

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



VZTAH MEZI STRUKTUROU A ÚČINNOSTÍ POTENCIÁLNÍCH
MODULÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY

DISERTAČNÍ PRÁCE

MGR. ONDŘEJ HOLAS

HRADEC KRÁLOVÉ 2012

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Tato disertační práce vznikla za podpory Grantové agentury UK (117909/2009/B-CH/FaF) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR SVV-2012-265-001 a výzkumného záměru MSM0021620822.

V Hradci Králové, dne 12. 7. 2012

.....
Mgr. Ondřej Holas

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK	6
2	SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ	8
2.1	Význam acetylcholinu	8
2.1.1	Syntéza a transport acetylcholinu	8
2.2	Receptory acetylcholinu	9
2.2.1	Nikotinové receptory	9
2.2.2	Muskarinové receptory	10
2.3	Cholinesterasy	12
2.3.1	Acetylcholinesterasa	12
2.3.2	Butyrylcholinesterasa.....	14
2.4	Inhibitory cholinesteras	16
2.4.1	Organofosforové inhibitory	17
2.4.2	Reverzibilní inhibitory	24
2.5	Metody stanovení aktivity cholinesteras	29
2.5.1	Titrimetrická stanovení	29
2.5.2	Radioisotopická stanovení	30
2.5.3	Fluorimetrická stanovení	30
2.5.4	Fotometrická stanovení	31
3	CÍL PRÁCE	34
3.1	Hodnocení účinnosti reaktivátorů acetylcholinesterasy	34
3.2	Hodnocení účinnosti inhibitorů acetylcholinesterasy.....	34
4	KOMENTÁŘ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUSE	36
4.1	In vitro testování	36
4.2	Vztah mezi strukturou a účinností reaktivátorů acetylcholinesterasy	37
4.2.1	Dosud nepublikované výsledky	42
4.3	Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních inhibitorů cholinesteras	42
5	ZÁVĚR	46
5.1	Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních reaktivátorů	46
5.2	Vztah mezi strukturou a účinností inhibitorů cholinesteras	46
6	SOUHRN	48
7	SUMMARY.....	49

8	PUBLIKOVANÉ VĚDECKÉ A ODBORNÉ PRÁCE	50
9	PODĚKOVÁNÍ	62
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
11	PŘÍLOHY	75

1 Seznam zkratek

ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterasa
AD	Alzheimerova choroba
Asp	Kyselina asparagová
BuChE	Butyrylcholinesterasa
CNS	Centrální nervový systém
CYP 450	Cytochrom P 450
DFP	Diisopropylfluorofosfát
DTNB	Kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová)
His	Histidin
i.m.	Intramuskulární
i.v.	Intravenózní
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyklosarin
Glu	Kyselina glutamová
GPI	Glykofosfatidylinositol
ChAT	Cholinacetyltransferasa
ChE	Cholinesterasa
IC ₅₀	Střední inhibiční koncentrace
KTOX FVZ UO	Katedra toxikologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany
L(Ct) ₅₀	Střední letální koncentrace v čase
LD ₅₀	Střední letální dávka
MG	Myasthenia gravis
mAChR	Muskarinové acetylcholinové receptory
nAChR	Nikotinové acetylcholinové receptory
NPL	Nervově paralytické látky
OF	Organofosforové
OFI	Organofosforový inhibitor

PAM	Periferní anionické místo
Phe	Fenylalanin
Ser	Serin
TNB ⁻	3-karboxy-4-nitrobenzothiolát
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin
VACHT	Vesikulární acetylcholinový receptor

2 Současný stav poznání

2.1 Význam acetylcholinu

Acetylcholin (ACh, Obr. 1) je významným transmittérem centrálního nervového systému, periferního nervového systému a to jak parasympatiku, tak sympatiku [1, 2]. Význam ACh však není omezen jen na nervovou soustavu a receptory pro ACh jsou exprimovány celou řadou dalších buněk např. hladkou svalovinou cév [3]. Z chemického hlediska se jedná o ester bazického alkoholu cholinu a kyseliny octové.



Obrázek 1. Struktura acetylcholinu a cholinu

2.1.1 Syntéza a transport acetylcholinu

Acetylcholin je syntetizován za pomoci enzymu cholin-*O*-acetyltransferasy (ChAT; EC 2.3.1.6) ze dvou prekurzorů: acetylkoenzymu A a cholinu. Tato syntéza je totožná u obratlovců i bezobratlých. Nejvyšší aktivita ChAT je v cytosolu presynaptických neuronů v blízkosti synapsí, kde dochází k největšímu obratu ACh. ChAT je považována za synaptický enzym, ale imunochemicky byla prokázána i jeho cytoplazmatická forma. Lokalizace ChAT se využívá pro identifikaci cholinergní tkáně v organismu [4].

Dostatek cholinu je považován za limitující faktor pro tvorbu ACh. Cholin je v organismu syntetizován ve formě fosfocholinu cestou *N*-methylace fosfoethanolaminu. Enzymy podílející se na této syntéze jsou methyltransferasy PMT-1 a PMT-2. Druhou cestou produkce cholinu je štěpení fosfatidylcholinu fosfolipasou PLD-1. Jak je patrné z textu výše, cholin je produktem lipidového metabolismu [2].

Syntetizovaný ACh je poté transportován do vezikul pomocí vezikulárního acetylcholinového transportéru (VAChT) [5] případně po pH gradientu vytvářeném ATP-dependentní protonovou pumpou [6]. Interakce vezikul s membránou

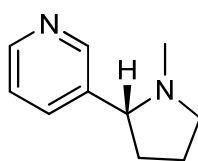
neurosynapse je stimulována influxem vápenatých iontů během šíření nervového signálu [7]. Uvolňování ACh, podobně jako dalších mediátorů je řízeno pomocí SNAREs (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors), v neuronech hojně rozšířené proteiny směřující vezikuly k synapsi a spouštějící exocytosu. Po vzniku komplexu SNARE dojde k uvolnění ACh do synaptické štěrbině a přenosu vzruchu na postsynaptický neuron [6, 8].

2.2 Receptory acetylcholinu

Receptory pro ACh se dají podle svých agonistů rozdělit na nikotinové receptory (nAChR) a muskarinové receptory (mAChR).

2.2.1 Nikotinové receptory

Alkaloid tabáku obecného (*Nicotiana tabacum*), nikotin, je přirozeným agonistou těchto receptorů, od něhož nAChR získaly své pojmenování (Obr. 2). Nikotinové receptory jsou široce zastoupeny v centrálním nervovém systému (CNS) i v periferních synapsích a podílí se na celé řadě fyziologických funkcí (vědomí, pozornost nebo paměť) [9, 10]. Narušení správné funkce nAChR může vést k závažným poruchám činnosti CNS, např. schizofrenie, Parkinsonova choroba nebo Alzheimerova choroba (AD) [11, 12].



Obrázek 2. Struktura nikotinu

Po aktivaci nAChR dojde k okamžité depolarizaci membrány a přímo i nepřímo ke zvýšení intracelulárního obsahu iontů pro který je receptor selektivní. NACHR mohou být umístěny jak presynapticky tak postsynapticky. Aktivace presynapticky umístěných receptorů zvyšuje možnost uvolnění mediátoru do synapse, zatímco postsynaptická lokalizace umožňuje šíření nervového impulsu na postsynaptický neuron. Společná (pre- i postsynaptická lokalizace zprostředkovává dlouhotrvající změny v synaptických transmisích [13].

Jedná se o typický příklad ligandem aktivovaného iontového kanálu. Celý receptor představuje strukturu o velikosti přibližně 160 Å [14]. Každý receptor se skládá z pěti podjednotek tvořících hydrofilní, pro kationty prostupný kanál. Byla identifikována řada typů podjednotek: α 1-10, β 1-4, γ , δ , ϵ . Ve fetálním stádiu vývoje jsou zastoupeny $\alpha\beta\gamma\delta$, které jsou v dospělém organismu nahrazeny receptory složenými z $\alpha\beta\epsilon\delta$ podjednotek [15]. Zastoupení různých podjednotek rozhoduje o tom, pro které ionty bude iontový kanál prostupný. Vysoké zastoupení podjednotky $\alpha 3$ definuje receptor spojený s iontovým kanálem propustným pro sodné a draselné ionty. Naproti tomu zastoupení $\alpha 7$ podjednotek umožňuje proporcionálně zvýšený prostup vápenatých iontů [16-18].

Podjednotky mají podobnou lineární strukturu a jsou i podobně transmembránově umístěny. Extracelulární N-terminus je určen pro navázání ligandu. Následují tři transmembránové hydrofobní segmenty a intracelulární smyčka, čtvrtý hydrofobní segment (M4) a C-terminus [17].

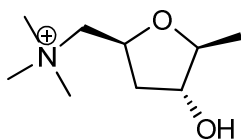
Receptory se mohou vyskytovat ve třech různých stavech: otevřený, uzavřený a desenzitizovaný. V uzavřeném stavu je iontový kanál uzavřen a vazné místo pro ligandy je přístupné. Po navázání obvykle dvou agonistů je iontový kanál otevřen a prostupný pro kationty. V desenzitizovaném stavu je iontový kanál uzavřen a neodpovídá na interakci s ligandy [19].

nAChR jsou aktivovány ACh a nikotinem a inhibované mekamylnem. Podjednotku $\alpha 7$ obsahující receptory jsou aktivovány cholinem vzniklým při hydrolýze ACh. Selektivními antagonisty nAChR je například α -bungarotoxin a nízké koncentrace methylkakonitinu [20, 21]. Na nervosvalové ploténce ACh rychle dosahuje vysokých koncentrací (cca 1mM během 1ms) předtím než je hydrolyzován [22].

2.2.2 Muskarinové receptory

Muskarin, alkaloid muchomůrky červené (*Amanita muscaria*), je typickým agonistou těchto receptorů (Obr. 3). Zastoupení mAChR je poněkud odlišné od nAChR. Na periférii jsou mimo jiné zodpovědné za kontrakci hladké svaloviny, sekreci některých žláz nebo modulaci srdeční frekvence a síly stahu [23]. Role mAChR v CNS je dosud v některých oblastech neobjasněná. Nicméně se dosud podařilo prokázat roli

mAChR při řízení tělesné teploty, pohybové koordinaci a kardiovaskulární regulaci [24]. Potvrzeno bylo zapojení mAChR při řízení paměti [25].



Obrázek 3. Struktura muskarinu

Na rozdíl od nAChR jsou mAChR s G-proteinem spojené receptory. V současnosti se doporučuje rozdělovat mAChR na pět podtypů: M₁, M₂, M₃, M₄ a M₅. Podtypy M₁, M₃, M₅ jsou spojené se subtypy G-proteinu G_{αq/11} a G_{αq/13} vedoucím k aktivaci fosfolipasy C (FLC) a fosfolipasy D (FLD), zatímco M₂ a M₄ jsou spojeny se subtypy G-proteinu G_{i/Go} s inhibicí adenylátcyklasy [26, 27].

M₁ receptory jsou lokalizovány na většině nervových buněk a ovlivňují jejich funkčnost, resp. možnost šíření nervového vzruchu. K tomu dochází cestou aktivace fosfolipasy C a tak ovlivněním některých napětím řízených iontových kanálů (např. proteinkinasa C-dependentní chloridové kanály). Aktivací M₂ receptoru dochází v myocytech ke snížení srdeční frekvence, snížení síly stahu srdečního svalu a snižuje se i vodivost pro akční potenciál (tj. agonisté těchto receptorů působí negativně chronotropně, inotropně a negativně dromotropně). M₃ jsou nejhojněji zastoupeny na buňkách hladkých svalů. Aktivací těchto receptorů dojde k aktivaci fosfolipasy. Tím dojde ke zvýšení tonu hladkého svalstva [28]. Vasodilatační účinek acetylcholinu na některé cévy je pravděpodobně zprostředkováván M₄ receptory, které jsou spojené s inhibicí adenylátcyklasy. Jedná se o presynaptický efekt spojený s uvolněním některého neadrenergního necholinergního mediátoru (např. oxid dusnatý). M₅ receptory jsou lokalizovány v CNS a buněčné změny se dějí cestou aktivace fosfolipasy C [27, 29-31].

Strukturně jsou mAChR glykoproteiny uspořádané do sedmi transmembránových helixů. Tři jsou orientované přibližně kolmo k membráně a čtyři v ostřejším úhlu. Na povrchu membrány je tvořena prohlubeň pro navázání substrátu [32].

2.3 Cholinesterasy

Cholinesterasy (ChE) patří do skupiny serinových hydrolas. Mezi cholinesterasy se řadí dva nejdůležitější enzymy: acetylcholinesterasa (AChE; E.C. 3.1.1.7.) a butyrylcholinesterasa (BuChE; E.C. 3.1.1.8.) [33]. Odlišnosti mezi jednotlivými ChE spočívají ve specifitě, s jakou jsou schopny štěpit různé substráty a v jejich citlivosti k inhibitorům [34]. Fyziologickou rolí ChE je hydrolyza esterů cholinu, především ACh a jsou tedy významným faktorem podílejícím se na cholinergní transmisi [35].

Narušená funkce ChE může vést k závažným onemocněním jako AD, myasthenia gravis (MG) nebo Parkinsonova choroba. V této souvislosti je lépe prozkoumána role AChE a celá řada léčiv se zaměřuje na modulaci její aktivity. Nicméně byla popsána závislost mezi výskytem snížené funkce BuChE (K alela) a nižší incidencí Alzheimerovy choroby [10, 11, 36].

Strukturně se ChE řadí mezi α/β hydrolasy. V této skupině enzymů jsou kromě ChE, neutrální lipasy některé peptidasy a některé enzymy vykazující strukturní homologii s AChE, ale postrádající v aktivním místě jednu nebo více aminokyselin katalytické triády. Všechny α/β proteiny mají přibližně stejnou strukturu: centrální β -skládaný list je obklopen smyčkami a α -helixy [37, 38].

2.3.1 Acetylcholinesterasa

Úlohou AChE v organismu je terminace cholinergního přenosu cestou hydrolyzy ACh v synaptické štěrbině. Při její snížené funkci případně úplnému zablokování její funkce (např. inhibitory AChE), dochází k trvalému dráždění AChR a z toho odvozeným dopadům na organismus (Obr. 8). AChE je lokalizována především v nervových cholinergních tkáních. Velké množství je rovněž přítomno na povrchu erytrocytů [39]. AChE je vysoce výkonný enzym s číslem přeměny přibližně 10^4 s^{-1} [40, 41].

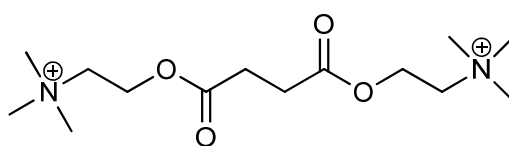
Zjištění skutečné struktury aktivního místa bylo překvapením s ohledem na vysoké číslo přeměny AChE. Aktivní místo je lokalizováno blízko dna relativně úzké asi 20 Å hluboké prohlubně do které substrát proniká pomocí interakce kationtu kvartérního dusíku a π -elektronů Trp84 a Phe330. Samotná katalytická triáda je u člověka tvořena aminokyselinovými zbytky Ser203, Glu334 a His447 [42]. Další

zbytky aromatických aminokyselin vytvářejí acylovou kapsu, která definuje substrátovou specificitu a citlivost k inhibitorům. Hrdlo vstupu do prohlubně aromatického místa je tvořeno především zbytky aromatických aminokyselin. Ty napomáhají především vstupu substrátu ke katalytické triádě cestou kation- π interakcí mezi kvartérním dusíkem a π -elektrony aromatických zbytků. Rozložení aminokyselin v molekule AChE vytváří permanentní dipólový moment, který napomáhá orientaci kladně nabitých substrátů k aktivnímu místu [43]. Na povrchu molekuly AChE se nachází periferní anionické místo (Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 a Tyr341), které je místem interakce AChE s řadou modulátorů její aktivity [44]. Byla vyslovena hypotéza, že v molekule AChE v jednom z jejích dynamických stavů existují tzv. „zadní dveře“ sloužící pro odchod produktů hydrolýzy a zamezující vzniku problému se vstupem substrátu do úzké štěrbiny aktivního místa. Lokalizace aktivního místa zapříčiňuje fakt, že AChE je na rozdíl od BuChE, jejíž aktivní místo je snadněji přístupné, inhibována nadbytkem substrátu [45, 46].

Kvartérní struktura AChE může být tvořena několika typy podjednotek. Asi 95 % AChE je v organismu přítomno ve formě tetramerů [47, 48]. Monomery mají obvykle molekulární hmotnost 69 kDa. AChE_R (readthrough) podjednotky vznikají při nedostatku posttranslačních modifikací při tvorbě katalytické domény. AChE_R podjednotky jsou rozpustné a zůstávají monomerní. AChE_R byla prokázána v embryonálních tkáních a buněčných kulturách, byla nalezena v myších, ale nikoliv lidských erythrocytech. Její tvorba může být navozena stresem. AChE_H (hydrofobní) podjednotky tvoří glykofosfatidylinositolem (GPI) kotvené dimery. GPI kotva má molekulární hmotnost 20 kDa a je asymetricky vázaná ke dvěma monomerům. V organismu je AChE_H tvořena hematopoetickým systémem, kde se pravděpodobně podílí na eliminaci ACh v krevním řečišti. AChE_T (tailed – ocasatá) tvoří celou řadu oligomerů: monomery, dimery, tetramery včetně heterotetramerů s kolagenem Q, GPI-kotvené tetramery a tetramery kotvené ke tkáni bohaté na prolin. AChE_T se vyskytuje v tkáních všech obratlovců a je nejhojněji zastoupenou formou v organismu. AChE_S (soluble – rozpustná) byla identifikovaná v jedových žlázách některých hadů rodu *Bungarus* a *Naja* [49-51].

2.3.2 Butyrylcholinesterasa

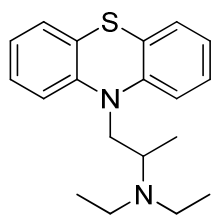
Největší podíl BuChE v organismu je v krevní plasmě. Na rozdíl od AChE není plná funkce BuChE dosud jednoznačně objasněna. Pacienti se sníženou funkcí BuChE jsou obvykle zdraví a nejeví žádné známky onemocnění [46]. Deficience BuChE se projevuje zvýšenou citlivostí k některým svalovým relaxancím jako je sukcinylcholin ústící v dechovou insuficienci. Tato deficience je rozšířená především v oblasti Kaspického moře [52]. BuChE má ve srovnání s AChE širší substrátovou specifitu a je schopna štěpit estery s rozměrnějším acylem [51].



