

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
**KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**

**POROVNÁNÍ SCHOPNOSTI  
TAKRIN-FENOTHIAZINOVÝCH DERIVÁTŮ  
INHIBOVAT CHOLINESTERASY**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.**

**Konzultant: Mgr. Martina Hrabinová**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

**Bc. Lenka Pulkrábková**

## PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D za ochotu, cenné rady a čas, jenž mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala paní Mgr. Martině Hrabínové za odborné konzultace, poskytnuté materiály, trpělivost a čas, který mi věnovala. Poděkování patří i paní kapitánce PharmDr. Vendule Hepnarové, Ph. D. za poskytnutý čas, pomoc v laboratoři, zpracování dat a za rady, které byly důležité při psaní této práce. V neposlední řadě patří mé velké díky zaměstnancům Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za vstřícnost a příjemné pracovní prostředí.

„Prohlašuji, že tato 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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 26. 4. 2018

.....  
Bc. Lenka Pulkrábková

# OBSAH

ABSTRAKT .....	6
ABSTRACT .....	8
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL PRÁCE .....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1 Enzymy .....	12
3.1.1 Mechanismus účinku .....	13
3.1.2 Zymogeny, izoenzymy .....	13
3.1.3 Regulace enzymů .....	14
3.1.4 Názvosloví .....	14
3.1.5 Třídy enzymů a jejich funkce .....	15
3.1.6 Využití enzymů .....	17
3.2 Cholinesterasy .....	17
3.2.1 Acetylcholinesterasa .....	18
3.2.2 Butyrylcholinesterasa .....	20
3.3 Alzheimerova choroba .....	25
3.3.1 Historie .....	25
3.3.2 Hypotézy vzniku AD .....	26
3.3.3 Léčba .....	28
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	34
4.1 Princip metody .....	34
4.2 Použitý materiál .....	35
4.3 Přístroje a pomůcky .....	37
4.4 Postup měření .....	37
4.5 Zpracování výsledků .....	37
5. VÝSLEDKY .....	38
6. DISKUSE .....	40
7. ZÁVĚR .....	43

8. POUŽITÉ ZKRATKY .....	44
9. SEZNAM TABULEK .....	45
10. SEZNAM OBRÁZKŮ .....	46
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	47

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Lenka Pulkrábková

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martina Hrabínová

Název diplomové práce: Porovnání schopnosti takrin-fenothiazinových derivátů inhibovat cholinesterasy

Alzheimerova choroba (AD) je progresivní fatální neurodegenerativní porucha a nejběžnější typ demence. Projevuje se řadou neuropsychiatrických příznaků, jako je ztráta paměti, sociální dovednosti atd. Etiologie a patogeneze onemocnění mají multifaktoriální charakter a nejsou dobře známy. Mezi hlavní patologické znaky patří: ztráta neuronů, zvláště ztráta cholinergních neuronů, extracelulární amyloidní plaky, intracelulární agregáty hyperfosforylovaného tau proteinu, oxidační stres apod. Jelikož AD je ovlivňována mnoha faktory, hlavní strategií léčby je intervence několika cílů v mozku. Takové léky jsou označovány jako multi-target-directed ligands (MTDLs) a ovlivňují různé molekulární abnormality AD.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat schopnost takrin-fenothiazinových derivátů inhibovat cholinesterasy. Testování byly podrobeny deriváty, které obsahovaly různé substituenty a jejich spojovací řetězce byly dlouhé od dvou až do pěti uhlíků.

Pro studii bylo použito 36 strukturně odlišných derivátů inhibujících acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu. Inhibiční aktivita sloučenin byla stanovena *in vitro* pomocí Ellmanovy metody. Inhibiční účinnost každého inhibitoru byla proměřena v každém bodě koncentrační řady od  $10^{-3}$  až po  $10^{-8,5}$  mol/l. Smísením všech potřebných složek reakce vzniklo žluté zbarvení

roztoku, jehož intenzita byla spektrofotometricky proměřena. Ze získaných hodnot byla vypočtena poloviční inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ).

Porovnáním hodnot  $IC_{50}$  byly zjištěny strukturální závislosti, které mají vliv na účinnost inhibice. Jako nejlepší se ukázaly sloučeniny obsahující atom chloru v poloze 6. Vliv délky spojovacího řetězce byl nepatrný.

Klíčová slova: acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Alzheimerova choroba, inhibitor, takrin, fenothiazin

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Lenka Pulkrábková

Supervisor: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martina Hrabínová

Title of diploma thesis: A comparison of tacrine – phenothiazine derivatives in the efficacy of cholinesterase inhibition

Alzheimer's disease (AD) is a progressive fatal neurodegenerative disorder and the most common type of dementia. It is manifested by a variety of neuropsychiatric symptoms such as memory loss, social skills etc. Etiology and pathogenesis of the disease has a multifactorial character and is not well known. Among the major pathological features belong: presence of neuronal loss, especially loss of cholinergic neurons, extracellular amyloid plaques, intracellular aggregates of hyperphosphorylated tau protein, oxidative stress etc. As AD is influenced by multiple factors, the main strategy in treatment is intervention multiple targets in the brain as well. Such drugs are denoted as multi-target-directed ligands (MTDLs) and they affect different molecular abnormalities of AD.

The aim of this diploma thesis was the evaluation of the ability of tacrine-phenothiazine derivatives to inhibit cholinesterases (AChE, BChE). Derivatives with two to five carbons linking chains between tacrine and phenothiazine moiety, which containing various substituents were tested.

The 36 structurally different derivatives of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors were used for this study. The inhibitory activity of the compounds was determined *in vitro* by the Ellman's method. A concentration range of all inhibitors was established. The concentration of



inhibitors solution started at a concentration  $10^{-3}$  and finished at a concentration of  $10^{-8.5}$  mol/l. The all necessary components of the reaction were mixed and resulting yellow coloration of the solution was measured spectrophotometrically. The inhibitory concentrations were calculated from the obtained values.

The structural dependencies were confirmed comparing inhibitory concentrations. The compounds containing the chlorine atom at position 6 showed the best inhibitory activity of all tested compounds. The influence of the length of the linker chain was insignificant.

Keywords: acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, inhibitor, tacrine, phenothiazine

# 1. ÚVOD

Alzheimerova choroba patří mezi neurodegenerativní choroby. Onemocnění postihuje v současné době značnou část populace a jeho incidence stále stoupá. Typickými příznaky jsou zhoršené kognitivní funkce, porucha paměti, změna chování a poruchy řeči. Etiopatogeneze tohoto onemocnění není stále objasněna. Současná léčiva využívající se v terapii tohoto onemocnění jsou pouze symptomatická a zpomalují progresi choroby. Pro lehčí až střední formu demence se používají inhibitory cholinesteras, pro léčbu těžší formy je pacientovi podáván blokátor NMDA receptoru.

Tato diplomová práce se zabývá substituovanými deriváty takrinu a fenothiazinu, jež jsou spojeny různě dlouhými řetězci. Takrin byl jeden z prvních objevených inhibitorů acetylcholinesterasy, ale vykazoval značnou hepatotoxicitu, proto se od jeho využití v praxi upustilo. Modifikací jeho molekuly dochází ke snížení jeho toxických vlastností. Fenothiaziny jsou velmi všestranná léčiva. Mají antioxidační účinek, který by mohl být využit právě v léčbě zmiňovaného onemocnění. Deriváty byly testovány na míru afinity k enzymu AChE a BChE, která byla vyjádřena inhibičním potenciálem těchto látek. Inhibitory byly syntetizovány dle nového přístupu tzv. „MTDLs – multi-target-directed ligands“. Sloučeniny připravené takovýmto způsobem by měly současně ovlivňovat více patologických procesů, které se podílí na vzniku Alzheimerovy choroby.

## 2. CÍL PRÁCE

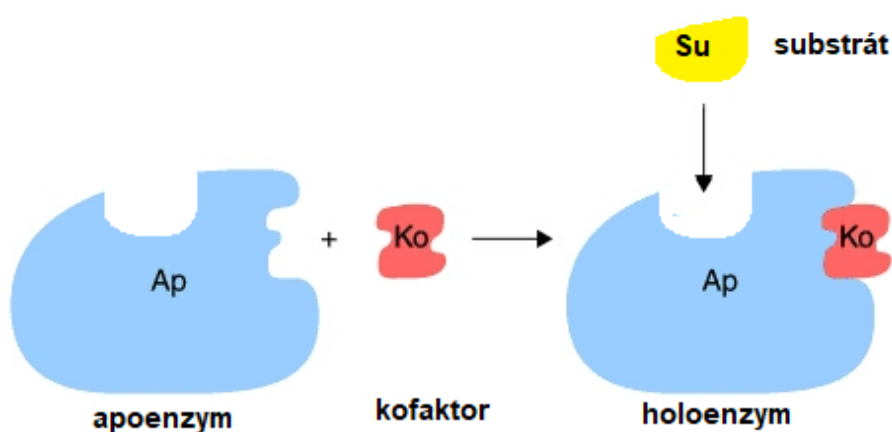
Cílem práce bylo porovnat inhibiční účinnost 36 derivátů, jež byly připraveny spojením takrinu a fenothiazinu. Tyto sloučeniny byly obohaceny o další substituenty, jež měly snížit jejich toxicitu a zvýšit jejich prostupnost přes hematoencefalickou bariéru. Inhibitory byly proměřeny v koncentrační řadě od  $10^{-3}$  až po koncentraci  $10^{-8,5}$  mol/l. Z naměřených dat byla vypočtena  $IC_{50}$ . Na základě získaných výsledků budou nejlepší sloučeniny procházet dalším *in vitro* testováním a následně sloužit jako podklad pro syntézu nových potenciálních léčiv Alzheimerovy nemoci.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Enzymy

V živých organismech probíhá nesčetné množství reakcí, které jsou katalyzovány enzymy. Pojem „enzym“ poprvé použil německý fyziolog Wilhelm Kühne již v 70. letech 19. století, ale existence enzymů, dříve označovaných jako fermenty, byla známá mnohem dříve. Postupem času a s přibývajícím znalostmi vznikl o enzimech samostatný vědní obor zvaný enzymologie. Enzymy lze charakterizovat jako biomolekuly, jež katalyzují biologické reakce. Obecně platí, že katalyzátory snižují aktivační energii reakce, neovlivňují její rovnovážný stav a vycházejí z reakce nezměněny. Enzymy se od ostatních katalyzátorů odlišují v první řadě vyšší reakční rychlostí, jsou tedy účinnější. Dále jsou schopny pracovat za mírnějších podmínek (nízká teplota, neutrální pH). Mají vyšší specifitu reakce, jsou schopny regulace a nejsou toxické (1).

Strukturně můžeme enzymy rozdělit na jednoduché a složené. Jednoduché enzymy obsahují pouze polypeptidový řetězec. Složené biokatalyzátory, jak už název napovídá, jsou tvořeny polypeptidovým řetězcem (apoenzymem) a nebílkovinnou složkou (kofaktorem). Sám apoenzym je neaktivní, aby vznikla aktivní molekula enzymu, tedy holoenzym, je nutná přítomnost kofaktoru (obr. 1).



Obrázek 1: Schématické zobrazení aktivace apoenzymu (2).

Jako kofaktory mohou sloužit ionty kovů nebo organické molekuly, které dělíme dle pevnosti vazby na koenzymy a prostetické skupiny. Koenzymy jsou schopné samostatné existence a na apoenzym jsou vázány přechodně například  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADP}^+$ . Dalšími zmíněnými kofaktory jsou prostetické skupiny, jež jsou trvale kovalentně spojeny s enzymem, příkladem je hem či flavin (3).

### **3.1.1 Mechanismus účinku**

Mechanismus účinku enzymů je založen na interakci enzymu a substrátu za vzniku komplexu enzym-substrát. Vzápětí je substrát za katalýzy enzymem přeměněn na produkt a vzniká komplex enzym-produkt. V posledním kroku se tento komplex rozpadne a dojde k uvolnění produktu. K interakci substrátu a enzymu by nedošlo bez aktivního místa. Aktivní místo je malá oblast molekuly skládající se z vazebného a katalytického místa. Úkolem vazebného místa je specificky vázat substrát, naopak za katalytickou aktivitu enzymu je zodpovědné místo katalytické (4).

### **3.1.2 Zymogeny, izoenzymy**

Některé enzymy jsou specifické tím, že jsou sekretovány v inaktivní formě a nazýváme je zymogeny neboli proenzymy. Mezi takovéto biokatalyzátory lze zařadit některé trávicí enzymy jako je například pepsinogen, který je aktivován nejen pomocí žaludeční kyseliny chlorovodíkové na aktivní pepsin, ale také samotnými molekulami pepsinu. Dále do této skupiny lze zařadit některé enzymy srážení krve, jmenovitě můžeme zmínit protrombin (3).

Enzymy, jež katalyzují stejnou reakci v různých částech organismu, ale liší se fyzikálně-chemickými vlastnostmi, označujeme jako izoenzymy. Tyto enzymy mají geneticky podmíněné rozdíly v primární struktuře a jednotlivé izoenzymy se liší afinitou k substrátům a možnostmi regulace aktivity. Typickým izoenzymem je laktátdehydrogenasa (LD), která je tvořena čtyřmi podjednotkami. Ty mohou být složeny ze dvou typů monomerů (M a H), takže existuje celkem 5 izoenzymů s označením  $\text{LD}_1$  až  $\text{LD}_5$  (5).

