



Akademie věd České republiky

Teze disertace  
k získání vědeckého titulu "doktor věd"  
ve skupině: Chemické vědy

Cholinesterasy v analýze a diagnostice

.....

název disertace

Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru Analytická chemie

Jméno uchazeče: doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Pracoviště uchazeče: Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany v Brně,  
Třebešská 1575, 50001 Hradec Králové

V Brně dne 9.12.2013

## **Obsah**

Souhrn .....	3
Summary .....	4
1. Užití zkratky .....	5
2. Úvod.....	6
3. Literární přehled.....	7
3.1. Cholinergní systém .....	7
3.2. Cholinesterasy a jejich význam .....	10
3.3. Stanovení aktivity cholinesteras .....	14
4. Cíle.....	18
5. Diskuze .....	18
6. Vlastní komentované práce.....	23
7. Citace .....	25

## Souhrn

Cholinergní systém je část nervového systému využívající acetylcholin jako neurotransmitter reagující s acetylcholinovými receptory (AChR). Signál je ukončen hydrolýzou neurotransmiteru enzymem acetylcholinesterasou (AChE). Mimo AChE je v těle přítomna ještě jedna cholinesterasa, butyrylcholinesterasa (BChE), která nemá jednoznačně rozpoznatelný fyziologický význam. Nicméně může do jisté míry zastupovat AChE při patologických procesech a podílet se na metabolismu některých jedů či léků. Cholinesterasy mohou být inhibovány řadou látek. Jedná se o insekticidy (například karbofuran), vojensky využitelné nervově paralytické látky (například sarin, VX), některé léky pro Alzheimerovu chorobu (například donepezil, rivastigmin, galantamin), léky pro onemocnění myasthenia gravis (pyridostigmin, neostigmin) a sekundární metabolity hub a rostlin (aflatoxiny, kofein, huperzin). *In vitro* mohou cholinesterasy sloužit jako biorekogniční element v konstrukci analytických metod a biosenzorů pro stanovení přítomnosti jejich inhibitorů. Stanovení aktivity cholinesteras může sloužit pro potřeby klinické biochemie zejména k diagnostice otrav ireverzibilním inhibitorem (AChE i BChE), jako test funkčnosti jater (BChE) a jaterních metastáz (BChE). Tento soubor komentovaných prací obsahuje deset vybraných článků a diskuzi dosavadního vlastního směru výzkumu v problematice cholinesteras. Jsou diskutovány hlavní směry ve výzkumu cholinesteras a přínos aspiranta k vědnímu oboru.

## Summary

Cholinergic system is a part of nerve system. It uses acetylcholine as a neurotransmitter able to interact with acetylcholine receptors (AChR). The transmitted signal is ended by action of enzyme acetylcholinesterase (AChE). Beside AChE, the second cholinesterase, butyrylcholinesterase (BChE), takes place in the body. Comparing to AChE, BChE has not revealed physiological sense. However, it is known that BChE can substitute AChE during some pathological processes and do detoxification of some drugs. Cholinesterases can be inhibited by many of compounds. Insecticides such as carbofuran, nerve agents used for chemical warfare such as sarin and VX, some drugs for Alzheimer's disease such as donepezil, rivastigmine and galantamine, some drugs for myasthenia gravis such as pyridostigmine and neostigmine, some fungal and plant secondary metabolites such as aflatoxins, caffeine and huperzine can be exemplified. In an *in vitro* assay, cholinesterases can be performed as a biorecognition element suitable for construction of an analytical test or a biosensor for assay of cholinesterases' inhibitors. Assay of cholinesterases activity in biological samples is well suited for diagnosis of poisoning by an irreversible inhibitor (assay of either AChE or BChE), liver function test (assay of BChE) and some kind of liver metastases (assay of BChE). In the here presented thesis, ten chosen papers with comments is provided. Beside this, discussion of my contribution to the field, main aims of research including quotation of the other works is provided.

## 1. Užité zkratky

AChE	acetylcholinesterasa
AChR	acetylcholinový receptor
Asp	kyselina aspargová
BChE	butyrylcholinesterasa
GPI	glykofosfatidylinositol
ChAT	cholin O-acetyltransferasa
ChT	sodný kation dependentní cholinový transportér
IF	Impact Factor (angl.)
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NYP	neuropeptid Y
Phe	fenylalanin
SNAP-25	protein asociovaný se synaptosomy 25
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor Attachment protein receptors (angl.)
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
VAcHT	vezikulární acetylcholinový transportér
VX	O-ethyl S-[2-(diisopropylamino)ethyl] ethylphosphonothioat

## 2. Úvod

Cholinergní nervový systém je předmětem zájmu výzkumu na poli různých mateřských oborů. Existují člověkem vytvořené léky ovlivňující různé části cholinergního systému. Na cholinergní systém jsou zacíleny nervově paralytické látky užívané ve vojenství a cholinergní systém může být ovlivněn řadou přírodních jedů. Snaha zkoumat a porozumět cholinergnímu systému je interdisciplinární záležitostí a v tomto duchu bylo přistoupeno i k pojetí vlastní práce. I když otištěné a diskutované autorské články v odborných periodících se dotýkají svým významem různých částí cholinergního systému, společným jmenovatelem jsou cholinesterasy a využití stanovení či ovlivnění jejich aktivity v živém organismu i *in vitro*.

Při výběru autorských článků, o které se disertační práce opírá, byl kladen důraz na to, aby se jednalo o články, které nebyly užity v jiném profesním řízení (habilitace) a společně vytvářejí konzistentní celek. Celkové množství tematických článků je samozřejmě vyšší než ty zde užité. Při pohledu na celkovou autoevaluaci může být čtenáři patrný mírný posun řešeného tématu autora. Je to způsobené jednak snahou reflektovat vývoj oboru a zároveň nutností financovat výzkum a vycházet z řešených projektů a jejich možností vymezených grantovými agenturami.

### 3. Literární přehled

#### 3.1. Cholinergní systém

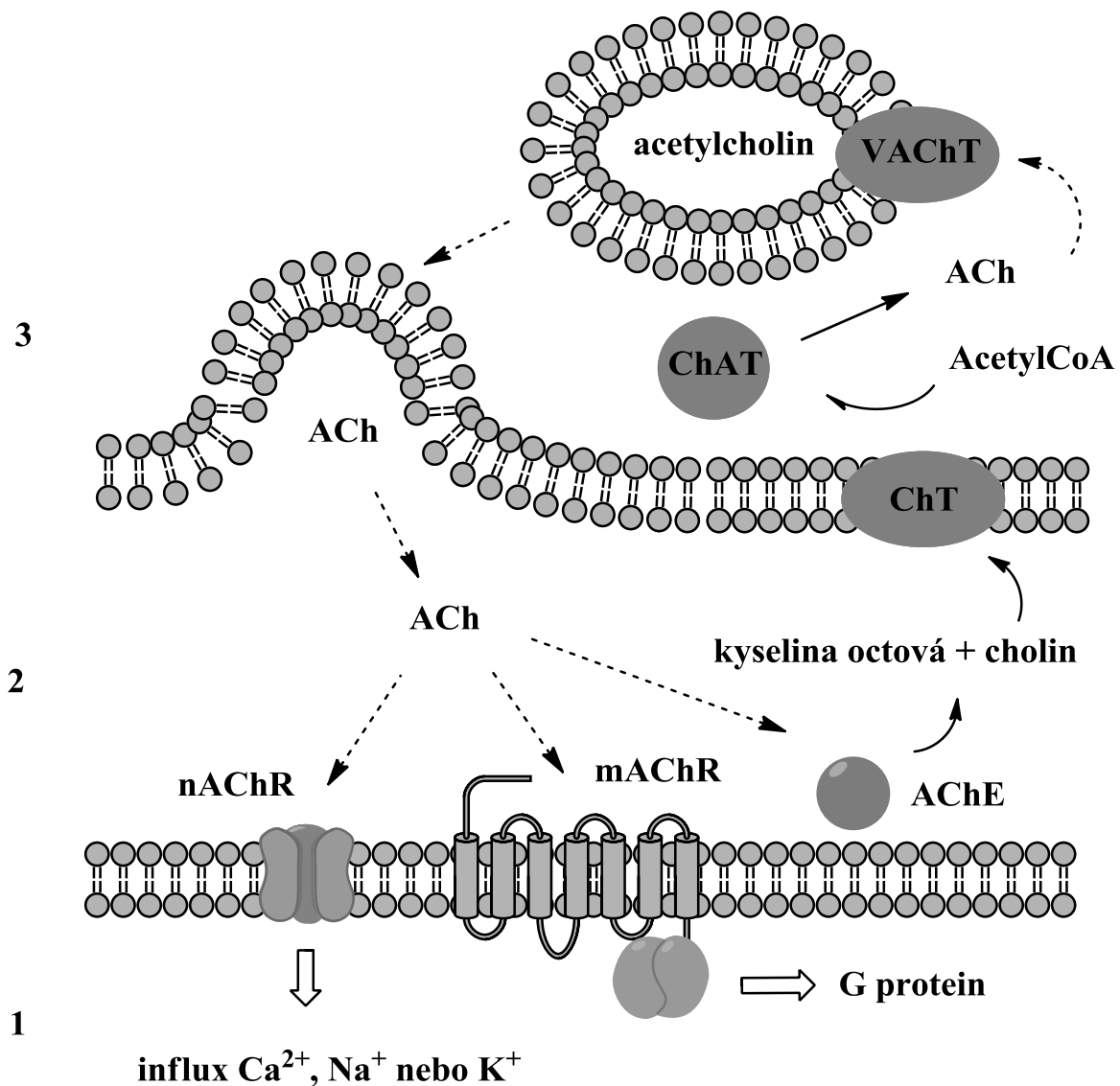
Šíření impulsů v nervové soustavě pomocí změn v membránovém potenciálu je efektivní způsob přenosu informace. Problém ovšem nastává ve chvíli, kdy signál reprezentovaný změnou koncentrace iontů na rozdílných stranách membrány doputuje ke štěrbině mezi dvěma neurony nebo neuronem a jinou výkonnou buňkou, neurosynaptické štěrbině. Aby signál mohl překonat neurosynaptickou štěrbinu, je třeba součinnosti malých chemických molekul, takzvaných neurotransmiterů. V současnosti je známo několik desítek látek podílejících se na přenosu informace přes neurosynaptickou štěrbinu [1,2]. V praxi se jedná například o dopamin [3], kyselinu gama-aminomáselnou [4], kyselinu glutamovou [5], serotonin [6] a různé neuropeptidy jako je například neuropeptid Y známý též pod zkratkou NYP [7]. Acetylcholin je rovněž jedním z významných neurotransmiterů [8].