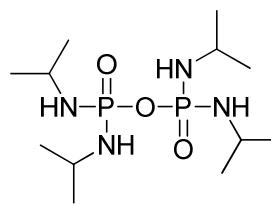
sukcinylcholin

Obrázek 4. Struktura sukcinylcholinu

AChE je schopna štěpit estery kyseliny octové rychleji než BuChE. Naproti tomu BuChE katalyzuje efektivně hydrolyzu esterů kyseliny máselné a vyšších. Toto zjištění je platné i pro jiné než cholinové estery. V praxi to znamená, že BuChE se podílí na hydrolyze široké škály esterů cholinu (indolové deriváty, adipoylcholin, butyrylcholin, butyrylthiocholin, propionylcholin, propionylthiocholin, benzoylcholin nebo sukcinylcholin) i na eliminaci celé řady xenobiotik ze skupiny organofosforových sloučenin a karbamátů, kokainu, prokainu, kyseliny acetylsalicylové nebo heroinu [53]. Rozdílná je i citlivost BuChE k inhibitorům. Ze selektivních inhibitorů je třeba vyzdvihnout dibukain (cinchokain), *iso*-OMPA a ethopropazin (Obr. 5 a 6). Tzv. dibukainové číslo se užívá pro rozlišení jedinců se sníženou aktivitou BuChE (K varianta BuChE). Tato mutace BuChE je méně citlivá k inhibici dibukainem [54]. Dibukainové číslo se rovná procentu inhibice BuChE a používá se pro predikci nadměrné citlivosti proti některým svalovým relaxantům. Na druhou stranu existují substráty hydrolyzované AChE, které BuChE není schopna hydrolyzovat: acetyl- β -methylcholin/acetyl- β -methylthiocholin (Obr. 7) [55, 56].

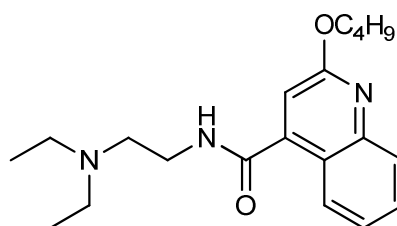


ethopropazin



iso-OMPA

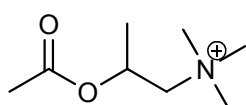
Obrázek 5. Struktura inhibitorů butyrylcholinesterasy



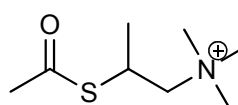
cinchokain

Obrázek 6. Struktura cinchokainu (dibukainu)

Tato rozdílná substrátová specificita a citlivost k inhibitorům je podložena rozdílnou strukturou BuChE a AChE. Aktivní místo BuChE není lokalizováno v úzké štěrbině, jako je tomu v případě AChE. To zapříčiňuje i fakt, že BuChE není, na rozdíl od AChE, inhibovaná nadbytkem substrátu. Podobně jako AChE i BuChE se může vyskytovat ve formě monomerů, dimerů a tetramerů. Všechny oligomery jsou poměrně hojně zastoupeny v organismu, nicméně tetramerní forma je nejobvyklejší. Strukturální podobnost s AChE je 54% [51, 57].

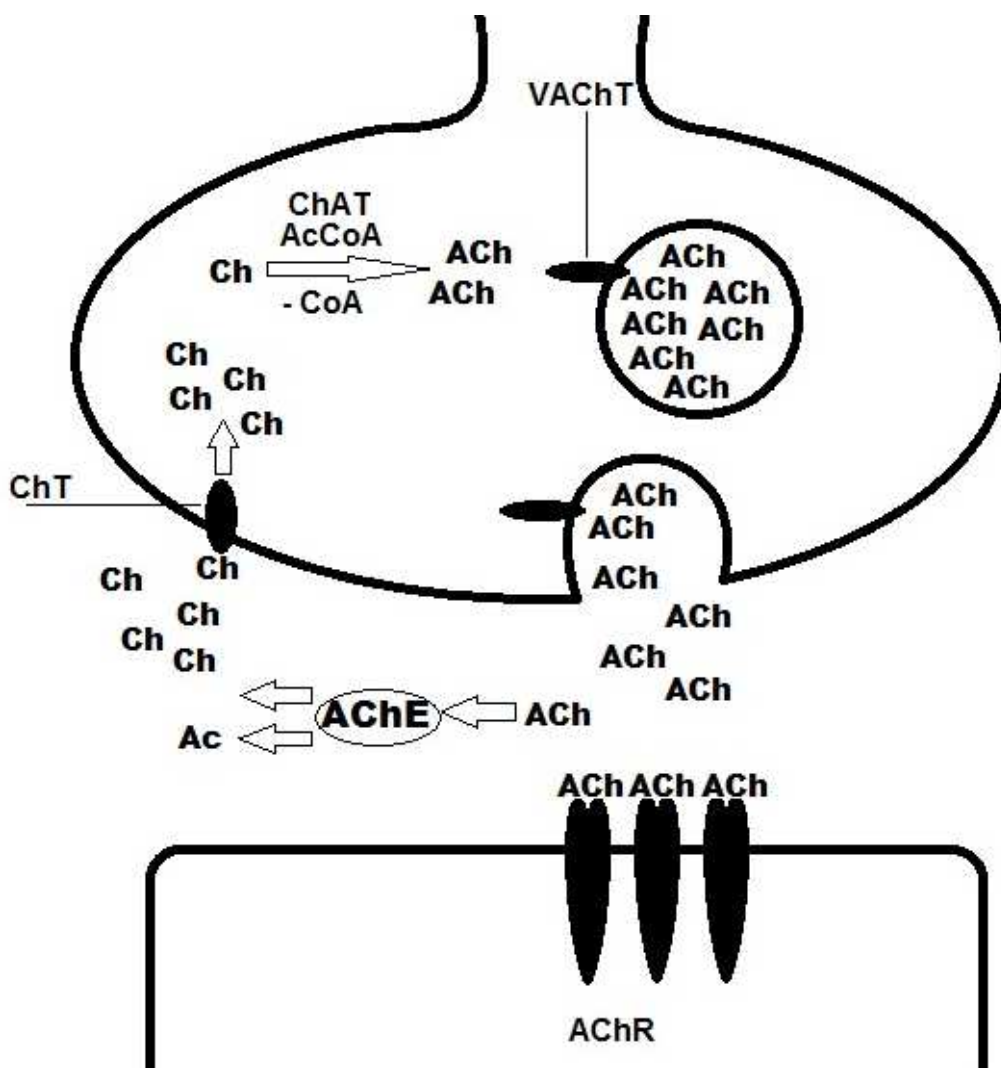


acetyl- β -methylcholin



acetyl- β -methylthiocholin

Obrázek 7. Struktura substrátů specifických pro acetylcholinesterasu



Obrázek 8. Schéma cholinerní synapse: Ac- acetát; AcCoA- acetylkoenzym A; ACh- acetylcholin; AChE- acetylcholinesterasa; AChR- acetylcholinové receptory; Ch- cholin; ChT- cholinový transportér; ChAT- cholinacetyltransferasa; VChT- vezikulární acetylcholinový transportér.

2.4 Inhibitory cholinesteras

Inhibitory ChE zastávají celou řadu funkcí. Jedná se o léčiva, pesticidy nebo bojové otravné látky. Celou řadu inhibitorů lze nalézt i mezi přírodními toxiny (např. aflatoxiny). Většina léčiv, pesticidů nebo bojových otravných látek je vyvíjena s cílem ovlivnit aktivitu AChE. Inhibitory selektivní pro BuChE (kap: 2.3.2 butyrylcholinesterasa) mají většinou analytický význam, využívají se pro odlišení, zda je ve vzorku přítomna AChE či BuChE, případně pro selektivní zjištění aktivity AChE v plné krvi [54].

Na základě mechanismu inhibice lze inhibitory rozdělit na ireverzibilní a reverzibilní inhibitory. *Ireverzibilní inhibitory* jsou sloučeniny téměř výhradně ze

skupiny organofosforových (OF) sloučenin [58]. **Reverzibilní inhibitory** lze dále rozdělit na: **a)** inhibitory interagující přímo s aktivním místem, **b)** inhibitory interagující s aromatickým hrdlem aktivního místa a **c)** inhibitory vážící se na periferní anionické místo [59].

2.4.1 Organofosforové inhibitory

Jedná se o organické deriváty fosfor obsahujících kyselin (obvykle kys. fosforečné nebo fosfonové). Obecně jsou tyto sloučeniny známé jako organofosfáty (OF), ale tento název nevyjadřuje, že se může jednat i organofosfonáty. Vhodnější je výraz organofosforové inhibitory (OFI). Použití těchto látek pokrývá širokou škálu lidských činností: nervově paralytické látky (NPL), pesticidy, v průmyslu se používají jako změkčovadla, plastifikátory nebo inhibitory hoření. Některé OFI byly zvažovány i jako léčiva AD (např. metrifonát) [60-63].

Mechanismem inhibice se řadí mezi tzv. acylující inhibitory. OFI fosforylují případně fosfonylují volný hydroxyl serinu Ser203 a vytvářejí kovalentní vazbu komplexu enzym-inhibitor [60, 64]. Poločas hydrolýzy vzniklého komplexu se pohybuje v řádu desítek až stovek hodin a taková inhibice je považovaná za ireverzibilní. Následná akumulace ACh v synapsi vede k nadměrné stimulaci cholinergních receptorů. To že je AChE primárním cílem potvrzuje dobrá korelace mezi hodnotami IC_{50} reprezentující schopnost OF inhibovat AChE *in vitro* a hodnotami LD_{50} získanými *in vivo*. Na druhou stranu existuje řada důkazů, že inhibice AChE není jediným mechanismem podílejícím se na toxicitě OF. Byla prokázána změna aktivity mnoha dalších enzymů, hladiny některých neurotransmiterů (např. zvýšení hladiny glutamátu v CNS je jedním z fenoménů podílejících se na toxických účincích NPL), změny plasticity synaptické membrány a závažné změny imunitního systému, které mohou vyústit až v anafylaktický šok [64, 65].

Mechanismus účinku je pro všechny OFI prakticky stejný, nicméně AChE inhibovaná různými OFI má různou odpověď na terapii antidoty i jiný poločas dealkylace komplexu enzym-inhibitor (tzv. „aging“). Touto reakcí vzniká nereaktivovatelný komplex. Inhibice plazmatické BuChE se nezdá být život ohrožujícím jevem při otravě OFI [66, 67].

Klinické projevy otravy OFI se dají odvodit podle druhu nadměrně stimulovaných receptorů:

Nadměrnou stimulací mAChR v parasympatickém nervovém systému dojde k rozvoji následujících symptomů: bronchospasmus, hypersekrece bronchiálních žláz, mióza, slzení, průjem, bradykardie, zvracení, nadměrná produkce slin ad.

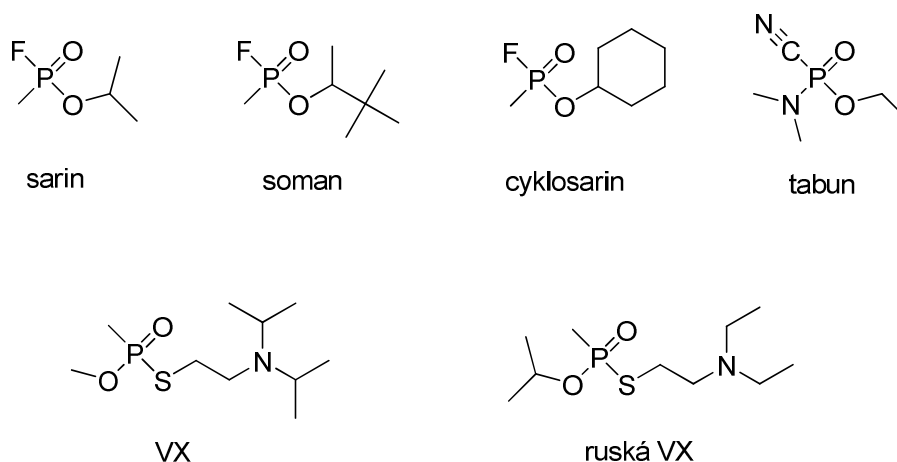
Nikotinové příznaky otravy OFI: tachykardie, hypertenze, pocení, svalová slabost, přecházející ve fascikulace, ústící až v tonicko-klonické křeče.

Příznaky nadměrné stimulace nAChR v CNS: zmatenost, bolest hlavy, agitace, kóma, selhání dýchání.

Ke smrti ve spojitosti s otravou OFI dochází nejčastěji vinou paralýzy dýchacích svalů a inhibicí dechového centra ústící v akutní dechovou insuficienci [68, 69].

2.4.1.1 Nervově paralytické látky

NPL byly poprvé vyrobeny ve 30. letech v Německu. První syntetizovanou NPL byl tabun (GA; ethyl-dimethylfosforamidokyanidát) a syntéza dalších NPL jako sarin (GB; propan-2-yl-methylfosfonofluoridát) a soman (GD; 3,3-dimethylbutan-2-yl-methylfosfonofluoridát) následovala do konce druhé světové války. Existují další NPL z této skupiny tzv. G-látek jako cyklosarin (GF; cyklohexylmethylfluorofosfonát). V-látky byly připraveny později a nejvýznamnějšími zástupci jsou látky VX (S-[2-(dipropan-2-ylamino)ethyl] O-ethyl-methylfosfonothioát) a její ruská varianta (S-[2-(diethylamino)ethyl] O-(2-methylpropyl)-methylfosfonothioát) (Obr. 9) [60].



Obrázek 9. Příklady struktury organofosforových sloučenin ze skupiny nervově paralytických látek

Jedná se o vysoce toxické sloučeniny, schopné proniknout do organismu prakticky všemi branami vstupu. G-látky dobře pronikají kůží i ostatními biologickými bariérami, zatímco u některých V-látek hrozí tvorba subkutánního depa. Příklady hodnot letálních dávek jsou shrnuty v Tab. 1. Obecně se dá říci, že toxicita NPL je velmi vysoká. G-látky jsou při porovnání s V-látkami méně toxické, jejich střední letální dávka kolísá mezi 0,7 až 7 mg.kg⁻¹. Střední letální dávka V-látek se pohybuje okolo 0,07 mg.kg⁻¹ [70, 71].

V případě G-látek se obvykle jedná o nízkovroucí kapaliny bez chuti a bez zápachu. Nejpravděpodobnější branou vstupu jsou dýchací cesty. Většina G-látek se rozpouští ve vodě i organických rozpouštědlech. NPL jsou snadno hydrolyzovatelné vodou. Poločas hydrolyzy NPL ve vodném prostředí je obecně v řádu několika hodin nebo méně. V-látky jsou, podobně jako v předchozím případě, kapaliny bez chuti a zápachu. Oproti G-látkám mají podstatně vyšší teplotu varu a nejsou tolik těkavé. Rozpustnost ve vodě je nízká, zatímco rozpustnost v organických rozpouštědlech je velmi dobrá [64].

NPL byly v historii použity ve vojenském konfliktu v průběhu Iránsko-Irácké války. V roce 1988 režim Saddáma Husajna použil NPL proti kurdskému obyvatelstvu ve městě Halajbla. Oběti na životech se odhadují na 3 000 až 5 000. V roce 1995 použila náboženská sekta Aum Shinrikyo sarin proti civilistům během útoku v tokijském metru [72].

Tabulka 1. Srovnání toxicity některých NPL

Brána vstupu	Veličina	Jednotka	GA	GB	GD	VX
Inhalační	L(Ct) ₅₀	mg min m ⁻³	150	70-100	40-60	-
Intravenózní	LD ₅₀	mg kg ⁻¹	0,08	0,01	0,025	0,007
Perkutánní	LD ₅₀	mg kg ⁻¹	-	-	-	0,142

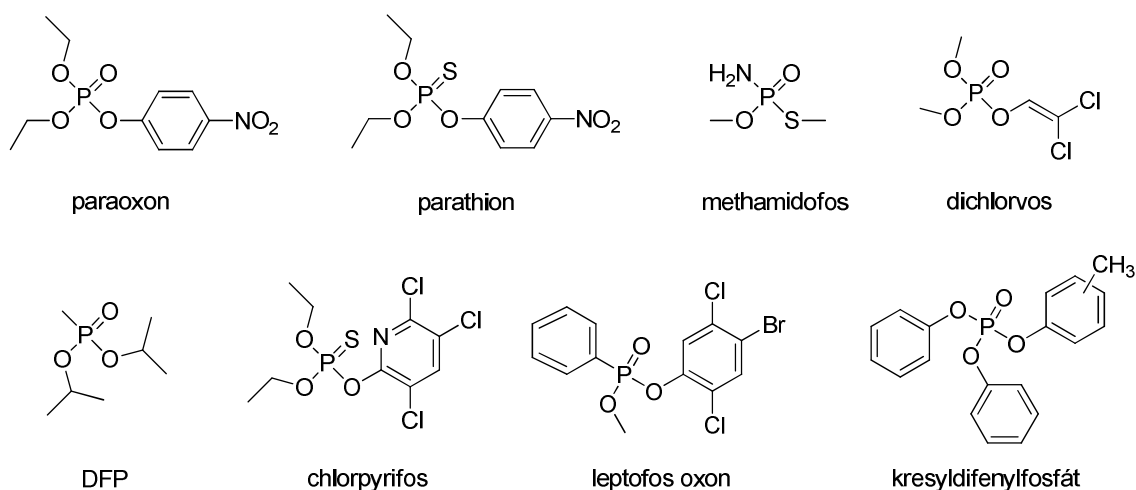
2.4.1.2 Organofosforové pesticidy

Méně toxickou variantou OFI jsou látky zavedené v zemědělství a průmyslu souhrnně označované jako OF pesticidy. Většina pesticidů našla uplatnění jako insekticidy, jako takové však nejsou selektivní pro hmyz, ale mají zachovanou toxicitu vůči teplokrevným organismům. Celosvětově dojde ročně k 200 000 případů úmrtí vinou otrav OF pesticidy. K největšímu počtu takových případů dojde v rozvojových

zemích, kde se pesticidy stále hojně používají především pro nízké náklady spojené s jejich použitím. Další OF sloučeniny se používají jako inhibitory hoření (kresyldifenylfosfát, triarylfosfát). Nebezpečnost těchto inhibitorů spočívá v jejich snadné dostupnosti a možné kontaminaci zdrojů pitné vody nebo potravin [61].

Thioanalogy některých pesticidů jsou ve tkáních konvertovány pomocí oxidas se smíšenou funkcí na podstatně více toxické oxo-deriváty. Tento fenomén se nazývá letální syntéza a probíhá např. při otravě parathionem, který je konvertován na paraoxon. Konverze probíhá podstatně rychleji v chladnokrevných organismech a toxicita vůči teplotokrevným organismům je tedy podstatně nižší [73].

