

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Modulace aktivity acetylcholinesterasy
vybranými organickými látkami**

**Modulation of acetylcholinesterase activity using
different organic compounds**

Vedoucí: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Školitel: mjr. doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Hradec Králové

Bc. Petra Vavrošová

2013

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

Práce vznikla s podporou programu Specifický výzkum na vysokých školách SVV267001/2013.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2013.

.....
Podpis:

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě poděkovat vedoucí mé práce paní doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za všechny rady, připomínky a odbornou pomoc při vyhotovování diplomové práce. Největší dík patří mému školiteli panu mjr. doc. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D. za trpělivost, ochotu a strávený čas, jak při vyhotovování praktické části, tak zpracování práce samotné.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Student: **Petra Vavrošová**

Vedoucí DP: **doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.**

Název práce: **Modulace aktivity acetylcholinesterasy vybranými organickými látkami**

Acetylcholinesterasa je životně důležitý enzym pro svou schopnost ukončení nervového impulsu cestou rozkladu neuromediátoru acetylcholinu. Inhibitory cholinesteras jsou látky užívané v mnoha odvětvích, ať už jako léčiva, pesticidy, nebo látky zneužívané jako biologické zbraně. V této práci se metodou sledování poklesu aktivity enzymu působením vybraných látek zjišťovala přítomnost inhibice, její míra a charakter. K experimentům byli vybráni zástupci tříd organických rozpouštědel, solí kovů, či látky jiné, jako je např. želatina, takrin, kofein. Ke zjištění poklesu aktivity acetylcholinesterasy byla použita spektrofotometrická metoda dle Ellmana, data byla vyhodnocena pomocí grafických znázornění podle Dixona a Boltzmannova. K pokusům byla použita acetylcholinesterasa z elektrického úhoře.

Výsledky poukázaly na schopnost celé řady látek inhibovat acetylcholinesterasu, u jiných naopak tuto vlastnost vyvrátily. Existence inhibitorů cholinesteras se potvrdila jak u řady zástupců solí kovů, tak u organických rozpouštědel. Výstup práce má posloužit jako podklad a souhrnný zdroj informací o vybraných inhibitech cholinesteras pro další prováděné experimenty na poli inhibice či jiných mechanismů působení látek na acetylcholinesterasu.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, inhibice, spektrofotometrické stanovení, Alzheimerova choroba, inhibitor

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: **Petra Vavrošová**

Supervisor: **Assoc. Prof. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.**

Title of thesis: **Modulation of acetylcholinesterase activity using different organic compounds**

Acetylcholinesterase is a vital enzyme because of its ability to end a nerve impulse by decomposition of neurotransmitter acetylcholin. Inhibitors of cholinesterases have been used in many sectors, such as drugs, pesticides, or substances abused as biological weapons. Using chosen agents an existence of acetylcholinesterase inhibition was detected together with its rate and character. The detection was accomplished by the method of measuring the decrease of acetylcholinesterase activity. In this experiment some organic solvents, metal salts, and other agents like gelatine, tacrine or caffeine were used. Ellman's spectrophotometrical detection was used to determine the decrease of acetylcholinesterase activity. The data were evaluated by the graphical representation by Dixon and Boltzmann. In this experiment the acetylcholinesterase from electric eel was used.

Results showed that many chosen agents have the ability to inhibit acetylcholinesterase and on the other hand many of them do not have this property. It was proved that there are inhibitors of cholinesterase both among metal salts and organic solvents. This thesis should serve as a base and a comprehensive source of information about chosen cholinesterase inhibitors, and for the following experiments related to inhibition or other mechanisms of action of substances on acetylcholinesterase.

Key words: acetylcholinesterase, inhibition, spectrophotometrical detection, Alzheimer's disease, inhibitors

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	8
1 ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1 Vegetativní nervový systém	10
2.1.1 Acetylcholin (ACh)	10
2.1.1.1 Receptory pro ACh	11
2.1 Cholinesterasy	13
2.1.1 Acetylcholinesterasa (AChE)	13
2.1.1.1 Molekulární struktura AChE	13
2.1.1.2 Funkce AChE	15
2.1.2 Butyrylcholinesterasa (BChE)	15
2.1.2.1 Molekulární struktura BChE	15
2.1.2.2 Funkce BChE	16
2.2 Inhibitory cholinesteras (IChE)	17
2.2.1 Organofosforové inhibitory (OFI)	17
2.2.1.1 Organofosforové pesticidy	18
2.2.1.2 Nervově paralytické látky (NPL)	18
2.2.2 Karbamáty	19
2.3 Anticholinergika (funkční antidota)	21
2.4 Reaktivátory cholinesteras (kauzální antidota)	21
2.5 Alzheimerova choroba	22
2.5.1 Léčba AD	24
2.5.1.1 Inhibitory acetylcholinesterasy (IAChE)	24
2.6 Myasthenia gravis (MG)	28
2.6.1 Léčba MG	29
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
3.1 Metodika stanovení aktivity AChE	30
3.1.1 Ellmanova metoda	30
3.2 Použité chemikálie	31
3.3 Pomůcky a přístroje	31
3.4 Měření pomocí spektrofotometru	32
3.4.1 Měření slepého vzorku	32

3.4.2	Měření vzorků.....	32
3.4.3	Měření kontroly	33
3.4.4	Měření koncentrační řady vzorků s různou koncentrací substrátu	33
3.5	Vyhodnocení podle Dixona.....	34
3.6	Vyhodnocení podle Boltzmannna	36
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
4.1	Vyhodnocení inhibice AChE	37
4.1.1	Kofein, takrin, albumin a želatina.....	37
4.1.1	Soli kovů.....	39
4.1.2	Organická rozpouštědla	45
5	ZÁVĚR	49
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChR	acetylcholinové receptory
AD	Alzheimerova choroba
APP	amyloidový prekurzorový protein
Asp	kyselina asparagová
ATCh	acetylthiocholin
ATChCl	acetylthiocholin-chlorid
BChE	butyrylcholinesterasa
CNS	centrální nervová soustava
Cys	cystein
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
GSK 3 β	glykogen syntasa kinasa 3 β
IACHe	inhibitory acetylcholinesterasy
IC50	střední inhibiční koncentrace
IChE	inhibitory cholinesteras
K _i	rovnovážná inhibiční konstanta
MG	myasthenia gravis
MHC II	hlavní histokompatibilní komplex II
M-receptory	muskarinové receptory
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NPL	nervově paralytické látky
N-receptory	nikotinové receptory
NSAIDs	nesteroidní antiflogistika (Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs)
OFl	organofosforové inhibitory
PBS	fyzilogický roztok pufovaný fosfátem (Phosphate Buffered Saline)
UV-VIS	ultrafialová – viditelná oblast světla
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym hrající důležitou roli v ukončení nervového impulsu především v dráhách parasympatického nervového systému, na nervosvalových ploténkách a v cholinergních drahách centrální nervové soustavy.

Snížením aktivity nebo inhibicí tohoto významného neuronálního enzymu dochází ke zvýšení koncentrace acetylcholinu (ACh) v synaptické štěrbině nebo na nervosvalovém spojení a zvýšené stimulaci postgangliových neuronů, popř. cílových orgánů. Tím se zvyšuje acetylcholinergní transmise. Tohoto se využívá např. u léčby Alzheimerovy nemoci, či jiných demencí, kdy se zablokováním acetylcholinesterasy v mozku dosáhne zvýšení obsahu mozkového ACh a tím i zlepšení paměťových funkcí. Inhibitory tohoto enzymu se používají také u léčby glaukomu nebo onemocnění myasthenia gravis. Kromě využití pro léčebné účely se inhibitory cholinesteras používají k usmrcování hmyzu, jako organofosforové nebo karbamátové insekticidy, nebo mohou být zneužity jako biologické zbraně.¹

Tato práce je zaměřena na sledování účinku různých látek na acetylcholinesterasu, a zhodnocení, zda se jedná o látku snižující aktivitu enzymu či nikoliv. Pro testování byla vybrána některá důležitá organická rozpouštědla, soli různých kovů, ale i látky vyskytující se fyziologicky v lidském organismu. Pro každou sledovanou látku byla stanovena míra inhibice acetylcholinesterasy.

Cílem práce je poskytnutí zjištěných dat o rozsahu inhibičního působení vybraných látek a veškerých poznatků, které budou dále využity pro další experimenty.

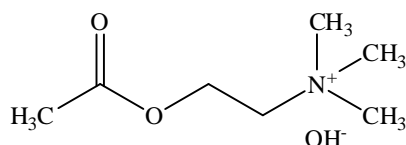
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vegetativní nervový systém

Vegetativní nervový systém, též autonomní nervový systém, kontroluje funkci hladkých svalů, exokrinní sekreci, funkci srdce a gastrointestinálního traktu i určité metabolické pochody (utilizace glukosy). Dělí se dle mediátoru, který se uvolňuje na zakončení postgangliových vláken na adrenergní a cholinergní systém.

Zatímco u adrenergního – sympatického – systému jsou neurotransmitery katecholaminy (noradrenalin, adrenalin a dopamin), v cholinergním – parasympatickém – systému je specifickým mediátorem **ACh**. V řadě případů působí systémy protichůdně. Aktivita sympatiku umožňuje zvládnout stresovou situaci, má za úkol aktivovat vše, co umožňuje boj nebo útěk. Aktivita parasympatiku převládá v klidových podmínkách. Umožňuje regeneraci, růst, zotavení, ale také dobré trávení. Za normálních okolností jsou oba systémy v rovnováze.²

2.1.1 Acetylcholin (ACh)



ACh zprostředkovává přenos nervového impulzu z nervového vlákna presynaptického na postsynaptické, taktéž u napojení nervů, například na nervosvalovém spojení. Přenáší vzruchy na pregangliových vláknech obou vegetativních systémů. Co se týká postgangliových vláken, u parasympatiku se účastní přenosu na všech, u sympatiku pouze na některých zakončeních (např. potní žlázy). Dále je mediátorem na nervosvalové ploténce a v cholinergních drahách centrální nervové soustavy.

ACh se tvoří v nervovém zakončení reakcí cholinu s kyselinou octovou. Tato je aktivována spojením acetylové skupiny s redukováným koenzymem A. Cholin acetyltransferasa slouží jako katalyzátor reakce mezi aktivním acetátem a cholinem.^{3,4}

Po syntéze je ACh v buňce skladován v tzv. synaptických váčcích, z nichž se při přenosu nervového vzruchu uvolňuje do synaptické štěrbině, a pak reaguje s integrální

bílkovinou postsynaptické membrány – acetylcholinovým receptorem (AChR) muskarinového nebo nikotinového typu.⁵

2.1.1.1 Receptory pro ACh

Receptory pro ACh jsou dvojího typu: muskarinové a nikotinové. Muskarinové receptory jsou spřažené s G-proteinem, dají se aktivovat alkaloidem muskarinem z muchomůrky červené (*Amanita muscaria*). Jsou to receptory na membránách buněk cílových orgánů. Nikotinové receptory jsou členem iontových kanálů řízených ligandy, dokáže je stimulovat alkaloid nikotin. Tyto receptory se nacházejí na synapsích v CNS, v gangliích a nervosvalové ploténce.²

MUSKARINOVÉ RECEPTORY (M-receptory)

M-receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem. Celkem je známo pět typů M1 – M5. Receptorový protein představuje transmembránově uspořádaný peptidový řetězec, který prochází fosfolipidovou membránou buněčné stěny sedmkrát ve formě α -šroubovic. Tyto α -šroubovice jsou pravděpodobně uspořádány do kruhu a vytvářejí tak ve svém středu prohlubeň s vazebným místem pro neurotransmitter. K přenosu signálu slouží G-protein přiléhající na vnitřní list fosfolipidové dvojvrstvy. G-protein má tři podjednotky, α (5 kDa), β (35kDa) a γ (7kDa).⁶

Receptory se dělí na několik typů: M1 – neuronální (vyskytují se na nervových buňkách, např. v gangliích, CNS, parietálních buňkách žaludku). M2 receptory přenášejí efekty acetylcholinu v srdci, ale i v hladké svalovině a neuronální tkáni. M3 mají význam pro tonus hladké svaloviny např. v močovém měchýři, střevě, bronších. Vyskytují se také na buňkách žláz – potních slinných, slzných – kde po stimulaci vyvolají zvýšení sekrece. Muskarinové receptory mohou být blokovány atropinem.^{2,7}

NIKOTINOVÉ RECEPTORY (N-receptory)

Nikotinové acetylcholinové receptory jsou členy nadrodiny iontových kanálů řízených ligandy. Receptorový komplex se skládá z pěti proteinových podjednotek, které jsou ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčné membrány uspořádány tak, že středem této pětičlenné skupiny molekul probíhá transmembránový kanál. Každou z těchto podjednotek tvoří bílkovinné vlákno, které ve formě α -šroubovice čtyřikrát prochází membránou.

Dvě z těchto podjednotek jsou identické: jsou to tzv. α -podjednotky. Mají vždy jedno vysoce specifické vazebné místo pro ACh. Navážou-li se současně dvě molekuly ACh na obě α -podjednotky, otevře se iontový kanál, do buňky vstoupí Na^+ , z buňky vystoupí K^+ , membrána se depolarizuje a vzniká akční potenciál.^{6,7}

Celkem je známo 17 typů podjednotek: $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ a ϵ . Kromě ptačího subtypu $\alpha 8$ se u savců vyskytují všechny podjednotky. ACh je však schopen vazby pouze s $\alpha 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8$. Ostatní typy podjednotek stabilizují strukturu zvenčí. Pentamerní uspořádání receptoru může být různého složení: např. pentamer $\alpha 7, 2 \times \alpha 2 - 3 \times \beta 2$, a jiné.³

Existují dva hlavní typy N-receptorů, které se od sebe liší svými podjednotkami: nervový typ N_N ve vegetativních gangliích a v mozku, a svalový typ N_M na nervosvalové ploténce.