### 3.1.3 Regulace enzymů

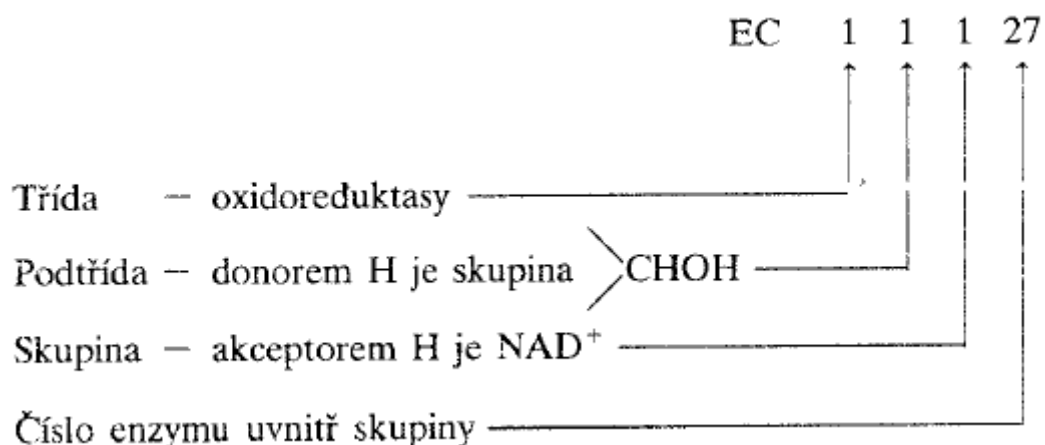
Látky, které ovlivňují katalytickou činnost enzymů, nazýváme efektory. Pokud dojde vlivem efektoru ke zvýšení aktivity enzymu, označujeme daný efektor jako aktivátor. V opačném případě, kdy dojde ke snížení účinku enzymu, jedná se o inhibitor. Efektory můžeme rozdělit na přirozené a nepřirozené. Do přirozených řadíme fyziologické součásti buněk, jako jsou metabolity či koenzymy. Za nepřirozené efektory považujeme jedy, modelové látky a některá léčiva (6).

Inhibici lze rozdělit na reversibilní a ireversibilní. K ireversibilní inhibici dochází v případě, že se inhibitor kovalentně naváže na enzym. Příkladem ireversibilních inhibitorů jsou organofosfáty nebo těžké kovy. Reversibilní inhibitory se váží nekovalentně a tento typ inhibice dělíme na kompetitivní, nekompetitivní a akompetitivní. V případě kompetitivní inhibice dochází k soutěžení inhibitoru a substrátu o aktivní místo daného enzymu. Pokud dojde k navázání inhibitoru na enzym, je možné jej vytěsnit zvýšením koncentrace substrátu. Naváže-li se inhibitor mimo aktivní centrum, avšak pozmění-li konformaci enzymu, není možná vazba substrátu na enzym. V takovéto situaci hovoříme o nekompetitivní inhibici. Při akompetitivní inhibici se inhibitor váže pouze na enzym, jehož konformace byla dříve změněna navázáním substrátu (7).

### 3.1.4 Názvosloví

Prvním použitým názvoslovím při studiu enzymů bylo názvosloví triviální, pro něž byla typická koncovka -in. Názvy enzymů byly odvozovány od metod, jimiž byly enzymy objeveny, příkladem může být pepsin nebo trypsin. Toto pojmenování některých enzymů je často využíváno i dnes. Koncem 19. století zavedl francouzský mikrobiolog a chemik Duclaux koncovku -asa. Název enzymu tvoříme dle katalyzovaného substrátu nebo dle typu katalyzované reakce. Názvy enzymů odvozené od katalyzovaného substrátu jsou například amylasa či lipasa. Naopak oxidasy, hydrolasy, transaminasy a další jsou pojmenovány dle katalyzované reakce (1).

S rostoucím počtem nově objevených enzymů, bylo potřeba vyřešit jejich jednoznačnou a jednotou nomenklaturu. Proto bylo v roce 1961 Mezinárodní unií biochemie zavedeno systémové rozdělení enzymů spolu s jejich systémovými názvy. Jedním z hlavních rysů tohoto klasifikačního systému je seskupení enzymů do šesti hlavních tříd, z nichž každá má soustavu podtříd a skupin. Každý název enzymu má dvě části, první část je odvozena od názvu substrátu a druhá část, která končí koncovkou -asa, označuje typ katalyzované reakce. Každý enzym je označen jedinečným názvem a systémovým číslem. Systémové číslo (obr. 2) je složeno ze čtyř číslic, následuje po zkratce EC (Enzyme Commission) a udává informaci o zařazení konkrétního enzymu (6).



Obrázek 2: Značení tříd enzymů (1).

### 3.1.5 Třídy enzymů a jejich funkce

Jak již bylo zmíněno, enzymy dělíme do 6 hlavních tříd, jedná se o oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy. První uvedenou a také nejpočetnější třídou jsou oxidoreduktasy. Katalyzují redoxní neboli oxidačně-redukční reakce, jež jsou v biochemických cestách velmi časté. Při redoxních reakcích získá jeden substrát elektrony a redukuje se. Druhý substrát elektrony ztrácí a oxiduje se. Příkladem oxidoreduktas jsou dehydrogenasy, hydroxylasy a oxidasy. Hojně využívanými kofaktory této třídy jsou nikotinamidové a flavinové nukleotidy, ale také třeba hem (8).

V pořadí druhou třídou enzymů jsou transferasy, které přenášejí funkční skupinu z jedné molekuly na druhou. Dle přenášené skupiny dělíme transferasy na podtřídy. Pokud je přenášenou skupinou například vysokoenergetický fosfát, enzym katalyzující tuto reakci je kinasa. Je-li přenášenou skupinou uhlovodíkový zbytek, enzym označujeme jako glykosyltransferasu a pokud je přenášena acylová skupina, nese enzym název acyltransferasa. Stejně jako oxidoreduktasy se transferasy vyskytují ve formě složených bílkovin. Významnými kofaktory této třídy enzymů jsou adenosintrifosfát a koenzym A (4).

Štěpení chemických vazeb za účasti vody zajišťují enzymy třetí třídy, tedy hydrolasy. Dle typu vazby, kterou daný enzym štěpí, se dále dělí na podtřídy. Mezi hydrolasy můžeme zařadit některé trávicí enzymy např. lipasy, z disacharidů je to sacharasa nebo proteasy a do nich spadající pepsin. Povahou jsou hydrolasy jednoduché bílkoviny a pracují převážně bez kofaktorů (9).

Čtvrtou třídou enzymů jsou lyasy, které štěpí nebo naopak tvoří vazby za pomoci jiných prostředků, než jsou hydrolýza a redoxní reakce. Jedná se o méně početnou skupinu enzymů, které mají povahu složených bílkovin. Mezi lyasy patří dekarboxylasy, dehydratasy, aldolasy a další. Dle štěpených nebo syntetizovaných vazeb dělíme enzymy dále na podtřídy. Jedním z významných kofaktorů této skupiny účastnících se enzymatických reakcí je acetylkoenzym A (9).

Enzymy mající povahu jednoduchých bílkovin umožňující intramolekulární přesuny atomů a skupin, se nazývají isomerasy. Tato třída zahrnuje nejmenší počet enzymů a tyto biokatalyzátory se obvykle obejdou bez kofaktoru. Mezi isomerasy spadají například epimerasy, které mění polohu hydroxylové skupiny v molekule (8).

Poslední třídou enzymů jsou ligasy, jež mají povahu složených bílkovin. Katalyzují tvorbu energeticky náročných vazeb spojených s hydrolýzou adenosintrifosfátu. Mezi ligasy náleží například karboxylasy a DNA-ligasy (6).



### 3.1.6 Využití enzymů

Již v době objevu prvních enzymů měly tyto biokatalyzátory široké uplatnění, a to nejen v potravinářství pro výrobu alkoholu, ale také v textilním, chemickém či papírenském průmyslu. Bezesporu obrovským kladem byl příchod enzymového inženýrství. Jedná se o biotechnologický obor, který se zabývá ziskem, úpravou, ale také třeba stabilizací enzymů (1). Dalším oborem využívajícím enzymy je medicína, ve které lze biokatalyzátory použít k diagnostice onemocnění nebo k léčbě pacienta. Uvedme příklad, kdy je měřena hladina enzymů alaninaminotransferasy společně s aspartataminotransferasou a výsledek nám vypovídá o poškození jater (7). Restrikční endonukleasy, proetasy, polymerasy a cholinesterasy, to je jen zlomek enzymů, které našly mnohostranné uplatnění ve vědě a výzkumu (10).

## 3.2 Cholinesterasy

Cholinesterasa (ChE) je obecný termín používaný pro skupinu příbuzných enzymů, které hydrolyzují estery cholinu rychleji než jiné estery za optimálních podmínek. Jedná se o serinové hydrolasy patřící do skupiny esterasy v rámci vyšších eukaryot. Tato skupina enzymů působí na různé typy karboxylových esterů (11). V lidském těle existují dva typy ChE s několika variantami, přičemž obě ChE v literatuře nalézáme pod různými názvy.

Acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE) sdílí 65% homologii aminokyselinové sekvence a mají podobné molekulární formy a aktivní centra, i když jsou produkty různých genů na lidských chromozomech. Jmenovitě se jedná o chromozom 7 v případě AChE a chromosom 3 u BChE (12).

Ačkoliv jsou tyto enzymy úzce příbuzné, vykazují velmi odlišné substrátové specifity, které se pouze částečně překrývají. Tato nerovnoměrnost je z velké části způsobena rozdíly v počtu aromatických zbytků lemujících aktivní místa enzymů. V případě BChE je šest ze 14 aromatických aminokyselinových zbytků, které lemují aktivní místo AChE, nahrazeno alifatickými aminokyselinovými zbytky. Tato situace způsobuje, že objem aktivního místa BChE je větší než objem aktivního místa AChE. Nahrazení

aromatických aminokyselin alifatickými aminokyselinami je zodpovědné za selektivní citlivost vůči různým inhibitorům obou enzymů (13).

### **3.2.1 Acetylcholinesterasa**

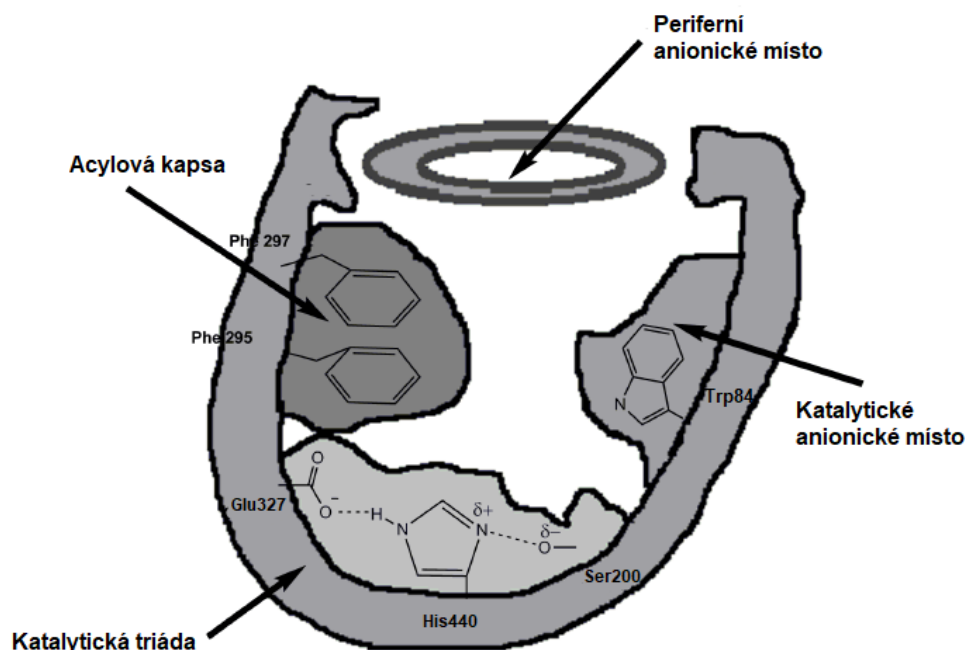
Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7) neboli acetylcholin acetylhydrolasa také známá jako pravá, specifická nebo ChE typu 1. Tento enzym se nachází v erythrocytech, nervových zakončeních, plicích, slezině a všech částech mozku. Enzym AChE je membránově vázaný glykoprotein a existuje v několika molekulárních formách (14). Hlavní funkcí AChE je rychlá hydrolýza neurotransmiteru acetylcholinu na cholinergních synapsích (15).

AChE je jedním z nejdůležitějších enzymů pro nervovou odezvu a funkci. Tento enzym katalyzuje hydrolýzu esterů acylcholinu s relativní specifitou pro acetylcholin (ACh). ACh je běžným neurotransmiterem, který najdeme v centrálním a periferním nervovém systému. Jakmile se ACh uvolní z axonu, začne se pohybovat napříč synaptickou štěrbinou, aby se navázal na receptor na postsynaptické membráně. V periferním nervovém systému se ACh nachází na neuromuskulárním spojení, kde působí regulaci svalové kontrakce. ACh se také uplatňuje v autonomním nervovém systému. Intracelulární účinky ACh jsou zprostředkovány aktivací nikotinových a muskarinových acetylcholinových receptorů. Po rychlé hydrolýze ACh pomocí AChE dojde k ukončení přenosu neuronálních impulzů (16).