Jako zástupce OF insekticidů lze jmenovat například paraoxon (diethyl-4-nitrofenylfosfát), chlorpyrifos (*O,O*-diethyl-*O*-3,5,6-trichloropyridin-2-yl fosforothioát), methamidofos (*O,S*-dimethylfosforamidothioát), dichlorvos (2,2-dichlorovinyl dimethylfosfát) a leptofos-oxon (*O*-[4-brom-2,5-dichlorfenyl] *O*-methylfenylfosfonát). Dalším OFI, který lze do této skupiny zařadit je DFP (dipropan-2-yl-fosforfluoridát). Přestože se DFP nepoužívá k zemědělským účelům ani v průmyslu, je často používán jako modelový isopropylem substituovaný OF inhibitor. Dříve byl používán v očním lékařství jako miotikum (Obr. 10) [62, 74].



Obrázek 10. Příklady struktury organofosforových sloučenin ze skupiny pesticidů

2.4.1.3 Terapie a profylaxe OF otrav

K *profylaxi* otrav OFI se přistupuje v případech, kdy je zvýšené riziko kontaktu s těmito sloučeninami (např. při likvidaci živelných katastrof, nebo ve vojenství, při pohybu vojáků v kontaminovaném terénu).

Látkami volby při takové profylaxi jsou reverzibilní inhibitory ChE (nejčastěji se užívá karbamát pyridostigmin). Reverzibilní inhibitory jsou schopné dočasně ochránit molekulu AChE před ireverzibilní inhibicí. V praxi se používají inhibitory v kombinaci s anticholinergiky, která jsou schopná ochránit pacienta před nežádoucími účinky inhibitoru (často se přistupuje k transdermálnímu podání: přípravek TRANSANT obsahující navíc kromě reverzibilního inhibitoru a anticholinergika i reaktivátor asoxim) [75]. Ve větším rozsahu bude o reverzibilních inhibitech pojednáno níže (viz. Kapitola: *Reverzibilní inhibitory*). Za zmínku stojí to, že ChE nejsou jedinými strukturami, na které se OFI váží. Karboxylesterasa 1, je schopna vázat a štěpit některé OF a tím je detoxikovat. Dalším enzymem s podobným mechanismem účinku je sérová paraoxonasa. Tyto enzymy se jako katalytické scavengery dají použít při profylaxi OFI otrav [64, 76].

Samotná *terapie* otrav se skládá ze tří základních složek: funkčního antidota s anticholinergním účinkem, antikonvulziva (obvykle diazepam), kauzálního antidota (reaktivátor AChE) [64, 73].

Anticholinergikem volby při zasažení OFI je atropin. Používá se pro antagonizaci účinků nahromaděného ACh na periferních muskarinových receptorech. Efekt na centrální příznaky otravy je podstatně nižší vzhledem k nižšímu poměru atropinu pronikajícímu přes hematoencefalickou bariéru. Atropin se podává i.m. nebo i.v. v dávce 2-4 mg opakovaně každých 30 minut až do prvních příznaků atropinizace. U otrav OFI s výrazně vyznačenými centrálními účinky se s výhodou používají anticholinergika s centrálním antimuskarinovým účinkem např. benaktyzin, biperiden nebo skopolamin [75, 77].

Reaktivátory AChE jsou mono- nebo biskvartérní pyridiniové soli nesoucí ve své molekule jednu nebo více aldoximových funkčních skupin (Obr. 11). Oximová skupina se při fyziologickém pH vyskytuje ve formě aniontu, oximátu [78]. Oximátová skupina je schopna nukleofilního útoku na elektronově deficitní fosfor OFI v komplexu

enzym-inhibitor a tím rozštěpit vazbu tohoto komplexu. Tím může být obnovena fyziologická funkce AChE [79, 80].

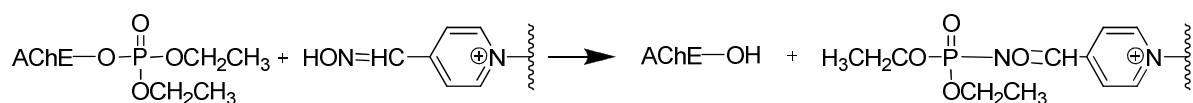
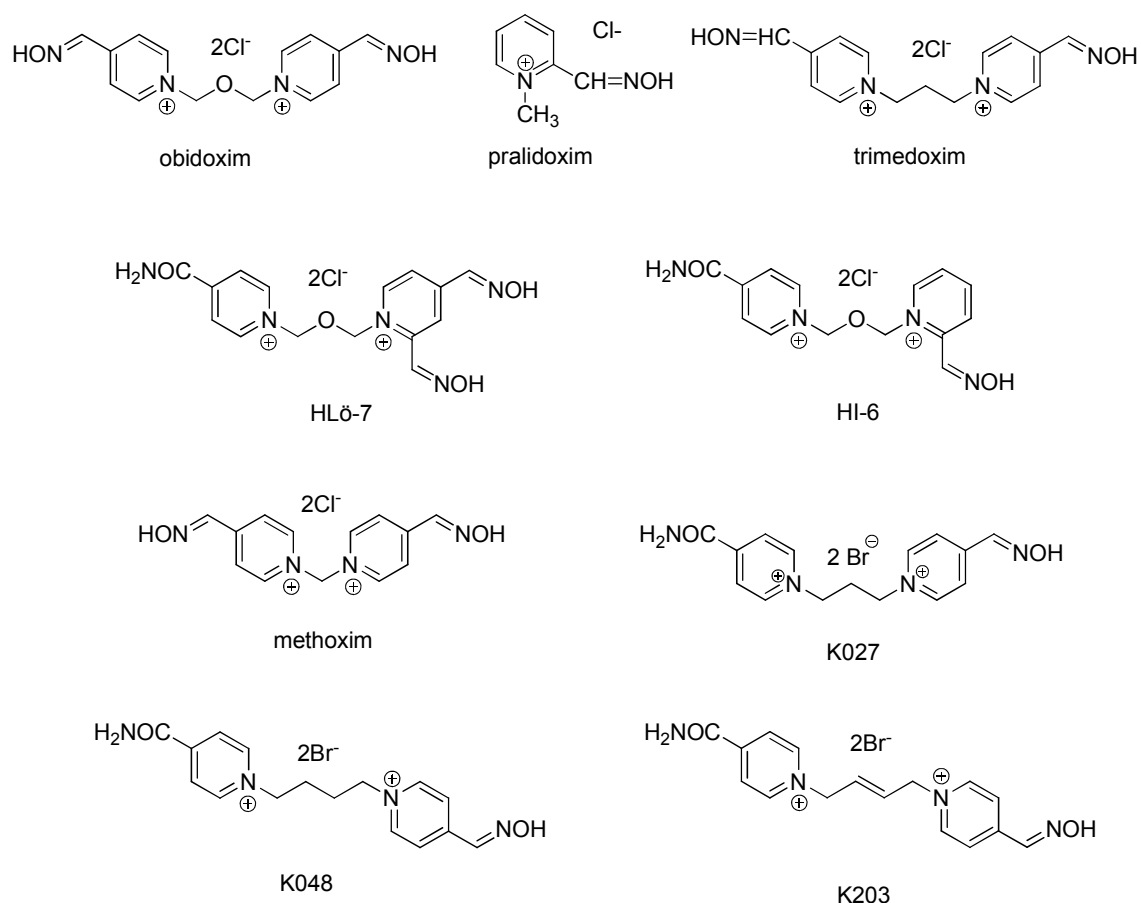


Schéma 1. Princip reaktivace paraoxonem inhibované acetylcholinesterasy

Pralidoxim (2-[(hydroxyimino)methyl]-1-methylpyridinium-chlorid) byl prvním reaktivátorem uvedeným do praxe. Následovaly biskvartérní reaktivátory: trimedoxim (1,1'-propan-1,3-diylbis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium}-dichlorid); methoxim (1,1'-methandiylbis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium}-dichlorid); obidoxim (1,1'-(oxydimethandiyl)bis{4-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium}-dichlorid; asoxime (HI-6; 1-[(2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl)methoxy)methyl]-4-karbamoylpyridinium-dichlorid) a HLö-7 (1-[(2,4-bis[(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl)methoxy)methyl]-4-karbamoylpyridinium-dichlorid). V současnosti komerčně dostupné reaktivátory (pralidoxim, methoxim, trimedoxim, obidoxim, asoxim) byly vyvinuty proti otravám NPL, zatímco otravám pesticidy nebyla věnována dostatečná pozornost. Navzdory tomu je pralidoxim reaktivátorem doporučeným Světovou zdravotnickou organizací při otravách OF pesticidy. Situace je poněkud odlišná v případě potenciálních otrav NPL. Tento problém je ve světě v armádní kompetenci a každá armáda má reaktivátor volby, v České republice je to asoxim [81]. Příklady účinnosti standardních reaktivátorů jsou shrnuty v tab. 2. Struktury komerčně používaných a standardních reaktivátorů jsou na obrázku 11.



Obrázek 11. Struktury komerčně dostupných a standardních reaktivátorů

Tabulka 2. Reaktivční účinnost standardních reaktivátorů proti modelovým OFI

	Tabun ^a		ethyl-paraoxon ^b		methyl-paraoxon ^c		DFP ^d	
	100μM	10μM	100μM	10μM	100μM	10μM	100μM	10μM
2PAM	3,3±0,5	2,4±0,2	10,7±0,3	2,1±0,1	30,2±0,3	22,4±0,7	1,3±0,6	0,1±0,4
TMB	31,5±1,2	16,9±0,2	44,3±0,6	2,5±1,3	51,4±0,9	59,5±0,7	10,0±0,5	2,7±0,3
MMC	2,9±0,1	2,1±0,5	16,1±0,5	1,8±0,3	14,2±0,1	14,3±0,2	2,4±0,1	0,6±0,3
OBI	15,1±0,9	7,9±0,5	59,7±1,0	22,4±0,4	61,7±0,3	45,3±0,9	7,6±0,7	3,3±0,4
HI-6	0,9±0,6	0,8±0,3	6,2±0,6	1,7±0,1	13,6±0,2	17,9±0,4	0,7±0,1	1,4±0,1
K027	15,2±0,6	7,8±0,5	48,0±0,5	20,8±1,0	55,6±0,7	33,9±0,3	5,7±0,3	2,1±0,1
K048	27,4±1,1	10,0±0,6	25,7±0,7	12,5±0,2	54,4±0,9	29,1±0,4	3,8±0,1	1,4±0,1
K203	48,1±1,5	21,2±0,3	39,3±0,4	13,1±0,4	55,9±0,5	41,1±0,1	4,4±0,1	2,1±0,4

^azástupce NPL; ^bzástupce ethyl substituovaných OF pesticidů; ^czástupce methyl substituovaných OF pesticidů; ^dzástupce isopropyl substituovaných OF pesticidů

K antikonvulzivní terapii se přistupuje z důvodu potřeby zabránit záchvatům v CNS vedoucím k tonicko-klonickým křečím a poškození CNS. Lékem volby v této oblasti je diazepam v dávce 10 mg i.m [73, 75].

2.4.2 Reverzibilní inhibitory

Reverzibilní inhibitory se používají v lékařství k terapii onemocnění, kde je potřeba docílit zvýšené nabídky ACh v synapsích v CNS nebo na periférii.

AD je příkladem takového onemocnění. Je to progresivní neurodegenerativní onemocnění způsobující závažné ztráty paměti, změny chování a poruchy řeči. AD je spojena se změnami jako agregace β -amyloidních plaků v CNS, výskytem vláken tau-proteinu, chronickým zánětem a v neposlední řadě ztrátou neuronů v kůře a subkortikálních regionech spojenou se ztrátou aktivity ACh a atrofií postižených oblastí [82-84].

MG je poměrně vzácné autoimunitní onemocnění, postihující postsynaptickou membránu neurosvalové ploténky. Klinicky se tato choroba manifestuje jako slabost kosterního svalstva. Počáteční symptomy jsou ptóza horních očních víček, doprovázená diplopií a rozostřeným viděním, případně potíže při polykání [85-87].

2.4.2.1 Inhibitory vážící se na aktivní místo

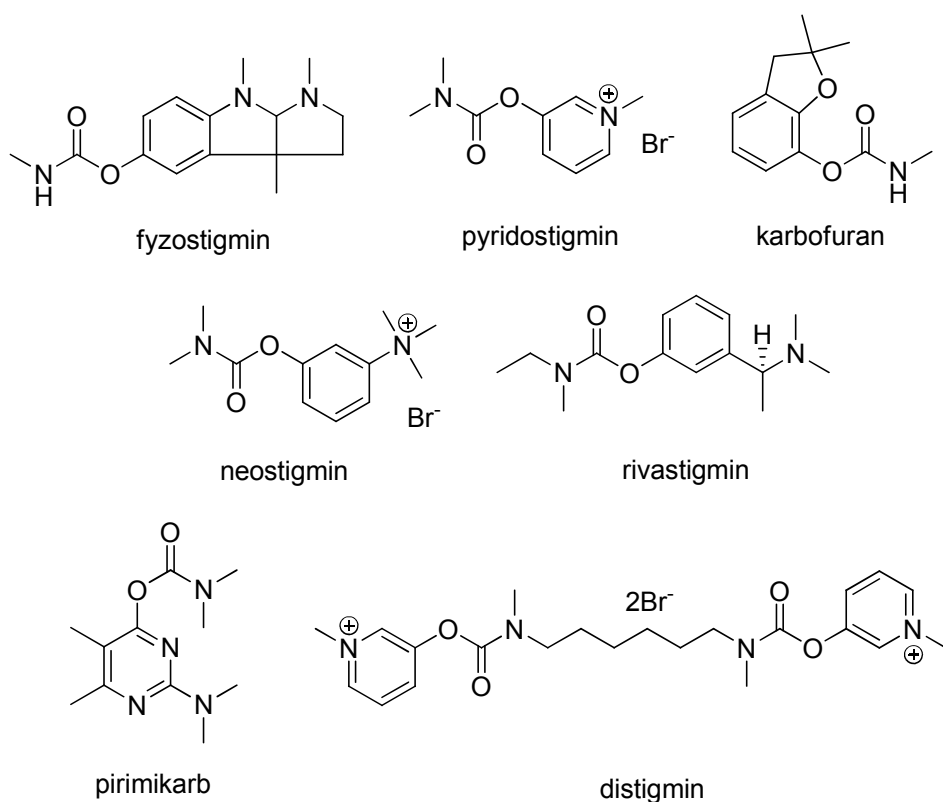
Karbamáty jsou skupinou inhibitorů s podobným mechanismem účinku jako OFI. Chemicky se jedná *N*-alkyl případně *N,N*-dialkylkarbamáty (Obr. 12). Karbamáty podobně jako OFI se řadí mezi acylující inhibitory, rozdíl mezi nimi spočívá ve způsobu acylace. Karbamáty karbamoylují serinový hydroxyl aktivního centra AChE. Tento mechanismus inhibice se často nazývá pseudoireverzibilní vzhledem k tomu, že se podobně jako v případě OFI, vytváří kovalentní vazbou tvořený komplex enzym-inhibitor, ale komplex podléhá spontánní hydrolýze během několika minut nebo hodin. Poločas hydrolýzy tohoto komplexu se pohybuje v relativně širokém spektru a závisí na substituci atomu dusíku. *N*-nesubstituované karbamáty fungují jako přímá cholinomimetika. Poločas hydrolýzy komplexu enzym-inhibitor se prodlužuje s rostoucí délkou alkylu a od *N*-monosubstituovaných k *N,N* disubstituovaným derivátům. Některé karbamáty mají pak inhibiční vlastnosti srovnatelné s OFI. Nukleofilní sloučeniny jako oximy však příliš neurychlují dekarbamoylaci [88-90].

Použití karbamátových inhibitorů je relativně široké. V přírodě vyskytující se alkaloid fysostigmin (eserin) je sekundárním metabolitem puchýřnatce jedovatého (*Physostigma venenosum*). Syntetický karbamát pyridostigmin (používaný ve formě

bromidu) vzhledem k přítomnosti kvartérního dusíku neprochází hematoencefalickou bariérou. Je světově nejpoužívanějším léčivem pro terapii myasthenia gravis [91]. Současně se jedná o nejrozšířenější reverzibilní inhibitor používaný k profylaxi otrav OFI [92]. Další syntetický karbamát neostigmin (bromid nebo methylsulfát) se liší od pyridostigminu v rychlejším nástupu účinku a kratším plazmatickém poločase. Distigmin dibromid je zdvojenou variantou inhibitoru karbamátového typu s výhodou prolongovaného působení [87].

Rivastigmin se vzhledem k dobrému prostupu používá pro terapii lehkých až středně závažných stádií AD. Podání je možné orální i transdermální cestou. Velkou výhodou podávání rivastigminu je fakt, že není metabolizován pomocí CYP 450, čímž se výrazně snižuje riziko potenciálních lékových interakcí [93].

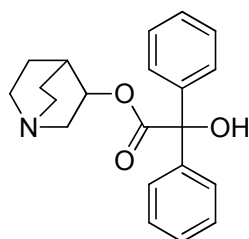
Karbofuran je jedním z nejtoxičtějších karbamátových pesticidů (hodnota orální LD₅₀ pro savce se pohybuje v rozmezí 8-20 mg.kg⁻¹). Navzdory tomu, že od roku 2009 platí nulová tolerance jakéhokoliv množství karbofuranu v potravinách, přetrvávají ekologické problémy s dopady karbofuranu především na ptačí populaci. Dalším poměrně hojně používaným karbamátovým pesticidem používaným především k hubení mšic je pirimikarb [94].



Obrázek 12. Příklady struktury karbamátových inhibitorů acetylcholinesterasy

Další skupina interagující přímo s aktivním místem ChE jsou látky odlišné od acylujících inhibitorů jak strukturními prvky, tak mechanismem inhibice. Všechny neacylující inhibitory interagují s ChE podstatně rychleji než acylující. Rovnovážného stavu je obvykle dosaženo během několika milisekund. Tyto inhibitory nereagují se serinem aktivního místa, ale váží se na tzv. ***α-anionické místo*** aktivního místa. Typickým zástupcem této skupiny je 9-amino-1,2,3,4,-tetrahydroakridin známý jako takrin. Objev takrinu se stal milníkem v terapii AD. Pro své lipofilní vlastnosti dobře proniká přes hematoencefalickou bariéru do CNS, kde po inhibici AChE snižuje rychlost degradace ACh a zlepšuje cholinergní přenos. Na trhu byl takrin známý pod obchodní značkou Cognex[®]. Později byl pro svou hepatotoxicitu stažen z používání [83, 95, 96].