K ukončení nervového přenosu slouží enzym **acetylcholinesterasa**, patřící do skupiny cholinesteras, která v synapsích odbourává acetylcholin.

2.1 Cholinesterasy

Jako cholinesterasy se označuje skupina enzymů, které katalyzují hydrolytické štěpení esterů cholinu. Jsou to serinové hydrolázy, které katalyzují hydrolyzu neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. Obecná reakce katalyzovaná esterasy je následující



Cholinesterasy v lidském těle se dělí na dvě skupiny podle své afinity k přirozenému substrátu acetylcholinu.⁸

2.1.1 Acetylcholinesterasa (AChE)

První z enzymů cholinesteras, **acetylcholinesterasa** (číslo dle klasifikace enzymů E.C. 3.1.1.7), také nazývaná pravá nebo specifická cholinesterasa, se nachází v erythrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině, srdci a ve všech oddílech mozku. Jedná se o membránově vázaný glykoprotein existující v mnoha molekulárních formách. Vzniká v ribozomech jaterních buněk a je secernována do krve. Optimální pH pro funkci AChE je 7,4 - 8.⁹

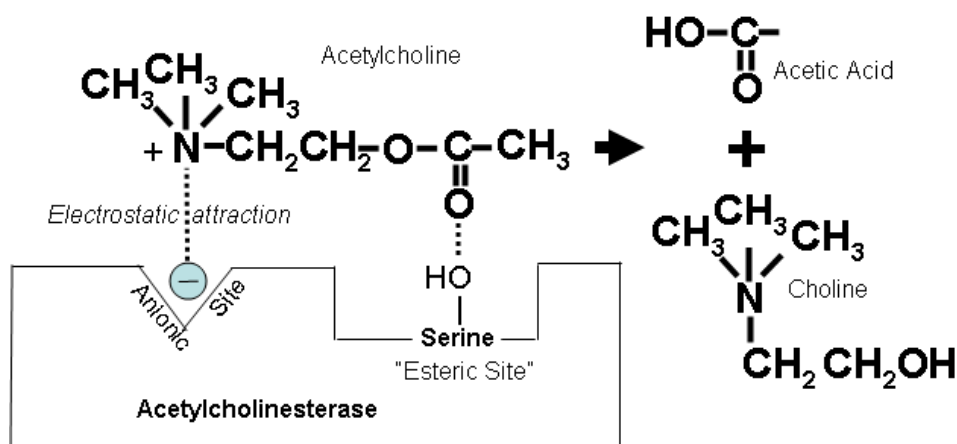
2.1.1.1 Molekulární struktura AChE

Molekula AChE v nativním stavu je složena ze dvou alfa a dvou beta polypeptidových řetězců. Jedná se tedy o tetrametr o složení alfa₂beta₂ patřící do skupiny serinových proteas. Primární struktura AChE se skládá z 537 aminokyselin s Asp-1 na N-konci a Cys-537 na C-konci. Monomer AChE je elipsoidní molekula s molekulovou hmotností přibližně 69 kDa a rozměry přibližně 45 × 60 × 65 Å. Je tvořen dvanácti centrálně stočenými β-skládanými listy, které jsou obklopeny čtrnácti α-helixy.^{4, 5, 10}

AKTIVNÍ CENTRUM

Nejdůležitějším místem v molekule AChE je tzv. **aktivní místo** (někdy též aktivní/katalytické centrum), které leží uvnitř 20 Å hluboké dutiny nazývané aromatická štěrbina (aromatic gorge) Tato štěrbina proniká hlouběji než do poloviny enzymu a je lemována čtrnácti aromatickými zbytky. Penetrace substrátu do štěrbiny je umožněna kation- π interakcemi mezi kvartérním dusíkem ACh a π -elektrony fenylalaninu, tryptofanu a tyrosinu.^{4,11}

Aktivní centrum se skládá ze dvou podjednotek: *esterové (katalytické) části*, která obsahuje tzv. katalytickou triádu, a *anionické části*, ke které se váže kvartérní skupina substrátu acetylcholinu (α -anionické místo).



Obr. č. 1 Navázání ACh a jeho rozklad

(převzato z <http://images.wikia.com/analytical/images/f/fd/Acetylcholinesterase.png>)

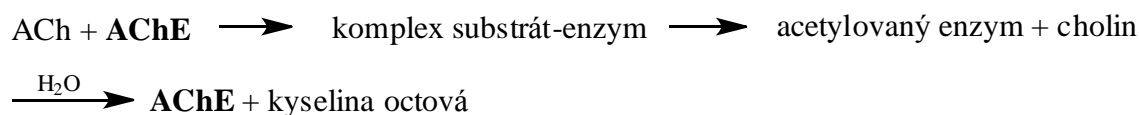
Katalytická triáda v **esterové části** je podobná jako u ostatních serinových proteas. Je tvořena trojicí aminokyselin: serinem, histidinem a kyselinou glutamovou. Hydroxylová skupina serinu se využívá k přenosu acetylů z ACh na enzym.^{9,10}

Periferní anionické místo (β -anionické místo) se nachází při vstupu do aromatické štěrbiny. Toto místo je popsáno jako cíl mnohačetné modulace aktivity AChE. Je cílem celé řady toxinů, ale i nadějných léků. Anionické místo pravděpodobně hraje důležitou roli ve vývoji Alzheimerovy demence (AD). β -amyloid tvořící se u této choroby reaguje s periferním anionickým místem, čehož výsledkem je tvorba amyloidního plaku vedoucí k destrukci cholinergních neuronů. V mozku demenčních nemocných je aktivita AChE přímo úměrná množství amyloidu v CNS.^{9,11,12}

2.1.1.2 Funkce AChE

Acetylcholinesterasa má největší afinitu k ACh, který je po uvolnění do synapse rychle štěpen AChE za vzniku cholinu a kyseliny octové. Tato reakce je nezbytná k tomu, aby se cholinergní neuron vrátil po aktivaci do klidového stavu.⁹

Hydrolyza ACh katalytickým působením AChE probíhá ve více stupních. ACh se nejprve naváže svým kvarterním dusíkem na α -aniontovou část enzymu a karboxylovou skupinou na esterové místo molekuly AChE. Vzniká komplex enzym-substrát. Dochází k přenosu acetylu na hydroxylovou skupinu serinu a po odštěpení cholinu tak vzniká acetylovaný enzym, který je nestálý a reaguje s vodou za vzniku AChE a kyseliny octové. AChE je pak připravena štěpit další molekuly ACh.⁵



2.1.2 Butyrylcholinesterasa (BChE)

Druhým enzymem ze skupiny cholinesteras je sérová cholinesterasa – **butyrylcholinesterasa** (č. E.C 3.1.1.8) zvaná nespecifická, popř. pseudocholinesterasa. BChE je lokalizována v játrech (kde se i syntetizuje), v plazmě, pankreatu, v bílé hmotě mozkové, střevní sliznici nebo v intersticiální tekutině. Kromě jater je BChE syntetizována v plicích, srdci a mozku.¹⁰

2.1.2.1 Molekulární struktura BChE

Primární struktura BChE se skládá z 574 aminokyselin. Její molekulová hmotnost je asi 85 kDa. Na rozdíl od AChE je BChE tvořena jen jedním polypeptidickým řetězcem. Molekula BChE obsahuje asi 25 % sacharidů. BChE se vyskytuje stejně jako AChE zejména v tetramerní formě G4, mohou se však vyskytovat dimery G2, které mohou být vylučovány jako molekuly rozpustné ve vodě, popř. i monomery G1, které se tvoří zejména v mozku u lidí trpících demencí (např. AD).^{4, 12}

2.1.2.2 *Funkce BChE*

Stejně jako má AChE vyšší afinitu k acetylcholinu, má BChE vyšší afinitu k butyrylcholinu, který však oproti acetylcholinu není tělu vlastní. BChE je na rozdíl od AChE schopna hydrolyzy vysokomolekulárních esterů. Obecně má BChE nižší substrátovou specifitu. Přednostně rozkládá butyrylcholin, může však rozkládat i jiné substráty, včetně ACh. Rozdíly v afinitách k různým substrátům jsou pravděpodobně způsobené různým uspořádáním aromatické štěrbiny.⁴

Dlouhou dobu nebyla fyziologická funkce BChE jasná. V současnosti je známo, že BChE hraje významnou roli například v metabolismu lipoproteinů, jako scavenger toxických látek – tedy má roli jakéhosi „čističe“ od těchto látek. Účastní se zpracování amyloid prekurzorového proteinu, při hydrolyze necholinových esterů jako jsou lokální anestetika (prokain, suxamethonium, kokain), kyselina acetylsalicylová. BChE může být užitečná při léčbě závislosti na kokainu.^{5,9}

2.2 Inhibitory cholinesteras (IChE)

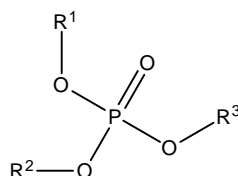
Do skupiny IChE patří různé léky, přírodní toxiny, pesticidy nebo chemické bojové látky. Jedná se o širokou skupinu látek různých fyzikálně chemických vlastností. Zablokováním ChE se zpomaluje rozklad ACh, aktuální koncentrace ACh se zvyšuje a tím se zvyšuje acetylcholinergní neurotransmise.^{4, 6}

Nejdůležitější IChE lze rozdělit do dvou skupin:

- reverzibilní inhibitory (převážně sloučeniny obsahující kvartérní dusík)
- ireverzibilní inhibitory (estery kyseliny fosforečné nebo fosfonové)

Do skupiny **reverzibilních** inhibitorů patří sloučeniny s kvartérním dusíkem v molekule. Například fysostigmin (indolový alkaloid ze semen liány *Physostigma venenosum*) a dále syntetické látky, např. neostigmin, pyridostigmin. Všechny tyto látky jsou estery mono nebo disubstituované karbamové kyseliny (karbamáty). Inhibitory **ireverzibilní** jsou zastupovány estery kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Používají se jako insekticidy a mají toxikologický význam.⁶

2.2.1 Organofosforové inhibitory (OFI)



OFI jsou synteticky vyrobené estery kyseliny *ortho-*, *thio-*, nebo pyrofosforečné. Jediným přirozeně se vyskytujícím zástupcem je anatoxin-a(s), neurotoxický alkaloid některých druhů cyanobakterií. Všechny ostatní OFI jsou produkovány člověkem a používají se buďto jako pesticidy, či jako bojové otravné látky.⁹

Jako IChE působí OFI tak, že se váží kovalentní vazbou na serin v esterovém místě aktivního centra AChE. Zablokováním enzymu odbourávajícího ACh, dochází k jeho hromadění, neschopnosti neuronů ukončení vedení signálu v cholinergních nervových vláknech. Dle dávky a distribuce inhibitoru v organismu pak může docházet k různě závažným změnám v centrální i periferní nervové soustavě. Stav může končit až cholinergní krizí a život ohrožujícími stavy, zejména poškozením dýchacího centra.¹³

OFI dokážou velmi dlouhodobě a za určitých okolností ireverzibilně fosforylovat nebo fosfonylovat esteratické centrum AChE. Inhibice způsobená OFI je tedy ireverzibilní. Při použití kauzativních antidot (tzv. reaktivátorů) však dojde ke štěpení vazby a k reaktivaci inhibovaného enzymu.^{6, 13}

2.2.1.1 Organofosforové pesticidy

OFI mají velmi silné insekticidní účinky a po použití se velmi rychle rozpadají. Proto našly široké uplatnění k ochraně rostlin. Díky svým účinkům začaly OFI postupně nahrazovat dříve používané organochlorové pesticidy, a tím odstranily některé jejich nevýhody. Naopak se ukázalo, že svou toxicitou přispívají k velkému množství otrav.^{6, 13}

Jsou to po dlouhá léta používané látky v boji proti různým škůdcům v zemědělství a lesnictví. Ačkoli jsou známy jejich toxické účinky na člověka i zvířata, mnoho z nich je stále používáno.¹³

Mezi zástupce takovýchto pesticidů patří malathion, diazinon, fluostigmin nebo také jeden z nejnebezpečnějších – paraoxon.

