

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2020**

**Zhouf Daniel**

**Univerzita Hradec Králové**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra chemie**

Reaktivace lidských cholinesteráz imobilizovaných na  
stacionárních fázích

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: Zhouf Daniel  
Studijní program: N1407 Chemie  
Studijní obor: NCHTOX Bioorganická chemie a toxikologie škodlivin  
Vedoucí práce: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.



## Zadání diplomové práce

**Autor:** Daniel Zhouf  
**Studium:** S18CH021NP  
**Studijní program:** N1407 Chemie  
**Studijní obor:** Bioorganická chemie a toxikologie škodlivin  
**Název diplomové práce:** **Reaktivace lidských cholinesteráz imobilizovaných na stacionárních fázích**  
**Název diplomové práce AJ:** Reactivation of human cholinesterases immobilized on stationary phases

### Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Hlavním cílem je ověřit možnost reaktivace lidských cholinesteráz, imobilizovaných na povrchu stacionárních fází.

Dílčí cíle:

- ověřit možnost imobilizace lidských cholinesteráz na povrch různých stacionárních fází
- potvrdit přítomnost metabolické aktivity u imobilizovaných enzymů
- ověřit stabilitu imobilizovaných enzymů
- reaktivovat imobilizované enzymy po předchozí inhibici pomocí vybraných organofosfátů
- porovnat možnost reaktivace s volnými enzymy

WINTER, Michael, Timo WILLE, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA, Horst THIERMANN a Franz WOREK, 2016. Investigation of the reactivation kinetics of a large series of bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* [online]. B.m.: Elsevier Ireland Ltd, **244**, 136?142. ISSN 18793169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2015.07.007

WOREK, Franz, Jens VON DER WELLEN, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA a Horst THIERMANN, 2012. Reactivation kinetics of a homologous series of bispyridinium bis-oximes with nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Archives of Toxicology* [online]. **86**(9), 1379?1386. ISSN 03405761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-012-0842-2

ZORBAZ, Tamara, David MALINAK, Nikola MARAKOVIC, Nikolina MA, Michal NOVOTNY, Adam SKARKA, Rudolf ANDRYS, Marketa BENKOVA, Ondrej SOUKUP, Maja KATALINIC, Kamil KUČA, Zrinka KOVARIK a Kamil MUSILEK, 2018. Pyridinium oximes with ortho-positioned chlorine moiety exhibit improved physicochemical properties and efficient reactivation of human acetylcholinesterase inhibited by several nerve agents [online]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01398

**Garantující pracoviště:** Katedra chemie,  
Přírodovědecká fakulta  
**Vedoucí práce:** PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.  
**Oponent:** doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.  
**Datum zadání závěrečné práce:** 27.6.2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 24. července 2020

Zhouf Daniel

Práce vznikla díky institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych rád poděkoval PharmDr. Rudolfu Andrysovi Ph.D. za cenné připomínky a odborné rady, kterými přispěl k vypracování, a také za vedení celé diplomové práce.

# **ANOTACE**

ZHOUF, Daniel. *Reaktivace lidských cholinesteráz imobilizovaných na stacionárních fázích*. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.

Tato diplomová práce popisuje reaktivaci lidských cholinesteráz, které mohou být imobilizovány na různých typech stacionárních fází. Práce se dále věnuje charakterizaci imobilizace a popisu inhibitorů a reaktivátorů.

Experimentální část se zabývá imobilizací enzymu na stacionární fáze, jeho stabilitou a následnou reaktivací pomocí různých oximů. Všechna měření probíhala na základě spektrofotometrických metod s využitím Ellmanovy eseje.

## **Klíčová slova**

Cholinesterázy, reaktivace, imobilizace, inhibice

# **ANNOTATION**

ZHOUF, Daniel. *Reactivation of human cholinesterases immobilized on stationary phases*. Hradec Králové, 2020. Diploma Thesis at Faculty of Science University Hradec Králové. Thesis supervisor PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.

This diploma thesis shows the reactivation of human cholinesterases, which can be immobilized on different types of stationary phases. The work also deals with the characterization of immobilization and the description of inhibitors and reactivators.

The experimental part is performed by immobilization of the enzyme on a stationary phase, its stability and subsequent reactivation with various oximes. All measurements began using spectrophotometric methods using Ellman's essay.

## **Keywords**

Cholinesterases, reactivation, immobilization, inhibition

# OBSAH

Seznam zkratek.....	- 10 -
Úvod.....	- 11 -
1 Teoretická část.....	- 12 -
1.1 Enzymy.....	- 12 -
1.1.1 Mechanismus působení enzymové reakce .....	- 12 -
1.1.2 Cholinesterázy.....	- 13 -
1.1.2.1 Acetylcholinesteráza .....	- 14 -
1.1.2.2 Butyrylcholinesteráza.....	- 16 -
1.2 Inhibitory cholinesteráz.....	- 17 -
1.2.1 Karbamáty.....	- 17 -
1.2.2 Organofosfáty .....	- 19 -
1.2.2.1 Interakce organofosfátového inhibitoru s AChE.....	- 21 -
1.2.3 Inhibitory cholinesteráz jako farmakoterapeutika.....	- 23 -
1.3 Reaktivace a reaktivátory cholinesteráz.....	- 24 -
1.3.1 Obecný mechanismus reaktivace a proces stárnutí .....	- 25 -
1.3.2 Přehled nejzákladnější reaktivátorů .....	- 28 -
1.3.3 Dávkování jednotlivých reaktivátorů .....	- 29 -
1.3.4 Léčba a inovace v oblasti reaktivátorů.....	- 29 -
1.4 Imobilizace enzymů.....	- 32 -
1.4.1 Existující typy imobilizací.....	- 33 -
1.4.2 Imobilizace na magnetické nosiče.....	- 35 -
1.4.2.1 Imobilizace enzymů na magnetické částice.....	- 36 -
1.4.3 Magnetické techniky pro izolaci a čištění proteinů a peptidů.....	- 37 -
1.5 Metody pro stanovení biologické aktivity enzymu.....	- 38 -
1.5.1 Ellmanův esej.....	- 38 -



2	Cíle diplomové práce .....	- 40 -
3	Experimentální část.....	- 41 -
3.1	Materiály a metody .....	- 41 -
3.1.1	Použité přístroje.....	- 41 -
3.1.2	Použité chemikálie a vzorky .....	- 41 -
3.1.3	Pracovní postupy .....	- 42 -
3.1.3.1	Imobilizace na různé stacionární fáze .....	- 42 -
3.1.3.2	Rychlost imobilizace na His-Trap částice .....	- 43 -
3.1.3.3	Stabilita imobilizovaného enzymu .....	- 43 -
3.1.3.4	Inhibice imobilizovaného enzymu .....	- 44 -
3.1.3.5	Reaktivace inhibovaného enzymu.....	- 44 -
3.1.3.6	Stanovení enzymové aktivity.....	- 44 -
3.2	Výsledky a diskuze.....	- 45 -
3.2.1	Imobilizace na různé stacionární fáze .....	- 45 -
3.2.2	Rychlost imobilizace na His-Trap magnetické částice.....	- 49 -
3.2.3	Stabilita imobilizovaného enzymu na His-Trap částicích .....	- 51 -
3.2.4	Inhibice imobilizovaného enzymu .....	- 52 -
3.2.5	Reaktivace inhibovaného enzymu.....	- 54 -
3.2.5.1	Reaktivace AChE a BChE.....	- 54 -
3.2.5.2	Reaktivace AChE a BChE s NaCl v Na-fosfátovém pufru .....	- 59 -
4	Závěr .....	- 61 -
5	Seznam zdrojů .....	- 62 -

## SEZNAM ZKRATEK

AChE	acetylcholinesteráza
BChE	butyrylcholinesteráza
ACh	acetylcholin
R <sub>l</sub>	odstupující skupina
AD	Alzheimerova choroba
i.m.	intramuskulárně
i.v.	intravenózně
2-PAM	pralidoxim
BBB	hematoencefalitická bariéra ( <i>Blood Brain Barrier</i> )
CNS	centrální nervová soustava
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
ATCI	acetylthiocholin jodid
BTCI	butyrylthiocholin jodid
NIMP	analog sarinu, 4-nitrofenylisopropylmethylfosfonát
POX	paraoxon
NEMP	analog VX, 4-nitrofenylethylmethylfosfát
NEDPA	analog tabunu, 4-nitrofenylethyldimethylfosfoamidát
TRIS	2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
VX	Ethyl-({2-[bis(propan-2-yl)amino]ethyl}sulfanyl) (methyl)fosfinát
His-tag	polyhistidinová značka

# ÚVOD

Současná moderní doba nám přináší neustálý rozvoj průmyslu, ať už potravinářského, farmaceutického, chemického anebo jakékoliv jiného. Nepřetržitý rozvoj všech odvětví průmyslu nám poskytuje nejen modernizaci přístrojů, pracovních postupů, způsobů zpracování, ale i celou řadu nových chemických látek.

Existuje velké množství chemických látek, které jsou připravovány, vyráběny, zpracovávány a skladovány v různých institucích, kde je s nimi, jakkoliv neodborně nakládáno. S nebezpečnými účinky veškerých chemických látek se může člověk setkat nečekaně kdekoliv a kdykoliv. V každém případě se riziko zvyšuje výskytem nebezpečných látek v blízkosti obydlených částí měst anebo skladováním ve velkém množství, které se někdy blíží až hodnotám zakázaným. Velké zastoupení těchto chemických látek tvoří například chlor, fosgen nebo sirouhlík. Většina chemických látek má snadnou dostupnost, například fosgen můžeme najít v chemických výrobních procesech, a s chlórem se setkáme běžně v bazénech.

Některé látky vykazují velmi nebezpečné vlastnosti, které určitým způsobem ovlivňují chod organismu a představují pro něj nemalou zátěž a mohou ohrozit zdraví a život člověka, popřípadě zapříčinit rozsáhlá závažná onemocnění. Do této kategorie spadají látky, které ovlivňují funkce acetylcholinesterázy. Jedná se především o nervově paralytické bojové látky případně pesticidy. Mezi nejznámější nervově paralytické bojové látky patří organofosfáty, např. sarin, soman a tabun. Nejčastěji se do organismu dostávají inhalační cestou. Po inhalaci se velice rychle vstřebávají do krevního oběhu a jsou transportovány po celém organismu.

Je důležité uvědomit si, že účinek každé toxické látky na živý organismus závisí na spoustě faktorech, kterými jsou druh a struktura látky, její množství, koncentrace, cesta vstupu do organismu a čas, jak dlouho byl organismus dané látce vystaven. Zmíněné faktory mohou značně ovlivnit reaktivaci lidských cholinesteráz imobilizovaných na stacionárních fázích.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

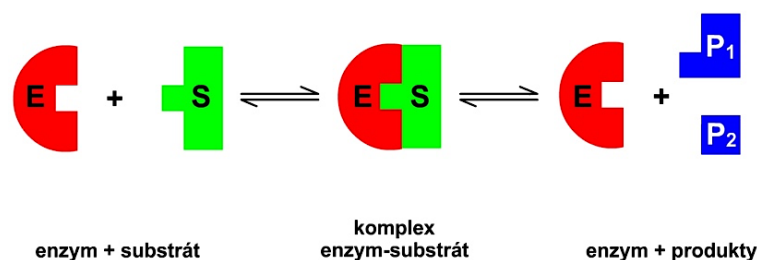
## 1.1 ENZYMY

Enzymy jsou z chemického, ale i biologického hlediska specifické biokatalyzátory, které se podílejí na řízení a koordinaci biochemických reakcí v každém živém organismu. Ve své podstatě se jedná o složené proteiny, které jsou schopny snížit aktivační energii některých chemických pochodů a zároveň je tímto způsobem i urychlit. Enzymy se objevují ve všech živých systémech a předpokládá se, že i u těch nejjednodušších buněk se může nacházet až 300 různých enzymů, které ovlivňují chod metabolických reakcí v organismu<sup>1, 2, 3</sup>.

Kromě bílkovinné složky mohou enzymy obsahovat i nebílkovinnou část. Podle jejího výskytu lze enzymy rozdělit na enzymy jednoduché a složené. Jednoduché enzymy obsahují vždy pouze bílkovinnou část, např. hydrolázy – pepsin, trypsin, ribonukleáza. Složené enzymy obsahují kromě bílkovinné části – apoenzym, který je sám o sobě neúčinný a dále obsahují i nebílkovinnou složku – kofaktor. Spojením kofaktoru a apoenzymu dochází ke vzniku aktivní molekuly enzymu, kterému se říká holoenzym. Příkladem kofaktorů mohou být ionty kovů:  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  nebo organické molekuly, např. různé deriváty vitaminů<sup>1, 2, 3</sup>.

### 1.1.1 Mechanismus působení enzymové reakce

Na bílkovinnou část aktivního centra jsou navázány strukturní jednotky substrátu, tak vzniká enzym-substrátový komplex. Vytvořením enzym-substrátového komplexu se mnohonásobně zvýší koncentrace substrátu na aktivním centru, a to vede ke zvýšení rychlosti chemické reakce v souladu s kinetickou rovnicí. Připojením strukturních jednotek substrátu k aktivnímu centru se zeslabí některé chemické vazby ve strukturních jednotkách substrátu. Chemické vazby proto pro své rozštěpení potřebují podstatně nižší aktivační energii a vznikem enzym-substrátového komplexu se výrazně sníží aktivační energie dané reakce. Díky tomu se enzym-substrátový komplex po vzniku nových chemických vazeb rozpadá na enzym a produkty (Obrázek 1)<sup>1, 2, 3</sup>.

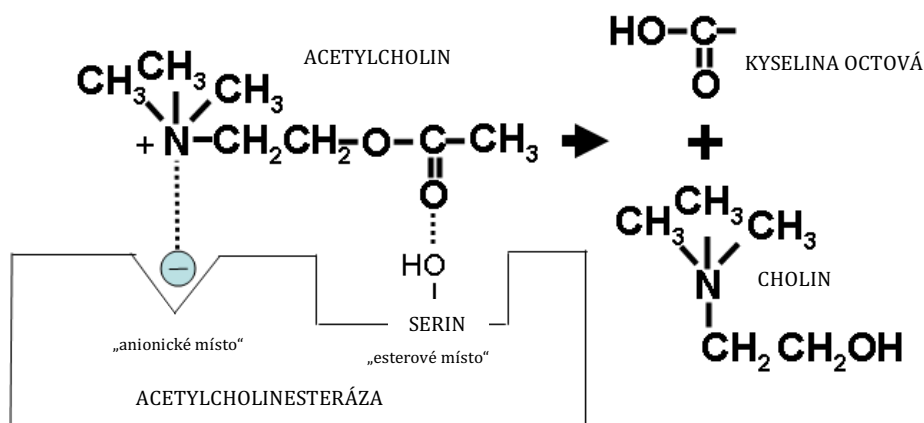


*Obrázek 1 Průběh enzymové reakce.<sup>3</sup>*

### 1.1.2 Cholinesterázy

Cholinesterázy jsou specifickou malou skupinou enzymů, které řadíme mezi serinové hydrolázy. Jejich funkce spočívá ve štěpení esteru cholinu. Každý enzym poskytuje dvě důležitá místa, tzv. aktivní centra. Jedno centrum se označuje jako anionické a druhé jako esterické.

A právě toto esterické centrum je tvořeno triádou aminokyselin a to serinem, histidinem a glutamátem. Důležitý je především serin, u něhož dochází k navázání chemické komponenty, substrátu a následně k její přeměně na látku úplně jinou, produkt. Esterické místo hraje důležitou roli při intoxikaci. Zejména u obratlovců, samozřejmě i u člověka, rozeznáváme dva typy těchto esterů a podle toho, který ester se štěpí, rozeznáváme acetylcholinesterázu (AChE) a butyrylcholinesterázu (BChE). Jedná se o dva velice rozdílné enzymy, které jsou vždy kódované samostatnými geny. Mezi těmito enzymy jsou zřetelné rozdíly. AChE a BChE se liší zejména ve svých strukturách a ve substrátové specifitě. AChE štěpí výhradně estery s malým acylovým zbytkem jako je výše zmíněný acetylcholin (ACh), oproti tomu BChE přednostně štěpí estery s podstatně větším acylovým zbytkem. Příkladem větších acylových zbytků mohou být například butyrylcholin, propionylcholin nebo benzoylcholin. Když se podíváme na substrátovou specifitu, víme, že cholinesterázy štěpí především estery cholinu, přičemž obě mohou štěpit ACh, což je molekula skládající se z kyseliny octové a cholinu. Funkcí acetylcholinu je především vazba na acetylcholinový receptor a poté funguje jako neuromediátor (Obrázek 2)<sup>4,6,7</sup>.



**Obrázek 2** Vazba acetylcholinu na AchE<sup>5</sup>.

Jak již bylo řečeno, ACh je důležitým přenašečem nervových vzruchů. Jeho biosyntézou a uvolněním v místě nervového zakončení se přenáší vzruch, dokud ho za normálního stavu nerozloží cholinesteráza. Je-li inhibována, pak ACh zůstává. Nervový vzruch se neustále přenáší, a to má za následek zvýšenou slinnou sekreci, bronchokonstrikci, respirační selhání, záškuby svalových vláken a svalovou slabost, která vede v rozvoji svalových křečí a může vést až k poruše chování. Těmito způsoby se projevuje otrava např. insekticidy a organofosfáty<sup>3,4</sup>.

AChE představuje klíčovou úlohu především na synapsích nervového systému nebo na nervosvalové ploténce a její možná inhibice má pro organismus závažné až i trvalé následky<sup>4,6,7</sup>. Na rozdíl od AChE nejsou funkce u BChE do dnešních dnů zcela vysvětleny, ale jedním z pravděpodobných úkolů BChE je zmenšování toxicity u xenobiotik. Je známo, že organismus se se spoustou xenobiotik během celého života dostává do úzkého kontaktu. Mezi tyto látky, které jsou hydrolyzované BChE, patří především léčiva (viz. 1.1.2.2. Butyrylcholinesteráza). Změny v plazmatické koncentraci BChE jsou rovněž spojovány s různými patologickými stavy jako je Alzheimerova choroba (AD), dyslipidémie, diabetes mellitus i jiné<sup>4,6,7</sup>.

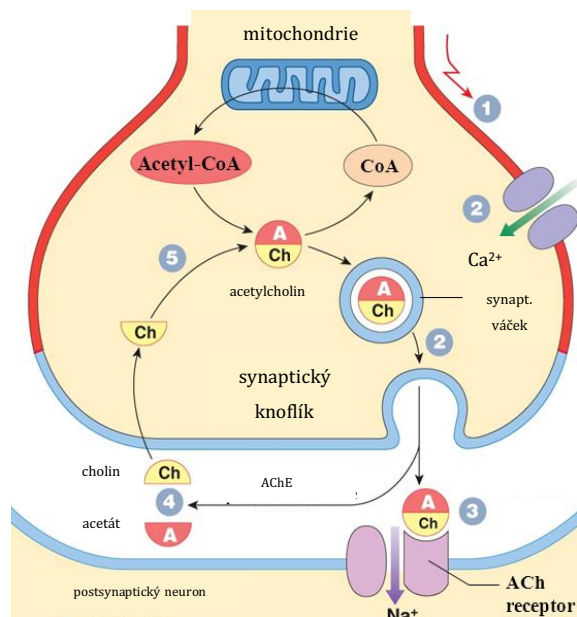
### 1.1.2.1 Acetylcholinesteráza

AChE se volně nevyskytuje v plazmě, ale je přítomna v červených krvinkách, mozku a nervech. AChE můžeme označit i druhotným názvem a to buď pravá cholinesteráza, nebo specifická cholinesteráza. Biologickou úlohou AChE je ukončení přenosů na cholinergních synapsích v nervovém systému rychlou hydrolyzou neurotransmiteru, ACh. AChE je jedním z nejdůležitějších enzymů pro

nervovou reakci a funkci. AChE je spojována s AD a Parkinsonovou chorobou a s mnoha dalšími degenerativními poruchami<sup>8,9,10</sup>.

ACh se řadí do skupiny běžných neurotransmiterů, které se nachází v centrálním a periferním nervovém systému. Tzn. že když se acetylcholin uvolní z axonu, pohybuje se přes synaptickou šterbinu a váže se k receptoru na druhé straně synapse. V periferním nervovém systému se ACh nachází v „neuromuskulárním přechodu“, kde řídí svalovou kontrakci<sup>8</sup>. Neuron přenášející informace se nazývá presynaptický neuron a neuron přijímající informace je postsynaptický neuron. Neuron předává informace jinému neuronu přes synapsi. Cholinergní synapse je specializované spojení dvou neuronů, kde jsou nervové impulzy přenášeny uvolňováním neurotransmiteru, acetylcholinu, z jednoho neuronu do jiného neuronu nebo do neuronální buňky<sup>11</sup>. Přenos ACh v nervové synapsi je popsán na obrázku 3.

Ve chvíli, kdy se nervový signál blíží nervovému zakončení otevírá napětěově řízené  $Ca^{2+}$  kanály v synaptickém knoflíku (na obrázku pod číslem 1). Ionty  $Ca^{2+}$  následně spouští uvolňování neurotransmiteru (pod číslem 2). Hned po uvolnění neurotransmiteru se ACh váže na receptory sodíkových kanálů, což způsobuje odstupňovanou depolarizaci (pod číslem 3). Následně se ACh rozdělí na acetát a cholin pomocí enzymu AChE (pod číslem 4). Nakonec je cholin reabsorbován a používán k syntéze nových molekul AChE (pod číslem 5)<sup>11</sup>.



**Obrázek 3** Přenos ACh v cholinergní synapsi<sup>11</sup>.

### 1.1.2.2 Butyrylcholinesteráza

Jedná se o enzym nacházející se v krevní plazmě, játrech, slinivce břišní, střevní sliznici a bílé hmotě centrálního nervového systému. Můžeme se setkat také s jiným druhem označení, jako je nespecifická cholinesteráza nebo pseudocholinesteráza. BChE metabolizuje butyrylcholin čtyřikrát rychleji v porovnání s metabolismem ACh.