Jistou alternativou takrinu se zdá být jeho 7-methoxy derivát označovaný jako 7-MEOTA. Jedná se o původní českou látku vyvinutou proti psychicky zneschopňujícím látkám typu anticholinergik (např. BZ-látka; 3-chinuklidinyl-benzilát; Obr. 13). Tento inhibitor má zachované anticholinesterasové vlastnosti a má potlačenou hepatototoxicitu, nicméně neprošel řádným klinickým řízením a není schválen pro civilní použití [97-99].



3-chinuklidinyl-benzilát

Obrázek 13. Struktura anticholinergika 3-chinuklidinyl-benzilátu

Alkaloid získaný z cibulí některých druhů sněženek (*Galanthus woronovii*, *Galanthus caucasicus*) galantamin je moderním léčivem používaným k terapii AD. Mechanismus inhibice je podobně jako u takrinu vazba na anionické místo aktivního místa. Kromě toho se galantamin váže s různou afinitou i na jiná místa AChE a je alosterickým modulátorem nAChR, což je pro terapii AD přínosné [100, 101].

Stejný mechanismus inhibice AChE, tedy vazba na anionické místo, byl prokázán u celé řady isochinolinových alkaloidů (berberin, palmatin, jatrorrhizin, epiberberine) [102].

Poněkud odlišný mechanismus inhibice mají sloučeniny vážící se na **aromatické hrdlo**. Strukturně se obvykle jedná o biskvartérní sloučeniny schopné interakce s funkčními skupinami aromatických aminokyselin. Krystalografické studie prokázaly, že depolarizující svalová relaxancia (dekamethonium, sukcinylcholin) inhibují AChE právě tímto mechanismem, přestože jejich terapeutické působení je především na postsynaptické membráně nervosvalové ploténky. Galantamin může být také příkladem inhibitoru vážícího se jak na α -anionické místo, tak na aromatické hrdlo [103].

Významnou skupinu tvoří inhibitory interagující s **periferním anionickým místem** (PAM). Kinetickými studiemi bylo prokázáno, že během své hydrolýzy pomocí AChE se substrát váže na PAM i na α -anionické místo. Proto lze inhibicí PAM zabránit hydrolýze substrátu a tím inhibici AChE. Kromě toho dochází k inhibici AChE i nepřímo cestou konformačních změn v molekule AChE, změnou rozložení náboje nebo elektrostatickým či sterickým bráněním vstupu substrátu do kavity aktivního místa. V případě, že se substrát i inhibitor mohou vázat na obě anionická místa, mohou vznikat komplexy enzymu, substrátu a inhibitoru: ES, SE, SES, EI, IE, IEI, IES a SEI [44, 59].

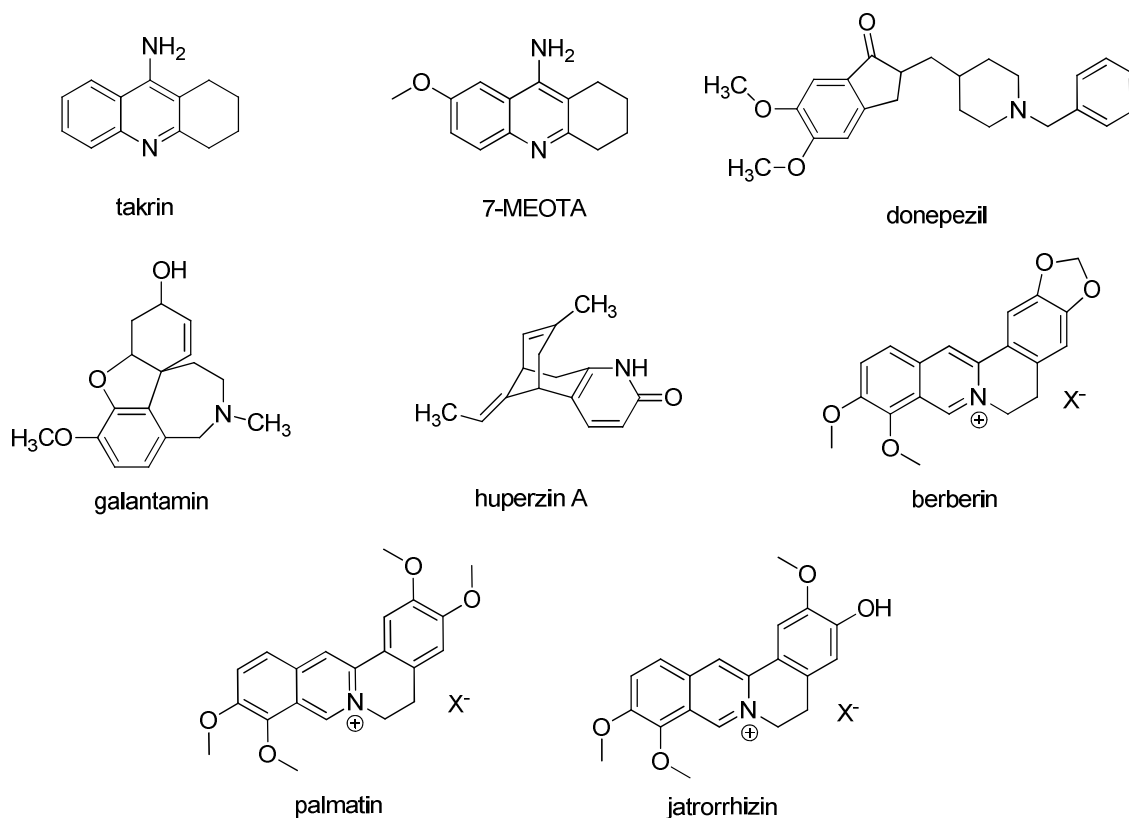
PAM je cílem celé řady farmakologicky a toxikologicky působících sloučenin a bylo studováno především ve spojitosti s AD. Nedostatek ACh je hlavním faktorem považovaným za příčinu symptomů AD. Ukládání plaků β -amyloidu je potenciálně spouštěno interakcí volného amyloidu s PAM. Proto jsou inhibitory PAM považovány za symptomatická i kauzální léčiva [104].

PAM je cílem celé řady inhibitorů zaměřených na symptomatickou terapii AD. Následkem je tedy nejen zvýšení nabídky ACh, ale i zpomalení ukládání amyloidových plaků. Inhibitory interagující s PAM však mají za následek zvýšení exprese genů kódujících AChE. To vede ke snížení účinnosti léčby [105].

Nejdůležitějšími zástupci jsou sloučeniny huperzin A, huperzin B a donepezil. Huperzin A je efektivnějším inhibitorem z obou alkaloidů získaných z plavuně *Huperzia serrata* (*Lycopodiaceae*). Inhibiční vlastnosti huperzinu se vyznačují značnou selektivitou vůči AChE [106]. Role BuChE v progresi onemocnění nebyla

dosud plně objasněna. Studie naznačují, že BuChE je v některých případech schopna do jisté míry suplovat roli AChE [107, 108]. Vzhledem k těmto zjištěním není jisté, zda je možné selektivitu inhibitorů jako huperzin A považovat za výhodnou pro terapii AD. V současné době není huperzin A součástí žádného léčivého přípravku používaného v Evropě, nicméně již je používán pro symptomatickou terapii AD v Asii a v USA je ve fázi klinického testování [109, 110].

Donepezil je částečně selektivním syntetickým inhibitorem používaným v terapii AD s dobrou prostupností hematoencefalickou bariérou. V současnosti je na trhu v podobě přípravku Aricept® [111, 112]. Hodnoty IC_{50} a případné selektivity pro AChE léčiv používaných na terapii AD jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 14. Příkladů struktury inhibitorů acetylcholinesterasy interagujících s aktivním místem

Tabulka 3. Srovnání hodnot IC_{50} komerčně dostupných inhibitorů pro terapii AD

inhibitor	hAChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	hBChE $IC_{50} \pm SD$ (μM)	SI hBChE/hAChE
takrin	$0,6 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,02$	0,1
7-MEOTA	$8,2 \pm 0,7$	33 ± 3	4
fyzostigmin	$0,009 \pm 0,001$	$0,020 \pm 0,006$	2
memantin	a	a	---
donepezil	$0,01 \pm 0,0006$	$18,3 \pm 0,8$	1830

galantamin	1,40±0,09	7,3±0,3	5
rivastigmin	21±4	10,6±0,1	0,5
huperzin A	0,0001±0,00002	a	pro hAChE

a- Žádná inhibice při zvoleném koncentračním rozmezí

2.5 Metody stanovení aktivity cholinesteras

Přesné stanovení aktivity AChE a BuChE se stalo významným nástrojem na poli vývoje a výzkumu nových léčiv. V průběhu posledních několika desítek let byla vyvinuta široká paleta metod pro tato stanovení. Tyto metody jsou založeny na specifických vlastnostech přirozených nebo umělých substrátů pro ChE. V současné době se nejčastěji využívají následující obecné přístupy pro kvantifikaci produktů nebo substrátů enzymatického štěpení: titrimetrický, radioisotopický, fluorimetrický a fotometrický.

2.5.1 Titrimetrická stanovení

Titrimetrie pro stanovení aktivity ChE je založena na hydrolýze ACh poskytující cholin a kyselinu octovou. Změna pH je detekována pomocí vhodně zvolené elektrody a celá směs je titrována odměrným roztokem báze tak aby $\Delta \text{pH} = 0$. V minulosti bylo stanovení prováděno tak, že enzymatická reakce byla po stanoveném čase zastavena nadbytkem inhibitoru a směs titrována na původní hodnotu pH. V současné době je celá metoda automatizována [113]. Velkým přínosem bylo zavedení selektivních elektrod na bázi polymerních membrán schopných selektivně sledovat úbytek ACh ve vzorku [114].

Jedná se o rychlou, jednoduchou a nenákladnou metodiku bez velkých požadavků na vybavení laboratoře. Výhodou titrimetrických stanovení je možnost sledování aktivity ChE v tkáňových homogenátech [115].

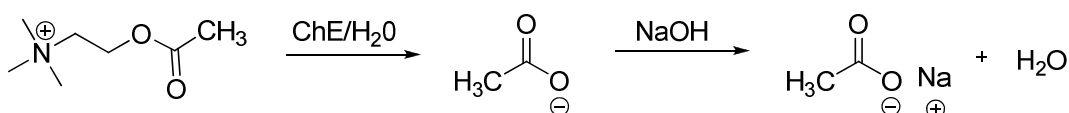


Schéma 2. Princip titrimetrického stanovení aktivity cholinesteras

2.5.2 Radioisotopická stanovení

Radiometrická stanovení jsou založena na měření radioaktivity ^3H nebo ^{14}C značeného ACh. Obvykle se jednotlivé postupy liší pouze v detailech jako např. zda jde o kvantifikaci značeného ACh nebo uvolněné kyseliny octové. Většina studií využívajících radiometrii pro stanovení aktivity ChE vychází z původní práce Johnsona a Russela. Jedná se o kvantifikaci ^3H značeného acetátu, který je z roztoku vytřepán do organického rozpouštědla (toluen+isoamylalkohol 5:1) [116].

Velkou výhodou radioisotopického stanovení je možnost stanovit velmi nízké aktivity ChE [117].

2.5.3 Fluorimetrická stanovení

Princip těchto stanovení je založen na vzniku fluorescenčního produktu. Takové stanovení je možné tehdy, pokud je použito substrátu, který po hydrolyze poskytuje již fluorescenční produkt, jako je tomu např. v případě 7-acetoxy-1-methylchinolinia, jež po hydrolyze poskytuje vysoce fluorescenční 7-hydroxy-1-methylchinolinium (schéma 3.). Tento substrát je však štěpen AChE jen ve velmi nízké míře a tato metoda je vhodná pouze ke stanovení celkové aktivity ChE ve vzorku nebo ke stanovení BuChE, která tento substrát štěpí velmi dobře [118].

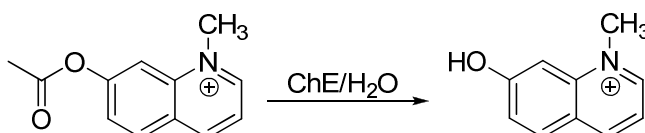


Schéma 3. Schéma stanovení aktivity ChE využívající 7-acetoxy-1-methylchinolinium

Pro stanovení aktivity AChE je třeba použít substrát, který je AChE štěpen bez problémů. Taková metoda byla navržena a využívá oxidace cholinu na kyselinu cholinovou pomocí oxidas. Peroxid vodíku vznikající při této oxidaci dále reaguje za přítomnosti peroxidasy s luminolem za vzniku fluorescenčního produktu (schéma) [119].

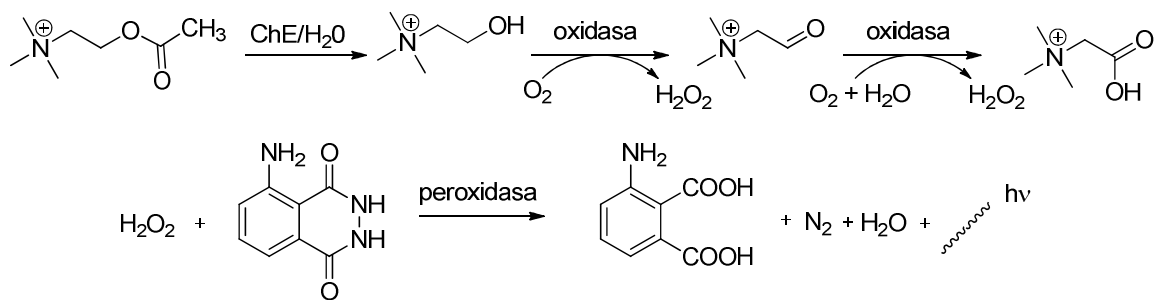


Schéma 4. Schéma fluorescenčního stanovení ChE využívající ACh jako substrát a systém oxidasy a peroxidasy vedoucí k tvorbě chemiluminiscenčního produktu.

2.5.4 Fotometrická stanovení

Jedná se o taková stanovení, která vedou k produktům schopným interakce s viditelným světlem. V současnosti nejpoužívanější metodou pro stanovení aktivity ChE je fotometrie dle Ellmana. Tato metoda využívá umělý substrát acetylthiocholin pro stanovení aktivity AChE a butyrylthiocholin pro stanovení BuChE. Hydrolytický produkt vzniklý štěpením těchto substrátů je příslušná kyselina a thiocholin, ten dále reaguje s 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou) (DTNB) kyselinou za vzniku směsného disulfidu a 3-karboxy-4-nitrobenzothiolát (TNB⁻). TNB⁻ má ostré absorpční maximum při 412 nm [120].

Při stanovení aktivity v přítomnosti oximových reaktivátorů dochází k neenzymatickému štěpení esterové vazby ATCh (tzv. oximolýza) a tedy ke zdánlivému zvýšení aktivity enzymu. Proto nemůže být Ellmanova metoda nekriticky přijímána jako univerzální nástroj pro hodnocení reaktivátorů především při vysokých koncentracích, kdy je rychlost oximolýzy vyšší než rychlost enzymatického štěpení ATCh. Proto je také nezbytné stanovení rychlosti oximolýzy při stanovení reaktivační účinnosti oximů [121].

Ellmanova metoda byla upravena pro stanovení aktivity AChE v plné krvi. Vlnová délka byla změněna na 436 nm s cílem omezit interferenci hemoglobinu. Při 436 nm absorbance hemoglobinu dosahuje 25 % svého maxima, zatímco absorbance TNB⁻ je redukována pouze na 80 % svého maxima. To umožňuje stanovení aktivity vzorků o vyšších koncentracích za podmínek, kdy mohly být stanoveny pouze velmi zředěné vzorky. Aktivita AChE v plné krvi je stanovena za přítomnosti BuChE selektivního inhibitoru ethopropazinu [122].

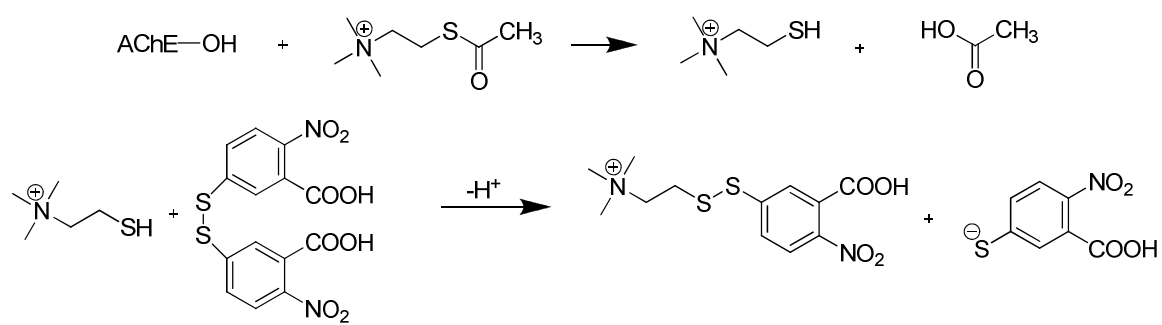


Schéma 5. Princip stanovení aktivity AChE dle Ellmana

3 Cíl práce

V rámci řešení této práce byla otestována řada sérií sloučenin s předpokládanou schopností ovlivňovat aktivitu cholinesteras. Jednalo se o dvě základní skupiny modulátorů: první skupinou byly oximové reaktivátory cholinesteras, druhá skupina byla relativně heterogenní skupina látek s potenciálem reverzibilně inhibovat cholinesterasy.

3.1 Hodnocení účinnosti reaktivátorů acetylcholinesterasy

V případě reaktivátorů byly nové sloučeniny testovány na reaktivační schopnost proti čtyřem OFI inhibovanými AChE. Jako zástupce NPL byl vybrán tabun s ohledem na fakt, že jím inhibovaná AChE patří k nejobtížněji reaktivovatelným. Jako zástupci OF pesticidů byly vybrány methyl-paraoxon (reprezentující skupinu methyl substituovaných OF pesticidů), ethyl-paraoxon (reprezentující skupinu ethyl substituovaných OF pesticidů) a DFP (reprezentující skupinu isopropyl substituovaných OF pesticidů). Takto vybrané inhibitory pokrývají základní škálu OFI. Reaktivační schopnost nových potenciálních reaktivátorů byla testována proti těmto OFI s cílem nalézt reaktivátor, který by bylo možné označit za širokospektrý. Reaktivátory schopné reaktivace inhibované BuChE mohou být použity pro konstrukci pseudokatalytických scavangerů OFI.

Testované sloučeniny pocházely jako standardy z Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Výsledky schopnosti reaktivovat jednotlivými OFI inhibovanou AChE, případně BuChE byly následně vyhodnoceny a porovnány se standardními a komerčně dostupnými reaktivátory. Dále byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem, které mohou být v budoucnu použity při designu nových reaktivátorů.