Jako potenciálně nejrizikovější se z organofosfátů jeví dimethoat v současnosti používaný jako akaricid (přípravek k hubení roztočů), insekticid a nematocid (k hubení hlístic) pro většinu v současnosti běžně pěstovaných polních plodin, či ovocných stromů. Toxicita pro teplokrevné organismy a vodní biotu je poměrně vysoká.¹³

2.2.1.2 Nervově paralytické látky (NPL)

Mezi OFI náleží i nervově paralytické látky (NPL) známé ve vojenství. Jsou to vysoce toxické látky s velmi rychlým nástupem účinku. Dostávají se do organismu všemi branami vstupu, zejména dýcháním, přes kůži. Jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek.¹⁴

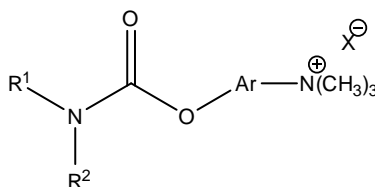
NPL se dělí na dvě velké skupiny, které jsou obecně označovány jako G látky a V látky. Starší skupinou jsou **G látky**. Tyto byly vyvinuty v Německu (odtud název G - *Germany*) před 2. světovou válkou. Patří sem tabun (GA), sarin (GB), soman (GD) a cyklosarin (GF). Nejzávažnější branou vstupu jsou vzhledem k vysoké těkavosti dýchací cesty, ale mohou být absorbovány do těla i jinými cestami – narušenou kůží, očima atd. **V látky** jsou toxičtější než G látky, zvláště při intoxikaci přes kůži. Písmeno „V“ v názvu je nejspíše odvozeno podle přívlastku *venomous* – jedovatý, i když se vyskytují dohady,

že by se mohlo jednat i o zkrácení slova *victory* – vítězství. Tato skupina zahrnuje VE, VG, VM a nejnámější z nich je pravděpodobně VX.¹⁵

Novější skupina látek, tzv. **GV látky**, kombinují vlastnosti předchozích dvou skupin. Představují hrozbu jak inhalací, tak perkutánní absorpcí.¹⁵

Sloučeniny stejné základní struktury jako organofosforové pesticidy nebo NPL se používají v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny nebo jako léčiva ve veterinární medicíně.¹⁶

2.2.2 Karbamáty



Chemicky jde o estery kyseliny *N*-methyl- nebo *N,N*-dimethylkarbamové s fenoly (nebo heterocyklickými alkoholy) nesoucími kvartérní amoniovou skupinu (případně terciární aminoskupinu, která podléhá kvarternizaci *in vivo*) Mechanismus účinku je obdobný jako u OFI, nicméně inhibice AChE je pseudoireverzibilní. Jsou podobné molekule ACh, proto není překvapením, že také reagují s AChE. K primárnímu kontaktu dochází mezi kationickým dusíkem karbamátové sloučeniny a anionickým centrem enzymu.^{6, 13}

Karbamáty jsou známy jako léčiva, nebo jako pesticidy. Mnohé z nich jsou vysoce toxické pro savce i pro člověka. Jejich výroba je levná a suroviny snadno dostupné, proto jsou nebezpečné z hlediska použití jako bojových otravných látek.

Z řad léčiv lze uvést např. **fysostigmin**, alkaloid ze semen popínavého keře *Physostigma venenosum*. Je vhodný k lokálnímu použití při glaukomu ve formě očních kapek. Také působí při terapii centrálních příznaků otrav cholinolytiky – např. atropinem, neboť proniká hematoencefalickou bariérou ve formě terciárního aminu a působí centrálně cholinomimeticky.

Dále je to **neostigmin** podávaný u myastenia gravis (MG) nebo u atonie střeva, či močového měchýře.

Podobně jako neostigmin působí i **pyridostigmin**, účinek však nastupuje pomaleji a trvá déle. Proto je u onemocnění MG lékem první volby. Je též méně toxický než neostigmin. Podobný pyridostigminu je **distigmin**. Při dlouhodobé léčbě MG je vhodné dávat těmto dvěma látkám přednost před neostigminem.⁶

Karbamáty patří mezi nejvýznamnější a nejčastěji užívané insekticidy. Navíc mají někteří zástupci karbamátů i herbicidní a fungicidní účinky.¹³

Zástupcem je např. **karbofuran**, používaný v zemědělství jako insekticidní přípravek k hubení škůdců na rostlinách. Je vysoce toxický nejen po požití, ale také po inhalaci nebo po potřísnění kůže. V současné době je již používání karbofuranu v zemědělství EU a ČR zakázáno, ale tato látka je stále zneužívána k otravám zvířat (především dravých ptáků nebo psů).

Nejrizikovějším z karbamátů se jeví methiokarb v současnosti používaný jako akaricid, insekticid, moluskocid (přípravek k hubení měkkýšů), či jako repelent. Dle WHO klasifikace je vysoce nebezpečný s vysokou toxicitou jak pro obratlovce, tak pro vodní biotu.¹³

Využití karbamátů jako bojových otravných látek se začalo zkoumat po zjištění jejich mimořádně vysoké toxicity vůči teplokrevným organismům.

Z toxických karbamátů vzbudila pozornost z hlediska možného využití látka **T-1123** (3-diethylaminofenyl-*N*-methylkarbamát-methojodid). Jedná se o krystalickou stabilní sloučeninu s vysokou toxicitou a rychlým nástupem účinku. Klinický obraz akutní intoxikace karbamáty je podobný příznakům vyvolaným OFI (zvýšená salivace, lakrimace, profuzní pocení, mióza, nauzea, křeče kosterního svalstva). V případě organofosfátů však nedochází k ústupu projevů otravy v důsledku ireverzibilní inhibice AChE.¹⁶

2.3 Anticholinergika (funkční antidota)

Nadměrné stimulaci cholinergních receptorů brání anticholinergika tak, že brání navázání nahromaděného ACh na receptory. Podle působení na ACh receptory se dělí na:

- ✓ parasymptolytika – antagonistují M-receptory parasymptatiku
- ✓ periferní myorelaxancia – působí na N_M receptory na nervosvalové ploténce
- ✓ ganglioplegika – blokují N_N receptory ve vegetativních gangliích

Nejpoužívanějším je **atropin**, který antagonistuje účinek nahromaděného ACh zejména na periferních M-receptorech. Centrálně působí méně, neboť neprochází přes hematoencefalickou bariéru. Nikotinové příznaky prakticky neovlivňuje.

Další anticholinergikum, **benactyzin**, má charakteristický antimuskarinový účinek. Látky s převahou centrálního účinku pak jsou biperiden nebo **skopolamin**.¹⁶

2.4 Reaktivátory cholinesteras (kauzální antidota)

Reaktivátory acetylcholinesterasy inhibované OFI jsou chemické substance, které podle názvu reaktivují inhibovanou AChE, a obnoví tak fyziologickou funkci tohoto životně důležitého enzymu. Touto cestou umožní návrat k normálnímu přenosu cholinergního nervového vzruchu. Reaktivátory AChE jsou po chemické stránce oximy. Z nich nejběžnějším je **pralidoxim**, známý také pod označením 2-PAM. Dále je sem možno zařadit **obidoxim**, **methoxim** nebo **asoxime**, známý také jako HI-6. Dosud však nebyl vyvinut takový reaktivátor, který by efektivně působil proti všem známým nervovým jedům.^{14, 16}

Reaktivátory se nejprve vážou svým pozitivně nabitým dusíkem na aniontové místo esterasy, tím dojde k přiblížení postranního řetězce k blokovanému esterovému místu enzymu. Dochází k přesunu fosforylu nebo fosfonylu na molekulu reaktivátoru a uvolnění AChE. Míra reaktivace závisí na délce kontaktu inhibitoru s AChE a dále na chemických vlastnostech příslušného inhibitoru.⁶

2.5 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba, nebo též Alzheimerova demence (AD), představuje neurodegenerativní progresivní onemocnění mozku především u starší populace. Dochází k úbytku některých populací neuronů a v důsledku toho k mozkové atrofii, což má za následek vznik demence. Klinický obraz AD je charakterizován třemi hlavními patologickými nálezy:

- **amyloidní plaky**
- **neurofibrilární klubka**
- **narušený cholinergní systém**¹⁷

AMYLOIDNÍ PLAKY

Velmi důležitým nálezem u AD je tvorba patologických proteinů. Dochází k tvorbě *β*-amyloidu (*Aβ*), významného degenerativního proteinu. Primárním zdrojem *β*-amyloidu je tzv. amyloidový prekurzorový protein (APP). Tento transmembránový glykoprotein je za fyziologických podmínek štěpen zejména *α*-sekretasou na kratší fragmenty (do 40 aminokyselin) mající své důležité fyziologické role – např. při zajišťování neuronové plasticity (*β*-peptid). Za patologických podmínek však stoupá aktivita enzymu *β*-sekretasy a také *γ*-sekretasy, které štěpí APP na jiných místech než *α*-sekretasa a dochází ke vzniku delších fragmentů (42 nebo 43 aminokyselin). Tyto atypické fragmenty vytvářejí nejprve oligomery, které jsou velmi neurotoxické. Ty pak v extracelulárních prostorech kůry mozkové koagulují a polymerují, čímž počiná vznik *β*-amyloidu. Uložená depozita *β*-amyloidu tvoří shluky, kolem kterých vzniká komplex dalších neurodegenerativních procesů, čímž vznikají **amyloidní plaky**.^{17, 18}

NEUROFIBRILÁRNÍ KLUBKA

Další patologický protein vzniká nadměrnou fosforylací tzv. *τ*-proteinu (tau protein) neuronových mikrotubulů. Za normálních okolností je *τ*-protein defosforylován a stabilizuje neuronální tubuly. Hyperfosforylovaná forma však vede k polymerizaci tubulů. Fosforylovaný *τ*-protein pak vytváří párová helikální filamenta, která jsou základem tzv. **tangles** (neurofibrilárních klubek).^{17, 18}

Otázkou u AD zůstává, který ze dvou degenerativních proteinů je primární – β -amyloidní protein, či τ -protein? Nové výzkumy ukazují, že primární je β -amyloid, který vede sekundárně svou toxicitou k degeneraci τ -proteinu. V oblasti plaků vzniká sterilní zánět, jehož se účastní aktivovaná mikroglie i astrocyty. V rámci akutní reakční fáze dochází k aktivaci cyklooxygenas, k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů, což způsobuje další neurodegenerativní změny, kdy např. volné kyslíkové radikály narušují buněčné membrány neuronů a způsobují jejich zánik. Při takovémto zániku neuronů se nadměrně uvolňují excitační aminokyseliny (glutamová a asparagová), které se váží v CNS na receptory NMDA (N-methyl-D-aspartátové), jejichž hyperexcitace vede k nadměrnému vstupu kalcia do neuronů, destabilizaci vnitřního prostředí v neuronech, aktivaci proteinkinas a v konečném důsledku k neuronové smrti.^{18, 19, 20}

NARUŠENÝ CHOLINERGNÍ SYSTÉM

U AD dochází k úbytku některých neuronů, počtu synapsí a ke snížení plasticity neuronů. Nejvíce bývají postiženy acetylcholinergní neurony, kde je typicky postižen presynaptický oddíl. Celkové množství neuromediátoru ACh je sníženo, dochází k úbytku enzymu cholinacetyltransferasy, a také acetylcholinesterasy. Zajímavé je, že hladina druhého enzymu odbourávajícího ACh, butyrylcholinesterasy, při AD progresivně a významně stoupá.¹⁷ Tento enzym, který se za normálních podmínek jen málo podílí na odbourávání ACh, je patologicky tvořen gliovými buňkami v oblasti plaků. Co se týká AChE, v lidském mozku se vyskytují dvě formy: tetrametr G4, který za normálních podmínek výrazně převládá, a monomer G1, jehož podíl u AD oproti G4 výrazně stoupá. Ubývá také presynaptických muskarinových a nikotinových receptorů.¹⁹

AD je primární neurodegenerativní onemocnění neznámé etiologie. Je nejčastějším typem demence. U nemocných je postižena paměť (zpočátku především krátkodobá epizodická), řeč, orientace, zrakové prostorové funkce a obratnost. Důležitá je také porucha intelektu, která má za následek snížení soudnosti a kritičnosti. U této nemoci dochází ke změnám chování, agitovanosti, poruchám spánku, neschopnosti výkonu běžných aktivit, jako je oblékání, stravování, aj.

2.5.1 Léčba AD

V léčbě AD převládá kognitivní terapie, která má za cíl zlepšit nebo na určitý čas stabilizovat průběh choroby. Ze spektra léčiv byla opakovanými klinickými studii prokázána a ověřena účinnost v léčbě AD pouze u léčiv ze skupiny inhibitorů acetylcholinesterasy (IChE). Jen u těžkých stádií AD byl prokázán efekt blokátoru ionotropních receptorů excitačních aminokyselin memantinu.²¹

2.5.1.1 Inhibitory acetylcholinesterasy (IChE)

Inhibitory AChE jsou prvním lékem volby u lehkých a středních forem AD. Tyto musí mít vysokou účinnost především v oblasti mozkové kůry a hipokampu a nemají působit v jiných oblastech, zejména v periférii, kde by způsobovaly množství závažných nežádoucích vedlejších účinků. Tyto podmínky splňují rivastigmin, galantamin, donepezil a takrin.⁹

Mechanismus účinku IChE spočívá ve zpomalení až zastavení činnosti AChE, čímž dojde ke zvýšení počtu molekul ACh schopného vazby na své receptory. Tím se zvyšuje acetylcholinergní transmise. IChE působí ještě dalším mechanismem. ChE, distribuované v mozku mimo oblast rozšíření acetylcholinergních drah, se podílí u pacientů s AD na tvorbě a toxicitě degenerativního proteinu β -amyloidu. Jejich inhibicí se IChE blíží účinku kauzálnímu, bezprostřední klinický účinek však není pozorován.²²

Inhibice AChE je trojí: reverzibilní, pseudoireverzibilní a ireverzibilní. U reverzibilního způsobu molekula inhibitoru vytváří s molekulou AChE inaktivní komplex, který přetrvává, dokud je inhibitor nebo jeho aktivní metabolit přítomen v plazmě. U pseudoireverzibilní inhibice dochází k tomu, že inhibitor je přímo odbouráván AChE, tímto kompetuje s ACh. Ireverzibilní inhibice znamená vytvoření ireverzibilního komplexu inhibitoru s molekulou cholinesterasy. U klinicky používaných IChE se setkáváme s prvními dvěma způsoby inhibice. Ireverzibilní inhibice je nevýhodná, způsobuje totiž množství nežádoucích efektů.²²

První experimentálně použitou látkou byl fysostigmin, ale prvním použitým lékem v klinické praxi byl takrin. Nyní jsou používány perorální IChE s dlouhým poločasem a dobrou tolerancí. IChE jsou indikovány především u lehkých a středně těžkých stádií AD.²⁰

