

**Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy**



**Spektrofotometrické stanovení aktivity
cholinesterasy v přítomnosti karbamátových
inhibitorů**

Bakalářská práce

Ondřej Keresteš

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

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

Hradec Králové, 2017

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

Tato práce vznikla za podpory programu SVV 260 401

V Hradci Králové, dne 31. 8. 2107

.....
Ondřej Keresteš

Je pro mne velkou ctí, že mohu na tomto místě poděkovat hlavně:

Vedoucí mé práce, paní PhramDr. Martě Kučerové, Ph.D., za báječnou pomoc a podnětné připomínky během zpracovávání (nejen) této práce;

a panu prof. RNDr. Miroslavu Pohankovi, Ph.D., DSc. za skvělé odborné a praktické vedení, diskuse a za příjemné zázemí, které mi věnoval během mé experimentální práce v jeho laboratoři.

Děkuji také své rodině a přátelům, bez kterých bych nebyl tam, kde nyní jsem.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam použitých zkratek.....	7
Úvod	8
Cíle práce.....	9
Teoretická část.....	10
Acetylcholinesterasa	10
Butyrylcholinesterasa (pseudocholinesterasa)	12
Inhibice cholinesteras.....	13
Zkoumané inhibitory cholinesteras	14
Metodická část.....	15
Možnosti vyhodnocení dat	16
Ellmanova metoda	17
Experimentální část	19
Použité chemikálie	19
Přístrojová technika a pomůcky	19
Hardware a software	20
Spotřební materiál	20
Příprava roztoků.....	21
Postupy jednotlivých měření.....	22
Výsledky a diskuse.....	25
Závěr.....	35
Citovaná literatura	36

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Student: Ondřej Keresteš

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

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

Název bakalářské práce: Spektrofotometrické stanovení cholinesteras v prostředí karbamátových inhibitorů

V současné době jsou známy dva typy cholinesteras. Prvním je acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7), která je zodpovědná za štěpení acetylcholinu v centrálním i periferním nervovém systému. Druhým typem je butyrylcholinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8), někdy nazývaná též pseudocholinesterasa. Její význam ještě nebyl plně pochopen. Inhibitory karbamátového typu se řadí mezi reversibilní inhibitory cholinesteras. Jejich účinnost časem slábne vlivem jejich vlastní hydrolyzy.

Cílem této experimentální práce bylo jednak stanovit kinetické parametry AChE a BChE, dále optimalizovat metodu pro stanovení vybraných karbamátových inhibitorů – karbofuranu a fysostigminu. Stanovení aktivity cholinesteras bylo provedeno Ellmanovou metodou.

Provedena byla mimo jiné optimalizace stanovení rychlosti vazby inhibitorů. V našem případě bylo dosaženo plného navázání inhibitorů již mezi 7–8 minutou. Bylo zjištěno, že oba inhibitory mají na zkoumané enzymy podobný účinek. Stanovena byla také IC_{50} pro zadané inhibitory. Na základě vyšší IC_{50} při inhibici BChE (rozdíl vůči AChE činil cca 20× u fysostigminu a bez mála 60× u karbofuranu), lze konstatovat, že BChE je k inhibitorům odolnější. Vratnost inhibice bude v budoucnu podrobena dalšímu zkoumání. Během sledování acetylcholinesterasy se ani během 4 hodin sledování nepodařilo zachytit znaky dekarbamoylace, která by se projevila obnovou aktivity enzymu.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Student: Ondřej Keresteš

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

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

Title of bachelor's thesis: Spectrophotometric determination of cholinesterase activity using carbamate inhibitors

Nowadays, two types of cholinesterase are known. Acetylcholinesterase is the first one (AChE, EC 3.1.1.7), whose function is the cleavage bond of acetylcholine to cholinergic receptors in the central and peripheral nervous system. The second type is butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), sometimes called plasmatic cholinesterase or pseudocholinesterase. Whole function of BChE is yet not fully understood. Carbamate inhibitors belong to reversible cholinesterase inhibitors. Their effect decreases in time due to their own hydrolysis into inactive compounds.

The goal of this experimental work was to obtain the kinetic parameters of AChE and BChE, and optimize the method for determination of selected carbamate inhibitors – carbofuran and physostigmine/eserine. Determination of cholinesterase activity was made with Ellman method.

It turned out, firstly, that both of inhibitors act very similarly, time to reach maximum of inhibition was about 7-8 min, secondly, that BChE is more resistant to them, it has IC_{50} between 20-fold bigger for physostigmine and 60-fold bigger for carbofuran than with AChE. Reversibility of inhibition will be even further investigated. During the experiment with acetylcholinesterase, which lasts after 4 hours, was not observed no evidence of decarbamylation, which would take effect at least partial recovery of activity.

Seznam použitých zkratek

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
ATChCl	acetylthiocholin-chlorid
BChE	butyrylcholinesterasa
BTChI	butyrylthiocholin-jodid
CNS	centrální nervový systém
DN	dibukainový poměr (dibucain number)
DTNB	5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina)
ES	linearizace dle Eadyho-Scatcharda
HW	linearizace dle Hanse-Woolfa
IC ₅₀	koncentrace látky, která inhibuje enzym z 50 %
K _m	konstanta Michaelise a Mentenové
LB	linearizace dle Lineweavera-Burka
PAS	periferní anionické místo (peripheral anionic side)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffer saline)
PNS	periferní nervový systém
TNB	5-sulfanyl-2-nitrobenzoová kyselina

Úvod

Je tomu již více než sto let, kdy Sir Henry Dale naznačil, že enzymy štěpící estery cholinu (cholinesterasy) mohou být činné v autonomním i somatickém nervovém systému. [1]

V průběhu minulého století se přišlo na to, že tyto enzymy existují ve dvou variantách – specifická a nespecifická. Specifická proto, že štěpí hlavně estery cholinu. Dnes ji nazýváme acetylcholinesterasa, a to podle substrátu, který štěpí nejčastěji. Tím je acetylcholin. Nespecifická cholinesterasa štěpí i jiné substráty, a i proto ji Mendel & Rudney ve 40. letech 20. století pojmenovali pseudochoolinesterasa. [2]

Dnes se termíny pseudochoolinesterasa nebo plazmatická cholinesterasa stále užívají spíše v klinické diagnostice. [3–5]

S průlomovou metodou spektrofotometrického stanovení aktivity cholinesteras přišel Ellman. I dnes je užívaná, byť určitými obměnami. Odborná veřejnost ji stále bere jako standardní, resp. srovnávací metodu vzhledem k nově vyvíjeným modifikacím. [4, 6–8]

Ve své práci jsem měl za úkol provést optimalizaci této metody při výzkumu vlivu karbamátových inhibitorů na zkoumané enzymy. Měl jsem se soustředit hlavně na spontánní hydrolýzu zbytků dvou vybraných *N*-methylkarbamátů (fysostigminu a karbofuranu) po navázání na aktivní místo cholinesteras, a na samotnou rychlost této vazby.

Cíle práce

Nejdříve bylo třeba optimalizovat a ověřit metodu spektrofotometrického stanovení cholinesteras dle Ellmana. [8] Jedná se sice o metodu starší, dosud ale nebyla zcela překonána. Testovali jsme AChE z elektrického úhoře a BChE z koňského séra spolu s inhibitory karbamátového typu. Vybranými inhibitory byly karbofuran a fysostigmin zastupující *N*-methylkarbamáty. Karbofuran představoval model karbamátového pesticidu, fysostigmin je výchozí látkou pro syntézu nových léčiv.

Při práci jsme se soustředili na tyto úkoly:

- 1) Zjištění vlivu koncentrace substrátu na aktivitu enzymů, optimalizování reakčních podmínek.
- 2) Porovnání různých detekčních časů, tedy doby mezi prvním a druhým měřením při stanovování aktivity enzymů.
- 3) Určení a porovnání IC_{50} (tj. koncentrace inhibitoru snižující aktivitu enzymu na 50 %) obou inhibitorů u každého enzymu.
- 4) Zjištění rychlosti vazby inhibitorů na enzymy.
- 5) Potvrzení *in vitro*, že karbamáty jsou pseudoreversibilními inhibitory.

Teoretická část

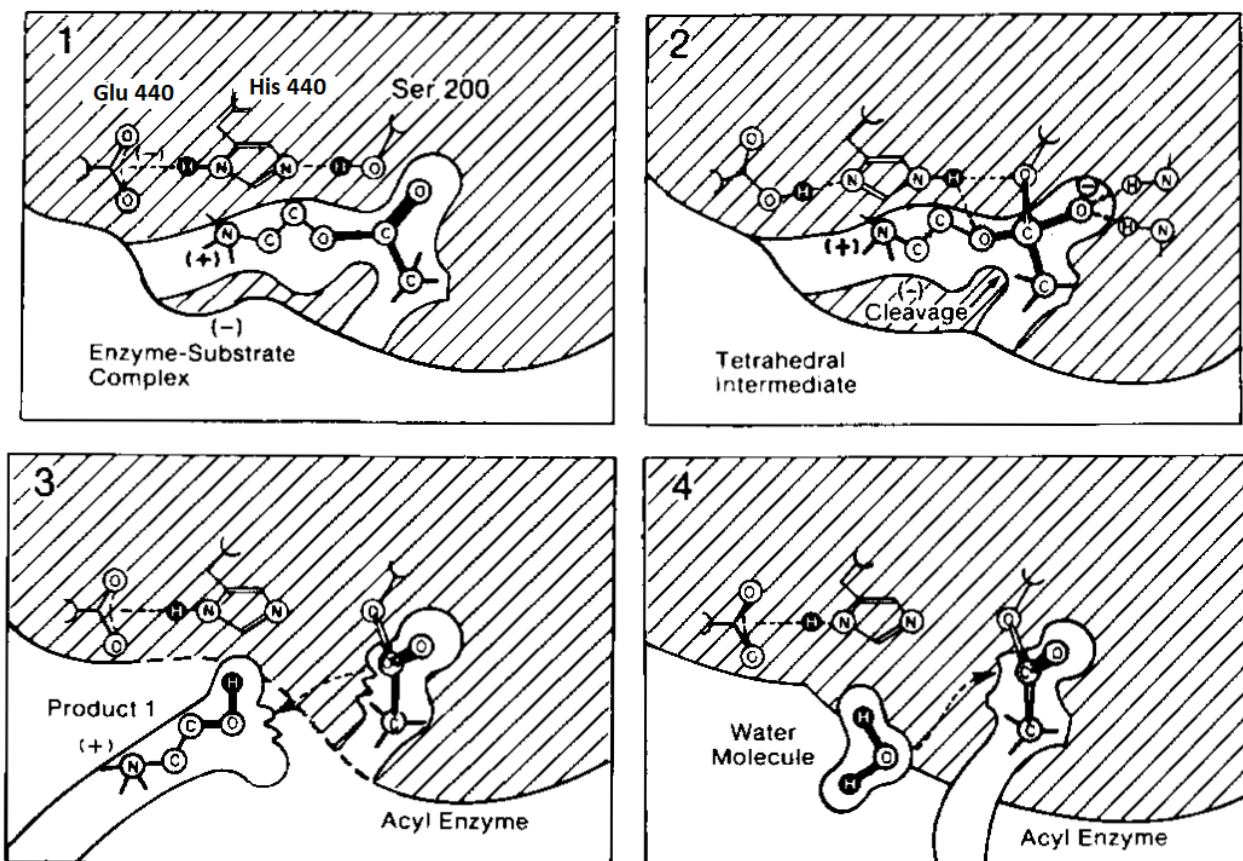
Acetylcholinesterasa

Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7, AChE) přirozeně štěpí acetylcholin (ACh), který je mediátorem jak centrálního nervového (CNS), tak také periferního nervového systému (PNS). AChE najdeme hlavně v mozku a na nervosvalových ploténkách, také ale na membránách erytrocytů. [1, 3]

