

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chémie a farmaceutickej analýzy

Enzýmové testy s viazanou cholínesterázou
k charakterizácií liečiv Alzheimerovej choroby

Diplomová práca
Miriama Dulinová

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.
Školiteľ špecialista: pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.
Hradec Králové 2018

„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 nebyl použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 9.10.2017

Miriama Dulinová

Děkuji ppkl. prof. RNDr. Miroslavovi Pohankovi, Ph.D., DsC. a prof. PharmDr. Martinovi Doležalovi, Ph.D. za odbornou pomoc a ochotu při řešení mé diplomové práce.

Děkuji celé své rodině a přátelům za jejich podporu.

Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Abstract.....	7
3. Zoznam použitých skratiek	8
4. Zoznam obrázkov a tabuliek.....	9
5. Úvod a cieľ práce.....	11
6. Teoretická časť	12
6.1 Cholinesterázy.....	12
6.1.1 Acetylcholinesteráza.....	12
6.1.1.1 Výskyt AChE v organizme.....	12
6.1.1.2 Štruktúra AChE.....	12
6.2 Inhibítory AChE (iAChE).....	13
6.2.1 Farmakokinetika iAChE.....	15
6.2.2 Farmakodynamika iAChE.....	15
6.3 Ďalšie látky s inhibičným potencióalom.....	16
6.4 Metódy používané na stanovenie aktivity AChE.....	17
6.5 Metódy imobilizácie AChE.....	21
6.5.1 Želatína ako membrána.....	24
6.5.2 Sieťovacie činidlá.....	25
7. Experimentálna časť.....	27
7.1 Použité chemikálie a prístrojové vybavenie.....	27
7.2. Metodika.....	29
7.2.1 Stanovenie aktivity acetylcholinesterázy.....	29
7.2.2 Meranie inhibičnej aktivity jednotlivých inhibítorov.....	29
7.2.3 Meranie aktivity inhibítorov za použitia membrán.....	30
8. Výsledky.....	32
8.1 Stanovenie aktivity acetylcholinesterázy.....	33
8.2 Meranie inhibičných potencióalov jednotlivých inhibítorov.....	34
8.2.1 Takrín.....	34
8.2.2 Donepezil.....	35
8.2.3 Galantamín.....	36
8.2.4 Kofeín.....	37
8.2.5 Epigalokatechín-galát ,teobromín, teofylín.....	38
8.3 Meranie aktivity jednotlivých inhibítorov za použitia membrán.....	38

8.3.1 Sušený enzým.....	38
8.3.2 Enzým zachytený v membráne.....	39
8.3.2.1 Enzým imobilizovaný do chitosanu.....	39
8.3.2.2 Enzým imobilizovaný v želatíne.....	39
9. Diskusia.....	42
10. Záver.....	46
11. Zoznam citovanej literatúry.....	48

1. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutickej chémie a kontroly liečiv

Vedúci práce: **prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.**

Školiteľ špecialista: **pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.**

Diplomant: **Miriama Dulinová**

Názov diplomovej práce: **Enzymové testy s viazanou cholinesterázou k charakterizácii liečiv Alzheimerovej choroby.**

Alzheimerova choroba je progresívne a ireverzibilné neurodegeneratívne ochorenie mozgu, ktoré je celosvetovo spájané s najčastejšou príčinou demencie. Patofyziológia ochorenia nie je zatiaľ úplne pochopená. Liečba tohto ochorenia je zatiaľ symptomatická a je reprezentovaná inhibítormi acetylcholinesterázy. Inhibítory acetylcholinesteráz sú v súčasnosti prakticky jediné účinné látky, ktoré zmiernujú dôsledky Alzheimerovej choroby.

V tejto práci sme sa venovali skúmaniu schopnosti inhibície už známych inhibítorov AChE (rivastigmín, donepezil, galantamín, takrín), u ktorých bola overená ich aktivita. Otestovali sme účinnosť inhibítorov s voľnou acetylcholinesterázou (referenčná metóda) a potom s imobilizovanou acetylcholinesterázou v čistej želatíne, ale aj s pridanými sieťovými činidlami (glutaraldehyd, EDC).

Pre náš experimentálny výskum sme využili spektrofotometrické stanovenie aktivít cholinesteráz, pomocou dobre známej Ellmanovej metódy. Absorbancia roztoku s AChE bola meraná pri vlnovej dĺžke 412 nm. Pre posúdenie účinnosti inhibítorov bol stanovený index IC_{50} .

Naším testovaním sme sa snažili poukázať na výhody imobilizácie AChE do želatíny. Cieľom bolo pripraviť enzým v imobilizovanej forme, ktorý sa dá prípadne použiť aj opakovane napr. po premytí.

Kľúčové slová: acetylcholinesteráza, inhibítory acetylcholinesterázy, Ellmanova metóda, Alzheimerova choroba, imobilizácia acetylcholinesterázy

2. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of: Pharmaceutical chemistry and drug control

Consultant: **prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.**

Supervisor specialist: **pplk. prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc.**

Student: **Miriama Dulinová**

Title of diploma Thesis: **Enzyme assays with bound cholinesterase to characterize drugs for Alzheimer's disease.**

Alzheimer's disease is a progressive and irreversible neurodegenerative brain disease, which is globally connected with the most common cause of dementia.

The pathophysiology of the disease is not yet fully understood. Treatment of this disease is for the time being only symptomatic and is represented by inhibitors of the acetylcholinesterase. The acetylcholinesterase inhibitors are at present practically the only active substances that mitigate the effects of the Alzheimer's disease.

In this thesis, we have investigated the ability to inhibit already known AChE inhibitors (rivastigmine, donepezil, galantamine, tacrine), that have been tested for their activity. We tested the effectiveness of the inhibitors with loose acetylcholinesterase (via the reference method) and subsequently with the immobilised acetylcholinesterase in clear gelatine, but also with added netted agents. (glutaraldehyd, EDC).

For the purposes of our experimental research we have utilized the spectrophotometric determination of activities of cholinesterases, with the aid of well known Ellman's method. The absorbance of the solution with AChE has been measured with the wavelength of 412 nm. The index IC₅₀ has been established to assess the efficiency of the inhibitors.

With our testing, we tried to advert the benefits of the immobilisation of AChE into gelatine. The goal of our research has been to prepare the enzyme in an immobilised format, which, if necessary, could be used repeatedly, for example: after washing.

Key terms: acetylcholinesterase, the inhibitors of acetylcholinesterase, Ellman's method, Alzheimer's disease, the immobilisation of acetylcholinesterase.

3. Zoznam použitých skratiek

Aβ	β - amyloid
AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesteráza
APP	amyloidový prekurzorový proteín
ATChCl	acetylthiocholín-chlorid
BSA	bovinný sérový albumín
BuChE	butyrylcholinesteráza
D-GlcN	<i>D</i> -glukosamín
D-GlcNAc	<i>N</i> -acetyl- <i>D</i> -glukosamín
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EGCG	epigalokatechín-galát
iAChE	inhibítory acetylcholinesterázy
IC₅₀	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia
iso-OMPA	tetraizopropylpyrofosforamid
K_M	Michaelisova konštanta
MTMOS	methyltrimethoxysilan
nAChR	nikotínový acetylcholinový receptor
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcnimid
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparágová kyselina
PAS	periférne anionické miesto AChE
TcAChE	acetylcholinesteráza izolovaná z <i>Torpedo californica</i>
TMOS	tetramethoxysilan
TNB⁻	5-merkaptó-2-nitrobenzoový anión
V_m	limitná rýchlosť enzymatickej reakcie

4. Zoznam obrázkov a tabuliek

Obrázok č.1: Aktívne miesto AChE (TcAChE; Proteínová databázová banka (PDB): 1EVE).

Obrázok č.2: (1) takrín, (2) donepezil, (3) rivastigmín, (4) galantamín, (5) memantín

Obrázok č.3: Využitie cholínoxidázy na stanovenie aktivity cholinesteráz. Zobrazené je použitie chromogénneho substrátu reagujúceho so vznikajúcim peroxidom vodíka.

Obrázok č.4: Použitie 2,6-dichlorfenolindofenol acetátu.

Obrázok č.5: Hydrolyza indoxylacetátu cholinesterázou a následná spontánna oxidácia na indigo.

Obrázok č.6: Voltametrické stanovenie aktivity AChE, vďaka oxidácií cholínu vloženým napätím U.

Obrázok č. 7: Mechanizmus Ellmanovej metódy.

Obrázok č.8: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie ATChCl.

Obrázok č.9: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie takrínu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Obrázok č.10: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie donepezilu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Obrázok č.11: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie galantamínu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Obrázok č.12: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie kofeínu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Obrázok č.13: Chemická štruktúra epigalokatechín-galátu.

Obrázok č.14: Chemické štruktúry kofeínu, teofylínu a teobromínu.

Obrázok č.15: Chemická štruktúra EDC.

Obrázok č.16: Chemická štruktúra glutaraldehydu.

Obrázok č.17: Porovnanie výsledkov aktivity AChE v rôznych formách – sušený enzým, enzým imobilizovaný do želatíny, enzým imobilizovaný do želatíny s prídavkom EDC.

Obrázok č.18: Chemická štruktúra chitosanu.

Obrázok č. 19: Porovnanie inhibície enzýmu takrínom odlišnými metódami.

Tabuľka č.1: Zhrnutie farmakodynamických vlastností inhibítorov spomenutých v texte.

Tabuľka č.2: Namerané hodnoty IC_{50} pri jednotlivých inhibítoroch.

Tabuľka č.3: Namerané hodnoty absorbancie sušeného enzýmu.

Tabuľka č. 4: Výsledky absorbancie enzýmu imobilizovaného do želatíny.

5. Úvod a cieľ práce

Alzheimerova choroba (AD) je progresívna neurodegeneratívna porucha súvisiaca s vekom, ktorá spôsobuje fyzický a duševný úpadok. Patologicky bol AD charakterizovaný stratou cholinergných neurónov, extracelulárnou depozíciou proteínu β -amyloidu (A β) v dôsledku abnormálneho spracovania amyloidného prekursorového proteínu (APP), tvorby hyperfosforylovaného tau proteínu v intracelulárnom neurofibrilárnom spletení (NFT), gliózou a stratou neurónov. [1,2,3,4]

Cholinergné neuróny syntetizujú acetylcholín (ACh), ktorý hrá hlavnú úlohu vo vzdelávaní a pamäti. AD bola charakterizovaná stratou cholinergných neurónov v kortikálnej a hipokampálnej oblasti. Pri AD dochádza k poškodeniu syntézy AChE, čo vedie k zníženiu jeho množstva v synaptických štrbinách. Okrem toho bolo tiež hlásené, že AD ovplyvňuje funkciu serotonergných, glutamanergých dopaminergných a adrenergných neurónov. [5,6,7,8,9]

Acetylcholín je neurotransmitter, ktorý pôsobí ako agonista pre cholinergické receptory. Cholinergické receptory môžu byť klasifikované buď ako nikotínové receptory alebo muskarínové receptory. Nikotínové receptory sa nachádzajú v nervovosvalových spojeniach, autonómnych gangliách a centrálnom nervovom systéme (CNS), zatiaľ čo muskarínové receptory sú exprimované v mozgu a parasympatických efektorových orgánoch. [10,11]

Acetylcholín je štiepený acetylcholinesterázou, ktorej sa v tejto práci venujeme. Zamerali sme sa na enzýmové testy s viazanou cholinesterázou k charakterizácii liečiv AD. Chceli sme poukázať na výhody imobilizácie AChE do želatíny pri testovaní enzýmovej aktivity a zároveň stanovenia inhibičného potencionálu jednotlivých inhibítorov, ktoré sú používané a známe ako liečivá na AD.

6. Teoretická časť

6.1. Cholinesterázy

Cholinesteráza je enzým, ktorý katalyzuje hydrolýzu neurotransmiteru acetylcholínu na cholín a kyselinu octovú. Táto reakcia je potrebná k tomu, aby sa cholinergný neurón po aktivácii vrátil do pokojového stavu. V ľudskom tele dokážeme nájsť 2 typy cholinesteráz s rôznou funkciou: acetylcholinesterázu (AChE; E.C. 3.1.1.7.) a butyrylcholinesterázu (BuChE; E.C. 3.1.1.8), pre ktorú sa používajú aj pomenovania ako pseudocholinesteráza alebo nešpecifická cholinesteráza. Cholinesterázy sú z molekulárneho hľadiska podobné a boli dobre charakterizované z hľadiska ich vzťahov štruktúry a aktivity. Zatiaľ čo funkciu AChE vieme opísať, funkcia BChE nie je celkom pochopená. [12,13]

V tejto práci sa budeme venovať AChE, ktorá je terčom veľa toxických látok.

6.1.1. Acetylcholinesteráza

6.1.1.1. Výskyt AChE v organizme

AChE sa nachádza v rôznych tkanivách ako sú nervy, svaly, centrálny a periférny systém, motorické a senzorické vlákna, cholinergné a necholinergné vlákna. Je to molekula s nízkou molekulovou hmotnosťou. Jej funkcia a pôsobenie je v synaptickej štrbine, kde je zapojená do ukončenia nervovo-svalového prenosu na synapsiách. Acetylcholinesteráza sa nachádza rovnako aj na membránach červených krviniek, kde tvorí antigén skupiny Yt. [12,14]

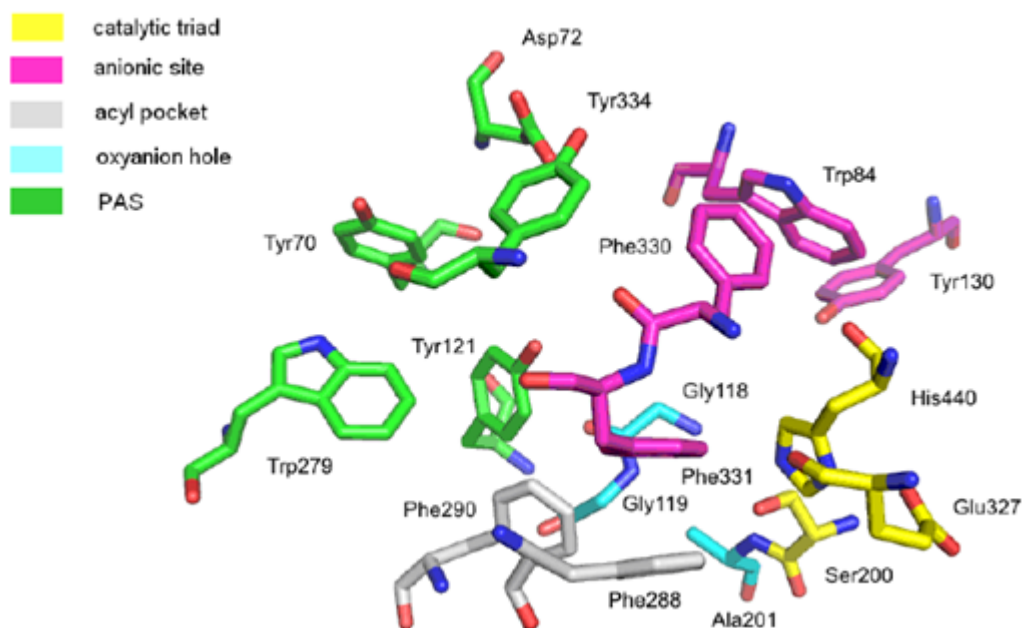
6.1.1.2. Štruktúra AChE

Štruktúra AChE bola prvýkrát popísaná v roku 1991 J. Sussmanom, ktorý úspešne vykryštalizoval enzým z elektrického lúča, *Torpedo californica* (TcAChE). AChE pozostáva z 537 aminokyselín, má tvar elipsy a je zložená z α/β polypeptidových reťazcov, to je 12 centrálne spletených β -skladaných listov, ktoré sú obklopené 14 α -helixovými štruktúrami.