Část nervové soustavy, která využívá acetylcholin jako neurotransmiter, bývá v literatuře označována jako cholinergní systém [9,10]. Je třeba zdůraznit, že se nejedná o bezvýznamnou část nervové soustavy. Například půdní hlístice háďátka obecné (*Caenorhabditis elegans*), sloužící jako modelový organizmus, má třetinu svého nervového systému tvořenou právě nervovými buňkami využívající acetylcholin jako neurotransmiter [11]. V lidském těle tvoří nervové buňky využívající acetylcholin podstatnou část parasympatické periferní nervové soustavy, jsou významně zastoupeny v sympatické periferní nervové soustavě a jsou velmi běžné i v centrální nervové soustavě [12,13].

Nyní se zaměříme přímo na synaptickou štěrbinu využívající acetylcholin jako transmiter přenášeného signálu. Popis jednotlivých částí je rovněž patrný z obrázku 1. Na postsynaptické části jsou lokalizovány acetylcholinové receptory (AChR), o kterých bude pojednáno dále. Acetylcholinesterasa (AChE), která je popsána v další kapitole, je buď volná nebo vázaná na vnější část membrány dendritu či jiné ovlivňované buňky. AChE hydrolyticky štěpí acetylcholin na kyselinu octovou a cholin. V synapsi vznikající cholin je přenášen  $\text{Na}^+$  dependentním cholinovým transportérem do cytosolu axonálního zakončení [14]. Působením enzymu cholin O-acetyltransferasa (ChAT; EC 2.3.1.6) vzniká acetylcholin [15]. Vzniknuvší acetylcholin je dále přenášen vezikulárním acetylcholinovým transportérem do organelové vezikuly [16].

Vezikuly naplněné acetylcholinem můžeme přirovnat k nabitě zbrani. Uvolnění neurotransmitteru je iniciováno změnou obsahu vápenatého kationtu, ke kterému dochází při šíření nervového signálu v terminální části axonu. Pokud zůstaneme u předchozího příkladu, tak zvýšení koncentrace vápenatého kationtu je stisknutím spouště, po kterém následuje výstřel, to jest fúze vezikul s membránou axonu a vylití jejich obsahu do synaptické štěrbin. Vlastní mechanismus vylití vezikul je samozřejmě složitější a uplatňuje se při něm kaskáda regulačních proteinů. Vezikuly obsahují membránově vázaný protein synaptotagmin, který váže vápenaté kationty [17]. Synaptotagmin díky vázanému vápníku získává afinitu k takzvanému komplexu SNARE (zkratka z anglického Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor Attachment protein REceptors). Jedná se o komplex proteinů synaptobrevinu lokalizovaného na povrchu vezikulu s proteiny SNAP-25 (zkratka z anglického Synaptosomal Associated Protein 25) a syntaxinu nacházejícího se na vnitřní straně membrány axonálního zakončení [18,19].





**Obrázek 1:** Princip přenosu signálu pomocí acetylcholinu jako neurotransmiteru.

Zkratky: ACh – acetylcholin; AChE – acetylcholinesterasa; ChAT – cholin-O-acetyltransferasa; ChT – sodný kation dependentní cholinový transportér; mAChR – muskarinový acetylcholinový receptor; nAChR – nikotinový acetylcholinový receptor; VChT – vezikulární acetylcholinový transportér.

1 – dendrit neuronu nebo jiná výkonná buňka, 2 – synaptická štěrbin, 3 – axonální zakončení neuronu.

Acetylcholin ovlivňuje cílové buňky prostřednictvím buď muskarinových acetylcholinových receptorů (mAChR) nebo nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChR). Pojmenování zohledňuje fakt, že receptory byly v minulosti rozpoznány díky selektivnímu agonismu sekundárních metabolitů muskarinu z muchomůrky červené (*Amanita*

*muscaria*) a nikotinu z tabáku virginského (*Nicotiana tabacum*). Z molekulárního úhlu pohledu jsou nAChR iontové kanály, zatímco mAChR jsou spřaženy s G proteiny.

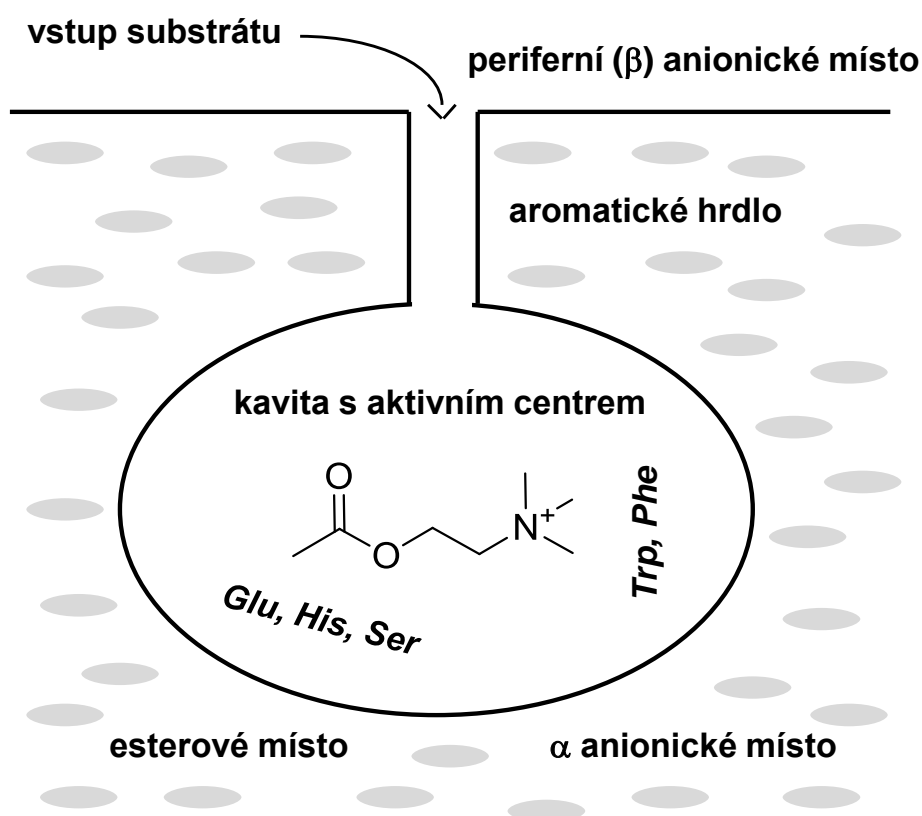
V minulosti se používalo dělení mAChR na dva typy: stimulační a inhibiční. Stimulační zvyšoval aktivitu fosfolipasy C a tím i hladinu sekundárního posla inositoltrifosfátu, inhibiční snižoval aktivitu adenylátcyklasy [20,21]. V současnosti se mAChR dělí na pět základních typů: M1, M2, M3, M4 a M5 [22]. Z uvedeného výčtu můžeme mAChR typu M1, M3 a M5 ztotožnit s výše uvedenými stimulačními receptory. Působí prostřednictvím fosfolipasy C a preferenčně jsou vázány na typ  $G_q$  protein [23]. Oproti tomu typy M2 a M4 jsou spojené  $G_i$  proteinem a působí inhibičně prostřednictvím adenylát cyklasy [24]. Oproti mAChR je členění nAChR trochu složitější. Jedná se o homo či hetero pentamer tvořený některými z podjednotek  $\alpha 1-10$ ,  $\beta 1-4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  [25,26]. U člověka byly popsány všechny výše uvedené podjednotky vyjma podjednotky  $\alpha 8$  známé u ptáků [27,28]. Pentamer má cirkulární symetrický tvar s centrálně umístěným pórem. Podjednotkové složení dává receptoru selektivitu pro jednotlivé biogenní kationty a nAChR mohou mít vysokou selektivitu pro  $Na^+/K^+$  nebo  $Ca^{2+}$  [29-31].