AChE je serinovou hydrolasou, tj. hydrolytickým enzymem, který má ve svém aktivním místě aminokyselinu serin. Aktivní místo, tzv. esteratická část, je uložena v dutině, kterou obepínají zbytky aminokyselin schopné interakce mezi kationty a π elektrony aromatických jader aminokyselin (fenylalaninu, tyrozinu, tryptofanu, aj.) – tzv. periferní anionické místo (PAS). PAS je tak odpovědné za koordinaci vstupu substrátu do aktivního místa. Substrát – acetylcholin – se váže hlavně do esteratické části aktivního místa, ale pokud je v nadbytku, váže se také kolem PAS. Při velmi vysoké koncentraci substrátu (např. 500 mmol/l) tak zabrání vstupu další molekuly substrátu do aktivního místa. [9–11]

Popis vazby a hydrolýzy acetylcholinu (viz Obrázek 1):

- 1) Substrát projde kolem PAS do aktivního místa a vznikne komplex enzym substrát v esteratické části aktivního místa AChE (1. nákres); vytvoří se intermediát ve tvaru čtyřstěnu, jehož součástí je zbytek aminokyseliny serinu (Ser 200) (2. nákres);
- 2) Dojde k rozpadu intermediátu, odstupující skupinou je cholin, Ser 200 zůstal acetylován (3. nákres);
- 3) Zbytek kyseliny octové je hydrolyticky odstraněn a opouští enzym (4. nákres)



Obrázek 1: Jednotlivé fáze hydrolyzy acetylcholinu. Převzato z Taylora [1] a upraveno podle Colletiera a Pohanky [9, 11]

Butyrylcholinesterasa (pseudocholinesterasa)

Butyrylcholinesterasu (EC 3.1.1.8., BChE) najdeme hlavně rozpuštěnou v krvi, kam je vylučována jaterními buňkami. Na rozdíl od AChE substrátově selektivní není. Je to díky tomu, že PAS je chudší na zbytky aromatických aminokyselin, které jsou na jejich místě nahrazeny hydrofobními konci aminokyselin, např. nahrazení dvou molekul fenylalaninu molekulou leucinu a valinu u AChE z úhoře. [11, 12]

O hlavní roli BChE se stále vedou diskuse. Hawkinsová a Gunterová popřely na základě pokusů vliv BChE na normální průběh hydrolýzy acetylcholinu v cholinergní synapsi. [2] Nicméně studie ukazují, že svou roli v nich mít může. Ukázalo se, že je BChE schopna acetylcholinesterasu alespoň z části, ne-li plně, v CNS nahradit. [13, 14]

Sérová hladina BChE dříve sloužila jako ukazatel jaterní funkce, protože má pro klinické účely přijatelný biologický poločas (cca 13 dnů, [15]). Bylo tak možné přibližně určit míru snížení proteosyntetické funkce jater. [3]

Bohužel, vzhledem k výskytu různých genových variant v populaci (více jak 60, navíc s různou mírou projevu [16]) se aktivita BChE v séru jeví jako poměrně nespecifický marker. Důležitý je případný výskyt dědičné varianty BChE typu K. Ta se vyskytuje asi u jednoho ze čtyř lidí europoidní rasy. Jde o výměnu aminokyseliny v sekvenci proteinu na pozici 539. Alanin je střídán threoninem. BChE typu K není tak aktivní jako původní typ (tzv. wild). Úbytek aktivity je cca 30 %. [17] U člověka s BChE typu K se může po podání succinylcholinu objevit apnoická pauza, jelikož defektní enzym jej není schopen štěpit tak rychle. [3, 15]

Bližší určit zbytkovou aktivitu můžeme pomocí dibukainu. Objev odolnosti BChE typu K vůči dibukainu zapříčinil, že bylo možné kvantifikovat účinnost oslabené BChE v porovnání s původní BChE, jež je k dibukainu citlivá. Změří se tedy aktivita cholinesteras v plazmě s přidaným dibukainem, i bez něj. Výsledný poměr ukazuje na tzv. Dibucain number (DN, <0;100>), kdy pro obvyklou BChE odpovídá $DN \geq 75$, pro homozygoty s převládajícím defektním enzymem je $DN < 20$. [11]

Inhibice cholinesteras

Ovlivněním aktivity cholinesteras můžeme v těle terapeuticky ovlivňovat funkce cholinergních neuronů, např. při léčbě Alzheimerovy choroby podáním inhibitorů působících hlavně v CNS, případně u Myasthenia gravis ovlivněním transmise ACh v PNS. K úpravě aktivity cholinesteras používáme reversibilně působící inhibitory. Jejich účinek s časem klesá a pro jejich podobnost se substrátem se snadno stane, že inhibitor substrát v aktivním místě nahradí, a tak zpomalí degradaci ACh, čímž zvýší jeho efekt. [18]

Terapie Alzheimerovy choroby v současné době probíhá pomocí léčivých přípravků obsahující donepezil, galantamin, případně rivastigmin. Léčiva podávaná u choroby Myasthenia gravis jsou např. distigmin, neostigmin, nebo pyridostigmin).

Ireversibilní inhibitory (mezi ně řadíme organofosfáty) byly používány, případně připraveny k použití jako otravné nervové plyny (např. VX, soman, sarin, ...) při vojenských konfliktech během 2. poloviny 20. století, při teroristických útocích (např. v roce 1995 došlo v Tokiu k vypuštění sarinu v metru. V dubnu 2017 byl podle Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) vypuštěn sarin ve městě Khan Shaykun v Sýrii). Organofosfáty, které nejsou tak nebezpečné, byly používány v zemědělství jako pesticidy (dichlorvos, malathion,...) [11, 18, 19]

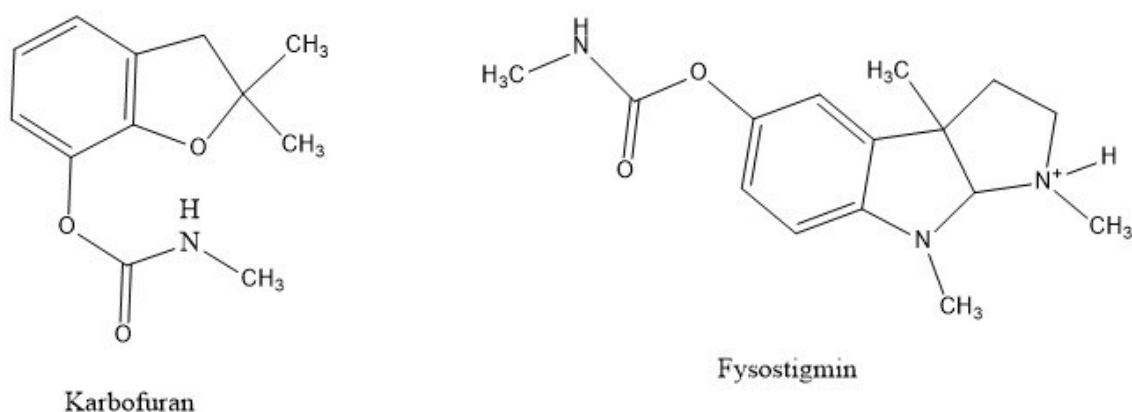
Zvláštní skupinou jsou pseudoreversibilní inhibitory cholinesteras. Mezi ně patří jak zkoumané látky karbofuran a fysostigmin, tak pyridostigmin a rivastigmin. Jejich efekt spočívá v tom, že se jako substrát napojí na aminokyselinu serin v esteratické části aktivního místa cholinesteras (viz Obrázek 1). Jako u ACh dojde také u karbamátů k jejich rozpadu na dvě části, přičemž místo k acetylaci aktivního místa nastane jeho karbamoylace, kdy hydrolýza karbamátové skupiny (dekarbamoylace) trvá podstatně delší dobu – desítky až stovky minut. Po vazbě ACh trvá řádově milisekundy, než dojde k hydrolýze acylové skupiny. [11, 18]

Skupinu reversibilních inhibitorů zastupuje například galantamin, který funguje jako kompetitivní inhibitor. Dále pak nekompetitivní inhibitory, jejichž zástupci jsou donepezil, takrin, aflatoxiny, aj. [11]

Zkoumané inhibitory cholinesteras

Fysostigmin (viz Obrázek 2) je modelovou sloučeninou přírodního původu, z něhož vychází řada syntetických léčiv. Izolován byl ze semen rostliny *Physostigma venenosum* (Phabaceae). Jeho účinek zprostředkovává karbamátová skupina, která se váže do aktivního místa, dále kladně nabitá aminoskupina – ta se váže na PAS. Vzhledem k tomu, že díky karbamátové skupině se inhibitory podobají přirozenému substrátu, snadno se do aktivního místa váží, čemuž ještě pomáhá zmíněný nabitý dusík v aminoskupině. Ten usnadňuje orientaci molekuly v aktivním místě enzymu. Užíval se k léčbě choroby Myasthenia gravis, nicméně kvůli značným vedlejším účinkům se nyní indikuje jako antidotum (přípravek ANTICHOLIUM inj. Sol.) při předávkování atropinem, případně jinými anticholinergiky, nebo při otravě muchomůrkou, alkoholem nebo tropanovými alkaloidy [18, 20]