Reakcia hydrolýzy prebieha v katalytickom mieste AChE, ktoré sa nachádza na dne hlbokaj a úzkej rokliny (20 Å hlboká, 5 Å široká), ktorá sa skladá z aromatických aminokyselín. Toto najdôležitejšie miesto, nazývané aj estetické miesto, obsahuje tri

esenciálne aminokyseliny: Ser200, His440 a Glu327, ktoré spolu vytvárajú katalytický trojuholník. Sú zapojené do prenosu acetylovej skupiny z acetylcholínu na Ser200.

Podstatnú úlohu v procese hydrolýzy zohráva aj anionické miesto AChE, zložené z Trp84, Tyr130, Phe330 a Phe331, ktoré je zodpovedné za väzbu kvartérnej amóniovej skupiny a π -interakcie aromatických skupín.



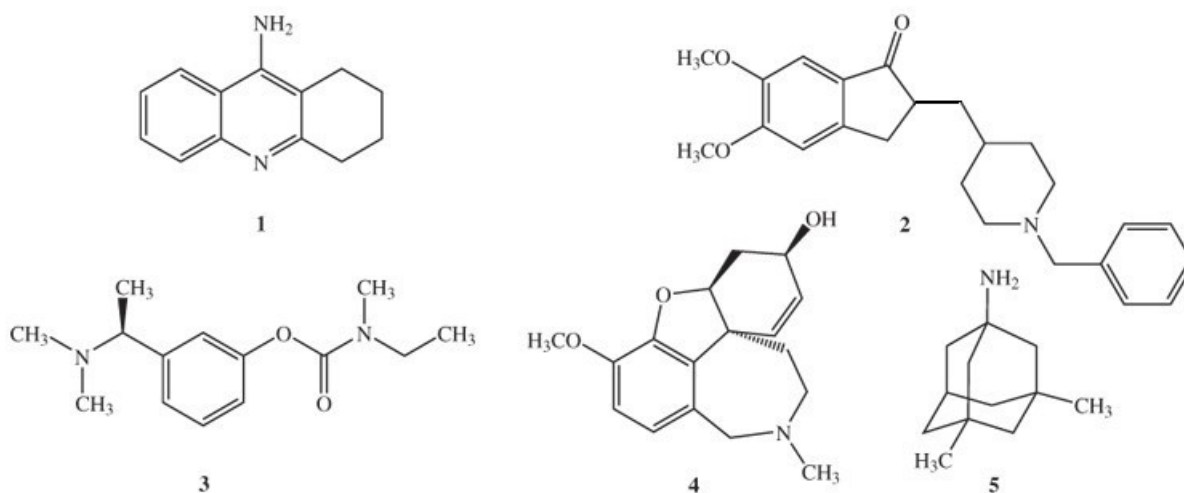
Obrázok č.1: Aktívne miesto AChE (TcAChE; Proteínová databázová banka (PDB): 1EVE). [15]

Ďalšou dôležitou časťou AChE je oxyaniónový otvor, acylová kapsa a periférne anionické miesto. Oxyaniónový otvor je komplex vytvorený a stabilizovaný Gly118, Gly119 a Ala201 z AChE. Acylová kapsa je zodpovedná za substrátovú špecifickosť. Tvar acylovej kapsy je stanovený dvoma zvyškami: to sú aromatické aminokyseliny Phe288 a Phe290 v TcAChE. Phe288 a Phe290 zabraňujú prístupu väčších molekúl do katalytického centra. Periférne anionické miesto AChE (PAS) pozostáva z piatich aminokyselín: Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 a Tyr334. PAS sa nachádza pri vstupe do aktívnej rokliny a zodpovedá za ďalšie aktivity, vrátane interakcie s β -amyloidom. PAS je veľmi dôležitý štrukturálny prvok, zodpovedný za viazanie mnohých inhibítorov. [15]

6.2. Inhibítory AChE (iAChE)

Inhibítory AChE sú neurotoxické zlúčeniny, ktoré inhibujú hydrolyzu acetylcholínu v synaptickej štrbine a tým sa zvyšuje množstvo synaptického acetylcholínu dostupného pre stimuláciu nikotínových a muskarínových cholinergných receptorov v centrálnej aj periférnej nervovej sústave. Centrálna inhibícia je potrebná na zlepšenie kognitívnych funkcií, zatiaľ čo periférna blokáda je zodpovedná za ich bežné vedľajšie účinky závislé od dávky. Inhibítory cholinesteráz sa stali dôležitou súčasťou liečby Alzheimerovej choroby (AD), pri ktorej dochádza k degeneratívnym zmenám v cholinergickom systéme. AD pacienti strácajú svoju pamäť a ich kognitívne schopnosti, čo je spôsobené smrťou nervových buniek zodpovedných za uchovávanie a spracovávanie informácií. Ďalšie zlúčeniny, ktoré vykazujú inhibičný účinok na cholinesterázy sa používajú na liečbu chorôb ako je senilná demencia, myastenia gravis, Parkinsonova choroba alebo ataxia. [16,17]

V súčasnosti boli schválené inhibítory ako galantamín, rivastigín, donepezil a z N-metyl-D-aspartátovej (NMDA) antagonistickej skupiny memantín. Ukázalo sa však, že cholinesterázy môžu ovplyvniť aj sériu iných procesov, ako je agregácia β -amyloidu, vďaka prítomnosti periférneho aniónového miesta (PAS) vo svojej molekulovej štruktúre. Známym inhibítorom je aj takrín, ktorý bol odstránený kvôli jeho hepatotoxicite, ale stále sa používa v pokusoch ako referenčný inhibítor. [15]



Obrázok č.2: (1) takrín, (2) donepezil, (3) rivastigín, (4) galantamín, (5) memantín.

Ďalšie látky, ktoré majú schopnosť inhibovať cholinesterázy sú napr. zlúčeniny organického fosforu, karbamátové zlúčeniny, niektoré sekundárne metabolity rastlín (alkaloidy: α -chakonín, α -solanín, tomatín, berberin, palmatín). Zlúčeniny organického

fosforu sú ireverzibilné inhibítory ako AChE, tak aj BChE. Viazu sa na aktívne miesto cholinesteráz a ľahko prekročia hematoencefalickú bariéru. Patrí sem napríklad sarín, somán, tabun a niektoré vysoko toxické zlúčeniny, ktoré sa predtým používali ako pesticídy (paraoxón, malaoxon). Jedinou výnimkou je tetraizopropylpyrofosforamid (iso-OMPA), ktorý je odlišný od ostatných inhibítorov. Neprestupuje do aktívneho miesta AChE a inhibuje len BChE.

Inhibítory karbamátu sa viažu na aktívne miesto oboch cholinesteráz, avšak kovalentná väzba nie je stabilná a karbamátová skupina je po určitom čase hydrolyticky rozdelená. Mechanizmus viazania sa na karbamát sa niekedy nazýva pseudo-ireverzibilný. Veľa karbamátov neprechádza cez hematoencefalickú bariéru. [18]

6.2.1. Farmakokinetika iAChE

Donepezil a galantamín sa metabolizujú v pečeni enzýmami cytochrómom P450 2D6 (CYP2D6) a CYP3A4. Podstupujú rozsiahly first-pass metabolizmus. Z hlavných metabolitov donepezilu má produkt CYP2D6 rovnakú farmakologickú aktivitu ako pôvodná zlúčenina, zatiaľ čo metabolit CYP3A4 je neaktívny. Hlavný metabolit CYP2D6 galantamínu je trikrát silnejší ako pôvodná zlúčenina a môže predstavovať až 20% perorálne podanej dávky. Na rozdiel od donepezilu a galantamínu, rivastigmín nepodlieha hepatálnej mikrozomálnej oxidácii enzýmami CYP. Namiesto toho sa rýchlo, extenzívne metabolizuje v sére a rýchlo sa eliminuje obličkami. [19]

6.2.2. Farmakodynamika iAChE

Galantamín je kompetitívny inhibítor AChE a alosterický modulátor nAChR. Donepezil je nekompetitívny inhibítor AChE. Oba inhibítory sú krátkodobo pôsobiace, ktoré sa reverzibilne viažu na cholinesterázy. Na rozdiel od toho sa rivastigmín aktívne metabolizuje cholinesterázami, čo spôsobuje, že je to medziproduktový alebo pseudo-ireverzibilný inhibítor. Všetky tri lieky majú afinitu pre AChE aj BChE, donepezil a galantamín selektívne inhibujú AChE vo väčšom rozsahu ako BChE, rivastigmín má rovnakú afinitu k obojmu a ľahko prechádza hematoencefalickou bariérou. Pomalá eliminácia rivastigmínu z dôvodu kovalentnej väzby v aktívnom mieste enzýmu je výhodou oproti iným liečivám. Účinok rivastigmínu môže trvať tak dlho, kým sa rivastigmínová skupina spontánne rozštiepi dekarboxylačným procesom z aktívneho miesta cholinesterázy. [19]

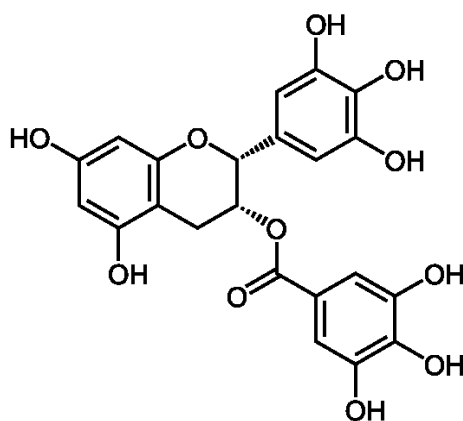
Tabuľka č.1: Zhrnutie farmakodynamických vlastností inhibítorov spomenutých v texte

Mechanizmus	Enzýmy	Inibítory
Ireversibilný	AChE, BChE	sarín, somán, tabun
Pseudoreversibilný	AChE, BChE	Rivastigmín
reversibilný, kompetitívny	AChE	Galantamín
reversibilny, nekompetitívny	AChE, BChE	Takrín
reversibilný, nekompetitívny	AChE	Donepezil

6.3. Ďalšie látky s inhibičným potencióalom

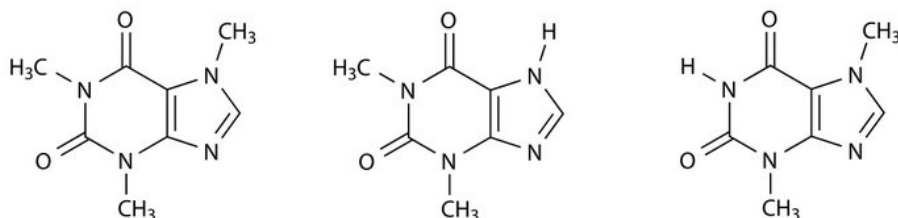
Okrem už známych a schválených inhibítorov na liečbu AD, boli otestované v rôznych štúdiách aj ďalšie látky, ktoré vykazovali inhibičný potenciál voči AChE. Patrí sem napr. EGCG alebo purínový alkaloid kofeín.

Epigalokatechín-galát je komplexná molekula tvorená štruktúrou flavonolového jadra s galokatecholovou skupinou a galátovým esterom. Tieto dva galokatecholové krúžky poskytujú silné antioxidačné a chelatačné vlastnosti EGCG. Každý z galokatecholových krúžkov je schopný priamo zachytiť voľné radikály z prostredia s vysokou účinnosťou. Zdá sa že táto zlúčenina bráni a je tiež užitočná pri liečbe mnohých ochorení, ako je rakovina a kardiovaskulárne a neurodegeneratívne choroby. Hematoencefalická bariéra je pre EGCG priepustná. V literatúre sa opisuje, že EGCG je účinnejší pri odstraňovaní radikálov ako vitamíny C a E, pričom jeho schopnosť chelatacie železa je užitočná na významné zlepšenie symptómov týchto neurodegeneratívnych ochorení. V neurónových bunkách tento katechín podporuje odpovede na prežitie buniek a inhibíciu signálov bunkovej smrti, čo vedie k zvýšeniu neuronálneho zdravia. Modifikácie v bunkovej signalizácii tiež podporujú neamyloidnú dráhu α -sekretázy, čím sa znižuje tvorba A β -amyloidových peptidov. Viaceré výskumné štúdie potvrdzujú, že EGCG má neuroprotektívne vlastnosti u ľudí, čo podporuje zvýšenie stupňa poznávania po orálnom podaní. Tieto štúdie tiež potvrdzujú, že EGCG indukuje celkové zvýšenie cerebrálnej aktivity a pokoja. [20]



Obrázok č.13: Chemická štruktúra epigalokatechín-galátu.

Kofeín je alkaloid so stimulujúcim účinkom v tele. Kofeín sa nachádza v kávových zrnách *Coffea arabica*, *C. canephora* a niektorých iných rastlinách *Coffea*. Je známe, že je tiež v čajových listoch *Camellia sinensis*. Ľudia zvyčajne prijímajú kofeín z kávy, čaju, energie a nápojov s kolou. Okrem prítomnosti v nápojoch sa kofeín používa ako stimulujúci doplnok a lekárske stimulant v kombinácii s inými zlúčeninami [31,32]. Môže zasahovať prenosy na báze acetylcholínu, epinefrínu, norepinefrínu, serotonínu, glutamátu a dopamínu. Klinické štúdie dokazujú, že môže byť zapojený do spomalenia patológie Alzheimerovej choroby a niektorých ďalších účinkov. Kofeín môže pôsobiť ako nekompetitívny inhibítor AChE v tele. [13]



Obrázok č.14: Chemické štruktúry kofeínu, teofylínu a teobromínu.