U lidí je BChE syntetizována v mnoha tkáních, včetně jater, plic, srdce a mozku. V současné době je předpokládána role pro BChE navržena například v metabolismu lipoproteinů, udržování myelinu nebo jako „vyčytávač“ toxických molekul a další. V lidském mozku se enzym nachází v neuronech a v gliové tkáni, což je podpůrná tkáň, která společně s neurony vytváří nervový systém. Množství BChE se v mozku s věkem zvyšuje a hraje důležitou roli v metabolismu některých sloučenin. Pokud se dostaví změna hladiny BChE nebo velice nízká hladina AChE dochází ke změnám v klinických stavech, jako je Alzheimerova choroba. U AD je AChE ztracena až z 85 %, zatímco hladina BChE stoupá s progresí této nemoci<sup>10</sup>. BChE umožňuje i hydrolýzu lokálních anestetik – prokain, ametokain, kokain nebo hydrolýzu některých dalších sloučenin, jako je kyselina acetylsalicylová. BChE zároveň urychluje metabolismus kokainu, proto může být BChE užitečná pro léčbu závislosti na kokainu<sup>8, 10, 12, 13, 14</sup>.



## 1.2 INHIBITORY CHOLINESTERÁZ

Organofosfátové a karbamátové inhibitory cholinesteráz jsou skupinou látek s určitými společnými znaky mechanismů toxicity. Obecný mechanismus je založen na kovalentní vazbě (esterifikace) na serin v esterovém místě aktivního centra AChE a BChE. Podle dávky a distribuce v organismu pak dochází ke změnám v centrální, ale i periferní nervové soustavě. Může nastat cholinergní krize anebo stav život ohrožující, který je spojen především s dysfunkcí dýchacího centra<sup>8,9</sup>.

Klasifikace inhibitorů cholinesteráz je možná z různých hledisek, zohledňujících jejich chemickou strukturu, toxické účinky na organismy, chování v prostředí apod. Sloučeniny se často nacházejí v pesticidech nebo jako nervové plyny v chemické válce. S ohledem k praktickému použití lze pesticidy rozdělit na: herbicidy (proti plevelným rostlinám), fungicidy (proti houbovým chorobám), insekticidy (proti hmyzu), akaricidy (proti roztočům), moluskocidy (proti měkkýšům) a nematocidy (proti háďátkům). Do kategorie nejdůležitějších inhibitorů AChE patří organofosfáty a karbamáty<sup>8</sup>.

### 1.2.1 Karbamáty

Chemicky se jedná o estery kyseliny karbaminové nebo karbamidové. Některé typy karbamátů jsou velmi toxické a spekulovalo se o jejich použití. Karbamáty působí karbamylací AChE a následným zrušením dané fyziologické funkce. Nejdéle známým a nejrozšířenějším inhibitorem AChE je přírodní alkaloid fysostigmin<sup>8,9</sup>.

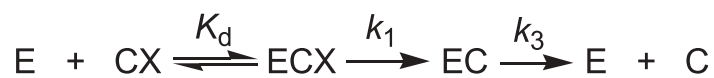
Fysostigmin pochází z fazole (*Physostigma venenosum*) a s jeho objevem byl také nalezen význam N-methylkarbamové skupiny jako základní složky pro biologickou aktivitu. Na základě tohoto objevu byly syntetizovány tisíce dalších karbamátů (převážně se jedná o N-methyl nebo N, N dimethylkarbamáty)<sup>8,9</sup>.

Tyto látky jsou díky polarizovatelnému dusíku za fyziologických podmínek v ionizované formě, která znemožňuje jejich distribuci přes myelinové pochvy a hematoencefalickou bariéru. Některé karbamáty však v omezené míře mohou prostupovat bariérami. Například rivastigmin, který je užíván ke zmírnění projevů AD, do centrální nervové soustavy prochází. Ve vodném prostředí dochází ke spontánní hydrolýze vazby, mezi enzymem a karbamátem, a k odštěpení

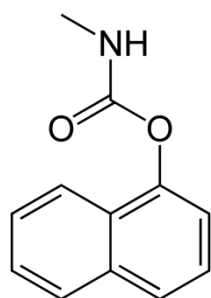
karbamátového zbytku. Následkem tohoto se cholinesterasa stává opět aktivní a může plnit svou fyziologickou úlohu<sup>8,9</sup>.

Karbamáty našly své uplatnění jako insekticidy (karbaryl, moban, dimetan, isolan), ostatní se vyskytují v medicíně (miotin, pyridostigmin, syntostigmin atd.).

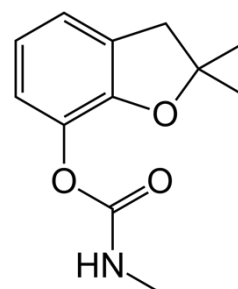
Inhibice AChE karbamátem:



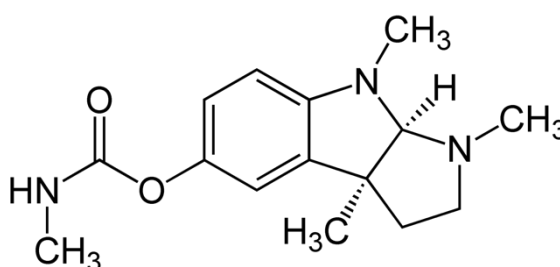
Enzym (E) a karbamát (CX) spoluvytvářejí meziprodukt (ECX) s disociační konstantou  $K_d$ . Následně tento komplex ztrácí odstupující skupinu karbamátu (X) a výsledkem je karbamoylovaný enzym (EC). Stabilita karbamoylovaného enzymu (EC) závisí vždy na charakteru karbamátu<sup>8, 17</sup>. Důležité chemické struktury některých karbamátů a karbamátových pesticidů jsou uvedeny na obrázku 4.



KARBARYL



KARBOFURAN

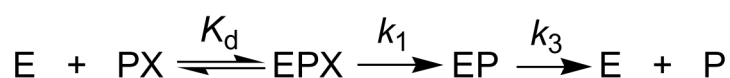


FYSOSTIGMIN

**Obrázek 4** Chemické struktury karbamátů a karbamátových pesticidů<sup>8</sup>.

### 1.2.2 Organofosfáty

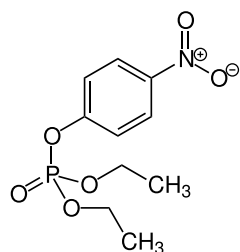
Organofosfáty se velice často připravují synteticky. Jako jediný známý přírodní organofosfát je anatoxin-a, který je toxickým produktem některých sinic. První vysoce toxické organofosfáty byly připraveny v Německu a Velké Británii. Němečtí vědci zpozorovali, že tyto organofosfátové sloučeniny mohou být jedovaté pro organismus. V roce 1936 byla poprvé vyrobena sloučenina fosforu s extrémně vysokou toxicitou. Tato sloučenina fosforu byla pojmenována jako tabun, později byla označena jako nervová látka<sup>8</sup>. Jejich rozsáhlý výzkum a vývoj pokračoval v páté a šesté dekádě minulého století. Problémy a nebezpečí, které jsou s těmito sloučeninami spjaty, jak pro životní prostředí anebo pro civilizaci, jsou velmi dobře známy, ale nejsou úplně dořešeny. V následujícím schématu vidíme, jak organofosfáty interagují s enzymem:



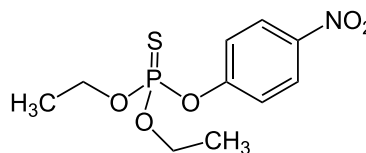
Enzym (E) vytváří s organofosfátem (PX) komplex (EPX) s disociační konstantou ( $K_d$ ). Vytvořený komplex (EPX) ztrácí odstupující skupinu organofosfátu (X) a konečným produktem tohoto procesu je fosforylovaný enzym (EP). Fosforylovaný enzym (EP) je zpravidla stabilní, jeho rychlost defosforylace je velmi pomalá a je charakterizovaná rychlostní konstantou ( $k_3$ ). Inhibice AChE organofosfáty je prakticky nevratná a defosforylační krok této reakce je zanedbatelný<sup>8</sup>.

V dnešní době se využívá řada organofosfátů v zemědělství a lesnictví, jedná se o tzv. organofosfátové pesticidy. Jsou to látky, které jsou po dlouhou dobu využívány v boji s různými „nepřáteli“, převážně se škůdci. Velký protest proti používání organofosfátových pesticidů byl z důvodu jejich vysoké toxicity pro savce. Primárními projevy akutní toxicity jsou projevy cholinergní, neurotransmitterové, hyperaktivity. Některé organofosfáty se řadí do skupiny zakázaných a nesmějí se dnes používat, patří sem např. schradan, paraoxon, parathion. Pro sloučeniny jako je malant, diazinon, fenitrothion neplatí stejná omezení, proto se mnoho z nich doposud používá<sup>8</sup>. Organofosfáty jsou také spojeny s rizikem vzniku rakoviny, a to

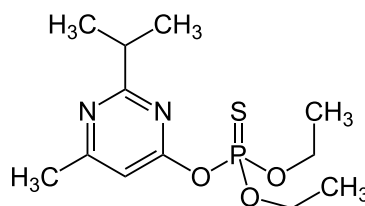
nejčastěji rakoviny hormonálního původu, např. rakoviny prsu, vaječníků a štítné žlázy<sup>15,16</sup>. Chemické struktury některých významných organofosfátů a organofosfátových pesticidů jsou uvedeny na obrázku 5.



PARAOXON



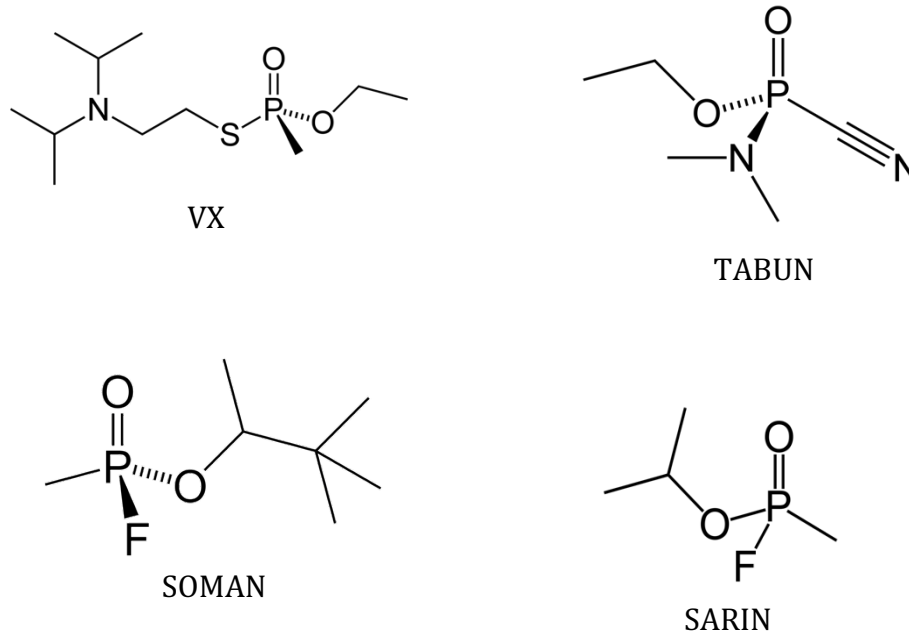
PARATHION



DIAZINON

**Obrázek 5** Struktury organofosfátů a organofosfátových pesticidů<sup>8</sup>.

Nervově paralytické látky, které mohou mít smrtelné následky, tu mají zcela dominantní roli. Organofosfátové nervové látky získaly své jméno, protože ovlivňují přenos nervových impulsů v celém nervovém systému. Chovají se velice stabilně, ale za to i vysoce toxicky. Dochází totiž k rychlým účinkům, které se projevují po absorpci kůží nebo respirací<sup>8</sup>. Chemické struktury některých organofosfátových nervových činidel jsou uvedeny na obrázku 6<sup>8</sup>.

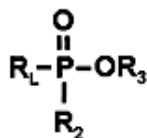


**Obrázek 6** Struktury organofosfátových nervových látek<sup>8</sup>.

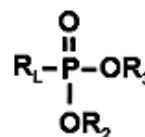
### 1.2.2.1 Interakce organofosfátového inhibitoru s AChE

Obecná struktura organofosfátu:

a)

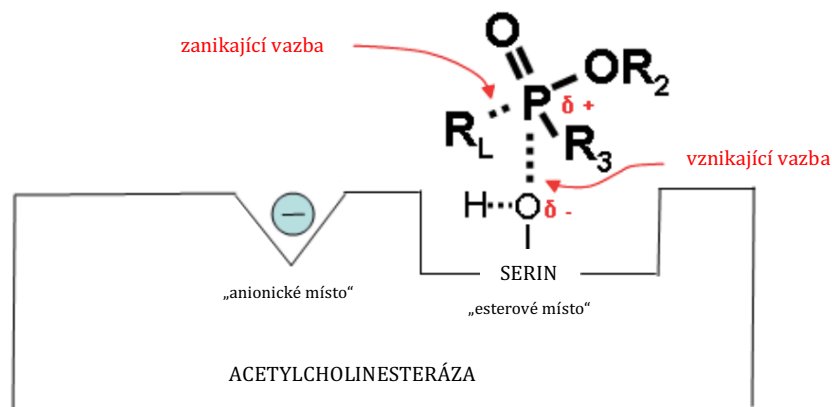


b)



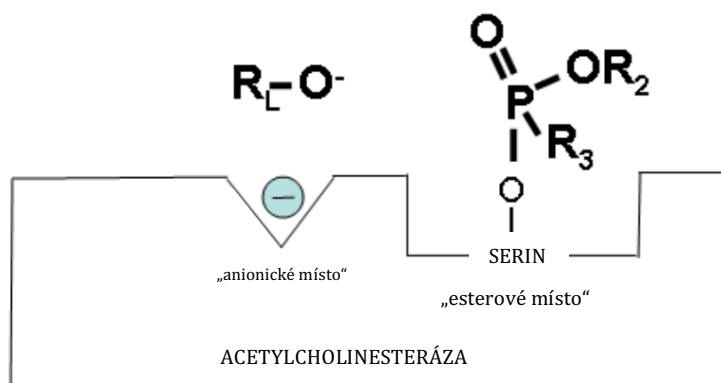
**Obrázek 7** Chemická struktura organofosfátů: a) „insekticid“, b) „nervový reagent“<sup>8</sup>.

R<sub>2</sub> a R<sub>3</sub> jsou nejčastěji různé alifatické alkyly. Odstupující skupina (R<sub>L</sub>) při interakci AChE a organofosfátu a dokáže odstoupit. Zbývající acyl se poté naváže na esterické místo. R<sub>L</sub> tedy může být F, Cl, Br, I, nitrilová skupina atd. Inhibitor cholinesterázy je schopen se navázat na hydroxy skupinu v aktivním místě AChE (obrázek 8). Tímto způsobem dochází k intoxikaci organismu<sup>5, 8, 17</sup>.



**Obrázek 8** Přitažlivost inhibitoru na AChE<sup>5</sup>.

Vazbou organofosfátu do esterového místa AChE dochází ke vzniku kovalentní vazby. V aktivním místě dochází k fosforylaci, což odpovídá acetylaci<sup>5, 8, 17</sup>.

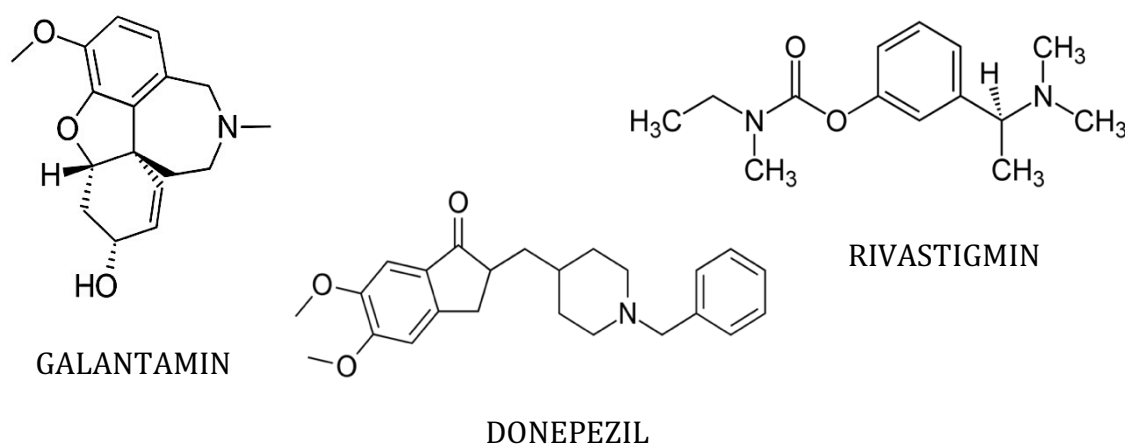


**Obrázek 9** Inhibitor navázaný v aktivním místě cholinesterázy<sup>5</sup>.

Ihned po připojení organofosfátu k aktivnímu místu AChE se tato oblast stává zablokovanou pro acetylcholin a není tedy k dispozici pro hydrolýzu (obrázek 9). ACh není dostatečně schopný vytlačit připojený organofosfát od enzymu. Toto vše vede k nahromadění nadměrného množství neurotransmiteru, ACh, v kosterním nervosvalovém spojení a synapsích, kde se nacházejí receptory pro ACh<sup>5, 8, 17</sup>.

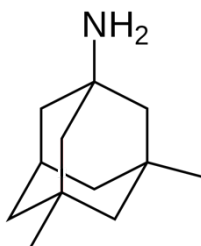
### 1.2.3 Inhibitory cholinesteráz jako farmakoterapeutika

Inhibitory cholinesteráz se v současné době dají klinicky využít. Můžeme se setkat s tím, že efektivita jednotlivých inhibitorů cholinesteráz není u všech pacientů totožná, ale existují rozdíly v oddálení i v rychlosti progresu symptomů AD. Inhibitory cholinesteráz vedou k zablokování enzymů, odbourávající v synaptické štěrbině ACh. Tímto způsobem napomáhají zlepšovat porušenou acetylcholinergní transmissi<sup>18,19,20</sup>. V dnešní době se používají 3 typy klinických přípravků – Donepezil, Galantamin a Rivastigmin (obrázek 10)<sup>21,22,23</sup>.



**Obrázek 10** Chemická struktura klinických přípravků pro léčbu AD<sup>22</sup>.

Dalším používaným klinickým přípravkem je, tzv. MEMANTIN (*Ebixa*) (obrázek 11). Tento přípravek je parciální inhibitor NMDA receptorů. Receptory jsou spojeny s otevřením iontových kanálů pro  $\text{Ca}^+$  a  $\text{Na}^+$  ionty. U AD dochází v pozdějších stadiích k tzv. excitotoxicitě, nadměrnému uvolňování excitačních aminokyselin – glutamát, aspartát, které pak vedou k hyperexcitaci svých receptorů včetně NMDA (N-metyl-D-aspartátového) typu. Aktivita je ještě zvýšena tím, že v některých oblastech mozku dochází k poklesu zpětného vychytávání glutamátu. A následně dochází k buněčné smrti neuronu<sup>19</sup>.

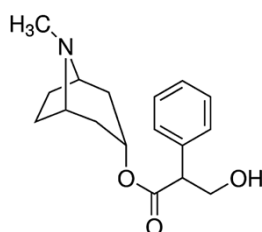


**Obrázek 11** Chemická struktura MEMANTINU<sup>19</sup>.

### 1.3 REAKTIVACE A REAKTIVÁTORY CHOLINESTERÁZ

Po fosforylaci katalytického zbytku serinu v AChE dochází v mozkových synapsích a neuromuskulárních spojeních k akumulaci ACh, což vede k cholinergní krizi a nakonec smrti<sup>16</sup>. Některé sloučeniny mohou výrazně urychlit spontánní regeneraci fosforylované AChE. Od objevu chemických nervových činidel bylo vyvinuto značné úsilí k vývoji nových a účinných léčiv pro jejich léčení. Reaktivaci inhibované AChE je možné urychlit látkami, které se nazývají reaktivátory. Terapeutický význam reaktivátorů stimuloval výzkum, který vyvrcholil objevem 2-pyridinaldoxim methylchloridu (2-PAM). 2-PAM se stal neformálním standardem, na jehož základě se měří účinnost ostatních reaktivátorů<sup>8, 9, 24</sup>.

Nejznámějšími reaktivátory jsou oximy odvozené od pyridinu. Z nichž některé našly uplatnění v lidské medicíně jako protijedy právě při otravě organofosfáty. Léčba při otravě organofosfáty je zaměřena na minimalizaci cholinergní krize po deaktivaci AChE v neurosynaptických a neuromuskulárních spojeních nebo na odstranění organofosfátu určitým procesem. Otrava organofosfáty je v současné době léčena kombinací léků (např. atropin, obrázek 12) a oximů, např. pralidoxim (2-PAM)<sup>8, 9, 24</sup>.



**Obrázek 12** Chemická struktura atropinu<sup>24</sup>.

Kromě 2-PAM do skupiny nejznámějších reaktivátorů patří trimedoxim, obidoxim a asoxim. Tyto reaktivátory se používají k vývoji léčebných postupů, kde je dosaženo významného pokroku. Jenomže vědce stále trápí značné problémy, jedním z nich je, že zatím neexistuje žádný reaktivátor cholinesteráz, který by byl univerzální pro větší skupiny organofosfátů. Reaktivátory jsou stále potřeba, a proto jsou vyvíjeny další nové reaktivátory cholinesteráz<sup>8, 9, 24</sup>.



### 1.3.1 Obecný mechanismus reaktivace a proces stárnutí

Velmi zjednodušeně reaktivace pomocí oximů probíhá podle následujícího schématu:



Fosforylovaný enzym (EP) vytváří s reaktivátorem (R) přechodný komplex (EPR). Produktem této reakce je nově regenerovaný enzym (E) a fosforylovaný oxim (PR). Fosforylovaný enzym (EP) se může rozkládat během několika minut, popř. hodin<sup>8</sup>.