#### **3.2.1.1 Struktura**

Enzym existuje ve více molekulárních formách, které mají podobné katalytické vlastnosti, ale liší se v jejich oligomerní sestavě a způsobu připojení k povrchu buněk. V mozku savců se většina AChE vyskytuje jako tetramerní forma  $G_4$  s mnohem menším množstvím monomerní formy  $G_1$  (17). Monomer AChE obsahující 537 aminokyselin je elipsoidní molekula o rozměrech 45 x 60 x 65 Å a spadá do třídy  $\alpha/\beta$  proteinů. Monomer enzymu obsahuje 12  $\beta$ -skládaných centrálně smíšených listů, které obklopuje 14  $\alpha$ -helixů (18).

Nejpozoruhodnějším znakem AChE je úzká a přibližně 20 Å hluboká kavita, jež proniká téměř polovinou enzymu a rozšiřuje se směrem k aktivnímu místu, které se nachází na jeho dně (19). Důležitými strukturami, které jsou součástí zmiňované kavity (obr. 3), jsou dvě vazebná místa, periferní anionické místo (PAS) a katalytické anionické místo (CAS), a v neposlední řadě katalytická triáda a acylová kapsa (18,20). PAS AChE, známé také jako  $\beta$ -anionické místo, je oblastí nacházející se na vstupu katalytické kavity, přibližně ve vzdálenosti 14 Å od aktivního centra (21–24). Ligandy obsazující PAS často mění konformaci aktivního centra (25,26). PAS obsahuje Tyr70, Tyr121 a Trp279. Mezi těmito aminokyselinami je klíčovým Trp279, jenž je zodpovědný za adhezní funkci AChE (27). Prvním krokem v katalytické dráze je přechodná vazba substrátu na PAS, který váže kladný kvarterní amin cholinové části ACh. Právě tato podjednotka je zodpovědná za vazbu kvarterních ligandů, působících jako kompetitivní inhibitory (23,28), a kvarterních oximů, jež účinně reaktivují AChE inhibovanou organofosfáty (29). Aktivní místo je lemováno čtrnácti aromatickými aminokyselinami, jejichž zbytky interagují se substráty (30). Všechny tyto aminokyseliny jsou vysoce konzervativní napříč druhy (31).



**Obrázek 3: Schéma aktivního místa acetylcholinesterasy (18).**

Nedaleko dna kavity se nachází CAS, jehož součástí je Trp84, který interaguje s kvarterním aminem ACh. Acetylová skupina je vázána v acylové

kapse, která je tvořena dalšími aromatickými zbytky, které lemují vnitřní stěnu kavity. Jelikož je mezi anionickými místy kavita zúžená a není možný prostup ACh, je nutné, aby protein podstoupil značné konformační změny. Tím dojde k rozšíření kavity a je umožněn prostup substrátu (32).

Dno kavity, kde dochází k hydrolýze ACh na acetát a cholin, obsahuje, podobně jako aktivní místa dalších serinových hydroláz, katalytickou triádu aminokyselin. Triádu tvoří aminokyselinová sekvence Ser200-His440-Glu327. Vazba ACh v CAS a acylové kapse umožňuje interakci ACh s aktivním místem. Hydrolýzou karboxylu vzniká acylderivát enzymu a volný cholin. Poté, v přítomnosti His440, podléhá acylderivát nukleofilnímu ataku molekulou vody. Následuje uvolnění kyseliny octové a regenerovaného volného enzymu (33).

### **3.2.1.2 Využití**

Znalost struktury a vlastností katalytické triády AChE vede k návrhu a vývoji nových inhibitorů AChE (IAChE) jako potencionálních terapeutik pro léčbu Alzheimerovy choroby (34). Mechanismus inhibice AChE se uplatňuje také při vývoji reaktivátorů jakožto antidot při léčbě otrav nervově paralytickými látkami (35). Další uplatnění inhibitorů AChE je v léčbě onemocnění, které způsobuje svalovou slabost a únavu, a je nazýváno myasthenia gravis. Toto autoimunitní onemocnění je způsobeno autoproti látkami zaměřenými na postsynaptické acetylcholinové receptory. Indikace IAChE je obvykle první volbou léčby a poskytuje symptomatickou úlevu (36).

### **3.2.2 Butyrylcholinesterasa**

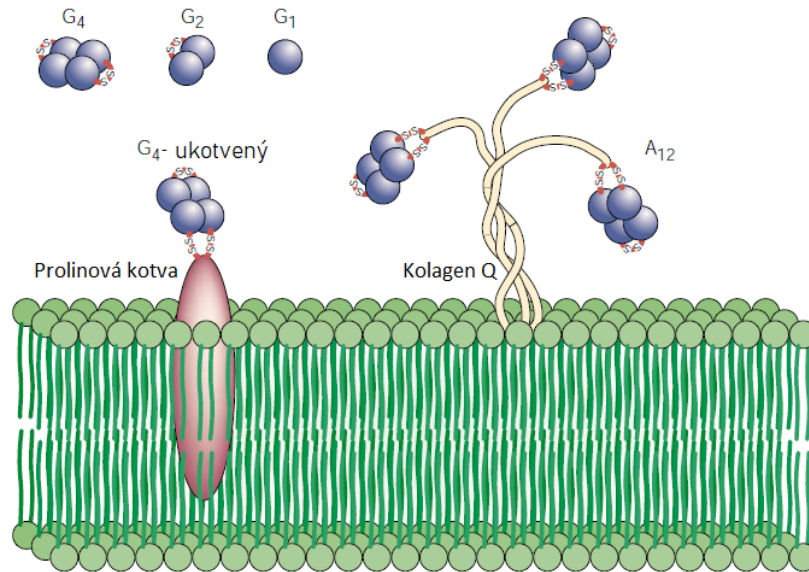
Druhým typem ChE je butyrylcholinesterasa (EC 3.1.1.8) nebo též acylcholin acylhydrolasa jinak označována jako plazmatická, sérová, falešná, nespecifická nebo ChE typu 2. Tento enzym vyskytující se v plazmě má více než jedenáct izoenzymových variant, dále je přítomný v játrech, hladké svalovině, střevech, pankreatu, srdci a bílé hmotě mozkové (14).

Význam BChE spočívá nejen v metabolismu lipoproteinů a některých sloučenin, ale zásadní úlohu má i v buněčné adhezi a neurogenezi, udržování myelinu, odstraňování toxických molekul a při zpracování prekursoru amyloidního proteinu (37). BChE působí jako detoxikační enzym, vychytává

organofosfátové a karbamátové inhibitory ještě předtím, než doputují k AChE. Inhibuje některá léčiva jako je například kokain a amitriptylin. V případě, že není AChE přítomna, funguje BChE jako záloha a přebírá regulaci cholinergního přenosu (38).

### 3.2.2.1 Struktura

U BChE stejně jako u AChE existují různé molekulární formy (obr. 4) zahrnující monomery a oligomery, které se skládají z identických katalytických podjednotek (39). Molekulární formy BChE jsou identifikovány podle jejich monomerní a oligomerní povahy. Symetrickou monomerní formu označujeme jako globulární formu -  $G_1$ . Dimerní forma, označená jako  $G_2$ , se skládá ze dvou monomerů, které jsou spojeny disulfidovým můstkem vytvořeným mezi Cys571 z každého monomeru. Dvě formy  $G_2$  mohou být spojeny dohromady pomocí hydrofobních interakcí za vzniku tetramerní globulární formy  $G_4$  (40). Všechny tyto tři molekulární formy  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_4$  jsou symetrické, hydrofilní, globulární a nacházejí se především v rozpustné formě. Globulární BChE se také vyskytuje v asymetrických, membránově vázaných formách, které jsou amfifilní a sestávají z tetramerů  $G_4$ , které jsou zakotveny na membránách pomocí proteinové kotvy. Protein, jenž upevňuje BChE k membránám, je známý jako proteinová kotva bohatá na prolin a podílí se také na oligomerizaci jednotlivých katalytických podjednotek (41). Mimoto existují další formy BChE, které jsou asymetrické, sestavené z tetramerů katalytických podjednotek a k membránám jsou připojeny trojitou, nekatalytickou, kolagenovou kotvou. Tyto tetramery označujeme jako  $A_4$ , dva takovéto tetramery tvoří formu  $A_8$  a tři vytváří formu  $A_{12}$  (42). Kolagen, který sestavuje BChE do heteromerních multimerů, označujeme jako kolagen Q. Zmiňovaný kolagen má vazebnou doménu bohatou na prolin (43).



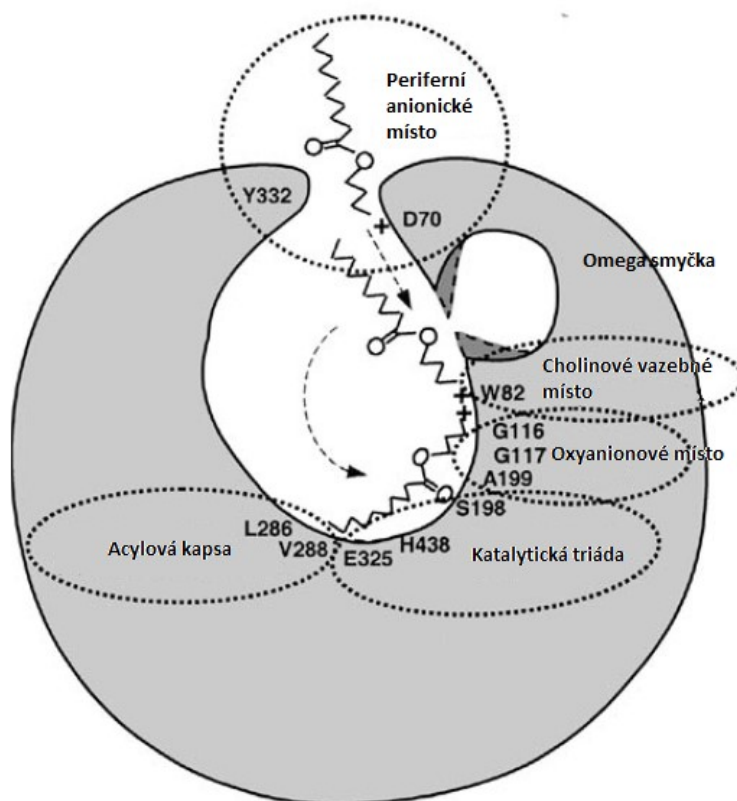
**Obrázek 4: Molekulární formy cholinesteras (44).**

Monomer tvořený přibližně 574 aminokyselinami má 20 Å hlubokou kavitu lemovanou přibližně 55 aminokyselinovými zbytky. PAS se nachází u ústí kavity a zbytky Asp70 a Tyr332, které jsou jeho součástí, se podílejí nejen na počáteční vazbě kladně nabitých substrátů, jako jsou kvarterní amoniové estery obsahující cholin, ale také na kontrole aktivace. Mezi Asp70 a Tyr332 se nachází vodíková vazba, která kontroluje funkční stavbu aktivního místa BChE. Navázáním kladně nabitého substrátu na enzym dojde ke vzniku komplexu kation- $\pi$  s aromatickým kruhem Tyr332, současně substrát interaguje s negativně nabitým Asp70, což vede ke konformačním změnám v monomeru. Poté se obě ohebná ramena omega smyčky přiblíží k sobě a substrát sklouzne ke zbytku Trp82, jenž je součástí cholinového vazebného místa. Toto místo bylo původně označeno jako anionické místo, ale nyní je známo, že neexistuje žádný zbytek s negativním nábojem, který by byl odpovědný za vazbu kvartérní amoniové skupiny (38).

Oxyanionové místo, nacházející se v blízkosti cholinového vazebného místa, zahrnuje Gly116, Gly117 a Ala199 a pomáhá otáčet substrát z vertikální do vodorovné polohy, kde může být substrát hydrolyzován za účasti Ser198. Aminokyseliny oxyanionového místa mají peptidické NH funkce s karbonylovým nebo fosforylovým kyslíkem esterové vazby (45).

V případě, že je substrát otočen vodorovně, dojde k vazbě acylové části substrátu na místo označované jako acylová kapsa. Acylové kapsy AChE a BChE obsahují různé aminokyselinové zbytky. V acylové kapse AChE fenylové kruhy Phe295 a Phe297 omezují míru volnosti navázaného substrátu a zvyšují katalýzu nejkratší acylové skupiny, jež je součástí např. substrátu ACh. Nahrazení fenylalaninů alifatickými zbytky Leu286 a Val288, jež se nacházejí v acylové kapse BChE, umožňuje katalýzu substrátu obsahujícího větší acyl skupinu. Takovýmto substrátem je například butyrylcholin (46).

Katalytická triáda esteratického místa (obr. 5) složená ze Ser198, His438 a Glu325 hydrolyzuje substrát, jenž je stabilizován mezi oxyanionovým místem a acylovou kapsou. Imidazolový kruh His438 přenáší elektrony z Glu325 na Ser198 a hydroxylový kyslík Ser198 se stává nukleofilem. Nukleofil atakuje esterovou vazbu substrátu, což má za následek vznik meziprojektu acyl-enzym a volného cholinu. Následně je acylová skupina hydrolyzována ze Ser198 nukleofilní molekulou vody, jež je aktivována převzetím protonu z His438 (45,47).