6.4. Metódy požívané na stanovenie aktivity AChE

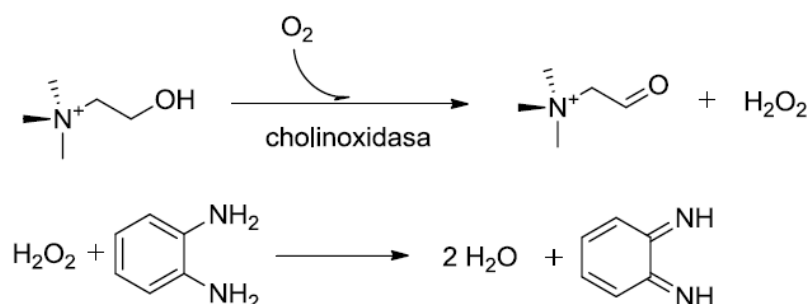
Cholinesterázy vykazujú aryl acylamidoázovu, esterázovú a thioesterázovú aktivitu. Aryl acylamidázová aktivita cholinesteráz sa využíva pri stanovení založenom na *o*-nitroacetanilidu ako chromogénnom substráte poskytujúcim po hydrolýze farebný *o*-nitroanilín.

Prevažujúce trendy v konštrukcii biosenzorov sú však zamerané na využitie buď fluorogénnych, alebo voltametricky aktívnych substrátov cholinesteráz. Fluorogénne

substráty môžu byť vhodne použité ku konštrukcii optických biosenzorov s prístrojovou alebo vizuálnou detekciou prítomnosti inhibítorov cholinesteráz. [21]

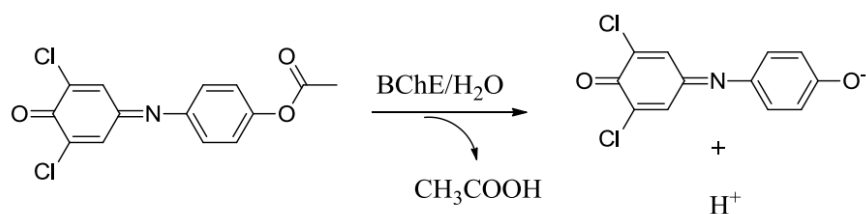
Metódy sledovania aktivity cholinesteráz vhodné pre diagnostiku:

- **Titráciou kyseliny vytvorenej hydrolyzou.** Sledovanie zvyšovania acidity média vďaka uvoľňovaniu kyseliny octovej z acetylcholínu. Na meranie použijeme pH indikačné činidlo alebo uskutočníme reakciu na tenkej pH indikujúcej vrstve dostatočnej na posúdenie aktivity či stanovenie prítomnosti inhibítora. Ďalšou možnosťou je kolorimetrická alebo potenciometrická titrácia. [22]
- **Chemiluminiscenčný postup na meranie acetylcholínu.** Oxidácia cholínu na betain cholínoxidázou s následným stanovením peroxidu vodíka (Obrázok č.3). Množstvo vznikajúceho peroxidu vodíku môžeme zmerať pomocou luminiscenčnej spektrofotometrie použitím napr. *o*-fenyldiaminu, 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinu, či vhodnou voltametrickou metódou. [23,24]



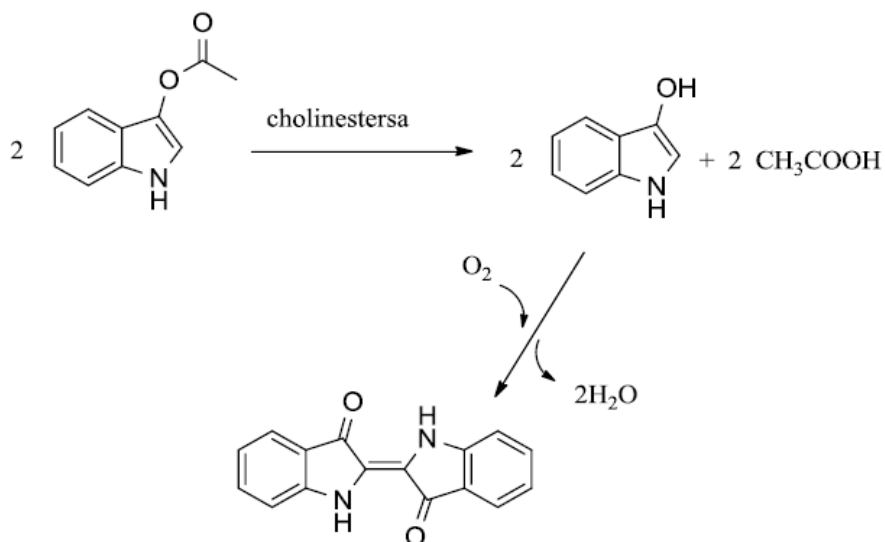
Obrázok č. 3: Využitie cholínoxidázy na stanovenie kativity cholinesteráz. Zobrazené je použitie chromogénneho substrátu reagujúceho so vznikajúcim peroxidom vodíka.

- **Použitie 2,6-dichlorfenolindofenol-acetátu.**



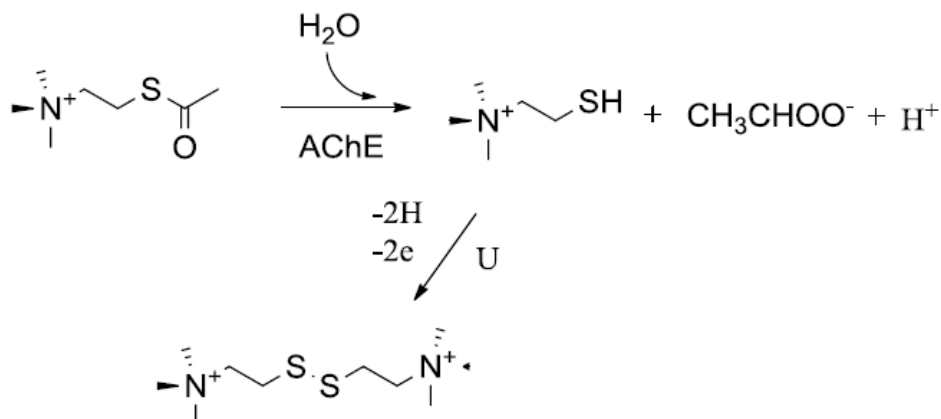
Obrázok č.4: Použitie 2,6-dichlorfenolindofenol-acetátu.

- **Použitie indoxyl-acetátu.** Indoxyl-acetát po štiepení AChE prechádza nasledujúcou spontánnou oxidáciou na modré indigo (Obrázok č.5). Výsledné zafarbenie roztoku alebo tenkej vrstvy roztoku na matrici môžeme hodnotiť vizuálne alebo inštrumentálne. [25]



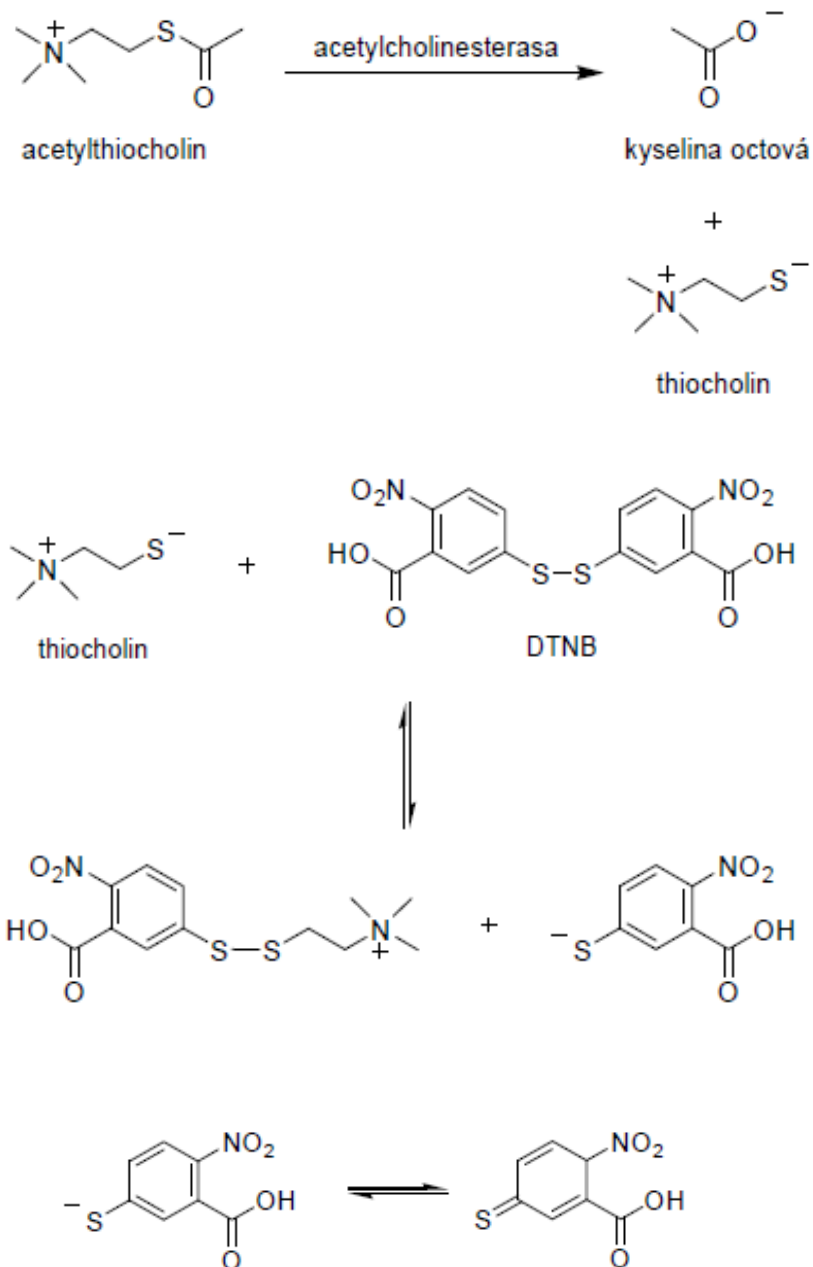
Obrázok č.5: hydrolyza indoxyl-acetátu cholinesterázou a následná spontánna oxidácia na indigo.

- **Analógmi acetylcholínu.** Použitie acetylthiocholínu ako substrátu s následnou elektrochemickou detekciou a to priamej ampérometrickej detekcii thiocholínu. Thiocholín je možné oxidovať vloženým napätím na dithiolovú formu, pričom prúdová odozva je úmerná koncentrácií thiocholínu (Obrázok č.6). Výhoda pri tejto metóde je použitie iba jedného enzýmu na zostavenie biosenzoru a detekčný potenciál je nižší ako napr. pri stanovení peroxidu vodíka. Obvykle sa používa 410 mV proti Ag/AgCl referenčnej elektróde. [26]



Obrázok č.6: Voltametrické stanovenie aktivity AChE, vďaka oxidáciám cholínu vloženým napätím U.

- Ellmanova reakcia** Najpoužívanejšia metóda na stanovenie aktivity AChE. Môže sa tiež použiť na overenie účinnosti liečby, napríklad pri liečbe Alzheimerovou chorobou. Veľmi citlivá kolorimetrická metóda, ktorej princíp je založený na hydrolýze thiocholínu. Po enzýmovej hydrolýze substrátu je uvoľnená príslušná kyselina a thiocholín. Thiocholín, ktorý obsahuje vo svojej molekule skupinu SH je detegovaný pomocou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB, Ellmanovo činidlo) tým, že po reakcií s thiocholínom dochádza k uvoľneniu žltu sfarbeného produktu v podobe 5-merkpto-2-nitrobenzoového aniónu (TNB⁻). Tento anión je potom detegovaný spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 412nm, čo je maximálny absorpčný koeficient. Mechanizmus chemickej reakcie je zobrazený na obrázku č.7. Nevýhodou pri tejto metóde je citlivosť DTNB, ktorá je tak citlivá na svetlo, že normálne laboratórne osvetlenie denného svetla významne zníži výt'azok farieb, ak sa použije inkubácia dlhšia ako niekoľko minút, alebo ak sa skúmavky nezachytia počas čakania na meranie absorbancie. [27,28,29,30]



Obrázok č. 7: Mechanizmus Ellmanovej metódy.

6.5. Metódy imobilizace AChE

Cholínesterázy sú globulárne proteíny s relatívne dobrou stabilitou. Zachytenie cholínesteráz na fyzikálne-chemický prevodník môže byť uskutočňované rôznymi spôsobmi. Dobré opísané sú sorpcia, mechanické zachytenie do membrán a kovalentná imobilizácia. Cholínesterázy sa však od ostatných biosenzorov líšia tým, že môžu byť trvale inhibované a teda slúžia iba ako jednorazový indikátor. [21]

Biosenzory sa skladajú z troch komponentov: prvý je prírodného pôvodu, tzv. biorekogničný element. Tým môže byť enzým, protilátka, organela a iné. Druhou komponentov je fyzikálne-chemický prevodník a treťou komponentov je detektor. Dôležitou podmienkou toho, aby analytické zariadenie bolo považované za biosenzor je spojenie fyzikálne-chemického prevodníka s biorekogničným elementom. Základným predpokladom vzniku funkčného biosenzoru je zvládnutý imobilizačný postup. Ako vlastná charakteristika úspešnosti imobilizačného postupu v prípade biosenzorov obsahujúcich enzým ako biorekogničný element je porovnanie aktivity vnesenej na senzor so zdanlivou aktivitou poskytnutou biosenzorom. Pri hodnotení je dôležité zobrať do úvahy fakt, že substrát môže ťažšie penetrovať vzniknutou membránou na povrch biosenzoru. [33]

Nenáročné postupy môžu byť paradoxne vhodnejšie ku konštrukcii biosenzorov, než využitie trendových metód. Komplexné porovnanie jednoduchej sorpcie, precipitácie glutaraldehydom, zachytenie do želatínovej membrány, zachytenie na grafitové mikročastice a imobilizácia. metódou soľ-gél viedla ku konštatovaniu, že najšetrnejšie a najvhodnejšie pre konštrukciu biosenzorov je precipitácia glutaraldehydom. Druhým vhodným postupom potom bola prostá sorpcia na platinovú elektródu.