### 3.2. Cholinesterasy a jejich význam

Pomineme-li tzv. pseudocholinesterasy známé u nižších vývojových forem, jsou v současnosti známé dvě cholinesterasy. První je v předešlé kapitole zmíněná AChE (EC 3.1.1.7), druhou je butyrylcholinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8). AChE se ve starší literatuře nazývá krevní cholinesterasa (blood cholinesterase) nebo pravá cholinesterasa (true cholinesterase). BChE bývala označována jako plazmatická cholinesterasa. Názvy vypovídají o faktu, že AChE je přítomna na povrchu erytrocytů a zůstává v krevní sedimentu. BChE při zpracování krve zůstává v krevní plazmě či séru.

Strukturně obě cholinesterasy náleží do rodiny esteras – lipas [32,33]. Esterasy si obecně uchovávají velkou míru sekvenční podobnosti i pro proteiny získané z evolučně vzdálených organizmů [33,34]. U obou enzymů nalezneme také katalytickou triádu tvořenou serinem, histidinem a glutamátem [35]. Sekvenční analýzou byla prokázána téměř 54% podobnost mezi lidskou BChE a AChE z modelového organismu parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*) [36]. Oba enzymy se mohou vyskytovat v monomerní až homotetramerní formě. Pro uchycení v membráně může být přítomna i glykofosfatidylinositolová (GPI) kotva poskytující amfifilní vlastnosti [37]. Velikost podjednotky AChE je 69 kDa, BChE má podjednotku větší – 85 kDa [35]. Kvarterní struktura

cholinesteras v organizmu je patrná z citované práce [38]. Autoři prokázali, že v mozku kočkodana lesula (*Cercopithecus lomamiensis*) převládá amfifilní forma AChE (83 %). Tato amfifilní forma je z převážné části tetramerní (85 %), ale vyskytnout se může i dimerní (10 %) a monomerní (5 %) forma. Oproti tomu hydrofilní forma je buď tetramerní (85 %) nebo monomerní (15 %).



**Obrázek 2:** Schéma aktivního centra acetylcholinesterasy.

S ohledem na katalytické působení cholinesteras a mechanismus působení inhibitorů mají následující části význam: aktivní centrum, aromatické hrdlo a periferní nebo též β anionické místo. Aby substrát pronikl až do aktivního centra, musí projít β anionickým místem a aromatickým hrdlem. Přehledná struktura aktivního centra a přilehlých oblastí je patrná z obrázku 2. Začneme prvním místem, které musí substrát minout při své cestě k aktivnímu centru. **β anionické místo** nebo též **periferní anionické místo** hraje významnou roli u AChE, zatímco BChE jej má vyvinuté mnohem méně [39-41]. Aminokyselinová rezidua Tyr 70, Asp 72, Tyr 121, Trp 279 a Tyr 334 (číslování pro parejnoka kalifornského) v β anionickém místě jsou zodpovědné za interakce kation π a π-π s četnými farmakologicky

zajímavými inhibitory a následnou konformační změnu v molekule AChE [42].  $\beta$  anionickému místu je přisuzována pseudokatalytická vlastnost spočívající ve vytvoření vhodného mikroprostředí umožňující agregaci amyloidních prekurzorů do formy amyloidního plaku v centrální nervové soustavě pacientů trpících Alzheimerovou chorobou [43,44]. Do  $\beta$  anionického místa AChE se vážou inhibitory schopné interakce kation  $\pi$  a  $\pi$ - $\pi$ . Jedná se například o aflatoxiny [45] a ethidium a propidium [46,47]. Další látka, huperzin A, je schopna interakce s oběma anionickými místy [48].

**Aromatické hrdlo** obsahuje, jak název napovídá, obsahuje vyšší procento obsahu reziduí aromatických aminokyselin. Aromatické hrdlo je vyvinutější u AChE, kde je přítomno 14 reziduí aromatických aminokyselin oproti osmi aromatickým reziduíům u BChE [49]. Aromatické hrdlo zajišťuje roli jakéhosi molekulového síta determinujícího, které substráty či inhibitory proniknou až do aktivního centra. V samotném aromatickém hrdle zřídka dochází k silné vazbě inhibitorů. Bylo však prokázáno, že v aromatickém hrdle může dojít k inhibici AChE díky zakotvení 4-acetoxy-plakinaminu B [50] nebo i dekamethonia [51].

**Aktivní centrum** AChE a BChE jsou si vzájemně velmi podobné. Triáda katalytických aminokyselin serin – glutamát – histidin (pozice Ser 200 – Glu 327 – His 440 pro AChE z parejnoka kalifornského) tvoří tzv. esterové nebo též esteratické místo zodpovědné za hydrolytické štěpení esterové vazby substrátu [52]. Druhou nezbytnou součástí aktivního centra cholinesteras je  $\alpha$  anionické místo někdy označované jen anionické místo nebo aktivní anionické místo. Toto místo je zodpovědné za správnou orientaci substrátu vůči esterovému místu [53]. Významnou úlohu zde hrají Trp 84 a Phe 330 (pozice aminokyselin pro AChE z parejnoka kalifornského), které jsou schopny vytvářet interakce kation  $\pi$  se substrátem [54]. Serin v aktivním centru vytváří stabilní ester s organofosforovými inhibitory schopnými ireverzibilně inhibovat jak AChE tak i BChE. Jedná se například o nervově paralytické látky užívané ve vojenství: sarin, soman, tabun, VX, a látky v minulosti užívané jako pesticidy jako je např. malaoxon či paraoxon [55,56]. Jiné látky, neinhibující cholinesterasy, jako je např. malathion či parathion, jsou v organismu konvertovány na zmíněné inhibitory malaoxon a paraoxon [40,41]. Se serinem v esterovém místě reagují i karbamátové inhibitory cholinesteras. Tuto inhibici označujeme jako pseudoireverzibilní, protože vzniklý konjugát je nestabilní a dochází k spontánní pomalé hydrolyze a tím návratu aktivity cholinesteras [57,58]. Typickými zástupci karbamátových inhibitorů jsou například lék pro nemoc myasthenia gravis – pyridostigmin [57], lék užívaný při Alzheimerově chorobě rivastigmin [59,60] a v zemích Evropské unie zakázaný insekticid karbofuran [61,62]. Inhibitory vážající se do  $\alpha$  anionického místa jsou například látky užívané pro zmírnění