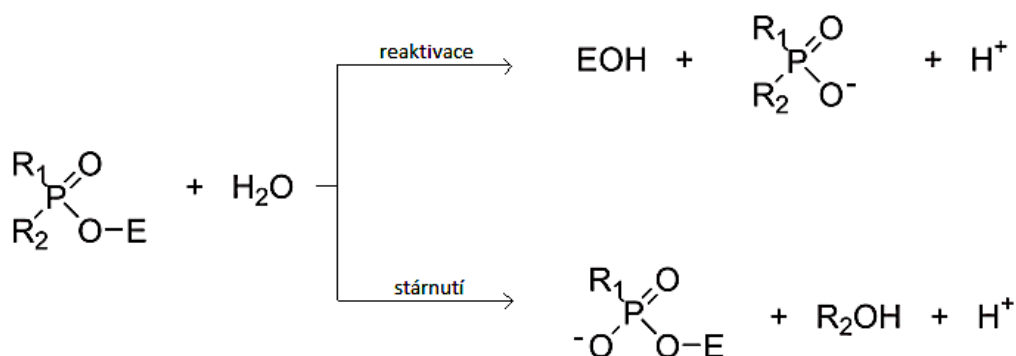
Při reaktivaci enzymu mohou nastat následující případy – vznik spontánní hydrolýzy anebo vznik dealkylace, tzv. stárnutí enzymu („aging“, obrázek 13). V procesu stárnutí se jedná o chemickou reakci, při které je inhibovaná AChE pozměněna, takže je účinku reaktivátorů nepřístupná. Účinkem vody dochází k odštěpení molekuly alkoholu. V takovémto případě je enzym trvale inhibován a neregeneruje se ani při využití reaktivátorů, dá se tedy říci, že dochází k výraznému ovlivnění průběhu léčby. Rychlost dealkylace inhibované AChE závisí na době interakce enzymu s nervově paralytickou látkou, ale také na chemické struktuře inhibitoru<sup>22</sup>.

U spontánní hydrolýzy dochází k defosforylaci za účinku vody a obnovení enzymatické aktivity. Menším nedostatkem tohoto procesu je, že daná reakce probíhá velmi pomalu (obrázek 13).

Z nervově paralytických látek velmi rychle dealkyluje AChE, která je zainhibovaná somanem<sup>8, 18, 26</sup>. Poločasy stárnutí některých vybraných inhibitorů se podstatně mění a každý inhibitor má tuto hodnotu odlišnou<sup>22</sup>:

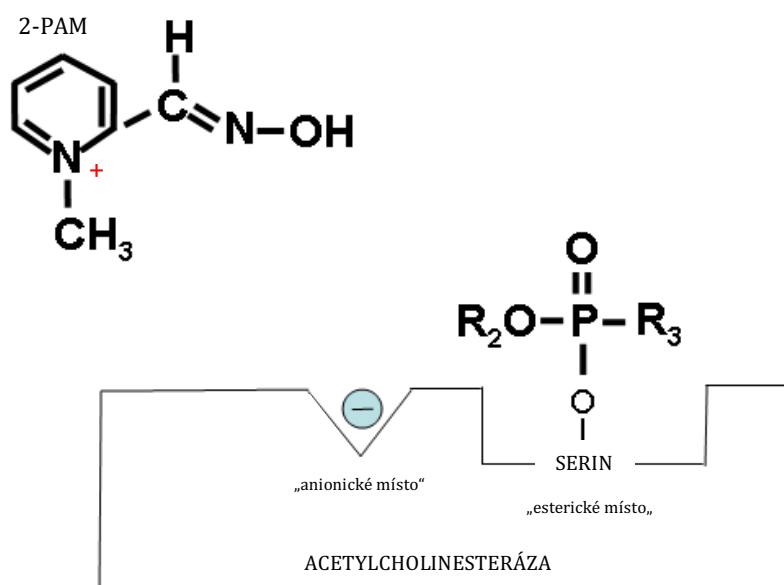
- Soman            2 minuty
- Sarin            5 hodin
- VX              přes 40 hodin

Akutní intoxikace somanem je považována za léčitelnou otravu. Oproti tomu pro akutní intoxikace látkou VX je typická velmi pomalá dealkylace a proto je tato intoxikace velmi dobře léčitelná.



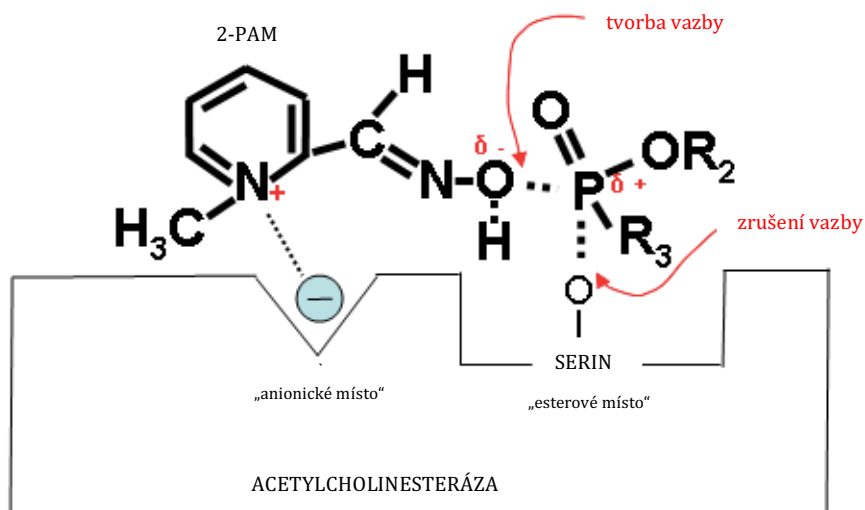
**Obrázek 13** Obecný mechanismus pro porovnání procesu reaktivity a stárnutí<sup>8</sup>.

Běžným a účinným reaktivátorem je 2-PAM. Některé studie naznačují, že 2-PAM je daleko bezpečnějším lékem, než je např. obidoxim. Ve studiích s lidským organismem se u některých pacientů léčených obidoximem objevily i různé vedlejší komplikace. Jednalo se převážně o problémy hepatotoxické. U některých z nich se tento stav zhoršoval a měl fatální následek, kterým bylo úmrtí organismu. Naopak u pacientů léčených 2-PAM se hepatotoxicita neprojevila<sup>16</sup>. Podrobnější mechanismus reaktivity je vyobrazen níže a začíná inhibovanou cholinesterázou (obrázek 14)<sup>26</sup>.



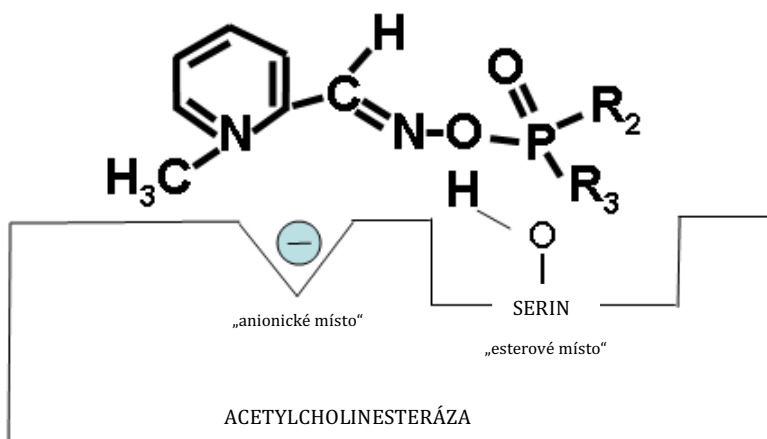
**Obrázek 14** AchE připravená na reaktivaci 2-PAM<sup>26</sup>.

2-PAM ve své struktuře obsahuje pozitivně nabitý kvartérní dusík. 2-PAM je přitahován do anionického místa cholinesterázy. Oximová funkční skupina reaktivátoru reaguje s inhibítorem nukleofilním způsobem (obrázek 15)<sup>26</sup>.



Obrázek 15 2-PAM reagující s inhibítorem<sup>26</sup>.

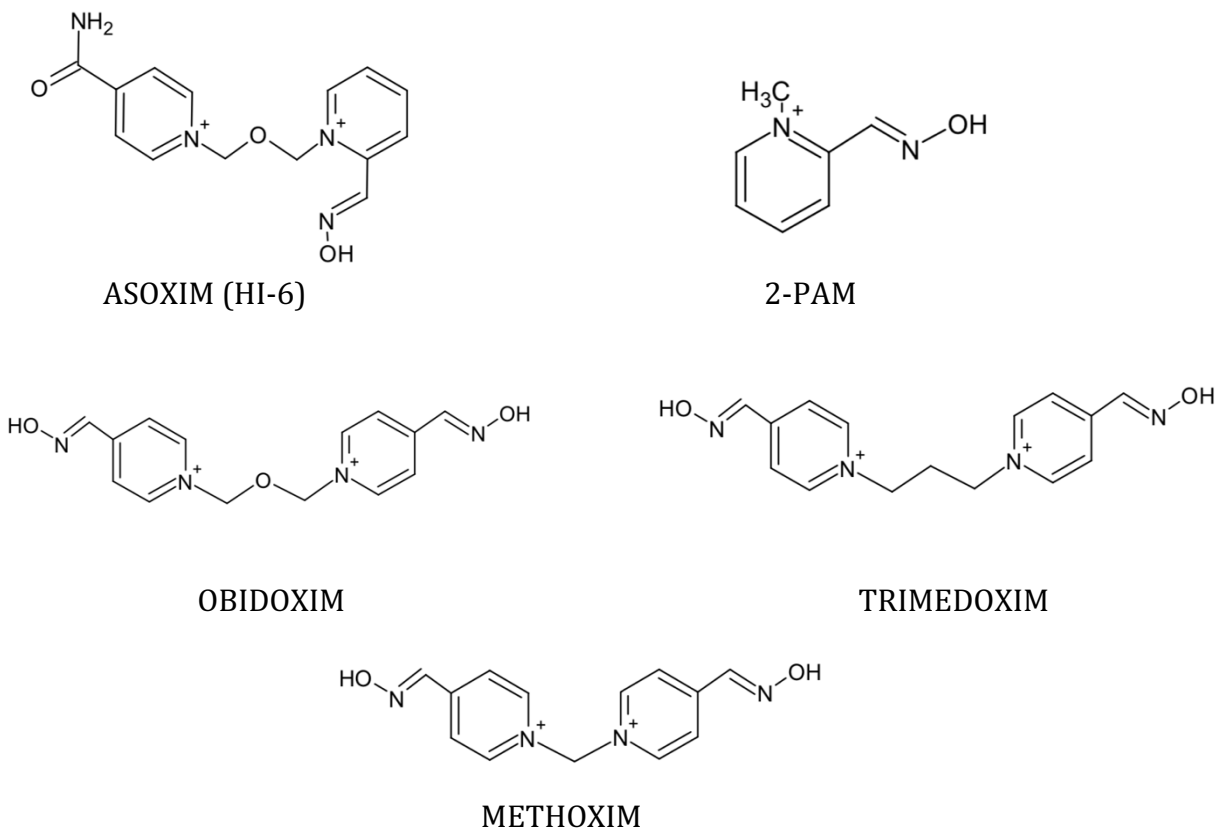
V průběhu reaktivace dochází ke zrušení vazby mezi inhibítorem a esterickým místem cholinesterázy (vazba P-O). Ihned dochází k vytvoření vazby mezi 2-PAM a inhibítorem, viz. obrázek 15. Následně na obrázku 16 je vyobrazena již zregenerovaná cholinesteráza<sup>26</sup>.



Obrázek 16 Regenerovaná cholinesteráza pomocí 2-PAM<sup>26</sup>.

### 1.3.2 Přehled nejzákladnější reaktivátorů

Mezi dosud nejběžnější reaktivátory ve světě patří 2-PAM a obidoxim, ale v této práci byly dále využity i jiné oximy, např. asoxim a trimedoxim. Chemické struktury jednotlivých oximů jsou vyobrazeny v obrázku 17<sup>8, 20</sup>.



**Obrázek 17** Chemické struktury reaktivátorů<sup>8</sup>.

### 1.3.3 Dávkování jednotlivých reaktivátorů

U některých výše uvedených reaktivátorů cholinesteráz byla prokázána poměrně nižší reaktivační schopnost, což vedlo k dalšímu pátrání po novějších, ale také účinnějších oximech, z nichž se právě asoxim dočkal zavedení do léčebné praxe.

Všechny kroky vedoucí k tomuto rozhodnutí byly provedeny na základě experimentálních výsledků a klinických zkoušek. Například jako jedna z mála armád na světě má právě Armáda ČR k dispozici lékové provedení asoximu, který je připraven k okamžitému použití při náhlém zasažení některou nervově paralytickou látkou. Tudíž se asoxim zařadil díky své účinnosti do kategorie prakticky využívaných léků. Ukázka dávkování jednotlivých oximů je zobrazena v tabulce 1<sup>20</sup>.

Tabulka 1 Dávkování reaktivátorů<sup>20</sup>

LÁTKA	DÁVKA v mg	
	i. m.	i. v.
Pralidoxim jodid	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0
Pralidoxim chlorid	0,5 – 1,0	0,5 – 1,0
Obidoxim	0,25	0,25
Trimedoxim	0,2-0,25	0,2-0,25
Methoxim	1,0	1,0
Asoxim	0,8-1,0	0,8-1,0

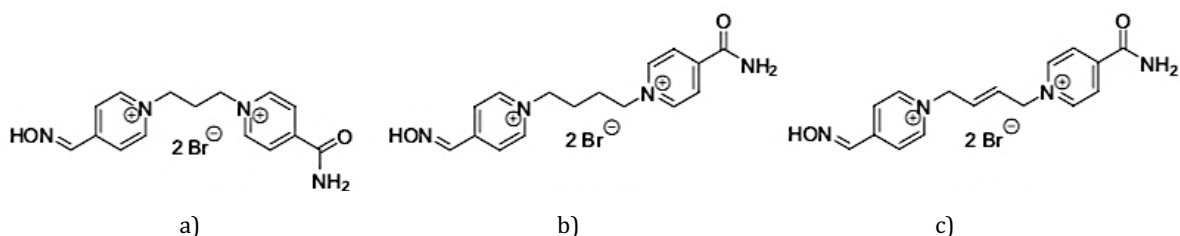
### 1.3.4 Léčba a inovace v oblasti reaktivátorů

Léčba otravy vysoce toxickými organofosfátovými sloučeninami je stále náročným úkolem. Jak bylo řečeno výše, atropin se používá jako základní symptomatické antidotum doplněné oximem.

Četné studie *in vitro* a *in vivo* prokázaly, že oximy 2-PAM a obidoxim mají omezenou účinnost v případě otravy různými nervovými činidly. Tato skutečnost vedla k neustálému úsilí o vývoj účinnějších a širokospektrálnějších oximů. V posledních desetiletích bylo syntetizováno a testováno velké množství sloučenin. Kanada a několik evropských zemí udělují licenci na bispyridinium oxim HI-6 jako organofosfátové antidotum, zatímco bispyridinium bis-oxim MMB-4 je ve vývoji armády USA, aby nahradil 2-PAM<sup>25</sup>. Schopnost látky MMB-4 reaktivovat inhibovanou AChE a chránit zvířata před účinky organofosfátů byla zkoumána asi

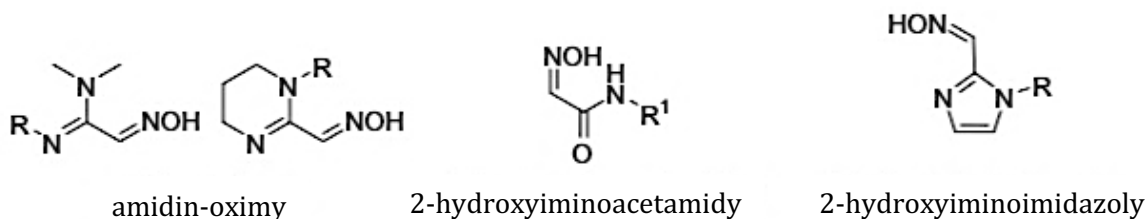
před 50 lety a několik zpráv o tomto oximu bylo publikováno v následujících desetiletích. Experimentální data ukazují, že MMB-4 je daleko lepším oximem než 2-PAM při reaktivaci AChE inhibovaného organofosfáty<sup>28,29,30</sup>.

MMB-4 je reaktivátor, který vykazuje určité specifické vlastnosti. Kombinuje vysokou reaktivitu a nízkou afinitu k AChE inhibované sarinem, cyklosarinem a látky VX. V důsledku vysoké reaktivity MMB-4 lze rychlou reaktivaci inhibované AChE očekávat při odpovídajících koncentracích oximu. K určení *in vivo* toxicity, snášenlivosti a farmakokinetiky látky MMB-4 u lidí jsou nezbytné další studie<sup>27,28</sup>. V posledních několika desetiletích byly objeveny oximy, zejména K027, K048 a K203 (obrázek 18)<sup>26,27,30</sup>.



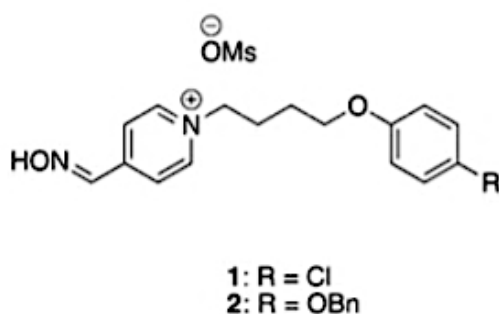
**Obrázek 18** Struktury oximu a) K027 b) K048 c) K203<sup>32</sup>

Tyto oximy jsou silnými reaktivátory AChE inhibovanými různými nervovými činidly, což se odráží v jejich univerzálnosti při reaktivaci. Podle výsledků *in vitro* a *in vivo* bylo zjištěno významné zlepšení reaktivity u komplexu tabun-AChE. Oximy K027, K048 a K203 navíc vykazovaly nízký cytotoxický potenciál v různých buněčných liniích; jaterních, ledvinových anebo krevních buňkách. K048 nevykazoval žádný významný cytotoxický nebo genotoxický potenciál. Ovšem tyto oximy stále nemají tak velký sklon k průchodu hematoencefalickou bariérou (BBB). Velice důležitou vlastností je lipofilita, která vstup usnadňuje, proto byly zavedeny a testovány nenabitě reaktivátory (obrázek 19)<sup>30,32</sup>.



**Obrázek 19** Struktury nenabitých reaktivátorů<sup>32</sup>.

Hlavní výhodou nenabitého reaktivátoru měla být jeho zvýšená propustnost přes BBB a tedy účinnější reaktivace AChE<sup>32, 33</sup>. Bylo vynaloženo značné úsilí na vývoj nových oximů a reaktivátorů, které jsou schopné léčit otravu vícero organofosfáty najednou efektivním způsobem. Teoreticky je toto efektivní řešení jednoduché, ale složitost aktivního místa enzymu po inhibici různými organofosfáty se ukázala jako velice problematická. Na základě této problematiky byl zvolen jedinečný přístup pokračující v používání oximů na bázi pyridinia, aby se zvýšila lipofilita, tím se zajistí lepší proniknutí do centrální nervová soustava (CNS). Ve studiích byly použity tyto látky (obrázek 20)<sup>25, 32, 33</sup>.



**Obrázek 20** Struktury chemický látek s vyšší lipofilitou<sup>25</sup>.

Klinické studie se zaměřily na všechna zvířata léčená pouze látkou 2-PAM, která po 8 hodinách vykazovala příznaky podobné záchvatu; zatímco zvířata ošetřena 1 nebo 2 vykazovala po 6 hodinách zastavení příznaků, které připomínaly příznaky neurologické, jako jsou záchvaty, křeče, poruchy řeči a další<sup>8,25</sup>.

## 1.4 IMOBILIZACE ENZYMŮ

Detekce inhibitorů cholinesteráz nabývá v nynější době na důležitosti, a to v různých oblastech, proto detekování inhibitorů musí být vždy metodou rychlou, levnou, a především velmi citlivou. Na základě poznatků byly totiž zkonstruovány různé detektory inhibitorů cholinesteráz, některé z nich se potom používají ve formách biosenzorů, které jsou založené na enzymové reakci. Mechanismus této reakce je totožný s mechanismem, který probíhá v organismech. Pomocí jednoduchých biosenzorů, které se využívají v terénu nebo v laboratořích jsou založeny na barevné indikaci průběhu enzymové reakce. Využívá se různorodých chromogenních činidel založených na acidobazických nebo redoxních typech indikátorů<sup>34</sup>.

Základem každé přípravy biosenzoru je důležitá správně zvolená metoda imobilizace enzymu – AChE anebo BChE, zachycený na sorbent, nosič. Imobilizace enzymu je založena na fyzikálním nebo chemickém zachycení na sorbent, aniž by daný enzym ztratil svoji biologickou aktivitu. Imobilizací dochází ke koncentrování enzymu, čímž je zajištěn dostatečný kontakt s reaktanty, které jsou součástí kapalné nebo plynné fáze procházející fází pevnou s imobilizovaným enzymem<sup>34,35</sup>.

Pevná fáze by měla mít především tyto vlastnosti: hydrofilní charakter, nerozpustnost ve vodě, mechanickou, chemickou odolnost a teplotní stabilitu. Obrovskou výhodou imobilizovaných enzymů je možnost opakovaného použití. K imobilizaci cholinesteráz se používají různé techniky. Některé z nich nacházejí uplatnění v různých oblastech biotechnologie<sup>34</sup>.

K imobilizování enzymů se využívá adsorpce nebo kovalentní vazba na nerozpustný nosič, vazba na ionexy, zabudování do gelů a pěn, imobilizace pomocí nanostruktur, protilátek a další<sup>34,35</sup>.