3.2 Hodnocení účinnosti inhibitorů acetylcholinesterasy

Inhibitory testované při řešení této práce je možné rozdělit na sloučeniny zamýšlené pro inhibici AChE na periférii a na inhibitory s velkým podílem prostupu

přes hematoencefalickou bariéru. Reverzibilní inhibitory jsou využitelné k profylaxi otrav OFI cestou ochránění molekuly AChE před působením OFI. Periferně působící inhibitory jsou potenciální léčiva pro symptomatickou terapii MG. Inhibitory schopné prostupovat ve větší míře do CNS jsou kandidáty na symptomatickou terapii AD.

Periferně působící inhibitory byly převážně biskvartérní sloučeniny s rozdílným spojovacím řetězcem. V případě centrálně působících inhibitorů se jednalo o deriváty známých sloučenin takrinu a jeho méně toxického derivátu 7-MEOTA. Použití inhibitorů AChE v terapii s sebou nese celou řadu nežádoucích účinků spojených se samotným mechanismem působení inhibitorů. Hledání nových sloučenin s minimem těchto nežádoucích účinků je proto aktuálním úkolem mnoha vědeckých pracovišť po celém světě. Všechny inhibitory byly otestovány na schopnost inhibovat AChE a BuChE *in vitro*. Výsledky byly porovnány se standardními kvartérními i centrálně působícími inhibitory. Po vyhodnocení výsledků byly navrženy vztahy mezi strukturou a účinkem, které mohou být využity při hledání inhibitorů s dobrou inhibiční aktivitou a minimem nežádoucích účinků.

4 Komentář dosažených výsledků a jejich diskuse

Většina dosažených výsledků byla úspěšně publikována v zahraničních odborných recenzovaných časopisech. Tyto výsledky nebudou pro přehlednost uvedeny v této kapitole v plném rozsahu. Podrobnosti týkající se výsledků je možno dohledat v článcích přiložených k této práci. Dosažené výsledky byly prezentovány i na konferencích formou plakátových sdělení a přednášek. Úplný přehled výstupů je uveden v kapitole 8.

4.1 In vitro testování

V první fázi bylo nutné vyvinout *in vitro* metodu hodnocení schopnosti sloučenin ovlivňovat aktivitu AChE, případně BuChE. Část výsledků byla dosažena za použití titrimetrické metody za použití homogenátu mozku laboratorního potkana [123]. Tato metoda však neumožňovala paralelní hodnocení několika vzorků a bylo tedy nutné hledat novou metodiku.

Ellmanova fotometrie byla upravena pro potřeby vícekanálového spektrometru Sunrise (Tecan, Rakousko). Poprvé byla tato metoda popsána v článku publikovaném v roce 2010 [124]. K hodnocení kinetických parametrů inhibitorů byla použita metoda dle Hanese a Woolfa [125].

Podstatným argumentem pro zavedení nové techniky byla možnost použít lidskou rekombinantní nebo erytrocytální AChE. Výsledky získané s použitím jiné AChE než lidské (v tomto případě potkaní) nemusí korespondovat účinností sloučenin na lidskou AChE. Zdrojem BuChE byla lidská plazma. Všechny enzymy byly pořizovány v purifikované formě od firmy Sigma-Aldrich.

Sloučeniny byly většinou testovány v koncentračním rozmezí (10 μM – 1000 μM). Pro další vývoj se jeví jako perspektivní sloučeniny dosahující dostatečné aktivity v koncentraci nižší než 100 μM , která je obvykle dosažitelná v plasmě při klinickém použití reaktivátorů AChE [126].

Účinnost nově připravených sloučenin byla vždy srovnávána s komerčně dostupnými reaktivátory (pralidoxim, obidoxim, methoxim, trimedoxim a asoxim)

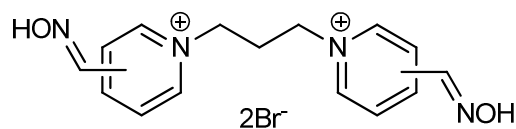
a reaktivátory dříve připravenými na KTOX FVZ UO, které jsou považovány za standardní (K027, K048, K074, K075 a K203).

4.2 Vztah mezi strukturou a účinností reaktivátorů acetylcholinesterasy

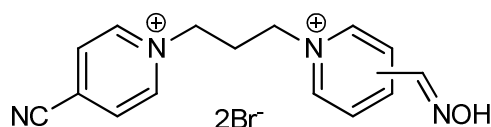
Tato práce navazuje na výsledky získané v rámci řešení diplomové práce (Přílohy 2 – 6). Pro lepší pochopení vztahů mezi strukturou a účinností reaktivátorů AChE jsou zde tyto výsledky rovněž uvedeny.

V první fázi byly testovány komerčně dostupné reaktivátory (pralidoxim, trimedoxim, obidoxim, asoxim a methoxim) a standardní reaktivátory připravené na KTOX FVZ UO (K027, K048, K074, K075 a K203) s cílem porovnat jejich účinnost proti paraoxonem inhibované AChE. Testování reaktivací aktivity proběhlo s použitím titrimetrického stanovení aktivity AChE s použitím homogenátu mozku laboratorního potkana jako zdroje enzymu. Koncentrace reaktivátorů byly zvoleny 1000 μM a 10 μM . S ohledem na fakt, že komerčně dostupné reaktivátory nebyly designovány proti OF pesticidům, ale NPL, všechny nově připravené sloučeniny překonaly světově nejpoužívanější reaktivátor pralidoxim a vyrovnaly se účinností reaktivovat OF pesticidy inhibovanou AChE trimedoximu a obidoximu. **(Příloha 1)**

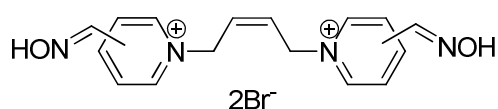
V další fázi pak bylo testováno několik sérií biskvartérních sloučenin. Bylo testováno 6 potenciálních symetrických a asymetrických bisoximových reaktivátorů s propan-1,3-diolovým spojovacím řetězcem. Byl použit standardní *in vitro* test používající homogenát mozku laboratorního potkana jako zdroj AChE. Výsledky byly porovnány s komerčně dostupnými reaktivátory (pralidoxim, asoxim a obidoxim). Tříuhlíkatý spojovací řetězec se ukázal jako výhodný pro reaktivaci paraoxonem inhibované AChE a některé nové reaktivátory vykazovaly lepší reaktivaci *in vitro* při obou koncentracích (1000 μM a 10 μM). Nejvýhodnější se ukázala poloha oximových skupin 4,4' (trimedoxim). Z dalších reaktivátorů dosáhla nejlepších výsledků molekula s oximem v poloze 3,4'. Z výsledků vyplývá, že esenciální je přítomnost oximu v poloze 4. **(Příloha 2)**



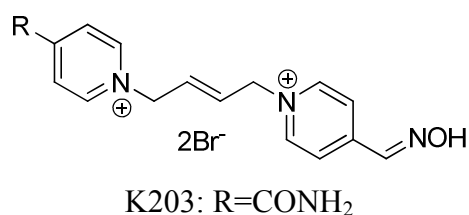
Jedna z oximových skupin byla později nahrazena kyano skupinou v poloze 4 pyridiniového jádra. Byl použit standardní *in vitro* test reaktivační aktivity používající homogenát mozku laboratorního potkana jako zdroj AChE a koncentrace reaktivátorů byly zvoleny 1000 μM a 10 μM . Pouze nový reaktivátor s oximovou skupinou v poloze 4 se vyrovnal svou účinností proti OF pesticidy inhibované AChE standardním a komerčně dostupným reaktivátorům (pralidoxim, obidoxim, asoxim, K027 a K048) s tím, že překonal komerčně dostupné reaktivátory pralidoxim a asoxim při koncentraci 10 μM . Výsledky získané při této koncentraci jsou hodnotnější vzhledem k dalšímu testování. Obecně lze říci, že sloučeniny obsahující ve své molekule kyano skupinu nejsou vhodné pro reaktivaci OFI inhibované AChE (**Příloha 3**)



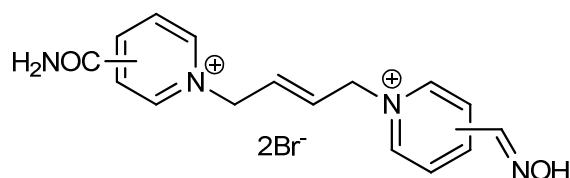
V další fázi byla obměněna struktura spojovacího řetězce. Byla testována série bisoximových symetrických a asymetrických reaktivátorů s *Z*-but-2-en-1,4-diolovým spojovacím řetězcem. Byl použit standardní *in vitro* test reaktivační aktivity používající homogenát mozku laboratorního potkana jako zdroj AChE a koncentrace reaktivátorů byly zvoleny 1000 μM a 10 μM . Výsledky byly porovnány se standardy: pralidoxim, obidoxim, asoxim a K075. Nejlepších výsledků bylo dosaženo podobně jako v předchozím případě se sloučeninami, které mají oximovou skupinu v poloze 4. Nejlepších výsledků dosáhl symetrický reaktivátor s oximovou substitucí v poloze 4,4'. V porovnání se standardními a komerčně dostupnými reaktivátory dosáhl 4,4' substituovaný srovnatelných výsledků jako standardní reaktivátor K075. Ostatní nově testované sloučeniny překonaly pralidoxim a asoxim při koncentraci 10 μM , ale obidoxim a K075 dosáhly lepších výsledků. (**Příloha 4**)



V návaznosti na předchozí studii byla testována série monooximových reaktivátorů s *E*-but-2-en-1,4-diylovým spojovacím řetězcem. Vzhledem k předchozím výsledkům byla zvolena poloha substituentů 4,4'. Byl použit standardní *in vitro* test reaktivační aktivity používající homogenát mozku laboratorního potkana jako zdroj AChE a koncentrace reaktivátorů byly zvoleny 1000 μM a 10 μM . Výsledky byly porovnány se standardy pralidoximem, obidoximem, asoximem, K075 a K203. Ve srovnání s výsledky dosaženými u látek s *Z*-but-2-en-1,4-diylovým spojovacím řetězcem dosáhly látky testované v této studii vyšší účinnosti proti OFI inhibované AChE *in vitro*. Nové monooximové reaktivátory byly testovány s cílem navázat na předchozí práci, zejména na dobré výsledky reaktivátoru K203 schopného účinně reaktivovat tabunem inhibovanou AChE [127]. Výsledky a následná SAR diskuze ukázaly významnou roli neoximové substituce na reaktivační účinnost. (**Příloha 5**)

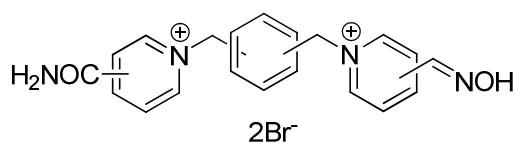


Deriváty úspěšné sloučeniny K203 byly testovány i v následující studii. Jednalo se o sérii monooximových monokarbamoylovaných reaktivátorů s *E*-but-2-en-1,4-diylovým spojovacím řetězcem. Pro hodnocení reaktivační účinnosti byl použit *in vitro* test s použitím homogenátu mozku laboratorního potkana jako zdroje enzymu. Výsledky pak byly porovnány s komerčně dostupnými (pralidoxim, obidoxim a asoxim) a standardními reaktivátory (K048 a K075). Ze všech sloučenin testovaných v této práci dosáhla látka K203 nejlepších výsledků proti tabunem inhibované AChE při obou koncentracích. Pouze sloučenina K075 dosáhla podobné reaktivační účinnosti při koncentraci 10 μM . Proti pesticidem paraoxonem inhibovanou AChE dosáhla sloučenina K203 a její polohový izomer K206 reaktivační účinnosti srovnatelné se standardy a komerčně dostupnými sloučeninami. Navíc pro koncentraci 10 μM dosáhla sloučenina K206 nejlepších výsledků ze všech reaktivátorů v této práci. (**Příloha 6**)

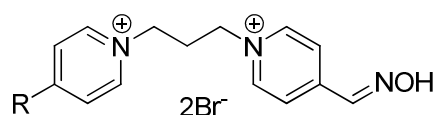


Strukturně aktivitní závislosti pro reaktivaci paraoxonem inhibované AChE byly navrženy v následující studii. Studie zahrnuje sloučeniny uvedené ve výše uvedených článcích a několik sérií sloučenin, které zde uvedeny nebyly. Bylo potvrzeno, že nejvyšší účinnosti dosahují biskvartérní sloučeniny obsahující 3 nebo 4 atomy uhlíku ve spojovacím řetězci a minimálně jednou aldoximovou skupinou obvykle v poloze 4 pyridiniového jádra. (**Příloha 7**)

V návaznosti na dobrou reaktivační účinnost reaktivátorů s xylenovým spojovacím řetězcem a monooximového monokarbamoylového reaktivátoru K203 byla testována série potenciálních monooximových monokarbamoylových reaktivátorů s xylenovým spojovacím řetězcem. Sloučeniny byly testovány proti tabunem, paraoxonem, methyl-paraoxonem a DFP inhibované AChE. Pro hodnocení reaktivační účinnosti byla zvolena *in vitro* metoda odvozená od fotometrie dle Ellmana upravená pro použití vícekanálového spektrofotometru. Jako enzym byla použita lidská erytrocytální AChE. Výsledky byly porovnány s výsledky komerčně dostupných (pralidoxim, obidoxim, methoxim, trimedoxim) a standardních reaktivátorů (K107, K108, K203). Jako pozitivní kontroly byly použity také dva reaktivátory s xylenovým spojovacím řetězcem (K107 a K108) úspěšné v předchozích studiích [123, 128]. Žádná ze sloučenin testovaných v této studii nepřekonala sloučeninu K203 proti tabunem inhibované AChE. Většina nových reaktivátorů nepřekonala 10% hranici zaručující život zachraňující reaktivaci *in vivo* v případě pesticidy inhibované AChE. Nejslibnější sloučeninou pro podání při otravách OF pesticidy byl 3,3' substituovaný reaktivátor s *o*-xylenovým spojovacím řetězcem, který dosáhl dostatečné reaktivační účinnosti proti paraoxonu a methyl-paraoxonu. Ani jedna z nově testovaných sloučenin nepřesáhla 10% hranici reaktivace v případě DFP inhibované AChE. (**Příloha 8**)



S cílem lépe porozumět vlivu neoximové substituce na reaktivační účinnost vznikla následující studie. Série nesymetrických biskvartérních monooximových reaktivátorů s propan-1,3-diylovým spojovacím řetězcem byla testována proti tabunu, paraoxonu, methylparaoxonu a DFP. Použita byla metoda fotometrie dle Ellmana upravená pro potřeby vícekanálového spektrofotometru. Použitý enzym byla lidská rekombinantní AChE. Výsledky nově testovaných sloučenin byly porovnány s komerčně dostupnými a standardními reaktivátory. Žádný z nových reaktivátorů nepřekonal K203 ani při jedné koncentraci ve schopnosti reaktivovat tabunem inhibovanou AChE. Reaktivátor s amidoximovým substituentem byl nejlepším reaktivátorem pro paraoxonem inhibovanou AChE. Současně tento reaktivátor dosáhl nejlepších výsledků proti methyl-paraoxonem inhibované AChE, nicméně nedosáhl takové reaktivační účinnosti jako např. trimedoxim. DFP inhibovaná AChE je nejobtížněji reaktivovatelnou sloučeninami uvedenými v této práci. Pouze tři nové reaktivátory překonaly 10% reaktivaci *in vitro*, z čehož methyl substituovaný reaktivátor dosáhl dostatečné reaktivity při obou koncentracích. V práci jsou rovněž uvedeny hodnoty IC₅₀ pro lidskou AChE vybraných sloučenin (**Příloha 9**)



SAR studie proti paraoxonem inhibované AChE byla provedena. Byla sledována závislost mezi strukturou a účinností u tří sérií monooximových reaktivátorů s propanovým, butanovým a *E*-but-2-en-1,4-diylovým spojovacím řetězcem. Výsledky reaktivity *in vitro* byly porovnány se známými reaktivátory. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u reaktivátorů s propan-1,3-diylovým spojovacím řetězcem. Zavedení *E*-but-2-en-1,4-diylového spojovacího řetězce vedlo ke zvýšení reaktivační účinnosti při nižší screeningové koncentraci. Byl určen vliv různých neoximových hydrofilních a lipofilních substituentů pyridiniového jádra stejně jako záměna pyridinia jiným heterocyklickým uspořádáním. (**Příloha 10**)

Poznatky získané během testování reaktivační OF pesticidy inhibované AChE účinnosti byly shrnuty v přehledové kapitole monografie *Pesticides in the Modern World – Effects of Pesticides Exposure*. (**Příloha 11**)

V rámci zahraniční spolupráce byly některé úspěšné reaktivátory testovány na reaktivační účinnost proti paraoxonem a tabunem inhibované BuChE s cílem navrhnout vhodný pseudokatalytický bioscavenger. Nejperspektivnějším reaktivátorem se pro tento účel jeví sloučenina K117. (**Příloha 12**)

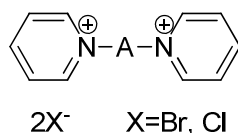
4.2.1 Dosud nepublikované výsledky

Některé výsledky dosud nebyly publikovány, jsou uvedeny a diskutovány v přílohách práce. Podrobnosti týkající se dosud nepublikovaných výsledků je možno dohledat v **příloze 13**.

