nebo na mg hmotnosti tkáně (mokrý, suchý). Z těchto hodnot lze odvodit vyjádření aktivity v jednotkách – množství enzymu katalyzující přeměnu μmol substrátu za minutu za standardních podmínek. V klinické laboratoři lze aktivitu také vyjádřit jako katal na litr, to je 1 mol substrátu hydrolyzovaného za sekundu na litr nebo na kg (Bajgar J., 2004).

3 Cíl práce

1. Optimalizace fotometrické techniky pomocí řady pufrů o různém pH na pH papírcích od dvou různých výrobců
2. Optimalizace a ověření spektrofotometrické Ellmanovy metody pro stanovení AChE
3. Zjištění vlivu koncentrace substrátu na intenzitu barevného signálu na pH papírcích a vlivu času na intenzitu barevného signálu na pH papírcích
4. Určení IC_{50} (tj. koncentrace inhibitoru, která inhibuje aktivitu enzymu na 50 %) a LOD takrinu jak u metody fotometrické, tak spektrofotometrické
5. Určení limitní rychlosti a Michaelisovy konstanty
6. Zjištění vlivu matrice na reakci enzym + substrát na pH papírcích firmy MACHEREY-NAGEL

4 Experimentální část

Pomůcky

Chemikálie

- 1) Ftalátový pufr pH 4 (firma Penta)
- 2) Fosfátový pufr pH 7 (firma Penta)
- 3) Borátový pufr pH 9 (firma Penta)
- 4) Glycinový pufr pH 3
- 5) Acetátový pufr pH 3,6
- 6) HEPES pH 6,8 (datum výroby: 28.5.2013)
- 7) TRIZMA pH 7,1 (datum výroby: 28.5.2013)
- 8) PBS pH 7,4 (datum výroby: 23.7.2019)
- 9) TRIS-HCl (+ 6 mmol/l guanidin hydrochlorid) pH 7,5
- 10) TRIS-HCl pH 9
- 11) Destilovaná voda
- 12) Acetylthiocholinchlorid (ATChCl, minimum 99 % TLC)
- 13) 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB, ≥ 99 % (w/w))
- 14) Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7) z paúhoře elektrického *Electrophorus electricus* (typ V-S, lyofilizovaný prášek, $\geq 1,000$ U/mg proteinu)
- 15) Fosfátový pufr (PBS, phosphate buffered saline, pH 7,4) 5 tablet na 1000 ml
- 16) Hovězí sérový albumin (BSA, pH 7, ≥ 98 % (w/w), šarže: SLBK9148V)
- 17) NaCl firmy Penta (č. šarže: 1502050210)
- 18) 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin hydrochlorid hydrát 99+% (šarže:07220AV)
- 19) Ethanol 96% p.a. firmy Penta (Product code: 70390-11001)

Všechny chemikálie, u kterých není uvedeno, jsou zakoupené od firmy Sigma-Aldrich.

Přístroje

- 1) UV Visible spectrophotometr evolution 201 (Thermo Scientific)
- 2) Vortex V-1 plus (Biosan)
- 3) Magnetické míchadlo s ohřevem (VELP Scientifica)
- 4) Váhy Sartorius
- 5) pH metr Hach H160
- 6) iPhone 8 s LED True Tone bleskem, 12MPx, šestičlenný objektiv se světelností $f/1.8$, formát ukládání fotek – HEIF a JPEG, rozlišení displeje 1334×750 při 326 pixelech na palec, velikost snímače $1,2 \mu\text{m}$
- 7) Stínítko vytištěné na Prusa i3 pomocí akrylonitril-butadien-styrenu
- 8) Počítač Toshiba 20H2
- 9) Pipety (Brand a Eppendorf)

Spotřební materiál

- 1) pH papírky MACHEREY-NAGEL (REF 92150) pH – Fx: 6,0–7,4
- 2) pH papírky FISHER SCIENTIFIC (univerzální indikátorové papírky pro pH 1–14)
- 3) Centrifugační zkumavky (Eppendorf)
- 4) Jednorázové mikrozukavky (Corning, TPP)
- 5) Plastové špičky (Brand)
- 6) Jednorázové kyvety 1,5 ml (Brand)

4.1 Ověření pH a fotometrické techniky

Před zahájením práce byly zásobní roztoky pufrů vytemperovány na laboratorní teplotu. Následně byl pH metr firmy Hach zkalibrován pomocí pufrů o známém pH, byl použit pufr ftalátový o pH 4, fosfátový o pH 7 a borátový o pH 9. Následně bylo přeměřeno pH pufrů, které byly určeny pro následné měření na pH papírcích. Jednalo se o pufrы – glycinový o pH 3, HEPES o pH 6,8, Trizma o pH 7,1, PBS o pH 7,4, TRIS-HCl o pH 7,5 + 6 mmol/l guanidin hydrochlorid, TRIS-HCl o pH 9, acetátový pufr o pH 3,6 a destilovaná voda. Při tomto měření došlo k ověření hodnot pH roztoků pufrů.

Dále byly tyto zásobní roztoky pipetovány na dva druhy pH papírků od dvou různých výrobců – MACHEREY-NAGEL a FISHER SCIENTIFIC (obr. 6), a to v objemu 10 μ l. Každý papírek byl focen v čase 0 sekund, 10 sekund, 20 sekund, 30 sekund, 40 sekund, 50 sekund, 60 sekund, 90 sekund a 120 sekund. Byly použity pufrы o pH 3; 3,6; 6,8; 7,1; 7,4; 7,5 a 9. Při focení experimentu s pH papírky bylo použité stínítko vytisknuté na 3D tiskárně (obr. 4), aby se eliminovalo jakékoli rušení okolním světlem. Na horní otvor byl přiložen smartphone (iPhone 8.0) a byl focen kolorimetrický produkt za použití automatického LED blesku „True Tone“. Snímky byly přeneseny do počítače a v programu malování byla vyhodnocena data RGB.

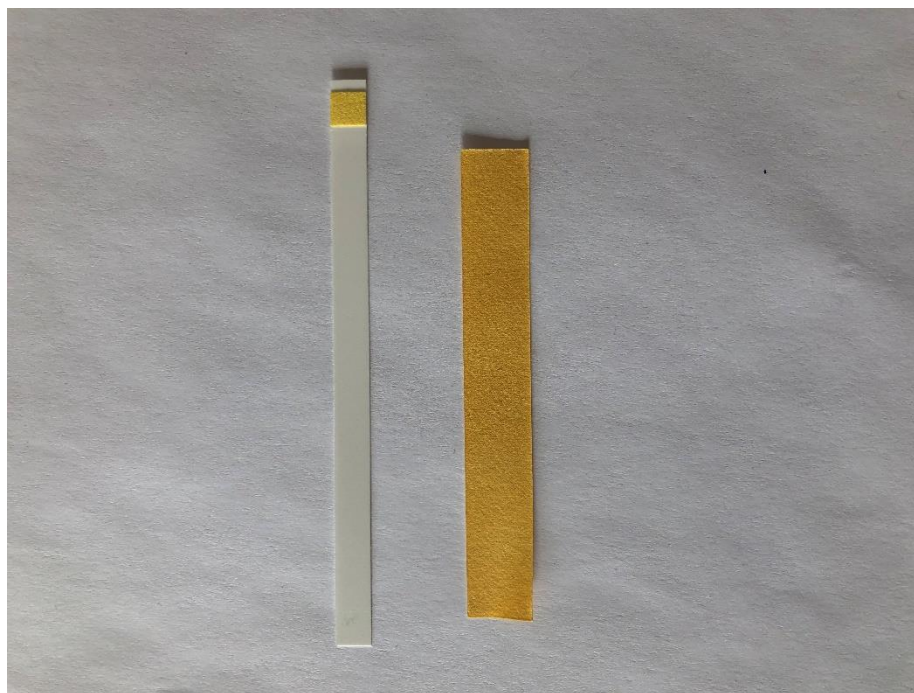


Obrázek č. 4: Stínítko používané proti vlivům okolního světla

Každé měření jednotlivého pufru bylo opakováno 5krát. Bylo vyfoceno také spektrum barev intervalu pH, jak u pH papírku značky MACHEREY-NAGEL, tak u značky FISHER SCIENTIFIC (obr. 5), které následně sloužilo ke kalibraci samotných pH papírků spolu s pufrы, které byly použity pro kalibraci pH metru.



Obrázek č. 5: Barevný interval pH papírků firmy FISHER SCIENTIFIC



Obrázek č. 6: Vlevo pH papírek výrobce MACHEREY-NAGEL, vpravo pH papírek FISHER SCIENTIFIC

Fotografie z telefonu byly uloženy do počítače. Vyhodnocení fotografií se provádělo v programu malování, kdy se ve třech různých bodech vyhodnotily hodnoty barevných kanálů R, G, B a následně v programu excel byla tato data vyhodnocena, z těchto 3 bodů byl vypočítán průměr, který byl zprůměrován s dalšími průměry určitých barevných kanálů dalších měření a tím se získala celková průměrná hodnota všech 5 měření určitého kanálu.

4.2 Optimalizace Ellmanovy metody

Příprava roztoků

Příprava koncentráту AChE (typ V-S)

Lyofilizovaný enzym AChE z *Electrophorus electricus* (navážka 0,16 mg) byl rozpuštěn ve 200 ml PBS. Aktivita roztoku byla upravena tak, aby 50 μ l roztoku AChE v 1 ml reakční směsi, která také obsahovala 400 μ l 1 mmol/l DTNB a 50 μ l 20 mmol/l ATChCl, nepřekročila absorbanci 2 po dobu inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Výsledný roztok enzymu byl stabilizován 175 mg sérového albuminu (0,5 mg/ml roztoku). Následně byl rozdělen do mikrozkušavek po 1 ml a skladován při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Příprava roztoku DTNB

Pro přípravu 1 mmol/l roztoku bylo naváženo 9,42 mg 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoové kyseliny) a rozpuštěno ve 25 ml PBS. Vzhledem k citlivosti DTNB na světlo byl povrch vnější strany zkumavky pokryt hliníkovou fólií.

Příprava roztoku acetylthiocholinu

Pro přípravu 20 mmol/l roztoku bylo naváženo 31,82 mg ATChCl, a toto množství bylo rozpuštěno v 8 ml PBS.

Postup

Do mikrozkušavek bylo napipetováno 400 μ l DTNB + 50 μ l AChE + 500 μ l PBS + 50 μ l ATChCl. Po přidání substrátu byl obsah květy promíchán a proti slepému pokusu byla změřena absorbance vzorku při vlnové délce 412 nm v čase 0 minut, 1 minuta, 2 minuty, 3 minuty, 4 minuty a 5 minut. V každé minutě byla od změřené absorbance odečtena absorbance hodnoty v nulté minutě ($A_n - A_0$). Jako blank byl použit roztok, který obsahuje všechny uvedené látky až na enzym AChE, který byl nahrazen roztokem PBS. Měření byla prováděna v tripletech. Rozdíl absorbance spolu s dalšími veličinami, jako je extinkční koeficient a čas byly doplněny do rovnice, kde $\epsilon = 14150\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$:

$$a = \frac{\Delta A}{\epsilon \times t} \quad (4)$$

Výsledek aktivity enzymu je udán v jednotkách katal.

4.3 Saturační křivka na pH papírcích

Příprava roztoků

Pro přípravu 20 mmol/l roztoku bylo naváženo 3,95 mg ATChCl, a toto množství bylo rozpuštěno v 1 ml 0,9% roztoku NaCl. Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 9 g NaCl v 1 litru destilované vody.