Inhibitory mozkových cholinesteras nejsou schopny AD vyléčit ani trvale zamezit progresi onemocnění. Zpomalují průběh choroby a oddalují vznik těžkých stadií. Zlepšují kvalitu života jak postižených, tak jejich pečovateli. Nemusí však být účinné u každého pacienta. Při neúspěchu jednoho inhibitoru mozkových cholinesteras přecházíme na druhý, ale nejdříve po půl roce podávání. Na IChE reaguje příznivě asi 70 % pacientů, existují ale i tací, kteří na tyto léčiva nereagují. Ke zlepšení jak kognitivních funkcí, především paměti, tak i aktivit denního života i poruch chování dochází pouze u některých léčených osob.²²

DONEPEZIL (Aricept)

Donepezil je piperidinový derivát, který je schopen nekompetitivně blokovat centrálně aktivní AChE. Tato inhibice nakonec vede ke zvýšené koncentraci ACh v oblasti synaptické štěrby, což je u AD charakterizované jeho nedostatkem velmi užitečné. Donepezil inhibuje reverzibilně obě formy AChE – které jsou v léčbě demence důležité – G1 i G4, a to přibližně stejně. BChE neovlivňuje ani nevede k modulaci receptorů. Zato však aktivuje specifické nikotinové receptory ($\alpha 4$ a $\alpha 7$), dochází k výraznější expresi anti-apoptického faktoru Bcl-2, chrání neurony proti glutamátové toxicitě. Dále aktivací muskarinových M5-receptorů ve stěnách mozkových cév zlepšuje mozkovou mikrocirkulaci. Působí tak současně proti několika mechanismům neurodegenerace.²²

Kromě toho, že inhibuje AChE má donepezil ještě další účinek – cestou α -sekretas brání tvorbě β -amyloidu. α -sekretasy vedou k odbourávání amyloidového prekurzorového komplexu. Podle klinických studií v USA je donepezil účinný i u těžších demencí Alzheimerovského typu, zdravotní pojišťovny v České republice však jeho použití u těžších demencí nehradí.^{12, 22}

RIVASTIGMIN (Exelon)

Rivastigmin patří mezi karbamátové deriváty společně s fysostigminem, který má spíše experimentální význam. Působí pseudoireverzibilní inhibicí, tzn. je odbouráván přímo molekulami cholinesteras. Jeho schopnost blokovat cholinesterasy je delší, než je přítomnost látky v plazmě. Rivastigmin je duální inhibitor, inhibuje současně AChE i BChE. Působí též modulací transmise na nikotinových receptorech. Co se týká vlivu na AChE, rivastigmin inhibuje obě formy G1 i G4, vykazuje však preferenční specifitu

pro formu G1. Podobně jako donepezil přispívá ke snížení tvorby β -amyloidu zásahem do metabolismu α -sekretas.¹²

U rivastigminu je prokázána účinnost v léčbě kognitivních funkcí, behaviorálních změn i aktivit denního života. Stejně jako další inhibitory oddaluje přechod do dalších stadií nemoci. Příznivý účinek u AD se obvykle projevuje během 12 týdnů od zahájení terapie a přetrvává až 6 měsíců po jejím ukončení.¹²

GALANTAMIN (Reminyl)

Galantamin je terciální alkaloid původně izolovaný z cibulí sněženky *Galanthus woronowi* a později z dalších rostlin čeledi amarylkovité. Je to kompetitivní inhibitor AChE. Kompetitivní inhibice znamená, že galantamin soutěží v místě receptoru o vazebné místo s acetylcholinem, což by z klinického hlediska mělo znamenat větší šetrnost než u preparátů s nekompetitivní inhibicí. Galantamin neovlivňuje BChE. Jeho výhodou oproti ostatním IChE používaným v terapii AD spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nikotinové receptory, což zvyšuje produkci ACh. Galantamin se naváže na jiné vazebné místo receptoru než ACh, čímž zesiluje jeho působení.^{12, 22, 23}

Účinnost galantaminu byla u AD prokázána v léčbě kognitivních funkcí, behaviorálních změn a aktivit denního života. Je schopen dosáhnout zlepšení nebo udržení stavu po dobu minimálně jednoho roku.^{12, 22}

TAKRIN (Cognex)

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) byl první IChE, který byl v léčbě AD klinicky použit. Chemicky se jedná o akridinový derivát. Jeho primárním účinkem je nekompetitivní inhibice cholinesteras. Působí jak na BChE, tak na AChE. Tato inhibice způsobí zvýšení hladiny ACh.

Takrin také blokuje draslíkové kanály, prodlužuje tak dobu akčního potenciálu a zvyšuje uvolnění ACh z cholinergních neuronů.

Je prokazatelně klinicky účinný. Byl však pro svou hepatotoxicitu stažen z distribuce.^{4, 12}

Tab. č. 1 Farmakologické charakteristiky inhibitorů cholinesteras.^{9, 24}

Léčivo	DONEPEZIL	RIVASTIGMIN	GALANTAMIN	TAKRIN
Chemická třída	piperidin	karbamát	terciální alkaloid	akridinový derivát
Způsob inhibice	reverzibilní, nekompetitivní, pouze AChE	pseudo-ireverzibilní, nekompetitivní, AChE i BChE	reverzibilní, kompetitivní, pouze AChE	reverzibilní, nekompetitivní, AChE i BChE
Místo inhibice	α -anionické místo	katalytické místo	α -anionické i katalytické místo	α -anionické místo
Allosterická modulace nikotinových receptorů	ne	ne	jednotlivé podtypy	ne

U těžších stádií AD se podává **memantin (Exiba)**, který je zástupcem třídy antagonistů glutamátových NMDA receptorů. Mimo účinek na NMDA receptorech, který vede ke zlepšení přenosu vzruchu a zabránění neurodegenerativních projevů, navíc do určité míry inhibuje enzym GSK 3 β , a tak částečně zamezuje degradaci τ -proteinu.¹⁸

Více klinických studií prokázalo účinnost kombinace memantinu a inhibitorů acetylcholinesteras. Tento terapeutický přístup je hojně používán, jedinou jeho nevýhodou jsou zvýšené finanční náklady na léčbu.²²

K léčbě AD se zkoušela řada dalších preparátů – *Ginkgo biloba*, nesteroidní antiflogistika-antirevmatika (NSAIDs), vitamín E, estrogeny a statiny, cerebrolysin, selegilin, nimodipin, piracetam, aj. V současné době není dostatek důkazů potvrzujících jejich účinek v této indikaci. Nadějně se jeví substance standardního extraktu *Ginkgo biloba*, EGb761, jehož složení není shodné ani zaměnitelné s jinými extrakty *Ginkgo biloba*. Několik klinických studií prokázalo klinické zlepšení u AD.²⁵

Nadějně se v léčbě AD také hovoří o nesteroidních antirevmaticích – NSAIDs. Většina klinických a epidemiologických studií dokazuje, že při dlouhodobém užívání

NSAIDs dochází ke zpomalení progresu, popř. oddálení nástupu AD. Nejvhodnější profylaktický efekt nesteroidních antirevmatik má dle studií celecoxib.¹⁹

2.6 Myasthenia gravis (MG)

Myasthenia gravis je klinicky heterogenní onemocnění, které je charakterizováno kolísající svalovou slabostí a unavitelností, která se zhoršuje po fyzické zátěži nebo psychickém stresu. Patří mezi autoimunitní onemocnění, kdy dochází k tvorbě protilátek namířených proti acetylcholinovému receptoru nikotinového typu na nervosvalovém spojení. Protilátky způsobí destrukci těchto receptorů. Tím se zabraňuje navázání ACh na receptory svalových buněk a vzniku kontrakce. Výsledkem je svalová slabost a nadměrná únava.²⁶

Existuje mnoho vlivů, díky nimž může MG vzniknout a progredovat (genetické, hormonální vlivy, vlivy vnějšího prostředí atd.). V patogenezi se uplatňuje brzlík (thymus). Za fyziologických okolností thymus eliminuje některé potenciálně autoreaktivní T-buněčné klony. Má velký význam v pozitivní selekci T-buněk rozpoznávajících vlastní a cizí antigeny. Asi u poloviny pacientů s myasthenií se objevuje hyperplazie thymu. Na rozhraní kůry a dřene brzlíku se v perivaskulárních prostorách nachází tzv. germinativní centra, v nichž jsou nahromaděny autoreaktivní B a T-lymfocyty. Dřeňové epiteliální struktury obsahují myoidní buňky (nezralé formy svalových buněk), na kterých jsou lokalizované ACh receptory. Myoidní buňky jsou v intimním kontaktu s MHC II pozitivními buňkami, které předkládají AChR autoreaktivním T-buňkám. Tyto T-lymfocyty stimulují specifické B-lymfocyty k produkci protilátek proti AChR.^{26, 27}

Mezi první příznaky MG patří ptóza, neboli pokles víček, a diplopie, tedy dvojité vidění. Charakteristickým klinickým příznakem je slabost a unavitelnost příčně pruhovaného svalstva, tj. objektivně prokazatelná vyčerpanost svalů v závislosti na předchozí fyzické zátěži (na rozdíl od únavy, která je subjektivním údajem pacienta). Predilekčně jsou postiženy svaly extraokulární, mimické, orofaryngeální, šíjové, pletencové a respirační. Typická je též fluktuace subjektivních obtíží. Může vznikat tzv. fenomén Walkerové, kdy fyzická zátěž může způsobit oslabení značně odlehlé svalové skupiny. V případě neléčené nemoci dochází k progresi a vzniku generalizované MG.²⁸

2.6.1 Léčba MG

Terapii MG dělíme na symptomatickou a imunosupresivní. V symptomatické léčbě se užívá IChE. Tyto brzdí enzymatickou hydrolýzu ACh a tím se jeho efekt prodlužuje. Dojde ke zvýšení počtu interakcí mezi molekulami ACh a postsynaptickými AChR, zlepší se neuromuskulární transmise. IChE vedou u většiny pacientů k výraznému zlepšení myastonické symptomatologie. Nejužívanějším preparátem je pyridostigmin-bromid (Mestinon). Je preferovaný díky minimálním nežádoucím gastrointestinálním příznakům.²⁷

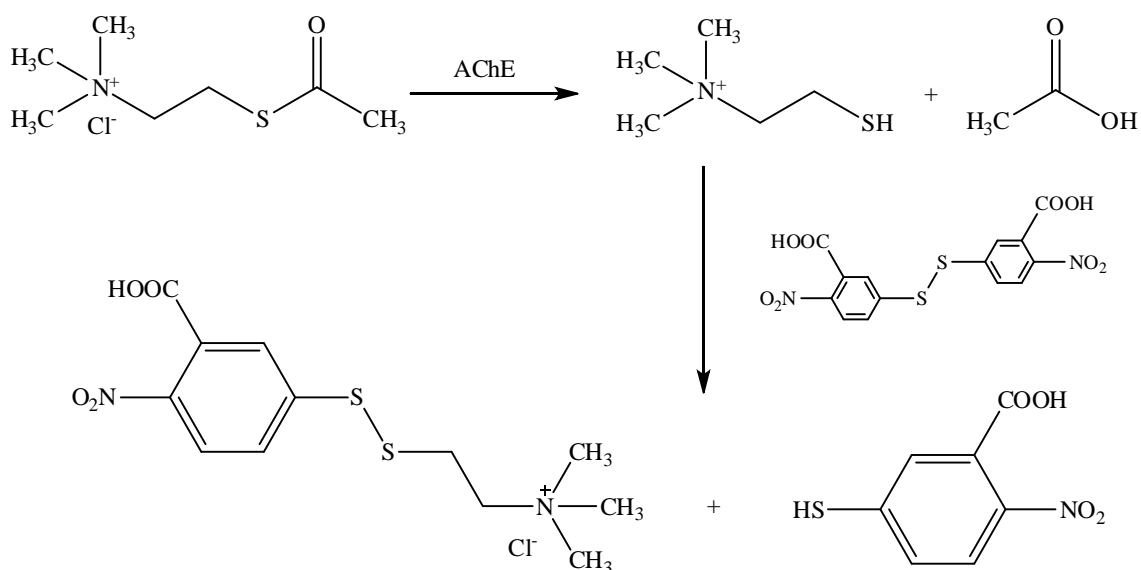
Současně s IChE se doporučuje podávat i imunosupresivní léky. IChE působí symptomatologicky, ale nemají vliv na imunopatogenezi onemocnění. Používají se kortikosteroidy jako je prednison, methylprednison anebo azathioprin. Tyto působí imunosupresivně na humorální a buněčné složky imunitního systému uplatňující se v patogenezi MG.²⁷

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Metodika stanovení aktivity AChE

3.1.1 Ellmanova metoda

Ke stanovení aktivity AChE byla použita metoda dle Ellmana. Při ní dochází k hydrolyze substrátu acetylthiocholinu (ATCh) (alternativní substrát fyziologickému ACh) za vzniku kyseliny octové a thiocholinu. Thiocholin dále reaguje s 5,5'-dithiobis-(2-nitro-benzoovou) kyselinou (DTNB) za vzniku 2-nitro-5-thio-benzoové kyseliny, která je žluté barvy. Toto zbarvení se měří spektrofotometricky při 412 nm bez jakékoliv další časové prodlevy nebo fyzikálních zásahů. Po určité době inkubace se proměří absorbance znovu. Rozdíl absorbancí je pak úměrný enzymové aktivitě.²⁹



Obr. č. 2 Schéma reakce Ellmanovy metody

3.2 Použité chemikálie

Činidla pro reakční směs v měřící v kyvetě spektrofotometru:

- Enzym AChE z elektrického úhoře
- Acetylthiocholin-chlorid (ATChCl) 10 mM
- Ellmanovo činidlo – 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
- Fosfátový pufr 0,01M, pH 7,4
- PBS (*Phosphate Buffered Saline*) - fosfátem pufovaný fyziologický roztok (obsahuje 137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 10 mmol/l Na₂HPO₄ • 2 H₂O, 2 mmol/l KH₂PO₄)

Použité látky od firmy Sigma-Aldrich pro zkoušku inhibice AChE:

- | | |
|---------------------|--------------------|
| ▪ NaCl | ▪ Kofein |
| ▪ KCl | ▪ Takrin |
| ▪ MgCl ₂ | ▪ Želatina |
| ▪ CaCl ₂ | ▪ Hovězí albumin |
| ▪ ZnCl ₂ | ▪ Ethanol |
| ▪ CuCl ₂ | ▪ Methanol |
| ▪ FeCl ₃ | ▪ Propan-2-ol |
| ▪ AlCl ₃ | ▪ Dimethylsulfoxid |

3.3 Pomůcky a přístroje

K přípravě roztoků potřebných činidel, testovaných inhibitorů a také k samotnému měření byly použity kádinky, lžičky, lodičky, zkumavky, mikrozukavky (Eppendorf), kyvety, stojánek na zkumavky, automatické pipety, špičky na pipety, analytické váhy, třepačka, magnetické míchadlo, topná ploténka, ultrazvuková lázeň, spektrofotometr. Pro změření časového intervalu byly použity stopky.