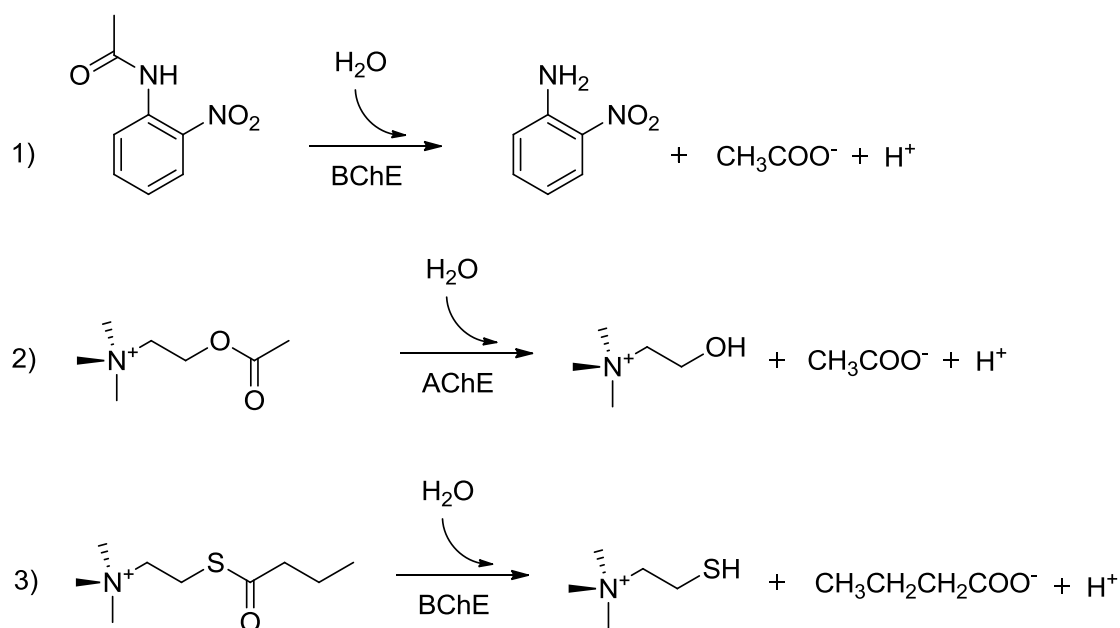
příznaků Alzheimerovy choroby huperzin, který by v budoucnosti měl být zaveden jako dostupný lék [63-65], v minulosti distribuovaný takrin [66-69] a v současnosti farmakologicky užívaný galantamin [70-74] a donepezil [75,76]. Selektivita zmíněných látek vázajících se do  $\alpha$  anionického místa je rozdílná vůči AChE a BChE. Zatímco huperzin, takrin a galantamin jsou silné inhibitory AChE a BChE je jimi inhibována výrazně méně, donepezil má afinitu pouze k AChE. Inhibitory cholinesteras jsou přehledně shrnuty v tabulce 1.

**Tabulka 1:** Přehled vybraných inhibitorů cholinesteras

<b>Mechanismus</b>	<b>Cílové místo</b>	<b>Enzym</b>	<b>Inhibitory</b>	<b>Citace</b>
Ireverzibilní	esterové místo	AChE, BChE	sarin soman, tabun, VX, malaaxon, paraaxon, po metabolické aktivaci: malathion, parathion, dimethoat	[55,56][40,41]
Pseudoireverzibilní	esterové místo	AChE, BChE	pyridostigmin, rivastigmin, karbofuran	[57,59-62]
Reverzibilní - kompetitivní	$\alpha$ anionické místo	AChE	galantamin	[70-74]
Reverzibilní nekompetitivní	$\alpha$ anionické místo	AChE > BChE	takrin	[66-69]
Reverzibilní nekompetitivní	$\alpha$ anionické místo	AChE	donepezil	[75,76]
Reverzibilní nekompetitivní	$\alpha$ anionické místo	AChE > BChE	huperzin A	[63-65]
Reversible non- competitive	periferní anionické místo	AChE	aflatoxin B1; ethidium; propidium	[40,45-47,77]

### 3.3. Stanovení aktivity cholinesteras

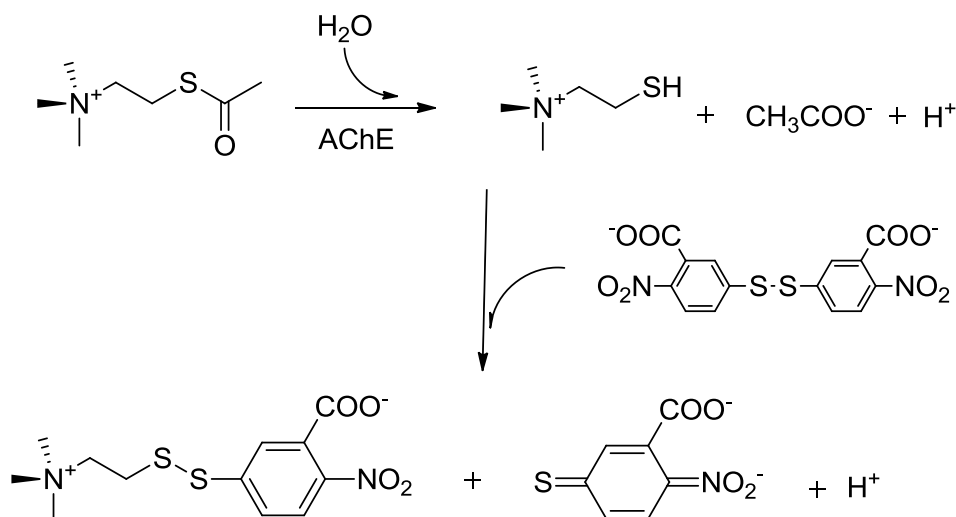
Obě cholinesterasy vykazují acylamidasovou, esterasovou a thioesterasovou aktivitu. To znamená, že jsou schopny provádět štěpení některých arylacylamidů, esterů a thioesterů schopných proniknout do aktivního centra a nalézt zde vhodnou orientaci vůči esterovému místu aktivního centra. Reakce jsou na příkladech ukázány v obrázku 3. AChE na rozdíl od BChE štěpí acetyl- $\beta$ -metylthiocholin a acetyl- $\beta$ -metylcholin [78,79]. Číslo přeměny acetylcholinu a acetylthiocholinu je vyšší při hydrolýze katalyzované AChE než BChE [80-82]. Naopak BChE lépe štěpí butyrylcholin [83], butyrylthiocholin [82,84], propionylcholin [85] a propionylthiocholin [82,86]. Specifické pro BChE je štěpení arylacylamidů jako v obrázku 3 zobrazeného *o*-nitroacetanilidu [87-89]. Z výše zmíněných reakcí lze přímo spektrofotometricky stanovit aktivitu BChE díky její acylamidasové aktivitě. Jestliže zůstaneme u příkladu *o*-nitroacetanilidu, tak vzniká *o*-nitroanilin dávající roztoku žluté až žluto-oranžové zbarvení.



**Obrázek 3:** Ukázka štěpení aryl acylamidu, esteru a thioesteru pomocí cholinesteras. Hydrolýza *o*-nitroacetanilidu pomocí BChE (reakce 1), acetylcholinu pomocí AChE (reakce 2) a butyrylthiocholinu pomocí BChE (reakce 3) jsou vyobrazeny jako reprezentativní příklady.

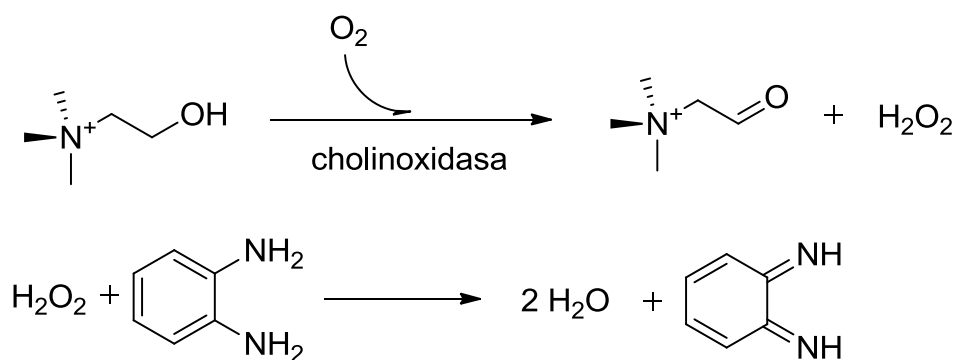
Při stanovení aktivity cholinesteras lze využít faktu, že z esteru vzniká kyselina snižující pH roztoku. Například v případě acetylcholinu a acetylthiocholinu kyselina octová. V případě butyrylcholinu a butyrylthiocholinu kyselina máselná. Aplikace pH indikačního činidla nebo provádění reakce na tenké pH indikující vrstvě jsou dostatečné pro posouzení změn v aktivitě enzymu či stanovení přítomnosti inhibitoru [90]. Jinou možností je acidobazická titrace s kolorimetrickým či potenciometrickým výstupem [91]. Metody založené na sledování pH mají ovšem své limity. Při analýze je třeba překonat pufrující schopnost roztoku. U cholinesteras navíc dochází k prudkému poklesu čísla přeměny, pokud reakce neprobíhá při optimálním pH, kterým je pro většinu cholinesteras fyziologické pH 7,4 [92,93].