### 1.4.1 Existující typy imobilizací

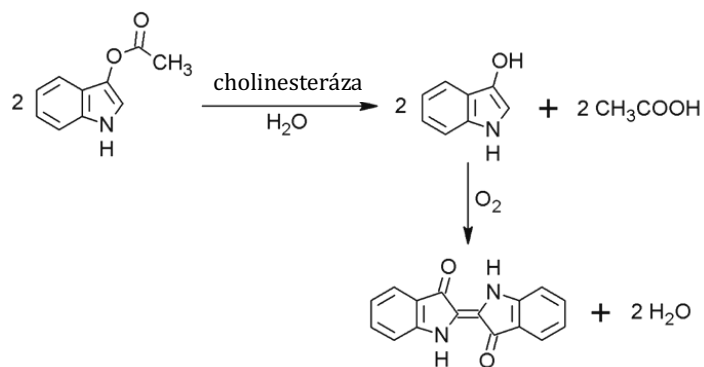
#### ○ ADSORPCE NA NEROZPUSTNÝ NOSIČ

Adsorpce enzymu na nerozpustný nosič se řadí mezi nejstarší, ale zároveň mezi nejjednodušší druh imobilizace. Princip této imobilizace je založen na interakcích mezi enzymem a sorbentem. Za velkou nevýhodu je považována nízká stabilita imobilizovaného enzymu, díky tomu omezená doba skladování<sup>34</sup>.

V USA byl připraven filtrační papír naimpregnovaný roztokem cholinesterázy. Při detekci procházel daný kontaminovaný vzduch navlhčeným filtračním papírkem. V případě tekutin se vzorek nanášel na detektor ve formě kapek. Pokud byly přítomny inhibitory cholinesteráz nedocházelo ke změně zbarvení filtračního papíru, ten zůstával v případě detekce indoxylacetátem či indofenylacetátem bílý. Naopak v nepřítomnosti inhibitorů docházelo k hydrolýze chromogenních činidel za vzniku modrého zbarvení (obrázek 21). V případě využití indofenylacetátu došlo k fialového zbarvení<sup>34</sup>.

Imobilizace cholinesterázy na bavlněnou tkaninu je dalším možným typem. Při tomto typu imobilizace je proces velice jednoduchý a je založen na ponoření tkaniny do roztoku cholinesterázy ve směsi s neiontovým tenzidem a dextranem. Při detekci je na bavlněnou tkaninu s enzymem přitlačen nosič se substrátem; jedná se buď o acetylthiocholin jodid (ATCI), nebo butyrylthiocholin jodid (BTCl) společně s Ellmanovým činidlem<sup>35</sup>.

V případě žlutého zbarvení nejsou přítomny inhibitory cholinesteráz. Pokud vzorek zůstane bílý, pak jsou tyto inhibitory přítomny. Typ inhibitoru je možné zjistit změřením změny aktivity inhibované cholinesterázy po její reaktivaci vhodným činidlem, např. aldoximy. Takto připravený detektor je vhodný pro detekci chemických látek, organofosfátových a karbamátových insekticidů (viz. Ellmanův esej)<sup>34</sup>.



**Obrázek 21** Hydrolytické štěpení indoxylacetátu za vzniku indiga (použití chromogenního substrátu)<sup>34</sup>.

### ○ IMOBILIZACE POMOCÍ KOVALENTNÍ VAZBY

Následující metoda imobilizace využívá tvorby specifických vazeb mezi enzymem a nosičem. Tvorba vazeb musí probíhat za podmínek, které nesnižují aktivitu enzymu. Důležité je, aby aktivní místo enzymu nebylo ovlivněno<sup>34,36</sup>.

Američtí vědci imobilizovali enzymy typu hydroláz, oxidoreduktáz a transferáz na nosič nerozpustný ve vodě, který obsahoval volné hydroxylové skupiny. Možnými nosiči mohou být tedy látky typu silikátů - porézní sklo, silikagel a oxidy kovů - oxid hlinitý, oxidy křemíku, hydroxyapatit nebo oxid nikelnatý. Vazba se mezi nosičem a enzymem vytvořila díky přidané látce aminopropyltriethoxysilan, která se nanasla na nosič ve formě roztoku. Po vytvoření vazby mezi silanem a nosičem se přidal enzym, který se za poklesu teploty navázal na silan. Konečný produkt se poté vysušil na vzduchu<sup>34,36</sup>.

Na detekci inhibitoru vědci použili biologické tekutiny, jako jsou krev, moč a plasma s použitím oximů, fluoridových, hořečnatých a nikelnatých iontů nebo měďnatých solí. Konečná detekce probíhala na mikrotitrační destičce s imobilizovaným konjugátem cholinesterasy s avidinem nebo streptavidinem. Ke konjugaci se použil glutaraldehyd, který vytvořil kovalentní vazby<sup>34,36</sup>.

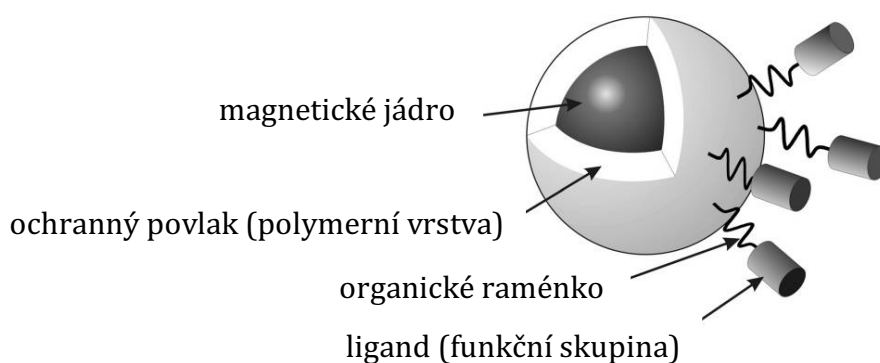
#### ○ **ZABUDOVÁNÍ DO GELŮ A PĚN**

Další možností imobilizace cholinesteráz je jejich inkorporace do gelů nebo pěn. Matrice jsou tvořeny syntetickými polymery – polyakrylamid, polyurethany nebo různé typy pryskyřic, proteinů jako je např. želatina, kolagen, vaječný bílek a polysacharidů jako např. agar, agarosa, karagenany. Gelové matrice mají schopnost zadržovat vodu, což je velice nutné pro uchování biologické aktivity imobilizovaných látek. Prostředí gelů je blízké fyziologickým podmínkám; v tomto případě je tak minimalizována denaturace proteinu a jsou zachovány biologické funkce materiálu. Avšak nevýhodou tohoto procesu může být pomalé uvolňování imobilizovaného proteinu. Při detekci imobilizovaná cholinesteráza štěpila substrát na thiocholin reagující s modrou sodnou solí, 2,6-dichlorfenolindofenolu, na produkt (bezbarvý). Pokud se inhibitor ve vzorku nevyskytoval, zůstal detektor modře zbarvený<sup>31,34</sup>.

#### **1.4.2 Imobilizace na magnetické nosiče**

Magnetické nanočástice (<100 nm) a mikročástice jsou předmětem velkého zájmu pro potenciální použití v biologických, biotechnologiích, environmentálních technologiích, ale i v medicíně a analytických aplikacích. Magnetické nanočástice se skládají ze čtyř základních komponentů: magnetického jádra, polymerní vrstvy a organického raménka s připojeným ligandem (obrázek 22). Magnetické částice mají z velkého procenta povahu kompozitních materiálů skládajících se z fero/ferimagnetické složky jsou zodpovědné za interakci s vnějším magnetickým polem. Dále složka diamagnetická, která je nemagnetická zajistí žádanou interakci s biologickými materiály. Všeobecnou výhodou u těchto magnetických kompozitních materiálů je možnost manipulace právě působením vnějšího magnetického pole<sup>34,35,36,37,38</sup>.

Nejčastějšími materiály pro přípravu magnetických nosičů biologicky aktivních látek jsou biokompatibilní magnetické oxidy železa: magnetit a maghemit nebo jejich směsi, ale také různé typy feritů, které jsou ve formě prášků nebo tzv. magnetických kapalin. V současné době se věnuje větší pozornost jednodoménovým a superparamagnetickým nanočásticím. Jednodoménové částice obsahují pouze jednu magnetickou doménu. Ojedinelé magnetické vlastnosti nanočástic spolu s jejich povrchem umožňují vázat velké množství ligandů<sup>37,38</sup>.



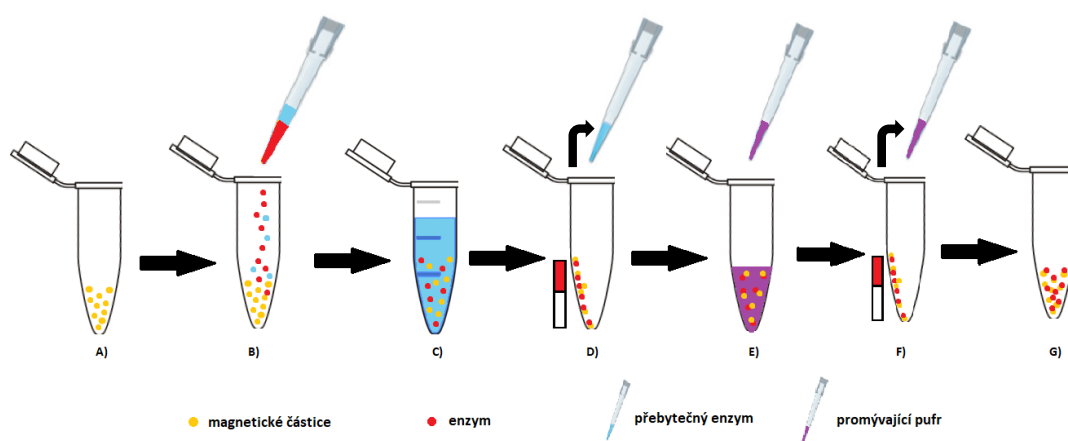
**Obrázek 22** Struktura magnetické částice<sup>38</sup>.

#### 1.4.2.1 Imobilizace enzymů na magnetické částice

Proteiny patří mezi nejvýznamnější biopolymery, vykonávající řadu funkcí v živých organismech. Pro dosažení požadovaných vlastností proteinů, zejména při *in vitro* aplikacích, se často zakotvují na pevné nosiče<sup>36,37</sup>. Imobilizace enzymu na magnetické částice je jednoduše znázorněna na obrázku 23.

Navázáním enzymů na magnetické nosiče pak mohou získat výhodnější vlastnosti, např. vyšší stabilitu, rozšířený rozsah optimální teploty, pH atd. Imobilizací se může zvýšit aktivita enzymů a často dochází ke snížení Michaelisovy konstanty  $K_m$ ; nižší hodnoty  $K_m$  ukazují na vyšší afinitu enzymu k substrátu. Následně navázané enzymy je možné opakovaně používat. Enzymy jsou stálejší při skladování a na rozdíl od volných enzymů je možno s nimi lehce manipulovat.

Magnetické biokatalyzátory mohou být výhodné zejména v případě, kdy je využíván drahý enzym nebo v situaci, kdy je nežádoucí přítomnost enzymu v hotovém produktu. Významnou skupinou enzymů, která má uplatnění v biotechnologických procesech a také v medicíně, jsou proteasy; jedná se o enzymy, které štěpí peptidové vazby v proteinech<sup>35,36,37</sup>.



**Obrázek 23** Imobilizace enzymu na magnetické částice.

### 1.4.3 Magnetické techniky pro izolaci a čištění proteinů a peptidů

Jedná se o nové separační techniky, které mají uplatnění v oblasti biologických věd a biotechnologií se izolace proteinů a peptidů obvykle provádí pomocí afinitní chromatografie, elektroforetiky, ultrafiltrace, srážení<sup>37</sup>.

Základní princip magnetické separace je velmi jednoduchý. Magnetické nosiče mající afinitu k izolované struktuře se smíchají se vzorkem, který obsahuje cílovou sloučeninu. Jako vzorky mohou být použity: buněčné lyzáty, krev, plazma, mléko, moč, kultivační média, odpady z potravinářského průmyslu a další<sup>37</sup>.

Po inkubační době, kdy se cílová sloučenina váže na magnetické částice, je celý magnetický komplex snadno a rychle odstraněn ze vzorku pomocí vhodného magnetického separátoru. Po vymytí kontaminantů může být izolovaná cílová sloučenina eluována a použita pro další práci. Obecně lze magnetické separace provádět ve dvou různých režimech přímé a nepřímé metody<sup>36,39</sup>.

V přímé metodě je afinitní ligand přímo spojen s magnetickými částicemi nebo biopolymerem vykazujícím afinitu k cílové sloučenině nebo sloučeninám je použit v průběhu přípravy magnetických afinitních částic. Tyto částice se přidají do vzorku a cílové sloučeniny se na ně poté vážou<sup>36,39</sup>.

V nepřímé metodě se k roztoku nebo suspenzi přidá volný afinitní ligand (vhodná protilátka), aby se umožnila interakce s cílovou sloučeninou. Výsledný komplex je poté zachycen vhodnými magnetickými částicemi. Pokud jsou protilátky použity jako volné afinitní ligandy, pro zachycení komplexu se použijí magnetické částice s imobilizovanými sekundárními protilátkami. Mohou být využity magnetické částice s imobilizovaným streptavidinem nebo avidinem, které jsou použity k zachycení vytvořených komplexů<sup>36,39</sup>.

## 1.5 METODY PRO STANOVENÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY ENZYMU

### 1.5.1 Ellmanův esej

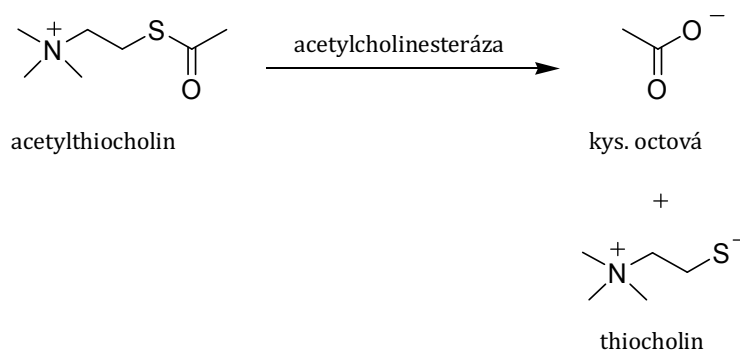
Celková informovanost o současném stavu biologické aktivity cholinesteráz v organismu je nejvíce rozhodující pro včasnou diagnózu při otravě organofosfátovými inhibitory. V nejčastějších případech se pro stanovení využívá erytrocytární AChE<sup>40,41,42</sup>.

V dnešní době existuje hned několik metod, které byly pro stanovení biologické aktivity cholinesteráz vyvinuty. Mezi ty nejznámější a nejpoužívanější metodiky řadíme: elektrometrické, titrační, kolorimetrické, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, enzymové metody. Méně využívané je měření změny pH s využitím indikátoru. Běžně používaná vhodná a velice citlivá metoda byla popsána dle Ellmana, tzv. Ellmannova metoda pro stanovení aktivit cholinestreráz. Jedná se o kolorimetrickou metodu zavádějící se do běžné praxe k vyhodnocení zdravotního stavu lidí, kteří se denně dostávají do styku s organofosforovými inhibitory. Do skupiny lidí, kteří se nejčastěji s těmito inhibitory setkávají patří především dělníci v průmyslu a v zemědělství<sup>40,41,42</sup>.

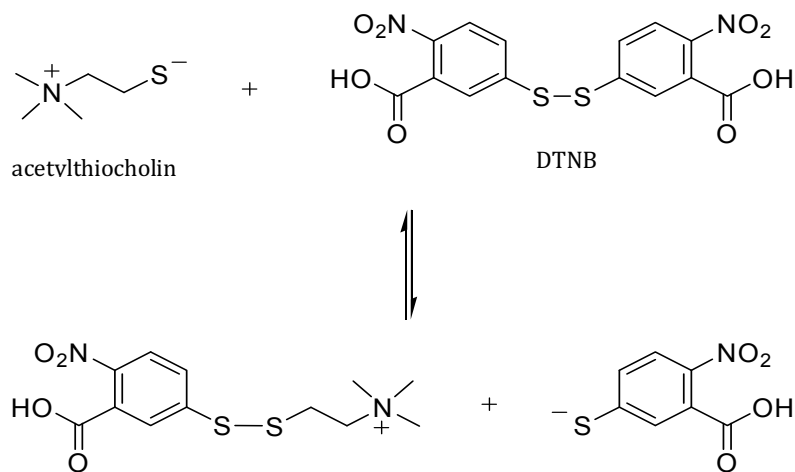
Principem Ellmannovy metody je nejprve hydrolýza thiocholinu (acetylthiocholin pro AChE anebo bytyrylthiocholin pro BChE). Ihned po hydrolýze dochází k uvolnění kyseliny octové a thiocholinu (obrázek 24). Thiocholin, který ve své molekule obsahuje skupinu -SH je detekován pomocí činidla DTNB tím, že po dané reakci s thiocholinem dochází k uvolnění tzv. TNB<sup>-</sup>. Tento iont se zjišťuje spektrofotometricky v rozmezí 412 nm (obrázek 25, 26). Přítomnost inhibitoru

se projeví bílým zabarvením, pokud inhibitor přítomen není, dochází ke žlutému zabarvení.

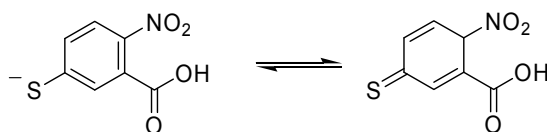
Ellmanův esej je metodou velice jednoduchou, levnou a rychlou, ale i přesto má určité nevýhody. Například při měření cholinesteráz v krvi, kdy absorpční maximum indikátoru TNB<sup>-</sup> je 412 nm, může docházet k interferenci s hemoglobinem. Právě při této vlnové délce také absorbuje hemoglobin přítomný v krvi. Pokud chceme tuto chybu vyloučit, je zapotřebí vzorek několikanásobně naředit nebo využít modifikaci vlnové délky na 436 nm, díky tomu nedochází k interferenci s hemoglobinem<sup>40,41,42</sup>.



**Obrázek 24** Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholin<sup>40</sup>.



**Obrázek 25** Štěpení DTNB a vznik chromoforu<sup>40</sup>.



**Obrázek 26** Přechod chromoforu na formu, která je fotometrována<sup>40</sup>.

## 2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je ověřit možnost reaktivace lidských cholinesteráz imobilizovaných na povrchu stacionárních fází.

Dílčí cíle:

1. ověřit možnosti imobilizace lidských cholinesteráz na povrchu různých stacionárních fází,
2. potvrdit přítomnost metabolické aktivity u imobilizovaných enzymů, ověřit stabilitu imobilizovaných enzymů,
3. reaktivovat imobilizované enzymy po předchozí inhibici pomocí vybraných organofosfátů,
4. porovnat možnost reaktivace s volnými enzymy.



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 MATERIÁLY A METODY

#### 3.1.1 Použité přístroje

- Spark Multimode Microplate Reader (Tecan Group, Švýcarsko)
- UV/VIS spektrofotometr Cary 60 (Agilent Technologies, Kalifornie, USA)
- Analytické váhy Mettler Toledo XSE105 (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Mini-Rotator Bio RS-24 (Biosan, Lotyšsko)
- Stolní centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)

#### 3.1.2 Použité chemikálie a vzorky

- MilliQ ultračistá voda (Merck, USA)
- rekombinantní enzymy – AChE a BChE (katedra PŘF, Hradec Králové)
- obidoxim (katedra PŘF, Hradec Králové)
- pralidoxim (katedra PŘF, Hradec Králové)
- asoxim (katedra PŘF, Hradec Králové)
- trimedoxim (katedra PŘF, Hradec Králové)
- methoxim (katedra PŘF, Hradec Králové)
- magnetické stacionární fáze His-Trap (Thermo Fisher's Scientific) a SIMAG-PGL (Thermo Fisher's Scientific)
- nemagnetické stacionární fáze Sepharosa (Thermo Fisher's Scientific)
- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát (Penta, ČR)
- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta, ČR)
- acetylthiocholin jodid (Merck, USA)
- butyrylthiocholin jodid (Merck, USA)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (Merck, USA)
- inhibitory – 4-nitrofenylisopropylmethylfosfonát, paraoxon  
4-nitrofenylethylmethylfosfát, 4-nitrofenylethyldimethylfosfoamidát  
(Chemforase, USA)
- kyanoborohydrid sodný (Merck, USA)
- 2-amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol (Merck, USA)

### 3.1.3 Pracovní postupy

#### 3.1.3.1 Imobilizace na různé stacionární fáze

##### Magnetické částice His - Trap a nemagnetické částice (Sepharsa)

Magnetické částice (0,1 mg,  $c_{\text{zásobní}}=40$  mg/ml) nebo nemagnetické částice (100  $\mu$ l,  $c_{\text{final}}=15$   $\mu$ mol/ml) byly napipetovány do Na-fosfátového pufru (1 ml, pH=7,4,  $c=25$  mM). Takto připravené částice byly třikrát promyty Na-fosfátovým pufrem (500  $\mu$ l), tím bylo zajištěno kvalitní prostředí pro dané částice. Následně byl připraven roztok 500x ředěného enzymu (1  $\mu$ l enzymu o  $c=689,29$   $\mu$ g/ml + 499  $\mu$ l pufru). Zkumavka s magnetickými částicemi byla vložena do magnetického separátoru a s nemagnetickými částicemi do centrifugy (800 RCF, 30 sek.). Poté byl odpipetován přebytečný pufr. Na částice byl napipetován 500x ředěný enzym (200  $\mu$ l) a zkumavky s těmito částicemi vloženy na rotátor, aby se částice navázaly. Celková imobilizace trvala 15 minut.

Po časovém intervalu se zbytkový roztok odpipetoval do nové zkumavky a označil se jako roztok po imobilizaci. Volné imobilizované částice byly opět třikrát promyty Na-fosfátovým pufrem (500  $\mu$ l) na odstranění přebytečného enzymu a resuspendovaly se do Na-fosfátového pufru (200  $\mu$ l). U čistého enzymu, imobilizovaného enzymu a u zbytkového roztoku po imobilizaci byla změřena biologická aktivita s využitím Ellmanovy eseje (3.1.3.6).