*Vysvětlivky: A-alanin; D-kys. asparagová; E-kys. glutamová; G-glycin; H-histidin; L-leucin; S-serin; V-valin; W-tryptofan; Y-tyrosin.*

*Obrázek 5: Schéma aktivního místa butyrylcholinesterasy (38).*

### 3.2.2.2 Využití

BChE je přítomna v lidské plazmě a lze ji z ní snadno izolovat. Enzym BChE rychle reaguje s estery organofosfátů (OP) i při velmi nízkých dávkách. OP vytváří nevratnou kovalentní vazbu s BChE, jež je stabilní v krevním oběhu ale i v odebrané plazmě. BChE má poločas rozpadu 120 dní, což znamená, že množství aduktu OP-BChE lze detekovat i několik dní po expozici OP. Všechny tyto aspekty svědčí pro využívání BChE jako biomarkeru při expozici nervově paralytickými látkami a organofosforovými pesticidy (48).

Enzym BChE hraje důležitou roli v metabolismu kokainu. Je to hlavní detoxifikační enzym přírodního i syntetického kokainu v plazmě. Neaktivní metabolity produkované BChE jsou methylestery ecgoninu a benzoové kyseliny, které se z oběhu rychle vylučují ledvinami (49). Zvažuje se její využití jako bioscavengeru při léčbě otrav kokainem (50).



BChE by mohla být včasný marker v diagnostice Alzheimerovy choroby (AD). Bylo zjištěno, že cerebrospinální tekutina pacientů s touto chorobou má specifickou formu BChE, jejíž glykosylace je změněna. Předpokládá se, že analýza této formy v mozkomíšním moku by mohla být použita v citlivé a specifické detekci AD (51).

### **3.3 Alzheimerova choroba**

AD je progresivní neurodegenerativní porucha a je považována za nejčastější příčinu demence. U starších osob je AD relativně častá, postihuje 13 % populace starší než 65 let a tento podíl stoupá na 45 % u osob ve věku 85 let (52). Podle statistik bylo celosvětově v roce 2015 přibližně 47 milionů dokumentovaných případů, což v roce 2050 dosáhne 107 milionů, pokud nebude k dispozici nový lék na zpoždění progresu onemocnění (53). Vzhledem k rychle rostoucímu počtu případů a nedostatku účinné terapie představuje AD v mnoha zemích vážnou sociální, ekonomickou a politickou zátěž. Vývoj a aplikace nových léků k léčbě AD nebo dokonce k zastavení progresu onemocnění přitahují globální pozornost nejen farmaceutických firem (54).

#### **3.3.1 Historie**

Bavorský psychiatr Alois Alzheimer v roce 1906 v Mnichově poprvé definoval klinicko-patologický syndrom nesoucí jeho jméno. Původní pacientka AD, žena označovaná jako Auguste D., ve své zprávě ilustruje několik základních rysů onemocnění, které dnes pozorujeme u většiny pacientů. Mezi tyto rysy patří progresivní porucha paměti, neuspořádané kognitivní funkce, změněné chování včetně paranoie a bludů a v neposlední řadě postupný pokles jazykových funkcí. Během rané a střední fáze tohoto pomalého, neúprosného procesu je bdělost pacienta dobře zachována a motorické a sensorické funkce jsou v podstatě neporušené. Nicméně postupem času dochází ke zpomalování motorických funkcí, jako je chůze a koordinace, což může připomínat extrapyramidové motorické poruchy jako je parkinsonismus.

Po mnoho desetiletí po původním popisu AD došlo k malému pokroku v definování patogeneze AD. Tato situace se začala měnit v 60. letech, kdy příchod elektronové mikroskopie dovolil popisovat nápadné ultrastrukturální

změny, které jsou základem patologických lézí. V pozdních 70. a začátcích 80. let byly v mozkové tkáni napadené AD identifikovány různé deficity neurotransmiterních systémů. Vědci zjistili, že AD na rozdíl od Parkinsonovy nemoci nezahrnuje degeneraci jedné třídy neuronů, ale hned několika. V minulých letech došlo k pokrokům v biochemické patologii, tedy v použití kompozičních analýz, imunocytochemie a molekulární genetiky. Tyto metody se používají k detekci patologických  $\beta$  amyloidních plaků (55).

### **3.3.2 Hypotézy vzniku AD**

AD je charakterizována postupnou ztrátou paměti, klesajícími kognitivními funkcemi, snížením fyzické funkce a nakonec smrtí (56). Za typické znaky patofyziologie AD jsou považovány  $\beta$  amyloidní plaky ( $A\beta$ ), které jsou způsobeny štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) enzymem  $\beta$ -sekretasa. Vznikem a nahromaděním  $A\beta$  dochází ke spouštění komplexní patologické kaskády způsobující dysfunkci neuronů, zánět a ztrátu neuronů. Tato kaskáda hraje ústřední roli v patogenezi a je označována jako amyloidní hypotéza AD (57,58). Dalšími diskutovanými hypotézami jsou cholinergní (59), mitochondriální (60) a tau proteinová teorie (61), ale velká pozornost je směřována i na studium vlivu oxidačního stresu (62), těžkých kovů (63) a genetických predispozic na vznik AD (55).

Pro vznik AD se používají dvě hlavní teorie, cholinergní a amyloidní. Cholinergní hypotéza se týká neurodegenerace se ztrátou cholinergní neurotransmise. Amyloidní hypotéza koreluje s tvorbou  $A\beta$  a progresem onemocnění (64).

#### **3.3.2.1 Cholinergní hypotéza**

Podle cholinergní hypotézy degenerace cholinergních neuronů v bazálním předním mozku a související ztráta cholinergní neurotransmise v mozkové kůře a dalších oblastech významně přispívají ke zhoršení kognitivních funkcí pozorovaných u pacientů s AD (64). Enzym, jenž se nachází v hipokampu a kůře mozku, syntetizující z prekurzorů acetylkoenzymu A a cholinu neurotransmitter ACh, se nazývá cholin acetyltransferasa. V polovině 70. let bylo zjištěno, že aktivita tohoto enzymu, který slouží jako spolehlivý marker

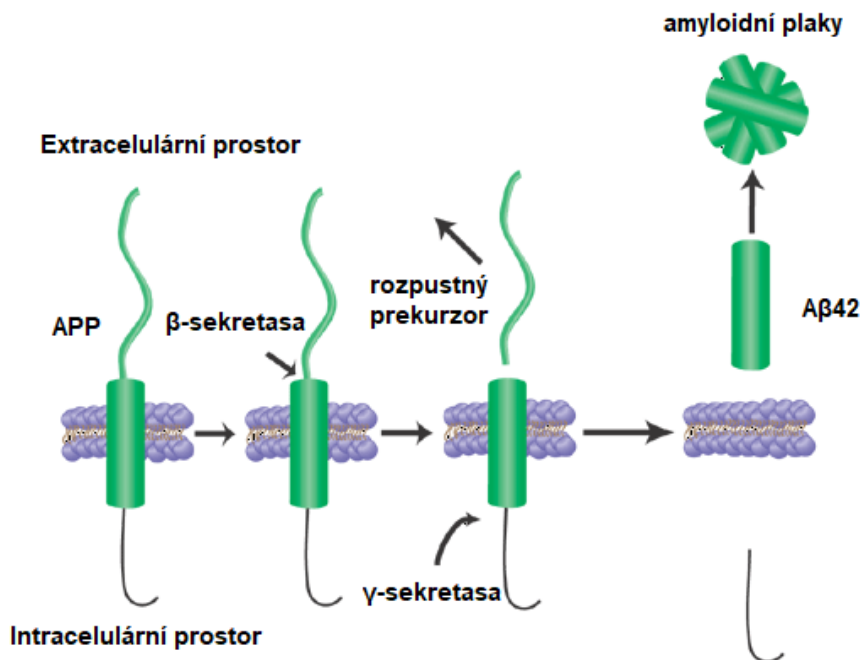
cholinergních neuronů a synapsí, u pacientů s AD klesá (65). Ve stejných tkáních se nacházejí i další dva specifické markery funkce cholinergních synapsí, jedná se o depolarizací indukované uvolňování ACh a vychytávání cholinu v nervových zakončeních. Ve vzorcích tkání pacientů trpících AD byly tyto markery také sníženy (66). Paralelní pozorování výrazně sníženého počtu cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti vede k závěru, že hlavním mechanismem v patogenezi AD je degenerace cholinergního spojení z nucleus Meynerti do kůry a hipokampu (67). Vzhledem k tomu, že poruchy paměti a demence jsou primárními příznaky AD, pak porucha přenosu ACh v kognitivních funkcích podporuje tento závěr (68). Cholinergní hypotéza byla první navrženou teorií k vysvětlení patogeneze AD a v současné době představuje jediný směr terapie AD (69).

### 3.3.2.2 Amyloidní hypotéza

Na druhé straně je zapojení amyloidní kaskády do progresu AD podporováno mnoha důkazy. APP je multifunkční protein spojený s životaschopností, růstem a funkcemi centrálních neuronů (57,70). Štěpením APP  $\beta$ -sekretasou vzniká  $A\beta$ , jenž je tvořen ze 40 aminokyselinových zbytků, avšak počet zbytků je variabilní a může se pohybovat mezi 39 a 43. Peptidy  $A\beta$  obsahující 42 aminokyselinových zbytků jsou špatně rozpustné, snadno agregují, dochází tak k tvorbě fibril a nakonec vzniku amyloidních plaků (71). Amyloidní hypotéza uvádí, že právě tyto peptidy jsou zodpovědné za zahájení neurotoxické kaskády, která nakonec vede ke smrti neuronů a demenci (57,72,73). Mnohé důkazy naznačují, že tvorba  $A\beta$  je rozhodujícím faktorem pro poškození mozku při AD (57,74). V tomto procesu hrají důležitou roli sekretasy.

Mezi sekretasy řadíme  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasu.  $\alpha$ -sekretasa zabraňuje uvolnění  $A\beta$  a vede k sekreci rozpustného APP po jeho štěpení. Rozpustný APP má neuroprotektivní účinky a také účinky zlepšující paměť (75).  $\beta$ -sekretasa štěpí řetězec APP (obr. 6) v polohách, ve kterých se nachází methionin a kyselina asparagová. Vzniká derivát obsahující aminovou skupinu a  $\beta$  C-koncový fragment o délce 99 aminokyselin. Fragment je dále štěpen  $\gamma$ -sekretasou za vzniku  $A\beta$  peptidu (73,76). Vedle APP má  $\beta$ -sekretasa i jiné substráty a identifikace těchto substrátů je důležitá nejen pro hodnocení

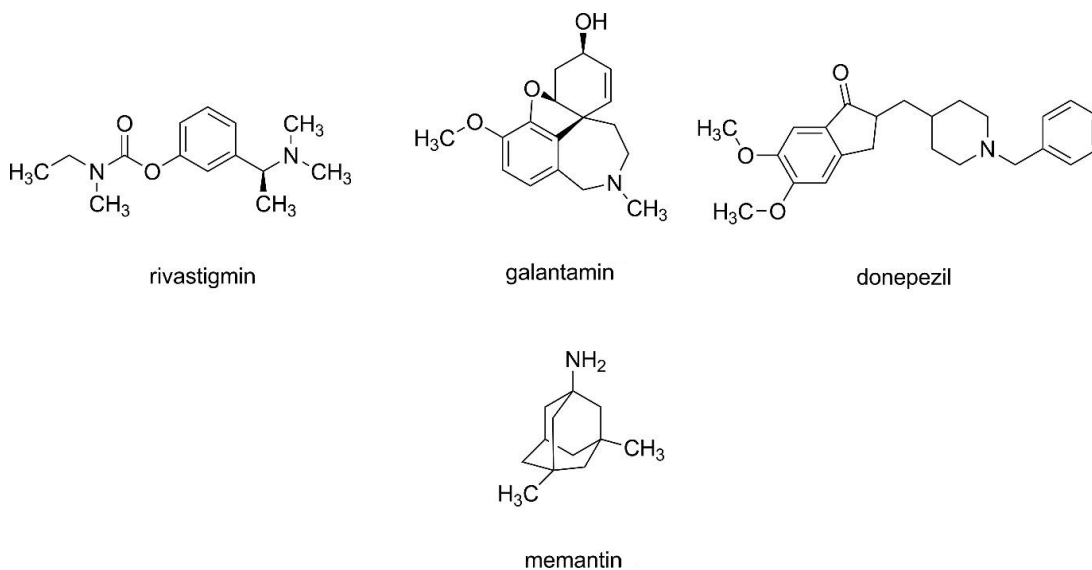
potenciální toxicity, jejíž mechanismus je založen na základě inhibice  $\beta$ -sekretasy, ale také pro návrh silných a selektivních inhibitorů zmíněného enzymu (77).



Obrázek 6: Schématické znázornění vzniku amyloidních plaků (78).