Běžným laboratorním testem pro stanovení aktivity cholinesteras je tzv. Ellmanova metoda zavedená na počátku šedesátých let minulého století [94]. Ellmanovou metodou lze spektrofotometricky stanovit aktivitu jak AChE, tak i BChE použitím acetylthiocholinu v případě AChE, nebo butyrylthiocholinu v případě BChE [40]. Je samozřejmě možné použít i jiné thioestery, které však nacházejí uplatnění spíše výjimečně. Princip metody je patrný z obrázku 4. Metoda je založena na dvou krocích. V prvním kroku se thioester hydrolyzuje na thiocholin a příslušnou kyselinu katalytickým působením AChE nebo BChE. V druhém kroku thiocholin spontánně reaguje s chromogenem, kyselinou 5,5'- dithiobis-(2-nitrobenzoovou), za vzniku konjugátu thiocholinu s kyselinou 5-thio-2-nitrobenzoovou a kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové [95]. Kyselina 5-thio-2-nitrobenzoové, respektive její anionická forma vyskytující se při pH 7,4, absorbuje při 412 nm s extinkčním koeficientem  $\epsilon = 14150$  l/mol $\times$ cm [96]. Nevýhodou Ellmanovy metody je interference hemoglobinu při dané vlnové délce a interference některých chemických látek včetně látek obsahujících thiol a oxim [97].



**Obrázek 4:** Princip Ellmanovy metody.

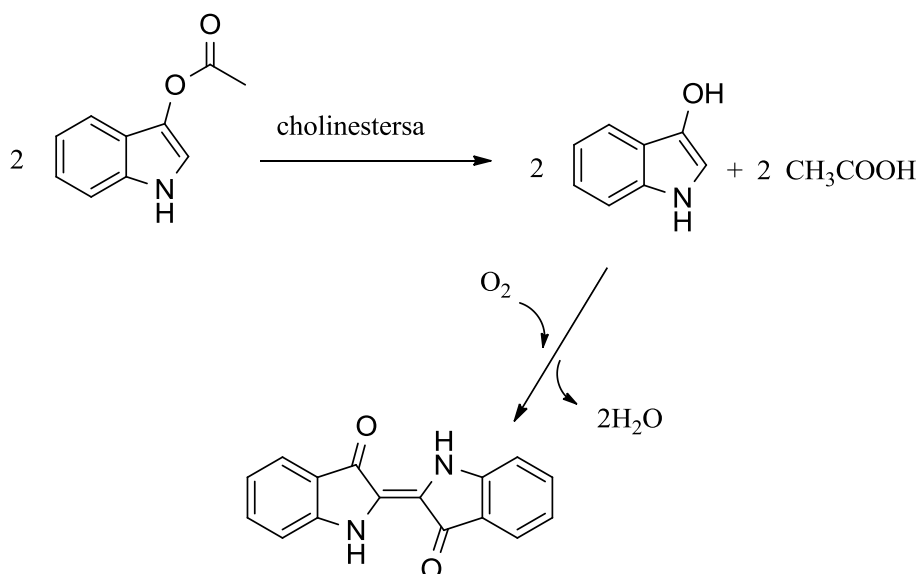
Ačkoliv hydrolyza esterů cholinesterasami nedává snadnou možnost přímé instrumentální analýzy, pokud není žádoucí provádět výše zmíněné hodnocení změn pH, existuje možnost stanovit cholinesterasy i jiným způsobem. Tím je přidání cholinoxidasy (EC 1.1.3.17) do roztoku či společné imobilizování s cholinesterasou na převodník v případě biosenzorů. Cholin, který vzniká výše popsanými reakcemi jak katalýzou AChE tak i BChE, je v přítomnosti kyslíku cholinoxidasou přeměněn na betain aldehyd za současného vzniku peroxidu vodíku [98]. Množství vznikajícího peroxidu vodíku lze měřit spektrofotometricky použitím např. o-fenylendiaminu, 3,3',5,5'-tetrametylbenzidinu, či vhodnou voltametrickou metodou [99].



**Obrázek 5:** Využití cholinoxidasy při stanovení aktivity cholinesteras. Znázorněno je i použití chromogenního substrátu reagujícího se vznikajícím peroxidem vodíku.

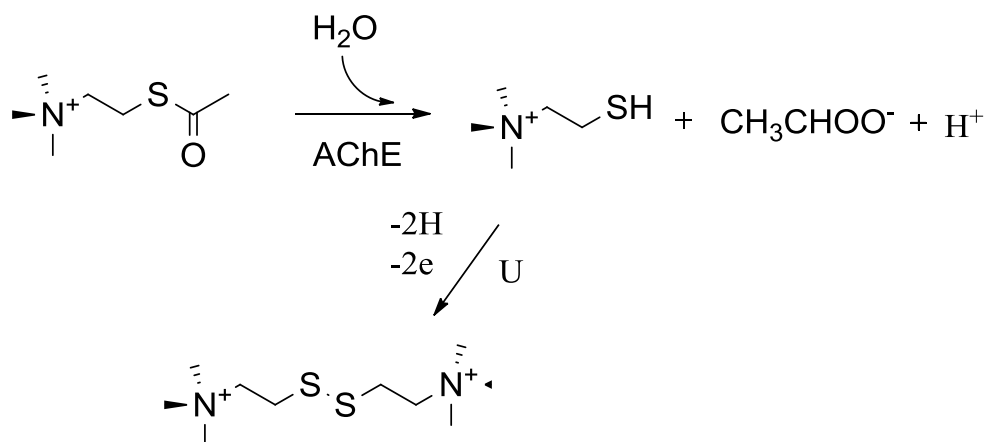
Cholinesterasy mohou štěpit i fluorogenní a chromogenní estery jako je indofenyl acetát, 2,6-dichlorindofenyl acetát a indoxylacetát [100,101]. Výsledné zabarvení roztoku nebo tenké vrstvy na matrici lze hodnotit vizuálně nebo instrumentálně [102]. Indoxylacetát po štěpení AChE nebo BChE přechází v následující spontánní oxidaci na modré indigo [103,104]. Reakce je ukázána v obrázku 6. I tento druh stanovení aktivity cholinesteras má několik nevýhod. Jsou jimi malá rychlost konverze, špatná rozpustnost ve vodě a anorganických pufrch a nízký extinkční koeficient  $\epsilon = 3900 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  [101,105]. Indigo lze stanovit i fluorescenčně [101].





**Obrázek 6:** Stanovení aktivity cholinesteras za využití indoxylacetátu jako fluorogenního a chromogenního substrátu.

Aktivitu cholinesteras lze stanovit i za pomoci voltametrie. Zde je použitelné výše zmíněné stanovení vznikajícího peroxidu vodíku, pokud byla použita cholinoxidasa. Efektivnější je však stanovení thiocholinu vznikajícího z acetylthiocholinu, butyrylthiocholinu či jiného thioesteru. Thiocholin je možné oxidovat vloženým napětím na dithiolovou formu, přičemž proudová odezva je úměrná koncentraci thiocholinu, jak je patrné z obrázku 7. Voltametrické stanovení aktivity cholinesteras je velmi výhodné pro konstrukci biosenzorů [56,106,107].



**Obrázek 7:** Voltametrické stanovení aktivity AChE díky oxidaci thiocholinu vloženým napětím  $U$ .

## 4. Cíle

Doktorská práce je pojata jako soubor komentovaných a prací otištěných v periodících s IF. Soubor prací byl zacílen na využití cholinesteras pro analytické a diagnostické účely za využití biochemických postupů sledování enzymové aktivity a dále na identifikaci možného biologického účinku zkoumaného v rámci *in vitro* testů.

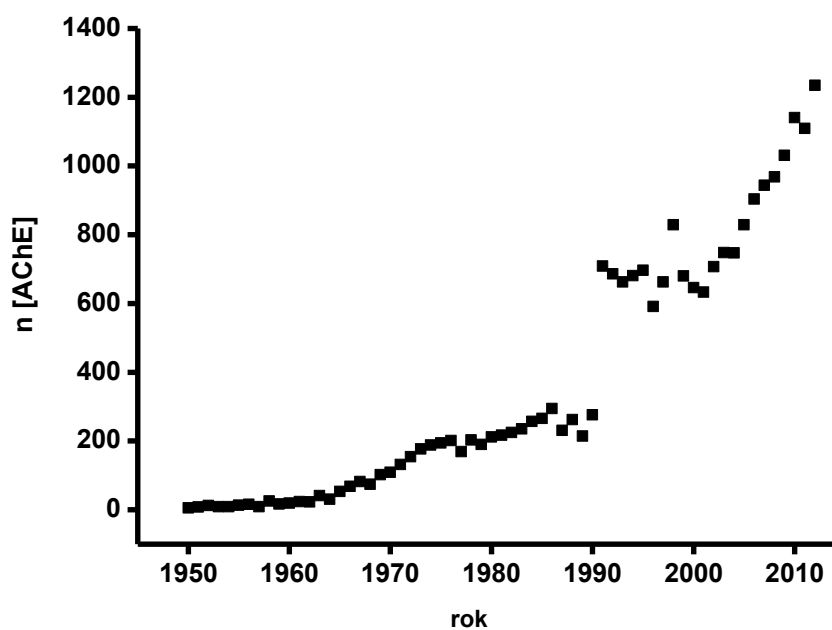
## 5. Diskuze

Práce, jak je patrné v kapitole Vlastní komentované práce, ve svém rozsahu pokrývá experimenty vykonané od roku 2011, tj. od doby zahájení habilitačního řízení. Díky tomu nedochází k užití stejných prací v různých profesních řízeních. Od doby otištění mého prvního článku v periodiku s IF do současnosti jsem autorem či spoluautorem více než 150 prací s IF. U více než poloviny jsem pak autorem prvním a korespondenčním. Tato doktorská práce se opírá o deset vybraných článků otištěných v periodících s IF, kde jsem buď prvním nebo jediným autorem. Tímto výběrem jsem se snažil předejít případným pochybnostem o osobním přínosu k řešené problematice.