3.4 Měření pomocí spektrofotometru

Vlastní měření se provádělo za pomoci spektrofotometru Helios zeta UV-VIS od firmy Thermo Scientific. Po nastavení měření ve fixním módu při vlnové délce 412 nm se jako první proměřil blank (slepá kontrola), následně kontrola a nakonec koncentrační řada vzorků zkoumaných látek.



Obr. č. 3 Spektrofotometr Helios Zeta UV-Visible

(převzato z http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_6527.pdf)

3.4.1 Měření slepého vzorku

Pro změření slepého vzorku se na začátku každého měření použil PBS. Tento se proměřil při 412 nm v kyvetě spektrofotometru a tím byla určena nulová absorbance.

3.4.2 Měření vzorků

Do měřicí kyvety spektrofotometru se postupně přidalo 400 μ l DTNB, 25 μ l roztoku AChE, 375 μ l PBS a 100 μ l roztoku testované látky. Reakce se spustila přidáním 100 μ l ATChCl. Změřila se absorbance při 412 nm. Po časovém intervalu – v našem případě po 5 minutách – se opět změřila absorbance. Z rozdílu konečné a počáteční hodnoty se vypočetla aktivita AChE.

U měření schopnosti inhibice některých látek byl PBS nahrazeno 0,01M fosfátovým pufrům. Kvůli iontové síle roztoku byl tento fosfátový pufr použit u NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, FeCl₃, AlCl₃, a to jak u přípravy těchto testovaných

látek, tak při následném měření v kyvetě. PBS by totiž mohlo svým složením iontovou sílu roztoku zvýšit a tím případně ovlivnit výsledek.

3.4.3 Měření kontroly

Pro kontrolní měření byl postup stanovení totožný s měřením vzorků, které je popsáno výše. Pouze kromě 100 μ l testované látky se použilo stejné množství PBS. Tímto se získala aktivita enzymu neinhibovaného testovanou látkou.

3.4.4 Měření koncentrační řady vzorků s různou koncentrací substrátu

Pro každou látku byla stanovena řada koncentrací, pro kterou pak byla určována aktivita AChE tak, aby se nejvyšší hodnota aktivity enzymu co nejvíce přibližovala kontrolnímu měření, a nejnižší hodnota (v případě potvrzení, že látka je inhibitorem AChE) odpovídala co nejnižší aktivitě – tedy absorbanci blízké nule (slepého vzorku).

U každé látky bylo proměřování koncentrační řady provedeno při třech různých koncentracích ATChCl. Tato látka, se do reakční kyvety přidává jako poslední a spouští reakci, jelikož obsahuje substrát ATCh, který se při Ellmanově reakci účinkem AChE hydrolyzuje na kyselinu octovou a thiocholin. Tento dále reaguje s DTNB za vzniku barevného produktu, jehož intenzita zabarvení je úměrná aktivitě AChE. Naměřená aktivita však také závisí na množství substrátu v reakci.

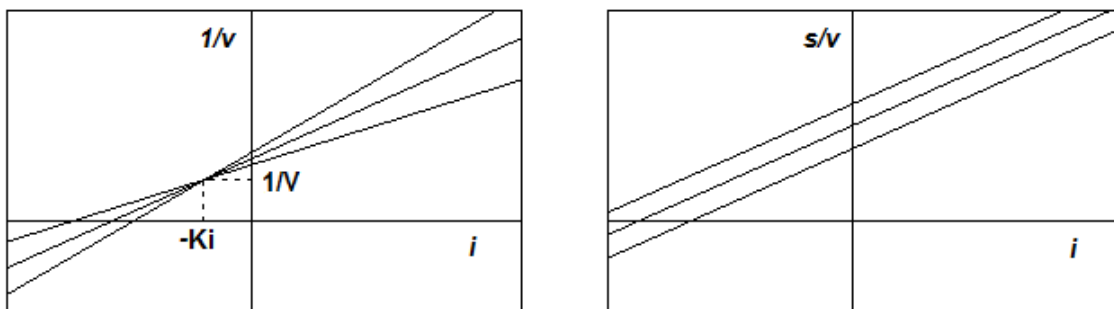
Byla použita koncentrace 10 mmol/l, 5 mmol/l a 2 mmol/l ATChCl u každé látky.

3.5 Vyhodnocení podle Dixona

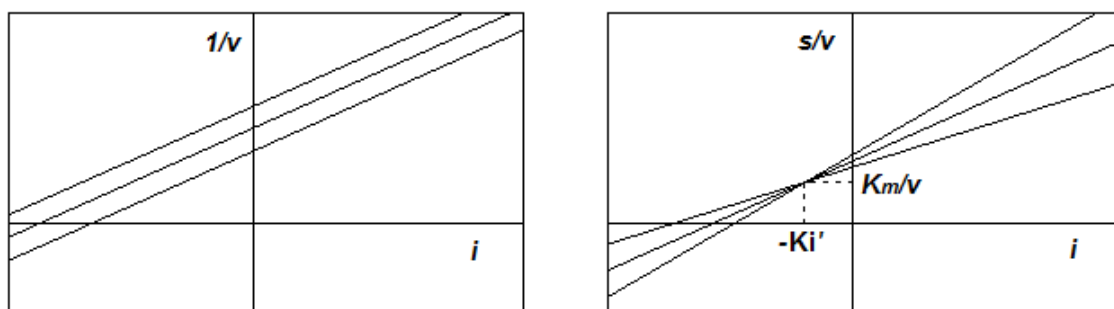
Naměřená data byla po zpracování vynesena do Dixonova grafu. Tato metoda slouží k určení rovnovážné inhibiční konstanty. Do grafu se vynáší reciproká rychlost (resp. aktivita) $1/v$ – na osu y – proti koncentraci inhibitoru i – na ose x . Pro každou hodnotu s (koncentrace substrátu) leží vynesené body na přímce. Extrapolací těchto přímek s různou koncentrací substrátu dojde k jejich protnutí v jednom bodě, kde hodnota koncentrace inhibitoru na ose x v tomto bodě je rovna inhibiční konstantě K_i .³⁰

Díky této metodě jsme schopni rozpoznat typ inhibice. Toto vyhodnocení je však nevýhodné, jestli posuzujeme, zda se jedná o inhibici kompetitivní nebo smíšenou. Toto podle Dixona nejsme schopni jednoznačně určit. Proto se v takových případech používá doplňující grafické znázornění podobné tomu dle Dixona. Vynáší se hodnota s/v proti koncentraci inhibitoru i . Tento graf je limitován nejednoznačností určení mezi nekompetitivní a smíšenou inhibicí, avšak současným grafickým ověřením pomocí obou těchto metod získáme výsledek jednoznačný, viz *obr. č. 4*.

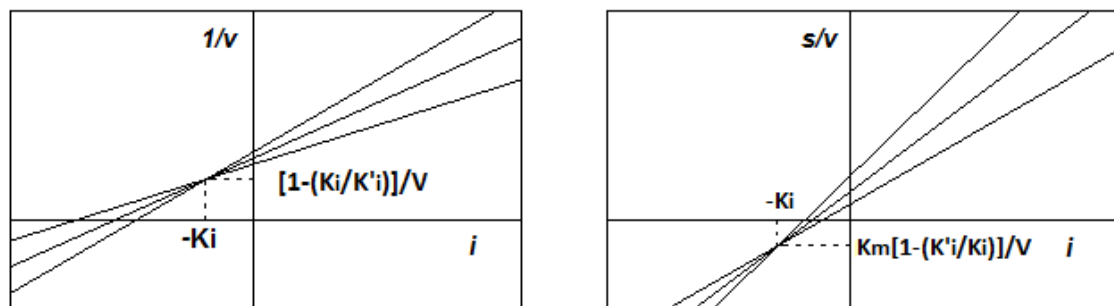
Kompetitivní inhibice



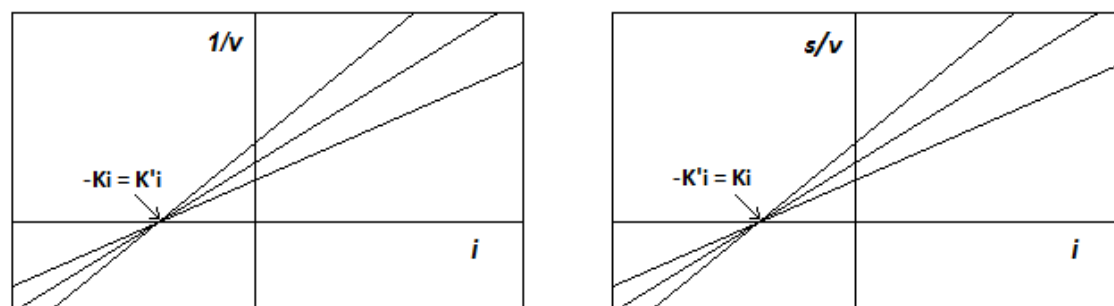
Akompetitivní inhibice



Smíšená inhibice



Nekompetitivní inhibice

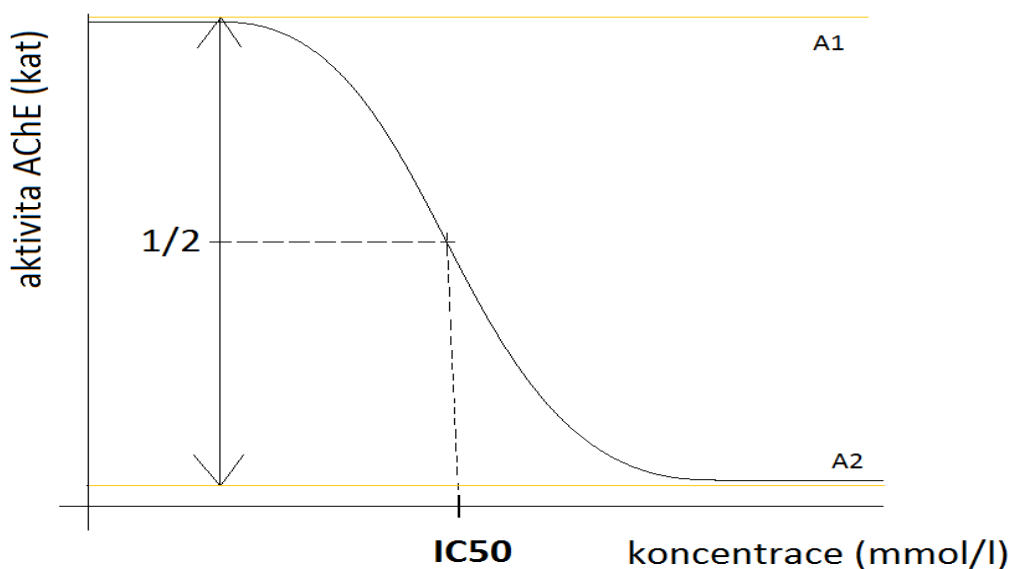


Obr. č. 4 Charakteristické grafy běžných typů inhibice

3.6 Vyhodnocení podle Boltzmannova

U některých výsledků, zejména u těch, kde nebylo možno použít Dixonův graf, byla použita ke zhodnocení výsledků funkce dle Boltzmannova. Tohoto bylo využito u organických rozpouštědel, která se neuplatňují jako selektivní inhibitory, ale zejména jako denaturující činidla ničící zkoumaný enzym. Popřípadě u látek s nízkou inhibiční aktivitou a pro určení hodnoty střední inhibiční koncentrace (IC₅₀). Hodnota IC₅₀ udává koncentraci, při které dochází k 50% inhibici původní aktivity AChE. Viz obr. č. 5.³¹

Boltzmannův graf vytvoří z dat sigmoidní křivku $y = A_2 + (A_1 - A_2) / \{1 + \exp[(x - x_0)/dx]\}$, kde A_1 , A_2 jsou horní a dolní limity, a spočítá hodnotu IC₅₀ pro danou látku. Toto vyhodnocení bylo prováděno za pomoci statistického software Origin 6.1.