Postup

Roztok ATChCl byl naředěn dvojkovou řadou až po výslednou koncentraci 0,625 mmol/l. Na pH papírek bylo pipetováno 5 μ l enzymu a 5 μ l substrátu. Měření probíhalo v čase 0 sekund, 30 sekund, 60 sekund, 90 sekund, 120 sekund, 5 minut, 10 minut a 30 minut, pH papírky byly po celou dobu inkubace ve vlhké komůrce. Jako kontrola 1 byl použit enzym, bez použití substrátu, spolu s fyziologickým roztokem. Kontrola 2 obsahovala substrát, bez použití enzymu, spolu s fyziologickým roztokem. Finální koncentrace na pH papírcích je o polovinu nižší než je koncentrace dávkovacího roztoku substrátu z důvodu ředění. Po vyhodnocení fotografií a sestrojení grafů bylo z grafu z času 30 minut nejlépe určitelná optimální koncentrace substrátu, která se pohybovala okolo 2,5 mmol/l.



Obrázek č. 7: Barevný vývoj reakce enzym + substrát v závislosti na čase (0 s, 90 s, 10 min a 30 min) na pH papírcích MACHEREY-NAGEL

4.4 Inhibice enzymu inhibitorem takrin na pH papírcích

Příprava roztoku ATChCl a fyziologického roztoku

Pro přípravu 20 mmol/l roztoku bylo naváženo 3,95 mg ATChCl, a to bylo rozpuštěno v 1 ml 0,9% roztoku NaCl. Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 9 g NaCl v 1 litru destilované vody.

Příprava roztoku takrinu

Pro přípravu 1 mmol/l roztoku bylo naváženo 2,35 mg takrinu, a toto množství bylo rozpuštěno v 10 ml destilované vody.

Postup

Ze zásobního roztoku takrinu o koncentraci 1 mmol/l byl připraven roztok o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ a z tohoto roztoku dále bylo ředěním desítkovou řadou vytvořeno 8 roztoků až po koncentraci 2×10^{-6} $\mu\text{mol/l}$. Na papírek bylo pipetováno 5 μl enzymu + 2,5 μl inhibitoru a jako poslední 2,5 μl 10 mmol/l substrátu ATChCl. Jako pozitivní kontrola byla směs složena z 5 μl enzymu AChE + 2,5 μl destilované vody + 2,5 μl 10 mmol/l substrátu ATChCl. Měření probíhalo po 30 minutách inkubace pH papírků ve vlhké komůrce. Finální koncentrace takrinu na pH papírcích je 4krát nižší než je koncentrace dávkovaných roztoků takrinu.

4.5 Saturační křivka na spektrofotometru (měření aktivity AChE)

Příprava roztoku ATChCl

Příprava substrátu byla zahájena navážením 98,86 mg ATChCl, tato navážka byla následně rozpuštěna v 5 ml PBS o pH 7,4. Výsledný roztok měl tedy koncentraci 100 mmol/l.

Příprava DTNB

Pro přípravu 1 mmol/l roztoku DTNB byla použita navážka 3,97 mg DTNB, která byla rozpuštěna v 10 ml PBS o pH 7,4.

Postup

Byl připraven 100 mmol/l zásobní roztok ATChCl, který byl dvojkovou řadou naředěn tak, aby výsledná koncentrace v kyvetě u posledního měření odpovídala koncentraci 0,1625 mmol/l. Do 1 ml kyvety bylo napipetováno 400 μ l DTNB + 50 μ l AChE + 100 μ l substrátu + 450 μ l PBS. Měření bylo zaznamenáváno v čase 0 minut, 1 minuta, 2 minuty a 5 minut při 412 nm. Blank obsahoval vše výše zmíněné kromě enzymu, místo kterého se přidalo doplňující množství PBS (obr. 8).



Obrázek č. 8: Srovnání blanku (vlevo) se směsí enzym + substrát + DTNB + PBS (vpravo)

4.6 Inhibice enzymu na spektrofotometru

Příprava roztoků

Viz příprava roztoků u inhibice enzymu takrinem na pH papírcích.

Postup

Ze zásobního roztoku 50 $\mu\text{mol/l}$ takrinu byla ředěním 10krát připravena řada roztoků až po koncentraci roztoku 5×10^{-6} $\mu\text{mol/l}$ takrinu. Do kyvety bylo pipetováno 400 μl DTNB + 350 μl PBS + 50 μl AChE + 100 μl takrinu + 100 μl 25 mmol/l ATChCl. Jako blank byl použit roztok obsahující vše výše zmíněné kromě AChE, který byl nahrazen roztokem PBS, inhibitor byl použit o koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$. Měření probíhalo při vlnové délce 412 nm v čase 0 minut, 1 minuta a 2 minuty.



Obrázek č. 9: Spektrofotometr Evolution 201 firmy Thermo Scientific

4.7 Vliv vybraných matric na AChE

Příprava roztoku 20 mmol/l ATChCl

Příprava substrátu byla zahájena navážením 3,95 mg ATChCl, tato navážka byla následně rozpuštěna v 1 ml fyziologického roztoku. Výsledný roztok měl tedy koncentraci 20 mmol/l. Dvojkovou řadou byly naředěny roztoky o koncentracích 10 mmol/l a 5 mmol/l.

Příprava matrice

Použité matrice: káva, čaj, mléko, nápoj DrWitt a 96% ethanol. Všechny matrice byly naředěny 10krát fyziologickým roztokem.

DrWitt (nesycený nealkoholický nápoj s příchutí – mango, citron, zelený čaj) s obsahem vitamínu C, niacinu, vitamínu B6, thiaminu, vitamínu B12, kyselinou citronovou, L-karnitinem a stabilizátory (č. šarže: L011083HB 360)

Postup

Na pH papírky jsem nanášela 5 μ l AChE + 2,5 μ l matrice, došlo ke krátké inkubaci (30 s), jelikož některé inhibitory působí na enzym pomaleji a po 30 sekundách bylo přidáno 2,5 μ l 10 mmol/l substrátu. Na pH papírek kontroly bylo nanášeno 5 μ l enzymu a 5 μ l 5 mmol/l substrátu ATChCl. Po dobu inkubace byly pH papírky ve vlhké komůrce a postupně byly foceny v časových intervalech – 0 sekund, 30 sekund, 60 sekund, 90 sekund, 120 sekund, 5 minut, 10 minut a 30 minut. Všechny matrice byly měřeny v tripletech.

5 Výsledky

5.1 Ověření pH

Při měření pH pufrů na pH metru došlo k ověření hodnot pH pro další použití. Hodnoty uvedené na obalu pH roztoků se od skutečné změřené hodnoty lišily v řádech desetin.

5.2 Optimalizace Ellmanovy metody

Při optimalizaci Ellmanovy metody byla změřena absorbance roztoku v časech 0–5 minut, od časů 1–5 minut byla odečtena absorbance v čase 0 z důvodu možné interference volných bílkovinných thiolových skupin. Absorbance od třetí minuty přesahovala hodnoty 1, tudíž je pro další stanovení vhodné měření pouze v první a druhé minutě (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Absorbance změřené při zkoušce enzymu

	1 zkumavka	$A_n - A_0$	2 zkumavka	$A_n - A_0$	3 zkumavka	$A_n - A_0$
0 min	0,09		0,15		0,12	
1 min	0,44	0,35	0,56	0,41	0,53	0,41
2 min	0,73	0,65	1,15	1,01	0,95	0,83
3 min	1,13	1,04	1,46	1,31	1,36	1,24
4 min	1,62	1,53	1,78	1,64	1,73	1,61
5 min	1,83	1,74	2,25	2,10	2,08	1,96

Z rozdílu absorbance byla vypočítána aktivita enzymu podle rovnice 4. Průměr aktivity je vypočítán z 3 měření v tabulce č. 2.

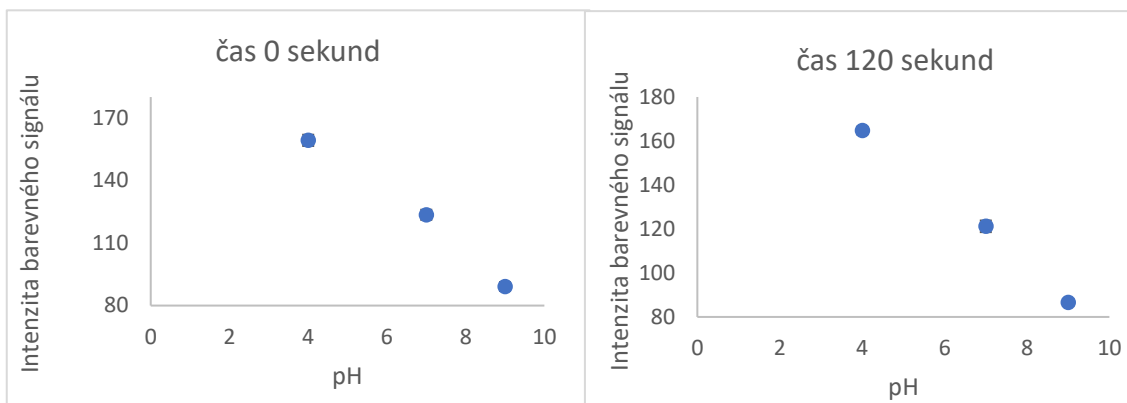
Tabulka č. 2: Průměry aktivity enzymu v jednotkách katal v intervalu 1–5 minut

1 min průměr	$4,59 \times 10^{-7}$
2 min průměr	$4,86 \times 10^{-7}$
3 min průměr	$4,70 \times 10^{-7}$
4 min průměr	$4,69 \times 10^{-7}$
5 min průměr	$4,56 \times 10^{-7}$

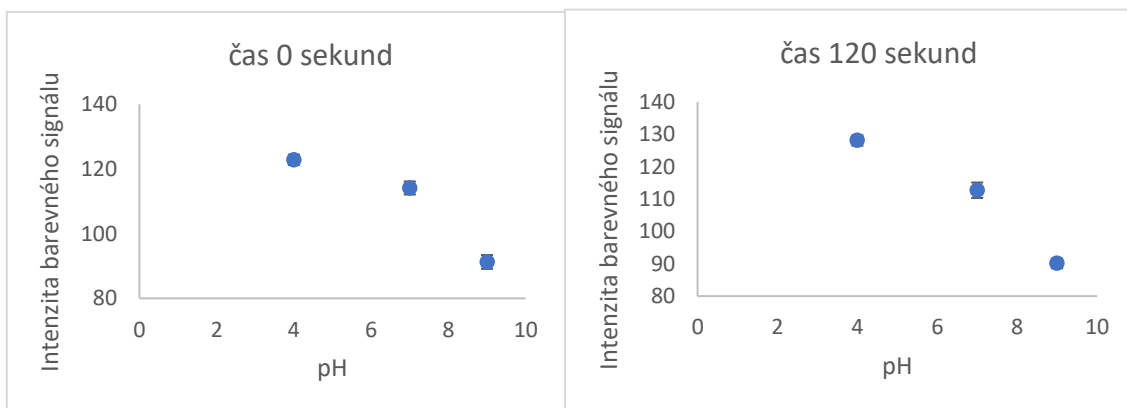
5.3 Optimalizace fotometrické techniky

Z grafů č. 1 a 2 je patrné, že hladiny signálu kanálů R a G, u pH papírků FISHER SCIENTIFIC, při zvyšujícím se pH klesaly, zatímco u kanálu B, vycházející z grafu č. 3, se při zvyšujícím se pH, hladiny intenzity zvyšují. U papírků výrobce MACHEREY-NAGEL, které odpovídají grafu č. 4, u grafu č. 5 hodnoty vychází obdobně, avšak u barevného kanálu B (graf č. 6) je pozorován pokles hladiny intenzity barevného signálu a následný nárůst. Graf č. 7, kde je závislost intenzity barevného signálu kalibračních papírků firmy MACHEREY-NAGEL na pH (6–7,7), vykazuje lineárně klesající závislost na rostoucím pH. U grafu č. 8, kde byly použity pH papírky firmy FISHER SCIENTIFIC, je závislost spíše polynomická a hodnoty intenzity signálu nekorelují s hodnotami pH. Z těchto závislostí lze konstatovat, že papírky MACHEREY-NAGEL vykazují vyšší citlivost a byly také použity k dalšímu měření.