Karbofuran (viz Obrázek 2) je v zemích EU již zakázaným pesticidem i vzhledem ke své vysoké toxicitě vůči obratlovcům. Vzhledem k jeho širokému užívání v ostatních částech světa je stále možné jeho rozšiřování skrze potraviny nebo vodou. Bohužel je stále zneužíván například k usmrcování zvířat prostřednictvím otrávených návnad. [21–23]



Obrázek 2: Vzorce a názvy zkoumaných N-methylkarbamátů

Metodická část

Nejprve je nezbytné optimalizovat podmínky z pohledu výběru substrátu a jeho použitého množství pro konkrétní enzym. Abychom mohli dále sledovat chování vzorku zkoumaného enzymu, musíme znát závislost koncentrace použitého substrátu a rychlosti reakce. Z křivky této závislosti určíme maximální/limitní reakční rychlost a tzv. konstantu Michaelise a Mentenové (K_m). K_m udává koncentraci, při které je dosaženo poloviční rychlosti, než jaká je ta maximální. Maximální rychlosti dosáhneme pouze v případě, že je enzym zcela nasycen substrátem, resp. jsou zaplněna aktivní místa enzymu. [24]

Musíme ale dávat pozor na to, zdali není zkoumaný enzym inhibovatelný i nadbytkem substrátu. V našem případě je substrátem inhibovatelná AChE. BChE výrazný nadbytek substrátu ve funkci neomezuje. I proto je třeba určit optimální koncentraci přidávaného substrátu. Aktivita BChE sice není vysokými koncentracemi substrátu nikterak ovlivněna, nicméně není třeba přidávat řádově vyšší koncentrace než tu, kterou zaplníme všechna aktivní místa, aby mohla reakce probíhat maximální rychlostí. Z modelu Michaelise a Mentenové je patrné, že v určitém rozsahu koncentrací substrátu již rychlost reakce tolik nenarůstá (viz Graf 1 a Graf 2, str.25). [10, 25]

Možnosti vyhodnocení dat

Pro vyhodnocení získaných dat při měření enzymové kinetiky lze použít Hillovu funkci¹, případně možnost lineární regrese uvedené v Tabulka 1. Pro hodnocení inhibice inhibice uijeme buďto exponenciální křivku, případně „dose-response“ model dostupný například v programu Origin 6.1, ve kterém můžeme určit IC₅₀ zkoumaných inhibitorů. Právě program Origin 6.1 byl využit v rámci této práce.

Tabulka 1: Parametry pro linearizaci vybranými způsoby, převzato z Kodíčka [24], upraveno

Regrese podle:	Osa x	Osa y	Směrnice přímky	Průsečík na ose x	Průsečík na ose y
Lineweavera a Burka (LB)	$1/\alpha$	$1/[S]$	K_m/V_{max}	$1/V_{max}$	$-1/K_m$
Hanse a Woolfa (HW)	$[S]/\alpha$	$[S]$	$1/V_{max}$	K_m/V_{max}	$-K_m$
Eadyho a Scatcharda (ES)	$\alpha/[S]$	α	$-1/K_m$	V_{max}/K_m	V_{max}

α aktivita enzymu vypočítaná dle Rovnice 1 (kat)

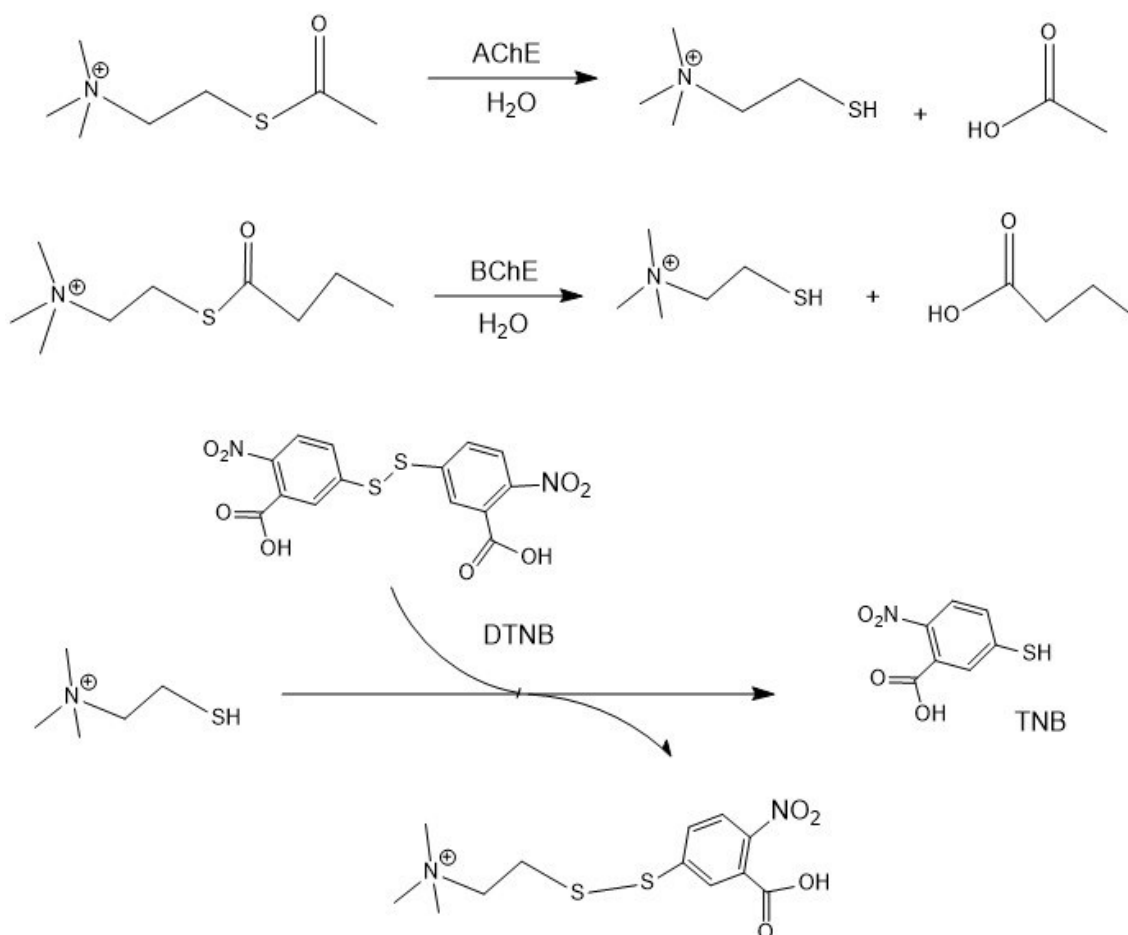
[S]... koncentrace substrátu (mmol/l)

¹ Při grafickém zpracování pomocí Hillova modelu nám nejsou poskytnuty přímo kinetické parametry, ale totožné hodnoty s jiným značením. Fakticky se také jedná o limitní hodnotu y (V_{max}) a o hodnotu na ose x, kde má (y) hodnotu poloviční vůči limitě. Takže se jedná o K_m .

Ellmanova metoda

Zásadním průlomem v možnosti stanovení aktivity cholinesteras bylo vytvoření první metody Ellmanem. Věděl, že cholinesterasy štěpí estery cholinu a stejným způsobem štěpí i jeho thioestery. Vyvinul novou molekulu pro důkaz volných thiolů, 5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB). Popsal novou metodu na stanovení cholinesteras prostřednictvím rozkladu acylthiocholinů (Obrázek 3):

AChE/BChE rozštěpí acetylthiocholin/butyrylthiocholin na příslušnou kyselinu a thiocholin. Ten následně reaguje s molekulou DTNB, čímž dojde k uvolnění 5-sulfanyl-2-nitrobenzenové kyseliny (TNB), kterou stanovujeme při vlnové délce 412 nm. [8, 26]



Obrázek 3: Schéma hydrolytické reakce AChE a BChE, znázornění důkazové reakce thiocholinu

$$\alpha = \frac{\Delta A}{\varepsilon * \Delta t}$$

Rovnice 1: Výpočet aktivity enzymu při spektrofotometrickém stanovení

V průběhu let od zveřejnění prvního spisu o metodě byly doporučené reakční podmínky upraveny i vzhledem k tomu, aby bylo možné cholinesterasy stanovovat i v plné krvi, nebo za jiné teploty. Při našem stanovení při teplotě 25 °C byl dosažen do *Rovnice 1* extinkční koeficient $\varepsilon = 14150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. [27]

Doporučená vlnové délka je 412 nm, pokud není ve směsi jiná absorbující látka. Když stanovení probíhá přímo v krvi, doporučuje se vlnovou délku pro měření zvolit delší (např. 436 nm), neboť oxyhemoglobin absorbuje při 412 nm též, zatímco při 436 nm už jen z 20 %. TNB absorbuje záření při 436 nm stále ještě dostatečně, z 80 % při 37 °C. [7, 27, 28]

V klinické analýze se při automatickém stanovení volí i sekundární vlnová délka k primární. Při použití soupravy firmy Roche se v metodice uvádí 480 nm jako primární vlnová délka a 660 nm jako sekundární vlnová délka. [4]

Experimentální část

Použité chemikálie

Acetylcholinesterasa z elektrického úhoře (AChE, typ V-S, ≥ 1000 IU/mg proteinu)

butyrylcholinesterasa z koňského séra (BChE, 19 IU/mg proteinu)

Fysostigmin (≥ 99 % (w/w))

Karbofuran (98 % (w/w))

5,5'-disulfandiylbis(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB, ≥ 98 % (w/w))

Acetylthiocholin-chlorid (ATChCl, ≥ 99 % (w/w))

Butyrylthiocholin-jodid (BTChI, ≥ 99 % (w/w))

Fosfátový pufr (PBS, pH 7,4)

Hovězí sérový albumin (≥ 98 % (w/w))

2-propanol (99,5% (V/V))

Všechny chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (nyní Merck, SRN)

Přístrojová technika a pomůcky

UV-VIS spektrofotometr Evolution 201 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Spektrofotometr SpectroVis Plus (Vernier, USA)

Semi-mikrováhy Sartorius CPA225D (Sartorius AG, SRN)