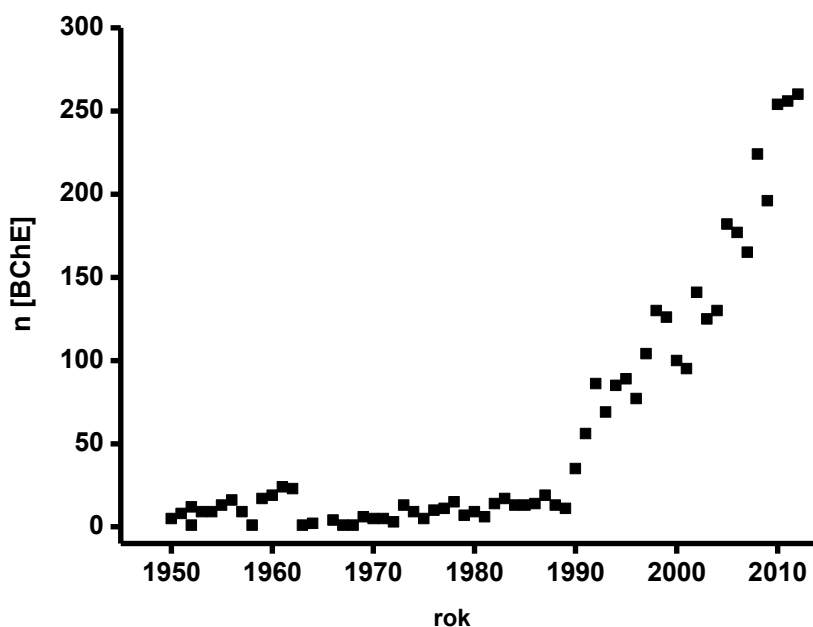
Obě cholinesterasy jsou předmětem dlouhodobého vědeckého zájmu. K 42. týdnu roku 2013 můžeme nalézt 23845 prací v databázích web of knowledge / web of science, které obsahují klíčové anglické slovo „acetylcholinesterase“ a 3611 prací spojených s klíčovým anglickým slovem „butyrylcholinesterase“. V této problematice se aktivně pohybují od roku 2007, kdy byla otištěna má první práce zaměřená na aplikovaný výzkum v oblasti cholinesteras [108]. K 42. týdnu roku 2013 je možné v databázi web of knowledge / web of science dohledat 94 prací spojených s klíčovým slovem „acetylcholinesterase“ a mým jménem, respektive 29 prací spojených s klíčovým slovem „butyrylcholinesterase“ a mým jménem. Podle počtu odborných výstupů jsem se dle databáze web of knowledge / web of science v pořadí vědců spojených s daným klíčovým slovem k 42. týdnu roku 2013 dostal na 22. místo při spojení jména s klíčovým slovem „acetylcholinesterase“ a 28. místo při spojení s klíčovým slovem „butyrylcholinesterase“.

Množství celosvětově zveřejněných prací v periodících s IF je patrné z obrázku 8 pro AChE a obrázku 9 pro BChE. Obrázky 8 a 9 si zaslouží komentář. V obou případech je patrný prudký zlom v zájmu o cholinesterasy kolem roku 1990. Pokud se podíváme na

cholinesterasy úhlem pohledu vědce padesátých až osmdesátých let minulého století, zjistíme, že cholinesterasy nás budou zajímat, zejména pokud se budeme chtít věnovat problematice nervově paralytických látek užívaných ve vojenství, případně léčbě otrav způsobených nervově paralytickými látkami a dále pokud je naším cílem příprava účinných insekticidů nezpůsobujících dlouhodobou kontaminaci životního prostředí. Především u problematiky nervově paralytických látek bylo možné očekávat značný útlum z důvodu politických událostí spojených s koncem Studené války a podpisu Konvence o chemických zbraních z roku 1993 účinné od roku 1997 [109,110]. Krátce po podpisu dohody, v letech 1994 a 1995, však přišly dva útoky sarinem spáchané japonskou sektou Aum Shinrikyo (též uváděno foneticky Óm Šinrikjó) s katastrofálními následky na civilní obyvatelstvo [111-113]. V srpnu 2013 pak došlo za dosud nevyjasněných okolností k zneužití sarinu v Sýrii. Z důvodu možného zneužití nervově paralytických látek pro teroristické účely zůstal zachován a mírně podporován výzkum v oblasti ochrany před nervově paralytickými látkami, i když množství výzkumných pracovišť zabývajících se touto problematikou je nižší než v době Studené války. V tomto směru jsem v minulosti prováděl například výzkum oxidačního stresu a pathobiochemických markerů u potkanů Wistar otrávených sarinem [114], výzkum oxidačního stresu a pathobiochemických markerů provázejících léčby otravy somanem pomocí kombinací kauzativní a nekauzativních antidot u potkanů Wistar [115], výzkum oxidačního stresu, pathobiochemických markerů, a farmakokinetiky u psů beagle jimž, bylo aplikováno kauzativní antidotum HI-6 [116], a zavádění diagnostických postupů vhodných pro rychlý průkaz otravy [117]. Rovněž jsem se podílel na výzkumu a testování nových kauzativních antidot, jak je patrné z některých vybraných citovaných prací [118-124].



**Obrázek 8:** Počet článků ( $n$ ) spojených s klíčovým slovem „acetylcholinesterase“ (AChE) otištěných v periodických excerpovaných v databázi Thomson Reuters – web of science / web of knowledge.



**Obrázek 9:** Počet článků ( $n$ ) spojených s klíčovým slovem „butyrylcholinesterase“ (BChE) otištěných v periodických excerpovaných v databázi Thomson Reuters – web of science / web of knowledge.

Za prudký nárůst výzkumu v oblasti cholinesteras však nemůže vojenský výzkum, ale zcela odlišné faktory. Pomineme-li celkové navyšování počtu periodik a rozvoj elektronických časopisů, tak jsou za zájem o cholinesterasy zodpovědné další dva faktory: za prvé výzkum v oblasti biosenzorů a za druhé výzkum v oblasti léčiv pro Alzheimerovu chorobu. Biosenzory s imobilizovanou cholinesterasou slouží jako platformy optimalizace imobilizačních postupů i jako potenciální analytické zařízení, jak je diskutováno v pracích řady zahraničních autorů i mých vlastních [56,95,125-127]. Má vlastní práce byla v minulosti zaměřena například na konstrukci voltametrických biosenzorů s AChE imobilizovanou v želatinové membráně [128], voltametrického biosenzoru s imobilizovanými cholinesterasami různého původu pro stanovení nervově paralytické látky sarinu [129]. Dále pak na konstrukci voltametrických biosenzorů s AChE zachycenou ve formě vrstvy stabilizované glutaraldehydem testovaných pro stanovení sarinu, somanu, cyklosarinu a VX [130], voltametrických biosenzorů vhodných pro charakterizaci látek použitelných k léčbě Alzheimerovy choroby [131] a jednoduchého amperometrického senzoru pro rychlý průkaz aflatoxinů [132]. Při řešení projektů aplikovaného výzkumu jsem pak prováděl i optimalizaci a testování použití voltametrických biosenzorů s požadavkem na minimalizaci času jednoho stanovení při zachování dostatečně nízkých limitů detekce [133] a výběr a testování nových imobilizačních postupů AChE včetně vazby na grafitové mikročástice, sol gel techniky a využití grafitových nanovláken [134]. Věnoval jsem se rovněž výzkumu v oblasti kolorimetrických biosenzorů a detekčních systémů s AChE. Jednalo se například o kolorimetrický senzor indikující změnu pH způsobenou katalytickou aktivitou AChE [90]. Senzor byl úspěšně použit pro stanovení vybraných organofosforových insekticidů a nervově paralytických látek. V jiné práci jsem konstruoval kolorimetrický senzor poskytující kontrastní změnu bílá – modrá díky konverzi indoxylacetátu působením imobilizované AChE [105]. Zabýval jsem se i optimalizací Ellmanovy metody pro testování léčiv a insekticidů za využití standardních titračních mikrodestiček [135,136] a optimalizací imobilizace AChE na titrační mikrodestičky s následným stanovením aflatoxinu B1 [77].