##### Magnetické částice SIMAG - PGL

Magnetické částice (0,1 mg,  $c_{\text{zásobní}}=50$  mg/ml) byly napipetovány do Na-fosfátového pufru (1 ml, pH=7,4). Takto připravené částice byly třikrát promyty Na-fosfátovým pufrem (500  $\mu$ l), tím bylo zajištěno kvalitní prostředí pro dané částice. Následně byl připraven roztok 500x ředěného enzymu (1  $\mu$ l enzymu o  $c=689,29$   $\mu$ g/ml + 499  $\mu$ l pufru). Zkumavka s částicemi vložena do magnetického separátoru a odpipetován přebytečný pufr. Poté byla zkumavka vložena do magnetického separátoru a odpipetován přebytečný pufr. Na tyto částice byl napipetován 500x ředěný enzym (200  $\mu$ l) a zkumavka s těmito částicemi byla vložena na rotátor, aby se částice navázaly. Celková imobilizace trvala 60 minut.

Po hodině se k částicím přidal kyanoborohydrid sodný (20  $\mu$ l,  $c_{\text{final}}=100$  mM). Po uplynutí 20 minut se přidal TRIS (4,85 mg,  $c_{\text{final}}=0,2$  M). Po všech přídavicích se zbytkový roztok odpipetoval do nové zkumavky a označil se jako roztok po imobilizaci. Volné imobilizované částice byly opět třikrát promyty Na-fosfátovým pufrům (500  $\mu$ l) na odstranění přebytečného enzymu a resuspendovaly se do Na-fosfátového pufru (200  $\mu$ l). U čistého enzymu, imobilizovaného enzymu a u zbytkového roztoku po imobilizaci byla změřena biologická aktivita s využitím Ellmanovy eseje (3.1.3.6).

### **3.1.3.2 Rychlost imobilizace na His-Trap částice**

Magnetické částice (0,1 mg,  $c_{\text{časovní}}=40$  mg/ml) byly napipetovány do Na-fosfátového pufru (1 ml, pH=7,4). Takto připravené částice byly třikrát promyty Na-fosfátovým pufrům (500  $\mu$ l). Byl připraven roztok 500x ředěného enzymu (1  $\mu$ l enzymu o  $c=689,29$   $\mu$ g/ml + 499  $\mu$ l pufru). Následně bylo odpipetováno 400  $\mu$ l enzymu a převedeno na částice. Zkumavka s těmito částicemi a enzymem byla vložena na rotátor. Jednotlivé vzorky byly odebírány po 5 min. intervalech (tzn. v čase 0, 5, 10, ...). V čase „0“ byl nadávkován 100% čistý neimobilizovaný enzym. Celková imobilizace trvala 30 minut. Po časovém intervalu se jednotlivé vzorky proměřily pomocí Ellmanovy eseje (3.1.3.6).

### **3.1.3.3 Stabilita imobilizovaného enzymu**

500x ředěný enzym (200  $\mu$ l) byl napipetován do zkumavky s připravenými částicemi a zkumavka se zbytkem čistého enzymu byla vložena do lednice na dobu 5 a 14 dní. Po časovém intervalu se zbytkový roztok odpipetoval a volné imobilizované částice byly opět třikrát promyty Na-fosfátovým pufrům (500  $\mu$ l) na odstranění přebytečného enzymu a resuspendovaly se zpět do Na-fosfátového pufru (200  $\mu$ l). U takto připravených vzorků byla změřena biologická aktivita s využitím Ellmanovy eseje (3.1.3.6).

#### **3.1.3.4 Inhibice imobilizovaného enzymu**

Připravené částice v jedné zkumavce se resuspendovaly se do Na-fosfátového pufru (200  $\mu$ l) a k druhé zkumavce s částicemi byl přidán inhibitor (0,5  $\mu$ l inhibitoru o  $c=25 \mu\text{M}/200 \mu\text{l}$  pufru). Zkumavku s inhibitorem byla vložena na rotátor a celkový čas inhibice byl 30 min.

Po 30 minutách se přebytečný inhibitor odpipetoval do odpadu a následovalo trojitě promytí částic od přebytečného inhibitoru. U imobilizovaného enzymu a inhibovaných částic byla změřena biologická aktivita s využitím Ellmanovy eseje (3.1.3.6).

#### **3.1.3.5 Reaktivace inhibovaného enzymu**

K inhibovanému enzymu se přidal předem připravený reaktivátor (10  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ ) rozpuštěný ve vodě. U imobilizovaného enzymu a u enzymu reaktivovaného byla změřena biologická aktivita s využitím Ellmanovy eseje (3.1.3.6). Tímto způsobem byly proměřeny všechny typy inhibitorů (POX, NIMP, NEMP a NEDPA) a reaktivátorů (obidoxim, pralidoxim, asoxim, trimedoxim a methoxim). Každý vzorek byl proměřen v duplikátu.

#### **3.1.3.6 Stanovení enzymové aktivity**

Pro stanovení enzymové aktivity byl využit přístroj Spark Multimode Microplate Reader nebo UV/VIS spektrofotometr Cary 60. Přístroj byl temperován na 37 °C a nastaven na vlnovou délku 436 nm. Spark Multimode Microplate Reader byl nastaven na celkové měření 5 minut a cyklus 0,1 min. UV/VIS spektrofotometr Cary 60 byl nastaven na celkové měření 10 minut a cyklus 0,5 minut.

Na mikrotitrační destičku bylo nadávkováno 60  $\mu$ l Na-fosfátového pufru (25 mM), 20  $\mu$ l DTNB (5 mM), 10  $\mu$ l enzymu a 10  $\mu$ l ATCI/BTCI (10 mM). Do kyvety bylo napipetováno 690  $\mu$ l pufru, 200  $\mu$ l DTNB (5 mM), 10  $\mu$ l enzymu a 100  $\mu$ l ATCI/BTCI (10 mM). Výsledné hodnoty biologických aktivit byly vyjádřeny jako rozdíl absorpance za časový úsek.

## 3.2 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 3.2.1 Imobilizace na různé stacionární fáze

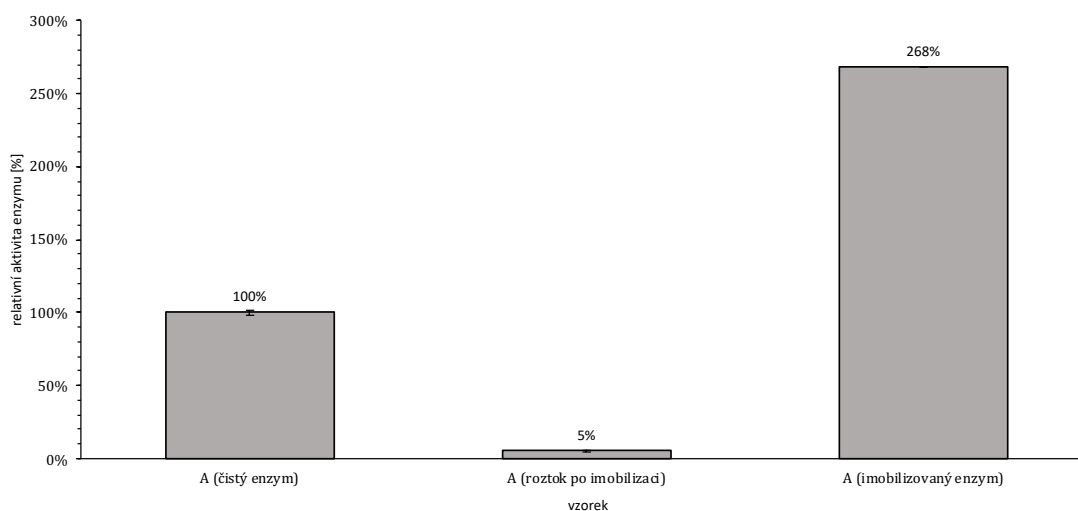
V této diplomové práci bylo využito k imobilizaci enzymu různých typů stacionárních fází. K imobilizaci enzymu se použily tyto stacionární fáze: magnetické a nemagnetické His – Trap částice, přičemž magnetické ve své struktuře nesou  $\text{Co}^{2+}$  a nemagnetické  $\text{Ni}^{2+}$ . Posledním typem stacionární fáze byly využity SIMAG-PGL částice.

U jednotlivých typů částic byla stanovena biologická aktivita enzymu, a to u roztoku čistého enzymu, imobilizovaného enzymu a zbytkového roztoku, který se odebral od částic pro ověření, v jaké míře se enzym na částice imobilizoval. Aktivita enzymu pro magnetické His-Trap byla proměřena třikrát tzn. v triplikátu. Nemagnetické His-Trap částice a SIMAG-PGL byly proměřeny jednou. Získané hodnoty absorbance vzorků byly vyjádřeny jako rozdíl absorbance za časový úsek. Následně byl vypočten průměr hodnot, vyjádřen v procentech a vnesen do grafu.

Biologická aktivita enzymu vázaného na magnetické His-Trap částice je uvedena v tabulce 2 a graf je znázorněn na obrázku 27. Biologická aktivita enzymu vázaného na nemagnetické His-Trap částice je uvedena v tabulce 3 a k porovnání výsledků je naměřená absorbance je uvedena v obrázku 29. Ke zhodnocení výsledků pro SIMAG-PGL částice jsou hodnoty uvedeny v tabulce 4 a hodnoty byly porovnávány v obrázku 30.

**Tabulka 2** Absorbance pro magnetické His-Trap částice.

	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	směr. odchylka	relativní aktivita enzymu [%]
A (volný enzym)	0,100	0,570	0,589	0,420	0,013	100%
A (roztok po imobilizaci)	0,018	0,024	0,027	0,023	0,005	5%
A (imobilizovaný enzym)	1,131	1,135	1,109	1,125	0,014	268%

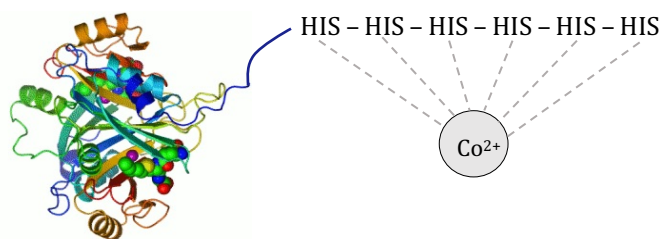


**Obrázek 27** Relativní aktivita enzymu jednotlivých vzorků u magnetických His-Trap částic.

Obrázek 27 nám znázorňuje relativní aktivitu enzymu před a po imobilizaci. Jako referenční hodnota byla stanovena absorbance neimobilizovaného enzymu a s ní byly porovnávány aktivity enzymu imobilizovaného a zbytkového roztoku. Zbytkový roztok nevykazoval téměř žádnou aktivitu z čehož usuzujeme, že došlo k úplnému navázání enzymu na částice. Z hodnoty absorbance enzymu imobilizovaného na částicích vidíme, že si enzym zachovává aktivitu a zároveň navázáním na částice došlo ke zvýšení aktivity, čímž pozorujeme vzestup absorbance asi 2,5x.

Tento typ částic je založen na principu polyhistidinové značky (His-tag) spočívající ve schopnosti histidinu se navázat na ionty některých kovů jako je  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  nebo  $\text{Zn}^{2+}$ . Výhodou His-tag je dobrá funkčnost, která je nezávislá na umístění v rámci sekvence proteinu. His-tag může být zařazen na C- i N- konec proteinu. Nejčastěji používané uspořádání His-tag je šestinásobné opakování histidinu, které má nejsilnější vazbu k výše zmíněným kovům (obrázek 28). Tímto způsobem pravděpodobně dochází k prostorově výhodné imobilizaci a aktivní

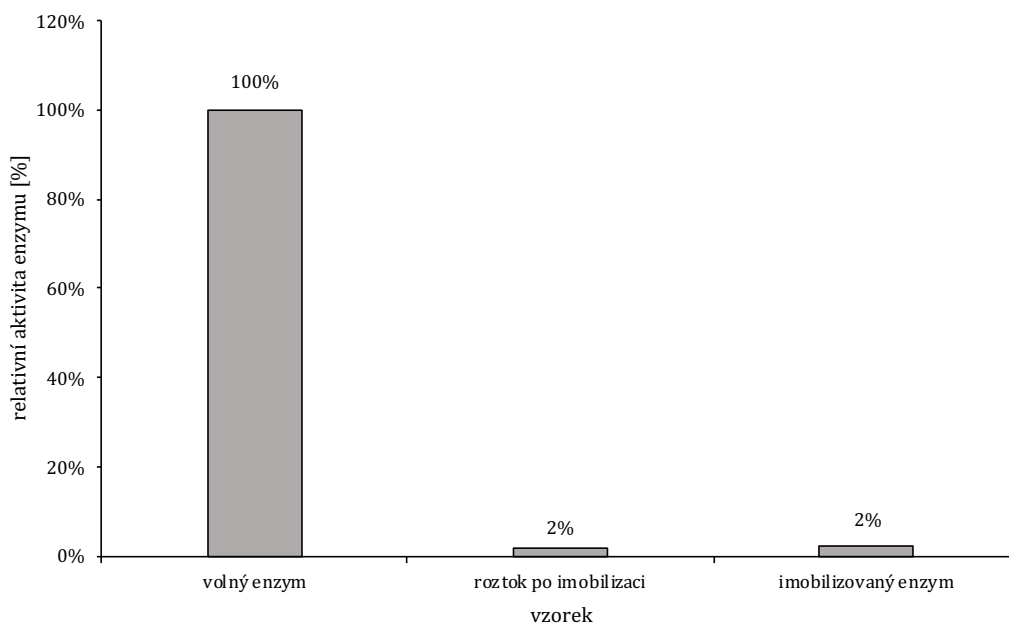
místo není stericky bráněno natolik, aby nemohlo dojít k navázání substrátu a jeho následné metabolizaci<sup>43,44</sup>.



**Obrázek 28** Interakce His-tag s kovovými ionty<sup>43</sup>

**Tabulka 3** Absorbance pro nemagnetické His-Trap částice.

	$\Delta A/\Delta t$	relativní aktivita enzymu [%]
A (volný enzym)	0,810	100%
A (roztok po imobilizaci)	0,017	2%
A (imobilizovaný enzym)	0,020	2%



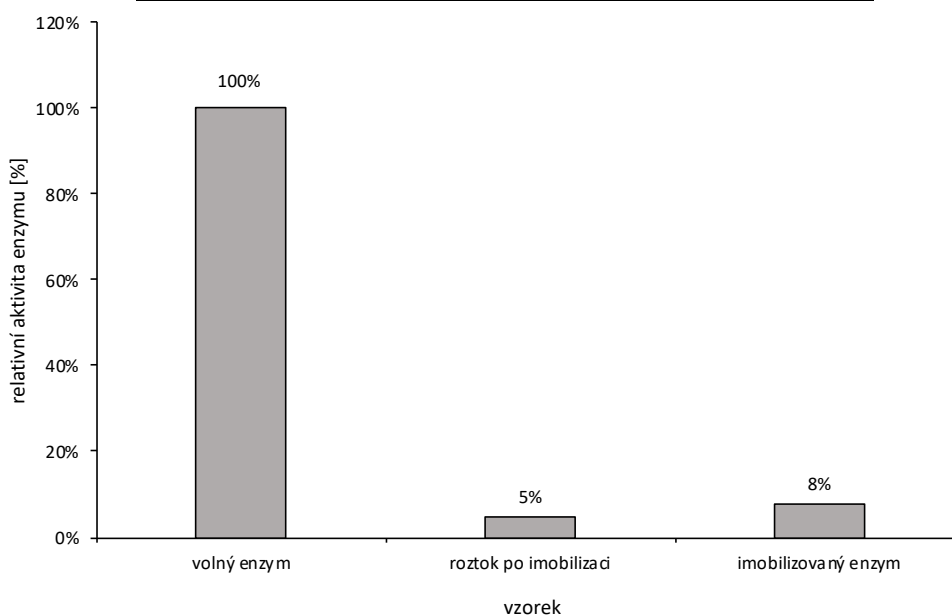
**Obrázek 29** Relativní aktivita enzymu jednotlivých vzorků u nemagnetických His-Trap částic.

Z obrázku 29 a 30 usuzujeme, že došlo k imobilizaci enzymu, jelikož aktivita zbytkového roztoku byla nízká. Od předchozího grafu pozorujeme pokles aktivity imobilizovaného enzymu. V případě nemagnetických částic His-Trap je biologická aktivita imobilizovaného enzymu nízká, jelikož Sepharosa je porézní částice, u které může docházet k podstatně delší interakci částice s enzymem anebo se enzym dostane hlouběji do pórů, a tudíž částice nemusí být přístupná pro další komponenty, např. substrát. Pro tento případ se nám nepotvrdila popisovaná

výhoda adsorpce na povrch nosiče bez vzniku kovalentní vazby, čímž nedochází k chemické modifikaci, a tedy ke snížení aktivity<sup>45</sup>.

**Tabulka 4** Absorbance pro SIMAG-PGL částice.

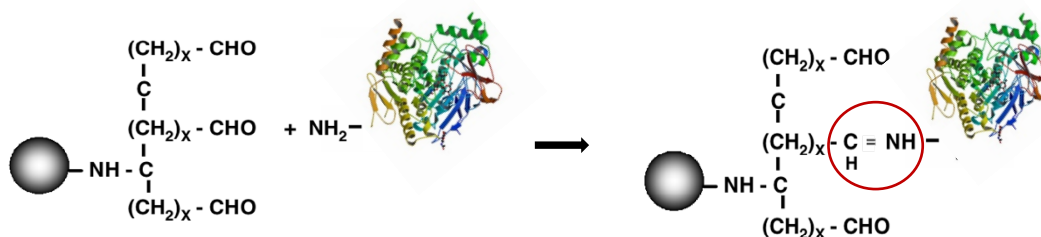
	$\Delta A/\Delta t$	relativní aktivita enzymu [%]
A (volný enzym)	0,758	100%
A (roztok po imobilizaci)	0,034	5%
A (imobilizovaný enzym)	0,060	8%



**Obrázek 30** Relativní aktivita enzymu jednotlivých vzorků u částic SIMAG-PGL

Obdobný pokles aktivity pozorujeme i u částic SIMAG-PGL. Magnetické částice SIMAG – PGL se vyznačují, tím, že mají ve své struktuře navázány aldehydické skupiny, pomocí kterých dochází k interakci dané  $-NH_2$  skupiny aminokyseliny (obrázek 31).

Interakcí aminoskupiny a aldehydické skupiny dochází ke vzniku iminu, tzv. Schiffovy báze. Iminy jsou všeobecně velmi málo stálé, proto se při procesu imobilizace využívá kyanoborohydridu sodného, který zajistí redukci iminu na stabilnější aminoskupinu. Kyanoborohydrid sodný je velice silné redukční činidlo,



**Obrázek 31** Vznik Schiffovy báze<sup>46</sup>.



které může zároveň zredukovat disulfidické můstky u cysteinu, z toho usuzujeme, že může dojít k porušení terciární struktury a ztrátě aktivity enzymu. Přídavkem TRIS k částicím dochází k blokaci nezreagovaných aldehydických skupin<sup>47,48</sup>.

Tím, že došlo k chemické modifikaci mohlo dojít ke změně terciární struktury a ke ztrátě aktivity. Ztrátou aktivity může být změna terciární struktury z důvodů sterických, blokáce aktivního místa nebo případně mohlo dojít k jiným chemickým a strukturním změnám na enzymu<sup>46</sup>.

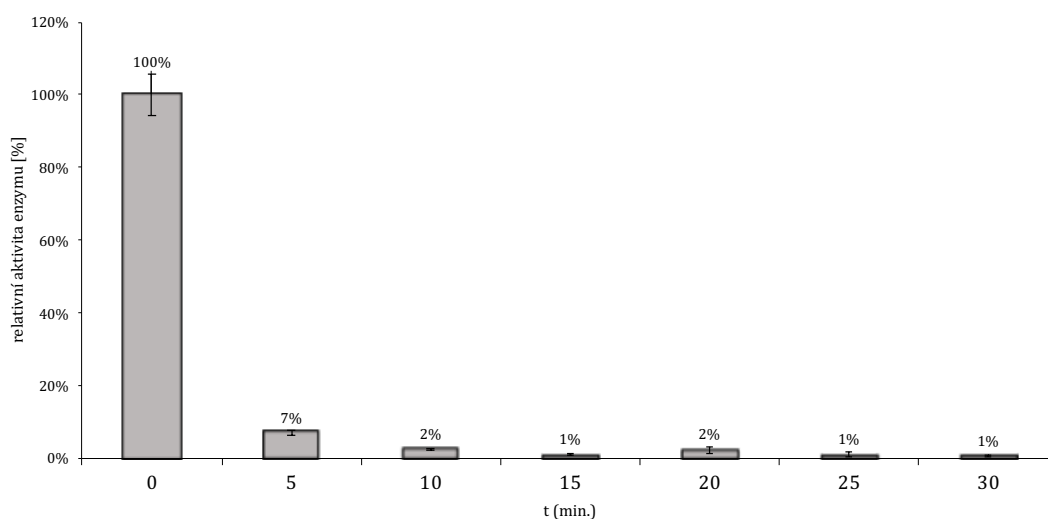
Shrnutím těchto výsledků byly pro další práci využity pouze magnetické His-Trap částice, jelikož jejich aktivita u imobilizovaného enzymu byla v porovnání s ostatními částicemi vyšší.

### **3.2.2 Rychlost imobilizace na His-Trap magnetické částice**

Pro stanovení rychlosti imobilizace enzymu bylo využito pouze His-Trap magnetických částic. Biologická aktivita byla proměřena u zbytkového roztoku, který byl odebrán od magnetických částic v různých časových intervalech, z důvodu zjištění efektivity vazby enzymu na dané částice. Vzorky se odebíraly po 5minutových intervalech a každý vzorek byl přeměřen v triplikátu. Celkový čas imobilizace byl 30 minut. Relativní aktivity enzymu byly zaznamenány do tabulky 5 a porovnání jednotlivých aktivit v různých časech jsou uvedeny na obrázku 32.