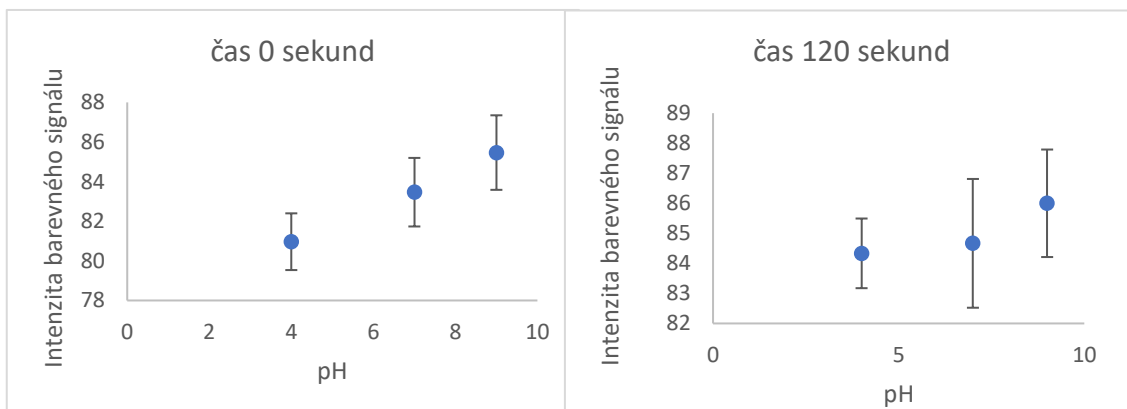
U grafu č. 9 v časovém intervalu, kdy byly vybrány grafy v čase 0 sekund a 120 sekund, není vykazován výraznější rozdíl v těchto časech. U kanálů R a G je závislost intenzity barevného signálu klesající a hladiny intenzity signálu u kanálu B jsou relativně neměnné. U grafu č. 10 při stoupajícím pH hodnoty intenzity barevných kanálů R a G klesají, hodnoty kanálu R se přibližují k hodnotám hladiny G. Hladina B je v závislosti na vzrůstajícím pH relativně neměnná. Chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování.



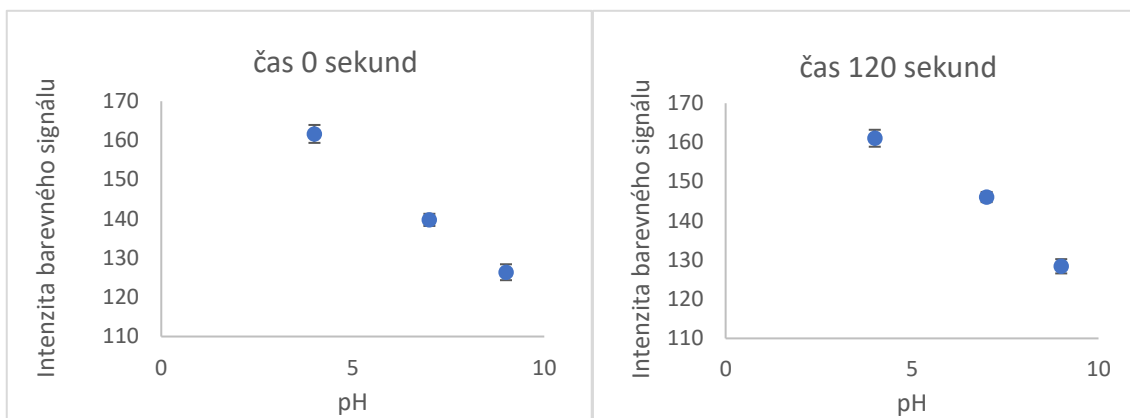
Graf č. 1: Závislost intenzity barevného kanálu R na hodnotě pH standardu u pH papírků FISHER SCIENTIFIC v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



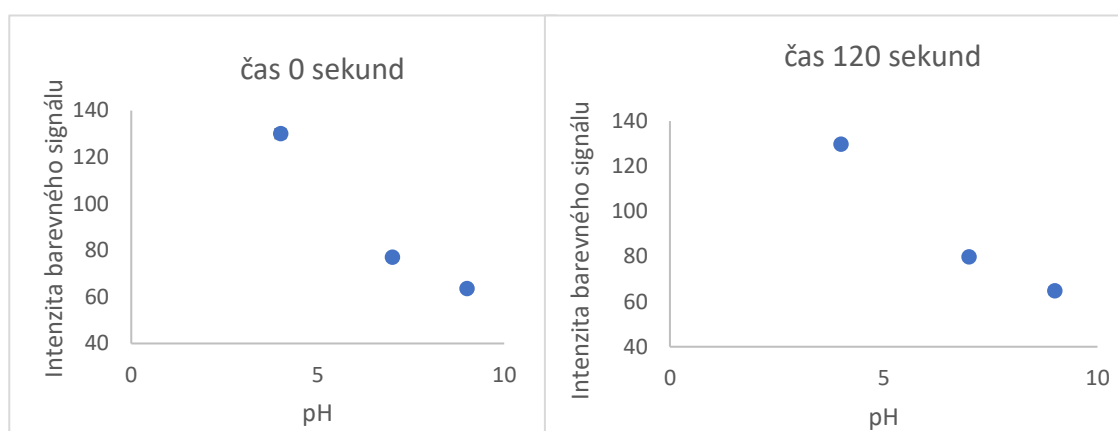
Graf č. 2: Závislost intenzity barevného kanálu G na pH standardu u pH papírků FISHER SCIENTIFIC v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



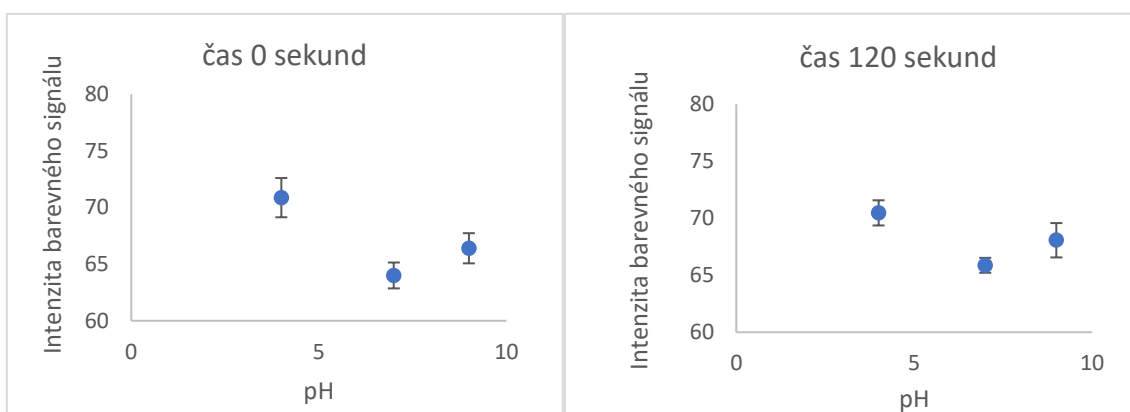
Graf č. 3: Závislost intenzity barevného kanálu B na pH standardu u pH papírků FISHER SCIENTIFIC v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



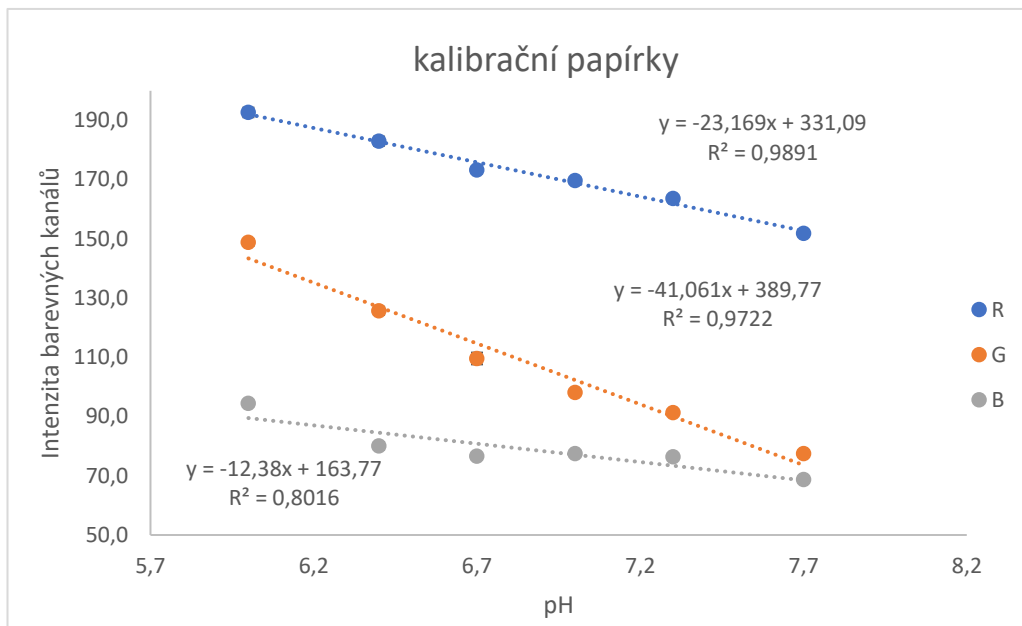
Graf č. 4: Závislost intenzity barevného kanálu R na pH standardu u pH papírků MACHEREY-NAGEL v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



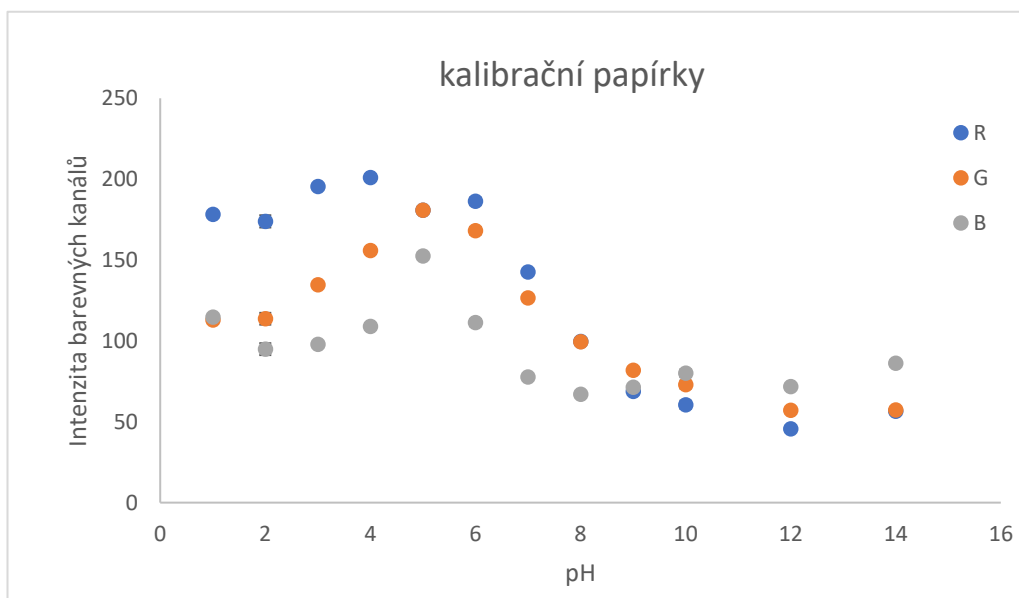
Graf č. 5: Závislost intenzity barevného kanálu G na pH standardu u pH papírků MACHEREY-NAGEL v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



