

## Abstrakt

Pro hodnocení toxicity látek a jejího mechanismu v počátečních fázích procesu vývoje nových chemických entit jsou dostupné různé *in vitro* přístupy. Tyto systémy se využívají hlavně pro účely screeningu a umožňují komplexně hodnotit toxikologické profily nově syntetizovaných sloučenin. Předkládaná práce je zaměřena na *in vitro* hodnocení látek modulujících aktivitu acetylcholinesterasy. Tento enzym sehrává klíčovou roli v nervovém systému a vyskytuje se především na cholinergních synapsích a neuromuskulárních spojích. Jeho hlavní biologickou rolí je terminace nervového impulzu na těchto synapsích, a to rychlou hydrolýzou neurotransmiteru acetylcholinu na cholin a acetát. Acetylcholinesterasa je cílovým enzymem pro mnohé léčiva, např. Na Alzheimerovu chorobu nebo jiná neurodegenerativní onemocnění. Nejčastěji se používají její reverzibilní a pseudoreverzibilní inhibitory. Taktéž sehrává úlohu při otravách chemickými bojovými látkami ze skupiny nervově paralytických látek a organofosfátovými pesticidy. U těchto otrav se jako antidota využívají právě reaktivátory acetylcholinesterasy.

Reaktivátory (asoxim, pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, metoxim a oximy K027, K048, K074, K075 a K203) a inhibitory (pyridostigmin, galantamin, rivastigmin, donepezil, takrin, 7-metoxytkarin a 6-chlorotakrin) acetylcholinesterasy byly hodnoceny pomocí různých *in vitro* testů s pomocí buněčných linií. Byla stanovena jejich cytotoxicita využitím kolorimetrické a elektroimpedanční metody. Dále byla sledovaná indukce apoptózy pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie. Prostřednictvím různých fluorescenčních sond byla sledovaná změna hladiny volných radikálů v buňkách a taktéž antioxidační potenciál testovaných látek.

Cytotoxicita látek a indukce apoptózy jednotlivých testovaných látek byla stanovena na 4 různých buněčných modelech (HepG2, ACHN, SH-SY5Y a NHLF) po 24hodinové inkubaci. K nejméně toxickým reaktivátorům je možné zařadit oxim K027 (nejméně toxický pro buňkovou linii HepG2 a SH-SY5Y) a K048 (nejnižší toxicita pro ACHN a NHLF buňky). U dalších oximů se cytotoxicita látek postupně zvyšovala, přičemž bylo možné sledovat určité strukturální aspekty, které měli vliv na cytotoxicitu látek. Jednalo se o délku a charakter spojovacího řetězce mezi pyridinovými kruhy, počet oximových skupin a jejich polohu na pyridinovém kruhu. Nejméně toxickým inhibitorem pro všechny buňkové linie bol pyridostigmin. Vzhledem k poměrně vysoké různorodosti inhibitorů nebylo možné zhodnocení vztahu cytotoxicity a struktury látek. Indukce apoptózy anebo nekrózy po ovlivnění buněk reaktivátory anebo inhibitory se odlišovala mezi jednotlivými liniemi. Důvodem by mohla být odlišná metabolická kapacita jednotlivých buněčných modelů. U reaktivátorů jsme sledovali, že na vstup buněk do apoptózy a/nebo nekrózy by mohli mít vliv stejné strukturální aspekty jako při hodnocení cytotoxicity.

Narušení oxidačně-redukční rovnováhy bylo sledované pomocí nespecifické fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát v časových intervalech 4 a 24 hodin spolu s viabilitou buněk. Na základě výsledků je možné konstatovat, že reaktivátory lze rozdělit do několika skupin: 1) reaktivátory, u kterých je možné předpokládat oxidační stres jako mechanismus jejich toxicity (K027, K048, K074, trimedoxim a obidoxim), 2) reaktivátory, u kterých se mechanismus toxicity jeví spíše jako kombinovaný, takže oxidační stres může sehrávat určitou roli (K203 a K075) a 3) reaktivátorů, u nichž oxidační stres pravděpodobně nesehrává úlohu (pralidoxim, metoxim nebo asoxim). Pro lepší porovnání

schopnosti reaktivátorů narušit oxidačně-redukční rovnováhu buněk byl dále testován vliv na hladinu volných radikálů při koncentracích, které odpovídali hodnotám IC50. Produkce volných radikálů byla sledována pomocí třech různých fluorescenčních sond v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin. Jako nejsilnější induktor oxidačního a dusíkatého stresu se jevil právě obidoxim. U inhibitorů acetylcholinesterasy jsme nepozorovali žádné narušení oxidačně-redukční rovnováhy.

Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí fluorescenční sondy 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát. Po indukci oxidačního stresu *tert*butylhydroperoxidem jsme pozorovali antioxidační efekt po ovlivnění buněk oximy K075 a K203, které ve své molekule obsahují dvojnou vazbu a u jediného sledovaného monopyridinového oximu pralidoximu. K inhibitorům, jež se vyznačovaly určitými antioxidačními vlastnostmi, je možné zařadit donepezil, rivastigmin a galantamin.