**Tabulka 5** Relativní aktivita imobilizovaného enzymu na His-Trap částicích v různých časech.

čas navázání [min.]	A (1.měření)	A (2.měření)	A (3.měření)	průměr	směr. odchylka	relativní aktivita enzymu [%]
0	1,190	1,058	1,087	1,112	0,070	100%
5	0,082	0,084	0,068	0,078	0,009	7%
10	0,030	0,026	0,026	0,027	0,003	2%
15	0,018	0,020	0,000	0,013	0,011	1%
20	0,024	0,019	0,031	0,025	0,006	2%
25	0,013	0,022	0,000	0,012	0,011	1%
30	0,010	0,001	0,010	0,007	0,005	1%

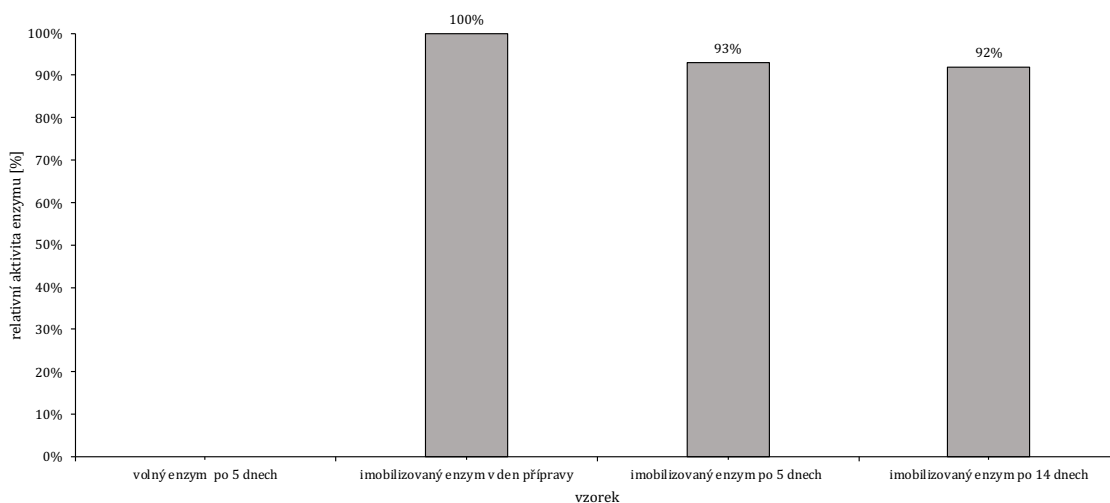


**Obrázek 32** Imobilizace enzymu na His-Trap magnetické částice po 5minutových intervalech.

Z obrázku 32 vyplývá, že enzym se imobilizuje v největší míře v rozmezí 0-5 minuty. Po 15 minutách od nadávkování enzymu k magnetickým částicím by se dalo říci, že se enzym z 99% imobilizoval z volného roztoku na povrch magnetické částice, jelikož z obrázku 32 je patrný klesající průběh imobilizace enzymu. Pro imobilizaci enzymu postačuje 15minutový interval, který se nadále používal v ostatních experimentech této diplomové práce.

### 3.2.3 Stabilita imobilizovaného enzymu na His-Trap částicích

Jelikož víme, že se enzym imobilizoval, mohlo se plynule přejít na další krok, a to ke stabilitě imobilizovaného enzymu na magnetických částicích. V tomto kroku byly proměřeny vzorky čistého enzymu a vzorky enzymu imobilizovaného. Tři vzorky byly připraveny s dostatečným předstihem a uloženy do lednice po dobu 5 a 14 dnů. Po uplynutí této doby byly vzorky proměřeny společně se vzorkem imobilizovaného enzymu, který byl připraven v den měření. Podstatou tohoto experimentu byl důkaz, že enzym imobilizovaný na částice lze využít pro následující práci i po určitém časovém intervalu a není tedy potřeba před zahájením nové práce vždy připravovat nový imobilizovaný enzym. Porovnání relativních biologických aktivit jednotlivých vzorků jsou uvedeny na obrázku 33.



**Obrázek 33** Porovnání stability imobilizovaného a volného enzymu na magnetických His-Trap částicích.

Na obrázku 33 je patrné, že získané hodnoty absorbancí u volného a imobilizovaného enzymu se zcela liší. Volný enzym již po 5 dnech vykazoval nulovou aktivitu. Oproti tomu enzym imobilizovaný na částicích po 5 dnech vykazoval 93% aktivitu a vzorek 14 dnů vykazoval 92% aktivitu v porovnání s imobilizovaným enzymem, který byl připravený v den měření. Enzymy by s takovou hodnotou aktivity mohly být použity v dalších experimentech.

U volného enzymu v roztoku může docházet k nežádoucímu shlukování a deformaci struktury, což výrazně snižuje jeho aktivitu<sup>49</sup>. Ztráta aktivity u volného enzymu může být také způsobena mikrobiální degradací, což je řešeno přidáním antibiotik do roztoku volného enzymu<sup>50</sup>.

Imobilizace enzymů je velice cenným procesem, kterou se zajišťuje jeho snadná separace od produktu. Imobilizace usnadňuje efektivní regeneraci, opětovné použití. Také dochází ke zlepšení enzymatických vlastností, jako je aktivita, zvýšená stabilita vůči teplotě, pH a organickým rozpouštědlům<sup>51,52,53,54</sup>.

### 3.2.4 Inhibice imobilizovaného enzymu

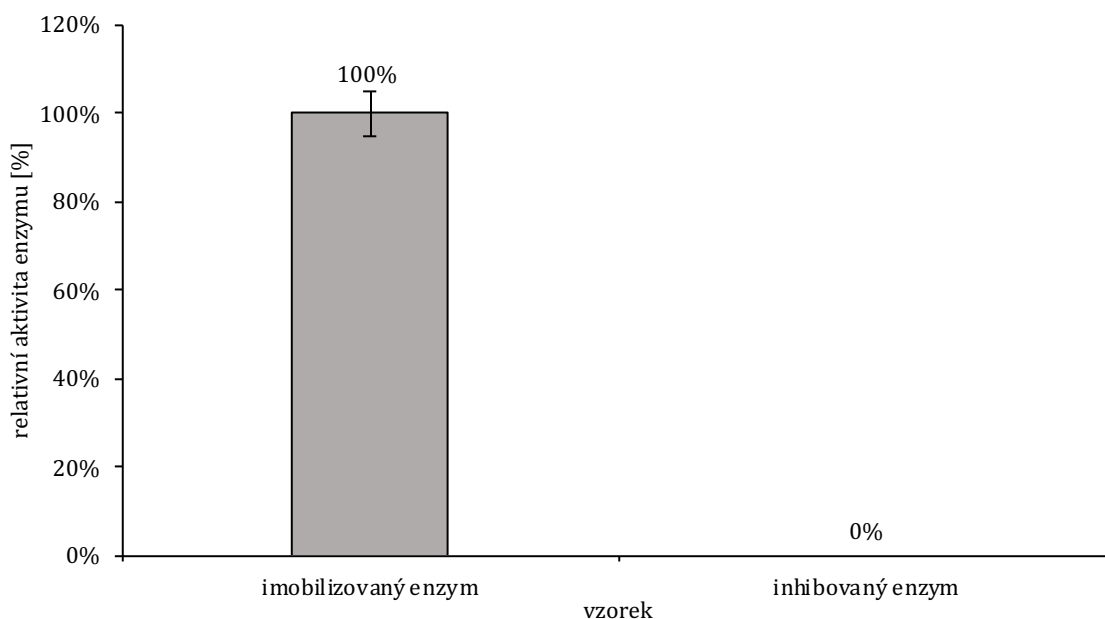
V této části bylo důležité ověřit, jestli lze imobilizovaný enzym inhibovat. Inhibice byla provedena pomocí NIMP ( $c=25 \mu\text{M}$ ) jak u AChE, tak u BChE. Používal se imobilizovaný enzym na His-Trap magnetických částicích a měření probíhalo v triplikátu. Z výsledných hodnot absorbancí byl vytvořen průměr a vyjádřena procentuální relativní aktivita u imobilizovaného enzymu a u inhibovaného enzymu. Všechny hodnoty absorbance pro AChE byly zaznamenány do tabulky 6 a pro BChE do tabulky 7. Hodnoty relativních aktivit u imobilizovaného a inhibovaného enzymu jsou uvedeny na obrázku 34 a 35.

**Tabulka 6** Hodnoty relativních aktivit pro imobilizovaný a inhibovaný enzym (AChE).

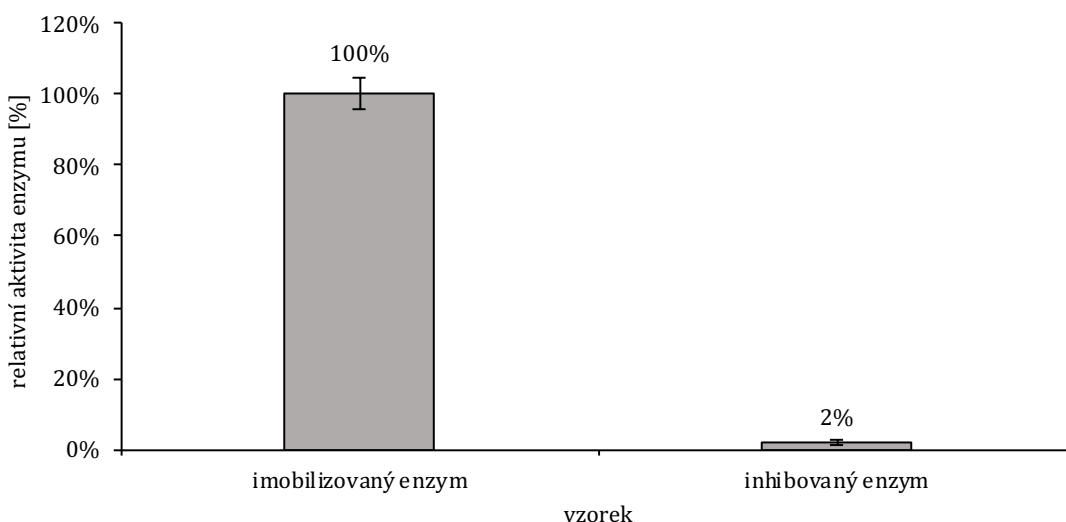
	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	směr. odchylka	Relativní aktivita enzymu[%]
A (imobil. enzym)	0,386	0,354	0,455	0,398	0,052	100%
A (inhib. enzym)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0%

**Tabulka 7** Hodnoty relativních aktivit pro imobilizovaný a inhibovaný enzym (BChE).

	1. měření	2. měření	3. měření	průměr	směr. odchylka	Relativní aktivita enzymu[%]
A (imobil. enzym)	0,511	0,427	0,445	0,461	0,044	100%
A (inhib. enzym)	0,008	0,000	0,000	0,008	0,005	2%



**Obrázek 34** Inhibice imobilizovaného enzymu (AChE).



**Obrázek 35** Inhibice imobilizovaného enzymu (BChE).

Obrázek 34 a 35 ukazuje inhibici imobilizovaného enzymu, jako referenční hodnota byla zvolena u imobilizovaného enzymu a to 100 %. Pokud byl k imobilizovanému enzymu přidán inhibitor došlo k výraznému poklesu aktivity, u AChE na 0% a u BChE na 2%. Z těchto dat usuzujeme, že imobilizovaný enzym ztratil veškerou biologickou aktivitu a v této chvíli je enzym zainhibovaný a není schopen vykonávat svoji biologickou funkci. Možnost inhibice imobilizovaného enzymu byla potvrzena. I po imobilizaci je enzym stále přístupný pro inhibitor a imobilizace nesnižuje jeho citlivost k inhibici<sup>55</sup>.

### 3.2.5 Reaktivace inhibovaného enzymu

Po ověření možnosti zainhibování enzymu bylo důležité prokázat možnost reaktivace takto inhibovaného enzymu imobilizovaného na povrch magnetických částic. K inhibici enzymu bylo využito následujících inhibitorů (POX, NIMP, NEMP a NEDPA). K takto připraveným (zainhibovaným enzymům) byl přidán klinicky používaný reaktivátor (obidoxim, pralidoxim, asoxim, methoxim nebo trimedoxim) o  $c=10$  a  $100 \mu\text{M}$ . Byla využita reaktivace, jak pro AChE, tak pro BChE a nakonec byla využita reaktivace AChE a BChE s přidavkem NaCl v Na-fosfátovém pufru.

#### 3.2.5.1 Reaktivace AChE a BChE

Hodnoty absorbance jsou zachyceny v tabulkách 8 a 9 a výsledné hodnoty porovnány v obrázku 36-43. Za referenční hodnotu byl zvolen průměr naměřených hodnot jednotlivých absorbancí u imobilizovaného enzymu bez předchozí inhibice.

**Tabulka 8** Relativní aktivity pro reaktivace AChE.

POX	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,533	0,630	0,582	100%	0,069
OBI 10 $\mu\text{M}$	-0,059	-0,026	-0,043	0%	0,024
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,010	0,045	0,028	5%	0,025
PRA 10 $\mu\text{M}$	-0,027	-0,035	-0,031	0%	0,006
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,001	0,017	0,009	2%	0,011
ASO 10 $\mu\text{M}$	-0,084	-0,072	-0,078	0%	0,009
ASO 100 $\mu\text{M}$	-0,015	-0,083	-0,049	0%	0,048
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,010	0,013	0,011	0%	0,002
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,080	0,030	0,055	9%	0,035
METH 10 $\mu\text{M}$	-0,073	-0,076	-0,074	0%	0,002
METH 100 $\mu\text{M}$	-0,037	-0,013	-0,025	0%	0,017

NEDPA	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,533	0,630	0,582	100%	0,069
OBI 10 $\mu\text{M}$	-0,021	0,060	0,020	3%	0,057
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,110	0,128	0,119	20%	0,013
PRA 10 $\mu\text{M}$	-0,013	-0,047	-0,030	0%	0,024
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,006	-0,061	-0,028	0%	0,048
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,035	0,024	0,029	5%	0,008
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,140	0,024	0,082	14%	0,083
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,024	0,106	0,065	11%	0,058
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,117	0,102	0,110	19%	0,010
METH 10 $\mu\text{M}$	0,030	0,047	0,039	7%	0,012
METH 100 $\mu\text{M}$	0,098	0,092	0,095	16%	0,005

NEMP	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,533	0,630	0,582	100%	0,069
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,054	-0,020	0,017	3%	0,052
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,044	0,091	0,067	12%	0,033
PRA 10 $\mu\text{M}$	-0,036	-0,011	-0,024	0%	0,018
PRA 100 $\mu\text{M}$	-0,059	-0,009	-0,034	0%	0,035
ASO 10 $\mu\text{M}$	-0,015	-0,049	-0,032	0%	0,024
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,028	0,094	0,061	10%	0,047
TRIM 10 $\mu\text{M}$	-0,032	0,027	-0,002	0%	0,041
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,047	0,069	0,058	10%	0,015
METH 10 $\mu\text{M}$	0,049	0,033	0,041	7%	0,011
METH 100 $\mu\text{M}$	0,017	0,030	0,023	4%	0,010

NIMP	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,533	0,630	0,582	100%	0,069
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,000	0,013	0,006	1%	0,009
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,022	0,025	0,023	4%	0,002
PRA 10 $\mu\text{M}$	0,001	0,007	0,004	1%	0,004
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,000	0,024	0,012	2%	0,017
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,085	0,029	0,057	10%	0,040
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,281	0,307	0,294	51%	0,018
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,019	0,005	0,012	2%	0,010
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,186	0,145	0,166	28%	0,029
METH 10 $\mu\text{M}$	0,041	-0,019	0,011	2%	0,042
METH 100 $\mu\text{M}$	0,065	0,103	0,084	14%	0,027

**Tabulka 9** Relativní aktivity pro reaktivace BChE.

POX	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,922	0,870	0,896	100%	0,037
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,149	0,145	0,147	16%	0,003
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,169	0,139	0,154	17%	0,022
PRA 10 $\mu\text{M}$	0,142	0,132	0,137	15%	0,007
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,147	0,141	0,144	16%	0,004
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,146	0,137	0,141	16%	0,006
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,138	0,143	0,140	16%	0,004
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,136	0,126	0,131	15%	0,007
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,154	0,137	0,146	16%	0,012
METH 10 $\mu\text{M}$	0,142	0,133	0,137	15%	0,006
METH 100 $\mu\text{M}$	0,148	0,141	0,145	16%	0,005

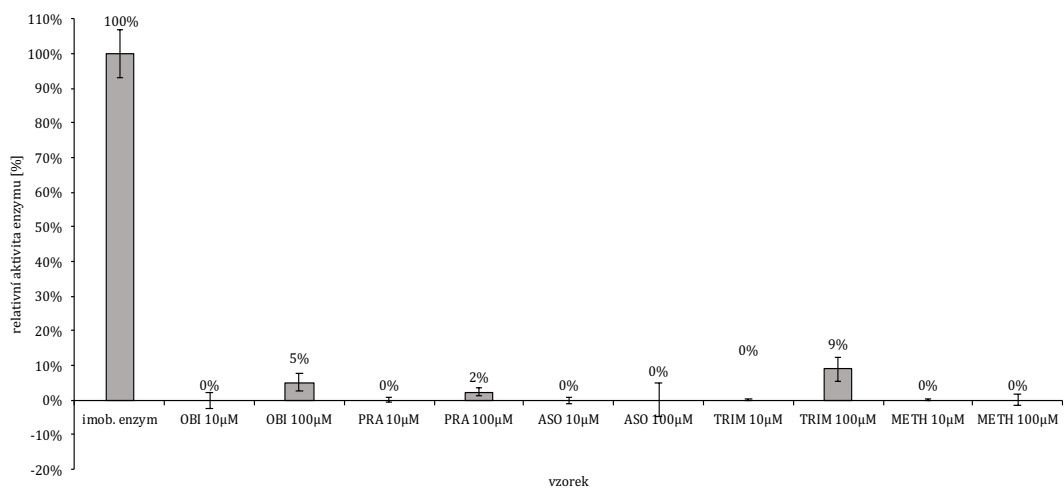
NEDPA	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,922	0,870	0,896	100%	0,037
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,124	0,127	0,126	14%	0,002
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,155	0,142	0,148	17%	0,009
PRA 10 $\mu\text{M}$	0,147	0,137	0,142	16%	0,007
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,168	0,160	0,164	18%	0,006
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,127	0,134	0,131	15%	0,005
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,161	0,142	0,152	17%	0,014
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,146	0,144	0,145	16%	0,002
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,154	0,145	0,149	17%	0,006
METH 10 $\mu\text{M}$	0,124	0,142	0,133	15%	0,013
METH 100 $\mu\text{M}$	0,147	0,152	0,149	17%	0,004

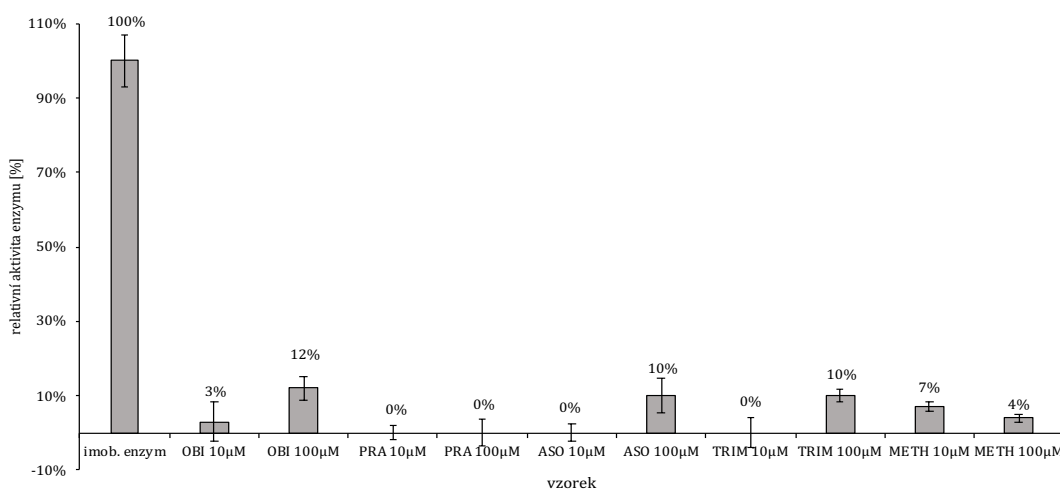
NEMP	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,922	0,870	0,896	100%	0,037
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,136	0,140	0,138	15%	0,002
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,161	0,158	0,160	18%	0,002
PRA 10 $\mu\text{M}$	0,167	0,135	0,151	17%	0,023
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,171	0,176	0,173	19%	0,004
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,144	0,132	0,138	15%	0,009
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,215	0,182	0,198	22%	0,023
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,141	0,142	0,141	16%	0,001
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,159	0,143	0,151	17%	0,011
METH 10 $\mu\text{M}$	0,165	0,143	0,154	17%	0,015
METH 100 $\mu\text{M}$	0,141	0,173	0,157	18%	0,022