Predpokladaný význam biosenzorov s naviazanou cholinesterázou spočíva v rýchlej a lacnej analýze nervovo paralytických látok, ľahkému dokazovaniu prítomnosti pesticídov v životnom prostredí a analýze liekov, ktorých účinná látka pôsobí ako inhibítor cholinesteráz. Nervovo paralytické látky môžeme detegovať za využitia biosenzorov s cholinesterázami s nízkym limitom detekcie vďaka silnej afinite inhibítora k enzýmu. [21]

Pre konštrukciu kolorimetrických dôkazových materiálov sa využíva široká škála nosných matric a tomu odpovedá aj množstvo rôznych imobilizačných technológií. Obecnými požiadavkami na nosnú maticu sú hlavne: kompatibilita so vzorkom, to znamená, že vzorka nesmie maticu rozpúšťať, extrahovať zložky atď.. Ďalšími požiadavkami sú dostatočná veľká plocha pre styk so vzorkou, rýchly prístup analytu k rekogničným komponentom vďaka dostatočnej priepustnosti, hydrofilný charakter, chemická a tepelná stabilita, mechanická pevnosť, odolnosť voči mikrobiálnym rozkladom, nízka cena a pod.

V zásade môžeme nosné matrice rozdeliť do troch veľkých skupín:

- prírodné polyméry (polysacharidy, proteíny)

- syntetické polyméry (polystyrén, polyakryláty, hydroxylalkyl methakryláty, apod.)
- anorganické častice (minerály, aktívne uhlie, sklovité vlákna, porézne oxidy kovov).

Prírodné polyméry sú získavané z pomerne pestrej škály prírodných zdrojov (drevené vlákna, odpad z mikroorganizmov), typickými zástupcami tejto skupiny sú celulóza, prípadne papier, dextran alebo želatína. Určitou nevýhodou týchto látok je možnosť straty AChE vymývaním. Zo syntetických polymérov, resp. anorganických nosičov, sa najčastejšie využívajú PVC, polykarbonáty, polyester, polyuretán, keramika, do ktorých sa potom AChE zachycuje.[33]

- **Prostá sorpcia na povrch elektródy:** Je najjednoduchšou metódou fyzikálnej adsorpcie. Postup spočíva v sorpcii enzýmu na elektródu prostredníctvom slabých väzbových interakcií, ako sú napríklad Van der Waalsove sily alebo elektrostatické interakcie. Táto metóda nezahrňuje žiadnu kovalentnú väzbu, a preto majú biosenzory horšiu operačnú a skladovaciú stabilitu. [34]
- **Precipitácia vo forme monovrstvy glutaraldehydom:** Precipitácia glutaraldehydom je založená na kopolymerácií molekúl cholínesterázy medzi sebou a BSA (bovinný sérový albumín) prostredníctvom voľných aminoskupín. Ďalšou možnosťou je použitie nylonovej membrány, ktorú spojíme s cholínesterázou pomocou glutaraldehydu a BSA. [33]
- **Zachytenie do membrány tvorenej želatínou:** Želatína je veľmi často používaná na tvorbu enzýmových membrán. V tejto práci sme využili želatínu, ktorej príprava a postup je popísaný nižšie.
- **Zachytenie metódou sol'-gél:** Metóda je založená na zmiešanej kondenzácii tetramethoxysilanu (TMOS) a methyltrimethoxysilanu (MTMOS) v prítomnosti imobilizovaného enzýmu. [33]
- **Zachytenie na grafitové nanovlákná:** Pre imobilizáciu môžeme použiť napríklad karbonové nanovlákná funkcionizované karboxylovými skupinami. Vlákna sa zachytia do želatínovej membrány. Po zaschnutí sú voľné karboxylové skupiny aktivované *N*-hydroxysukcinimidem (NHS). [33]
- **Kovalentné naviazanie:** Kovalentné naviazanie môžeme previesť na nylonovú membránu. Nylon narežeme na kusy požadovanej veľkosti, ktorý je potom

hydrolyticky štiepený pomocou HCl. Voľné aminoskupiny uvoľnené pri hydrolytickom štiepení sú aktivované pomocou glutaraldehydu. [35]

6.5.1. Želatína a chitosan používané ako membrána

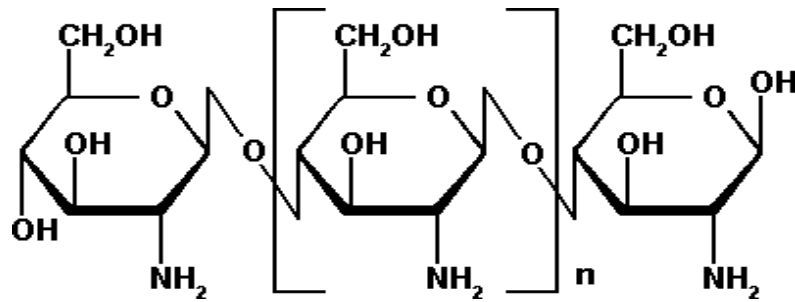
Želatína

Želatína je prirodzený hydrokoloid pochádzajúci z ošípaných, hovädzieho a rybacieho spojivového tkaniva, kože a kostí. Jej dopyt sa značne zvýšil pri aplikáciách, ako sú balenie potravín, membrány a riadené uvoľňovanie účinných látok. V skutočnosti želatína vykazuje funkčné vlastnosti, ako je schopnosť tvorby filmu a biologická odbúrateľnosť, vlastnosti, ktoré podporujú jej aplikáciu v potravinárskom a farmaceutickom priemysle. Avšak materiály na báze želatíny vykazujú určité nevýhody vzhľadom na ich hydrofilnú povahu, ktoré obmedzujú ich použitie. Zlepšenie vlastností sa môže dosiahnuť pomocou zosieťovania proteínov. Vyrábajú sa rôzne druhy želatíny s rôznymi fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami. [36 - 41]

Chitosan

Chitosan je prirodzený polysacharid, získaný z plášťov kôrovcov, zložený z D-GlcN a D-GlcNAc monomérov s β 1-4 väzbami. Aminové, hydroxylové a acetylové substituenty poskytujú miesta na chemické viazanie a modifikáciu. Pórovitá matrica polymerizovaných chitosanových fólií poskytuje ideálne prostredie pre imobilizáciu enzýmov a uľahčuje difúziu substrátu alebo inhibítorov. Imobilizácia enzýmov v biokompatibilnom prostredí, ktoré si zachová vodu ako základnú vrstvu, ako je chitosan, môže zlepšiť stabilitu enzýmov a poskytnúť ochranu pred škodlivým účinkom rozpúšťadiel.

Štúdie dokázali účinok rozpúšťadla a imobilizačnej matrice na účinnosť biosenzora AChE, ktorý bol vyrobený za použitia enzýmu zachyteného v chitosane a zosieťovaný s glutaraldehydom. Biosenzor na báze chitosanu si zachoval vysokú enzymatickú aktivitu v rôznych zmesiach vody a organických rozpúšťadiel s vodou miešateľnými a nemiešateľnými rozpúšťadlami a poskytol nízku hranicu detekcie na detekciu pesticídov. Biosenzor založený na AChE vykazuje vysokú odolnosť voči rozpúšťadlu použitím chitosanu ako imobilizačnej matrice enzýmu. [46,47,48]

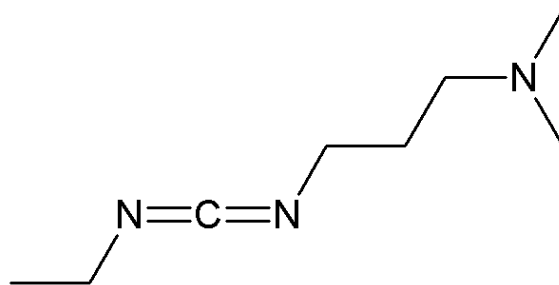


Obrázok č.18: Chemická štruktúra chitosanu.

6.5.2. Siet'ovacie činidlá

a) EDC

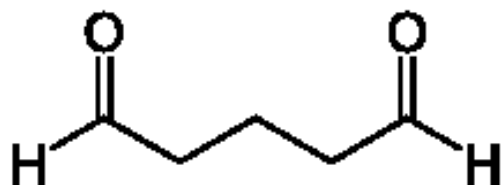
EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid) je vo vode rozpustný karbodiimid zvyčajne získaný ako hydrochlorid. Typicky sa používa v rozmedzí pH 4,0 až 6,0. Bežné použitia tohto karbodiimidu zahŕňajú syntézu peptidov, zosieťovanie proteínov na nukleové kyseliny, pri príprave imunokonjugátov, alebo na aktiváciu karboxylátových skupín na reakciu s inými molekulami obsahujúcimi amíny. EDC sa často používa v kombinácii s *N*-hydroxysukcinimidom (NHS) na imobilizáciu veľkých biomolekúl. [42,43]



Obrázok č.15: Chemická štruktúra EDC.

b) Glutaraldehyd

Glutaraldehyd (GTA) je vo vode rozpustná olejovitá kvapalina, obsahujúca dve aldehydové skupiny. Veľmi často sa používa ako výhodné zosieťovacie činidlo kvôli jeho nízkej cene, vysokej reaktivite a vysokej rozpustnosti vo vodnom roztoku. Rovnako sa používa ako dezinfekčný prostriedok na sterilizáciu zariadení citlivých na teplo a ako laboratórne činidlo, najmä ako fixačný prostriedok. [44,45]



Obrázok č.16: Chemická štruktúra glutaraldehydu.

7. Experimentálna časť

7.1. Použité chemikálie a prístrojové vybavenie

Základné chemikálie potrebné na stanovenie aktivity pomocou Ellmanovej metódy:

- Enzým acetylcholinesteráza z elektrického úhora: (AChE, EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich), enzým bol uchovávaný v mrazničke. V čase potreby rozmrazený a ihneď použitý k meraniu.
- Acetylthiocholín-chlorid: (ATChCl, Sigma-Aldrich), špecifický substrát pre stanovenie aktivity AChE. Uchovávaný v mrazničke a pripravený roztok v čase potreby v koncentrácií 100 mM ATChCl.
- Ellmanovo činidlo: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina), (DTNB, Sigma-Aldrich). Pripravovaný vždy v čase potreby a chránený pred svetlom (prostredníctvom slnečných lúčov dochádza k štiepeniu DTNB a vzniku TNB⁻, čo vnáša chybu do spektrofotometrického merania).
- Fosfátový pufer (PBS): koncentrácia 0,1 mol/l a pH 7,4. Uchovávaný v chladničke.

Ďalšie chemikálie, ktoré sme použili na imobilizáciu enzýmu:

- Želatína (Bio-Rad Laboratories)
- Chitosan (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová
- Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich)
- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC, Sigma-Aldrich)

Všetky testované inhibítory AChE sú od spoločnosti Sigma-Aldrich:

- Takrín
- Donepezil
- Galantamín
- Kofeín
- Theobromín
- Theofylín
- Epigalokatechín-galát (EGCG, 95%)

Prístrojové vybavenie:

- Spektrofotometer č. 1 – Thermo Scientific GENESYS™ 10S UV-Vis
- Spektrofotometer č. 2 – Evolution™ 201 UV-Visible
- Trepačka – Biosan Vortex V1-plus
- Magnetická miešačka s ohrevom – VELP Scientifica
- Kyvety

7.2. Metodika

Existuje mnoho metód, ktoré boli vyvinuté pre stanovovanie aktivít cholinesteráz. Medzi najčastejšie používané patria metódy elektrometrické, titračné, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické a enzýmové. Tieto spomenuté metódy sa však nedokážu využiť v praxi, kvôli náročným úpravám vzorku, dĺžke merania a nedostatočnej špecifikácii enzýmu. [27]

V našom prípade sme využili veľmi citlivú no pre bežné využitie vhodnú Ellmanovu metódu.

7.2.1. Stanovenie aktivity acetylcholinesterázy

Aktivita acetylcholinesterázy bola stanovená Ellmanovou metódou. Princíp Ellmanovej metódy je popísaný v kapitole 5.3.

Do kyvety bolo napipetované:

- 0,4 ml DTNB – 0,4 mg/ml = $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- 25 μ l roztoku AChE
- 475 μ l PBS
- Reakcia bola spustená pridaním 0,1 ml ATChCl určitej koncentrácie

Zo zásobného roztoku $40 \cdot 10^{-3}$ mol/l acetylthiocholínu bolo pripravené riedením dvojkovou radou desať roztokov. Každá koncentrácia bola meraná trikrát, pre zvýšenie presnosti merania. Ako blank bola použitá rovnaká reakčná zmes, kde sme vymenili AChE za PBS, tak aby objem v kyvete bol rovnaký. Teda je v blanku 500 μ l PBS, bez pridania AChE.

Merala sa absorbancia pri 412 nm hneď po pridaní ATChCl, a následne absorbancia po určitej inkubačnej dobe, v našom prípade 5 min, rovnako pri 412 nm. Na určenie aktivity AChE bol zostrojený graf závislosti absorbancie na koncentrácií acetylthiocholínu.

7.2.2. Meranie inhibičnej aktivity jednotlivých inhibítorov

Postup prípravy reakčnej zmesi na meranie absorbancie pomocou spektrofotometra bol u každého inhibítora rovnaký.

Do kyvety bolo postupne napipetované:

- 0,4 ml DTNB – 0,4 mg/ml = $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l

- 25 μ l roztoku AChE
- 0,1 ml roztoku testovaného inhibítora o určitej koncentrácii
- 375 μ l PBS
- reakcia bola spustená pridaním 0,1 ml ATChCl – 10 mmol/l

Zo zásobného roztoku určitého inhibítora v koncentrácii $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l bolo nariadené dvojkovou radou minimálne 12 koncentracií pre dostatočné zaznamenanie účinnosti inhibítora. Ako blank bola použitá rovnaká reakčná zmes, kde sme vymenili enzým za PBS, to znamená že v blanku sa nachádza 400 μ l PBS.

Absorbanica bola meraná po pridaní ATChCl a potom po 5 minútach inkubácie. Každá koncentrácia inhibítora bola meraná trikrát, pre presnejšie stanovenie aktivity. Tento postup sme opakovali pri každom inhibítore. Na určenie účinnosti inhibičnej aktivity inhibítora bol zostrojený graf závislosti absorbancie na koncentrácii určitého inhibítora.