### 3.3.3 Léčba

AD je stále více uznávána jako jeden z nejdůležitějších zdravotních a sociálních problémů u starších lidí v industrializovaných a neindustrializovaných zemích (79). Dosavadní způsoby léčby jsou pouze symptomatické a snaží se vyvážit poruchy neurotransmiterů. Pro léčbu mírného až středního stupně AD se používají inhibitory cholinesteras (80). Jedná se o donepezil, rivastigmin a galantamin (81), jejichž struktura je vyobrazena níže (obr. 7). Další dostupnou terapeutickou možností pro středně těžkou až závažnou AD je memantin (obr. 7), který je založen na blokaci NMDA receptoru (82). Současně je na behaviorální symptomy používána antipsychotická a antidepresivní léčba (83). Medikamenty, které jsou schopny zastavit nebo alespoň účinně změnit průběh AD, označované jako nemoc-modifikující léky, jsou stále předmětem rozsáhlého výzkumu (79).



*Obrázek 7: Strukturní vzorce léčiv používaných v terapii AD (84).*

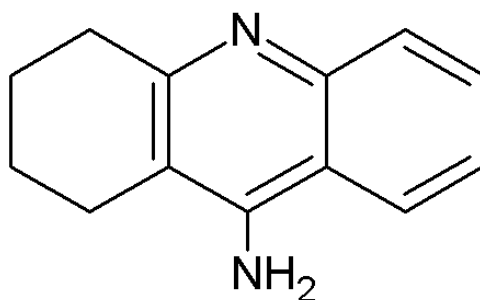
### 3.3.3.1 Multi-target-directed ligands

AD je mnohostranná neurodegenerativní porucha charakterizována na molekulární úrovni porušením a agregací proteinů, oxidačním stresem, mitochondriálními abnormalitami a neurozánětlivými procesy (85). V minulosti byl vztah mezi cholinergní dysfunkcí a závažností AD důvodem k terapeutickému použití inhibitorů AChE jako je takrin. Bez ohledu na přijatou klinickou praxi byla zpochybněna účinnost IChE, které ačkoliv jsou prospěšné při zlepšování kognitivních a behaviorálních symptomů, neoddalují ani nebrání neurodegeneraci (86,87). Multifaktoriální povaha AD a současně její nesjednocená teorie etiologie vedou k úvahám, že úspěšnějším přístupem bude jediná sloučenina schopná interagovat s několika molekulárními cíli zapojenými do neurotoxické kaskády. Důsledkem je, že objevování léků v AD postupně přechází z vývoje molekul, které jsou schopny modulovat biologickou funkci jediného cíle, na ligandy s multifunkčním charakterem (MTDLs, multi-target-directed ligands) (88,89). Zmiňované MTDLs jsou v zásadě účinné při léčbě složitých onemocnění, protože mají schopnost interagovat s více cíli, které jsou zodpovědné za patogenezi nemoci. Nejběžnější strategie návrhu MTDLs je založena hlavně na propojení dvou správně vybraných farmakoforů, které mají

aktivitu proti dvěma různým molekulárním cílům (90). Spojení farmakoforů přináší klady v podobě snížení rizika interakcí nejen farmakokinetických a farmakodynamických, ale i interakcí s dalšími léčivými. Jedním z nejpoužívanějších přístupů je modifikace molekulární struktury IChE, za účelem zlepšení jejích biologických vlastností, jež se uplatňují v léčbě AD (91).

### 3.3.3.1.1 Takrin

V roce 1993 byl takrin (THA; 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) prvním léčivem, které bylo schváleno americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) speciálně pro léčbu mírného až středního stupně AD. Avšak brzy bylo jasné, že THA (obr. 8) má nevýhody, které omezily jeho použití. Hlavním handicapem byla jeho hepatotoxicita (92). THA je nekompetitivní, reversibilní inhibitor ChE, jehož akridinová část se váže na indolový kruh Trp84 v aktivním místě enzymu (93,94). Vlivem jeho relativně dobré rozpustnosti v lipidech dochází k dobrému prostupu přes hematoencefalickou bariéru (95). Ke zlepšení aktivity a eliminaci toxicity byly zavedeny změny ve struktuře THA a byly syntetizovány jeho nové deriváty. Některé tyto změny umožnily vazbu na další vazebná místa AChE včetně PAS (96).

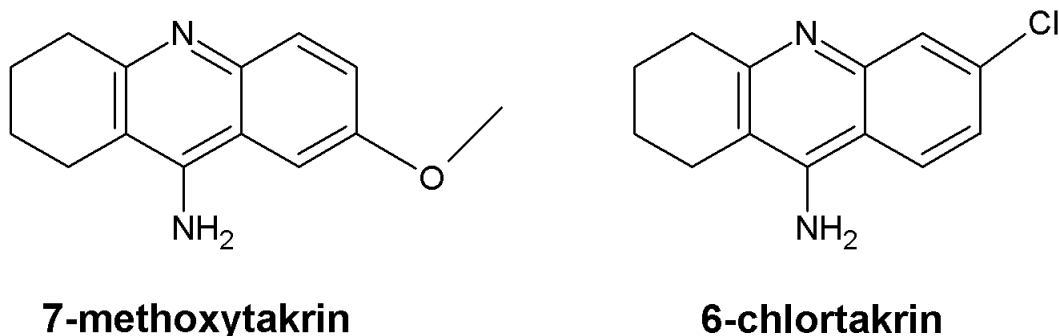


*Obrázek 8: Strukturální vzorec takrinu.*

Jedním z takových derivátů (obr. 9) je například 7-methoxytakrin (7-MEOTA; 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin), který byl syntetizován a rozvíjen v České republice (97). Farmakologická charakteristika 7-MEOTA zůstává zachována, naproti tomu THA vykazuje vyšší inhibiční účinnost vůči AChE (98). Mezi výhody derivátu patří lepší antioxidační vlastnosti a interakce s acetylcholinovými receptory. Nejvýznamnějším plusem je ovšem

jeho nižší toxicita, která je výsledkem exkrece hlavního metabolitu 7-hydroxytakrinu. Metabolit, vznikající v organismu demetylací 7-methoxy skupiny, podléhá konjugaci s kyselinou glukuronovou a poté je vylučován močí (99).

Dalším derivátem (obr. 9), vykazujícím silnou inhibici AChE, je 6-chlortakrin (6-Cl-THA; 9-amino-6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin). Oproti THA se 6-Cl-THA vyznačuje vyšší inhibiční aktivitou vůči AChE (100), ovšem toxicita těchto dvou látek je srovnatelná (101).

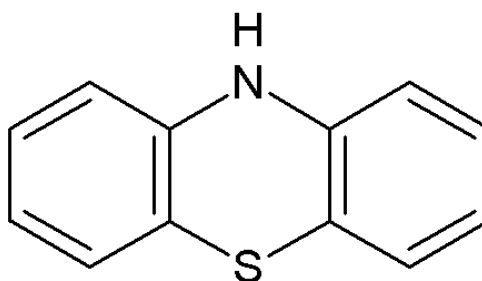


*Obrázek 9: Strukturální vzorce derivátů takrinu.*

### 3.3.3.1.2 Fenothiaziny

Fenothiaziny (PTZ) jsou jednoznačně jednou z nejuniverzálnějších sloučenin z hlediska biologické aktivity. Od objevu PTZ bylo zjištěno hned několik jejich nových využitelných farmakologických vlastností. Proto mají důležitou roli v mnoha oblastech medicíny, zejména v psychofarmakologii, a jsou předmětem dalšího zkoumání ve farmakologii. Bylo potvrzeno, že tyto sloučeniny jsou schopné účinně inhibovat dopaminové, histaminové, serotoninové, acetylcholinové a  $\alpha$ -adrenergní receptory. Jejich efektivita a postranní účinky jsou velmi rozmanité. Mimo antipsychotické aktivity mají PTZ významný antimikrobiální účinek, protože mohou zvýšit baktericidní funkci makrofágů a inhibovat efluxní pumpy. Mimo jiné jsou schopné eliminovat bakteriální rezistenci plazmidů a díky jejich účinku, který destabilizuje membránu, mohou ničit bakterie. Rovněž byla popsána jejich antivirová, antiprotozoální, antifungální a antiprionová aktivita. Bylo také prokázáno,

že PTZ ničí rakovinné buňky a zvyšují jejich citlivost k chemoterapii. Díky objasnění jejich role v antiangiogenezi a protinádorové aktivitě by v budoucnu mohly být aplikovány jako adjuvanty při léčbě infekcí a nádorů. PTZ mohou být také účinné při léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je AD a Parkinsonova choroba. Významné jsou i deriváty odvozené od fenothiazinového skeletu (obr. 10). Postranní alkylový řetězec, jenž je připojen k dusíku v poloze 10, je zodpovědný za specifické vlastnosti sloučeniny. Zatímco substituent nacházející se v poloze 2 má vliv na účinnost. Nejvyšší účinnost poskytují hlavně vysoce elektronegativní lipofilní substituenty, jako jsou halogeny, zejména trifluormethylová skupina (102).



**Obrázek 10: Strukturní vzorec fenothiazinu.**

Výzkum prováděný ve 30. a 40. letech prokázal potenciální široké využití PTZ. Byly detekovány insekticidní (103), anthelmintické (104) a antibakteriální účinky (105), avšak k těmto účelům nebyly sloučeniny příliš používány. Ve 40. letech minulého století byl do popředí uveden nový fenothiazinový derivát, promethazin. Zmíněný derivát má antihistaminový účinek, jenž byl využíván v léčbě alergických onemocnění a v anestezii (106,107). O několik let později byl objeven chlorpromazin, který má nejen antihistaminový účinek, ale i silný anxiolytický a antipsychotický účinek (108). Při vysokých koncentracích chlorpromazinu byla popsána inhibice NMDA receptoru (109). Téměř před třiceti lety, s použitím předběžné léčby fenothiazinem, byl v myších modelech proveden výzkum zaměřený na snížení post-ischemického poškození mozku. Pozorování bylo přičítáno redoxním vlastnostem PTZ, protože bylo prokázáno, že inhibují peroxidaci lipidů a mají cytoprotektivní účinky na neurony. Vzhledem k tomu, že PTZ a jejich derivát methylenová modř jsou jedny z neúčinnějších antioxidantních sloučenin, je zřejmé, že mohou mít



důležitou roli při léčbě neurodegenerativních procesů. V současnosti se tímto směrem ubírají studie týkající se možné léčby AD (102).

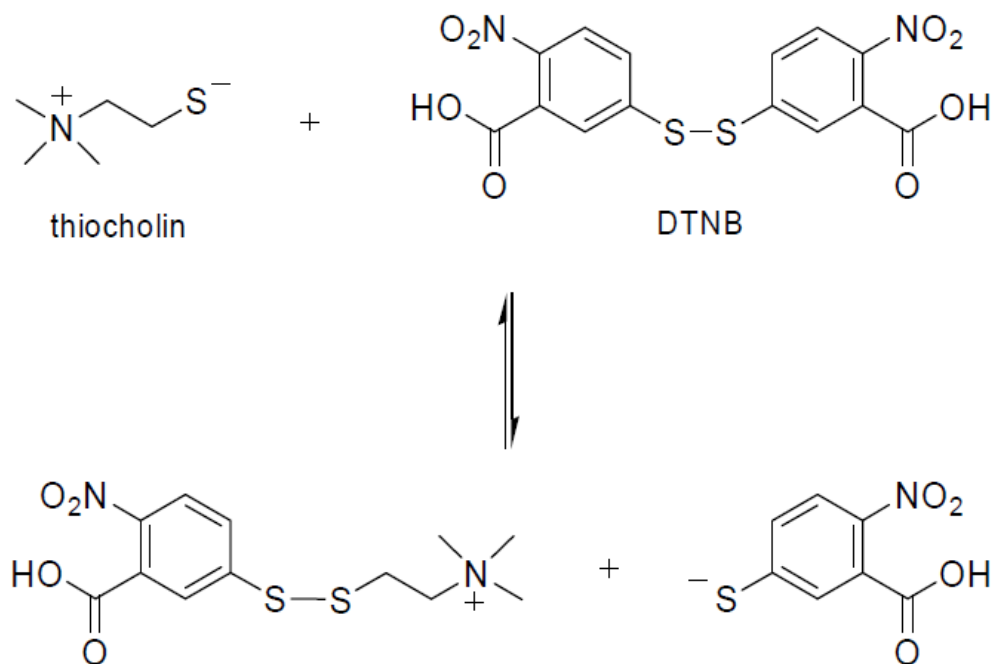
## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Princip metody

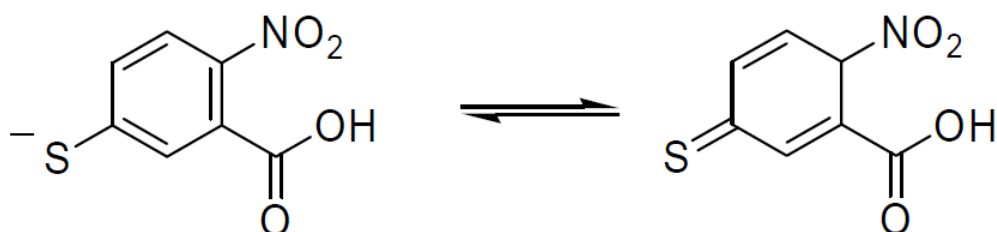
Pro stanovení schopnosti jednotlivých derivátů inhibovat ChE byla použita kolorimetrická metoda dle Ellmana (110). Její princip spočívá v hydrolyze acetylthiocholin jodidu v případě AChE nebo butyrylthiocholin jodidu v případě BChE, kdy vzniká příslušná kyselina (kyselina octová nebo máselná) a thiocholin obsahující SH- skupinu (obr. 11). Tato skupina reaguje s 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinou) (DTNB). Thiocholin rozštěpí sulfidický můstek, sám se váže na jednu vzniklou SH- (thiolovou) skupinu. Následně u uvolněné 5-merkapt-2-nitrobenzoové kyseliny (obr. 12) dochází ke konjugaci dvojných vazeb (obr. 13). Žlutě zbarvený chromofor, 5-thio-2-nitrobenzoový aniont, podléhá spektrofotometrickému stanovení při vlnové délce 412 nm.