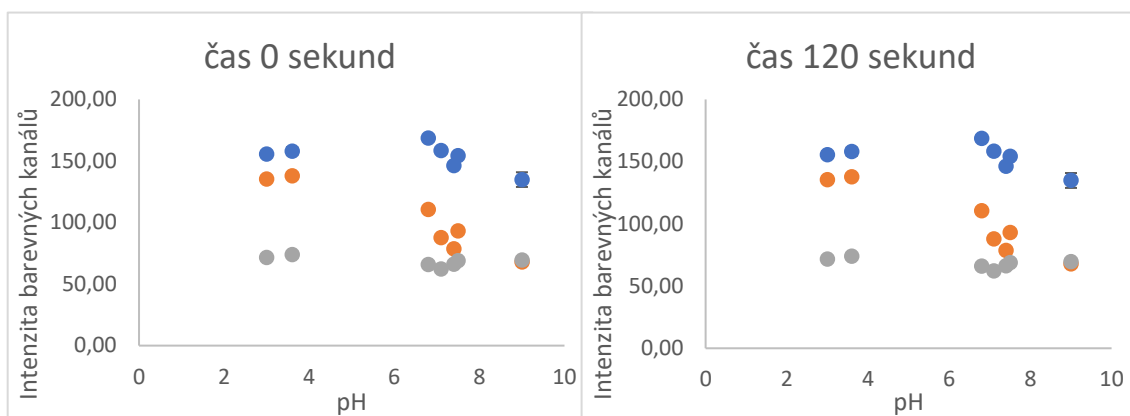
Graf č. 6: Závislost intenzity barevného kanálu B na pH standardu u pH papírků MACHEREY-NAGEL v čase 0 sekund a 120 sekund, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



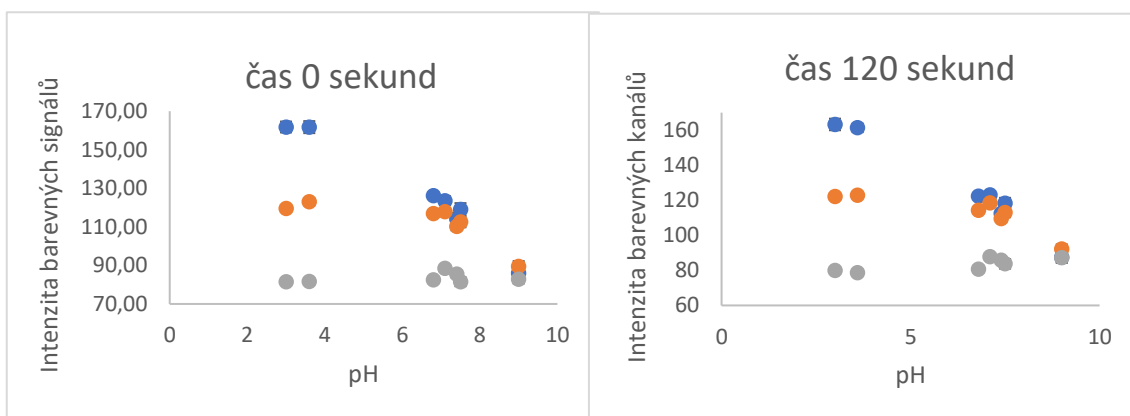
Graf č. 7: Závislost intenzity barevných kanálů R, G, B na pH u pH papírků MACHEREY-NAGEL z fotografií barevného spektra ze přední strany krabičky, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



Graf č. 8: Závislost intenzity barevných kanálů R, G, B na pH u pH papírků FISHER SCIENTIFIC z fotografií barevného spektra ze přední strany krabičky, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování



Graf č. 9: Závislost intenzity barevných kanálů R, G, B na pH u pH papírků MACHEREY-NAGEL z měření rozdílných pH pufrů, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování

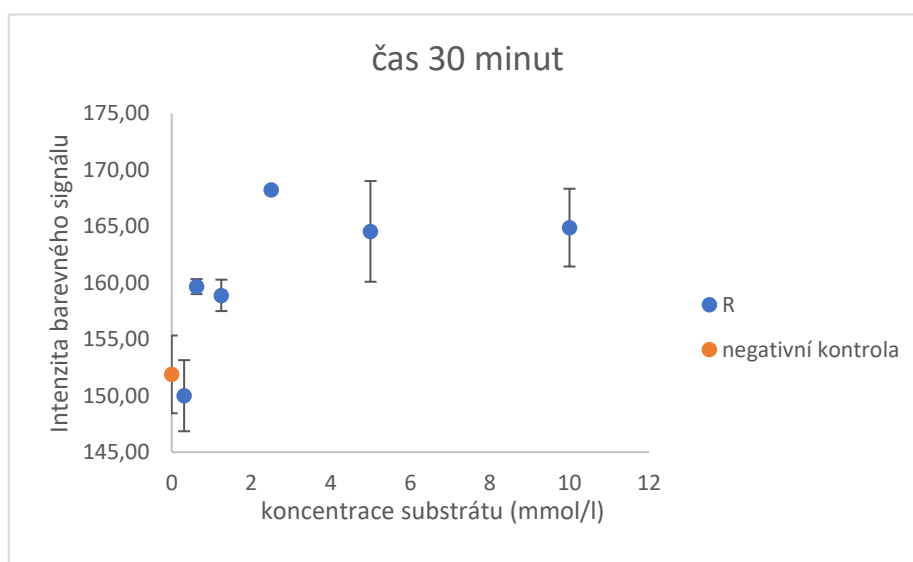


Graf č. 10: Závislost intenzity barevných kanálů R, G, B na pH u pH papírků FISHER SCIENTIFIC z měření rozdílných pH pufrů, chybové úsečky při optimalizaci fotometrické techniky vyjadřují střední chybu průměru pro pět opakování

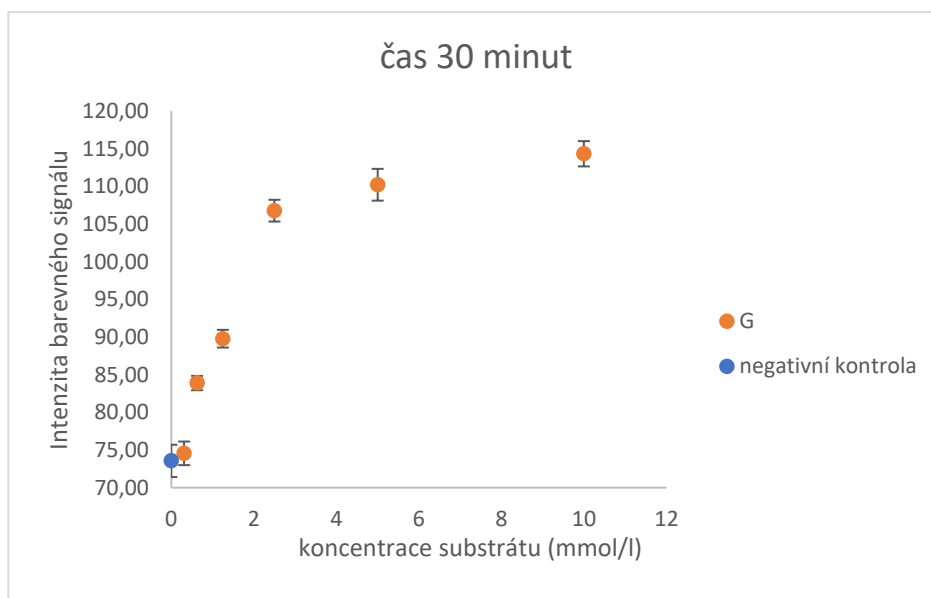
5.4 Reakce enzym + substrát na pH papírcích, zjištění afinity enzymu k substrátu a určení kinetických parametrů

Při použití pH papírků MACHEREY-NAGEL se při reakci enzymu se substrátem projevovala výrazná barevná změna až po čase 30 minut. Graf č. 11 odpovídá kanálu R v čase 30 minut, kdy je možno tento graf použít pro určení kinetických parametrů, avšak při 30 minutách vykazoval nejlepší analytické vlastnosti kanál G, vyneseny v grafu č. 12, při kterém se křivka dala nejlépe vyhodnotit. Z programu Origin byly zjištěny hodnoty $V_m = 172,2$ a $K_M = 0,748$ mmol/l. Z této saturační křivky bylo nutné zjistit optimální koncentraci substrátu, při které bude reakce katalyzovaná AChE probíhat nejrychleji. Za optimální koncentraci byla zvolena hodnota 2,5 mmol/l substrátu. Graf č. 13, který odpovídá kanálu B, nebylo možno využít pro určení kinetických parametrů, jelikož hodnoty jsou zatíženy větší chybou.

Z grafů č. 14, 15 a 16 lze pozorovat, že barevný signál všech třech kanálů roste se vzrůstajícím časem. Tento jev však mohl být způsoben postupným vysycháním pH papírku, i přesto, že během měření byla použita vlhká komůrka. Chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování.



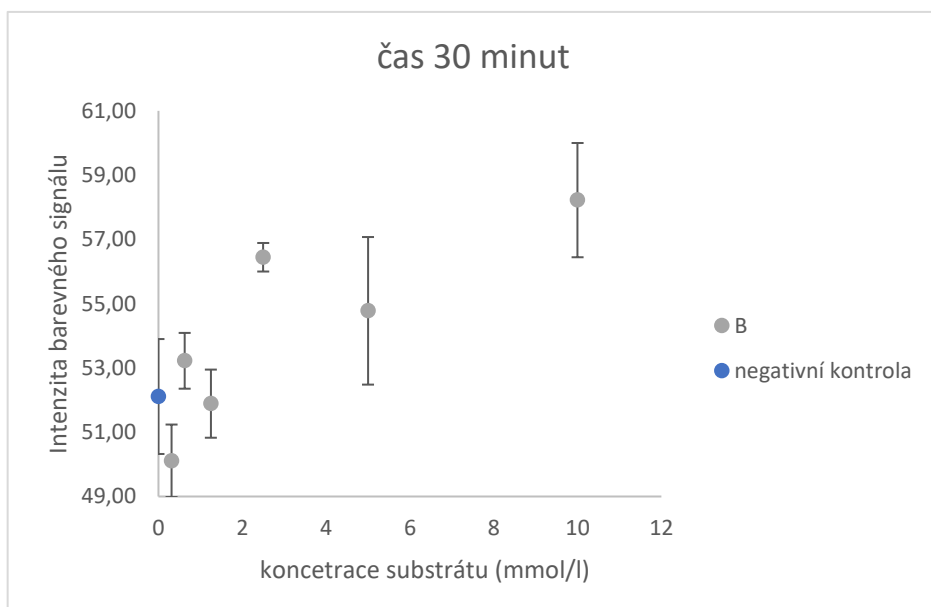
Graf č. 11: Závislost intenzity barevného kanálu R na koncentraci substrátu ATChCl (foceno po 30 minutách proběhlé reakce), chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování



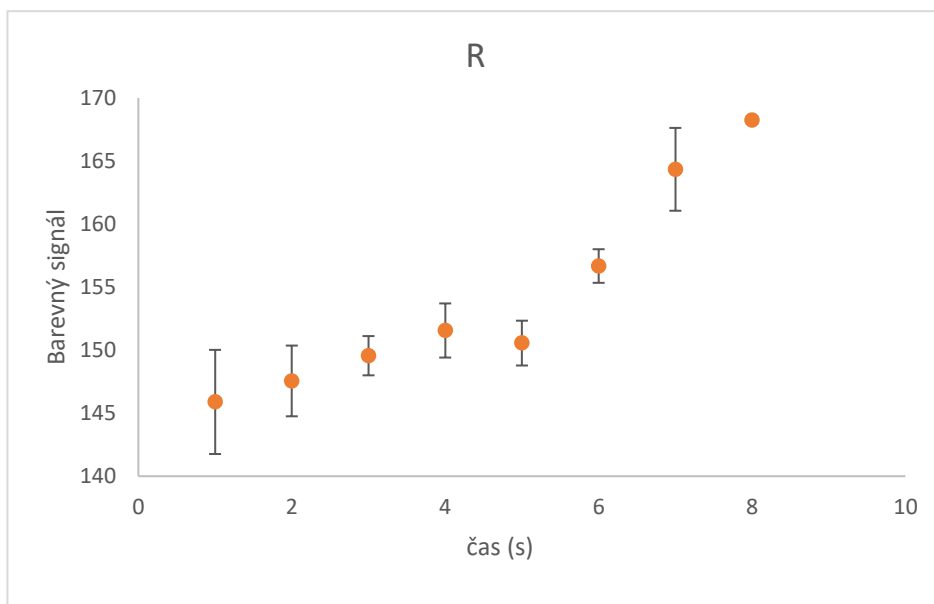
Graf č. 12: Závislost intenzity barevného kanálu G na koncentraci substrátu ATChCl (foceno po 30 minutách proběhlé reakce), chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování

$$V_m = 172,2$$

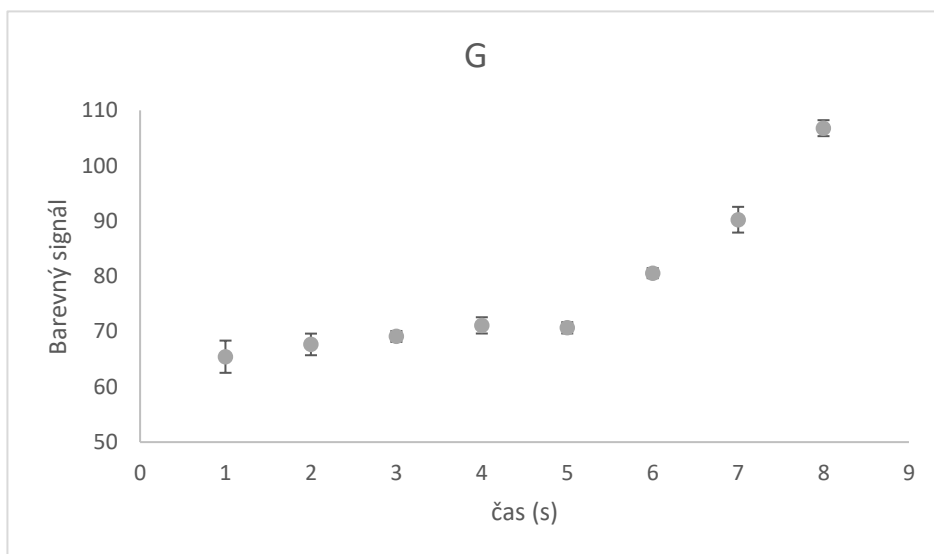
$$K_M = 0,748 \text{ mmol/l}$$



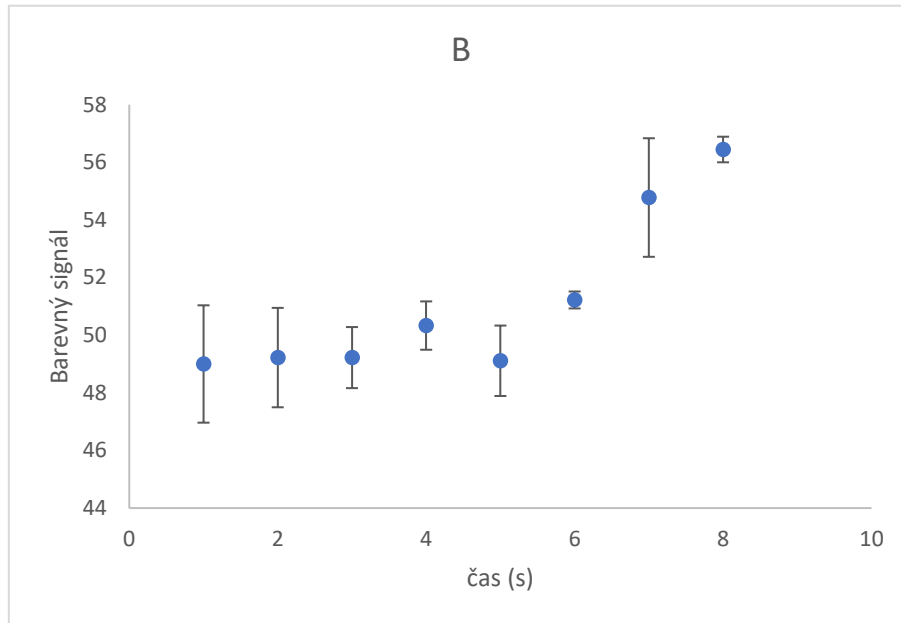
Graf č. 13: Závislost intenzity barevného kanálu B na koncentraci substrátu ATChCl (foceno po 30 minutách proběhlé reakce), chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování



Graf č. 14: Závislost intenzity barevného kanálu R na čase v sekundách, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování



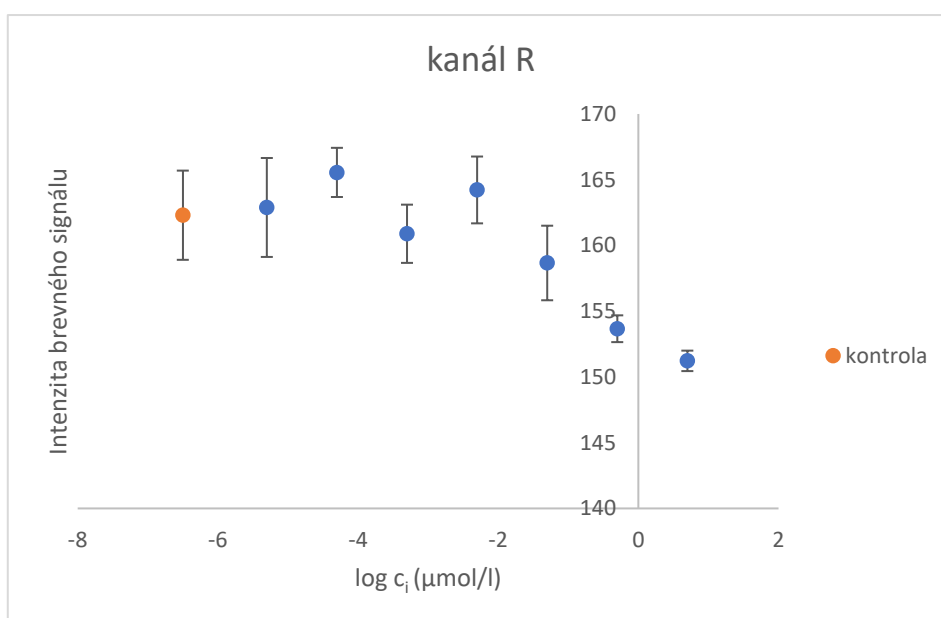
Graf č. 15: Závislost intenzity barevného kanálu G na čase v sekundách, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování



Graf č. 16: Závislost intenzity barevného kanálu B na čase v sekundách, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro 3 opakování

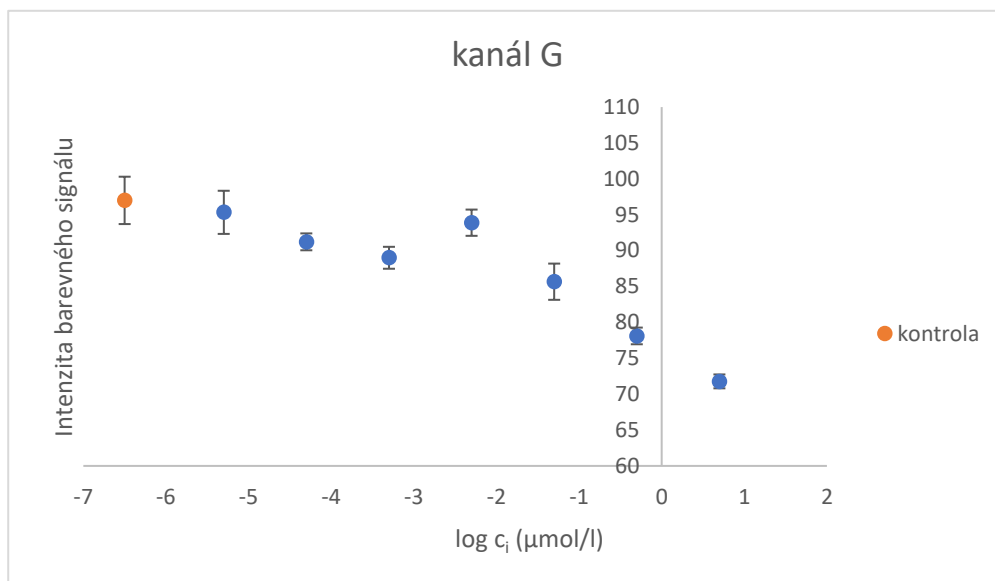
5.5 Inhibice enzymu takrinem na pH papírcích a určení IC_{50} inhibitoru

Při měření inhibice reakce takrinem byla pro stanovení hodnot IC_{50} a LOD vybrána závislost kanálů R a G, které odpovídají grafům č. 17 a 18, graf č. 19, který popisuje intenzitu kanálu B vykazoval špatné analytické vlastnosti, jelikož kontrola hladiny B měla nízkou hodnotu. Tato odchylka mohla být způsobena chybou měření. Chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro tři opakování, u kontroly jsou chybové úsečky vyjádřeny střední chybou průměru pro deset opakování. U kanálu R byla vypočítána hodnota $IC_{50} = 0,0712 \mu\text{mol/l}$ a hodnota $LOD = 0,06 \mu\text{mol/l}$. U kanálu B hodnota $IC_{50} = 0,157 \mu\text{mol/l}$ a hodnota $LOD = 2,24 \mu\text{mol/l}$.



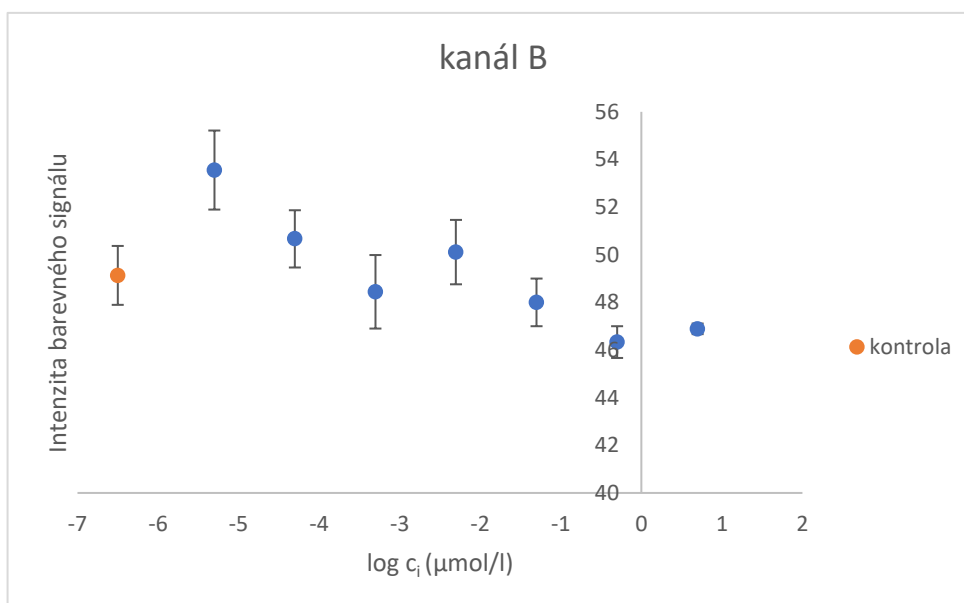
Graf č. 17: Závislost intenzity barevného signálu u kanálu R na logaritmu koncentrace inhibitoru, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro tři opakování, u kontroly jsou chybové úsečky vyjádřeny střední chybou průměru pro deset opakování

Hodnota $IC_{50} = 0,0712 \mu\text{mol/l}$ takrinu. Hodnota LOD je $0,06 \mu\text{mol/l}$.