7.2.3. Meranie aktivity jednotlivých inhibítorov za použitia membrán

Sušený enzým

Najprv bol otestovaný čistý enzým bez membrány. Do kyviek bol napipetovaný enzým v množstve 25 μ l a nechal sa vysušiť minimálne cez noc. Na druhý deň sa pridali ďalšie zložky v poradí:

- 0,4 ml DTNB – $0,4 \text{ mg/ml} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$
- 500 μ l PBS
- reakcia bola spustená pridaním 0,1 ml ATChCl – 10 mmol/l

Ako blank bola použitá rovnaká reakčná zmes, v kyvete bez vysušeného enzýmu. Merala sa absorbancia pri 412 nm hneď po pridaní ATChCl, a následne absorbancia po určitej inkubačnej dobe. Ďalšie meranie sme uskutočnili po premytí enzýmu, rovnako pri 412 nm. Meranie sme opakovali minimálne 5 \times na získanie dostatočnej priemernej hodnoty aktivity enzýmu.

Enzým zachytený v membráne

Želatína: Bol použitý 0,25 % roztok želatíny. Do každej kyvety bolo napipetované 50 μl zmesi želatíny a enzýmu v pomere 1:1. Nechalo sa stuhnúť minimálne cez noc, pridali sa ďalšie zložky reakčnej zmesi a potom sa uskutočnilo meranie aktivity enzýmu. Aktivitu sme merali aj po premytí kyvety a opakovanom pridaní zložiek zmesi.

Doplnené ďalšie zložky reakčnej zmesi do kyvety:

- 0,4 ml DTNB – 0,4 mg/ml = $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- 500 μl PBS
- reakcia bola spustená pridaním 0,1 ml ATChCl – 10 mmol/l

Aktivitu enzýmu v želatíne sme neskôr merali aj s inhibítorom (v našom prípade sme pridali 0,1 ml $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l takrínu) a potom aj s pridaním EDC alebo glutaraldehydu rovno do zmesi želatíny a to 20 μl EDC alebo glutaraldehydu na 50 μl zmesi želatíny a enzýmu.

Chitosan: Bol pripravený roztok chitosanu z 10 mg chitosanu a 1 ml 0,2 mol/l kyseliny octovej. Na 30 μl chitosanu sme pridali 5 μl enzýmu. Do každej kyvety bolo napipetované 50 μl roztoku chitosanu zmiešaného s enzýmom. Zmes sa nechala minimálne cez noc stuhnúť a pred meraním sa pridali ďalšie zložky reakčnej zmesi:

- 0,4 ml DTNB – 0,4 mg/ml = $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- 500 μl PBS
- reakcia bola spustená pridaním 0,1 ml ATChCl – 10 mmol/l

Ako blank pri oboch membránach bola použitá rovnaká reakčná zmes, v kyvete bez enzýmu. Merala sa absorbancia pri 412 nm hneď po pridaní ATChCl, a následne absorbancia po určitej inkubačnej dobe.

8. Výsledky

Z nameraných hodnôt absorbancie boli zostrojené grafy, kde sú znázornené krivky závislosti inhibičnej aktivity na koncentrácií vzorku. Na základe nameraných hodnôt absorbancie v čase boli vypočítané hodnoty IC_{50} .

IC_{50} je koncentrácia látky, ktorá inhibuje enzým z 50 %. Podľa tejto hodnoty sme zistili, schopnosť inhibície jednotlivých inhibítorov.

Výsledné hodnoty jednotlivých inhibítorov sú zobrazené v tabuľke č.2.

Tabuľka č.2: Namerané hodnoty IC_{50} pri jednotlivých inhibítoroch.

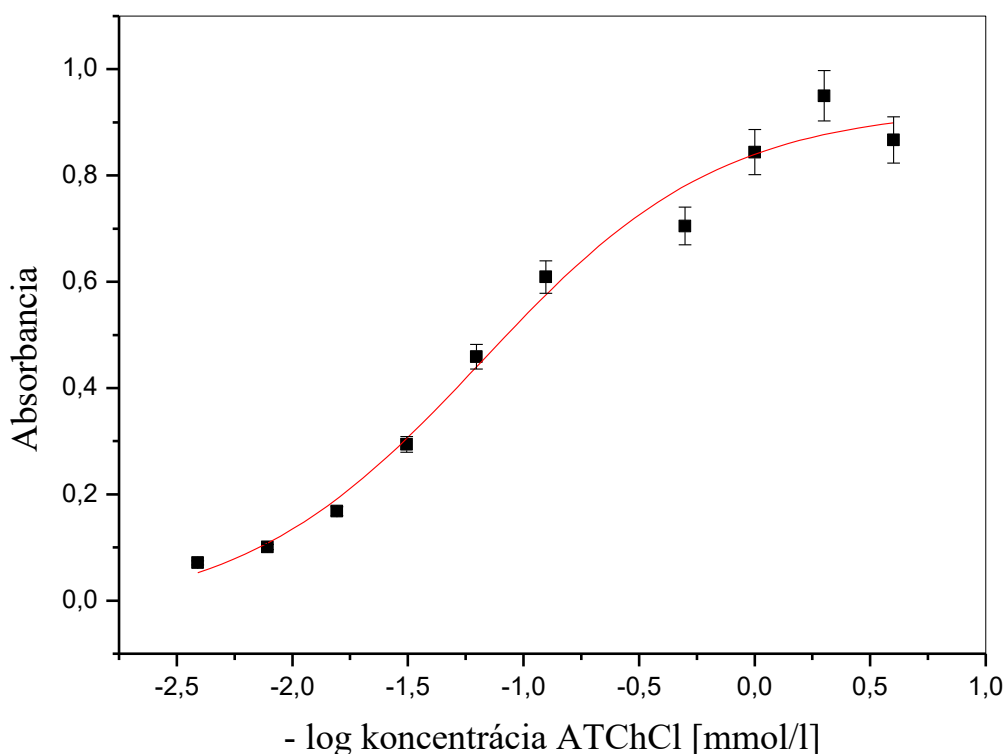
Použitý inhibítor	IC_{50} [mmol/l]
Takrín	$2,081 \cdot 10^{-3}$
Donepezil	$1,589 \cdot 10^{-3}$
Galantamín	$15,028 \cdot 10^{-3}$
Kofeín	$384 \cdot 10^{-3}$

Z nameraných hodnôt vidíme veľké rozdiely v koncentráciách jednotlivých použitých inhibítorov, ktoré dokážu inhibovať 50 % enzýmovej aktivity acetylcholinesterázy. Z našich testovaných inhibítorov bol najsilnejší donepezil, hneď za ním o trochu slabší od donepezilu je takrín. Tento inhibítor sme použili pri ďalších meraniach, kde bol potrebný nejaký inhibítor.

Najvyššiu potrebnú koncentráciu schopnú inhibovať enzým AChE na 50 % mal kofeín a to až 240-krát násobne nižšiu schopnosť ako najsilnejší inhibítor donepezil.

8.1. Stanovenie aktivity acetylcholinesterázy

Na zistenie účinnosti jednotlivých inhibítorov na AChE, je potrebné vedieť, akú aktivitu AChE vykazuje. Preto sa uskutočnilo základné meranie, na určenie aktivity AChE. Týmto meraním sme zistili, akú koncentráciu ATChCl použijeme na ďalšie merania, za použitia inhibítorov.



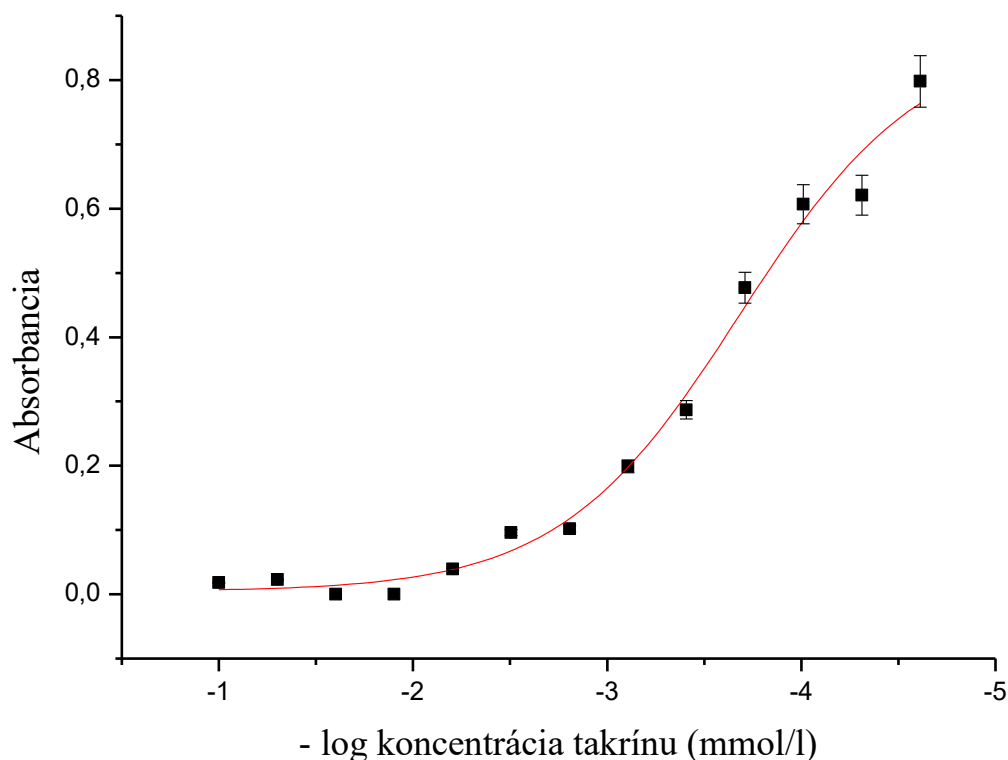
Obrázok č. 8: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie ATChCl [mmol/l]

Z nameraných hodnôt sme vypočítali pomocou programu, v ktorom bol graf zostrojený hodnotu $EC_{50} = 1,304 \cdot 10^{-3}$ mmol/l, čo je koncentrácia ATChCl, schopná vyvolať polovicu z maximálnej aktivity AChE. Na spresnenie kinetických vlastností enzýmu sme vypočítali aj Michaelisovu konštantu (K_M), ktorá definuje takú koncentráciu substrátu, pri ktorej rýchlosť enzýmovej reakcie (V_m) dosahuje práve polovicu z maximálnej rýchlosti. K_M nám vyšla $1,280 \cdot 10^{-3}$ mmol/l. Čím je hodnota Michaelisovej konštanty pre daný substrát nižšia, tým je vyššia afinita enzýmu k danému substrátu a je považovaný za prirodzenejší.

Podľa grafu vidíme, že na začiatok stačí nízka koncentrácia na to, aby enzým začal reagovať. Postupne sa však zvyšovaním koncentrácie ATChCl znižuje rýchlosť zvyšovania aktivity enzýmu. Maximálnu hranicu svojej aktivity dosiahol pri koncentrácií 10 mmol/l. Túto koncentráciu sme použili pri ďalších meraniach s inhibítormi.

8.2. Meranie inhibičnej aktivity jednotlivých inhibítorov

8.2.1. Takrín

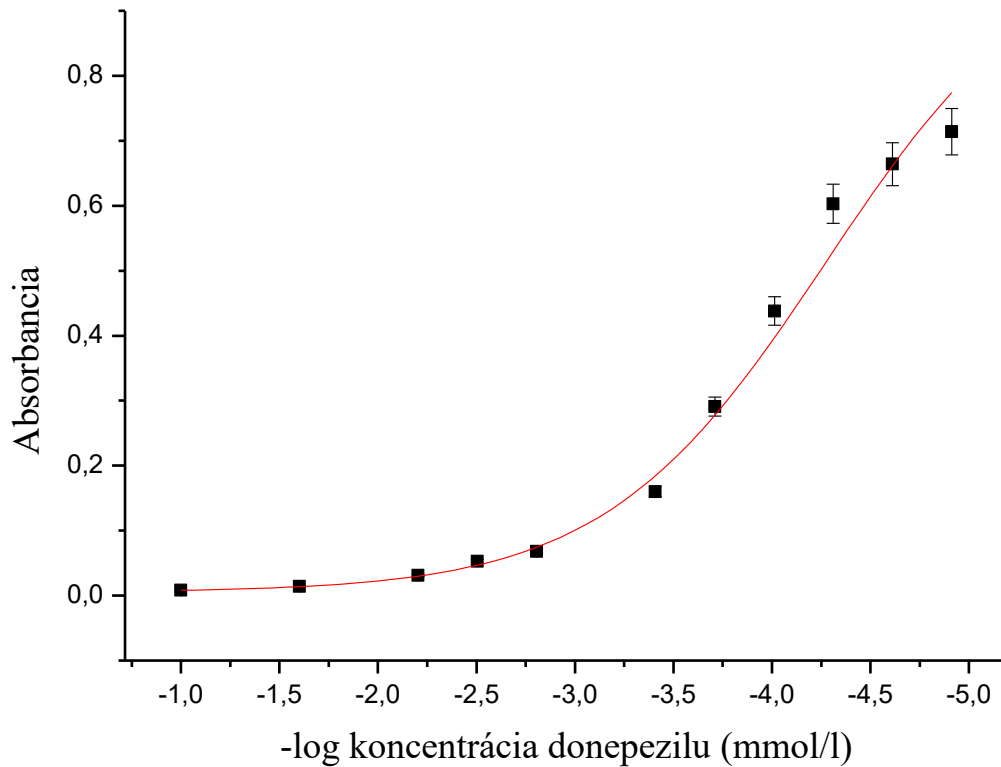


Obrázok č.9: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácií takrínu. AChE v homogénnej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Takrín ako prvý objavený inhibítor acetylcholinesterázy, ma celkom silné inhibičné schopnosti, čo potvrdzuje aj naše meranie. Na grafe závislosti zmeny absorbancie na koncentrácií takrínu pozorujeme, že už veľmi nízke koncentrácie takrínu dokážu veľmi silno inhibovať aktivitu enzýmu. Čo môžeme vidieť aj na veľmi nízkej IC_{50} , ktorá je $2,081 \cdot 10^{-3}$ mmol/l. Ale od tejto hodnoty IC_{50} aktivita enzýmu už stúpala rýchlejšie. R^2 , koeficient determinácie je 79,92 %. Na základe tohto koeficientu,

ktorého hodnota je vysoká, môžeme povedať, že meranie aj spracovanie výsledkov boli vhodne zvolené.