Obrázek 11: Schématické znázornění rozštěpení acetylthiocholinu (111).



Obrázek 12: Schéma vzniku 5-merkpto-2-nitrobenzoové kyseliny (111).



Obrázek 13: Schéma konjugace dvojných vazeb (111).

## 4.2 Použitý materiál

- **Fosfátový pufr (0,1 M, pH 7,4):** 6,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bylo rozpuštěno v 500 ml vody, čímž vznikl 0,1 M roztok. 17,799 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  bylo rozpuštěno v 1000 ml vody za vzniku 0,1 M roztoku. Roztok 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  byl upraven pomocí 0,1 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  na pH 7,4.
- **Acetylthiocholin jodid (10 mM):** 0,2891 g bylo rozpuštěno v 10 ml vody, čímž vznikl 100 mM zásobní roztok, který byl následně 10x naředěn. Výsledná koncentrace pracovního roztoku byla 10 mM.

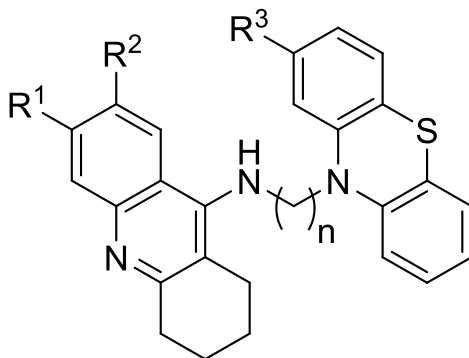
- **Butyrylthiocholin jodid (10 mM):** 0,3172 g bylo rozpuštěno v 10 ml vody, za vzniku 100 mM roztoku. Dále bylo postupováno stejně jako u předchozí látky.
- **DTNB (0,00252 M):** 0,05 g DTNB bylo rozpuštěno v 50 ml fosfátového pufru.
- **Lidská rekombinantní AChE:** K enzymu AChE byl postupně přidáván fosfátový pufr. Základní aktivita AChE byla upravena tak, aby objem užitý v měření inhibičního potenciálu látek odpovídal potřebám měření. Enzym byl stabilizován přidáním lidského albuminu.
- **Lidská plazmatická BChE:** K plazmatické BChE byl přidáván fosfátový pufr tak dlouho, dokud nebylo dosaženo požadované aktivity, vhodné pro potřeby měření.
- **Dimethylsulfoxid (DMSO)**
- **Inhibitory:** Připravena koncentrační řada od  $10^{-3}$  do  $10^{-8,5}$ .

*Př. LG-427:*

*5,86 mg rozpuštěno v 1105  $\mu$ l DMSO, vznikne koncentrace  $10^{-2}$ .*

*Odpipetováno 100  $\mu$ l a přidáno 900  $\mu$ l destilované vody, čímž vznikne koncentrace  $10^{-3}$ . Stejný postup byl opakován až do vzniku koncentrace  $10^{-8,5}$ . Pro získání mezikoncentrace odpipetováno 200  $\mu$ l z předchozí celé koncentrace  $10^{-3}$  a přidáno 430  $\mu$ l destilované vody, tím byla získána koncentrace  $10^{-3,5}$ , takto se postupovalo u všech mezikoncentrací.*

Obecný vzorec testovaných látek je znázorněn na obrázku 14.



**Obrázek 14: Strukturní vzorec takrin-fenothiazinového derivátu.**

### 4.3 Přístroje a pomůcky

- **Multidetekční reader Synergy HT** – BioTek – Vermont, USA
- **Vortex Lab Dancer** – IKA – Staufen, Germany
- **Titrační destičky s 96 jamkami** – ThermoFisher Scientific
- **Automatické pipety** – Transferpette S – Essex, England
- **Pipeta krokovací Handy Step electronic** – Brand – Wertheim, Germany
- **Zkumavky Safe-Lock** – Eppendorf
- **Špičky** – Eppendorf
- **PC + program GraphPad Prism 5**

### 4.4 Postup měření

Do testovacích jamek bylo napipetováno 10  $\mu$ l roztoku AChE nebo BChE. K enzymu bylo přidáno 40  $\mu$ l fosfátového pufru, 20  $\mu$ l DTNB a 10  $\mu$ l příslušné koncentrace daného inhibitoru. V jamkách s kontrolou byl inhibitor nahrazen 10  $\mu$ l fosfátového pufru. Tato získaná hodnota odpovídala 100 % aktivity enzymu. Obsah titrační destičky byl promíchán a destička byla vložena do multikanálového spektrofotometru, kde po dobu 5 minut probíhala inkubace při 37 °C za kontinuálního protřepávání. Po uplynutí inkubační doby byla reakce odstartována přidáním 20  $\mu$ l substrátu acetylthiocholin jodidu nebo butyrylthiocholin jodidu. Změna absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm. Pro všechny koncentrace inhibitorů byla provedena tři nezávislá měření.

### 4.5 Zpracování výsledků

Výsledky byly zpracovány statistickým programem GraphPad Prism 5. Ze získaných údajů byla vypočítána hodnota  $IC_{50}$ , která udává koncentraci inhibitoru, při níž aktivita enzymu klesne na 50 % původní aktivity. Tímto způsobem byla zjištěna  $IC_{50}$  u všech 36 takrin-fenothiazinových derivátů. Podílem hodnot  $IC_{50}$  BChE a AChE byl získán index selektivity (SI).

## 5. VÝSLEDKY

S využitím Ellmanovy metody byl testován inhibiční vliv jednotlivých derivátů. Byla proměřena celá koncentrační škála ( $10^{-3}$  –  $10^{-8,5}$  mol/l) inhibitorů, přičemž byly stanovovány změny v aktivitě enzymů AChE a BChE. Procentuální hodnoty odpovídající aktivitě enzymu po přidání jednotlivých koncentrací inhibitorů byly zpracovány statistickým programem GraphPad Prism 5. Výstupem programu bylo stanovení  $IC_{50}$  jednotlivých derivátů. S klesající hodnotou  $IC_{50}$  roste účinnost derivátu inhibovat ChE. Sloučeniny, jež podléhaly testování, měly odlišnou strukturu. Lišily se nejen v délce spojovacího řetězce, ale i v počtu a polohách navázaných funkčních skupin, což mělo vliv na jejich inhibiční aktivitu. Přehled testovaných látek a jejich inhibiční koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 1.

**Tabulka 1: Tabulka testovaných takrin-fenothiazinových derivátů.**

sloučenina	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> ± SEM (µM)		SI
					AChE	BChE	
LG-305	2	-	-	-	2,040 ± 0,080	0,019 ± 0,001	0,009
LG-309	2	-	-O-CH <sub>3</sub>	-	4,040 ± 0,310	0,120 ± 0,002	0,030
LG-310	2	Cl	-	-	0,280 ± 0,010	0,026 ± 0,001	0,093
LG-311	2	-	-	Cl	1,210 ± 0,030	0,051 ± 0,001	0,042
LG-312	2	-	-O-CH <sub>3</sub>	Cl	9,010 ± 0,840	0,140 ± 0,003	0,016
LG-313	2	Cl	-	Cl	0,350 ± 0,020	0,085 ± 0,003	0,243
LG-316	2	-	-	-CF <sub>3</sub>	1,710 ± 0,110	0,069 ± 0,004	0,040
LG-317	2	-	-O-CH <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	18,600 ± 2,700	0,480 ± 0,010	0,026
LG-318	2	Cl	-	-CF <sub>3</sub>	0,370 ± 0,020	0,300 ± 0,007	0,833
LG-332	3	-	-	-	4,520 ± 0,380	0,120 ± 0,004	0,027
LG-333	3	-	-O-CH <sub>3</sub>	-	3,500 ± 0,200	0,400 ± 0,010	0,114
LG-334	3	Cl	-	-	0,320 ± 0,010	0,260 ± 0,010	0,813
LG-322	3	-	-	Cl	0,830 ± 0,080	0,210 ± 0,005	0,253
LG-323	3	-	-O-CH <sub>3</sub>	Cl	0,590 ± 0,020	0,810 ± 0,020	1,373
LG-324	3	Cl	-	Cl	0,260 ± 0,020	0,950 ± 0,030	3,654
LG-327	3	-	-	-CF <sub>3</sub>	1,700 ± 0,110	0,230 ± 0,010	0,135
LG-328	3	-	-O-CH <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	5,840 ± 0,300	1,850 ± 0,050	0,317
LG-335	3	Cl	-	-CF <sub>3</sub>	0,450 ± 0,020	1,040 ± 0,030	2,311
LG-353	4	-	-	-	4,690 ± 0,540	0,092 ± 0,004	0,020
LG-354	4	-	-O-CH <sub>3</sub>	-	6,330 ± 0,500	0,047 ± 0,003	0,007
LG-355	4	Cl	-	-	0,440 ± 0,030	0,066 ± 0,002	0,150
LG-343	4	-	-	Cl	1,820 ± 0,110	0,150 ± 0,002	0,082
LG-344	4	-	-O-CH <sub>3</sub>	Cl	2,830 ± 0,250	0,130 ± 0,003	0,046
LG-345	4	Cl	-	Cl	0,480 ± 0,040	0,230 ± 0,008	0,479
LG-348	4	-	-	-CF <sub>3</sub>	13,100 ± 0,800	0,430 ± 0,013	0,033
LG-349	4	-	-O-CH <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	24,100 ± 3,400	0,580 ± 0,020	0,024
LG-350	4	Cl	-	-CF <sub>3</sub>	1,450 ± 0,150	3,820 ± 0,800	2,634
LG-423	5	-	-	-	0,084 ± 0,002	0,019 ± 0,001	0,226
LG-432	5	-	-O-CH <sub>3</sub>	-	> 100	0,830 ± 0,030	-
LG-425	5	Cl	-	-	0,008 ± 0,000	0,190 ± 0,010	23,457
LG-426	5	-	-	Cl	0,330 ± 0,020	0,034 ± 0,001	0,103
LG-427	5	-	-O-CH <sub>3</sub>	Cl	> 100	0,810 ± 0,030	-
LG-428	5	Cl	-	Cl	0,029 ± 0,002	0,420 ± 0,020	14,500
LG-429	5	-	-	-CF <sub>3</sub>	0,720 ± 0,050	0,081 ± 0,002	0,113
LG-430	5	-	-O-CH <sub>3</sub>	-CF <sub>3</sub>	> 100	2,350 ± 0,090	-
LG-431	5	Cl	-	-CF <sub>3</sub>	0,120 ± 0,010	4,350 ± 0,130	36,250

*AChE* – acetylcholinesterasa; *BChE* – butyrylcholinesterasa

*IC<sub>50</sub>* – inhibiční koncentrace, při které aktivita enzymu klesne na 50 % původní aktivity

*SI* – index selektivity vyjadřující poměr *IC<sub>50</sub>* *BChE* a *AChE*

## 6. DISKUSE

První skupinou látek, které byly testovány, byly deriváty spojené řetězcem o délce dvou uhlíků. Nejvyšší inhibiční potenciál ve stovkách nM vůči AChE vykazovaly látky LG-310, LG-313 a LG-318. Nejlepší hodnotu  $IC_{50}$  měla látka LG-310. Tyto sloučeniny jsou na molekule THA v poloze 6 substituované chlorem a jsou rovněž nejselektivnější vůči AChE v porovnání s ostatními. Naopak nejhorší inhibiční potenciál měla látka LG-317, jejíž hodnota  $IC_{50}$  byla 18,6  $\mu$ M. Z tabulky je patrné, že látky s inhibičním potenciálem pohybujícím se v desítkách nM, jsou sloučeniny LG-305, LG-310, LG-311, LG-313, LG-316. První dvě, výše jmenované vykazovaly nejlepší inhibiční potenciál k BChE. Látka LG-317 vykazovala nejnižší selektivitu k BChE.

Další skupinou derivátů, jež byly podrobeny testování, byly látky se spojovacím řetězcem, který byl tvořen třemi uhlíky. Mezi nejlepší inhibitory AChE z této skupiny lze zařadit sloučeniny LG-334, LG-324 a LG-335, LG-322 a LG-323. Hodnota  $IC_{50}$  prvních tří výše jmenovaných se pohybovala od 0,26  $\mu$ M do 0,45  $\mu$ M. Nejvyšší selektivitu pro AChE vykazovala látka LG-324. Tato látka obsahovala na THA molekule v poloze 6 chlorový substituent. Látky nejlépe inhibující enzym BChE, jež mají spojovací řetězec o délce tří uhlíků, jsou LG-332, LG-334, LG-322 a LG-327. Inhibiční potenciál těchto látek se nacházel v setinách  $\mu$ M. Nejhůře z testované skupiny dopadla látka LG-328, jejíž  $IC_{50}$  pro AChE byla 5,84  $\mu$ M a pro BChE 1,85  $\mu$ M.