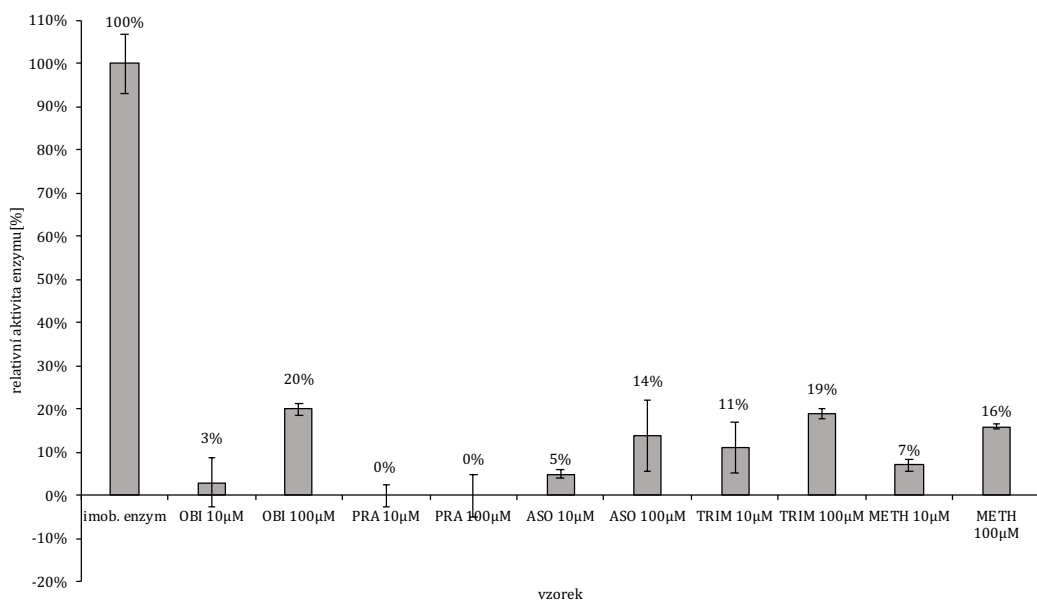
NIMP	A(1.měření)	A(2.měření)	průměr	rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
imob. enzym	0,922	0,870	0,896	100%	0,037
OBI 10 $\mu\text{M}$	0,127	0,137	0,132	15%	0,007
OBI 100 $\mu\text{M}$	0,167	0,160	0,164	18%	0,005
PRA 10 $\mu\text{M}$	0,137	0,140	0,138	15%	0,002
PRA 100 $\mu\text{M}$	0,158	0,161	0,160	18%	0,002
ASO 10 $\mu\text{M}$	0,081	0,094	0,087	10%	0,009
ASO 100 $\mu\text{M}$	0,206	0,189	0,198	22%	0,012
TRIM 10 $\mu\text{M}$	0,324	0,300	0,312	35%	0,017
TRIM 100 $\mu\text{M}$	0,183	0,188	0,186	21%	0,003
METH 10 $\mu\text{M}$	0,143	0,156	0,149	17%	0,009
METH 100 $\mu\text{M}$	0,277	0,234	0,256	29%	0,031



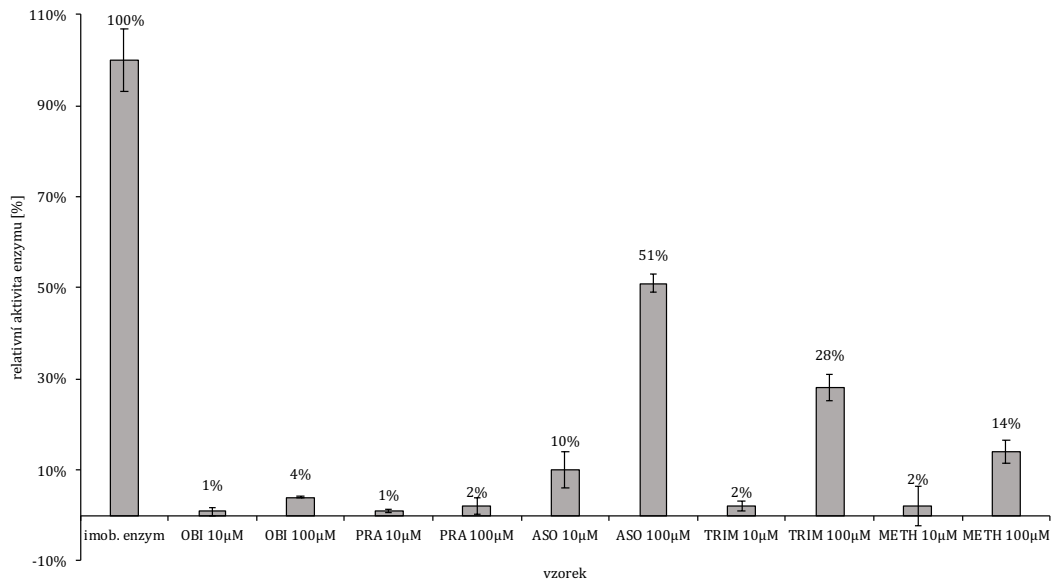
**Obrázek 36** Reaktivace AChE POX.



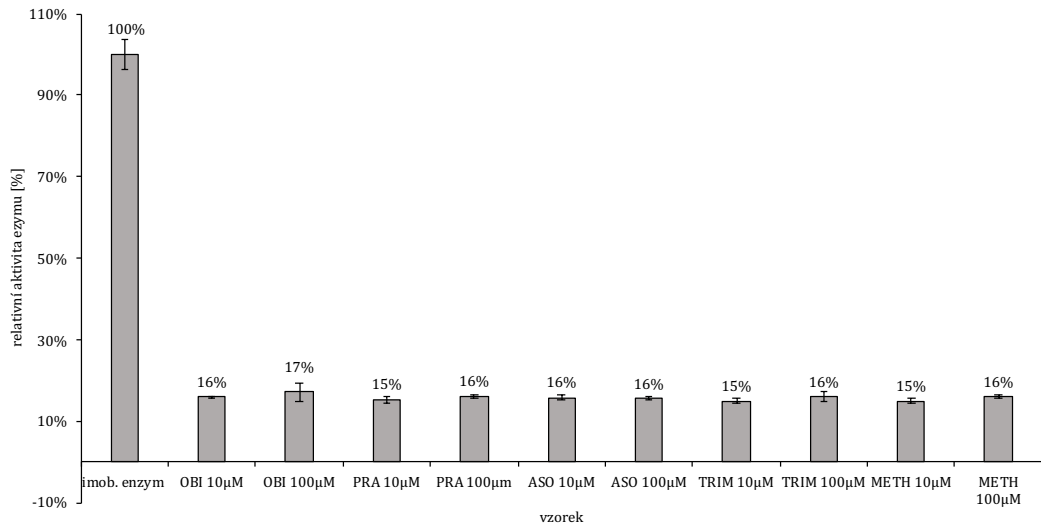
**Obrázek 37** Reaktivace AChE NEMP.



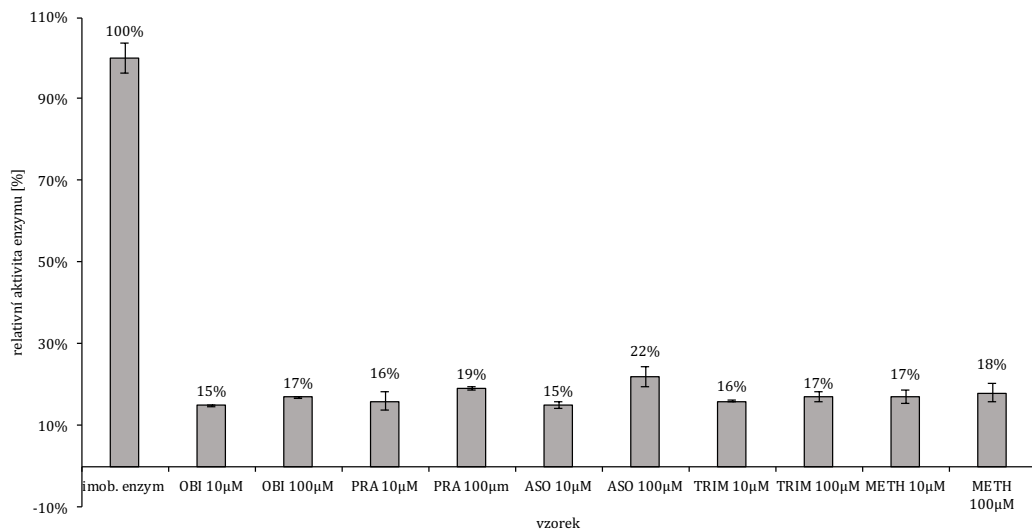
**Obrázek 38** Reaktivace AChE NEDPA.



**Obrázek 39** Reaktivace AChE NIMP

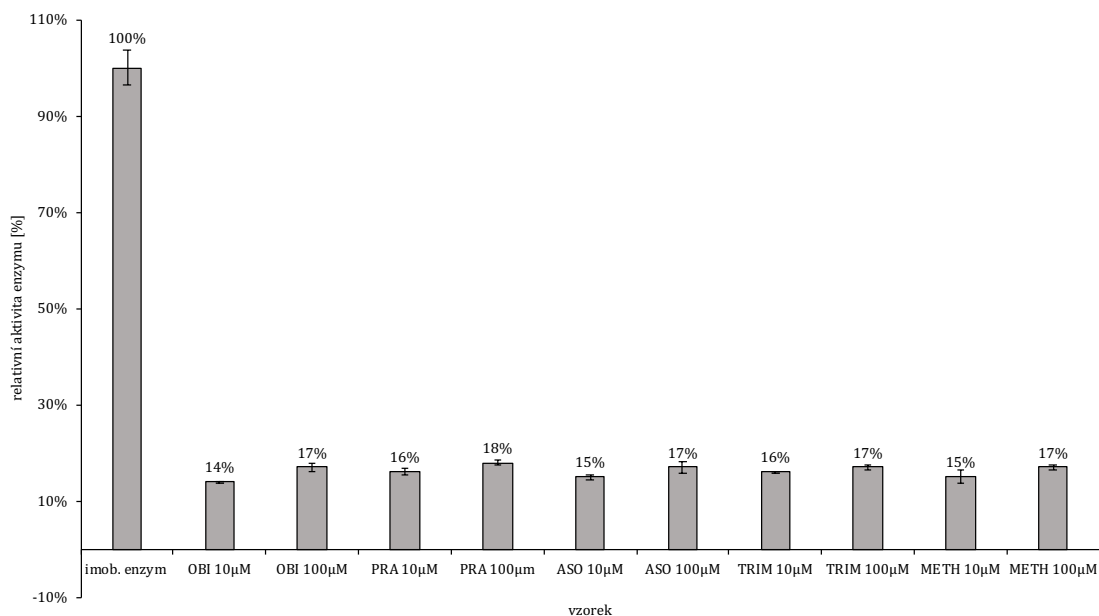


**Obrázek 40** Reaktivace BChE POX.

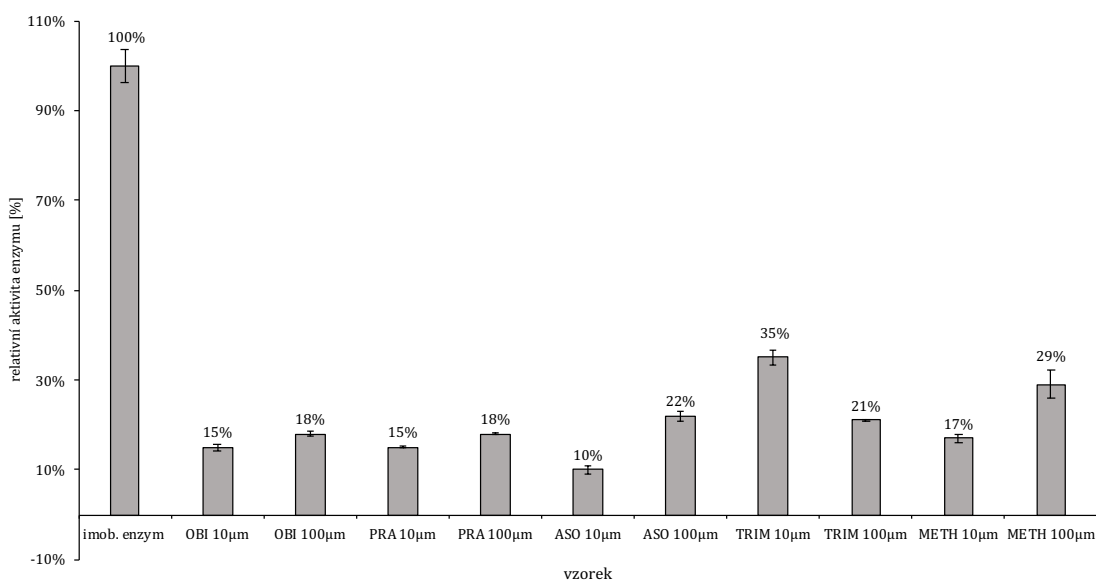


**Obrázek 41** Reaktivace BChE NEMP.





**Obrázek 42** Reaktivace BChE NEDPA.



**Obrázek 43** Reaktivace BChE NIMP.

Na obrázku 36-39 je znázorněna reaktivace AChE. Reaktivace u AChE se pohybují v rozmezí 0-10% u  $c=10 \mu\text{M}$  a u  $100 \mu\text{M}$  reaktivátorů se aktivity enzymu pohybují v rozsahu od 2 do 28%. Hodnoty u  $100 \mu\text{M}$  reaktivátorů jsou o něco vyšší, což je očekávané, protože se pracuje s vyšší koncentrací. Z těchto výsledků vybočuje pouze reaktivace AChE inhibované NIMP, kde reaktivace pomocí asoximu ( $100 \mu\text{M}$ ) dosahuje 51%. Obecně lze konstatovat, že u imobilizované AChE je účinnost reaktivace nižší ve srovnání s daty publikovanými i s naměřenými daty (tabulka 10) pro volný enzym<sup>56,57</sup>.

**Tabulka 10** Reaktivace volné AChE a BChE pomocí oximů

ACHE				ACHE			
POX		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka	NEDPA		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
	OBI 10 $\mu$ M	34,5%	1,6		OBI 10 $\mu$ M	31,7%	0,9
	OBI 100 $\mu$ M	94,9%	1,6		OBI 100 $\mu$ M	49,5%	4,7
	PRA 10 $\mu$ M	5,6%	0,1		PRA 10 $\mu$ M	4,3%	0,5
	PRA 100 $\mu$ M	36,6%	0,5		PRA 100 $\mu$ M	26,4%	0,1
	ASO 10 $\mu$ M	2,3%	0,3		ASO 10 $\mu$ M	12,6%	1,7
	ASO 100 $\mu$ M	21,8%	2,8		ASO 100 $\mu$ M	22,6%	1,8
	TRIM 10 $\mu$ M	52,4%	1,5		TRIM 10 $\mu$ M	25,7%	0,4
	TRIM 100 $\mu$ M	67,3%	0,2		TRIM 100 $\mu$ M	36,9%	2,0
	METH 10 $\mu$ M	7,7%	0,5		METH 10 $\mu$ M	5,7%	0,2
	METH 100 $\mu$ M	44,6%	3,5		METH 100 $\mu$ M	29,0%	1,1
NEMP				NIMP			
		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka			rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
	OBI 10 $\mu$ M	11,5%	1,2		OBI 10 $\mu$ M	54,4%	3,7
	OBI 100 $\mu$ M	57,7%	2,1		OBI 100 $\mu$ M	72,5%	3,3
	PRA 10 $\mu$ M	4,5%	0,4		PRA 10 $\mu$ M	10,7%	0,43
	PRA 100 $\mu$ M	28,3%	0,9		PRA 100 $\mu$ M	44,4%	0,57
	ASO 10 $\mu$ M	24,2%	1,2		ASO 10 $\mu$ M	43,7%	1,3
	ASO 100 $\mu$ M	88,2%	6,8		ASO 100 $\mu$ M	63,3%	3,2
	TRIM 10 $\mu$ M	2,5%	0,3		TRIM 10 $\mu$ M	33,2%	2,5
	TRIM 100 $\mu$ M	44,5%	1,7		TRIM 100 $\mu$ M	91,2%	1,3
	METH 10 $\mu$ M	7,1%	0,3		METH 10 $\mu$ M	7,9%	0,3
	METH 100 $\mu$ M	41,1%	0,6		METH 100 $\mu$ M	45,1%	0,9
BChE				BChE			
POX		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka	NEDPA		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
	OBI 10 $\mu$ M	1,2%	0,2		OBI 10 $\mu$ M	3,5%	0,6
	OBI 100 $\mu$ M	4,9%	0,2		OBI 100 $\mu$ M	12,1%	0,4
	PRA 10 $\mu$ M	0,4%	0,2		PRA 10 $\mu$ M	1,3%	0,1
	PRA 100 $\mu$ M	2,9%	0,7		PRA 100 $\mu$ M	9,6%	0,7
	ASO 10 $\mu$ M	0,7%	0,4		ASO 10 $\mu$ M	1,0%	0,6
	ASO 100 $\mu$ M	3,8%	0,7		ASO 100 $\mu$ M	3,8%	0,5
	TRIM 10 $\mu$ M	1,0%	0,3		TRIM 10 $\mu$ M	2,8%	0,5
	TRIM 100 $\mu$ M	3,0%	0,4		TRIM 100 $\mu$ M	10,2%	0,3
	METH 10 $\mu$ M	0,6%	0,2		METH 10 $\mu$ M	1,4%	0,5
	METH 100 $\mu$ M	2,2%	0,8		METH 100 $\mu$ M	6,5%	0,9
NEMP				NIMP			
		rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka			rel. aktivita enzymu [%]	směr. odchylka
	OBI 10 $\mu$ M	9,1%	0,2		OBI 10 $\mu$ M	27,1%	0,9
	OBI 100 $\mu$ M	25,1%	0,4		OBI 100 $\mu$ M	53,2%	3,5
	PRA 10 $\mu$ M	6,5%	0,3		PRA 10 $\mu$ M	15,2%	0,7
	PRA 100 $\mu$ M	29,5%	0,4		PRA 100 $\mu$ M	55,8%	1,4
	ASO 10 $\mu$ M	3,6%	0,2		ASO 10 $\mu$ M	14,0%	0,8
	ASO 100 $\mu$ M	20,7%	0,5		ASO 100 $\mu$ M	45,9%	0,5
	TRIM 10 $\mu$ M	8,8%	0,2		TRIM 10 $\mu$ M	27,3%	1,8
	TRIM 100 $\mu$ M	24,3%	0,5		TRIM 100 $\mu$ M	48,1%	1,5
	METH 10 $\mu$ M	4,2%	0,3		METH 10 $\mu$ M	16,4%	0,9
	METH 100 $\mu$ M	11,8%	0,3		METH 100 $\mu$ M	30,4%	3,4

Na obrázku 40–43 je znázorněna reaktivace BChE. Hodnoty se pohybují mezi 15–29%. Z těchto výsledků vybočuje pouze reaktivace BChE inhibované NIMP, kde reaktivace trimedoximem (10  $\mu$ M) dosahuje 35%. Obecně byla pozorována vyšší účinnost reaktivace oximovými reaktivátory u BChE než u AChE. Toto zjištění se neshoduje s poznatky publikovanými i s naměřenými (tabulka 10) pro volné enzymy, které poukazují na vyšší reaktivaci u AChE než u BChE<sup>56,57,58</sup>. Možným vysvětlením je, že kavita aktivního místa BChE je v porovnání u AChE mnohem větší. Tato skutečnost spolu s možnými změnami v terciární a kvartérní struktuře způsobené imobilizací, tak mohla zvýšit účinnost oximových reaktivátorů u imobilizované BChE<sup>25,55</sup>.

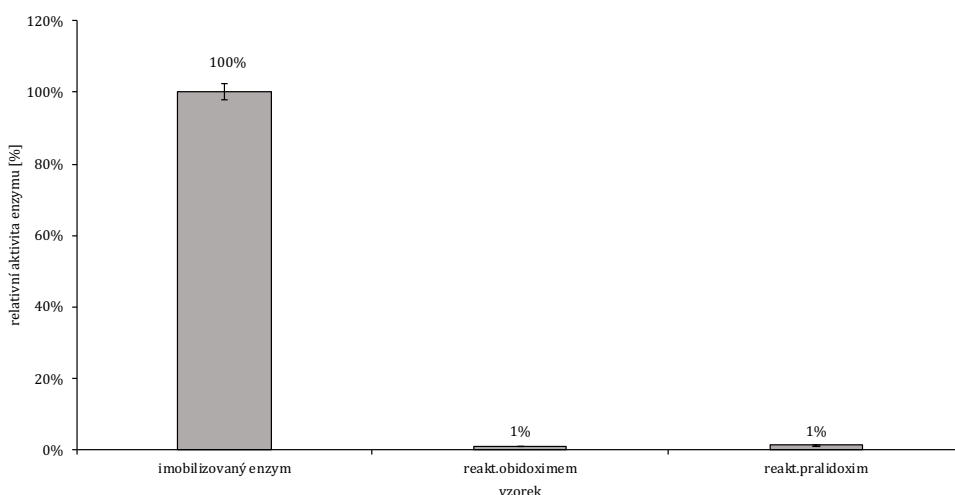
Rozdíly v reaktivaci mezi imobilizovaným enzymem a enzymem volným se dají vysvětlit změnami ve struktuře enzymu, případně sterickou nepřístupností aktivního místa pro molekuly reaktivátorů po imobilizaci enzymu.