Nejzásadnější vliv v zájmu o výzkumu v oblasti cholinesteras však má Alzheimerova choroba, jejíž incidence roste nejen s tím, jak stárne populace, ale objevuje se stále častěji i u lidí v produktivním věku [137-140]. Alzheimerova choroba stále zůstává idiopatickým onemocněním. I přes vyslovení několika hypotéz se nepodařila nalézt etiologie. Někteří badatelé se přiklánějí k názoru, že počátek onemocnění je třeba hledat v dysfunkci cholinergního systému [141]. Nepopíratelným faktem je, že cholinergní systém vykazuje při

Alzheimerově chorobě značné poškození, a ukládání amyloidních plaků s hyperfosforylaným tau postihuje nejvíce nervy cholinergního systému [142-144]. I přes úspěšné zavedení memantinu působícího prostřednictvím N-methyl-D-aspartátových receptorů patří k hlavní farmakologické léčbě aplikace inhibitorů cholinesteras [60,145-147]. Konkrétně se jedná o rivastigmin, donepezil a galantamin [60,146,148,149]. Nadějným se jeví i inhibitor huperzin jehož derivát ZT-1 prochází klinickými studiemi [41,64,150]. V oblasti Alzheimerovy choroby a možnosti jejího ovlivnění inhibitory cholinesteras jsem napsal několik přehledových článků [12,40,41,151-153]. Jednalo se o hodnocení dopadu některých léků na organismus laboratorního zvířete a hodnocení pathobiochemických markerů a markerů oxidačního stresu, jak bylo provedeno například pro látku huperzin a laboratorní morče [154,155], bývalý lék pro Alzheimerovu chorobu metrifonát a cerebrální kortex potkanů Wistar [156], bývalý lék pro Alzheimerovu chorobu takrin a organismus laboratorního morčete [157] a porovnání takrinu a jeho 7-metoxy derivátu [158]. Překvapivým zjištěním některých klinických studií je nálezkem, že kofein může zmírnit progresi Alzheimerovy choroby [159,160]. Ačkoliv je mechanismus působení kofeinu založen na interakci s některými receptory v nervové soustavě jako jsou receptory pro serotonin, dopamin, glutamát a zejména adenosin [161-165], ve vlastní práci se nám podařilo prokázat, že kofein je selektivní inhibitor AChE s minimálním působením na BChE [166]. Mimo výše uvedené jsem se i podílel na přípravě a testování některých látek potenciálně použitelných k léčbě Alzheimerovy choroby [167-169]. Inhibitory cholinesteras mohou být použity i pro zmírnění dopadů onemocnění myasthenia gravis. Používají se např. látky pyridostigmin a neostigmin [57,170]. Na rozdíl od Alzheimerovy choroby je aplikace inhibitorů cholinesteras při measthenii gravis jen jednou z možných léčebných postupů. Na rozdíl od inhibitorů cholinesteras užitých při Alzheimerově chorobě není potřeba, aby inhibitory použité ke zmírnění myasthenie gravis procházely do centrální nervové soustavy a stačí, když působí na periferní nervy [40,41]. Nicméně i zde jsem se v minulosti podílel na přípravě a testování některých látek potenciálně použitelných při léčbě myasthenie gravis [171-173].

Samostatným a hraničním směrem výzkumu, kterým se zabývám, je studium cholinergní protizánětlivé dráhy a vliv vybraných inhibitorů cholinesteras na tuto dráhu. I když hlavní možnost ovlivnění cholinergní protizánětlivé dráhy leží v přímém ovlivnění  $\alpha 7$  nAChR na povrchu makrofágů [174-178], i inhibice cholinesteras je schopna ovlivnit toto propojení nervového a imunitního systému, jak jsem nastínil v přehledových pracích [12,179].

Ve vlastních experimentech se jednalo například o ovlivnění infekčního onemocnění neostigminem [180], takrinem [181] a galantaminem [182].

## 6. Vlastní komentované práce

V této kapitole jsou vloženy vybrané práce (články) vztahující se k problematice disertace. Celkem jsem vybral 10 prací v periodických s IF. Polovina je původních prací, druhá polovina jsou pak přehledové práce. U všech vybraných prací jsem prvním a korespondenčním autorem. K této volbě jsem se přiklonil z důvodu, aby nevznikly pochybnosti o osobním přínosu k řešené problematice. Přehledný seznam prací je uveden níže.

- I. Pohanka, M., Acetylcholinesterase based dipsticks with indoxylacetate as a substrate for assay of organophosphates and carbamates. *Anal. Lett.* **2012**, *45*, 367-374. IF=1.344.
- II. Pohanka, M., Spectrophotometric assay of aflatoxin B1 using acetylcholinesterase immobilized on standard microplates. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 1306-1315. IF = 0.965.
- III. Pohanka, M., Drtinova, L., Spectrophotometric methods based on 2,6-dichloroindophenol acetate and indoxylacetate for butyrylcholinesterase activity assay in plasma. *Talanta* **2013**, *106*, 281-285. IF=3.498.
- IV. Pohanka, M., Adam, V., Kizek, R., Acetylcholinesterase based chronoamperometric biosensor for fast and reliable assay of nerve agents. *Sensors* **2013**, *13*, 11498-11506. IF=1.953.
- V. Pohanka, M., Dobes, P., Caffeine inhibits acetylcholinesterase but not butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9873-9882. IF=2.598.
- VI. Pohanka, M., Butyrylcholinesterase as a biochemical marker, a review. *Brat. Med. J.* **2013**, *13*, In press.
- VII. Pohanka, M., Acetylcholinesterase inhibitors; a patent review (2008-present). *Exp. Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 871-886. IF=3.571.
- VIII. Pohanka, M., Cholinesterases in biorecognition and biosensor construction, a review. *Anal. Lett.* **2012**, *46*, 1849-1868. IF=0.965.
- IX. Pohanka, M., Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219-223. IF=0,716.

- X. Pohanka, M., Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2219-2238. IF=2,279



## 7. Citace

1. Raiteri, M., Functional pharmacology in human brain. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 162-193.
2. Berg, D.A.; Belnoue, L.; Song, H.; Simon, A., Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development* **2013**, *140*, 2548-2561.
3. Bisaglia, M.; Greggio, E.; Beltramini, M.; Bubacco, L., Dysfunction of dopamine homeostasis: Clues in the hunt for novel parkinson's disease therapies. *Faseb J.* **2013**, *27*, 2101-2110.
4. Obata, K., Synaptic inhibition and  $\gamma$ -aminobutyric acid in the mammalian central nervous system. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2013**, *89*, 139-156.
5. Coyle, J.T.; Basu, A.; Benneyworth, M.; Balu, D.; Konopaske, G., Glutamatergic synaptic dysregulation in schizophrenia: Therapeutic implications. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2012**, *213*.
6. Blier, P.; El Mansari, M., Serotonin and beyond: Therapeutics for major depression. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2013**, *368*, 20120536.
7. Roberto, M.; Gilpin, N.W.; Siggins, G.R., The central amygdala and alcohol: Role of  $\gamma$ -aminobutyric acid, glutamate, and neuropeptides. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a012195.
8. Lawal, H.O.; Krantz, D.E., Slc18: Vesicular neurotransmitter transporters for monoamines and acetylcholine. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 360-372.
9. Fania, L.; Zampetti, A.; Guerriero, G.; Feliciani, C., Alteration of cholinergic system in keratinocytes cells produces acantholysis: A possible use of cholinergic drugs in pemphigus vulgaris. *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.* **2012**, *11*, 238-242.
10. Grando, S.A., Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp. Dermatol.* **2006**, *15*, 265-282.
11. Rand, J.B., Acetylcholine. *WormBook* **2007**, doi: 10.1895/wormbook1.131.1.
12. Pohanka, M., Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 2219-2238.
13. Bellier, J.P.; Kimura, H., Peripheral type of choline acetyltransferase: Biological and evolutionary implications for novel mechanisms in cholinergic system. *J. Chem. Neuroanat.* **2011**, *42*, 225-235.