Jednokanálové pipety Transferpette® S o rozsahu 1–100 μ l, 1–200 μ l, 100–1000 μ l, 500–5000 μ l (Brand GmbH, SRN)

Vortex V-1 plus (Biosan, Litva)

Magnetická míchačka IKAMAG™ Color Squid (IKA, USA)

Stopky, kopistky, kádinky, odměrný válec

Hardware a software

Přenosný počítač ThinkPad T420 (Lenovo, USA)

Office 2016, Windows 10 (Microsoft, USA)

Acrobat Reader DC (Adobe, USA)

Firefox (Mozilla, USA)

Origin 6.1 (OriginLab, MA, USA)

ChemOffice 2016 (PerkinElmer Informatics, USA)

Spotřební materiál

Centrifugační zkumavky 15 a 50 ml (Techno Plastic Products, Švýcarsko)

Jednorázové semi-mikro kyvety 1,5ml s optickou dráhou 10 mm (Brand GmbH, SRN)

Plastové špičky do Transferpette® S (Brand GmbH, SRN)

Jednorázové mikrozukavky 2ml (Eppendorf, SRN)

Parafilm® (Bemis Company, Inc., USA)

Příprava roztoků

Zásobní roztoky enzymů byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných proteinů v PBS (pH 7,4). Aktivita enzymu v zásobním roztoku byla upravena tak, aby se při standardní dávce roztoku enzymu 25 μ l, koncentraci DTNB 0,4 mmol/l a koncentraci substrátu 1 mmol/l, pohybovala absorbance výsledné reakční směsi mezi 0,5–1 v rozmezí 2–5 minut inkubace. Hotový roztok AChE / BChE byl stabilizován přidávkem hovězího albuminu do celkové koncentrace 0,5 mg albuminu v 1 ml roztoku, rozlit do mikrozkušavek a skladován nejdéle po dobu jednoho měsíce při -20°C .

Roztoky inhibitorů byly připraveny do čistého 2-propanolu a uchovávány v chladu a temnu. 2-Propanol je sice také inhibitorem (cca 25% snížení aktivity při koncentraci 5 % (V/V)), ovšem ne tak silným jako některá jiná rozpouštědla, např. dimethylformamid, n-butanol (oba inhibují lidskou AChE z cca 60 % již při koncentraci 5 % (V/V)). Také 1-propanol inhibuje více (40 % při stejné koncentraci). [29] 2-Propanol inhibuje i použitou úhoří AChE přibližně z 25 %. [30, 31]

Roztoky DTNB (1 mmol/l) a substrátů byly vždy připraveny čerstvé, rozpuštěním základní látky v PBS (pH 7,4). DTNB se na světle rozkládá, stěna zkumavky proto byla krytá hliníkovou fólií.

Postupy jednotlivých měření

1) Zjištění afinity enzymu k substrátu a určení kinetických parametrů:

Do mikroskopavek byla naředěna kalibrační řada substrátů dle měřeného enzymu (ATChCl pro AChE, BTChI pro BChE) začínající na koncentraci 20 mmol/l substrátu. Ředěním roztoku o koncentraci 20 mmol/l dvojkovou řadou pomocí PBS až do koncentrace 0,04 mmol/l bylo připraveno 10 kalibračních roztoků substrátu. Dávkování do kyvet probíhalo následovně (viz Tabulka 2):

Tabulka 2: Postup ředění pro změření saturační křivky AChE a BChE, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Vzorek	Slepý pokus
Měřený objem	1000 μl	1000 μl
DTNB (1mM)	400 μl	400 μl
Enzym	25 μl	Nepřidáván
PBS	475 μl	500 μl
Roztok substrátu	100 μl	100 μl

Neprodleně po přidání substrátu a protřepání obsahu kyvety byla proti slepému pokusu změřena absorbance vzorků při vlnové délce 412 nm, a znovu přesně 5 minut poté. Rozdíl absorbance spolu s dalšími známými veličinami (extinkční koeficient, doba odečtu v sekundách) po doplnění do (Rovnice 1) umožnil výpočet aktivity enzymu (α) v kataltech. Měření byla prováděna v tripletu a u každé série byla vedle průměru počítána směrodatná odchylka a variační koeficient.

2) Porovnání různých detekčních časů, tedy doby mezi prvním a druhým měřením při stanovování aktivity enzymů:

Postup je totožný s úkolem 1), ale v tomto došlo druhému měření po 1, 2, 3 a 4 minutách od prvního. Práce probíhala vždy v tripletu a odečítalo se proti slepému pokusu. Měření proběhla bezodkladně po smíchání reakční směsi se substrátem a promíchání kyvety.

3) Určení a porovnání IC_{50} obou inhibitorů u každého enzymu:

Tabulka 3: Postup ředění vzorku pro měření inhibiční křivky, $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

	Vzorek	Slepý pokus
Měřený objem	1000 μl	1000 μl
DTNB (1mM)	400 μl	400 μl
Enzym	25 μl	Nepřidáván
PBS	450 μl	475 μl
Kal. roz. inhibitoru	25 μl	25 μl
Inkubace při 25 $^{\circ}\text{C}$		
ATChCl (10mM)	100 μl	100 μl

a. Acetylcholinesterasa

Do mikrozkušavek byla připravena ředěním dvojkovou řadou kalibrační řadu roztoků inhibitorů rozpuštěných ve 2-propanolu. Koncentrace kalibračních roztoků se pohybovala v rozmezí $4,884 \cdot 10^{-2}$ –25 $\mu\text{mol/l}$, v případě fysostigminu 50 $\mu\text{mol/l}$. Po zředění (viz Tabulka 3) byla nejvyšší výsledná koncentrace inhibitoru v kyvetě 0,625 $\mu\text{mol/l}$ (karbofuran), resp. 1,25 $\mu\text{mol/l}$ (fysostigmin). Koncentrace 2-propanolu v kyvetě nepřesáhla 5 %. Koncentrace DTNB byla standardně 0,4 mmol/l.

Reakce byla spuštěna přidáním substrátu do kyvety po uplynutí přesné doby inkubace (10 min). Neprodleně poté byla kyveta s reakční směsí promíchána, změřena absorbance proti slepému pokusu při 412 nm a po 5 minutách byla změřena opět.

b. Butyrylcholinesterasa

Postup byl identický jako u AChE, koncentrace kalibrační řady inhibitorů se pohybovaly mezi 25–500 $\mu\text{mol/l}$ u karbofuranu, rozpětí u roztoků fysostigminu činilo 25–300 $\mu\text{mol/l}$. Výsledná koncentrace v měřeném roztoku byla 0,625–12,5 $\mu\text{mol/l}$, resp. 0,625–7,5 $\mu\text{mol/l}$.

4) Zjištění rychlosti vazby inhibitorů na enzymy:

Do kyvet byly dávkovány zásobní roztoky dle Tabulka 3. Pro hodnocení karbofuranu a fysostigminu jejich koncentrace v kyvetě byla 0,5 $\mu\text{mol/l}$ při sledování AChE, resp. 10,4 $\mu\text{mol/l}$ a 5,1 $\mu\text{mol/l}$ během sledování s BChE. (Aktivita enzymu v kyvetě při těchto koncentracích se pohybovala okolo 10–20 %).

Spouštění reakce se lišilo pouze v případě sledování poklesu aktivity bezprostředně po přidání inhibitoru k enzymu – poslední přidávaný byl tedy vzorek enzymu. V ostatních případech, kdy se reakce spouštěla substrátem, se též při měření v tripletu sledovali aktivity po 30 s. Nejdelší doba inkubace byla alespoň 8 min. Měření probíhalo opět při 412 nm proti slepému pokusu.

5) Potvrzení *in vitro*, že karbamáty jsou reversibilními inhibitory.

Do vytvořené základní směsi roztoku AChE (1,5 ml připraveného rozmraženého koncentrátu) bylo přidáno 1,5 ml roztoku karbofuranu, případně fysostigminu (rozpuštěných v 5% 2-propanolu, viz pozn.²), kdy koncentrace karbofuranu ve směsi s enzymem byla 286 nmol/l, 128 nmol/l nebo 64 nmol/, a koncentrace fysostigminu byla 500 nmol/l.

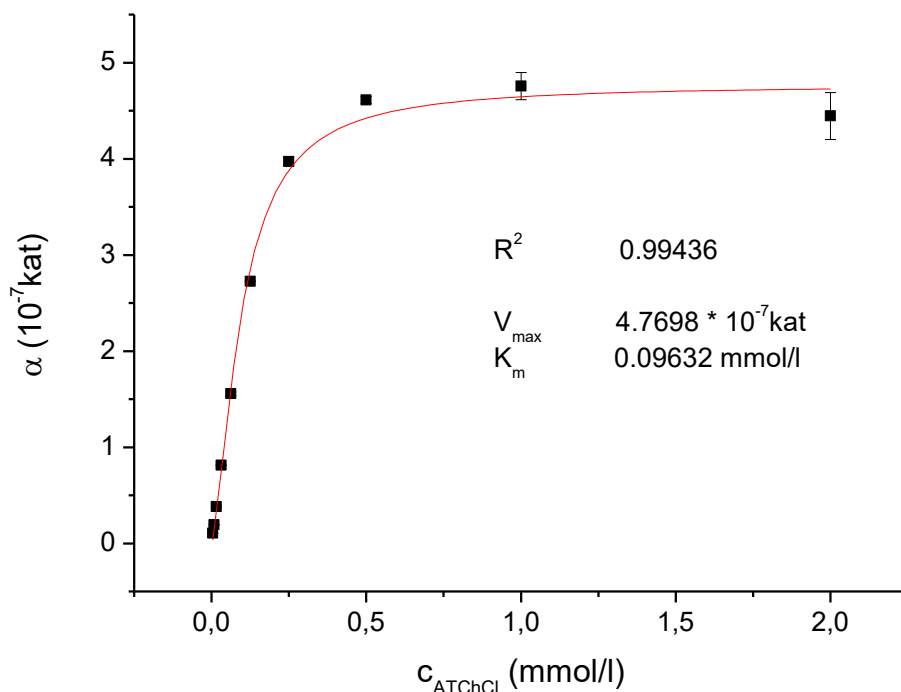
Tyto směsi byly kontinuálně promíchávány ve skleněné nádobce na magnetické míchače rychlostí, kdy se roztok zbytečně nevířil, avšak byl stále zvolna míchán. Nádobka byla utěsněna folií Parafilm®, aby nedošlo k vytékání rozpouštědla.