Graf č. 18: Závislost intenzity barevného signálu u kanálu G na logaritmu koncentrace inhibitoru, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro tři opakování, u kontroly jsou chybové úsečky vyjádřeny střední chybou průměru pro deset opakování

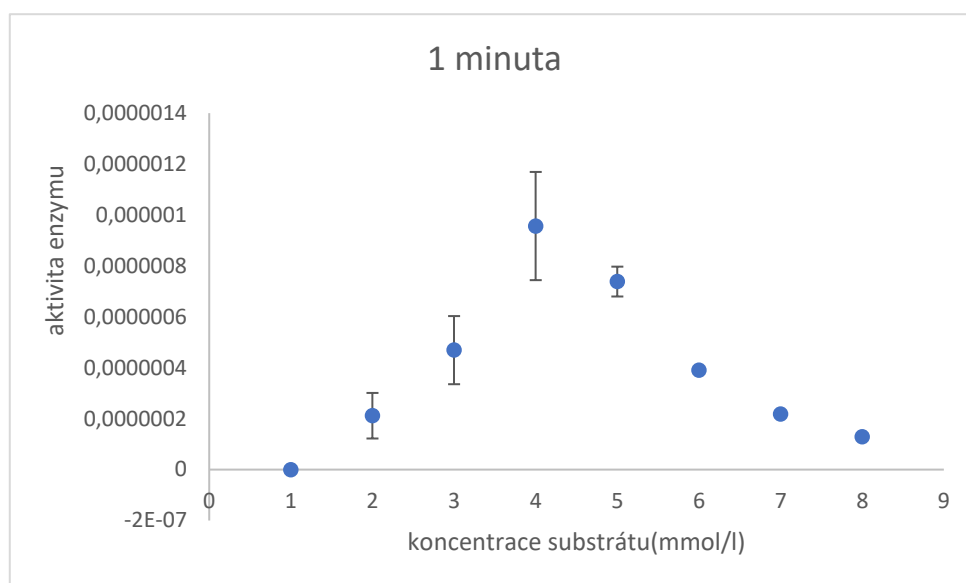
Hodnota $IC_{50} = 0,157 \mu\text{mol/l}$ inhibitoru takrin. Hodnota LOD je $2,24 \mu\text{mol/l}$.



Graf č. 19: Závislost intenzity barevného signálu u kanálu B na logaritmu koncentrace inhibitoru, chybové úsečky vyjadřují střední chybu průměru pro tři opakování, u kontroly jsou chybové úsečky vyjádřeny střední chybou průměru pro deset opakování

5.6 Saturační křivka na spektrofotometru

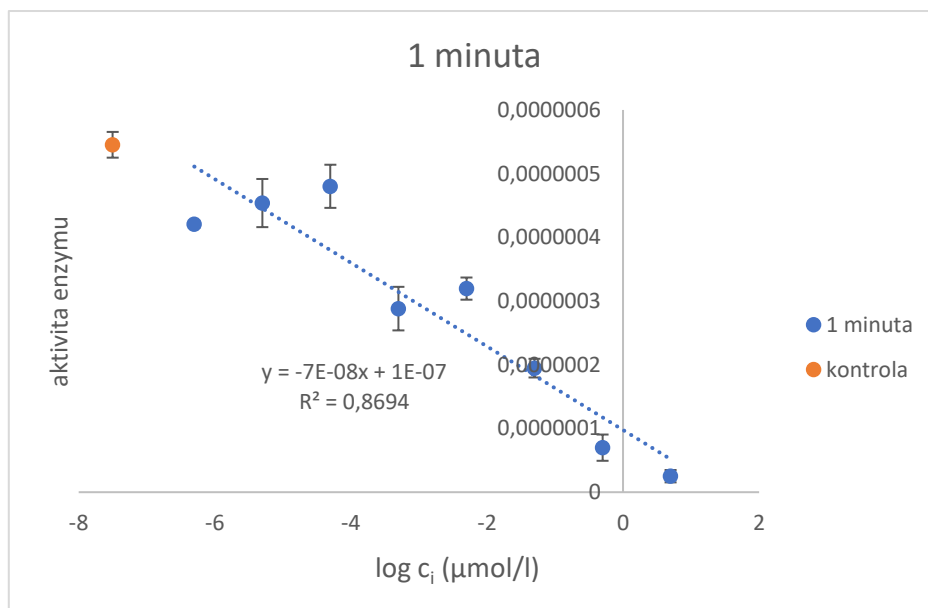
Jak je možno vyčíst z grafu č. 20 saturační křivka roste do 4 mmol/l ATChCl. Poté aktivita enzymu s rostoucí koncentrací substrátu klesá. Tento jev je nejspíše způsobený tím, že AChE je inhibován při vysokých koncentracích substrátu. Na rozdíl u saturační křivky kanálu G na pH papíreích tato inhibice pozorována nebyla. Chybové úsečky jsou vyjádřeny střední chybou průměru pro tři opakování. Hodnota $V_m = 1,28 \times 10^{-6}$ katal a hodnota $K_M = 1,062$ mmol/l.



Graf č. 20: Závislost aktivity enzymu na koncentraci substrátu na spektrofotometru, chybové úsečky jsou vyjádřeny střední chybou průměru pro tři opakování

5.7 Inhibice enzymu takrinem měřeno na spektrofotometru

Graf č. 21 popisuje inhibiční závislost inhibitoru na aktivitě enzymu. Jako inhibitor byl zvolen takrin. Z grafu je patrné, že takrin při vzrůstající koncentraci snižuje aktivitu AChE lineárně. Hodnota LOD = $1,94 \times 10^{-5}$ $\mu\text{mol/l}$ takrinu a hodnota IC₅₀ je 0,0175 $\mu\text{mol/l}$. Chybové úsečky jsou vyjádřeny střední chybou průměru pro tři opakování.



Graf č. 21: Závislost aktivity enzymu na logaritmu koncentrace takrinu měřeno na spektrofotometru, chybové úsečky jsou vyjádřeny střední chybou průměru pro tři opakování

5.8 Vliv vybraných matric na reakci enzym + substrát

Všechny pH papírky byly měřeny v čase 30 minut. Výsledné hodnoty barevných kanálů byly porovnány s hodnotami kontroly. Jako kontrola byl použit pouze enzym AChE a substrát ATChCl.

Z tabulky č. 3 je patrné, že barevný kanál R v malé míře ovlivňuje ethanol a čaj, ethanol kanál R zvyšuje o 5,39 % a čaj snižuje o 3,69 %. U čaje je možné, že došlo ke zbarvení pH papírku vlivem barvy čaje. U kanálu G došlo ke zvýšení po přidání ethanolu o 8,77 %, v ostatních případech se hodnota kanálu G snížila o cca 4–8 %. Kanál B zůstal bez větší změny po přidání většiny z matric. Ethanol kanál B zvýšil o 5,26 %.

Tabulka č. 3: Vliv matrice na AChE v barevných kanálech RGB

R	kontrola R	ethanol	čaj	káva	DrWitt	mléko
30 minut	156	165	150,7	153	151	153
G	kontrola G	ethanol	čaj	káva	DrWitt	mléko
30 minut	84,9	92,3	78,9	81	78	81
B	kontrola B	ethanol	čaj	káva	DrWitt	mléko
30 minut	50,67	53,3	49,8	51	48,8	51

6 Diskuze

Při optimalizaci fotometrické techniky bylo zjištěno, že hladiny kanálů R a G při zvyšujícím se pH klesají, zatímco kanál B roste v rozmezí hladin pH od 6 do 8 (Inagawa A., Sasaki A., Uehara N., 2020). Tento fakt byl v naší práci zjištěn na pH papírcích od dvou různých výrobců. V rozmezí hodnot pH 1–3 jsou hodnoty RGB relativně neměnné (Inagawa A., Saito K., Sasaki A., Uehara N., 2020). Kolorimetrická metoda s využitím fotoaparátu je reprodukovatelná a vhodná jako detekční nástroj ke studiu chemických jevů (Inagawa A., Sasaki A., Uehara N., 2020). Velkou výhodou této metodě oproti metody spektrofotometrické je nízká spotřeba reagensů, malé objemy vzorků potřebných pro stanovení a jednoduchost. Použití mobilního telefonu nepotřebuje vyškolený personál a použité mobilní telefony jsou cenově dostupné. Výsledky však mohou být ovlivněny použitým zařízením, jelikož každé digitální zařízení obsahuje jiné specifikace. Například komprese dat předurčuje kvalitu celého testu, dále pak optické aberace, mezi které patří vinětace nebo zkreslení, a ty negativně ovlivňují analytické měření. Menší význam má pak obrazový snímač, který je zodpovědný za zachycení světla a přenos signálu na digitální data, a to díky stabilnímu zdroji osvětlení, který se během analýzy nemění (Pohanka M., 2017). 3D tištěný kryt tím, že omezuje veškeré okolní světlo, dopadající na fotoaparát, zlepšuje poměr optického signálu k šumu (Rani S. et al., 2021). Závislost intenzity barevných kanálů na hodnotě pH v rozmezí 1–14 popisují polynomičnou závislost a žádná z intenzit jednotlivých kanálů nekoreluje s hodnotami pH (Shen L., Hagen J.A., Papautsky I., 2012).

Při určení reakčních parametrů u saturační křivky je dobré si zvolit takový kanál, který vykazuje nejvhodnější analytické vlastnosti pro určení reakčních parametrů. V našem měření byl zvolen graf č. 12 s kanálem G, z tohoto kanálu byla vyhodnocena hodnota V_m , která odpovídala barevné intenzitě 172,2 a hodnota K_M , která byla rovna 0,748 mmol/l. Podle (Kostelnik A., Cegan A., Pohanka M., 2016), kdy byla testována aktivita AChE zachycená v želatinové matrici, kdy na základě změny pH média dojde ke změně pH indikátoru. Byl vybrán kanál B, kde vypočítaná hodnota K_M se rovnala $2,9 \times 10^{-4}$ mmol/l substrátu AChCl. Rozdílná hodnota K_M je dána jinou použitou koncentrací substrátu. Časový interval reakce byl vybrán 30 minut, při použití delšího intervalu by mohlo dojít k vysychání vzorku (Pohanka M., 2015). Určení reakčních parametrů na spektrofotometru bylo provedeno dle Ellmana. Tato metoda je nejpoužívanější fotometrickou metodou. DTNB však reaguje se sulfhydrylovými