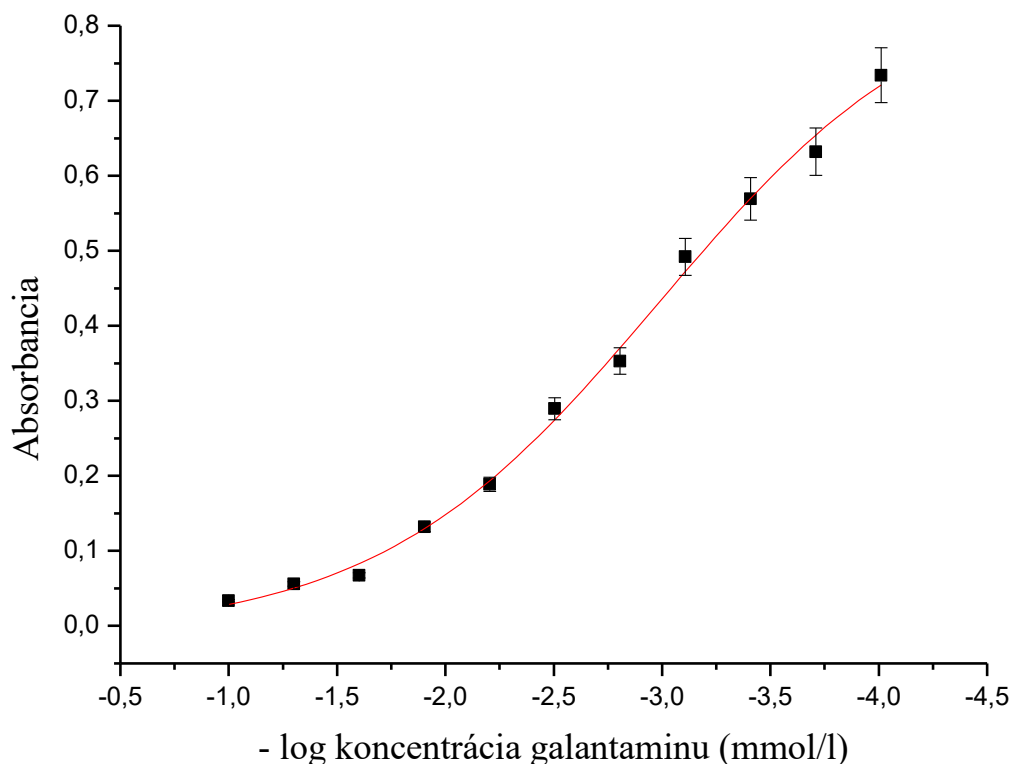
1.1.1. Donepezil



Obrázok č.10: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie donepezilu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Ďalší inhibítor, ktorého inhibičný potenciál sme si overili bol donepezil. Jeho hodnota IC_{50} je $1,589 \cdot 10^{-3}$ mmol/l, teda môžeme povedať že už veľmi malá koncentrácia donepezilu inhibuje aktivitu enzýmu na 50%. Pri postupnom znižovaní koncentrácií donepezilu sa schopnosť inhibovať enzým zmenšovala na konci merania rýchlejšie ako na začiatku. Presnosť merania bola veľmi vysoká, čo nám ukazuje aj koeficient determinácie $R^2 = 98,94$ %.

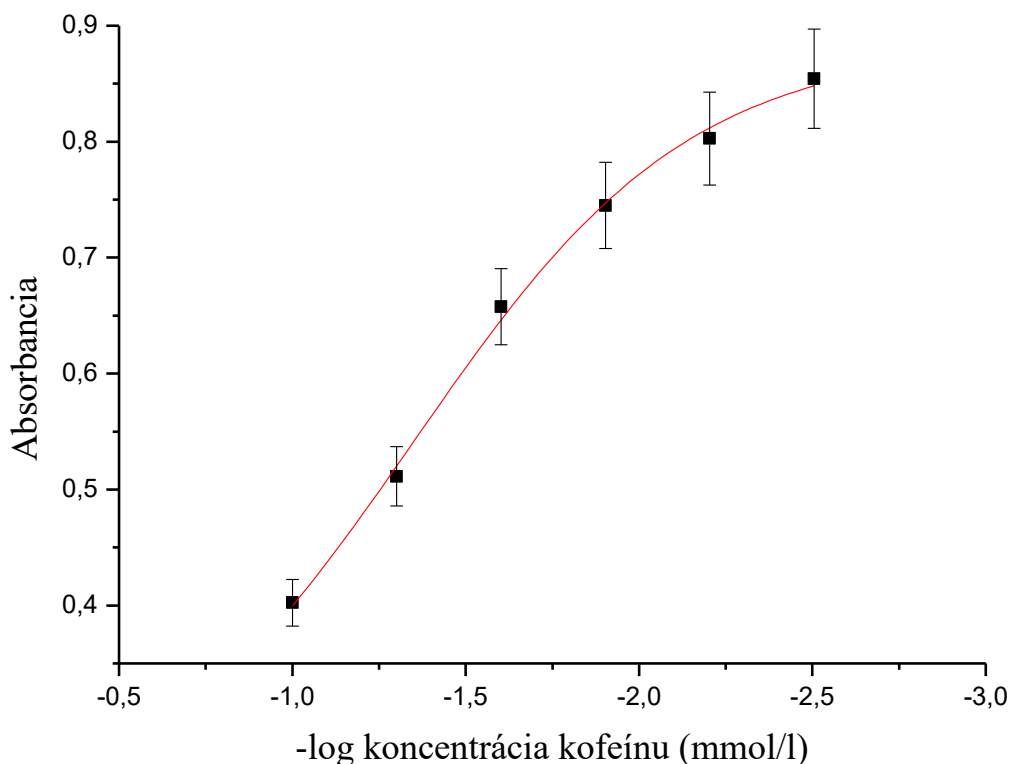
1.1.2. Galantamín



Obrázok č. 11: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie galantamínu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Na grafe vidíme, že krivka závislosti zmeny absorbancie na koncentrácií galantamínu rastie pomerne rýchlo. Hodnota IC_{50} galantamínu je $15,028 \cdot 10^{-3}$ mmol/l. $R^2 = 99,74\%$. Tento koeficient determinácie ukazuje, že 99,74% zmeny absorbancie je spôsobené zmenou koncentrácie galantamínu. Môžeme tvrdiť, že naše meranie bolo správne a rovnako aj spôsob spracovania výsledkov.

1.1.3. Kofeín



Obrázok č. 12: Závislosť zmeny absorbancie na zápornom logaritme koncentrácie kofeínu. AChE v homogenizovanej fáze, ATChCl v koncentrácií 10 mmol/l.

Pri meraní inhibičného potencionálu kofeínu sme využili len veľmi úzke rozmedzie koncentrácie, pretože už pri vyšších koncentráciách kofeínu sa jeho schopnosť inhibovať enzým acetylcholínesterázu stratila. Jeho IC_{50} je $384 \cdot 10^{-3}$ mmol/l. Na grafe pozorujeme veľmi prudké stúpanie absorbancie, čo znamená že schopnosť inhibície veľmi rýchlo klesala s postupným znižovaním koncentrácie. Meranie aj spôsob spracovania boli veľmi presné, čo potvrdzuje aj $R^2 = 99,77\%$.

8.2.2. Epigalokatechín galát, teobromín, teofylín

Vďaka známej inhibičnej schopnosti kofeínu sme vyskúšali jej príbuzné štruktúry a to teobromín a teofylín, ktoré však inhibičnú schopnosť nepreukázali.

Aj napriek tomu že mnoho štúdií dokazuje to, že látka EGCG dokáže inhibovať AChE, v našom prípade enzým acetylcholinesteráza mal stále nameranú svoju maximálnu aktivitu.

8.3. Meranie aktivity jednotlivých inhibítorov za použitia membrán

8.3.1. Sušený enzým

Prvé meranie sme uskutočnili bez membrány, s čistým enzýmom, ktorý sme nechali stáť celú noc v priestoroch laboratória pri teplote cca 21°C. Enzým sa na dne kyvety počas 24 hodín vysušil. Toto meranie sme previedli, aby sme zistili účinnosť enzýmu aj mimo skladovanie v chlade a v roztoku.

Meranie prebiehalo rovnako ako pri ostatných postupoch Ellmanovej reakcie s jediným rozdielom, a to inkubačnou dobou. V našom prípade boli prvé merateľné a použiteľné hodnoty aktivity AChE po 2 hodinách. Znamená to že enzým sa počas dvoch hodín postupne v reakčnej zmesi rozpúšťal. Pred každým meraním bolo potrebné roztoky v kyvete premiešať, pre rovnomerne rozmiestnenie postupne sa rozpúšťajúceho enzýmu na dne kyvety. Meranie sme opakovali aj po premytí kyvety.

Tabuľka č.3: Namerané hodnoty absorbancie sušeného enzýmu.

Sušený enzým		
	Meranie po 2 hodinách po pridaní roztokov Ellmanovej reakcie	Premytie (aktivita po 30 min. inkubácie)
1.	0,220	0,017
2.	0,200	0,020
3.	0,154	0,020
4.	0,115	0,033
5.	0,171	0,047
Priemerná hodnota	0,172	0,027

Namerané hodnoty absorbancie sú aj po dvoch hodinách veľmi malé. Čo je spôsobené pomaly sa rozpúšťajúcim enzýmom do roztoku. Kyvetu sme premyli a meranie zopakovali pre prípadne zvyšky enzýmu na stenách kyvety. Meranie však ukázalo veľmi nízke hodnoty, čo by sme neprisudzovali aktivite enzýmu ale miernemu sfarbeniu DTNB aj bez reakcie s enzýmom, ktorý je citlivý na svetlo.

8.3.2. Enzým zachytený v membráne

8.3.2.1. Enzým imobilizovaný do chitosanu

Pri príprave chitosanu ako membrány s imobilizovanou acetylcholinesterázou sme postupovali na základe už prevedených štúdií, kde bola dokázaná schopnosť chitosanu chovať sa ako ideálna membrána pre enzým.

V našom prípade však enzým pri meraní nevykazoval v chitosane žiadnu aktivitu.

8.3.2.2. Enzým imobilizovaný do želatíny

Pre imobilizáciu AChE sme použili 0,250 % želatínu pri teplote 21-24°C. Vychádzali sme z rigorózneho práce PharmDr. Ota Drobíka [57], kde sa ako najvhodnejšia koncentrácia pre imobilizáciu želatíny ukázala 0,250 % pri teplote od 21-37°C. Táto koncentrácia a teplota sa používa aj v iných odborných prácach.

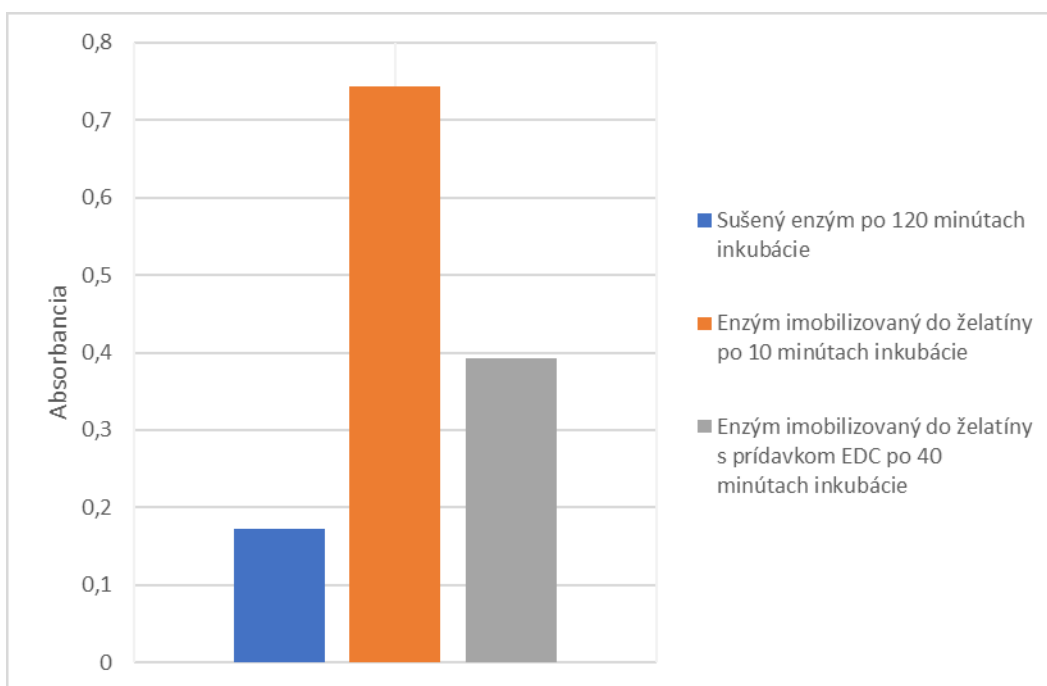
Po prvom meraní sme kyvety premyli vodou a meranie zopakovali, pre prípadne zvyšky enzýmu zachyteného na želatíne, ktoré ešte nezreagovali alebo sa ich nepodarilo zmyť.

Tabuľka č. 4: Výsledky absorbancie enzýmu imobilizovaného do želatíny.

	Meranie absorbancie ΔA	Premytie
1.	0,723	0,019
2.	0,754	0,018
3.	0,840	0,011
4.	0,657	0,016
5.	0,743	0,016
Priemerná hodnota ΔA	0,743	0,016

Dobu inkubácie od bežného merania podľa Ellmanovej metódy sme museli zvýšiť dvojnásobne, a to na 10 min., na to aby sme získali maximálnu aktivitu enzýmu. Ukázalo sa že premytie kviet vodou malo veľký vplyv na výslednú aktivitu AChE. Enzým po premytí už nevykazoval žiadnu aktivitu.

- **Enzým imobilizovaný do želatíny s prídavkom EDC**



Obrázok č.17: Porovnanie výsledkov aktivity AChE v rôznych formách – sušený enzým, enzým imobilizovaný do želatíny, enzým imobilizovaný do želatíny s prídavkom EDC.