Měření probíhalo téměř od okamžiku prvního styku enzymu s inhibitorem, dále každých 15 minut, a to v sérii 3 vzorků. Z nádobky jsem odebíral 50 μl na každé měření, toto množství napipetoval do kyvety s již připraveným roztokem DTNB v pufru (výsledná koncentrace DTNB byla 0,4 mmol/l, viz Tabulka 3). Reakce byla spuštěna přidáním substrátu, po promíchání kyvety jsem změřil absorbanci proti slepému pokusu (bez enzymu) při 412 nm poprvé, a po 5 minutách znovu. Preinkubace enzymu s inhibitorem v nádobce probíhala vždy alespoň 180 min.

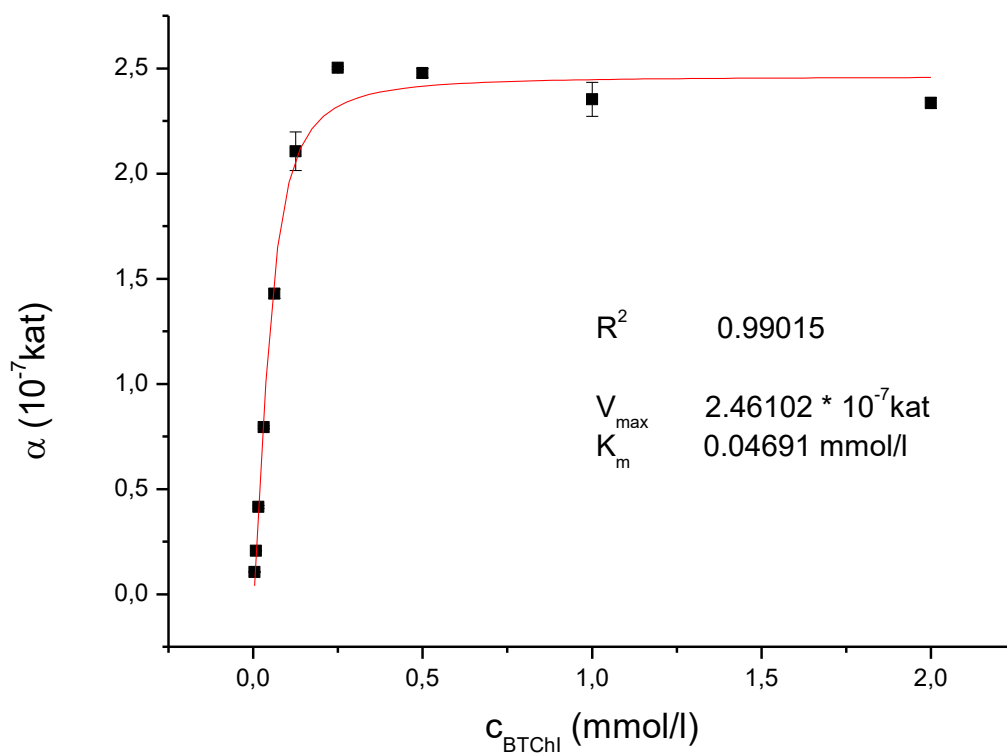
² Roztok byl ředěn z předpřipraveného roztoku inhibitoru v čistém 2-propanolu. Nicméně vzhledem k jeho negativnímu vlivu na aktivitu enzymu jsme museli zvolit kompromis, kdy došlo k zachování inhibitorů v rozpuštěném stavu a zároveň k minimalizování inhibice AChE samotným 2-propanolem. [31]

Výsledky a diskuse

1) Zjištění afinity enzymu k substrátu a určení kinetických parametrů, optimalizování reakčních podmínek



Graf 1: Saturační křivka acetylcholinesterasy, substrát acetylthiocholin chlorid



Graf 2: Saturační křivka butyrylcholinesterasy, substrát butyrylthiocholin jodid

Tabulka 4: Srovnání výsledků lineárního a nelineárního hodnocení kinetiky

Vyhodnocení K_m	Nelineárně – Hill	Lineárně – LB	Lineárně – HW	Lineárně – ES
AChE	96,3 $\mu\text{mol/l}$	413 $\mu\text{mol/l}$ 84,0 $\mu\text{mol/l}$ (32)	127 $\mu\text{mol/l}$	237 $\mu\text{mol/l}$
BChE	46,9 $\mu\text{mol/l}$	48,0 $\mu\text{mol/l}$	49,0 $\mu\text{mol/l}$	11,9 mmol/l

Z použitých enzymů má K_m nižší BChE, a to přibližně dvojnásobně. Můžeme tedy říci, že má BChE větší afinitu k BTChI, než má AChE ke svému substrátu.

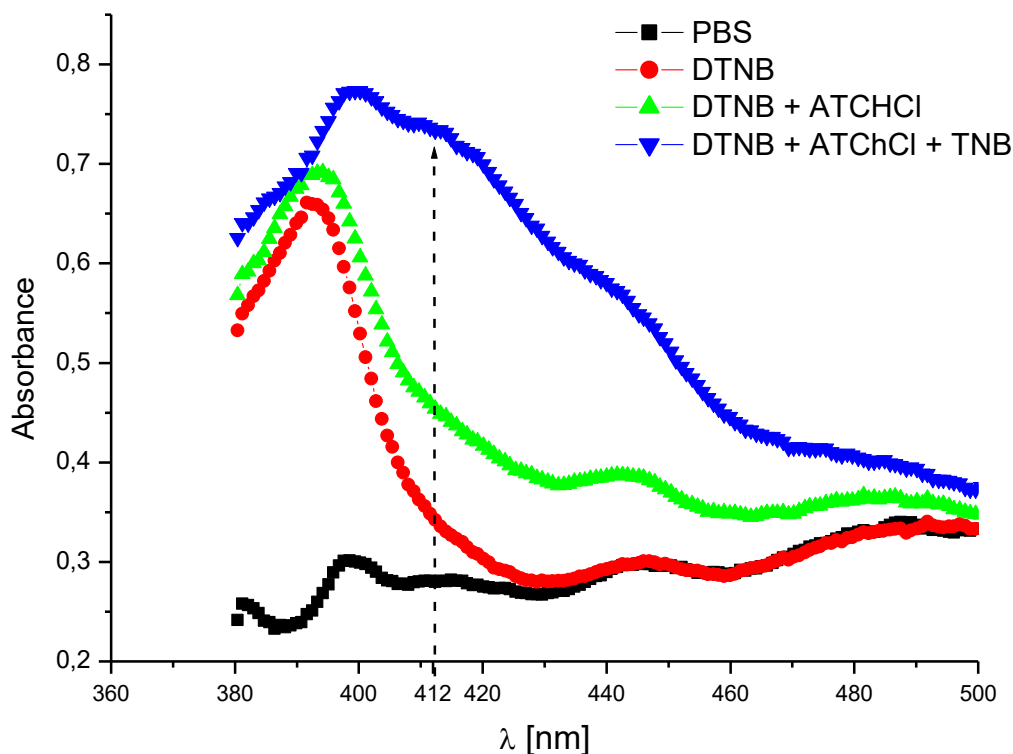
Vyzkoušeli jsme též srovnání různých způsobů vyhodnocení kinetického měření, které jsou nejběžněji používané [24]:

Model dle Lineweavera a Burka (LB) se s výsledky vyhodnocení Hillovou funkcí blížil pouze u BChE. Model dle Hanse a Woolfa (HW) dopadl ve stejném srovnání naprosto shodně jako u modelu LB – shoda výsledků u BChE v rozmezí 5 %, u AChE v rozmezí 30–146 %.

Nejhůře dopadla linearizace dle Eadyho-Scatcharda (ES) – rozdíl ve výsledcích je v rámci dvou řádů.

Jeden z mála dohledaných výsledků z odborné literatury, který využíval enzym stejného organismu a práce probíhala také při teplotě 25 °C, je uveden v tabulce. Ten se blíží k experimentální hodnotě více než ostatní lineární vyhodnocení.

Velmi podobnou experimentálně zjištěnou závislost aktivity úhoří AChE a ATChCl je možno pozorovat zde. [30] Číselné hodnoty s tímto zdrojem porovnat nelze.

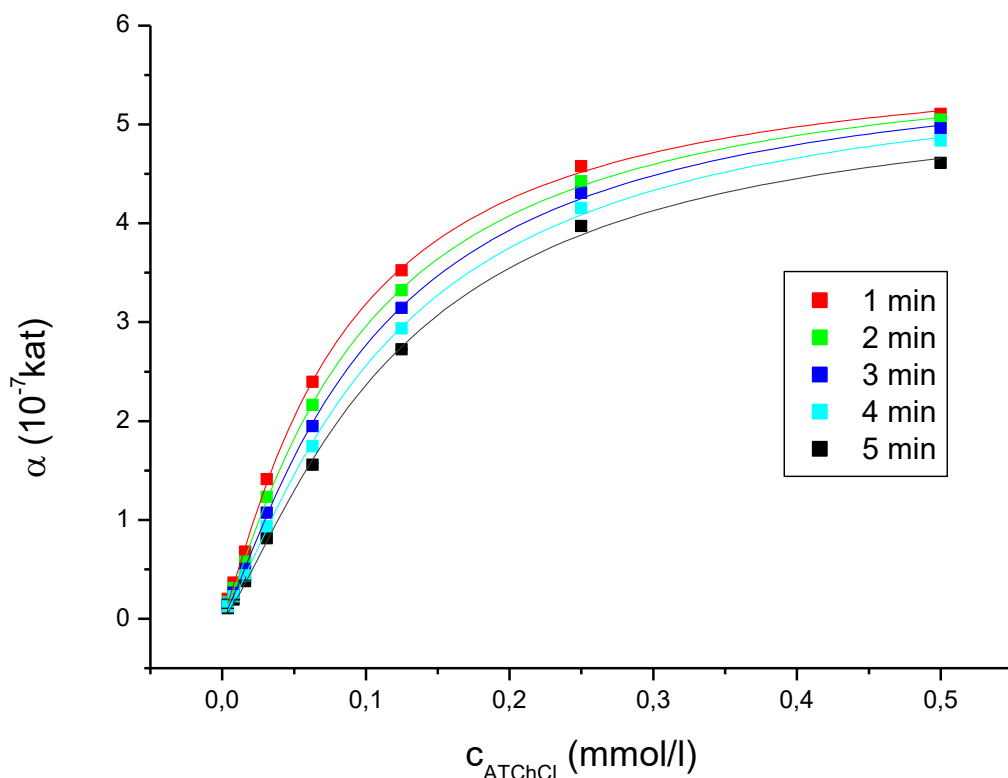


Graf 3: Absorpční spektra jednotlivých použitých látek a jejich směsí

V Graf 3 jsou souhrnně vyznačeny absorpční spektra jednotlivých postupně vznikajících směsí během dávkování roztoků do kyvet.