Obr. č 5 Boltzmannův graf závislosti aktivity enzymu na koncentraci inhibitoru

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

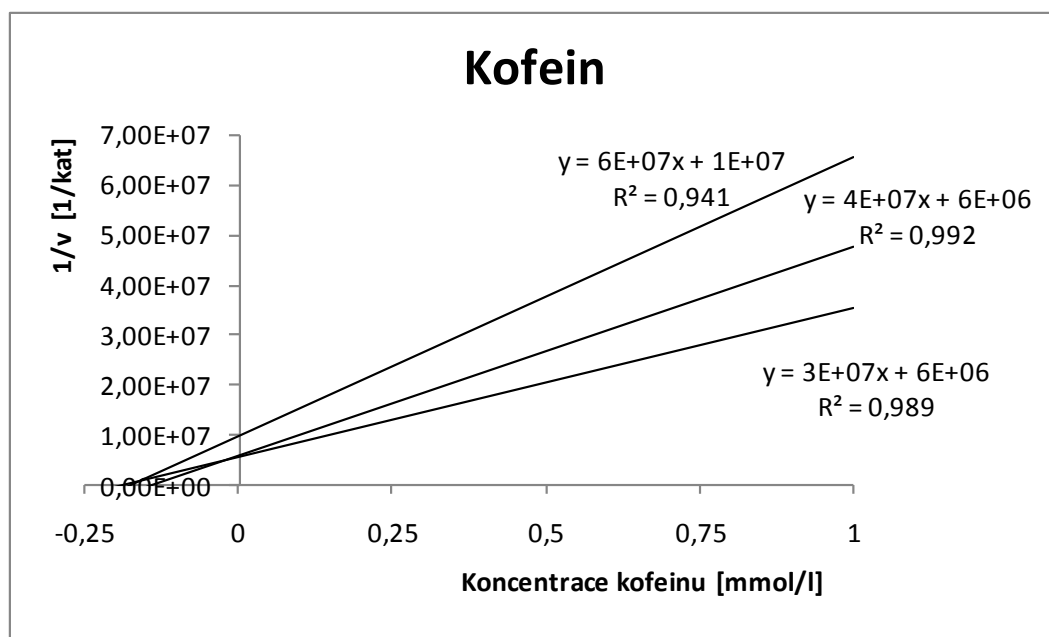
4.1 Vyhodnocení inhibice AChE

V grafech podle Dixona jsou data znázorněna třemi přímkami pro tři různé koncentrace substrátu ATChCl (10 mmol/l, 5 mmol/l, 2 mmol/l). Tyto jsou proloženy experimentálními body – pro každou koncentraci substrátu jedna přímka.

4.1.1 Kofein, takrin, albumin a želatina

KOFEIN

Kofein je silným inhibitorem AChE s hodnotou rovnovážné inhibiční konstanty K_i 0,21 mmol/l. Jedná se o nekompetitivní inhibitor AChE.

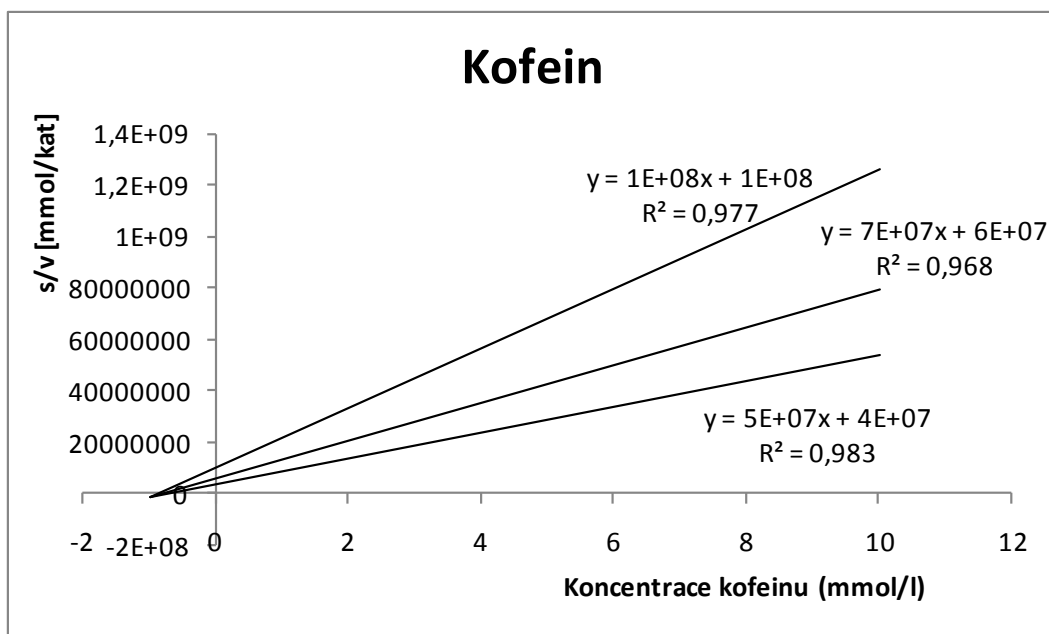


Obr. č. 6 Dixonův graf inhibice AChE kofeinem

U kofeinu bylo prokázáno, že se jedná o inhibitor AChE, jak se předpokládalo podle mnohých literárních zdrojů.³²

Podle jiného zdroje³³ je však kofein inhibitorem kompetitivním. Dle mnou provedených experimentů zhodnocených metodou dle Dixona je kofein jednoznačným nekompetitivním inhibitorem, viz obr. č 6 a 7. Z těchto dvou grafů je patrné, že se nejedná o kompetitivní inhibici. Odlišný výsledek od literatury mohl mít mnoho příčin.

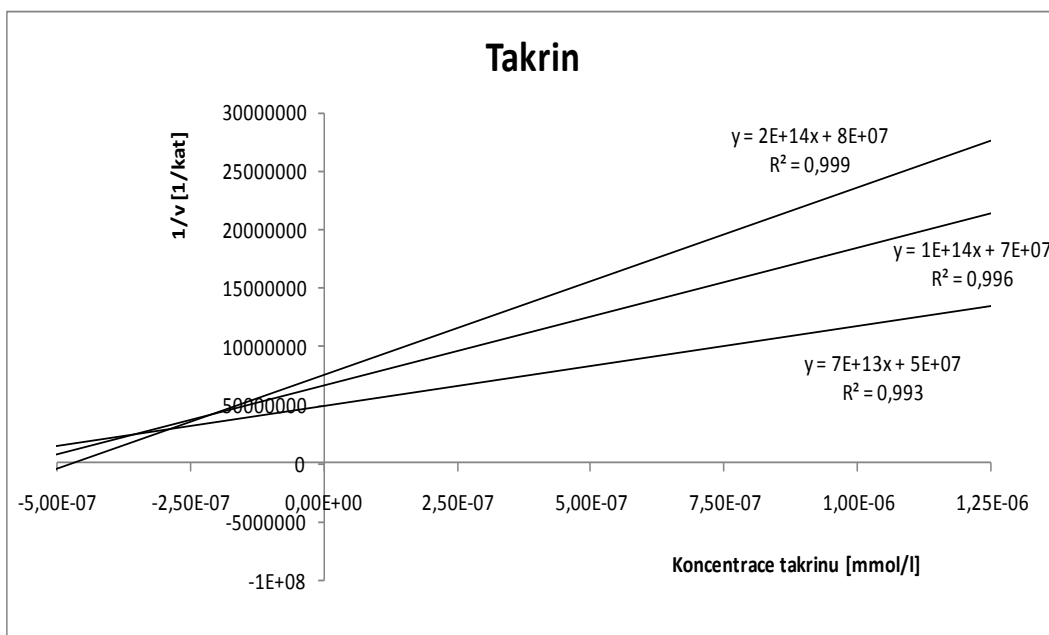
Pravděpodobně se však jedná o různost původu použité AChE. V našich experimentech byla použita AChE z elektrického úhoře.



Obr. č. 7 Graf závislosti s/v na koncentraci kofeinu – doplňkový graf

TAKRIN

Takrin je velmi silný inhibitor AChE s hodnotou K_i $3,75 \times 10^{-7}$ mmol/l. Dle Dixonova grafu se jedná o nekompetitivní inhibitor AChE.



Obr. č. 8 Dixonův graf inhibice AChE takrinem

Takrin je známým inhibitorem AChE, který se přestal používat jako lék u Alzheimerovy choroby pro svou hepatotoxicitu. Jedná se o nekompetitivní silný inhibitor

AChE se slabou afinitou i k BChE.³⁴ Naše výsledky poukazující na nekompetitivní inhibici jsou v souladu s citovanou literaturou. V našem případě takrin sloužil jako standard a za jeho pomoci jsme demonstrovali funkčnost užití metody.

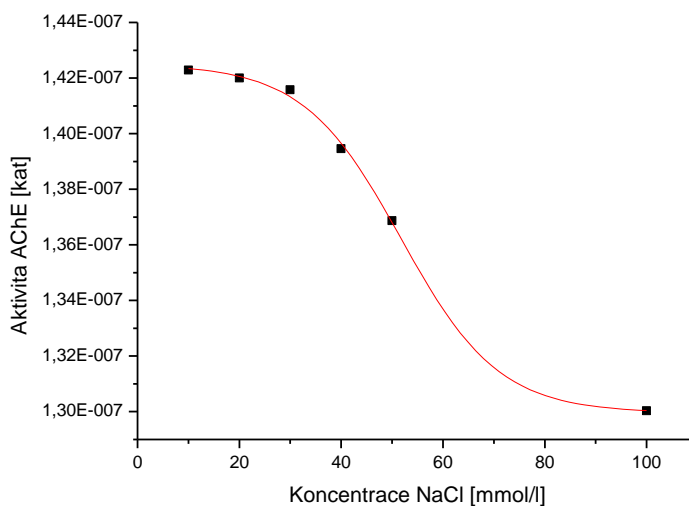
ALBUMIN A ŽELATINA

Albumin a stejně tak i želatina nezpůsobovali signifikantní inhibici AChE. I aplikace nejvyšší užití koncentrace albuminu či želatiny do reakční kvyety neměla prokazatelný vliv na stanovovanou aktivitu AChE a lze tedy uzavřít tuto část experimentu vyloučením případného inhibičního potenciálu.

4.1.1 Soli kovů

- NaCl

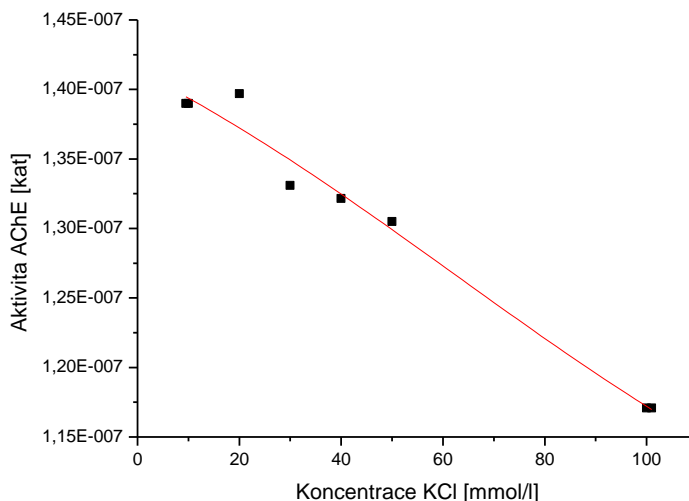
O NaCl nelze hovořit jako o inhibitoru AChE. Hodnota střední inhibiční koncentrace IC₅₀ je 51,8 mmol/l.



Obr. č. 9 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na koncentraci NaCl

- **KCl**

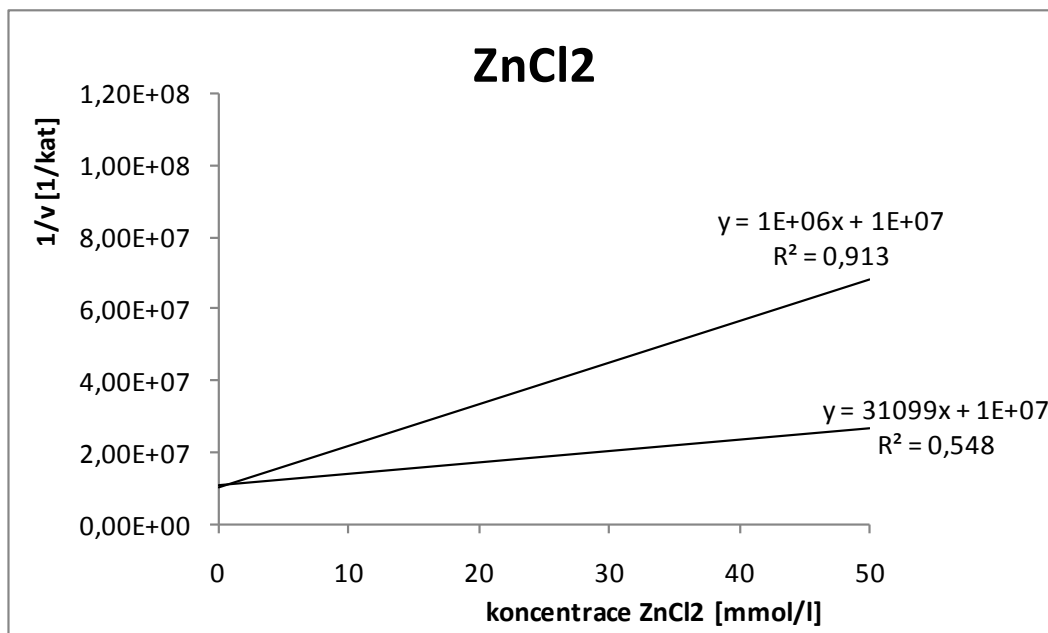
KCl, stejně jako NaCl, nelze považovat za inhibitor AChE. Hodnota IC50 je 62,2 mmol/l.



Obr. č. 10 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na koncentraci KCl

- **ZnCl₂**

ZnCl₂ je nekompetitivním inhibitorem AChE. Jeho K_i je 13,3 mmol/l.