skupinami v roztoku, a to poté může ovlivnit výsledek měření (Holas O. et al., 2012). Tato reakce je však rychlá a pro vyloučení interference je vhodné použít rozdíl absorbancí. Ellmanova metoda je levná, rychlá a jednoduchá, ale nevýhodou v klinickém použití je, že neumožňuje přesné stanovení aktivity AChE v plné krvi nebo erythrocytech kvůli interferenci hemoglobinu (Worek F. et al., 1999). Z grafu č. 20 u saturační křivky je patrné, že AChE je inhibována při vysokých koncentracích substrátu (Colletier J. – P., 2006). Kolorimetrické stanovení, spolu s metodami elektrometrickými či radiometrickými, jsou citlivé pro stanovení aktivity AChE v experimentální a klinické toxikologii, rutinní použití je však pracné, kvůli přípravě vzorků a dlouhé době měření. Mezi spolehlivé metody patří také voltametrická analýza, kdy byla touto metodou měřena aktivita BChE v biologických vzorcích. Toto stanovení vykazovalo velmi spolehlivé výsledky (Pohanka M., 2014). Na voltametrickém principu jsou založeny také detekční proužky DETEHIT, vyrobené firmou Oritest Praha, které detekují organofosfáty a aktivitu AChE v krvi. Tyto papírky se také osvědčily pro nízkonákladovou polní analýzu (Pohanka M. et al., 2010). Nevýhodou však je, že dochází k méně výraznému zbarvení žluté barvy, zejména za obtížných světelných podmínek (Matějovský L., Pitschmann V., 2018). Testovací proužky vyrobené společností E. Merck byly použity pro stanovení chromanů a dusičnanů v odpadní vodě. Vyhodnocení probíhalo vizuálně, kdy je možno proužky využít pro kvalitativní analýzu, anebo reflektometricky, kdy byly výsledky přesnější a více reprodukovatelné a zároveň srovnatelné se standardními laboratorními metodami (Waters L. C. et al., 1995). Další možností je fluorimetrické stanovení, kdy lze AChE imobilizovat na tzv. kvantových tečkách (Zheng Z. et al., 2011). Nebo lze použít modifikovanou Ellmanovu metodu, kdy se thiocholin váže na fluorescenční sondu a vykazuje citlivější stanovení aktivity AChE, kdy je možné měřit velmi nízké aktivity ChE (až 10^{-12} mmol/l), oproti standardnímu spektrofotometrickému stanovení, kdy není možno určit kinetické parametry $<10^{-9}$ mmol/l. Další výhodou této metody je možná miniaturizace a použití v polních podmínkách (Mukhametgalieva A. R. et al., 2020).

Při analýze s inhibitorem byl vyhodnocen limit detekce, který se u kanálu R (graf č. 17) rovnal 0,06 $\mu\text{mol/l}$ a u kanálu G (graf č. 18) 2,24 $\mu\text{mol/l}$. Podle (Kostelník A., Cegan A., Pohanka M., 2016) limit detekce takrinu u kanálu B při nižším koncentračním rozsahu byl 1,1 nmol/l, zatímco například u galantaminu 1,28 $\mu\text{mol/l}$. Nevýhodou však mohou být změny zbarvení během analýzy a mohou vést ke zhoršení

detekčního limitu (Pohanka M., 2017). Limit detekce z grafu č. 21, kdy měření probíhalo na spektrofotometru, odpovídal hodnotě $1,94 \times 10^{-5}$ $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC_{50} změřená na spektrofotometru byla $0,0175$ $\mu\text{mol/l}$. Hodnota IC_{50} kanálu R z grafu č. 17 odpovídala hodnotě $0,0712$ $\mu\text{mol/l}$ a u kanálu G (graf č. 18) byla hodnota IC_{50} $0,157$ $\mu\text{mol/l}$. Metoda s použitím spektrofotometru je citlivější, ale je špatně přenosná pro použití v terénu a spotřeba reagensů je větší než u metody fotometrické. Na druhou stranu výsledky měření nejsou ovlivněny okolním světlem a nedochází k optickým aberacím.

Aktivitu AChE lze snížit za použití organických rozpouštědel, jako je methanol, ethanol nebo izopropylalkohol, a proto jsou považovány za látky ovlivňující testy založené na AChE. Konkrétně alkoholy inhibují AChE v poměrně vysokých koncentracích. V testu interference 5% ethanolu na AChE nedošlo k žádné změně aktivity enzymu (Kostelnik A., Cegan A., Pohanka M., 2016). Při naší studii byl použit 9,6% ethanol, což odpovídá slabšímu alkoholickému nápoji či vínu, a ovlivnil kanál R o 5,39 % a kanál G o 8,77 %, což jsou hodnoty, které jsou téměř zanedbatelné a tato malá odchylka mohla být způsobena chybou při měření nebo vlivem okolního světla. Účinky ethanolu na aktivitu AChE vlivem polymorfismu enzymu mohou být různé (Shin S., Roth L.G., Chang – Hwei Ch., 1991). Při studii, kdy byla AChE imobilizována na celulóзовou matici a jako chromogenní substrát byl použit indoxylacetát, došlo k inhibici 20% ethanolem, a také dimethylsulfoxidem. Nižší koncentrace pak také neměla žádný vliv na stanovení (Pohanka M., Vlcek V., 2014). Žádné další námi použité matrice, vyplývající z tabulky č. 3, neměly významný vliv na stanovení.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat fotometrickou techniku při stanovení AChE z paúhoře elektrického a následně byla reakce inhibována takrinem. Dále pak byl sledován účinek vybraných matric na reakci AChE s ATChCl při měření fotometrickou technikou. Měření probíhalo na papírcích MACHEREY-NAGEL.

Inhibice AChE je důležitá především ve výzkumu pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je například Alzheimerova choroba. U takrinu jsme určili IC_{50} a LOD.

Vliv málo koncentrovaných matric neměl na výsledek stanovení žádnou vykazující hodnotu. Je třeba brát v potaz zbarvení matric, aby neovlivňovaly výslednou barvu stanovení a nezkreslovaly výsledky.

Metody využívající mobilní telefon jako detektor stanovení jsou reprodukovatelné a vhodné pro kolorimetrická stanovení. V současnosti jsou metody, kde je jako detektor použit mobilní telefon, dostupné ve vědecké sféře. Použití v komerčních podmínkách není ještě zcela dostupné. V budoucnu však lze očekávat rychlý vývoj v zavedení této technologie pro praktické použití.

8 Seznam použité literatury

BAJGAR J. *Organophosphates/Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment*. Elsevier, 2004, 2004, s. 151-216. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780120103386. doi:10.1016/S0065-2423(04)38006-6.

BEVERIDGE T., TOMA S. J., NAKAI S. Determination of SH- and SS- groups in some food proteins using Ellman's reagent. *Journal of Food Science*. 1974, 39(1), 49-51. doi: 10.1111/j.1365-2621.1974.tb00984.x. ISSN 0022-1147.

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2001, 69(3), 89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989. ISSN 00099236.

BYRNE L., BARKER J., PENNARUN-THOMAS G., DIAMOND D., EDWARDS S. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2000, 19(8), 517-522. doi: 10.1016/S0165-9936(00)00019-4. ISSN 01659936.

CAMPS P., MUNOZ-TORRERO D. Cholinergic Drugs in Pharmacotherapy of Alzheimers Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2002, 2(1), 11-25. doi: 10.2174/1389557023406638. ISSN 13895575.

COLEMAN B., COARSEY Ch., KABIR M. A., ASGHAR W. Point-of-care colorimetric analysis through smartphone video. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 282, 225-231. doi: 10.1016/j.snb.2018.11.036. ISSN 09254005.

COLLETIER J.-P., FOURNIER D, GREENBLATT H. M., STOJAN J., SUSSMAN J. L., ZACCAI G., SILMAN I., WEIK M. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal*. 2006, 25(12), 2746-2756. doi: 10.1038/sj.emboj.7601175. ISSN 0261-4189.

DAVIS K.L., POWCHICK P. Tacrine. *The Lancet*. 1995, 345(8950), 625-630. ISSN 01406736. doi:10.1016/S0140-6736(95)90526-X.

EL GAMAL A., ELTOUKHY H. CMOS image sensors. *IEEE. Circuits and Devices Magazine*. 2005, 21(3), 6-20. doi: 10.1109/MCD.2005.1438751. ISSN 8755-3996.

EYER P., WOREK F., KIDERLEN D., SINKO G., STUGLIN A., SIMEON-RUDOLF V., REINER E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent:

reassessment. *Analytical Biochemistry*. 2003, 312(2), 224-227. doi: 10.1016/S0003-2697(02)00506-7. ISSN 00032697.

ELLMAN G. L. A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1958, 74(2), 443-450. doi: 10.1016/0003-9861(58)90014-6. ISSN 00039861.

ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961, 7(2), 88-95. doi: 10.1016/0006-2952(61)90145-9. ISSN 00062952.

FRANCIS P. T, PALMER A. M, SNAPE M., WILCOCK G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999, 66(2), 137-147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.137. ISSN 0022-3050.

FUJII T., MORI Y., TOMINAGA T., HAYASAKA I., KAWASHIMA K. Maintenance of constant blood acetylcholine content before and after feeding in young chimpanzees. *Neuroscience Letters*. 1997, 227, 21-24.

FUKUTO T. R. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 1990, 87, 245-254. doi: 10.1289/ehp.9087245. ISSN 0091-6765.

GNIAZDOWSKA E., KOŹMIŃSKI P., HALIK P., et al. Synthesis, physicochemical and biological evaluation of tacrine derivative labeled with technetium-99m and gallium-68 as a prospective diagnostic tool for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry*. 2019, 91. ISSN 00452068. 10.1016/j.bioorg.2019.103136.

GOLIÁŠ J. Metody analýzy potravin – Podpořeno projektem OPVK CZ.1.07/2.2.00/28.0220. 2013. Dostupné z: <<https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?opora=5352>>.

GONÇALVES K. G., DA SILVA L. L., SOARES A. R., ROMEIRO N. C. Acetylcholinesterase as a target of halogenated marine natural products from Laurencia dendroidea. *Algal Research*. 2020, 52. doi: 10.1016/j.algal.2020.10213. ISSN 22119264.

GRANICA M., TYMECKI Ł. Analytical aspects of smart (phone) fluorometric measurements. *Talanta*. 2019, 197, 319-325. doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.032. ISSN 00399140.

HAN S-H., PARK J-Ch., BYUN M.S., YI D., LEE J.H., LEE D.Y. MOOK-JUNG I. Blood acetylcholinesterase level is a potential biomarker for the early detection of cerebral amyloid deposition in cognitively normal individuals. *Neurobiology of Aging*. 2019, 73, 21-29. ISSN 01974580. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.09.001.

HOFER P., FRINGELI U. P. Acetylcholinesterase kinetics. *Biophysics of Structure and Mechanism*. 1981, 8(1-2), 45-59. ISSN 0340-1057. doi:10.1007/BF01047105.

HOLAS O., MUSILEK K., POHANKA M., KUCA K. The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012, 7(12), 1207-1223. ISSN 1746-0441. doi:10.1517/17460441.2012.729037.

HONG J. I., CHANG B.-Y. Development of the smartphone-based colorimetry for multi-analyte sensing arrays. *Lab Chip*. 2014, 14(10), 1725-1732. doi: 10.1039/C3LC51451J. ISSN 1473-0197.

CHOODUM A., BOONSAMRAN P., NICDAEID N., WONGNIRAMAİKUL W. On-site semi-quantitative analysis for ammonium nitrate detection using digital image colourimetry. *Science & Justice*. 2015, 55(6), 437-445. doi: 10.1016/j.scijus.2015.05.001. ISSN 13550306.

CHOODUM A., KANATHARANA P., WONGNIRAMAİKUL W., NIC DAEID N. Using the iPhone as a device for a rapid quantitative analysis of trinitrotoluene in soil. *Talanta*. 2013, 115, 143-149. doi: 10.1016/j.talanta.2013.04.037. ISSN 00399140.

CHOODUM A., PARABUN K., KLAWACH N., DAEID N. N., KANATHARANA P., WONGNIRAMAİKUL W. Real time quantitative colourimetric test for methamphetamine detection using digital and mobile phone technology. *Forensic Science International*. 2014, 235, 8-13. doi: 10.1016/j.forsciint.2013.11.018. ISSN 03790738.