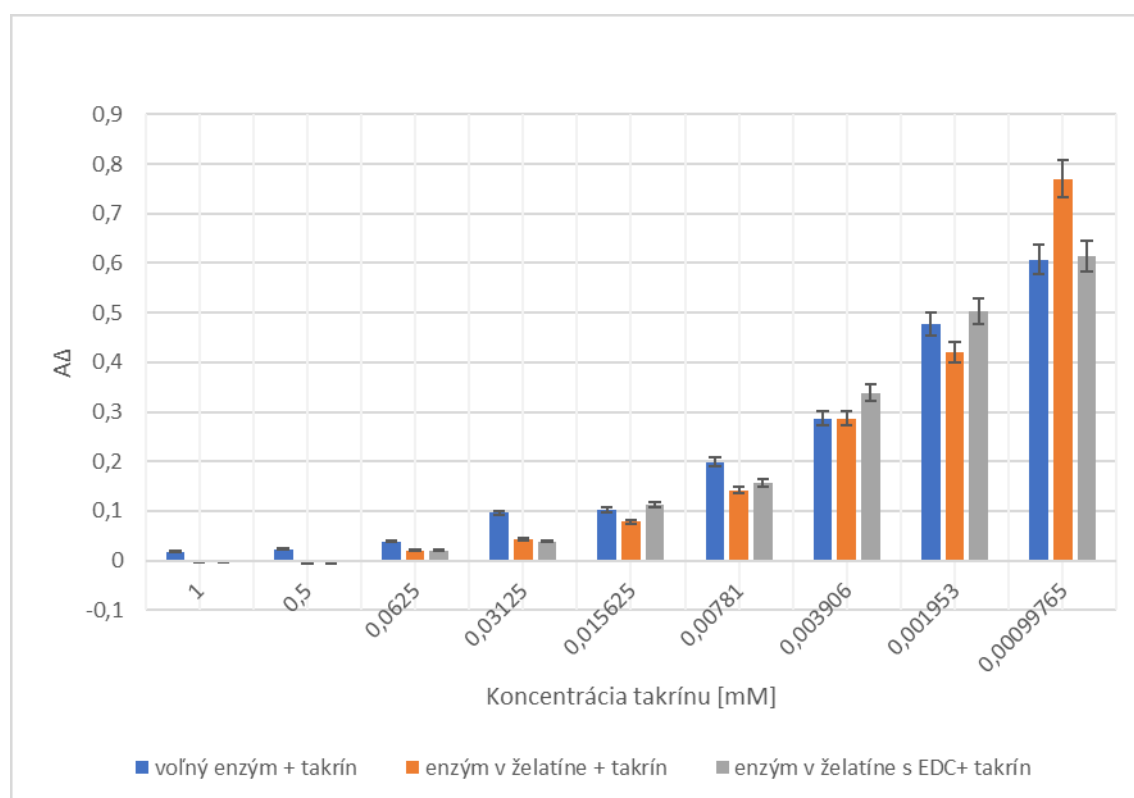
Na grafe je jasne vidieť, že enzým imobilizovaný do želatíny ma najlepšiu a najvyššiu aktivitu za najmenšiu inkubačnú dobu. Prídavok sieťovacieho činidla EDC do želatíny znížil aktivitu enzýmu acetylcholinesterázy a predĺžil inkubačnú dobu aktivity enzýmu. Sušený enzým ani po 120 minútach inkubácie v zmesi na Ellmanovu reakciu nedokázal reagovať dostatočne ani na 50% svojej aktivity.

Meranie aktivity enzýmu sme opakovali po premytí, kedy sa už aktivita resp. prítomnosť enzýmu nepreukázala.

- **Enzým imobilizovaný do želatíny s prídavkom glutaraldehydu**

Aj keď je glutaraldehyd známe sieťovacie činidlo rovnako ako EDC, v našom prípade sa neosvedčilo a po pridaní glutaraldehydu do membrány so želatínou enzým acetylcholinesteráza nevykazoval žiadnu aktivitu.

- **Enzým imobilizovaný do želatíny s prídavkom EDC a inhibítora**



Obrázok č. 19: Porovnanie inhibície enzýmu takrínom odlišnými metódami

Ďalším testovaním sme vyskúšali aktivitu imobilizovaného enzýmu v želatíne s prídavkom sieťovacieho činidla EDC a inhibítora takrínu. Koncentrácie takrínu sme použili rovnaké ako pri všetkých testovaniach s týmto inhibítorom, pre lepšie porovnanie výsledkov a na zistenie ako ovplyvňuje imobilizácia enzýmu a pridanie sieťovacieho činidla jeho inhibíciu.

Na grafe vidíme, že vo všetkých troch prípadoch výskytu enzýmu sa jeho aktivita a účinok inhibítora takrínu nemenil a enzým reagoval s inhibítorom pomerne rovnako. Malé výkyvy su zanedbateľné, keďže Ellmanova reakcia je veľmi citlivá.

9. Diskusia

V prvej časti našej práce sme sa venovali testovaniu inhibičnej aktivity jednotlivých inhibítorov, ktoré sa používajú na liečbu Alzheimerovej choroby. Určili sme si tak silu ich inhibičnej aktivity pomocou IC50.

Naše testovanie ukázalo ako aj iné štúdie tvrdia, že medzi najsilnejšie inhibítory patrí takrín a donepezil. Takrín je silný a účinný inhibítor, ako prvý používaný na liečbu AD už od roku 1993, až kým neboli zaznamenané hepatotoxické účinky, pre ktoré bol stiahnutý z trhu. Pri našom meraní nám vyšiel donepezil približne rovnako silný ako takrín. Donepezil je v poradí druhý liek používaný na liečbu AD od roku 1996. [49]

Ďalším skúmaným inhibítorom v našej práci je galantamín. Patrí medzi slabé inhibítory, čo ukázalo aj naše meranie. Výsledky z iných štúdií hovoria o 40 až 500 násobne nižšej účinnosti galantamínu ako má donepezil, čo znamená, že je na dostačujúci liečebný účinok potrebné vyššie dávkovanie. Z našich výsledkov môžeme potvrdiť minimálne 10× nižšiu účinnosť galantamínu ako má donepezil, teda nižšiu inhibičnú schopnosť enzýmu AChE skúmanej pomocou Ellmanovej metódy. [50]

Látka, ktorá ovplyvňuje priebeh AD je aj kofeín. Už skôr bola zistená jeho funkcia selektívneho nekompetitívneho inhibítora AChE. V našej práci sme potvrdili jeho schopnosť inhibovať AChE, aj keď veľmi slabo. Rozdiel veľkosti inhibičnej sily medzi kofeínom a inhibítormi takrínom a donepezilom nám vyšiel rovnaký ako už v publikovaných štúdiách. Keďže kofeín patrí medzi purínove alkaloidy, konkrétne metylderiváty xantínu, kam patrí aj teofylín a teobromín, skúsili sme ich otestovať. Chceli sme zistiť, či sa aj pri nich preukáže schopnosť inhibovať AChE. Naše testovanie nepreukázalo žiaden inhibičný potenciál, čo môžeme prisúdiť rozdielnym funkčným skupinám naviazaných na purínovom základe oproti kofeínu. [13]

Ďalšou látkou, ktorá nereagovala s enzýmom v našej práci je EGCG. Pri našom meraní nedokázala inhibovať enzým AChE. Je známe, že EGCG dokáže inhibovať enzým viazaný na membráne erytrocytov skôr, než jeho rozpustnú formu. EGCG sa sama dokáže na membránu erytrocytov viazať a tým má uľahčený prístup k interakcii s AChE. Keďže v našom meraní je enzým v rozpustnej forme, môže to byť príčina prečo EGCG s enzýmom nereagovalo. Pre ďalšie testovanie jeho inhibície odporúčame vyskúšať AChE imobilizovať do membrány a tak otestovať inhibičnú schopnosť EGCG na enzým. [50]

Základom pre našu prácu bolo imobilizovať enzým a ukázať výhody tejto imobilizácie. Najprv sme otestovali účinnosť samotného enzýmu, ktorý sme nechali stáť v kyvete cez noc pri bežných laboratórnych podmienkach. Tento enzým sa vysušil a vytvoril na dne kyvety tenkú vrstvu vysušeného enzýmu. Pri meraní sa aktivita enzýmu ukázala až po 2 hodinách. Príčinou takejto pomalej reakcie enzýmu môže byť neprístupnosť reakčného roztoku na aktívne miesta enzýmu, ktorý počas inkubácie a odparovaní rozpúšťadla mohol zmeniť svoju konformáciu, prípadne pomalému rozpúšťaniu, a tak zároveň uvoľneniu aktívnych miest enzýmu do roztoku. Pomalé rozpúšťanie bolo viditeľné voľným okom, kde sa na dne kyvety vytváralo žlté sfarbenie roztoku. Pre nedostatok času sme meranie ukončili po 2 hodinách, no môžeme usúdiť, že pod dlhšej inkubácií enzýmu v reakčnom roztoku, by dosiahol svoju maximálnu aktivitu, po uvoľnení a rozpustení celého enzýmu.

Pri imobilizácií enzýmu do želatíny sa aktivita enzýmu preukázala až po 10 minútach inkubácie. Čo je oproti bežnej Ellmanovej metóde s voľne rozpustným enzýmom, kde sme použili inkubačnú dobu 5 minút, predĺženie na dvojnásobok. V iných štúdiách bola využívaná inkubačná doba od 10 do 30 min., kedy sa už aktivita nemenila. Môžeme to odôvodniť postupným uvoľňovaním a rozpúšťaním enzýmu zo želatíny, spôsobom zachytenia enzýmu do želatíny, podľa dostupnosti aktívneho miesta na enzýme. Imobilizácia môže mať za následok zmenu konformácie, stability a aktivity enzýmu. Želatína poskytuje dobré vlastnosti pre imobilizáciu enzýmov v kombinácii s biokompatibilitou a nulovou toxicitou. Sušenie želatíny v našej práci prebiehalo pri laboratórnej teplote. V iných prácach pozorujeme, že aplikovaná teplota počas sušenia hrá významnú úlohu, než koncentrácia želatíny. Zvýšená teplota mala pozitívny účinok na množstvo imobilizovaného AChE. Teda optimálne pre konštrukciu biosenzora je použitie imobilizačnej zmesi obsahujúcej 0,25% želatíny a sušenie pri 37 ° C. Na ďalšie testovanie odporúčame sušiť enzým pri zvýšenej teplote pre lepšiu imobilizáciu enzýmu. [52]

Meranie aktivity enzýmu sme opakovali po premytí, no zvyšky enzýmu už neboli preukázane. Z rigorózneho práce PharmDr. Ota Drobíka [57], odkiaľ sme čerpali najvhodnejšiu percentuálnu hmotnosť želatíny (0,25%) sa po premytí aktivita enzýmu ešte objavila. Môžeme to vysvetliť iným postupom merania a premytia. V našej práci sme najprv uskutočnili meranie pomocou Ellmanovej metódy, kedy sme po meraní roztok z kyvety odstránili, kyvetu premyli fosfátovým pufrom, znova pridali všetky zložky reakčnej zmesi a meranie opakovali. V práci Ota Drobíka sa premytie

uskutočnilo hneď na začiatku, pred pridaním reakčnej zmesi. Môžeme usúdiť, že keby sme kyvetu najprv premyli, a až tak uskutočnili meranie na základe Ellmanovej metódy, časť enzýmu by mohla byť preukázaná. V našej práci nám enzým zreagoval pri prvom meraní, uvoľnil sa do reakčnej zmesi a po premytí už v želatíne sa žiaden imobilizovaný enzým nepreukázal.

V ďalšom meraní sme skúsili do želatíny pridať sieťovacie činidlo EDC. Takýto zosieťovaný želatínový gél má dobrú stabilitu vo fyziologických relevantných podmienkach. Po zosieťovaní EDC sa pre všetky želatínové vzorky znížil pomer rovnovážneho napučievania. Pridanie EDC do želatíny nám znížilo aktivitu enzýmu AChE na polovicu a predĺžilo inkubačnú dobu z 10 minút na 40 minút. Môžeme to pripísať sieťovaciemu činidlu EDC, ktoré nám spôsobilo silnejšie zachytenie enzýmu do membrány a pomalšie vylučovanie do reakčného roztoku. Príčinou môže byť aj limitovaná distribúcia substrátu k enzýmu. [53]

Ako ďalšie sieťovacie činidlo sme otestovali glutaraldehyd. Glutaraldehyd sa používal v rôznych štúdiách na testovanie inhibítorov AChE ako sú napr. neurotoxické zlúčeniny. Bol vybraný nový imobilizačný postup založený na zachytávaní AChE do želatínovej membrány a následnej stabilizácii glutaraldehydom. V našom prípade sa účinnosť enzýmu v takto upravenej a stabilizovanej membráne nepreukázala. Pri meraní enzým nevykazoval žiadnu aktivitu. Môžeme sa domnievať, že enzým bol poškodený reakčným činidlom a stratil tak svoju aktivitu. [54]

Veľa štúdií dokázalo využitie chitosanu ako membrány na kovalentnú imobilizáciu enzýmu AChE. V našom prípade sa aktivita mobilizovaného enzýmu do chitosanu nepreukázala. Môže to byť spôsobené iným postupom pri príprave membrány, skladovania membrány alebo kombinácií so sieťovacím činidlom. V predchádzajúcich štúdiách bol chitosan vždy kombinovaný so sieťovacím činidlom glutaraldehydom, v našej práci sme sieťovacie činidlo nepoužili. [55,56]

Keďže nám enzým reagoval dostatočne aktívne v želatíne samotnej aj s prídavkom sieťovacieho činidla EDC, meranie sme opakovali s pridaním inhibítora acetylcholinesterázy takrínu. Môžeme povedať, že želatína a ani EDC neovplyvnili aktivitu inhibítora takrínu. Takrín dokázal v čistej želatíne aj s prídavkom EDC inhibovať enzým dostatočne, rovnakou silou pre obe membrány. S klesajúcou koncentráciou takrínu stúpala aktivita enzýmu. Pri želatíne stačila 5 minútová inkubačná doba, no pri želatíne s prídavkom sieťovacieho činidla EDC sme museli inkubačnú dobu predĺžiť minimálne na 30 minút, pokiaľ sa enzým uvoľnil z membrány.

Dlhšie uvoľňovanie resp. rozpúšťanie AChE z membrány pripisujeme prídavku EDC do želatíny. Takto sme museli predĺžiť inkubačnú dobu aj pri základnom meraní aktivity enzýmu AChE bez použitia inhibítora. Môžeme povedať, že sa vlastnosti membrány zachovali aj po pridaní inhibítora, a preto je vhodné na ďalšie testovanie inhibítorov pomocou Ellmanovej metódy.

10. Záver

Hlavným cieľom tejto práce bolo charakterizovať liečivá používané na liečbu Alzheimerovej choroby prostredníctvom enzýmových testov s viazanou acetylcholinesterázou. Následne sme sa snažili poukázať na výhody imobilizácie AChE do želatíny.

Už známe liečiva na AD sme otestovali prostredníctvom Ellmanovej metódy, na zhodnotenie inhibičného potencionálu jednotlivých inhibítorov. Ako najsilnejší inhibítor sa nám preukázal donepezil s IC_{50} $1,589 \cdot 10^{-3}$ mmol, hneď za ním takrín s IC_{50} $2,081 \cdot 10^{-3}$ mmol/l a najslabšie inhibítory s väčším rozdielom sily sú galantamín a kofeín. Takrín bol vybraný pre ďalšie testovanie s imobilizovanou AChE.