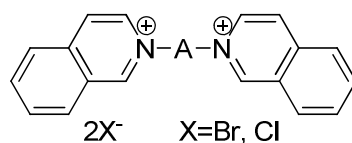
±

4.3 Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních inhibitorů cholinesteras

Výchozím bodem pro syntézu nových biskvartérních inhibitorů AChE byla práce publikovaná v roce 2010. V této práci bylo testováno 20 nových bispyridiniových sloučenin s potenciálem inhibovat lidskou AChE a BuChE jako potenciálních léčiv MG. Strukturně se jednalo o bispyridiniové sloučeniny s různě dlouhým alifatickým, nenasyčeným nebo aromatickým spojovacím řetězcem. Pro testování inhibiční aktivity byla použita Ellmanova metoda modifikovaná pro vícekanálový spektrofotometr. Enzymy použité v této studii byla lidská erytrocytální AChE a lidská sérová BuChE. Výsledky byly porovnány s používanými karbamátovými inhibitory pyridostigminem a neostigminem. Několik sloučenin dosáhlo řádově stejné inhibiční účinnosti jako standardní inhibitory. Nejlepších výsledků dosáhly sloučeniny s alifatickým spojovacím řetězcem (CH₂)₈₋₁₁ a naftalenovým spojovacím řetězcem. Nově testované inhibitory nevykazovaly zvýšenou selektivitu vůči AChE. Pomocí kinetického stanovení dle Hanese a Woolfa u dvou slibných sloučenin byl potvrzen nekompetitivní mechanismus účinku. (**Příloha 14**)

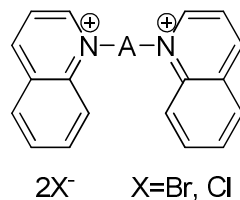


Dalším krokem byla obměna heterocyklické části molekuly. V následující práci byla testována série biskvartérních inhibitorů, kde byl pyridin nahrazen isochinolinem. Výsledky IC_{50} proti lidské AChE a BuChE nových bisisochinoliniových inhibitorů s odlišnými spojovacími řetězci byly porovnány se standardními inhibitory ambenoniem, edrofoniem a látkou BW284c5. Pro úplnost byl mezi standardy zařazen i BuChE selektivní inhibitor ethopropazin. Pro testování inhibiční aktivity byla použita Ellmanova metoda modifikovaná pro vícekanálový spektrofotometr. Enzymy použité v této studii byla lidská rekombinantní AChE a lidská sérová BuChE. Několik látek se ukázalo být řádově stejně účinnými inhibitory jako edrofonium. Žádná z nových látek nepřekonalala inhibiční vlastnosti ambenonia. Nekompetitivní mechanismus inhibice lidské AChE novými látkami byl potvrzen molekulově modelovací studií. Ve srovnání s bispyridiniovými inhibitory dosáhly bisisochinolinové inhibitory nižších hodnot IC_{50} . Nejúčinnějšími novými inhibitory byly sloučeniny s alifatickým spojovacím řetězcem $(CH_2)_{8-16}$. Ze skupiny sloučenin s nenasyceným nebo aromatickým spojovacím skeletem byl nejúčinnější derivát s naftalenovým spojovacím řetězcem. Překvapivě některé inhibitory vykazovaly inhibiční selektivitu k BuChE (např. sloučenina s $(CH_2)_{14}$ alifatickým spojovacím řetězcem. (**Příloha 15**)



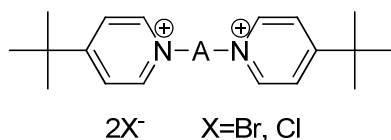
Logickým pokračováním práce bylo hodnocení inhibiční účinnosti biskvartérních bisisochinoliniových inhibitorů na lidskou AChE a BuChE. Jako v případě předchozích prací byly vybrány látky s alifatickými, nenasycenými a aromatickými spojovacími řetězci. Pro testování byla použita Ellmanova metoda modifikovaná pro vícekanálový spektrofotometr. Enzymy použité v této studii byla lidská rekombinantní AChE a lidská sérová BuChE. Hodnoty IC_{50} byly porovnány se standardy ambenoniem, edrofoniem, látkou BW284c5 a ethopropazinem. Ve srovnání s předchozími dvěma

sériemi dosáhly bischinoliniové deriváty nižších hodnot IC_{50} než inhibitory pyridiniové a isochinoliniové. Nejúčinnějšími inhibitory byly ty s alifatickým spojovacím řetězcem $(CH_2)_{7-12}$ (**Příloha 16**).



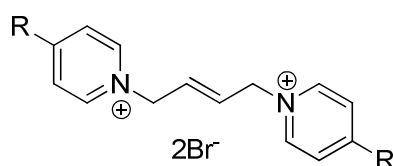
Kvartérní inhibitory se zaměřením na symptomatickou terapii ranných stádií MG jsou sumarizovány v přehledové kapitole. (**Příloha 17**)

V další práci pak byla testována série látek odvozených od již známé sloučeniny SAD-128, u které se zjistilo, že je reverzibilním inhibitorem AChE. Následně se zjistilo, že SAD-128 je antagonistou AChR. V návaznosti na tento fakt byla testována série analogů SAD-128 s různými spojovacími řetězci s cílem nalézt nová profylaktika proti otravě OFI. Pro testování byla použita Ellmanova metoda modifikovaná pro vícekanálový spektrofotometr. Enzymy použité v této studii byla lidská rekombinantní AChE a lidská sérová BuChE. Výsledky byly porovnány se známými inhibitory i reaktivátory (pralidoxim, obidoxim, BW284c5 a ethopropazin). Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro inhibitory s alifatickým spojovacím řetězcem (C_6-C_{12}) a naftylenovým spojovacím řetězcem. Zavedení terciárního butylu do polohy 4 pyridinia mělo za následek nárůst inhibiční aktivity proti AChE i BuChE. Analogy SAD-128 dosáhly srovnatelné inhibiční aktivity s chinoliniovými inhibitory. Čtyři nejslibnější inhibitory byly postoupeny pro molekulární modelovací studie a byly odvozeny vztahy mezi strukturou a účinkem. (**Příloha 18**)

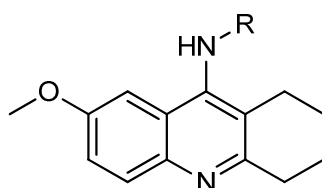


Následující série inhibitorů byla připravena s cílem nalézt vhodné profylaktikum pro případ otravy OFI. Základ struktury byl odvozen od existujících biskvartérních

reaktivátorů s *E*-but-2-en-1,4-diylovým spojovacím řetězcem. Substituenty na pyridinových jádrech byly nahrazeny různými funkčními skupinami. Byly vybrány sloučeniny s takovými substituenty, aby byly zastoupeny hydrofilní i lipofilní substituenty. Všechny sloučeniny byly testovány na schopnost inhibovat lidskou AChE a BuChE. Pro testování byla použita Ellmanova metoda modifikovaná pro vícekanálový spektrofotometr. Enzymy použité v této studii byly lidská rekombinantní AChE a lidská sérová BuChE. Výsledky byly porovnány s karbamátovými inhibitory pyridostigminem a neostigminem a oximovými reaktivátory pralidoximem a K203. U některých sloučenin bylo dosaženo výsledků srovnatelných s pyridostigminem. Pouze jeden nový inhibitor překonal oba standardní karbamáty ve schopnosti inhibovat lidskou AChE. Jednalo se o bisbenzylový inhibitor. Tatáž sloučenina rovněž vykazovala určitou míru selektivity vůči AChE. (**Příloha 19**)



Centrálně působící inhibitory testované v rámci řešení této práce byly deriváty 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Obměny struktury 7-MEOTA spočívaly v alkylnaci primární aminoskupiny, případně ve zdvojení molekuly. Pro stanovení hodnot IC_{50} byly použity enzymy: lidská rekombinantní AChE a lidská sérová BuChE. Všechny testované inhibitory byly testovány na svou schopnost inhibovat lidskou AChE a BuChE a výsledky byly porovnány se známými inhibitory takrinem a 7-MEOTA. Žádná z testovaných sloučenin nevykazovala řádově nižší hodnoty IC_{50} pro lidskou AChE než takrin. Několik sloučenin však překonalo předlohou sloučeninu 7-MEOTA. Některé sloučeniny překonaly takrin i 7-MEOTA ve schopnosti inhibovat lidskou BuChE. (**Přílohy 20–23**)



5 Závěr

5.1 Vztah mezi strukturou a účinností potenciálních reaktivátorů

V rámci řešení této práce bylo otestováno několik sérií biskvartérních reaktivátorů s cílem nalézt reaktivátor schopný reaktivovat AChE inhibovanou jak NPL, tak OF pesticidy. Celá řada látek překonala známé reaktivátory v reaktivaci AChE inhibované OF pesticidy. NPL (v tomto případě tabunem) inhibovaná AChE se ukázala jako obtížněji reaktivovatelná a žádný nově testovaný reaktivátor nepřekonal v tomto ohledu reaktivátor K203. Některé sloučeniny však překonaly známé reaktivátory včetně obidoximu a trimedoximu.

Pro reaktivaci pesticidy inhibované AChE se ukázala nezbytná alespoň jedna oximová skupina v poloze 4 pyridiniového jádra. Optimální délka spojovacího řetězce je 3-4uhlíkatý řetězec. Nejslibnějších výsledků bylo dosaženo u reaktivátorů s propan-1,3-diolovým spojovacím řetězcem. Zavedení nenasycené vazby do spojovacího řetězce vede ke zvýšení reaktivační účinnosti při nižší screeningové koncentraci.

Podářilo se nalézt nové reaktivátory, které jsou schopné reaktivovat AChE inhibovanou více typy OFI (pesticidů i tabunem). Jejich účinnost je srovnatelná se známými reaktivátory.

5.2 Vztah mezi strukturou a účinností inhibitorů cholinesteras

Při řešení této práce bylo otestováno 5 sérií symetrických biskvartérních inhibitorů cholinesteras s různými spojovacími řetězci i heteroaromatickou částí. Nejúčinnějšími inhibitory byly sloučeniny s alifatickým spojovacím můstkem o počtu methylenových skupin v rozmezí 8-12. Při porovnání jednotlivých sérií stoupala inhibiční účinnost od pyridiniových přes isochiniliniové k chinoliniovým inhibitorům a analogům SAD-128. Ze sloučenin s nenasyceným nebo aromatickým spojovacím řetězcem nejslibnějších výsledků dosahovaly inhibitory s naftylenovým spojovacím řetězcem. Nejúčinnější inhibitory se svou účinností vyrovnaly standardům včetně

ambenonia. Celá řada inhibitorů překonala standardní karbamátové inhibitory neostigmin a pyridostigmin. Inhibiční mechanismus vybraných inhibitorů se podařilo potvrdit i molekulovým modelováním a kinetickým stanovením. Podařilo se určit SAR použitelné pro další design a syntézu periferních inhibitorů ChE.

Druhou skupinou inhibitorů byly deriváty známé sloučeniny 7-MEOTA. Testovány byly deriváty s rozdílnými alkyly na primární aminoskupině molekuly 7-MEOTA, případně zdvojené molekuly. U některých sloučenin bylo dosaženo výsledků srovnatelných se standardem takrinem a celá řada látek překonala předlohou sloučeninu 7-MEOTA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo se sloučeninami s 6-9 uhlíkatým alkylem. Ze zdvojených molekul dosáhl nevyšší účinnosti bis-pentylenový derivát, který zároveň vykazoval silnou selektivitu vůči AChE.

Podařilo se nalézt několik slibných inhibitorů AChE schopných pronikat do CNS. Vzhledem k nižší toxicitě 7-MEOTA ve srovnání s takrinem by mohly být tyto inhibitory kandidáty pro další testování.

6 Souhrn

Tato disertační práce se zabývá hledáním vztahů mezi strukturou a účinností sloučenin schopných modulovat aktivitu acetylcholinesterasy. Pro hodnocení reaktivační účinnosti byl použit standardní titrimetrický *in vitro* test využívající jako zdroj enzymu homogenát mozku laboratorního potkana. Později byl navržen test vycházející z spektrofotometrie dle Ellmana. Pro hodnocení inhibiční účinnosti byl navržen *in vitro* test rovněž využívající princip spektrofotometrie dle Ellmana.

Aldoximové reaktivátory se používají jako kauzální antidota v případě otrav organofosforovými sloučeninami. Organofosforové sloučeniny jsou rozšířenou skupinou látek používaných v zemědělství jako pesticidy, v průmyslu jako inhibitory hoření a změkčovadla. V minulosti byly vyvinuty pro válečné účely jako nervově paralytické látky. Mechanismus toxicity těchto látek spočívá v inhibici acetylcholinesterasy cestou kovalentní vazby na hydroxyl Ser203 aktivního místa. Žádný z dnes dostupných reaktivátorů není schopen reaktivovat acetylcholinesterasu inhibovanou všemi typy organofosforovými sloučenin.

Byl proveden screening řady sérií biskvartérních reaktivátorů a výsledky byly srovnány se známými reaktivátory. Byly navrženy vztahy mezi strukturou a účinkem pro reaktivaci acetylcholinesterasy inhibované jednotlivými inhibitory.

Reverzibilní inhibitory AChE jsou dnes známými léčivy používanými pro terapii celé řady onemocnění jako MG a AD.

V rámci řešení této práce bylo testováno několik sérií biskvartérních inhibitorů a inhibitorů odvozených od struktury tetrahydroakridinu. Výsledky IC_{50} proti lidské AChE a BuChE byly porovnány se známými léčivy a byly navrženy vztahy mezi strukturou a účinností.

7 Summary

The Ph. D. thesis is focused on finding structure-activity relationships for the acetylcholinesterase activity modulating compounds. Standard *in vitro* test using rat brain homogenate as the source of acetylcholinesterase was chosen for enzyme activity assay. Later, the procedure employing the colorimetric approach according to Ellman was developed. New procedure for inhibitory efficacy assessment based on Ellman's method was designed as well.

Aldoxime reactivators are mainly used as the causal antidotes of organophosphorus compounds intoxications. Organophosphorus compounds are widely used for agricultural purposes as pesticides, and in the industry as plasticizers or flame retardants. Beside the peaceful purposes, they were also developed as nerve agents applicable for chemical warfare. Toxic mechanism of the compounds is formation of covalent bond with serine (Ser203) hydroxyl in active site of acetylcholinesterase. Unfortunately, none of the currently used reactivators is able to reactivate acetylcholinesterase inhibited by variety of organophosphorus compounds.

Screening of several series of bisquaternary reactivators was performed, and the results were compared to the known reactivators. SAR of the tested reactivators against various inhibitors were proposed.

Reversible AChE inhibitors are known as a treatment of several disorders such as myasthenia gravis and Alzheimer disease.

Several series of bisquaternary inhibitors and tetrahydroacridine based inhibitors were assessed. The IC_{50} results for human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase were compared to the known inhibitors, and the SAR studies were performed accordingly.

8 Publikované vědecké a odborné práce

Publikované práce

1. Musilek, K.; Holas, O.; Hambalek, J.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of bispyridinium compounds bearing propane linker and evaluation of their reactivation activity against tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Lett. Org. Chem.* **2006**, *3*, 831–835. IF₂₀₀₆ = 1.004
2. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of asymmetrical bispyridinium compounds bearing cyano-moiety and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5673–5676. IF₂₀₀₆ = 2.538
3. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of a novel series of non-symmetrical bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 425–432. IF₂₀₀₇ = 1.343
4. Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Monooxime reactivators of acetylcholinesterase with (*E*)-but-2-ene linker: Preparation and reactivation of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6733–6741. IF₂₀₀₇ = 2.662
5. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. Novel series of bispyridinium compounds bearing a (*Z*)-but-2-ene linker-synthesis and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3172–3176. IF₂₀₀₇ = 2.604
6. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. Synthesis of monooxime-monocarbamoyl bispyridinium compounds bearing (*E*)-but-2-ene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun-

- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 70–76 IF₂₀₀₈ = 1.421
7. Musilek, K.; Holas, O.; Misik, J.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K. Monooxime-monocarbamoyl bispyridinium xylene linked reactivators: Synthesis, in vitro and toxicity evaluation, docking studies. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 247–254. IF₂₀₁₀ = 3.306
 8. Musilek, K.; Komloova, M.; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabanova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage: Initial study for Myasthenia gravis implications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763–1766. IF₂₀₁₀ = 2.661
 9. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivatives-bis-alkylene linked 7-MEOTA. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 327–331. IF₂₀₁₀ = 0.785
 10. Pohanka, M.; Zdarova-Karasova, J.; Kuca, K.; Pikula, J.; Holas, O.; Korabecny, J.; Cabal, J.; Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticide and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta*, **2010**, *81*, 621–624. IF₂₀₁₀ = 3.772
 11. Kovarik, Z.; Katalinic, M.; Sinko, G.; Binder, J.; Holas, O.; Jung, Y.-S.; Musilova, L.; Jun D.; Kuca, K. Pseudo-catalytic scavenging: Searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 167–171. IF₂₀₁₀ = 2.832
 12. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K.; Opletalova, V.; Jung, Y.-S. In vitro screening of oxime reactivators on the model of paraoxon-inhibited acetylcholinesterase: SAR study. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 1609–1614. IF₂₀₁₀ = 0.871
 13. Holas, O.; Musilek, K.; Opletalová, V.; Kuča, K. Hodnocení reaktivační účinnosti vybraných reaktivátorů paraoxonem inhibované acetylcholinesterasy in vitro. *Česk. Slov. Farm.* **2010**, *59*, 18–22
 14. Soukup, O.; Holas, O.; Binder, J.; Killy, J.; Tobin, G.; Jun, D.; Fusek, J.; Kuca, K. The effect of trimedoxime on acetylcholinesterase and on the cholinergic system of the rat bladder. *J. App. Biomed.* **2010**, *8*, 87–92. IF₂₀₁₀ = 1.689
 15. Korabecný, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K. Synthesis and in vitro

- evaluation of *N*-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6093–6095. IF₂₀₁₀ = 2.661
16. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Jun, D.; Zemek, F.; Opletalova, V.; Patocka, J.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Kuca, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of *N*-(Bromobut-3-en-2-yl)-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine as a cholinesterase inhibitor with regard to Alzheimer's disease treatment. *Molecules* **2010**, *15*, 8804–8812. IF₂₀₁₀ = 1.988
17. Musílek, K.; Röder, J.; Komlóová, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Jung, Y.-S. Preparation, *in vitro* screening and molecular modelling of symmetrical 4-*tert*-butylpyridinium cholinesterase inhibitors: Analogues of SAD-128. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 150–154. IF₂₀₁₁ = 2.554
18. Musilek, K.; Komlóová, M.; Holas, O.; Horova, A.; Pohanka, M.; Gunn-Moore, F.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Mono-oxime bisquarternary acetylcholinesterase reactivators with prop-1,3-diyl linkage: Preparation, *in vitro* screening and molecular docking. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 757–762. IF₂₀₁₁ = 2.921
19. Komlóová, M.; Musílek, K.; Horová, A.; Holas, O.; Dohnal, V.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Preparation, *in vitro* screening and molecular modelling of symmetrical bis-quinolinium cholinesterase inhibitors – implication for early myasthenis gravis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2505–2509. IF₂₀₁₁ = 2.554
20. Musílek, K.; Pavlíková, R.; Marek, J.; Komlóová, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. The preparation, *in vitro* screening and molecular docking of symmetrical bisquarternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2*E*)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 125–253. IF₂₀₁₁ = 1.617
21. Musílek, K.; Komlóová, M.; Holas, O.; Hrabínova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K.; Preparation and *in vitro* screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various

- connecting linkage – Implications for early myasthenis gravis treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 811–818. IF₂₀₁₁ = 3.346
22. Korábečný, J.; Musílek, K.; Zemek, F.; Horová, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y.S.; Kuca, K.; Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-*N*-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine-new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6563–6566. IF₂₀₁₁ = 2.554
23. Herich, P.; Kamenicek, J.; Pohanka, M.; Holas, O.; Kozisek, J.; Dlhan, L.; Kuca, K.; Planar Ni(II) 1,2-dithiolenes involving tridentate P-donor ligands. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 156–164. IF₂₀₁₁ = 1.547
24. Holas, O.; Musílek, K.; Horová, A.; Opletalová, V.; Kuča, K. SAR Study on reactivators of ethyl-paraoxon inhibited acetylcholinesterase *Lett. Drug Des. Discov.* **2012**, *9*, 587–594. IF₂₀₁₁ = 0.872

Kapitoly v knize

1. Musilek, K.; Holas, O.; Horova, A.; Pohanka, M.; Zdarova-Karasova, J.; Jun, D.; Kuca, K. Progress in antidotes (acetylcholinesterase reactivators) against organophosphorus pesticides. In Pesticides in the Modern World: Effects of Pesticides Exposure: Intech Rijeka (Croatia), 2011, pp. 341–358, ISBN978-953-307-454-2.
2. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Horova, A.; Zdarova-Karasova, J.; Jun, D.; Kuca, K. Myasthenia gravis – current treatment standards and emerging drugs. In A Look into Myasthenia Gravis: Intech Rijeka (Croatia), 2012, pp. 23–42, ISBN 978-953-307-821-2.