Velmi podobné se jeví křivky směsi DTNB a substrátu (zelená) vedle samotného roztoku DTNB (červená). Je to patrně způsobeno částečnou hydrolyzou substrátu již v roztoku. Modrou křivkou je popsáno spektrum reakční směsi, kde již dochází ke vzniku TNB, detekovaného produktu. Míra vzniku produktu je tak vysoká, že kvůli zachycení samotného spektra bylo nutné tento aktivní roztok 10× naředit. I proto se může zdát, že absorpční maxima jsou sice relativně blízko. Při bližším pohledu je zřejmé, že by se těžko hledala jiná vlnová délka, kde by bylo stanovení tak citlivé. Jakýkoli posun vlnové délky by znamenal *de facto* menší rozdíl absorbancí vzhledem k absorpci výchozích látek, zvláště při stanovování stopových koncentrací případně při sledování residuální aktivity během inhibičních studií. Důvodem, proč uvažovat o změně vlnové délky může být zjištěná interference hemoglobinů, které absorbují v okolí absorpčního maxima TNB. [7, 28]

2) Porovnání různých detekčních časů, tedy doby mezi prvním a druhým měřením při stanovování aktivity enzymů:

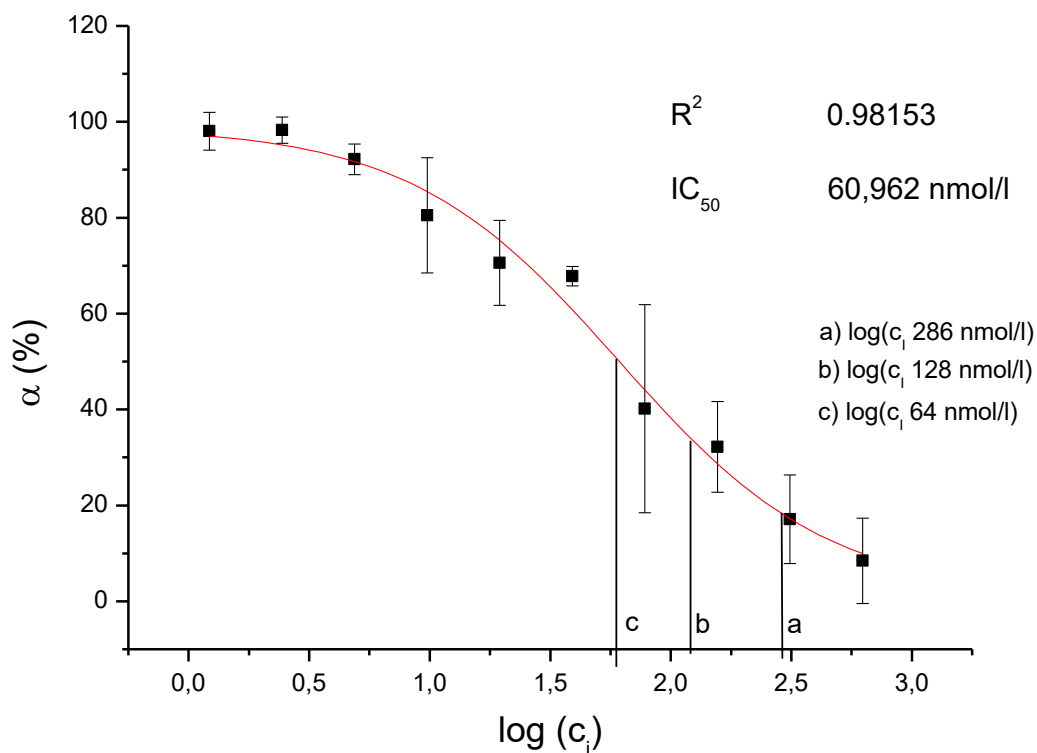


Graf 4: Ukázka rozdílů při měření za různých detekčních dob

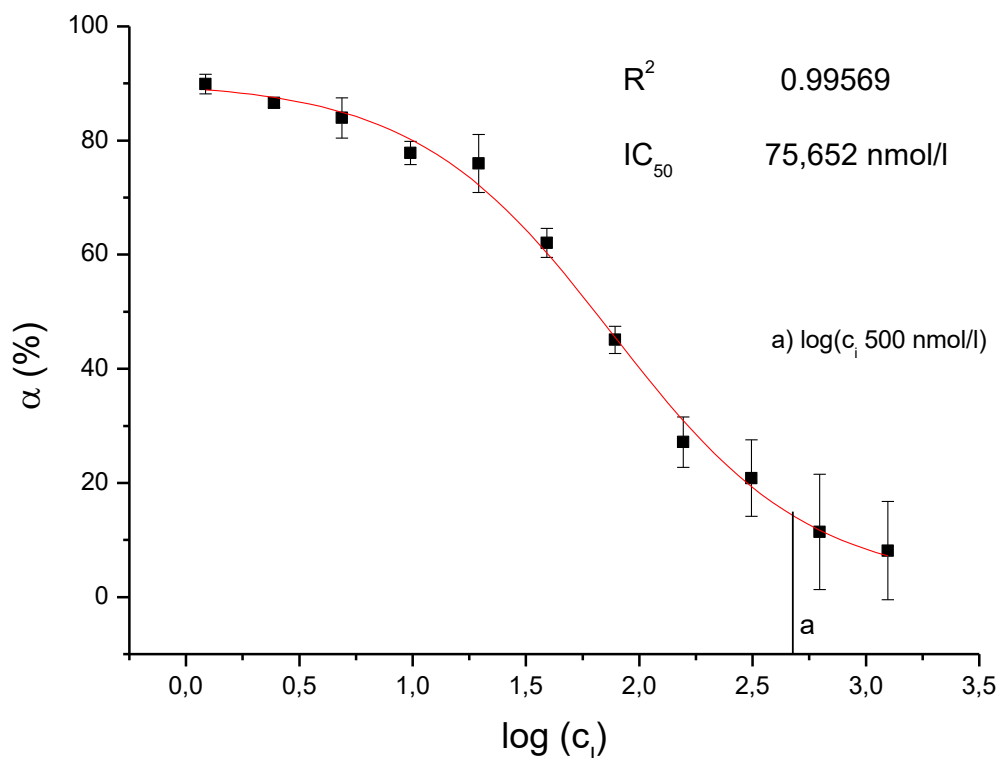
Jako příklad byla zvolena acetylcholinesterasa. Z

Graf 4 vyplývá, že nejvyšší limitní rychlost enzymové reakce naměříme při nejmenší prodlevě, v našem případě po 1 minutě. Nejnižší limitní rychlost byla stanovena při odečtu po 5 minutách. Z tohoto hlediska se na první pohled zdá nejkratší interval odečtu jako výhodný. Opak je pravdou. Vše se odvíjí od našeho požadavku na citlivost metody. Není reálné, aby metoda s 5x menší dobou pro tvorbu produktu měla stejný pracovní rozsah, a navíc rozlišila i stopové rozdíly koncentrace produktu, což jsme při našich pokusech potřebovali. Zvolili jsme tedy odečet po 5 minutách. I vzhledem k tomu, že veškeré manipulace s kyvetou probíhali ručně a nebylo možné měřit triplet současně bez jejich ruční výměny v kyvetovém prostoru spektrofotometru. Případné rozdíly tedy nebudou vnášet tak velkou potenciální chybu do získaných výsledků.

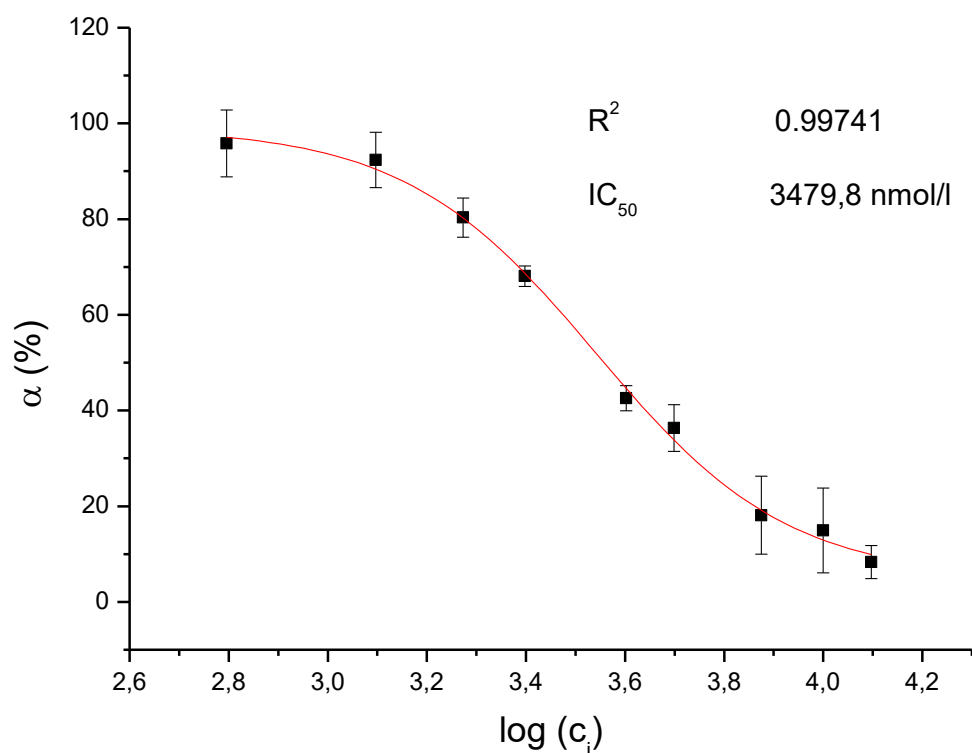
3) Určení a porovnání IC_{50} obou inhibitorů u každého enzymu, tj. *de facto* vzájemné porovnání odolnosti enzymů vůči inhibitorům