### 3.2.5.2 Reaktivace AChE a BChE s NaCl v Na-fosfátovém pufru

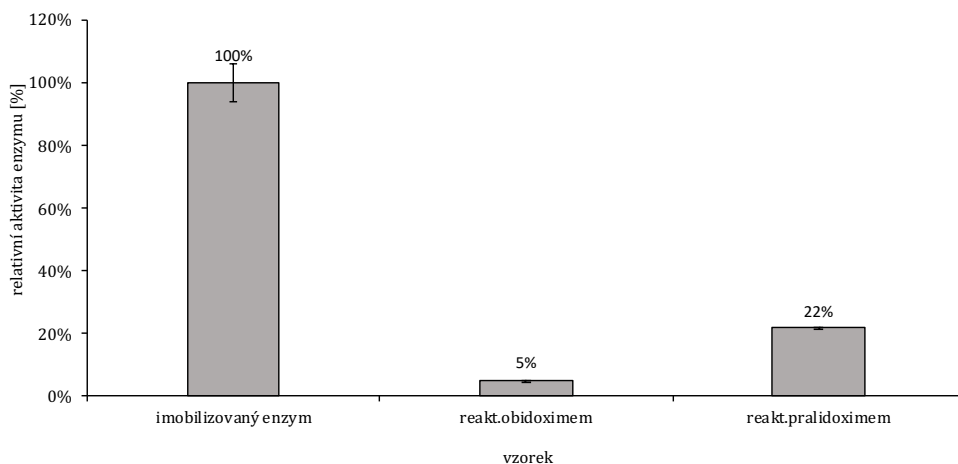
Na základě nízké reaktivace bylo potřeba ověřit, zda nedochází k nějaké nespecifické vazbě organofosfátu na enzym nebo částice. Tento jev by mohl mít za následek vyšší míru inhibice, jelikož by byl organofosfát stále přítomen. A proto jsme se rozhodli přidat do pufru NaCl (150 mM), jelikož se jedná o běžný způsob, jak eliminovat iontové nespecifické interakce<sup>59,60,61</sup>. Inhibice byla provedena pomocí NIMP (c=25 μM). Získané hodnoty jsou znázorněny v tabulce 11 a k porovnání hodnot byly vytvořeny obrázky 44 a 45.

**Tabulka 11** Hodnoty absorbance pro reaktivaci s přidávkem NaCl.

ACHE	1. měření	2. měření	průměr	směr.odchylka	rel. aktivita enzymu [%]
A (imobil. enzym)	0,386	0,354	0,398	0,023	100%
A (reak.obidoximem)	0,000	0,000	0,004	0,000	1%
A (reak.pralidoxim)	0,001	0,007	0,005	0,004	1%
BChE	1. měření	2. měření	průměr	směr.odchylka	rel. aktivita enzymu [%]
A (imobil. enzym)	0,511	0,427	0,461	0,059	100%
A(reakt.obidoxim)	0,024	0,023	0,023	0,001	5%
A(reakt.pralidoxim)	0,101	0,099	0,100	0,002	22%



**Obrázek 44** Reaktivace AChE s přidávkem NaCl do Na-fosfátového pufru



**Obrázek 45** Reaktivace BChE s přidávkem NaCl do Na-fosfátového pufru.

Na obrázku 44 a 45 je patrná referenční hodnota, která byla zvolena u imobilizovaného enzymu a to 100%. Jak pro AChE, tak pro BChE byl pozorován pokles reaktivační schopnosti v přítomnosti NaCl, jestliže jsme porovnali výsledky, které byly měřené s pufrem bez NaCl.

Jedinou výjimkou byla reaktivace s využitím NaCl a to u 2-PAM pro BChE, kde došlo ke zvýšení aktivity na 22%. Vyšší hodnotu u BChE reaktivované 2-PAM můžeme vysvětlit, že obidoxim má větší rozměr molekuly v porovnání s 2-PAM, a proto je u 2-PAM vyšší pravděpodobnost se dostat do aktivního místa enzymu. Také příliš vysoká koncentrace soli může způsobit inhibici požadované interakce a destabilizaci vznikajících komplexů<sup>62</sup>.

## 4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit, reaktivaci lidských cholinesteráz, které byly imobilizovány na různé stacionární fáze. Imobilizace lidských enzymů na magnetické nebo nemagnetické nanočástice, nám přináší řadu možností, jak s danými enzymy pracovat. Je to účinný nástroj, který má uplatnění v oborech přírodních věd, medicíně a v biotechnologiích. I přesto se stále objevují značné problémy s reaktivací enzymů. Neexistuje totiž žádný reaktivátor cholinesteráz, který by byl univerzální pro větší skupiny organofosfátů. Reaktivátory cholinesteráz jsou stále potřeba, a proto jim je věnováno velké množství studií.

V experimentální části byly zkoumány vazby enzymu na tři typy stacionárních fází: magnetické His-Trap, SIMAG-PGL i nemagnetické částice. U všech zkoumaných nosičů byla imobilizace potvrzena.

V rámci dalšího zkoumání byla sledována metabolická aktivita enzymu po jeho imobilizaci na částice. Aktivita se u těchto typů stacionárních fází lišila. U magnetických His-Trap částic se metabolická aktivita zvýšila až 2,5x. Enzym imobilizovaný na magnetické SIMAG-PGL a na nemagnetickou Sepharosu vykazoval velice nízkou aktivitu. Důvodem nízké aktivity mohou být strukturní změny na enzymu. Pro další práci s enzymem bylo využito pouze magnetických His-Trap částic, u kterých se potvrdilo, že imobilizovaný enzym na His-Trap částice byl stále funkční a více aktivní než volný enzym v roztoku, a to až po dobu 14 dnů. Imobilizace přináší značné výhody, např. opětovné použití, zlepšení enzymatických vlastností a zvýšená stabilita vůči změnám teploty, pH a vlivu organických rozpouštědel.

Inhibice imobilizovaného enzymu byla potvrzena díky tomu, že inhibovaný enzym ztratil svoji biologickou aktivitu a nebyl schopen vykonávat svoji funkci. Proto dalším důležitým krokem byla reaktivace. Reaktivace byla provedena u inhibované AChE i u inhibované BChE. U AChE byla pozorována nižší reaktivace než u BChE, u které se reaktivace pohybovala ve vyšších hodnotách. Aktivní místo AChE a BChE je odlišné. BChE má mnohem větší kavitu aktivního místa, tudíž může poskytnout větší prostor pro reaktivátor a tím i vyšší reaktivaci.

Výsledky se neshodují s publikovanými daty. Z toho můžeme usuzovat, že velikost kavity aktivního místa a změna struktury enzymu po imobilizaci, mohou hrát velkou roli při reaktivaci, a to může být podnětem k dalším studiím.

## 5 SEZNAM ZDROJŮ

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. Enzymologie. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-7080-330-4.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie pro studenty středních škol a všechny, které láká tajemství živé přírody. Praha: Scientia, 1998. ISBN 80-7183-083-6.
- [3] TEPLÁ, Milada. Biochemie – vzdělávací portál. Přírodní látky – Enzymy [online]. Praha: KUDCH, PŘF UK, 2018 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: [http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni\\_latky\\_enzymy.html](http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky_enzymy.html)
- [4] PROKEŠ, Jaroslav. Základy toxikologie: obecná toxikologie a ekotoxikologie. Praha: Karolinum, c2005. Základy. ISBN 80-7262-301-X.
- [5] Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Cholinesterase Inhibitors: Including Insecticides and Chemical Warfare Nerve Agents Part 2: What are cholinesterase inhibitors? [online]. Atlanta: U.S. Department of Health & Human Services, 2007 [cit. 2020-03-05]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=5>
- [6] PROKEŠ, Jaroslav. Úvod do toxikologie. Praha: Karolinum, 1991.
- [7] KUČERA, Matěj a HRABOVSKÁ, Anna: MOLEKULOVÉ FORMY CHOLÍNESTERÁZ A ICH KOTVIACE PROTEÍNY. Chemické listy, 2013, 107, 695 – 700.
- [8] PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – Important Enzymes of Human Body. Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic) [online]. 2004, 47(4), 215-228 [cit. 2020-03-05]. DOI: 10.14712/18059694.2018.95. ISSN 1211-4286. Dostupné z: <https://actamedica.lfhk.cuni.cz/47/4/0215/>

- [9] KUČA, Kamil, Daniel JUN a Kamil MUSILEK. Structural Requirements of Acetylcholinesterase Reactivators. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. 2006, 6(3), 269-277 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.2174/138955706776073510. ISSN 13895575. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-5575&volume=6&issue=3&spage=269>
- [10] Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* [online]. 2007, 13(12), 214-221 [cit. 2020-04-17]. Dostupné z: <http://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/563743>
- [11] Senior Biology: Neuronal Communication. *Senior Biology* [online]. Dostupné z: <http://msseconisseniorbiology.blogspot.com/p/the-nervous-system.html>
- [12] Neurobiology of butyrylcholinesterase [online]. 2003, 4 [cit. 2020-04-17]. ISSN 1471-0048.
- [13] Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem: Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance [online]. 2003, 28(2) [cit. 2020-04-17]. ISSN 1303-829X.
- [14] POHANKA, M. Butyrylcholinesterase as a biochemical marker. *Bratislava Medical Journal* [online]. 2013, 114(12), 726-734 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.4149/BLL\_2013\_153. ISSN 1336-0345. Dostupné z: [http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=3684&category\\_id=103&option=com\\_virtuemart](http://www.elis.sk/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=3684&category_id=103&option=com_virtuemart)

- [15] LERRO, Catherine C, Stella KOUTROS, Gabriella ANDREOTTI, et al. Organophosphate insecticide use and cancer incidence among spouses of pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Occupational and Environmental Medicine* [online]. 2015, 72(10), 736-744 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1136/oemed-2014-102798. ISSN 1351-0711. Dostupné z: <http://oem.bmj.com/lookup/doi/10.1136/oemed-2014-102798>
- [16] *Neurology India: Neurological syndromes following organophosphate poisoning*. [online]. 2000, 48(4) [cit. 2020-04-17]. ISSN 1998-4022. Dostupné z: <http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886;year=2000;volume=48;issue=4;spage=308;epage=13;aulast=Singh>
- [17] VLČEK, Vítězslav a POHANKA, Miroslav: ENVIRONMENTÁLNÍ ASPEKTY UŽITÍ ORGANOFOFOROVÝCH A KARBAMÁTOVÝCH PESTICIDŮ SCHVÁLENÝCH K UŽITÍ V ČESKÉ REPUBLICE. *Chemické listy*, 2011, 105, 908 - 912.
- [18] PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0608-3.
- [19] JIRÁK, Roman: *Farmakoterapie Alzheimerovy choroby*. *Praktické lékařství*, 2009, vol. 5(4): 176-178.
- [20] BRUNOVSKÝ, Martin: *Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci*. *Neurologie pro praxi*, 2007, vol. 8 (2): 112-117.
- [21] PEPEU, Giancarlo a Maria GIOVANNINI. *Cholinesterase Inhibitors and Beyond*. *Current Alzheimer Research* [online]. 2009, 6(2), 86-96 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.2174/156720509787602861. ISSN 15672050. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2050&volume=6&issue=2&spage=86>



- [22] ANAND, Preet a Baldev SINGH. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research* [online]. 2013, 36(4), 375-399 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1007/s12272-013-0036-3. ISSN 0253-6269. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12272-013-0036-3>
- [23] CUMMINGS, Jeffrey L. Cholinesterase Inhibitors: A New Class of Psychotropic Compounds. *American Journal of Psychiatry* [online]. 2000, 157(1), 4-15 [cit. 2020-04-17]. DOI: 10.1176/ajp.157.1.4. ISSN 0002-953X. Dostupné z: <http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.157.1.4>
- [24] GUTTMACHER, Alan E., Francis S. COLLINS, Robert L. NUSSBAUM a Christopher E. ELLIS. Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 2003, 348(14), 1356-1364 [cit. 2020-03-18]. DOI: 10.1056/NEJM2003ra020003. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM2003ra020003>
- [25] FRANJESEVIC, Andrew J., Sydney B. SILLART, Jeremy M. BECK, Shubham VYAS, Christopher S. CALLAM a Christopher M. HADAD. Resurrection and Reactivation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2019, 25(21), 5337-5371 [cit. 2020-03-20]. DOI: 10.1002/chem.201805075. ISSN 0947-6539. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/chem.201805075>
- [26] Cholinesterase Inhibitors – Management of the Cholinergic Toxidrome – Medications: 2-PAM (2-Pyridine Aldoxime Methylchloride) (Pralidoxime) | ATSDR - Environmental Medicine & Environmental Health Education - CSEM. Agency for Toxic Substances and Disease Registry [online]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/csem/csem.asp?csem=11&po=23>

- [27] WOREK, Franz, Timo WILLE, Nadine AURBEK, Peter EYER a Horst THIERMANN. Reactivation of organophosphate-inhibited human, Cynomolgus monkey, swine and guinea pig acetylcholinesterase by MMB-4: A modified kinetic approach. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2010, 249(3), 231-237 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.taap.2010.09.021. ISSN 0041008X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X10003637>
- [28] WINTER, Michael, Timo WILLE, Kamil MUSILEK, Kamil KUCA, Horst THIERMANN a Franz WOREK. Investigation of the reactivation kinetics of a large series of bispyridinium oximes with organophosphate-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicology Letters* [online]. 2016, 244, 136-142 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2015.07.007. ISSN 03784274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427415300114>
- [29] WOREK, Franz, Horst THIERMANN, Ladislaus SZINICZ a Peter EYER. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2004, 68(11), 2237-2248 [cit. 2020-04-02]. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.07.038. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295204005544>
- [30] MALINAK, David, Eugenie NEPOVIMOVA, Daniel JUN, Kamil MUSILEK a Kamil KUCA. Novel Group of AChE Reactivators—Synthesis, In Vitro Reactivation and Molecular Docking Study. *Molecules* [online]. 2018, 23(9) [cit. 2020-06-17]. DOI: 10.3390/molecules23092291. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2291>

- [31] WOREK, Franz, Jens VON DER WELLEN, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA a Horst THIERMANN. Reactivation kinetics of a homologous series of bispyridinium bis-oximes with nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Archives of Toxicology* [online]. 2012, 86(9), 1379-1386 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1007/s00204-012-0842-2. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-012-0842-2>
- [32] ZORBAZ, Tamara, David MALINAK, Nikola MARAKOVIĆ, et al. Pyridinium Oximes with Ortho - Positioned Chlorine Moiety Exhibit Improved Physicochemical Properties and Efficient Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Several Nerve Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2018, 61(23), 10753-10766 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01398. ISSN 0022-2623. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.8b01398>
- [33] KOVARIK, Zrinka, Nikolina MAČEK, Rakesh K. SIT, Zoran RADIĆ, Valery V. FOKIN, K. BARRY SHARPLESS a Palmer TAYLOR. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2013, 203(1), 77-80 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1016/j.cbi.2012.08.019. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279712001573>
- [34] ZEMAN, Jiří, VETCHÝ, David, FRANC, Aleš a PITSCHMANN, Vladimír: METODY IMOBILIZACE ENZYMŮ A JEJICH VYUŽITÍ PRO OPTICKOU (KOLORIMETRICKOU) DETEKCI INHIBITORŮ CHOLINESTERAS. *Chemické listy*, 2018, 112, 434-439.
- [35] BILAL, Muhammad, Yuping ZHAO, Tahir RASHEED a Hafiz M.N. IQBAL. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 120, 2530-2544 [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.025. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018337607>

- [36] Guisan J.M., Bolivar J.M., López-Gallego F., Rocha-Martín J. (2020) Correction to: Immobilization of Enzymes and Cells. In: Guisan J., Bolivar J., López-Gallego F., Rocha-Martín J. (eds) Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Molecular Biology, vol 2100. Humana, New York, NY
- [37] PEČOVÁ, Michaela, ZAJONCOVÁ, Ludmila, POLÁKOVÁ, Kateřina, ČUDA, Jan, ŠAFARÍKOVÁ, Mirka, ŠEBELA, Marek a ŠAFARÍK, Ivo: BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY IMOBILIZOVANÉ NA MAGNETICKÝCH NOSIČÍCH A JEJICH VYUŽITÍ V BIOCHEMII A BIOTECHNOLOGII. Chemické listy, 2011, 105, 524-530.
- [38] DOBSON. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* [online]. [cit. 2020-06-16]. DOI: 10.2147/IJN.S1608. ISSN 1178-2013. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/magnetic-nanoparticles-for-gene-and-drug-delivery-peer-reviewed-article-IJN>
- [39] SAFARIK, Ivo a Mirka SAFARIKOVA. BioMagnetic Research and Technology [online]. 2(1) [cit. 2020-03-29]. DOI: 10.1186/1477-044X-2-7. ISSN 1477044X. Dostupné z: <http://biomagres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-044X-2-7>
- [40] ŽĎAROVÁ KARASOVÁ, Jana, KUČA, Kamil, JUN, Daniel a BAJGAR, Jiří: UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLINESTERAS PŘI *IN VIVO* HODNOCENÍ ÚČINKŮ REAKTIVÁTORŮ. Chemické listy, 2010, 104, 46-50.

- [41] WOREK, Franz, Peter EYER a Horst THIERMANN. Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning. *Drug Testing and Analysis* [online]. 2012, 4(3-4), 282-291 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1002/dta.337. ISSN 19427603. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dta.337>
- [42] ELLMAN, George L., K.Diane COURTNEY, Valentino ANDRES a Robert M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 1961, 7(2), 88-95 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/0006-2952(61)90145-9. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>
- [43] KNECHT, Steven, Daniel RICKLIN, Alex N. EBERLE a Beat ERNST. Oligohistags: mechanisms of binding to Ni<sup>2+</sup>-NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition* [online]. 2009, 22(4), 270-279 [cit. 2020-07-22]. DOI: 10.1002/jmr.941. ISSN 09523499. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.941>
- [44] ANDREESCU, Silvana, Bogdan BUCUR a Jean-Louis MARTY. Affinity Immobilization of Tagged Enzymes. GUI SAN, Jose M., ed. *Immobilization of Enzymes and Cells* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2006, 2006, s. 97-106 [cit. 2020-07-15]. *Methods in Biotechnology*<sup>TM</sup>. DOI: 10.1007/978-1-59745-053-9\_9. ISBN 978-1-58829-290-2. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-053-9\\_9](http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-053-9_9)
- [45] MATEO C., ABIAN O., FERNANDEZ-LAFUENTE R., GUI SAN J.M.: Reversible enzyme immobilisation via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng*, 2000, 68, 98-105.
- [46] 301 Moved Permanently [online]. Copyright ©D [cit. 15.07.2020]. Dostupné z: <http://www.chemicell.com/products/protocols/docs/SiMAG-PGL.pdf>

- [47] BILLMAN, JOHN H. a ARTHUR C. DIESING. Reduction of Schiff Bases with Sodium Borohydride. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1957, 22(9), 1068-1070 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1021/jo01360a019. ISSN 0022-3263. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo01360a019>
- [48] *Journal of Pharmacy Research: Direct reductive amination of Schiff bases using sodium borohydride possessing antibacterial activity.* [online]. 5(8). 2012 [cit. 2020-07-21]. ISSN 0974-6943. Dostupné z: <http://jprsolutions.info/newfiles/journal-file-56c549ed9476d1.01880676.pdf>
- [49] RODRIGUES, Rafael C., Claudia ORTIZ, Ángel BERENGUER-MURCIA, Rodrigo TORRES a Roberto FERNÁNDEZ-LAFUENTE. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev*[online]. 2013, 42(15), 6290-6307 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1039/C2CS35231A. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2CS35231A>
- [50] LUCKARIFT, Heather R, Jim C SPAIN, Rajesh R NAIK a Morley O STONE. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support. *Nature Biotechnology* [online]. 2004, 22(2), 211-213 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1038/nbt931. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nbt931>
- [51] Risso, F. V. A., Mazutti, M. A., Costa, F., Treichel, H., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2010). Comparative studies of the stability of free and immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in aqueous-organic solutions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 27(4), 507–516. doi:10.1590/s0104-66322010000400002
- [52] SINGH, Raushan, Manish TIWARI, Ranjitha SINGH a Jung-Kul LEE. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 14(1), 1232-1277 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.3390/ijms14011232.

ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/1232>

- [53] Kumari, A., Mahapatra, P., Kumar, G. V. and Banerjee, R., Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31, 291 (2008).
- [54] SHELDON, Roger A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* [online]. 2007, 349(8-9), 1289-1307 [cit. 2020-07-14]. DOI: 10.1002/adsc.200700082. ISSN 16154150. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.200700082>
- [55] WOREK, Franz, Horst THIERMANN, Ladislaus SZINICZ a Peter EYER. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* [online]. 2004, 68(11), 2237-2248 [cit. 2020-06-29]. DOI: 10.1016/j.bcp.2004.07.038. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295204005544>
- [56] MUSILOVA, Lucie, Kamil KUCA, Young-Sik JUNG a Daniel JUN. In vitro oxime-assisted reactivation of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Clinical Toxicology* [online]. 2009, 47(6), 545-550 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1080/15563650903058914. ISSN 1556-3650. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15563650903058914>
- [57] JUN, D., L. MUSILOVA, K. KUCA, J. KASSA a J. BAJGAR. Potency of several oximes to reactivate human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibited by paraoxon in vitro. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2008, 175(1-3), 421-424 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.004. ISSN 00092797. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279708002585>

- [58] KUČA, Kamil, Daniel JUN, Lucie JUNOVA, et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of Novel Bisquaternary Aldoxime Reactivators on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules* [online]. 2018, 23(5) [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.3390/molecules23051103. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/23/5/1103>
- [59] TSUMOTO, Kouhei, Daisuke EJIMA, Anna M. SENCZUK, Yoshiko KITA a Tsutomu ARAKAWA. Effects of salts on protein–surface interactions: applications for column chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, 96(7), 1677-1690 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1002/jps.20821. ISSN 00223549. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916322997>
- [60] 4 Ways to Reduce Non-Specific Binding in SPR Experiments. Benchtop Surface Plasmon Resonance | OpenSPR | Nicoya [online]. Dostupné z: <https://nicoyalife.com/blog/4-ways-reduce-non-specific-binding-spr/>
- [61] GÜVEN, Esin, Karen DUUS, Magnus Christian LYDOLPH, Charlotte Sværke JØRGENSEN, Inga LAURSEN a Gunnar HOUEN. Non-specific binding in solid phase immunoassays for autoantibodies correlates with inflammation markers. *Journal of Immunological Methods* [online]. 2014, 403(1-2), 26-36 [cit. 2020-07-21]. DOI: 10.1016/j.jim.2013.11.014. ISSN 00221759. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175913003396>
- [62] GANESANA, Mallikarjunarao, Georges ISTARNOULIE, Jean-Louis MARTY, Thierry NOGUER a Silvana ANDREESCU. Site-specific immobilization of a (His)6-tagged acetylcholinesterase on nickel nanoparticles for highly sensitive toxicity biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2011, 30(1), 43-48 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.bios.2011.08.024. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631100577X>