Konferenční sdělení

1. Holas, O.; Opletalová, V.; Kuča, K.; Musílek, K. Evaluation of novel acetylcholinesterase reactivators against paraoxon: SAR study. In **7. konference vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů ČSL JEP** Hradec Králové 24. – 25. 10. 2007. [CD-ROM]; Fakulta vojenského zdravotnictví UO: Hradec Králové, 2007. *ISBN 987-80-7231-324-2*.
2. Holas, O.; Pohanka, M.; Musílek, K.; Kuča, K.; Opletalová, V. Anticholinergic properties of some organic compounds. **8. konference vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů** Hradec Králové 27. – 28.11.2008. [CD-ROM]; Fakulta vojenského zdravotnictví UO: Hradec Králové, 2008 *ISBN 978-80-254-3267-9*.
3. Musílek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Opletalova, V.; Pohanka, M.; Kuca, K. Resear of small quaternary AChE inhibitors as pretreatment of OP poisoning. **5th World Congress on Chemical, Biological and Radiological Terrorism** Cavtat (Croatia) 5.-10.4.2009, *Kniha abstraktů*, p. 45.
4. Hambálek, J.; Holas, O.; Soukup, O.; Opletalová, V.; Doležal, M.; Kuča, K.; Musilek, K. Novel reactivators of acetylcholinesterase with xylene linker – synthesis and in vitro evaluation. **42th Conference Progress in Organic, Bioorganic and Pharmaceutical Chemistry** Nymburk 16.– 18.11.2007, *Chem. List. 2007, 101*, p. 972-973, *ISSN 0009-2770*.
5. Musilek, K.; Holas, O.; Jun, D.; Kuca, K. Organophosphate pesticide reactivators – novel approaches. **Bioscience Review 2008** Hunt Valley (USA) 1.6. – 6.6.2008, *Book of abstracts*, p. 121.
6. Musilek, K.; Holas, O.; Opletalová, V.; Jun, D.; Kuča, K. Novel acetylcholinesterase reactivators against paraoxon intoxication – SAR study. **20th International Symposium on Medicinal Chemistry** Vienna 31.8.- 4.9.2008, *Drug. Future. 2008, 33, P258 p. 154, ISSN 0377-8282*.
7. Musilek, K.; Holas, O.; Opletalova, V.; Jun, D.; Kuca, K. Novel reactivators of acetylcholinesterase against paraoxon intoxication. **International Crisis Management Symposium on CBRN and Emerging Infectiuos Diseases** Choshi (Japan) 13.9.-16.9.2008, *Abstract book*, p. 64, *Proceedings*, p. 146.
8. Musilek, K.; Holas, O.; Opletalova, V.; Jun, D.; Kuca, K. Reactivators of acetylcholinesterase for organophosphorus pesticide intoxication – May we

- replace pralidoxime? **45nd Congress of European Societies of Toxicology** Rhodes 5.-8.10.2008, *Toxicol. Lett. 2008, 180S, Suppl. 1, S23, p. S171, ISSN 0378-4274*.
9. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Opletalova, V.; Pohanka, M.; Kuca, K. Research of small quaternary AChE inhibitors as pretreatment of OP poisoning. **5th World Congress on Chemical, Biological and Radiological Terrorism** Cavtat (Croatia) 5.–10.4.2009, *Book of abstracts*, p. 45.
 10. Musilek, K.; Holas, O.; Opletalova, V.; Pohanka, M.; Kuca, K. In vitro evaluation of xylene linked monooxime AChE reactivators with carbamoyl functional group against OP pesticides. **12th Medical Chemical Defence Conference** Munich (Germany) 22. – 23.4.2009, *Book of abstracts* p. 75.
 11. Musilek, K.; Holas, O.; Komloova, M.; Zdarova-Karasova, J.; Pohanka, M.; Kuca, K. Development of promising oximes against nerve agent and/or pesticide intoxication. **328th American Chemical Society National Meeting** Washington D.C. 16.8.-20.8.2009, *Meeting program*, p.184.
 12. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dolezal, M.; Kuca, K. Small quaternary AChE inhibitors—Implication for pretreatment of OP poisoning or MG treatment. **46th Congress of European Societies of Toxicology** Dresden 13. – 16.9.2009, *Toxicol. Lett. 2009, 189S, Z06, p. S209, ISSN 0378-4274*.
 13. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V. In vitro evaluace bisquaterní monooximové reaktivatory AChE s xylenovým spojovacím řetězcem. **38. Syntéza a analýza léčiv** Hradec Kralove 14. – 16.9.2009, *Kniha abstraktů, P23 p.85, ISBN 978-80-7305-078-8*. (in Czech).
 14. Komloova, M.; Holas, O.; Musilek, K.; Dolezal, M. Syntéza a in vitro evaluace bispyridiniových inhibitorů AChE. **38. Syntéza a analýza léčiv** Hradec Kralove 14.-16.9.2009, *Kniha abstraktů, P37 p.99, ISBN 978-80-7305-078-8*. (in Czech).
 15. Korabecny, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Musilek, K.; Kuca, K. Syntéza a in vitro evaluatce sekundárních alkyl-amino analogů 7-MEOTA. **38. Syntéza a analýza léčiv** Hradec Kralove 14. – 16.9.2009, *Kniha abstraktů, P40 p.102, ISBN 978-80-7305-078-8*.
 16. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Nachon, F.; Pohanka, M.; Dolezal, M.; Opletalova, V.; Kuca, K. Nekovalentní interakce kvarterních heteroaromatických sloučenin s cholinesterasami. **38. Syntéza a analýza léčiv**

- Hradec Kralove 14. – 16.9.2009, *Kniha abstraktů*, P57 p.119, ISBN 978-80-7305-078-8.
17. Binder, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Jun, D. Design, synthesis and biological evaluation of new effective acetylcholinesterase inhibitors. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20. – 25.9.2009, *Book of abstracts*, P3-5, p. 92.
 18. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K.; Opletalova, V. Reactivation of tabun and pesticide inhibited human erythrocyte AChE using bisquaternary oxime reactivators in vitro. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20. – 25.9.2009, *Book of abstracts*, P3-16, p. 98.
 19. Komloova, M.; Holas, O.; Musilek, K.; Kuca, K.; Dolezal, M.; Opletalova, V. Synthesis and in vitro screening of AChE bisquaternary inhibitors as potential compounds for Myasthenia gravis treatment. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20. – 25.9.2009, *Book of abstracts*, P3-19, p. 99-100.
 20. Korabecny, J.; Holas, O.; Opletalova, V.; Kuca, K.; Musilek, K.; Zdarova-Karasova, J.; Synthesis and evaluation of various N-methyl quaternary salts of 7-methoxytacrine compounds as acetylcholinesterase inhibitors. **10th International Meeting on Cholinesterases** Sibenik (Croatia) 20. – 25.9.2009, *Book of abstracts*, P3-21, p. 100.
 21. Pohanka, M.; Drobik, O.; Krenkova, Zdarova-Karasova, J.; Holas, O.; Kasalova, Korabecny, J.; Marek, J.; Kuca, K.; Musilek, K. Electrochemical evaluation of acetylcholinesterase activity and construction of biosensor suitable for anticholinergic compounds assay. **The 104th National Meeting of the Korean Chemical Society** Daejeon (Korea) 28. – 30.10.2009, *Book of abstracts*, p.43.
 22. Musilek, Holas, Pohanka, Kuca. Monooxime monocarbamoyl reactivators for OP- pesticides with xylene linker. **The 104th National Meeting of the Korean Chemical Society** Daejeon (Korea) 28. – 30.10.2009, *Kniha abstraktů* p43.
 23. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Pohanka, M.; Dolezal, M.; Opletalova, V.; Nachon, F.; Kuca, K. Non-covalent interactions of quaternary heteroaromatic compounds with cholinesterases. **Chemical and Biological Defense Science and Technology Conference** Dallas (USA) 16. – 20.11.2009, *Kniha abstraktů*, p. 151-152.

24. Holas, O.; Musilek, K.; Kuca, K.; Opletalova, V. Relationship between structure and activity of potential reactivators against paraoxon inhibited acetylcholinesterase. **9. Konference vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů** Hradec Kralove 26. – 27.11.2009, *Sborník příspěvků*, p. 61-63, ISBN 978-80-254-5956-0.
25. Komloova, M.; Holas, O.; Musilek, K.; Dolezal, M. Preparation and in vitro evaluation of new peripheral inhibitors of acetylcholinesterase. **9. Konference vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů** Hradec Kralove 26. – 27.11.2009, *Sborník příspěvků*, p. 78-79, ISBN 978-80-254-5956-0.
26. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Pohanka, M.; Dolezal, M.; Nachon, F.; Kuca, K. Interactions of bisquaternary molecules with cholinesterases. **9. Konference vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů** Hradec Kralove 26. – 27.11.2009, *Sborník příspěvků*, p. 91, ISBN 978-80-254-5956-0.
27. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Binder, J.; Pohanka, M.; Zdarova-Karasova J.; Kuca, K. Syntéza a in vitro evaluace centrálně účinných inhibitorů acetylcholinesterázy odvozených od struktury 7-MEOTA. **9. konference odborné Společnosti vojenských lékařů, farmaceutů a veterinárních lékařů** Hradec Králové 26. – 27.11.2009, *Sborník příspěvků*, p. 80-83.
28. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Opletalova, V.; Pohanka, M.; Kuca, K. Nově připravené deriváty látky 7-MEOTA. **52. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník 6. – 10.1.2010, Supplementum 1, 2010, p. 45
29. Korabecny, J.; Holas, O.; Patocka, J.; Zdarova-Karasova J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Musilek, K.; Kuca, K. Syntéza a in vitro testování strukturně odlišných alkyl-aminoderivátů odvozených od látky 7-MEOTA. **52. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 6. – 10.1.2010, (*Suppl I.*), 2010, p. 45
30. Musilek, K.; Holas, O.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Kuca, K. AChE reactivator – SAR of non-oxime part of the molecule. **8th International Chemical and Biological Medical Treatment Symposium** Spiez (Switzerland) 2.5.-7.5.2010, Book of Abstracts p27.
31. Holas, O.; Musilek, M.; Horrova, A.; Opletalova, V.; Reaktivace Paraoxonem inhibované lidské acetylcholinesterasy novými biskvarterními reaktivátory. **39.**

Syntéza a analýza léčiv Modrá (Slovensko) 2. – 4.9.2010, *Book of abstracts*, p.69, ISBN 978-80-7399-986-5.

32. Korábečný, J., Holas, O. et al. Syntéza a *in vitro* hodnocení *N*-alkyl-7-methoxytakrin hydrochloridů jako potenciálních inhibitorů cholinesteráz při Alzheimerově chorobě. **Sborník 53. česko-slovenské psychofarmakologické konference**, Lázně Jeseník, 5. – 9. ledna 2011. *Psychiatrie – časopis pro moderní psychiatrii* **2011**, 15 (Suppl. 1), 55.
33. Korábečný, J., Holas, O. et al. Syntéza a hodnocení biologické účinnosti nových takrinových derivátů jako potenciálních agens pro Alzheimerovu chorobu. **Sborník 53. česko-slovenské psychofarmakologické konference**, Lázně Jeseník, 5. – 9. ledna 2011. *Psychiatrie – časopis pro moderní psychiatrii* **2011**, 15 (Suppl. 1), 56.
34. Holas, O.; Pohanka, M.; Musílek, K.; Kuča, K. . *In vitro* metodika pro testování potenciálních inhibitorů acetylcholinesterasy. **Sborník 53. česko-slovenské psychofarmakologické konference**, Lázně Jeseník, 5. – 9. ledna 2011. *Psychiatrie – časopis pro moderní psychiatrii* **2011**, 15 (Suppl. 1), 57.
35. Kuča, K.; Korábečný, J.; Holas, O.; Zemek, F.; Musílek, K.; Pohanka, M.; Opletalová, V.; Dohnal, V. Syntéza a *in vitro* hodnocení *N*-alkyl-7-methoxytakrin hydrochloridů jako potenciálních inhibitorů cholinesteras při Alzheimerově chorobě. **53. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 5. -9. 1. 2010, (Suppl I.), 2011, p. 56
36. Musílek, K.; Korabecny, J.; Holas, O.; Horova, A.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA – cholinesterase inhibitor with valuable pharmacological profile. **10th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Barcelona (Spain) 9. -13.3.2011, p. 73
37. Korabecny, J.; Musílek, K.; Holas, O.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Hroudova, J.; Jun, D.; Fisar, Z.; Karasova, J.; Patocka, J.; Kuca, K. Synthesis and *in vitro* evaluation of *N*-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential anti-Alzheimer's disease agents. **10th International Conference Alzheimer's and Parkinson's Diseases** Barcelona (Spain) 9. -13.3.2011, p. 74
38. Korabecny, J.; Musílek, K.; Holas, O.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA derivatives based human

- cholinesterase inhibitors. **12th Annual Network Conference Alzheimer's Research UK** Leeds (United Kingdom) 16. – 17. 3. 2011, p. 36
39. Musilek, K.; Korabecny, J.; Holas, O.; Horova, A.; Patocka, J.; Kuca, K. 7-MEOTA – cholinesterase inhibitor with improved pharmacological properties. **12th Annual Network Conference Alzheimer's Research UK** Leeds (United Kingdom) 16. – 17. 3. 2011, p. 46
40. Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Holas, O.; Dohnal, V.; Kuca, K. Monooximemonoquaternary cholinesterase reactivators with modified side chain – preparation, in vitro screening and molecular modelling study. **13th Medical Chemical Defence Conference** Munich (Germany) 13. – 14.4.2011, *Book of abstracts*, p. 40.
41. Korábecny, J.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horová, A.; Holas, O.; Nepovimová, E.; Opletalová, V.; Hroudová, J.; Fišar, Z.; Jung, Y.-S.; Kuča, K. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine – new tacrine derivative with cholinergic properties. **54. Česko-Slovenská psychofarmakologická konference** Lázně Jeseník (Česká republika) 4. – 8. 1. 2012, *Psychiatrie – časopis pro moderní psychiatrii* **2012** (*Suppl I.*).

9 Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Veronice Opletalové Ph.D a svému odbornému asistentu Doc. PharmDr. Kamilu Musílkovi Ph.D za jejich pomoc a cenné rady při řešení této doktorské disertační práce.

Dále bych chtěl poděkovat Bc. Anně Horové za její technickou pomoc a svědomitou a precizní práci.

Nelze na tomto místě jmenovat všechny, kteří mi vycházeli vstříc a asistovali nejen během mého studia. Za všechny děkuji kolegům Mgr. Markétě Komlóové, Mgr. Filipu Zemkovi, Mgr. Janu Korábečnému, Doc. RNDr. Miroslavu Pohankovi Ph.D, Prof. Ing. Kamilu Kučovi Ph.D a Bc. Martině Hrabínové.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mi umožnili studovat a podporovali mě po celou dobu mého studia.

10 Seznam použité literatury

1. Birks, R.; Macintosh, F. C. Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. *Can. J. Biochem Phys.* **1961**, *39*, 787–827.
2. Beers, W. H.; Reich, E. Structure and Activity of Acetylcholine. *Nature* **1970**, *228*, 917-922.
3. Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 1558–1571.
4. Sarter, M.; Parikh, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* **2005**, *6*, 48–56.
5. Gasnier, B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* **2000**, *82*, 327–337.
6. Sudhof, T. C. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* **2004**, *27*, 509-547.
7. Katz, B.; Miledi, R. Effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* **1965**, *161*, 496–503.
8. Snyder, D. A.; Kelly, M. L.; Woodbury, D. J. SNARE complex regulation by phosphorylation. *Cell. Biochem. Biophys.* **2006**, *45*, 111–123.
9. Corringer, P. J.; Le Novère, N.; Changeux, J. P. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, *40*, 431–458.
10. Fibiger, H. C. Cholinergic mechanism in learning, memory and dementia - A review of recent evidence. *Trends. Neurosci.* **1991**, *14*, 220–223.
11. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **1999**, *66*, 137–147.
12. Sargent, P. B. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine-receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **1993**, *16*, 403–443.
13. Levin, E. D. Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology* **1992**, *108*, 417–431.
14. Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989.
15. Barrantes, F. J. Structural basis for lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function. *Brain. Res. Rev.* **2004**, *47*, 71–95.

16. Hucho, F.; Hilgenfeld, R. The selectivity filter of a ligand-gated ion channel - the helix-M2 model of the ion channel of the nicotinic acetylcholine-receptor. *Febs. Letters*. **1989**, *257*, 17–23.
17. Brejc, K.; van Dijk, W. J.; Klaassen, R. V.; Schuurmans, M.; van der Oost, J.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **2001**, *411*, 269–276.
18. Vernino, S.; Amador, M.; Luetje, C. W.; Patrick, J.; Dani, J. A. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* **1992**, *8*, 127–134.
19. Unwin, N. The structure of ion channels in membranes of excitable cells. *Neuron* **1989**, *3*, 665–676.
20. Doley, R.; Kini, R. M. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, *66*, 2851–2871.
21. Alkondon, M.; Pereira, E. F. R.; Wonnacott, S.; Albuquerque, E. X. Blockade of nicotinic currents in hippocampal neurons defines methyllcaconinine as a potent and specific receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **1992**, *41*, 802–808.
22. McGehee, D. S.; Role, L. W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, *57*:521–546.
23. Bonner, T. I.; Buckley, N. J.; Young, A. C.; Brann, M. R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine-receptor genes. *Science* **1987**, *237*, 527–532.
24. Felder, C. C. Muscarinic acetylcholine receptors signal transduction through multiple effectors. *Faseb. J.* **1995**, *9*, 619–625.
25. Levey, A. I.; Kitt, C. A.; Simonds, W. F.; Price, D. L.; Brann, M. R.; Identification and localization of muscarinic acetylcholine-receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J. Neurosci.* 1991, **11**(10):3218–3226.
26. Pitcher, J.A.; Freedman, N.J.; Lefkowitz, R.J. G protein-coupled receptor kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 653–692.
27. Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 279–290.
28. Tobin G.; Giglio, D.; Lundgren, O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J. Physiol. Pharmacol.* **2009**, *60*, 3–21.