INAGAWA A., SASAKI A., UEHARA N. Reproducing absorption spectra of pH indicators from RGB values of microscopic images. *Talanta*. 2020, 216. ISSN 00399140. doi: 10.1016/j.talanta.2020.120952.

INAGAWA A., SAITO K., SASAKI A., UEHARA N. Dataset for reproducing absorption spectra of methyl orange from the RGB values of microscopic images. *Data in Brief*. 2020, 31. ISSN 23523409. doi: 10.1016/j.dib.2020.105998.

IOAN M-R. An innovative idea for developing a new gamma-ray dosimetry system based on optical colorimetry techniques. *Nuclear Engineering and Technology*. 2018, 50(3), 519-525. doi: 10.1016/j.net.2018.01.007. ISSN 17385733.

KATZ N. K., BAROHN R. J. The history of acetylcholinesterase inhibitors in the treatment of myasthenia gravis. *Neuropharmacology*. 2020. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108303. ISSN 00283908.

KAWASHIMA K., FUJII T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000, 86(1), 29-48. doi: 10.1016/S0163-7258(99)00071-6. ISSN 01637258.

KERKUT G.A. Acetylcholinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7.). *General Pharmacology: The Vascular System*. 1984, 15(5), 375-378. ISSN 03063623. doi:10.1016/0306-3623(84)90033-8.

LIN B., YU Y., CAO Y., GUO M., ZHU D., DAI J., ZHENG M. Point-of-care testing for streptomycin based on aptamer recognizing and digital image colorimetry by smartphone. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018, 100(6), 482-489. doi: 10.1016/j.bios.2017.09.028. ISSN 09565663.

LIN G., LAI Ch.-Y., LIAO W.-Ch. Molecular recognition by acetylcholinesterase at the peripheral anionic site: structure–activity relationships for inhibitions by aryl carbamates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1999, 7(12), 2683-2689. doi: 10.1016/S0968-0896(99)00213-8. ISSN 09680896.

LOCKRIDGE O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015, 148, 34-46. ISSN 01637258. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.011.

LOEWENSTEIN-LICHTENSTEIN Y., SCHWARZ M., GLICK D., NØRGAARD-PEDERSEN B., ZAKUT H., SOREQ H. Genetic predisposition to adverse consequences of anti–cholinesterases in ‘atypical’ BCHE carriers. *Nature Medicine*. 1995, 1(10), 1082-1085. doi: 10.1038/nm1095-1082. ISSN 1078-8956.

LOEWI O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*. 1921, 189(1), 239-242. doi: 10.1007/BF01738910. ISSN 0031-6768.

MA J., LU X., ZHAI H., LI Q., QIAO L., GUO Y. Rational design of a near-infrared fluorescence probe for highly selective sensing butyrylcholinesterase (BChE) and its bioimaging applications in living cell. *Talanta*. 2020, 219. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121278. ISSN 00399140.

MALEKI N. Single-step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. *Talanta*. 2004, 64(4), 830-835. doi: 10.1016/j.talanta.2004.02.04. ISSN 00399140.

MASAWAT P., HARFIELD A., NAMWONG A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. *Food Chemistry*. 2015, 184, 23-29. ISSN 03088146. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.089.

MATĚJOVSKÝ L., PITSCHMANN V. New Carrier Made from Glass Nanofibres for the Colorimetric Biosensor of Cholinesterase Inhibitors. *Biosensors*. 2018, 8(2). doi:10.3390/bios8020051. ISSN 2079-6374.

MEHTA M., ADEM A., SABBAGH M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2012, 2012, 1-8. ISSN 2090-8024. doi:10.1155/2012/728983.

MONOGAROVA O. V., CHAPLENKO A. A., OSKOLOK K. O. Multisensory digital colorimetry to identify and determination of active substances in drugs. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 299(6), 63-68. doi: 10.1016/j.snb.2019.126909. ISSN 09254005.

MUKHAMETGALIEVA A. R., ZUEVA I. V., AGLYAMOVA A. R., LUSHCHEKINA S. V., MASSON P. A new sensitive spectrofluorimetric method for measurement of activity and kinetic study of cholinesterases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2020, 1868(1). ISSN 15709639. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140270.

NEPOVIMOVA E., KORABECNY J., DOLEZAL R. et al. Tacrine–Trolox Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo

Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 58(22), 8985-9003. ISSN 0022-2623. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01325.

NICOLET Y., LOCKRIDGE O., MASSON P., FONTECILLA-CAMPS J. C., NACHON F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem*. 2003, 278(42), 41141-41147. doi: 10.1074/jbc.M210241200. ISSN 0021-9258.

PEZZEMENTI L., CHATONNET A. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. *Chemico-Biological Interactions*. 2010, 187(1-3), 27-33. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.043. ISSN 00092797.

POHANKA M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers*. 2011, 155(3), 219-223. doi: 10.5507/bp.2011.036. ISSN 12138118.

POHANKA M. Voltammetric assay of butyrylcholinesterase in plasma samples and its comparison to the standard spectrophotometric test. *Talanta*. 2014, 119, 412-416. ISSN 00399140. doi: 10.1016/j.talanta.2013.11.045.

POHANKA M. Photography by Cameras Integrated in Smartphones as a Tool for Analytical Chemistry Represented by an Butyrylcholinesterase Activity Assay. *Sensors*. 2015, 15(6), 13752-13762. doi: 10.3390/s150613752. ISSN 1424-8220.

POHANKA, M. Stanovení aktivity cholinesteras a jejich využití pro diagnostiku patologických stavů. *Česká a slovenská farmacie*, 2017, 66, 147-153.

POHANKA M., ZDAROVA-KARASOVA J., KUCA K., PIKULA J., HOLAS O., KORABECNY J., CABAL J. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*. 2010, 81(1-2), 621-624. doi: 10.1016/j.talanta.2009.12.052. ISSN 00399140.

POHANKA M. Small camera as a handheld colorimetric tool in the analytical chemistry. *Chemical Papers*. 2017, 71(9), 1553-1561. doi:10.1007/s11696-017-0166-z. ISSN 2585-7290.

POHANKA M., VLCEK V. Preparation and performance of a colorimetric biosensor using acetylcholinesterase and indoxylacetate for assay of nerve agents and drugs. *Interdisciplinary Toxicology*. 2014, 7(4), 215-218. ISSN 1337-9569. doi:10.2478/intox-2014-0031.

RACHAKONDA V., PAN T. H., L W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: How good are they? *Cell Research*. 2004, 14(5), 349-358. doi: 10.1038/sj.cr.7290235. ISSN 1001-0602.

ROMERO A., CACABELOS R., OSET-GASQUE M.J., SAMADI A., MARCO-CONTELLES J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013, 23(7), 1916-1922. ISSN 0960894X. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.02.017.

RANI S., BISWAS P.Ch., HOSSAIN M. A., ISLAM M. R., CANNING J. Polynomial regression of multiple sensing variables for high-performance smartphone colorimeter. *OSA Continuum*. 2021, 4(2). ISSN 2578-7519. doi:10.1364/OSAC.417889.

SAJED S., AREFI F., KOLAHDOUZ M., SADEGHI M.A. Improving sensitivity of mercury detection using learning based smartphone colorimetry. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2019, 298(6), 154-161. doi: 10.1016/j.snb.2019.126942. ISSN 09254005.

SANTARPIA L., GRANDONE I., CONTALDO F., PASANISI F. Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2013 4(1), 31–39. doi.org/10.1007/s13539-012-0083-5.

SHAO X., CHEN Z., DAI X., HE X. Camera array-based digital image correlation for high-resolution strain measurement. *Review of Scientific Instruments*. 2018, 89(10). doi: 10.1063/1.5050187. ISSN 0034-6748.

SHEN L., HAGEN J.A., PAPAUTSKY I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. *Lab on a Chip*. 2012, 12(21). doi: 10.1039/c2lc40741h. ISSN 1473-0197.

SHEN L., RATTERMAN M., KLOTZKIN D., PAPAUTSKY I. A CMOS optical detection system for point-of-use luminescent oxygen sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011, 155(1), 430-435. doi: 10.1016/j.snb.2011.01.001.

SHENHAR-TSARFATY S., BRZEZINSKI R. Y., WAISKOPF N. et al. Blood acetylcholinesterase activity is associated with increased 10 year all-cause mortality following coronary angiography. *Atherosclerosis*. 2020, 313, 144-149. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.004. ISSN 00219150.

SHENHAR-TSARFATY S., BERLINER S., BORNSTEIN N. M., SOREQ H. Cholinesterases as Biomarkers for Parasympathetic Dysfunction and Inflammation-

Related Disease. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014, 53(3), 298-305. doi: 10.1007/s12031-013-0176-4. ISSN 0895-8696.

SHIN S., ROTH L.G., CHANG-HWEI Ch. Ethanol-acetylcholinesterase-inhibitor interactions: Inhibitor hydrophobicity and site specificity dependence. *International Journal of Biochemistry*. 1991, 23(10), 1131-1136. doi:10.1016/0020-711X(91)90154-F. ISSN 0020711X.

SCHAEFER S. Colorimetric water quality sensing with mobile smart phones. The University of British Columbia. Okanagan. 2012. Thesis. Electrical Engineering.

SOREQ H., SEIDMAN S. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001, 2(4), 294-302. doi: 10.1038/35067589. ISSN 1471-003X.

SUSSMAN J., HAREL M., FROLOW F., OEFNER C., GOLDMAN A., TOKER L., SILMAN I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*. 1991, 253(5022), 872-879. doi: 10.1126/science.1678899. ISSN 0036-8075.

ŠINKO G., ČALIĆ M., BOSAK A., KOVARIK Z. Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Analytical Biochemistry*. 2007, 370(2), 223-227. doi: 10.1016/j.ab.2007.07.02. ISSN 00032697.

ŠTĚPÁNKOVÁ Š., KOMERS K. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Current Enzyme Inhibition*. 2008, 4(4), 160-171. doi: 10.2174/157340808786733631. ISSN 15734080.

THANOMSIT Ch., KIATPRASERT P., PRASATKAEW W., KHONGCHAREONPORN N., NANTHANAWAT P. Acetylcholinesterase (AChE) monoclonal antibody generation and validation for use as a biomarker of glyphosate-based herbicide exposure in commercial freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2021, 241. ISSN 15320456. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108956.

WATERS L. C., COUNTS R. W., PALAUSKY A., JENKINS R. A. Colorimetric strip tests: a comparison of visual and reflectometric measurements for quantitative applications. *Journal of Hazardous Materials*. 1995, 43(1-2), 1-12. ISSN 03043894. doi:10.1016/0304-3894(95)00022-M.

WILSON B. W. Cholinesterase Inhibition. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier, 2014, s. 942-951. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00116-0. ISBN 9780123864550.

WILSON B., SAMANTA M.K., SANTHI K., KUMAR K.P.S., RAMASAMY M., SURESH B. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010, 6(1), 144-152. ISSN 15499634. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.001.

WONGNIRAMAİKUL W., LIMSAKUL W., CHOODUM A. A biodegradable colorimetric film for rapid low-cost field determination of formaldehyde contamination by digital image colorimetry. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, 249(6), 63-68. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.021. ISSN 03088146.

WOREK F., MAST U., KIDERLEN D, DIEPOLD Ch., EYER P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*. 1999, 288(1-2), 73-90. doi:10.1016/S0009-8981(99)00144-8. ISSN 00098981.

ZANGHERI M., CEVENINI L., ANFOSSI L., BAGGIANI C., SIMONI P., DI NARDO F., RODA A. A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 64(6), 63-68. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.048. ISSN 09565663.

ZHENG Z., ZHOU Y., LI X., LIU S., TANG S. Highly-sensitive organophosphorous pesticide biosensors based on nanostructured films of acetylcholinesterase and CdTe quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, 26(6), 3081-3085. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2010.12.021.