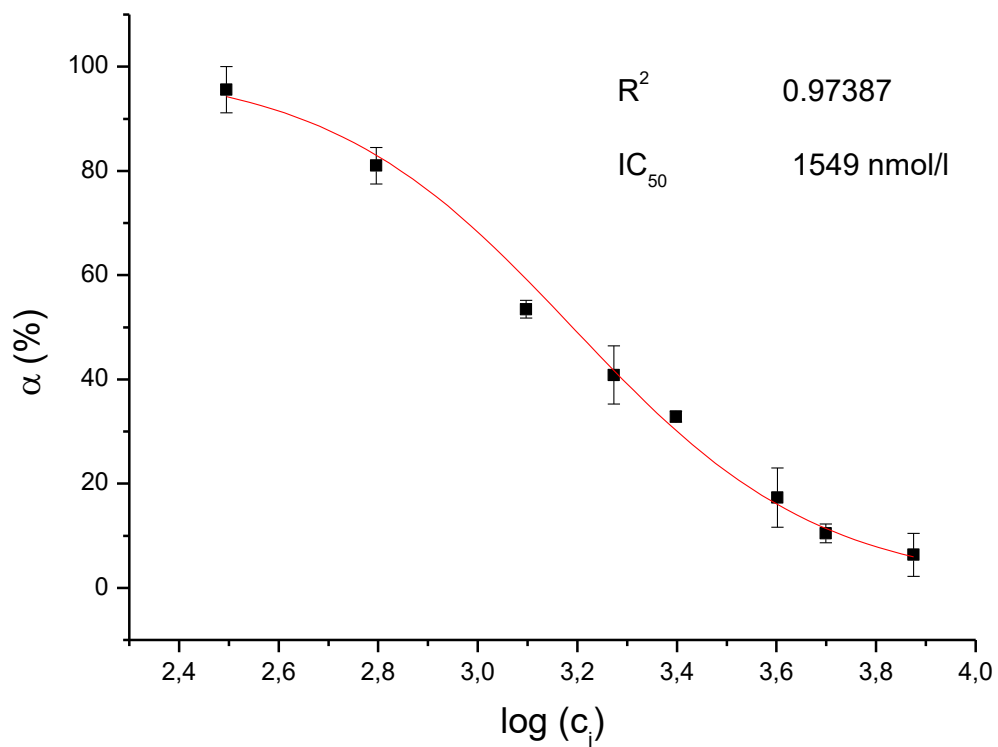
Graf 5: Inhibiční křivka acetylcholinesterasa – karbofuran



Graf 6: Inhibiční křivka acetylcholinesterasa – fysostigmin



Graf 7: Inhibiční křivka butyrylcholinesterasa – karbofuran



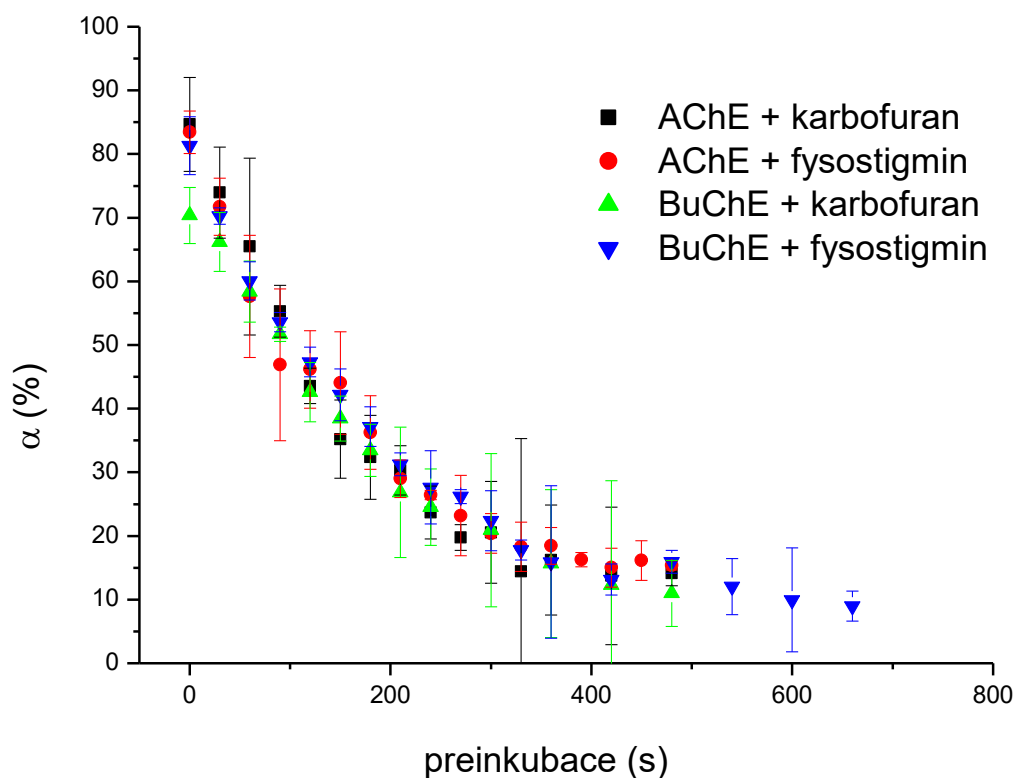
Graf 8: Inhibiční křivka butyrylcholinesterasa – fysostigmin

V Graf 5, Graf 6, Graf 7 a Graf 8 jsou ukázány inhibiční křivky pro jednotlivé enzymy, které byly postupně vystavené oběma inhibitorům. Všechny výsledky byly vypracovány s použitím varianty modelu „dose – response“ v programu Origin 6.1.

Z dat je patrné následující:

- a) Butyrylcholinesterasa je k oběma inhibitorům odolnější. IC_{50} je o dva řády vyšší.
- b) Na Ach působí oba inhibitory téměř stejně. Rozdíl sice je 20 % (karbofuran je silnějším inhibitorem), nicméně jde o 15 nmol/l. Rozdíl to tedy není nijak výrazný. U BChE se inhibitory svým efektem liší daleko více. Zatímco koncentrace fysostigminu pro dosažení IC_{50} byla 1549 nmol/l, koncentrace karbofuranu bylo zapotřebí 3480 nmol/l. Fysostigmin je tedy více než 2x silnější inhibitor BChE oproti karbofuranu.

4) Srovnání rychlosti vazby inhibitorů

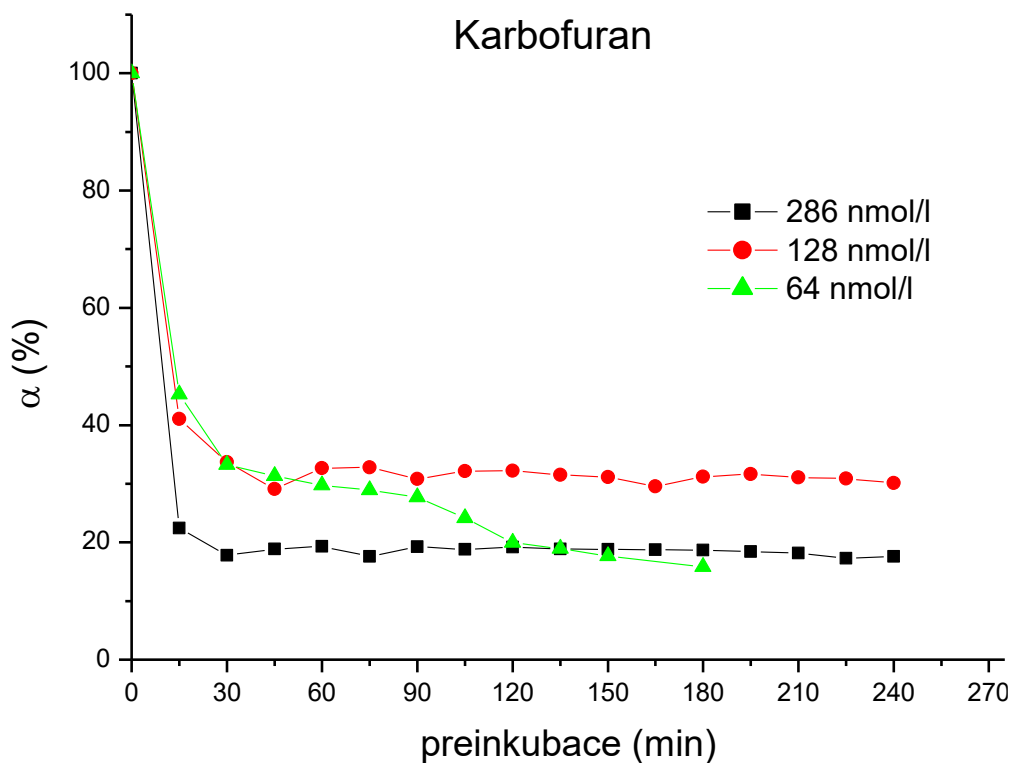


Graf 9: Souhrnný pohled na časový průběh vazby inhibitorů na enzymy

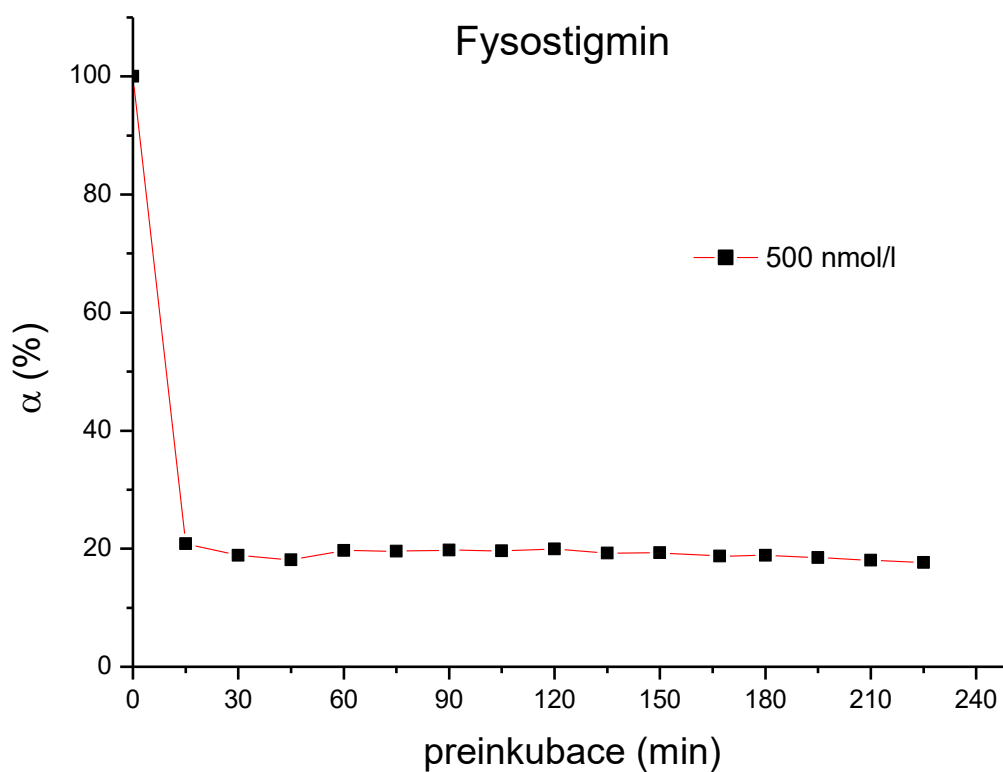
Zjistili jsme, že se všechny inhibitory, nezávisle na inhibovaném enzymu, váží v podstatě stejnou rychlostí. K dosažení zbytkové aktivity enzymů cca 15 % došlo již po 7 minutách. (viz Graf 9)

Potvrzuje to fakt, že hlavním funkčním prvkem obou inhibitorů je tatáž, tj. *N*-methylkarbamoylová skupina. [18, 20]

5) Potvrzení *in vitro*, že karbamáty jsou pseudoreversibilními inhibitory.