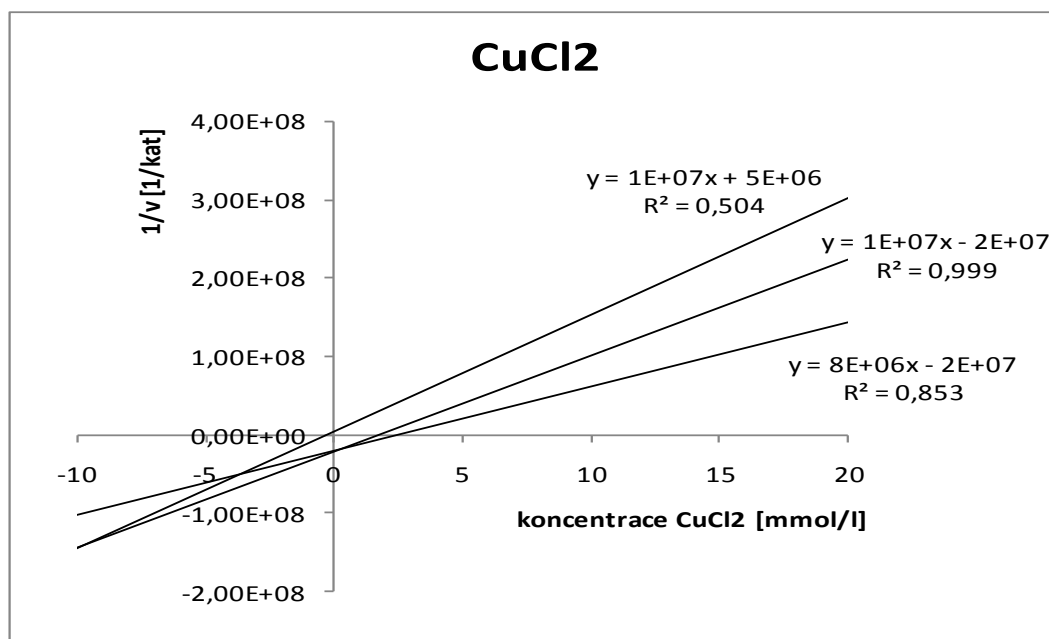
Obr. č. 11 Dixonův graf inhibice AChE ZnCl₂

Kvůli špatné rozpustnosti ZnCl₂ docházelo u vyšších koncentrací ke spontánnímu vysrážení z roztoku, a proto nebylo možno provést experiment v plném rozsahu

a v grafickém vyjádření na *obr. č. 11* se nacházejí pouze přímky s nižší koncentrací substrátu (2 mmol/l a 5 mmol/l ATChCl).

- **CuCl₂**

CuCl₂ je velmi silný inhibitor AChE s hodnotou K_i 4,75 mmol/l. Jedná se o nekompetitivní inhibitor.



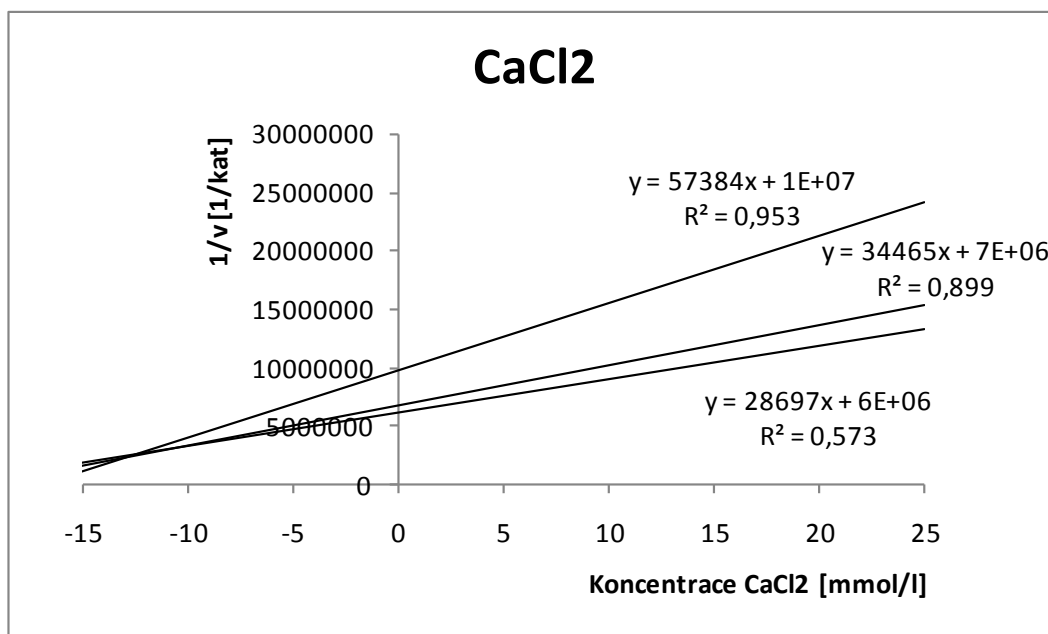
Obr. č. 12 Dixonův graf inhibice AChE CuCl₂

- **MgCl₂**

U MgCl₂ nebylo možno posoudit, jaký vztah má k AChE. Při měření absorbance se v kyvetě spektrofotometru postupně utvářela sraženina, nejspíše v důsledku kontaktu MgCl₂ s fosfátovým pufrům, či jiným činidlem. Tato interferovala s absorbancí odečítanou přístrojem v konečné minutě, a tudíž nebylo možno správně vypočítat aktivitu po smíšení s činidlem.

▪ **CaCl₂**

CaCl₂ je nekompetitivním inhibitorem AChE s hodnotou K_i 13,1 mmol/l.

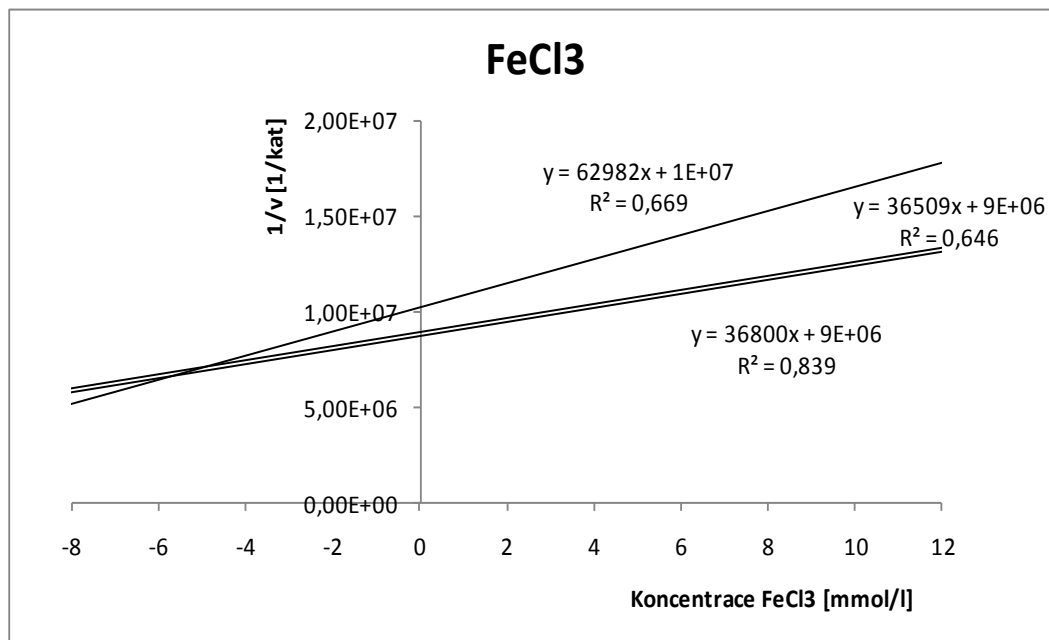


Obr. č. 13 Dixonův graf inhibice AChE CaCl₂

U CaCl₂ docházelo v reakční kyvetě v průběhu měření ke tvorbě mírného zákalu, který klesal ke dnu kyvety. Promícháním před konečnou minutou inkubace bylo dosaženo i tak poměrně velké inhibice. I přes zákal, který zvyšoval absorbanci, která v přítomnosti inhibitoru klesá, docházelo k jejímu velkému poklesu.

▪ **FeCl₃**

FeCl₃ je poměrně silný inhibitor AChE s hodnotou K_i 4,95 mmol/l. Jedná se o inhibici nekompetitivní.

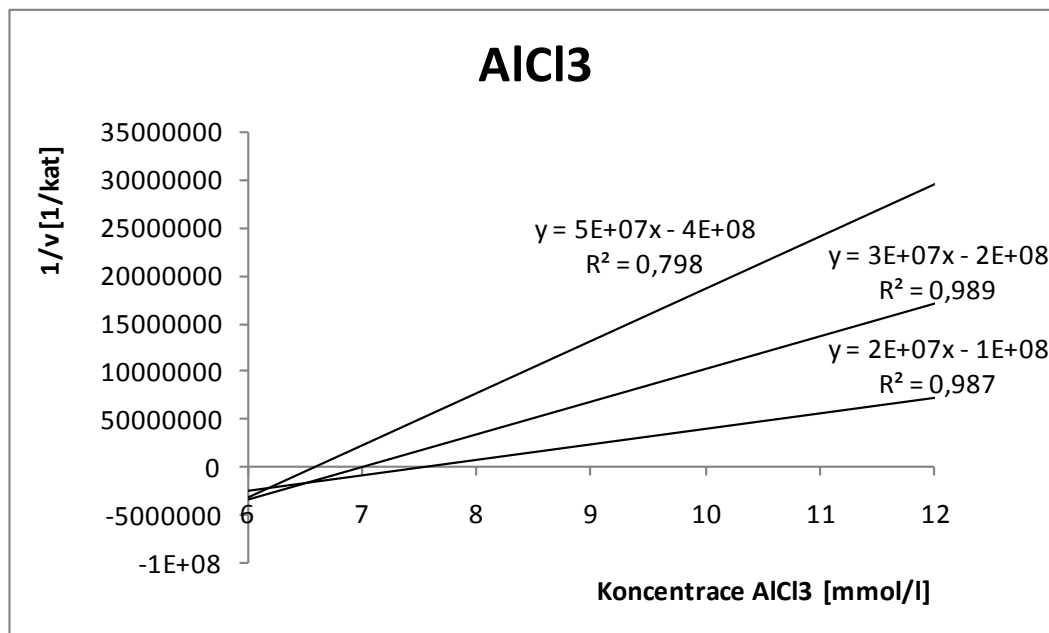


Obr. č. 14 Dixonův graf inhibice AChE FeCl₃

U FeCl₃ docházelo také k tvorbě mírného zákalu, který jsem před konečnou minutou inkubace promícháním zvířila, ani ten však neovlivnil velkou inhibiční sílu chloridu železitého. I když se jedná o silný inhibitor, v literatuře se o něm zmínky v souvislosti s AChE neobjevují.

- AlCl_3

AlCl_3 je poměrně silný inhibitor AChE s hodnotou K_i 6,31 mmol/l. Je inhibitorem nekompetitivním.



Obr. č. 15 Dixonův graf inhibice AChE AlCl_3

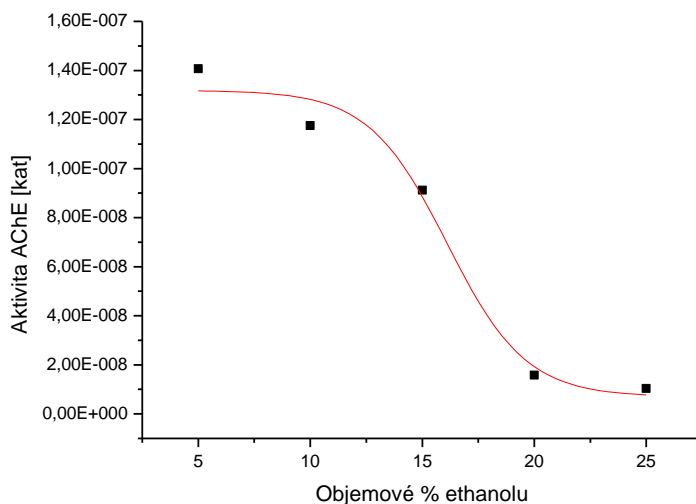
U AlCl_3 při vyšších koncentracích docházelo ke tvorbě mírného zákalu. Nižší užití koncentrace byly rozpustné bez obtíží a výsledky nebyly tedy ovlivněny (viz obr. č 15).

Do experimentů mělo být původně zařazeno i PbCl_2 , nepodařilo se jej však rozpustit žádnou metodou, která by nenarušovala následné stanovení aktivity AChE dle Ellmana. Připisovalo se to na vrub stáří PbCl_2 , ale ani po vyzkoušení rozpustnosti zcela nového chloridu olovnatého jsme nebyli úspěšní.

4.1.2 Organická rozpouštědla

ETHANOL

Ethanol je dobrým inhibítozem AChE, inhibuje zejména ve vyšších koncentracích. Hodnota IC₅₀ je 16,1 %.