Další kategorií byly látky s délkou spojovacího řetězce o čtyřech uhlících. Látky LG-355 a LG-345 vykazovaly vůči AChE nejlepší inhibiční potenciál. Výsledná hodnota  $IC$  byla srovnatelná. Obě sloučeniny měly THA nahrazen 6-chlortakrinem. Látka LG-349 měla hodnotu  $IC_{50}$  nejvyšší (24,1  $\mu$ M), což svědčí o její špatné inhibiční účinnosti. Ve stejné kategorii, tedy s délkou spojovacího řetězce o délce čtyř uhlíků, ale s inhibicí vůči enzymu BChE se jako nejlepší látky ukázaly sloučeniny LG-353, LG-354 a LG-355. Vypovídají o nejvyšší selektivě k BChE. Hodnoty  $IC_{50}$  byly v rozmezí desítek nM. Nejnižší inhibiční potenciál vůči BChE s hodnotou  $IC_{50}$  3,82  $\mu$ M v této skupině měla látka LG-350.



Poslední testovanou skupinou jsou sloučeniny s délkou spojovacího řetězce o pěti uhlících. Nejhoršími inhibitory AChE byly látky LG-432, LG-427 a LG-430, jejichž hodnota  $IC_{50}$  přesáhla 100  $\mu\text{M}$ . Naopak látka s nejvyšší schopností inhibovat AChE byla LG-425. Hodnota její  $IC_{50}$  byla 0,008  $\mu\text{M}$ . Prokázala tak nejlepší inhibiční potenciál vůči AChE. Tato látka měla taktéž ve své molekule 6-Cl-THA místo takrinového motivu. Sloučeniny LG-423, LG-426 a LG-429 inhibující BChE, měly nejlepší inhibiční potenciál, který se pohyboval v desítkách nM. Nejnižší selektivitu vůči BChE měla sloučenina LG-431. Tato skutečnost dokazuje nízký inhibiční potenciál zmiňované sloučeniny.

Sloučeniny, které vykazovaly nejvyšší inhibiční aktivitu vůči AChE, byly deriváty s 6-Cl-THA a se substituentem chloru na molekule PTZ. Sloučeniny LG-310, LG-324, LG-355, LG-425 mající ve své molekule 6-Cl-THA byly ve srovnání s ostatními sloučeninami nejselektivnějšími vůči AChE. Látka LG-425 s  $IC_{50}$  0,008  $\mu\text{M}$ , prokázala ze všech testovaných sloučenin nejvyšší schopnost inhibovat AChE. Nejednalo se ovšem o látku s nejvyšším indexem selektivity vůči AChE, tou byla látka LG-431 s pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem a chlorem na THA v poloze 6 společně s trifluormethylovou skupinou na PTZ v poloze 2 (SI 36,25).

Deriváty substituované na THA v poloze 7 methoxy skupinou byly nejméně účinné vůči AChE (LG-317, LG-328, LG-349, LG-432, LG-427 a LG-430). Vůbec nejméně aktivní z těchto sloučenin byly látky s pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem, jejichž  $IC_{50}$  bylo více jak 100  $\mu\text{M}$ .

Látky s nejvýraznější inhibicí BChE byly nesubstituované deriváty s dvouuhlíkatým, tříuhlíkatým a pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem (LG-305, LG-332, LG-423). Z derivátů s čtyřuhlíkatým spojovacím řetězcem vykazoval nejvyšší inhibiční aktivitu derivát substituovaný methoxy skupinou v poloze 7 (LG-354). S  $IC_{50}$  0,019  $\mu\text{M}$  byly látky LG-305 a LG-423 nejlepšími inhibitory BChE.

Mezi nejméně aktivní látky vůči BChE s dvouuhlíkatým a tříuhlíkatým spojovacím řetězcem patří deriváty substituované na THA v poloze 7 methoxy skupinou a na PTZ v poloze 2 trifluormethylovou skupinou (LG-317, LG-328). Sloučeniny LG-350 a LG-431 vykazovaly nízkou inhibiční aktivitu vůči BChE.

Jedná se o látky, které obsahují čtyřuhlíkatý a pětiuhlíkatý spojovací řetězec a jsou substituované na THA v poloze 6 atomem chloru a na PTZ v poloze 2 trifluormethylovou skupinou.

Donepezil, rivastigmin a galantamin jsou léčiva, která jsou v současnosti používána k terapii AD. Schopnost těchto léčiv inhibovat BChE je oproti testovaným derivátům velmi nízká. Inhibiční potenciál rivastigminu vůči AChE byl 48  $\mu\text{M}$  (112), což je v porovnání s většinou takrin-fenothiazinových derivátů vysoká hodnota. Z toho lze usuzovat, že látky v této studii jsou lepšími inhibitory AChE než rivastigmin.  $\text{IC}_{50}$  donepezilu byla 0,022  $\mu\text{M}$  (81), ve srovnání s většinou testovaných látek je donepezil lepším inhibitorem AChE. Ovšem látka LG-425 vykazuje lepší inhibiční aktivitu a látka LG-428 s  $\text{IC}_{50}$  0,029  $\mu\text{M}$  má téměř srovnatelný inhibiční potenciál jako zmíněné léčivo. Sloučeniny, jež obsahují 6-Cl-THA, jsou v porovnání s galantaminem lepšími inhibitory. S inhibiční aktivitou 0,800  $\mu\text{M}$  je galantamin schopen lépe inhibovat AChE oproti zbylým derivátům, jež byly podrobeny experimentu (112).

## 7. ZÁVĚR

Cílem této studie bylo porovnat schopnost takrin-fenothiazinových derivátů inhibovat ChE. Deriváty se lišily v délce spojovacího řetězce a v navázaných substituentech. *In vitro* testováním derivátů za použití Ellmanovy metody byly stanoveny inhibiční aktivity vůči AChE a BChE. Ze získaných dat vyplývá, že ze všech 36 derivátů nejlepší inhibiční aktivita byla naměřena u látky LG-425 s  $IC_{50}$  0,008  $\mu$ M a zároveň s druhým nejlepším indexem selektivity (SI 23,457). S nejvyšším indexem selektivity vůči AChE byla látka LG-431. Navázané substituenty měly vliv na inhibiční aktivitu vůči AChE i BChE. Jako nejlepší substituent ovlivňující inhibici AChE se ukázal atom chloru navázaný na THA v poloze 6. V případě BChE byly nejlepšími inhibitory sloučeniny se základním takrinovým motivem. Navázáním methoxy skupiny na THA v poloze 7 se projevilo jako nevýhodné, protože došlo ke snížení inhibičního účinku vůči AChE. Předností tohoto substituentu je nižší toxicita látek, což se může projevit v následujících testech. Trifluormethylová skupina na PTZ v poloze 2 měla stejný negativní účinek jako methoxy skupina v předchozím případě. Tento substituent byl navázán na molekulu PTZ s cílem zvýšit rozpustnost dané sloučeniny. Délka spojovacího řetězce neměla na inhibiční aktivitu derivátů významnější vliv.

## 8. POUŽITÉ ZKRATKY

6-CI-THA.....	6-chlortakrin
7-MEOTA.....	7-methoxytakrin
A $\beta$ .....	$\beta$ amyloidní plaky
AD.....	Alzheimerova choroba (Alzheimer's disease)
ACh.....	acetylcholin
AChE.....	acetylcholinesterasa
APP.....	amyloidový prekurzorový protein
BChE.....	butyrylcholinesterasa
CAS.....	katalytické anionické místo (catalytic anionic site)
DMSO.....	dimethylsulfoxid
DTNB.....	dithionitrobenzoová kyselina
EC.....	Enzyme Commission
FDA.....	úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
ChE.....	cholinesterasy
IACHe.....	inhibitory acetylcholinesterasy
IC <sub>50</sub> .....	inhibiční koncentrace
LD.....	laktátdehydrogenasa
MTDLs.....	ligandy s multifunkčním charakterem (multi-target-directed ligands)
NMDA.....	N-methyl-D-glutamát
OP.....	organofosfáty
PAS.....	periferní anionické místo (periferic anionic site)
PTZ.....	fenothiaziny
THA.....	takrin

## 9. SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Tabulka testovaných takrin-fenothiazinových derivátů. ....	39
--	----

## 10. SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Schématické zobrazení aktivace apoenzymu (2).....	12
<b>Obrázek 2:</b> Značení tříd enzymů (1). .....	15
<b>Obrázek 3:</b> Schéma aktivního místa acetylcholinesterasy (18). .....	19
<b>Obrázek 4:</b> Molekulární formy cholinesteras (44). .....	22
<b>Obrázek 5:</b> Schéma aktivního místa butyrylcholinesterasy (38). .....	24
<b>Obrázek 6:</b> Schématické znázornění vzniku amyloidních plaků (78). .....	28
<b>Obrázek 7:</b> Strukturní vzorce léčiv používaných v terapii AD (84). .....	29
<b>Obrázek 8:</b> Strukturní vzorec takrinu. ....	30
<b>Obrázek 9:</b> Strukturní vzorce derivátů takrinu. ....	31
<b>Obrázek 10:</b> Strukturní vzorec fenothiazinu. ....	32
<b>Obrázek 11:</b> Schématické znázornění rozštěpení acetylthiocholinu (111). ....	34
<b>Obrázek 12:</b> Schéma vzniku 5-merkaptu-2-nitrobenzoové kyseliny (111). .....	35
<b>Obrázek 13:</b> Schéma konjugace dvojných vazeb (111). ....	35
<b>Obrázek 14:</b> Strukturní vzorec takrin-fenothiazinového derivátu. ....	36

## 11. POUŽITÁ LITERATURA

1. Vodrážka Z. Biochemie. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1; s. 120–80.
2. Anonym. Apoenzym [Internet]. [citován 27. březen 2018]. Dostupné z: <https://leporelo.info/apoenzym>
3. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harperova biochemie, 23. vyd.(4. české vyd.) Jinočany: H&H, 2002, 872s. ISBN 80-7319-013-3; s. 65–110.
4. Šípal Z. Biochemie [Internet]. 1992 [citován 26. březen 2018]. Dostupné z: <https://katalog.upce.cz/documents/71044?locale=cs>
5. Racek J, Eiselt J, Friedecký B, Holeček V, Nekulová M, Pittrová H, et al. Klinická biochemie. 1. vyd. Praha: Galén, 1999. 317 s. ISBN 80-7262-023-1; 1999.
6. Ledvina M. Biochemie pro studující medicíny - soubor [Internet]. 2009 [citován 26. březen 2018]. Dostupné z: [https://www.cupress.cuni.cz/ink2\\_ext/index.jsp?include=podrobnosti&id=203690](https://www.cupress.cuni.cz/ink2_ext/index.jsp?include=podrobnosti&id=203690)
7. Lavříková P. 6. Enzymy • Funkce buněk a lidského těla [Internet]. [citován 13. únor 2018]. Dostupné z: <http://fblt.cz/skripta/ii-premena-latek-a-energie-v-bunce/6-enzymy/>
8. Karlson P, Kocourek J, Leblová S. Základy biochemie [Internet]. 1981 [citován 26. březen 2018]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/publication/143756>
9. Čegan A, Korecká L. Biochemie pro bakalářské studium chemie a technické chemie [Internet]. 2008 [citován 26. březen 2018]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/3534007-Biochemie-pro-bakalarske-studium-chemie-a-technicke-chemie-doc-ing-alexander-cegan-csc.html>
10. Anonym. Enzym. In: Wikipedie [Internet]. 2018 [citován 11. březen 2018]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Enzym&oldid=15615492>
11. Aldridge WN. Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J. leden 1953;53(1):110–7.
12. Allderdice PW, Gardner HA, Galutira D, Lockridge O, LaDu BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. Genomics. říjen 1991;11(2):452–4.

13. Saxena A, Redman AM, Jiang X, Lockridge O, Doctor BP. Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry (Mosc)*. 2. prosinec 1997;36(48):14642–51.
14. Massoulié J, Sussman J, Bon S, Silman I. Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res*. 1993;98:139–46.
15. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem Rev*. 1. říjen 1987;87(5):955–79.
16. Barnard EA. Neuromuscular Transmission—Enzymatic Destruction of Acetylcholine. In: *The Peripheral Nervous System* [Internet]. Springer, Boston, MA; 1974 [citován 12. březem 2018]. s. 201–24. Dostupné z: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8699-9\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-8699-9_9)
17. Wang R, Tang XC. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals*. 2005;14(1–2):71–82.
18. Čolović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr Neuropharmacol*. květen 2013;11(3):315–35.
19. Manavalan P, Taylor P, Curtis Johnson W. Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol*. 1. červenec 1985;829(3):365–70.
20. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. *Eur J Med Chem*. 2013;70:165–88.
21. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov*. září 2011;155(3):219–29.
22. Berman HA, Yguerabide J, Taylor P. Fluorescence energy transfer on acetylcholinesterase: spatial relationship between peripheral site and active center. *Biochemistry (Mosc)*. 13. květen 1980;19(10):2226–35.
23. Mooser G, Sigman DS. Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes. *Biochemistry (Mosc)*. 1. květen 1974;13(11):2299–307.
24. Taylor P, Lappi S. Interaction of fluorescence probes with acetylcholinesterase. Site and specificity of propidium binding. *Biochemistry (Mosc)*. 1. květen 1975;14(9):1989–97.