29. Bonner, T. I.; Young, A. C.; Brann, M. R.; Buckley, N. J. Cloning and expression of the human and rat M5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1988**, *1*, 403–410.
30. Nathanson, N. M. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev. Neurosci.* **1987**, *10*, 195–236.
31. Wess, J. Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit. Rev. Neurobiol.* **1996**, *10*, 69–99.
32. Baldwin, J.M. The probable arrangement of the helices in G-protein coupled receptors. *Embo. J.* **1993**, *12*, 1693–1703.
33. Wiesner, J.; Kriz, Z.; Kuca, K.; Jun, D.; Koca, J. Acetylcholinesterases - the structural similarities and differences. *J. Enzyme Inhib. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *22*, 417–424.
34. Massoulie, J.; Pezzementi, L.; Bon, S.; Krejci, E.; Vallette, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Prog. Neurobiol.* **1993**, *41*, 31–91.
35. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219–229.
36. Lindstrom, J. M.; Seybold, M. E.; Lennon, V. A.; Whittingham, S.; Duane, D. D. Antibody to acetylcholine receptor in Myasthenia gravis- prevalence, clinical correlates and diagnostic value. *Neurology* **1976**, *26*, 1054–1059.
37. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S.M.; Harel, M.; Remington, S.J.; Silman, I.; Schrag, J. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein. Eng.* **1992**, *5*, 197–211.
38. Cousin, X.; Hotelier, T.; Giles, K.; Toutant, J. P.; Chatonnet, A.; AChEdb: the database system for ESTHER, the alpha/beta fold family of proteins and the Cholinesterase gene server. *Nucleic. Acids. Res.* **1998**, *26*, 226–228.
39. Fujii, T.; Mori, Y.; Tominaga, T.; Hayasaka, I.; Kawashima, K.; Maintenance of constant blood acetylcholine content before and after feeding in young chimpanzees. *Neurosci. Lett.* **1997**, *227*, 21–24.
40. Sussman, J. L.; 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*, 872–879.
41. Dvir, H.; Silman, I.; Harel, M.; Rosenberry, T. L.; Sussman, J. L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 10–22.

42. Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. Active-site gorge and buried water molecules in crystal structures of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 713–735.
43. Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, *90*, 5128–5132.
44. Johnson, G.; Moore, S. W. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 217–225.
45. Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. Open back door in molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**, *263*, 1276–1278.
46. Chatonnet, A.; Lockridge, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **1989**, *260*, 625–634.
47. Fernandez, H. L.; Moreno, R. D.; Inestrosa, N. C. Tetrameric (G4) acetylcholinesterase: structure, localization, and physiological regulation. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1335–1346.
48. Liao, J.; Norgaard-Pedersen, B.; Brodbeck, U. Subunit association and glycosylation of acetylcholinesterase from monkey brain. *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 1127–1134.
49. Massoulie, J. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals* **2002**, *11*, 130–143.
50. Massoulie, J.; Bon, S.; Perrier, N.; Falasca, C. The C-terminal peptides of acetylcholinesterase: cellular trafficking, oligomerization and functional anchoring. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *158*, 3–14.
51. Massoulie, J.; Sussman, J. L.; Bon, S.; Silman, I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog. Brain. Res.* **1993**, *98*, 139–146.
52. Alvarez-Arcaya, A.; Combarros, O.; Llorca, J.; Sanchez-Guerra, M.; Berciano, J.; Fernandez-Viadero, C.; Pena, N. The butyrylcholinesterase K variant is a protective factor for sporadic Alzheimer's disease in women. *Acta. Neurol. Scand.* **2000**, *102*, 350–353.
53. Small, D. H. A function for butyrylcholinesterase? *J. Neurochem.* **1995** *64*, 466–467.

54. Sinko, G.; Kovarik, Z.; Reiner, E.; Simeon-Rudolf, V.; Stojan, J. Mechanism of stereoselective interaction between butyrylcholinesterase and ethopropazine enantiomers. *Biochimie* **2011**, *93*, 1797–1807.
55. Darvesh, S.; Hopkins, D. A.; Geula, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 131–138.
56. Cattozzo, G.; Franzini, C.; Rettondini, M. Dibucaine number measured with the Ektachem. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 1545–1546.
57. 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*, 41141–41147.
58. Marrs, T. C. Organophosphates poisoning. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58*, 51–66.
59. Weiner, L.; Shnyrov, V.L.; Konstantinovskii, L.; Roth, E.; Ashani, Y.; Silman, I. Stabilization of *Torpedo californica* Acetylcholinesterase by Reversible Inhibitors. *Biochemistry* **2009**, *48*, 563–574.
60. Marrs, T. C.; Organophosphate anticholinesterase poisoning. *Tox. Subst. Mech.* **1996**, *15*, 357–388.
61. Eddleston, M.; Phillips, M.R. Self poisoning with pesticides. *Br. Med. J.* **2004**, *328*, 42–44.
62. Kwong, T. C. Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug. Monit.* **2002**, *24*, 144–149.
63. Cummings, J. L.; Nadel, A.; Masterman, D.; Cyrus, P. A.; Efficacy of metrifonate in improving the psychiatric and behavioral disturbances of patients with Alzheimer's disease. *J. Geriatr. Psychiatry. Neurol.* **2001**, *14*, 101–108.
64. Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **2004**, *38*, 151–216.
65. Leibson, T.; Lifshitz, M. Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in southern Israel. *Isr. Med. Assoc. J.* **2008**, *10*, 767–770.
66. Bajgar, J.; Fusek, J.; Kuca, K.; Bartosova, L.; Jun, D.; Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: Facts and fiction. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 461–466.
67. Pope, C. N. Organophosphorus pesticides: Do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Env. Health.-Pt. b-Crit. Rev.* **1999**, *2*, 161–181.

68. Eddleston, M.; Eyer, P.; Worek, F.; Mohamed, F.; Senarathna, L.; von Meyer, L.; Juszczak, E.; Hittarage, A.; Azhar, S.; Dissanayake, W. Differences between organophosphorus insecticides in human self-poisoning: a prospective cohort study. *Lancet* **2005**, *366*, 1452–1459.
69. Costa, L. G. Current issues in organophosphate toxicology. *Clin. Chim. Acta.* **2006**, *366*, 1–13.
70. Soukup, O.; Tobin, G.; Kumar, U. K.; Binder, J.; Proska, J.; Jun, D.; Fusek, J.; Kuca, K. Interaction of Nerve Agent Antidotes with Cholinergic Systems. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1708–1718.
71. Bajgar, J.; Kuca, K.; Fusek, J.; Karasova, J.; Kassa, J.; Cabal, J.; Jun, D.; Blaha, V. Inhibition of blood cholinesterases following intoxication with VX and its derivatives. *J. App. Toxicol.* **2007**, *27*, 458–463.
72. Masuda, N.; Takatsu, M.; Morinari, H.; Ozawa, T. Sarin poisoning in Tokyo subway. *Lancet* **1995**, *345*, 1446–1446.
73. Eddleston, M.; Buckley, N. A.; Eyer, P.; Dawson, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* **2008**, *371*, 597–607.
74. Pohanka, M.; Drtinova, L.; Kuca, K. Acetylcholinesterase based assay of eleven organophosphorus pesticides: finding of assay limitations. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2012**, *92*, 125–132.
75. Husain, K.; Ansari, R. A.; Ferder, L.; Pharmacological agents in the prophylaxis/treatment of organophosphorous pesticide intoxication. *Indian. J. Exp. Biol.* **2010**, *48*, 642–650.
76. Doctor, B. P.; Saxena, A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157*, 167–171.
77. Sanaei-Zadeh, H.: Atropine dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning: *Am. J. Emerg. Med.* **2012**, *30*, 628–628.
78. Kuca, K.; Jun, D.; Musilek, K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 269–277.
79. Buckley, N. A.; Eddleston, M.; Li, Y.; Bevan, M.; Robertson, J. Oximes for acute organophosphate pesticide poisoning. *Cochrane Db. Syst. Rev.* **2011**, *95*, 275–283.
80. Kuca, K.; Hrabnova, M.; Soukup, O.; Tobin, G.; Karasova, J.; Pohanka, M. Pralidoxime - the gold standard of acetylcholinesterase reactivators - reactivation in vitro efficacy. *Bratislava Med. J.* **2010**, *111*, 502–504.

81. Kuca, K.; Musilek, K.; Jun, D.; Pohanka, M.; Karasova, J.Z.; Novotny, L.; Musilova, L. Could oxime HI-6 really be considered as "broad-spectrum" antidote? *J. Appl. Biomed.* **2009**, *7*, 143–149.
82. Everitt, B. J.; Robbins, T. W.; Central cholinergic systems and cognition. *Annu. Rev. Psychol.* **1997**, *48*, 649–684.
83. Birks, J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Db Syst. Rev.* [Online] **2008**, *1*.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005593/full> (accessed Jan 21, 2009)
84. Akiyama, H.; Barger, S.; Barnum, S.; Bradt, B.; Bauer, J.; Cole, G. M.; Cooper, N. R.; Eikelenboom, P.; Emmerling, M.; Fiebich, B.L. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2000**, *21*, 383–421.
85. Juel, V. C.; Massey, J. M.; Myasthenia gravis. *Orphanet J. Rare Dis.* [Online] **2007**, *2*. <http://www.OJRD.com/content/2/1/44> (accessed Nov 6, 2007)
86. Pohanka, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap. Med. Olomouc* **2011**, *155*, 219–229.
87. Komloova, M.; Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Structure-Activity Relationship of Quaternary Acetylcholinesterase Inhibitors - Outlook for Early Myasthenia Gravis Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1810–1824.
88. Coelho, F.; Birks, J. Physostigmine for Alzheimer's disease. *Cochrane Db. Syst. Rev.* [Online] **2001**, *2*.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD001499/full> (accessed Jun 1, 2008)
89. Nordberg, A.; Svensson, A. L. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease - A comparison of tolerability and pharmacology. *Drug. Saf.* **1998**, *19*, 465–480.
90. Darvesh, S.; Darvesh, K. V.; McDonald, R. S.; Mataija, D.; Walsh, R.; Mothana, S.; Lockridge, O.; Martin, E. Carbamates with differential mechanism of inhibition toward acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4200–4212.
91. Andersen, J. B.; Engeland, A.; Owe, J.F.; Gilhus, N. E. Myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. *Eur. J. Neurol.* **2010**, *17*, 1445–1450.

92. Haigh, J. R.; Adler, M.; Apland, J. P.; Deshpande, S. S.; Barham, C. B.; Desmond, P.; Koplovitz, I.; Lenz, D.E.; Gordon, R.K. Protection by pyridostigmine bromide of marmoset hemi-diaphragm acetylcholinesterase activity after soman exposure. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *187*, 416–420.
93. Weintraub, D.; Somogyi, M.; Meng, X.; Rivastigmine in Alzheimer's disease and Parkinson's disease dementia: an ADAS-cog factor analysis. *Am. J. Alzheimers Dis.* **2011**, *26*, 443–449.
94. Eddleston, M.; Dawson, A.; Karalliedde, L.; Dissanayake, W.; Hittarage, A.; Azher, S.; Buckley, N. A. Early management after self-poisoning with an organophosphorus or carbamate pesticide - a treatment protocol for junior doctors. *Crit. Care* **2004**, *8*, 22–22.
95. Blackard, W. G.; Sood, G. K.; Crowe, D. R.; Fallon, M. B.; Tacrine. A cause of fatal hepatotoxicity? *J. Clin. Gastroenterol.* **1998**, *26*, 57-59.
96. Patocka, J.; Jun, D.; Kuca, K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Drug. Metab.* **2008**, *9*, 332–335.
97. Bajgar, J.; Bisso, G. M.; Michalek, H. Differential inhibition of rat brain acetylcholinesterase molecular forms by 7-methoxytacrine in vitro. *Toxicol. Lett.* **1995**, *80*, 109–114.
98. Korabecny, J.; Musilek, K.; Zemek, F.; Horova, A.; Holas, O.; Nepovimova, E.; Opletalova, V.; Hroudova, J.; Fisar, Z.; Jung, Y. S.; Kuca, K. Synthesis and in vitro evaluation of 7-methoxy-N-(pent-4-enyl)-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-amine-new tacrine derivate with cholinergic properties. *Bioorg.Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6563–6566.
99. Giacobini, E.; Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochem. Int.* **1998**, *32*, 413–419.
100. Peters, O.; Lorenz, D.; Fesche, A.; Schmidtke, K.; Hull, M.; Pernecky, R.; Ruther, E.; Moller, H. J.; Jessen, F.; Maier, W. A Combination of galantamine and memantine modifies cognitive function in subjects with amnesic MCI. *J. Nutr. Health Aging* **2012**, *16*, 544–548.
101. Hopkins, T. J.; Rupprecht, L. E.; Hayes, M. R.; Blendy, J. A.; Schmidt, H. D. Galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor and positive allosteric modulator of nicotinic acetylcholine receptors, attenuates nicotine taking and seeking in rats. *Neuropsychopharmacology* [Online] **2012**, *6*.

<http://www.nature.com/npp/journal/vaop/ncurrent/full/npp201283a.html>

(accessed Jun 6, 2012)

102. Jung, H. A.; Min, B. S.; Yokozawa, T.; Lee, J.H.; Kim, Y. S.; Choi, J. S. Anti-alzheimer and antioxidant activities of Coptidis Rhizoma alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* **2009**, *32*, 1433–1438.
103. Axelsen, P. H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: synergistic use of molecular dynamics simulation and X-ray crystallography. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 188-197.
104. Chu, L. W. Alzheimer's disease: early diagnosis and treatment. *Hong Kong Med. J.* **2012**, *18*, 228–237.
105. Castro, A.; Martinez, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4377-4387.
106. Raves, M. L.; Harel, M.; Pang, Y. P.; Silman, I.; Kozikowski, A. P.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57–63.
107. Mesulam, M.; Guillozet, A.; Shaw, P.; Quinn, B. Widely spread butyrylcholinesterase can hydrolyze acetylcholine in the normal and Alzheimer brain. *Neurobiol. Dis.* **2002**, *9*, 88–93.
108. Ballard, C. G. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: Benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur. Neurol.* **2002**, *47*, 64–70.
109. Rafii, M. S.; Walsh, S.; Little, J. T.; Behan, K.; Reynolds, B.; Ward, C.; Jin, S.; Thomas, R.; Aisen, P. S. A phase II trial of huperzine A in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology* **2011**, *76* , 1389–1394.
110. Li, J.; Wu, H. M.; Zhou, R. L.; Liu, G.J; Dong, B. R. Huperzine A for Alzheimer's disease. *Cochrane Db. Syst. Rev.*[Online] **2008**, *16*.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005592.pub2/full>
(accessed Jan 1, 2009) .
111. Kryger, G.; Silman, I.; Sussman, J. L. Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure* **1999**, *7*, 297–307.
112. Burke, D. Donepezil or memantine improved cognitive functioning in moderate-to-severe Alzheimer disease. *Ann. Intern. Med.* **2012**, *156*, JC6–10.

113. Bajgar, J.; Jun, D.; Kuca, K.; Fusek, J.; Karasova, J.Z.; Kassa, J.; Cabal, J.; Blaha, V.: Inhibition of blood cholinesterases by nerve agents in vitro. *J. App. Biomed.* **2009**, *7*, 201–206.
114. Cuartero, M.; Ortuno, J. A.; Garcia, M. S.; Garcia-Canovas, F. Assay of acetylcholinesterase activity by potentiometric monitoring of acetylcholine. *Anal. Biochem.* **2012**, *421*, 208–212.
115. Kuca, K.; Cabal, J.; Jun, D.; Hrabínova, M.; In vitro evaluation of acetylcholinesterase reactivators as potential antidotes against tabun nerve agent poisonings. *Drug Chem. Toxicol.* **2006**, *29*, 443–449.
116. Johnson, C. D.; Russell, R. L. A rapid, simple radiometric assay for cholinesterase, suitable for multiple determinations. *Anal. Biochem.* **1975**, *64*, 229–238.
117. Kikuchi, T.; Okamura, T.; Arai, T.; Obata, T.; Fukushi, K.; Irie, T.; Shiraishi, T. Use of a novel radiometric method to assess the inhibitory effect of donepezil on acetylcholinesterase activity in minimally diluted tissue samples. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 1732–1742.
118. Prince, A. K. A sensitive fluorometric procedure for the determination of small quantities of acetylcholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* **1966**, *15*, 411–417.
119. Birman, S.; Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochem. J.* **1985**, *225*, 825–828.
120. Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
121. Sinko, G.; Calic, M.; Bosak, A.; Kovarik, Z.; Limitation of the Ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 223–227.
122. Worek, F.; Mast, U.; Kiderlen, D.; Diepold, C.; Eyer, P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta.* **1999**, *288*, 73–90.
123. Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K.; Opletalova, V.; Jung, Y. S. In vitro Screening of Oxime Reactivators on the Model of Paraoxon-inhibited Acetylcholinesterase-SAR Study. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2010**, *31*, 1609–1614.

124. Musilek, K.; Holas, O.; Misik, J.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Kuca, K. Monooxime-monocarbamoyl Bispyridinium Xylene-Linked Reactivators of Acetylcholinesterase-Synthesis, In vitro and Toxicity Evaluation, and Docking Studies. *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 247–254.
125. Briggs, G. E.; Haldane, J. B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* **1925**, *19*, 338–339.
126. Kuca, K.; Cabal, J.; Kassa, J.; Jun, D.; Hrabínová, M. Comparison of in vitro potency of oximes (pralidoxime, obidoxime, HI-6) to reactivate sarin-inhibited acetylcholinesterase in various parts of pig brain. *J. App. Toxicol.* **2005**, *25*, 271–276
127. Park, N. J.; Jung, Y. S.; Musilek, K.; Jun, D.; Kuca, K. Potency of several structurally different acetylcholinesterase reactivators to reactivate house fly and bovine acetylcholinesterases inhibited by paraoxon and DFP. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2006**, *27*, 1401–1404.
128. Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Dolezal, M. Synthesis of a novel series of non-symmetrical bispyridinium compounds bearing a xylene linker and evaluation of their reactivation activity against tabun and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22*, 425–432.

11 Přílohy