Graf 10: Sledování dekarbamoylace AChE po inhibici karbofuranem



Graf 11: Sledování dekarbamoylace AChE po inhibici fysostigminem

Testován byl efekt karbofuranu a fysostigminu na AChE. Nicméně nepodařilo se prokázat návratnost aktivity enzymu, i když pozorování trvalo po dobu, během které se již podle některých autorů měla aktivita obnovit. [33]

Podobně se podle literatury chová BChE, která sice námi testovaná nebyla, ale například při použití fenserinu byla zjištěna počínající obnova aktivity již kolem 60. minuty. Analýza sice probíhala v systému HPLC, nicméně neprobíhala tak, že BChE byla plně inhibována nadbytkem inhibitoru, který byl pak z mobilní fáze odstraněn. Také byly použity koncentrace, které inhibují enzym z méně jak 90 %. [34]

Zbytková aktivita vzorků odpovídá koncentracím vyznačeným v Graf 5, který ukazuje vliv karbofuranu na aktivitu acetylcholinesterasy ve vzorku (aktivita je cca 20 % u koncentrace 286nmol/l (a), 30–35 % u 128nmol/l (b)). Kolem těchto hodnot se zbytkové aktivity pohybovaly po téměř celou dobu sledování bez výrazných změn. Žádná výrazná obnova aktivity pozorována nebyla. (viz Graf 10)

Stejný průběh byl pozorován u fysostigminu. Vyznačená aktivita při vybrané koncentraci (viz Graf 6) rovněž jako u karbofuranu přibližně odpovídá zbytkové aktivitě, která během sledování stagnovala. (viz Graf 11)

Výjimku tvořil vzorek obsahující karbofuran o koncentraci 64 nmol/l, u něhož v čase došlo k prohloubení jeho inhibičního efektu (viz Graf 10 a pozvolný pokles od 60. minuty, a to až o 20 %, bez delšího viditelného ustálení).

Závěr

V této práci jsme se zabývali charakteristikou úhoří acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy z koňského séra.

Úspěšně jsme určili K_m vzhledem k jejich substrátům. Ukázalo se, že butyrylcholinesterasa vykazuje ke svému substrátu vyšší afinitu.

Také jsme určili IC_{50} pro fysostigmin a karbofuran. Podstatně odolnější k oběma inhibitorům se jeví butyrylcholinesterasa, u které jsme zjistili IC_{50} vyšší o dva řády u obou inhibitorů. ($20\times$ u fysostigminu a bez mála $60\times$ u karbofuranu)

Vizualizovali jsme pokles aktivity obou enzymů vzhledem k délce expozice inhibitorům. Nepřímo jsme tak odhadli přibližnou dobu potřebnou k maximální inhibici.

Sledování dekarbamoylace acetylcholinesterasy nepřineslo očekávané výsledky. Bude spolu s butyrylcholinesterasou podrobena dalšímu zkoumání.

Citovaná literatura

1. TAYLOR, P. The Cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **1991**, 7, 4025-4028.
2. HAWKINS, R. D.; GUNTER, J. M. Studies in cholinesterase; 5. The Selective Inhibition of Pseudo-cholinesterase in vivo. *Biochem. J.* **1946**, 2, 192-197.
3. RACEK, J. et al. *Klinická biochemie*. 2. vyd., Galén, Praha 2006.
ISBN 80-7262-324-9
4. ROCHE DIAGNOSTICS. [Online] [Citace: 25. 7 2017.] Dokumentace k soupravě pro stanovení cholinesteras na analyzátorech Cobas (2/2017). https://pim-eservices.roche.com/eLD_SF/cz/cs/Documents/GetDocument?documentId=9d41a7dd-feec-e611-3ea1-00215a9b3428&referrer=Dialog.
5. ZIMA, T. et al. *Laboratorní diagnostika*. 3. vyd., Galén, Praha 2013.
ISBN 9789074920622
6. POHANKA, M. Photography by Cameras Integrated in Smartphones as a Tool for Analytical Chemistry Represented by an Butyrylcholinesterase Activity Assay. *Sensors*. **2015**, 15, 13752-12762.
7. ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ, J.; KUČA, K.; JUN, D.; BAJGAR, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivity cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chem. Listy*. **2010**, 104, 46-50.
8. ELLMAN, G. L. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, 2, 88-95.
9. COLLETIER, J.F.; FOURNIER, D.; GREENBLATT, H. M.; STOJAN, J.; SUSSMAN, J. L.; ZACCAI, G.; SILMAN, I.; WEIK, M.; Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J.* **2006**, 25, 2746-2756.
10. SHAFFERMAN, A.; VELAN, B.; ORDENTLICH, A.; KRONMAN, CH.; GROSFELD, H.; LEITNER, M.; COHEN, S.; BARAK, D.; ARIEL, N. Substrate inhibition of acetylcholinesterase: residues affecting signal transduction from the surface to the center. *EMBO J.* **1992**, 10, 3561-3568.
11. POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **2011**, 155, 219-230.

12. POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Brat. Lek. listy*. **2013**, *114*, 726-734.
13. MESULAM, M.-M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. **2002**, *4*, 627-639.
14. REID, G. A.; CHILUKURI, N.; DARVESH, S.; Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Neuroscience*. **2013**, *234*, 53-68.
15. WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*. **1980**, *35*, 174-197
16. LOCKRIDGE, O. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol. Ther.* **2015**, (148), 34-46.
17. BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N.; DNA Mutation Associated with the Human Butyrylcholinesterase K-Variant and Its Linkage to the Atypical Variant Mutation and Other Polymorphic Sites. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *50*, 1086-1103.
18. LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. vyd. Grada, Praha 2002. ISBN 80-7169-976-4
19. *OPCW Fact-Finding Mission Confirms Use of Chemical Weapons in Khan Shaykhun on 4 April 2017*. [Online] [Citace: 22. 8 2017.]
<<https://www.opcw.org/news/article/opcw-fact-finding-mission-confirms-use-of-chemical-weapons-in-khan-shaykhun-on-4-april-2017/>>
20. DOLEŽAL, M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. 1. vyd. Karolinum, Praha 2009. ISBN 9788024616339
21. Conclusion on pesticide peer review regarding the risk assessment of the active substance carbofuran. *EFSA Scientific Report*. **2009**, *310*, 1-132.
22. SATAR, S.L.; SATAR S.R.; SEBE A.; YESILAGAG H. Carbofuran poisoning among farm workers. *Mount Sinai Journal of Medicine*. **2005**, *6*, 389-392
23. VERMOUZEK, Z.; MRLÍK, V. *Databáze případů otrav karbofuranem u zvířat*. [Online] [Citace: 17. 8 2017.] <<http://karbofuran.cz/db.php?f>>

24. KODÍČEK, M.; VALENTOVÁ, O.; HYNEK, R. *Biochemie - Chemický pohled na biologický svět*. VŠChT Praha, Praha 2015. ISBN 978-80-7080-927-3.
25. MASSON, P.; NACHON, F.; BARTELS, C.F.; FROMENT, M.T.; RIBES, F.; MATTHEWS, C.; LOCKRIDGE, O. High activity of human butyrylcholinesterase at low pH in the presence of excess butyrylthiocholine. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 315-324.
26. ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *1*, 70-77
27. EYER, P.; WOREK, F.; KIDERLEN, D.; SINKO, G.; STUGLIN, A.; SIMEON-RUDOLF, V.; REINER, E.. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent : reassessment. *Anal. Biochem.* **2003**, *2*, 224-227.
28. WOREK, F.; MAST, U.; KIDERLEN, D.; DIEPOLD, CH.; EYER, P. Improved determination of acetylcholinesterase in human whole blood. *Clin. Chim. Acta.* **1999**, *1-2*, 73-90.
29. DRTINOVÁ, L. *In vitro reaktivace cholinesteras inhibovaných pesticidy*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2010.
30. DROBNÍK, O. *Kolorimetrická metoda založená na imobilizované acetylcholinesterase pro stanovení účinnosti inhibitorů používaných v terapii*. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
31. VAVROŠOVÁ, P. *Modulace aktivity acetylcholinesterasy vybranými organickými látkami*. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2013.
32. BARTERI, M.; PALA, A.; ROTELLA, S. Structural and kinetic effects of mobile phone microwaves on acetylcholinesterase activity. *Biophys. Chem.* **2005**, *113*, 245-253.
33. HERKERT, N. M.; ECKERT, S.; EYER, P.; BUMM, R.; WEBER, G.; THIERMANN, H.; WOREK, F. Identical kinetics of human erythrocyte and muscle acetylcholinesterase with respect to carbamate and spontaneous reactivation after withdrawal of the inhibitors. *Toxicology.* **2008**, *2-3*, 188-192.

34. BARTOLINI, M.; GRIEG, N. H.; YU, Q.-S.; ANDRISANO, V. Immobilized butyrylcholinesterase in the characterization of new inhibitors that could ease Alzheimer's disease. *J. Chromatogr. A.* **2009**, *13*, 2730-2738.