Imobilizovaná AChE je odolnejšia voči vonkajším vplyvom. Zachytenie AChE do membrány sa považuje za prístupnú metódu, pretože môže stabilizovať enzým v prostredí, kde sa rýchlo degraduje. V našom prípade sme enzým vyskúšali imobilizovať do chitosanu a želatíny. Účinná nám vyšla iba želatína. Preto sme pre ďalšie testovanie imobilizovali enzým do želatíny. Na tvorbu želatínovej membrány sme použili 0,25% roztok želatíny a sušili ho pri laboratórnej teplote. V takto pripravenej membráne nám enzým vykazoval dostatočnú aktivitu pre ďalšie testovanie s inhibítorom. Želatínu sme sa pokúsili stabilizovať siet'ovými činidlami EDC a glutaraldehyd, aj v tomto prípade nám vyšiel účinný iba jeden, a to EDC. Toto siet'ovacie činidlo stabilizovalo želatínu a spomalilo vylučovanie AChE do reakčného roztoku Ellmanovej metódy. Aj keď sa zvýšila stabilita a spomalilo vylučovanie enzýmu, po premytí sa nedokázali zvyšky enzýmu na membráne. Naše predpoklady pre opakované použitie membrány na ďalšie merania sa nedokázali.

Inhibičnú schopnosť takrínu sme otestovali v želatíne samotnej ale aj s prídavkom EDC. Takrín nezmenil svoju inhibičnú schopnosť a naďalej bol dostatočne silným inhibítorom ako pri voľnej forme AChE. Môžeme povedať, že imobilizácia enzýmu do želatíny neovplyvní inhibičnú účinnosť jednotlivých inhibítorov a je vhodná pre ďalšie testovanie a charakterizáciu týchto látok. V našej práci sme otestovali membránu hneď na druhý deň po jej príprave. Odporúčame na ďalšie meranie otestovať stabilitu želatíny vo väčšom časovom rozmedzí, kedy by bol enzým imobilizovaný viac dní. Otestovala by sa stabilita imobilizovaného enzýmu v čase.

Takto pripravený a stabilizovaný enzým nám ušetrí čas a zjednoduší prácu. AChE je najdrahší prvok v konštruovanom biosenzore. Očakávame, že AChE predstavuje viac ako polovicu materiálových nákladov potrebných na konštrukciu

biosenzora. Úsilie o imobilizáciu AChE s dobrou účinnosťou je nevyhnutné pre príslušnú komercializáciu zariadenia. Ukázali sme, že je výhodne a šetrné imobilizovať enzým do membrány, pretože je stále účinný. Opakované použitie membrány však nie je možné.

11. Zoznam citovanej literatúry

1. Arora, K.; Alfulaj, N.; Higa, J. K.; Panee, J.; Nichols, R. A. Impact of sustained exposure to β -amyloid on calcium homeostasis and neuronal integrity in model nerve cell system expressing $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, **2013**, 288 (16), 11175-90.
2. Daulatzai, M. A. Fundamental role of pan-inflammation and oxidative-nitrosative pathways in neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *Am. J. Neurodegener. Dis.*, **2016**, 5 (1), 1-28.
3. Vickers, J. C.; Mitew, S.; Woodhouse, A.; Fernandez-Martos, C. M.; Kirkcaldie, M. T.; Canty, A. J.; McCormack, G. H.; King, A. E. Defining the earliest pathological changes of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**, 13 (3), 281–287.
4. Kumar, A.; Sharma, V.; Singha, V. P ; Kaundal, M.; Gupta, M. K.; Bariwal, J.; Deshmukh, R. Herbs to curb cyclic nucleotide phosphodiesterase and their potential role in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2015**, 149, 75-87.
5. Francis, P. T.; Palmer, A. M.; Snape, M.; Wilcock, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **1999**, 66 (2), 137-147.
6. Arendt, T.; Brückner, M. K.; Morawski, M.; Jäger, C.; Gertz, H. J. Early neurone loss in Alzheimer's disease: cortical or subcortical? *Acta Neuropathol. Commun.*, **2015**, 3, 10.
7. Arora, R. B.; Kumar, K.; Deshmukh, R. R.; FK506 attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced neurotoxicity in rats. *Behav. Pharmacol.* 2013, 24 (7), 580–589.
8. Danysz, W.; Parsons, C. G. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine—searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, 167 (2), 324–352.
9. Meltzer, C. C.; Smith, G.; DeKosky, S. T.; Pollock, B. G.; Mathis, C. A.; Moore, R. Y.; Kupfer, D. J.; Reynolds, C. F. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology*, **1998**, 18 (6), 407–430.

10. Dani, J. A.; Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2007**, *47*, 699–729.
11. Ishii, M.; Kurachi, Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr. Pharm. Des.*, **2006**, *12* (28), 3573–3581.
12. Čolovič, M. B.; Krstić, D. Z.; Lazarević-Pašti, T. D.; Bondžić, A. M.; Vesna, M. V. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol*, **2013**, *11*, 315-335.
13. Pohanka, M.; Dobeš, P. Caffeine Inhibits Acetylcholinesterase, But Not Butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9873-9882.
14. Gjerløff, T.; Jakobsen, S.; Nahimi, A.; Munk, O. L.; Bender, D.; Alstrup, A. K.; Vase, K. H.; Hansen, S. B.; Brooks, D. J.; Borghammer, P. In Vivo Imaging of Human Acetylcholinesterase Density in Peripheral Organs Using ¹¹C- Donepezil: Dosimetry, Biodistribution, and Kinetic Analyses. *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*(11), 1818-24.
15. Bajda, M.; Wieckowska, A.; Hebda, M.; Guzior, N.; Sottriffer, A. Ch.; Malawska, B. Structure-Based Search for New Inhibitors of Cholinesterases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*(3), 5608–5632.
16. Lam, B.; Hollingdrake, E.; Kennedy, J. L.; Black, E. S.; Masellis, M. Cholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease and Lewy body spectrum disorders: The emerging pharmacogenetic story. *Hum. Genomics.* **2009**; *4*(2), 91-106.
17. Vladimir-Knežević, S.; Blažeković, B.; Kindl, M.; Vladić, J.; Lower-Nedza, A. D.; Brantner, A. H. Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules* **2014**, *19*, 767-782.
18. Pohanka, M. Inhibitors of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Meet Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 9809-9825.
19. Lam, B.; Hollingdrake, E.; Kennedy, J. L.; Black, E. S.; Masellis, M. Cholinesterase inhibitors in Alzheimer’s disease and Lewy body spectrum disorders: The emerging pharmacogenetic story. *Hum Genomics.* **2009**, *4*(2), 91-106.

20. Granja, A.; Frias, I.; Neves, A. R.; Pinheiro, M.; Reis, S. Therapeutic Potential of Epigallocatechin Gallate Nanodelivery Systems. *Biomed. Res. Int.*, **2017**, *4*, 1-15.
21. Pohanka, M. Biosenzory založené na cholinesterasach. *Chem. Listy*, **2013**, *107*, 121-125.
22. Pohanka, M.; Karasova, J. Z.; Kuca, K.; Pikula, J.; Holas, O.; Korabecny, O.; Cabal, J. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and vx. *Talanta*, **2010**, *81*, 621-624.
23. Evans, O. On-line deoxygenation in reductive (and oxidative) amperometric detection: Environmental applications in the liquid chromatography of organic peroxides. *Analyst*, **1999**, *124*, 1811-1816.
24. Serge, B. Determination of acetylcholinesterase activity by a new chemiluminescence assay with the natural substrate. *Biochem. J.*, **1985**, *225*, 825-828.
25. Guilbault, G. G.; Kramer, D. N. Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Anal. Chem.*, **1965**, *37*, 120-123.
26. Wang, K.; Li, H. N.; Wu, J.; Ju, C.; Yan, J. J.; Liu, Q.; Qiu, B. Tio₂-decorated graphene nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Analyst*, **2011**, *136*, 3349-3354.
27. Žďárová Karasová, J.; Kuča, K.; Jun, D.; Bajgar, J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při in vivo hodnocení účinků reaktivátorů. *Chem. Listy*, **2010**, *104*, 46-50.
28. Vorčáková, K.; Štěpánková, Š.; Imramovský, A. Stanovenie anticholinesterasovej aktivity vybraných benzothiazolov. *Conference: Študentská vedecká konferencia PriF UK 2012, Bratislava* [online]. 2014 [cit.2018-05-02]. Dostupné z: <<https://www.researchgate.net/publication/266266155>>
29. Maxwell H. A.; Hugh P. F.; Kathleen M. A. An Enzymatic Method for Erythrocyte Acetylcholinesterase. *Clin. Chem.*, **1998**, *34/6*, 1055-1057.
30. Pohanka, M.; Hrabínová, M.; Kuča, K.; Simonato, J. P. Assessment of Acetylcholinesterase Activity Using Indoxylacetate and Comparison with the Standard Ellman's Method. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12(4)*, 2631-2640.
31. Guilbeau, J. R. Health risks of energy drinks: What nurses and consumers need to know. *Nurs. Women's Health*, **2012**, *16*, 423-428.

32. Sepkowitz, K. A. Energy drinks and caffeine-related adverse effects. *JAMA* **2013**, *309*, 243–244.
33. Pohanka, M.; Drobík, O.; Křenková, Z.; Žďárová Karasová, J.; Cabal, J.; Kuča, K. Imobilizace acetylcholinesterasy a konstrukce elektrochemického biosenzoru pro stanovení toxických organofosfátů. *Voj. zdrav. lis.*, **2010**, *3*, 105-109
34. Martin, J.; Kršková, Z.; Dušek, J. Huperzin A a jiné přírodní látky v léčbě Alzheimerovy choroby. *Prakt. Lekárn.*, **2011**, *2*, 103-105.
35. Rekha, K. a B.; Murthy, N. Studies on the immobilisation of acetylcholine esterase enzyme for biosensor applications. *Food Agric. Immunol.*, **2008**, *4*, 273-281.
36. Padrão, J.; Machado, R.; Casal, M.; Lanceros-Méndez, S.; Rodrigues, L. R.; Dourado, F.; Sencadas, V. Antibacterial performance of bovine lactoferrin-fish gelatine electrospun membranes. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2015**, *81*, 608-614.
37. Shakila, R. J.; Jeevithan, E.; Varatharajakumar, A.; Jeyasekaran, G.; Sukumar, D. Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT-Food Sci. Technol.* **2012**, *48*, 30–36.
38. Silva, R. S. G.; Bandeira, S. F.; Pinto, L. A. A. Characteristics and chemical composition of skins gelatin from cobia (*Rachycentron canadum*). *LWT-Food Sci. Technol.* **2014**, *57*, 580–585.
39. Silva, R. S. G.; Pinto, L. A. A. Physical cross-linkers: alternatives to improve the mechanical properties of fish gelatin. *Food Eng. Rev.* **2012**, *4*, 165–170.
40. Liu, J.; Ru, Q.; Ding, Y. Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review. *Food Res. Int.*, **2012**, *49*, 170–183.
41. Etxabidea, A.; Urdanpilleta, M.; Gómez-Arriaran, I.; Cabaa, K.; Guerrero, P. Effect of pH and lactose on cross-linking extension and structure of fish gelatin films. *Reactive and Functional Polymers*, **2017**, *117*, 140-146.
42. Davidenko, N.; Schuster, C. F.; Bax, D. V.; Raynal, N.; Farndale, R. W.; Best, S. M.; Cameron, R. E. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomaterialia*, **2015**, *25*, 131-142.
43. López-Alonso, J. P.; Díez-García, F.; Font, J.; Ribo, M.; Vilanova, M.; Scholtz, J. M.; González, C.; Vottariello, F.; Gotte, G.; Libonati, M.; Laurents, D. V. Carbodiimide EDC Induces Cross-Links That Stabilize RNase A

- C-Dimer against Dissociation: EDC Adducts Can Affect Protein Net Charge, Conformation, and Activity. *Bioconjugate Chem.*, **2009**, *20*, 1459-1473.
44. Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. Glutaraldehyde behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, **2004**, *37*, 790-802.
45. Zhenhua, T.; Wentao, L.; Li, G. The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. *Pol. Degr. and Stab.*, **2016**, *130*, 264-270.
46. Wan, Y. Y.; Lu, R.; Xiao, L.; Du, Y. M.; Miyakoshi, T. Chen Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 488–495.
47. Mohamed, S. A.; Al-Malki, A. L.; Kumosani, T. A.; El-Shishtawy, R. M. Horseradish peroxidase and chitosan: activation, immobilization and comparative results. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *60*, 295–300.
48. Warner, J.; Andreescu, S. An acetylcholinesterase (AChE) biosensor with enhanced solvent resistance based on chitosan for the detection of pesticides. *Talanta*, **2016**, *146*, 279–284.
49. Mehta, M.; Adem, A.; Sabbagh, M. New Acetylcholinesterase Inhibitors of Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.*, **2012**, *60* (6), 1-8
50. Geerts, H.; Guillaumat, P. O.; Grantham, C.; Bode, W.; Anciaux, K.; Sachak, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Res.*, **2005**, *1033* (2), 186-93.
51. Salazar, P. B.; de Athayde Moncorvo Collado, A.; Canal-Martínez, V.; Minahk, C. J. Differential inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by polyphenols epigallocatechin-3-gallate and resveratrol. Relevance of the membrane-bound form. *Biofactors.*, **2017**, *43* (1), 73-81.
52. Kostelnik, A.; Cegan, A.; Pohanka, M. Acetylcholinesterase Inhibitors Assay Using Colorimetric pH Sensitive Strips and Image Analysis by a Smartphone. *J. Int. J. Anal. Chem.*, **2017**, *2*, 1-8
53. Xing, O.; Yates, K.; Vogt, C.; Qian, Z.; Frost, C. M.; Zhaoa, F. Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Sci Rep.*, **2014**, *4*, 4706.

54. Pohanka, M.; Adam, V.; Kizek, R. An Acetylcholinesterase-Based Chronoamperometric Biosensor for Fast and Reliable Assay of Nerve Agents. *Sensors (Basel)*, **2013**, *13*(9), 11498–11506.
55. Yaodong, Z.; Li, L.; Caihong, Y.; Tingting, H. Chitosan-coated polystyrene microplate for covalent immobilization of enzyme. *Anal Bioanal Chem*, **2011**, *401*, 2311–2317.
56. Dan, D.; Xi, H.; Jie, C.; Aidong, Z.; Jiawang, D.; Shizhen, Ch. An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube–cross-linked chitosan composite. *Anal Bioanal Chem*, **2007**, *387*, 1059–1065.
57. Drobík, 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.