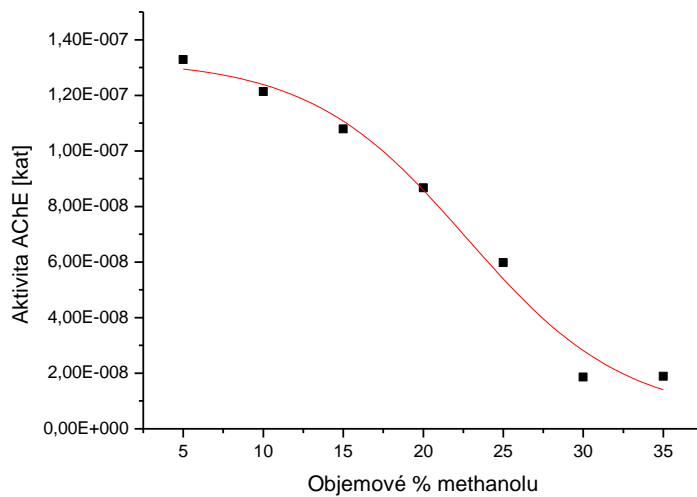


Obr. č. 16 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na objemových % ethanolu

Inhibiční působení ethanolu bylo potvrzeno i jinými experimentálními pracemi. Studium inhibice ethanolom se zabývá např.³⁵ Podle tohoto zdroje ethanol modifikuje afinitu AChE k ACh. Při reakci s AChE dochází ke zřejmé kompetici ACh s ethanolom.³⁵

METHANOL

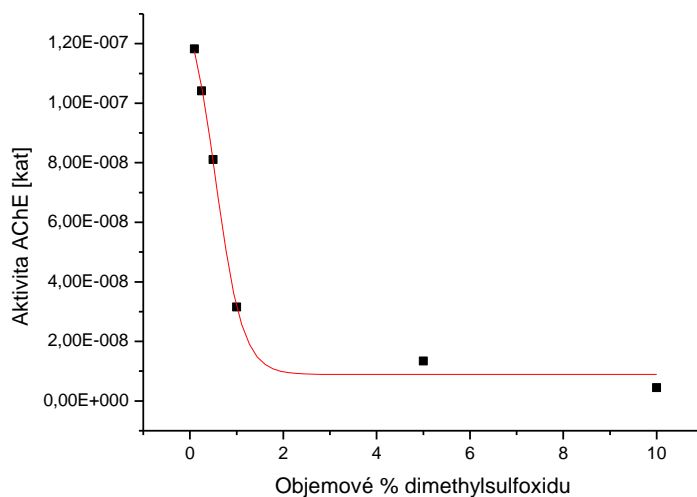
Methanol je oproti ethanolu slabším inhibítorom. Hodnota IC₅₀ je 22,7 %.



Obr. č. 17 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na objemových % methanolu

DIMETHYLSULFOXID

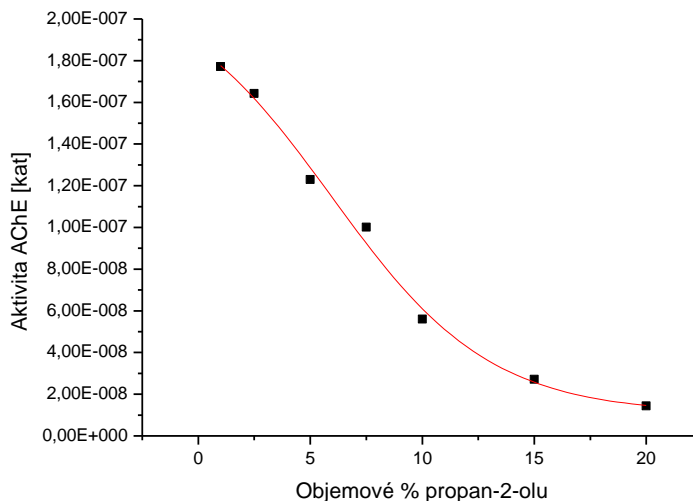
Dimethylsulfoxid je velmi silným inhibítorom AChE. Jeho hodnota IC₅₀ je 0,55 %.



Obr. č. 18 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na objemových % dimethylsulfoxidu

PROPAN-2-OL (ISOPROPYLALKOHOL)

Propan-2-ol je poměrně silný inhibitor AChE. Jeho hodnota IC₅₀ je 5,95 %.



Obr. č. 19 Boltzmannův graf závislosti aktivity AChE na objemových % propan-2-olu

Metoda stanovení aktivity AChE dle Ellmana se ukázala být pro tuto práci vhodná. Komplikovanější situace nastala jen při měření některých solí kovů, kde při vyšších koncentracích substrátu docházelo k vytvoření zákalu a k jeho interferenci s měřenou absorbancí. Z tohoto důvodu musely být některé výsledky, jako např. MgCl₂, či nejvyšší koncentrace substrátu u ZnCl₂ z výsledků odebrány.

Vyhodnocení pomocí grafů dle Dixon a Boltzmana shledávám v této práci stejně přínosnými. Jednoduchým grafickým zhodnocením bylo dosaženo očekávaných výsledků. Pouze u některých látek nebylo možno pomocí těchto dvou metod získané výstupy vyhodnotit. Ne však chybou metod samých, nebo jejich špatného užití. Jednalo se o látky bez inhibičního potenciálu, u kterých výsledné hodnoty aktivity AChE nebylo možné proložit sigmoidní křivkou, jaká se používá u Boltzmana, nebo přímkou u Dixon.

Výsledky ve většině případů souhlasí s literaturou, v případě, že se již o daných látkách v souvislosti s AChE zmínky objevují (takrin^{4, 12, 35}, ethanol³⁶). Jediným sporným bodem byla situace u kofeinu, kde mé výsledky jednoznačně svědčily pro kofein jako nekompetitivní inhibitor, kdežto v literatuře³³ se o něm hovoří jako o inhibitoru kompetitivním. Tento rozpor nastal pravděpodobně rozdílem mezi použitou AChE v mé práci a v experimentu, který stojí za opačným názorem. V této práci byla použita AChE

z elektrického úhoře. Ostatní zdroje³² pouze potvrzují, že kofein inhibuje AChE, mechanismus inhibice však nezmiňují.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo vytvořit komplexní experiment shrnující účinek různých látek na aktivitu acetylcholinesterasy. Výběrem látek z řad organických rozpouštědel, některých solí kovů a také substancí vyskytujících se v lidském těle nebo v potravinách byl vytvořen přehled látek, které ovlivňují aktivitu acetylcholinesterasy a zasahují tak do neuronální transmise.

U skupiny látek inhibujících zkoumaný enzym byl posouzen rozsah inhibičního působení, odhadnut způsob inhibice, zejména pomocí grafických metod uzpůsobených tomuto účelu, a v neposlední řadě byla určena podle dané metody buď střední inhibiční koncentrace (IC₅₀), nebo rovnovážná inhibiční konstanta K_i, které zastupují sílu inhibice enzymu.

Mezi nejsilnější inhibitory AChE z této práce lze zařadit takrin, kofein, FeCl₃, AlCl₃, dimethylsulfoxid, ethanol, methanol nebo jeden z nejsilnějších propan-2-ol. U těchto rozpouštědel však nelze hovořit o selektivitě právě k AChE. Jsou to činidla, která působí denaturaci a neselektivně působí i na jiné látky.

Výstup z práce má posloužit jako podklad a zdroj informací pro další prováděné experimenty týkající se inhibitorů AChE nebo jiných mechanismů působení látek na enzym.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) JIRÁK, R., HOLMEROVÁ, I., BORZOVÁ C. Demence a jiné poruchy paměti. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2454-6.
- 2) MARTÍNKOVÁ, J. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing 2007. ISBN 9788024713564.
- 3) POHANKA, M. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* [online]. 2012, roč. 13, č. 2, s. 2219-2238 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1422-0067.
Dostupné z: DOI 10.3390/ijms13022219
- 4) POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* [online]. 2011, roč. 155, č. 3, s. 219-226 [cit. 2013-04-11]. ISSN 12138118.
Dostupné z: DOI 10.5507/bp.2011.036
- 5) NAVRÁTIL, L., BAJGAR, J. *Prostaglandiny v klinické medicíně: cholinesterasy a jejich klinický význam*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989.
- 6) LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 15. zcela přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0836-1.
- 7) LÜLLMANN, H., MOHR, K., HEIN, L. *Barevný atlas farmakologie 5*. Zcela přeprac. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-1672-5.
- 8) PALMER, T. *5th International Meeting on Cholinesterases: A Satellite Meeting of the International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Madras (India) September 24-28,1994: Published Proceedings* [online]. San Diego: University of California, 1995 [cit. 2013-04-11].
Dostupné z: <http://www.dtic.mil/cgi-bin/GetTRDoc?AD=ADA291253>

- 9) PATOČKA, J., KUČA, K., JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Med. (Hradec Králové)* [online]. 2004, roč. 47, č. 4, s. 215-226 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1211-4286.
Dostupné z: http://www.lfhk.cuni.cz/Data/files/Casopisy/2004/AM-4_04.pdf
- 10) DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., et al. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem. Biol. Interact.* [online]. 2010, roč. 187. č. 1-3, s. 10-22 [cit. 2013-04-11]. ISSN: 0009-2797.
Dostupné z: DOI: 10.1016/j.cbi.2010.01.042
- 11) YON-KAHN, J., HERVÉ, G. *Molecular and Cellular Enzymology, Vol.1*, 1st ed. Berlin: Springer, 2010, XLIV. ISBN 978-3-642-01227-3
- 12) PIDRMAN, V. *Demence*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. ISBN 978-80-247-1490-5.
- 13) VLČEK, V., POHANKA, M. Environmentální aspekty užití organofosfátových a karbamátových pesticidů schválených k užití v České republice. *Chem. Listy* [online]. 2011, roč. 105, č. 12, s. 908-912 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_12_908-912.pdf
- 14) KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol: Clin. Toxicol.* [online]. 2002, roč. 40, č. 6, s. 803-816 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1556-3650.
Dostupné z: DOI 10.1081/CLT-120015840
- 15) WIENER, S. W., HOFFMAN, R. S. Nerve Agents: A Comprehensive Review. *J. Intensive Care Med.* 2004, roč. 19, č. 1. s. 22-37. ISSN 0885-0666.
- 16) PATOČKA, J. a kolektiv. *Vojenská toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN: 80-247-0608-3.

- 17) YANKNER, B. A Mechanisms of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Neuron* [online]. 1996, roč. 16, č. 5, s. 921-932 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1097-4199. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/08966273/16/5>
- 18) FIŠAR, Z. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. 2. přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2737-0.
- 19) FERENČÍK, M., NOVÁK, M., ROVENSKÝ, J. Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Bratisl. Lek. Listy* 2001, roč. 102, č. 3, s. 123-132. ISSN 0006-9248.
- 20) TAKASHIMA, A., HONDA, T., YASUTAKE, K., et al. Activation of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25-35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* [online]. 1998, roč. 31, č. 4, s. 317-323 [cit. 2013-04-11]. ISSN 0168-0102. Dostupné z: DOI: 10.1016/S0168-0102(98)00061-3
- 21) RESSNER, P. Alzheimerova nemoc – diagnostika a léčba. *Zdravotnické noviny: Příloha Lékařské listy* 2006, č. 21, ISSN 0044-1996.
- 22) JIRÁK, R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt. lékáren.* 2012, roč. 8, č. 3, s. 107-108. ISSN 1801-2434.
- 23) KREJČOVÁ, G., ŠEVELOVÁ, L. Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterasy. *Voj. Zdrav. Listy* [online]. 2003, roč. LXXII, č. 1, s. 37-44 [cit. 2013-04-11]. ISSN 0372-7025. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%201_2003/Vz11_9.pdf
- 24) BRUNOVSKÝ, M. Inhibitory cholinesteras v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol. praxi* 2007, roč. 8, č. 2, s. 112-117. ISSN 1213-1814.

- 25) SHEARDOVÁ, K., HORT, J., RUSINA, R. Doporučené postupy pro terapii Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Psychiatr. praxi* [online]. 2009, roč. 10, č. 5, s. 224-227 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1803-5272.
Dostupné z: <http://www.psychiatriepropraxi.cz/pdfs/psy/2009/05/04.pdf>
- 26) CARPENITO-MOYET, L. J. *Nursing Care Plans and Documentation*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 978-0-7817-7064-4.
- 27) ŠPALEK, P. Myasténia gravis. *Čes. Slov. Neurol. Neurochir.* [online]. 2008, 71/104, č. 1. s. 7-24 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1802-4041.
Dostupné z: <http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek?ida=2594>
- 28) PÍŤHA, J. Praktické zkušenosti s klinickou diagnostikou myasthenia gravis. *Neurol. praxi* 2010, roč. 11, č. 2, s. 90-94. ISSN 1213-1814.
- 29) ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDERS, V. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, roč. 7., č. 2, s. 88-95. ISSN 0264-6021.
- 30) CORNISH-BOWDEN, A. A Simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* 1974, roč. 137, č. 1, s. 143-144. ISSN 0264-6021.
- 31) KUCHARŤ, M. *Výzkum a vývoj léčiv*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008. ISBN 978-80-7080-677-7.
- 32) KARADSHEH, N., KUSSIE, P., LINTHICUM, D. S. Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methyl pyrrolidine and their derivatives. *Toxicol. Lett.* 1991, roč. 55, č. 3, s. 335-342. ISSN 0378-4274.
- 33) STOYTICHEVA, M., ZLATEV, R. Bioelectrical Studies of the Effect of Some Pharmaceuticals on the Acetylcholinesterase Activity. *Electroanalysis* [online]. 1996, roč. 8, č. 7, s. 676-679 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1521-4109.
Dostupné z: DOI 10.1002/ELAN.1140080714

- 34) POHANKA, M. Biosenzory založené na cholinesterasach. *Chem.Listy* [online]. 2013, roč. 107, č. 2, s. 121-125 [cit. 2013-04-11]. ISSN 1213-7103.
Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_02_121-125.pdf
- 35) FISHER, A., HANIN, I., YOSHIDA, M. Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. New York: Plenum Press, 1998. ISBN: 0-306-45903-5.
- 36) ORTÉGA, F., GARCIA, D., MARTY J. L. Acetylcholinesterase-ethanol interactions: inactivation, substrate and ligand exclusion. In: Ballesteros, A., Plou, F. J., Iborra, J. L., Halling P. J. Eds. *Stability and Stabilization of Biocatalysts, Proceedings of an International Symposium organized under auspices of the Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology, the University of Cordoba, Spain, and the Spanish Society of Biotechnology, Cordoba, Spain, April 19-22, 1998*. *Prog. Biotechnol.* 1998, roč. 15, ISBN 978-0-444-82970-2.