25. Berman HA, Taylor P. Fluorescent phosphonate label for serine hydrolases, pyrenebutyl methylphosphonofluoridate: reaction with acetylcholinesterase. *Biochemistry (Mosc)*. 2. květen 1978;17(9):1704–13.
26. Berman HA, Becketl W, Taylor P. Spectroscopic studies on acetylcholinesterase: influence of peripheral-site occupation on active-center conformation. *Biochemistry (Mosc)*. 1. srpen 1981;20(16):4803–10.
27. Johnson G, Moore SW. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr Pharm Des*. 2006;12(2):217–25.
28. Wilson IB, Quan C. Acetylcholinesterase studies on molecular complementarity. *Arch Biochem Biophys*. 1. leden 1958;73(1):131–43.
29. Froede HC, Wilson IB. *The Enzymes*. PD Boyer Acad Press Inc N Y Lond. 1971;87.
30. Ariel N, Ordentlich A, Barak D, Bino T, Velan B, Shafferman A. The „aromatic patch“ of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors. *Biochem J*. 1. říjen 1998;335(Pt 1):95–102.
31. Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Segall Y, et al. Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity. Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket. *J Biol Chem*. 15. srpen 1993;268(23):17083–95.
32. AChE.pdf [Internet]. [citován 20. březen 2018]. Dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/widgets/QuipStories/AChE/AChE.pdf>
33. Nachmansohn D, Wilson IB. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*. 1951;12:259–339.
34. Rosenberry TL, Barnett P, Mays C. [13] Acetylcholinesterase. In: *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 1982 [citován 19. březen 2018]. s. 325–39. (Structural and Contractile Proteins Part A: Extracellular Matrix; roč. 82). Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687982820703>
35. Zemek F, Zdarova JK, Sepsova V, Kuca K. Acetylcholinesterase Reactivators (HI-6, Obidoxime, Trimedoxime, K027, K075, K127, K203, K282): Structural Evaluation of Human Serum Albumin Binding and Absorption Kinetics. *Int J Mol Sci*. 2. srpen 2013;14(8):16076–86.
36. Spillane J, Beeson DJ, Kullmann DM. Myasthenia and related disorders of the neuromuscular junction. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. červen 2010;81(8):850.

37. Patocka J, Kuca K, Jun D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-  
important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*.  
2004;47(4):215–28.
38. Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: structure and physiological  
importance. *Turk J Biochem*. 2003;28(2):54–61.
39. Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and  
acetylcholinesterase. *Biochem J*. 15. červen 1989;260(3):625–34.
40. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA, Wong CK, Norton SE, Johnson LL.  
Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol  
Chem*. 15. leden 1987;262(2):549–57.
41. Perrier AL, Massoulié J, Krejci E. PRiMA: the membrane anchor of  
acetylcholinesterase in the brain. *Neuron*. 17. leden 2002;33(2):275–85.
42. Massoulié J, Pezzementi L, Bon S, Krejci E, Vallette FM. Molecular and  
cellular biology of cholinesterases. *Prog Neurobiol*. červenec  
1993;41(1):31–91.
43. Bon S, Coussen F, Massoulié J. Quaternary Associations of  
Acetylcholinesterase II. The polyproline attachment domain of the collagen  
tail. *J Biol Chem*. 31. leden 1997;272(5):3016–21.
44. Darvesh S, Hopkins D, Geula C. The biology of butyrylcholinesterase. *Roč.  
4*. 2003. 131 s.
45. Masson P, Nachon F, Bartels CF, Froment M-T, Ribes F, Matthews C, et  
al. High activity of human butyrylcholinesterase at low pH in the presence  
of excess butyrylthiocholine. *Eur J Biochem*. leden 2003;270(2):315–24.
46. Radic Z, Pickering NA, Vellom DC, Camp S, Taylor P. Three distinct  
domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and  
butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry (Mosc)*. 1. listopad  
1993;32(45):12074–84.
47. Masson P, Legrand P, Bartels CF, Froment M-T, Schopfer LM, Lockridge  
O. Role of Aspartate 70 and Tryptophan 82 in Binding of  
Succinylthiocholine to Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry  
(Mosc)*. 1. únor 1997;36(8):2266–77.
48. Sporty JLS, Lemire SW, Jakubowski EM, Renner JA, Evans RA, Williams  
RF, et al. Immunomagnetic separation and quantification of  
butyrylcholinesterase nerve agent adducts in human serum. *Anal Chem*. 1.  
srpen 2010;82(15):6593–600.
49. Hoffman RS, Morasco R, Goldfrank LR. Administration of purified human  
plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. *J Toxicol  
Clin Toxicol*. 1996;34(3):259–66.

50. Lockridge O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther.* 1. duben 2015;148:34–46.
51. Sáez-Valero J, Small DH. Altered glycosylation of cerebrospinal fluid butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Brain Res. leden* 2001;889(1–2):247–50.
52. Xue-shan Z, Juan P, Qi W, Zhong R, Li-hong P, Zhi-han T, et al. Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 1. květen 2016;456(Supplement C):107–14.
53. León R, Garcia AG, Marco-Contelles J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev. leden* 2013;33(1):139–89.
54. Gu T, Wu W-Y, Dong Z-X, Yu S-P, Sun Y, Zhong Y, et al. Development and Structural Modification of BACE1 Inhibitors. *Mol Basel Switz.* 22. prosinec 2016;22(1).
55. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev. duben* 2001;81(2):741–66.
56. Sathya M, Premkumar P, Karthick C, Moorthi P, Jayachandran KS, Anusuyadevi M. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta.* 24. prosinec 2012;414(Supplement C):171–8.
57. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 19. červenec 2002;297(5580):353–6.
58. Ohno M, Sametsky EA, Younkin LH, Oakley H, Younkin SG, Citron M, et al. BACE1 deficiency rescues memory deficits and cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron.* 8. leden 2004;41(1):27–33.
59. Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* únor 1999;66(2):137–47.
60. Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J Alzheimers Dis JAD.* 2010;20(Suppl 2):265–79.
61. Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci [Internet].* 30. leden 2018 [citován 4. duben 2018];12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5797629/>
62. Pohanka M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. *Curr Med Chem.* 2014;21(3):356–64.

63. Bondy SC. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology*. leden 2016;52:222–9.
64. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 30. červenec 1982;217(4558):408–14.
65. Perry EK, Gibson PH, Blessed G, Perry RH, Tomlinson BE. Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia: Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J Neurol Sci*. 1. listopad 1977;34(2):247–65.
66. Rylett RJ, Ball MJ, Colhoun EH. Evidence for high affinity choline transport in synaptosomes prepared from hippocampus and neocortex of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res*. 19. prosinec 1983;289(1–2):169–75.
67. Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 5. březen 1982;215(4537):1237–9.
68. Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol*. únor 1974;30(2):113–21.
69. Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol*. červen 2000;163(2):495–529.
70. Nguyen J-T, Yamani A, Kiso Y. Views on Amyloid Hypothesis and Secretase Inhibitors for Treating Alzheimer's Disease: Progress and Problems. *Curr Pharm Des*. 1. listopad 2006;12(33):4295–312.
71. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta- and gamma-secretases. *FEBS Lett*. 13. říjen 2000;483(1):6–10.
72. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. únor 2007;8(2):101–12.
73. Dislich B, Lichtenthaler SF. The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol*. 2012;3:8.
74. Stockley JH, O'Neill C. Understanding BACE1: essential protease for amyloid-beta production in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci CMLS*. říjen 2008;65(20):3265–89.
75. Hooper NM. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. *Biochem Soc Trans*. duben 2005;33(Pt 2):335–8.

76. Steiner H, Winkler E, Haass C. Chemical Cross-linking Provides a Model of the  $\gamma$ -Secretase Complex Subunit Architecture and Evidence for Close Proximity of the C-terminal Fragment of Presenilin with APH-1. *J Biol Chem*. 12. prosinec 2008;283(50):34677–86.
77. Vassar R, Kandalepas PC. The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 31. květen 2011;3(3):20.
78. Anonym.  $\beta$ -Secretase (BACE1) Activity Assay Kit: A FRET Based Assay Designed for BACE1 Inhibitor Screening [Internet]. Sigma-Aldrich. [citován 10. duben 2018]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/learning-center/bace1-assay-kit.html>
79. Yiannopoulou KG, Papageorgiou SG. Current and future treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord*. leden 2013;6(1):19–33.
80. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 25. leden 2006;(1):CD005593.
81. Štěpánková Š, Komers K. Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Arch Neurol*. 1. leden 2001;58.
82. McShane R, Areosa Sastre A, Minakaran N. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 19. duben 2006;(2):CD003154.
83. Ballard C, Corbett A. Management of neuropsychiatric symptoms in people with dementia. *CNS Drugs*. září 2010;24(9):729–39.
84. Korábečný J, Nepovimová E, Cikánková T, Špilovská K, Vašková L, Mezeiová E, et al. Newly Developed Drugs for Alzheimer's Disease in Relation to Energy Metabolism, Cholinergic and Monoaminergic Neurotransmission. *Neuroscience*. 1. únor 2018;370:191–206.
85. Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 3. listopad 2006;314(5800):777–81.
86. Small DH. Acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of dementia in Alzheimer's disease: do we need new inhibitors? *Expert Opin Emerg Drugs*. 1. listopad 2005;10(4):817–25.
87. Terry AV, Buccafusco JJ. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*. září 2003;306(3):821–7.
88. Youdim MBH, Buccafusco JJ. Multi-functional drugs for various CNS targets in the treatment of neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol Sci*. leden 2005;26(1):27–35.
89. Zhang H-Y. One-compound-multiple-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *FEBS Lett*. 10. říjen 2005;579(24):5260–4.

90. Bolognesi ML, Cavalli A, Valgimigli L, Bartolini M, Rosini M, Andrisano V, et al. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J Med Chem*. 27. prosinec 2007;50(26):6446–9.
91. Cavalli A, Bolognesi ML, Minarini A, Rosini M, Tumiatti V, Recanatini M, et al. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem*. 14. únor 2008;51(3):347–72.
92. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease. *JAMA*. 6. duben 1994;271(13):992–8.
93. Cummings JL. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *Am J Psychiatry*. leden 2000;157(1):4–15.
94. Harel M, Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C, et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1. říjen 1993;90(19):9031–5.
95. Nielsen JA, Mena EE, Williams IH, Nocerini MR, Liston D. Correlation of brain levels of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine (THA) with neurochemical and behavioral changes. *Eur J Pharmacol*. 28. listopad 1989;173(1):53–64.
96. Pang YP, Quiram P, Jelacic T, Hong F, Brimijoin S. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 27. září 1996;271(39):23646–9.
97. Patocka J, Bielavsky J, Fusek J. Advances in synthesis of tacrine derivatives as potential-drugs for treatment of alzheimers-disease. *Homeost Health Dis*. 1994;35(6):299–301.
98. Soukup O, Jun D, Karasova J, Patocka J, Musilek K, Korabecny J, et al. Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr Alzheimer Res*. 1. září 2013;10(8):893–906.
99. 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*. květen 2008;9(4):332–5.
100. Spilovska K, Korabecny J, Sepsova V, Jun D, Hrabínova M, Jost P, et al. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Mol Basel Switz*. 16. červen 2017;22(6).

101. Recanatini M, Cavalli A, Belluti F, Piazzini L, Rampa A, Bisi A, et al. SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues. *J Med Chem.* 18. květen 2000;43(10):2007–18.
102. Varga B, Csonka Á, Csonka A, Molnár J, Amaral L, Spengler G. Possible Biological and Clinical Applications of Phenothiazines. *Anticancer Res.* 2017;37(11):5983–93.
103. Campbell FL, Sullivan WN, Smith LE, Haller HL. Insecticidal Tests of Synthetic Organic Compounds-chiefly Tests of Sulfur Compounds against Culieine Mosquito Larvae. *J Econ Entomol* [Internet]. 1934 [citován 10. duben 2018];27(6). Dostupné z: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19351000282>
104. Manson-Bahr P. Phenothiazine as an Anthelmintic in Threadworm and Roundworm Infections. *Lancet.* 1940;239:808–9.
105. Deeds F, Stockton AB, Thomas JO. Studies on Phenothiazine Viii. Antiseptic Value of Phenothiazine in Urinary Tract Infections. *J Pharmacol Exp Ther.* 1. duben 1939;65(4):353–71.
106. Halpern BN, Wood DR. The action of promethazine (phenergan) in protecting mice against death due to histamine. *Br J Pharmacol.* 1950;5(4):510–516.
107. Adelman MH, Jacobson E, Lief PA, Miller SA. Promethazine hydrochloride in surgery and obstetrics. *J Am Med Assoc.* 3. leden 1959;169(1):5–7.
108. Delay J, Deniker P, Harl JM. Therapeutic method derived from hibernotherapy in excitation and agitation states. In: *Annales médico-psychologiques.* 1952. s. 267.
109. Lidsky TI, Yablonsky-Alter E, Zuck LG, Banerjee SP. Antipsychotic drug effects on glutamatergic activity. *Brain Res.* 1997;764(1–2):46–52.
110. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1. červenec 1961;7(2):88–95.
111. Pešková D. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholin- esteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů [Internet]. *anzdoc.com.* [citován 13. duben 2018]. Dostupné z: <https://anzdoc.com/uiti-ellmanovy-metody-pro-stanoveni-aktivit-cholin-esteras-p.html>
112. Giacobini E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. *Pharmacol Res.* říjen 2004;50(4):433–40.