14. Okuda, T.; Haga, T., High-affinity choline transporter. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 483-488.
15. Oda, Y., Choline acetyltransferase: The structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol. Int.* **1999**, *49*, 921-937.
16. Prado, V.F.; Roy, A.; Kolisnyk, B.; Gros, R.; Prado, M.A., Regulation of cholinergic activity by the vesicular acetylcholine transporter. *Biochem. J.* **2013**, *450*, 265-274.
17. Moghadam, P.K.; Jackson, M.B., The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion. *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 124.
18. Kiessling, V.; Ahmed, S.; Domanska, M.K.; Holt, M.G.; Jahn, R.; Tamm, L.K., Rapid fusion of synaptic vesicles with reconstituted target snare membranes. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1950-1958.
19. Yu, S.C.; Klosterman, S.M.; Martin, A.A.; Gracheva, E.O.; Richmond, J.E., Differential roles for snapin and synaptotagmin in the synaptic vesicle cycle. *PLoS One* **2013**, *8*, e57842.
20. Hamilton, S.E.; McKinnon, L.A.; Jackson, D.A.; Goldman, P.S.; Migeon, J.C.; Habecker, B.A.; Thomas, S.L.; Nathanson, N.M., Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. *Life Sci.* **1995**, *56*, 939-943.
21. McKinnon, L.A.; Rosoff, M.; Hamilton, S.E.; Schlador, M.L.; Thomas, S.L.; Nathanson, N.M., Regulation of muscarinic receptor expression and function in cultured cells and in knock-out mice. *Life Sci.* **1997**, *60*, 1101-1104.
22. Qu, J.; Zhou, X.T.; Xie, R.Z.; Zhang, L.H.; Hu, D.N.; Li, H.; Lu, F., The presence of m1 to m5 receptors in human sclera: Evidence of the sclera as a potential site of action for muscarinic receptor antagonists. *Curr. Eye Res.* **2006**, *31*, 587-597.
23. Wess, J., Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends Pharmacol. Sci.* **2003**, *24*, 414-420.
24. Haga, T., Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **2013**, *89*, 226-256.
25. Millar, N.S.; Lansdell, S.J., Characterisation of insect nicotinic acetylcholine receptors by heterologous expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, *683*, 65-73.
26. Millar, N.S., A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 766-776.
27. Lohmann, T.H.; Torrao, A.S.; Britto, L.R.; Lindstrom, J.; Hamassaki-Britto, D.E., A comparative non-radioactive in situ hybridization and immunohistochemical study of

- the distribution of alpha7 and alpha8 subunits of the nicotinic acetylcholine receptors in visual areas of the chick brain. *Brain Res.* **2000**, 852, 463-469.
28. Sampaio, L.; Markus, R.P., Melatonin and the time window for the expression of the alpha8 nicotinic acetylcholine receptor in the membrane of chick retinal cells in culture. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2010**, 28, 245-249.
  29. Tricoire-Leignel, H.; Thany, S.H., Identification of critical elements determining toxins and insecticide affinity, ligand binding domains and channel properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, 683, 45-52.
  30. Magnus, C.J.; Lee, P.H.; Atasoy, D.; Su, H.H.; Looger, L.L.; Sternson, S.M., Chemical and genetic engineering of selective ion channel-ligand interactions. *Science* **2011**, 333, 1292-1296.
  31. Sacchi, O.; Rossi, M.L.; Canella, R.; Fesce, R., Changes in cationic selectivity of the nicotinic channel at the rat ganglionic synapse: A role for chloride ions? *PLoS One* **2011**, 6, e17318.
  32. Cygler, M.; Schrag, J.D.; Sussman, J.L.; Harel, M.; Silman, I.; Gentry, M.K.; Doctor, B.P., Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* **1993**, 2, 366-382.
  33. Akoh, C.C.; Lee, G.C.; Liaw, Y.C.; Huang, T.H.; Shaw, J.F., Gdsl family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* **2004**, 43, 534-552.
  34. Myers, M.; Richmond, R.C.; Oakeshott, J.G., On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.* **1988**, 5, 113-119.
  35. Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D., *et al.*, Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17640-17648.
  36. Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wogn, C.K.; Norton, S.E.; Johnson, L.L., Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 549-557.
  37. Massoulie, J.; Anselmet, A.; Bon, S.; Krejci, E.; Legay, C.; Morel, N.; Simon, S., The polymorphism of acetylcholinesterase: Post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chem. Biol. Interact.* **1999**, 120, 29-42.
  38. Liao, J.; Norgaard-Pedersen, B.; Brodbeck, U., Subunit association and glycosylation of acetylcholinesterase from monkey brain. *J. Neurochem.* **1993**, 61, 1127-1134.

39. Nawaz, S.A.; Ayaz, M.; Brandt, W.; Wessjohann, L.A.; Westermann, B., Cation- $\pi$  and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions allow selective inhibition of butyrylcholinesterase by modified quinine and cinchonidine alkaloids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 935-940.
40. Pohanka, M., Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.* **2011**, *155*, 219-229.
41. Pohanka, M., Acetylcholinesterase inhibitors: A patent review (2008 - present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 871-886.
42. Johnson, G.; Moore, S.W., The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: Structure, functions and potential role in rational drug design. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 217-225.
43. Inestrosa, N.C.; Dinamarca, M.C.; Alvarez, A., Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for alzheimer's disease. *Febs J.* **2008**, *275*, 625-632.
44. Holzgrabe, U.; Kapkova, P.; Alptuzun, V.; Scheiber, J.; Kugelmann, E., Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert. Opin. Ther. Tar.* **2007**, *11*, 161-179.
45. Cometa, M.F.; Lorenzini, P.; Fortuna, S.; Volpe, M.T.; Meneguz, A.; Palmery, M., In vitro inhibitory effect of aflatoxin b-1 on acetylcholinesterase activity in mouse brain. *Toxicology* **2005**, *206*, 125-135.
46. Cavalli, A.; Bottegoni, G.; Raco, C.; De Vivo, M.; Recanatini, M., A computational study of the binding of propidium to the peripheral anionic site of human acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3991-3999.
47. Mazzanti, C.M.; Spanevello, R.M.; Obregon, A.; Pereira, L.B.; Streher, C.A.; Ahmed, M.; Mazzanti, A.; Graca, D.L.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R., Ethidium bromide inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *162*, 121-127.
48. Wong, D.M.; Greenblatt, H.M.; Dvir, H.; Carlier, P.R.; Han, Y.F.; Pang, Y.P.; Silman, I.; Sussman, J.L., Acetylcholinesterase complexed with bivalent ligands related to huperzine a: Experimental evidence for species-dependent protein-ligand complementarity. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 363-373.
49. Saxena, A.; Redman, A.M.; Jiang, X.; Lockridge, O.; Doctor, B.P., Differences in active site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 14642-14651.

50. Khan, I.; Samad, A.; Khan, A.Z.; Habtemariam, S.; Badshah, A.; Abdullah, S.M.; Ullah, N.; Khan, A.; Zia-Ul-Hag, M., Molecular interactions of 4-acetoxy-plakinamine b with peripheral anionic and other catalytic subsites of the aromatic gorge of acetylcholinesterase: Computational and structural insights. *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 722-727.
51. Axelsen, P.H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J.L., Structure and dynamics of the active site gorge of acetylcholinesterase: Synergistic use of molecular dynamics simulation and x-ray crystallography. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 188-197.
52. Gilson, M.K.; Straatsma, T.P.; McCammon, J.A.; Ripoll, D.R.; Faerman, C.H.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L., Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**, *263*, 1276-1278.
53. Holtje, H.D.; Kjier, L.B., Nature of anionic or alpha-site of cholinesterase. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 418-420.
54. Silman, I.; Sussman, J.L., Acetylcholinesterase: How is structure related to function? *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 3-10.
55. Marrs, T.C., Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* **1993**, *58*, 51-66.
56. Andreescu, S.; Marty, J.L., Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 1-15.
57. Yu, Q.S.; Holloway, H.W.; Luo, W.; Lahiri, D.K.; Brossi, A.; Greig, N.H., Long-acting anticholinesterases for myasthenia gravis: Synthesis and activities of quaternary phenylcarbamates of neostigmine, pyridostigmine and physostigmine. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4687-4693.
58. Venkatasubban, K.S.; Johnson, J.L.; Thomas, J.L.; Faug, A.; Cusack, B.; Rosenberry, T.L., Steric effects in the decarbamylation of carbamoylated acetylcholinesterases. *Chem. Biol. Interact.* **2005**, *157-158*.
59. Yang, Z.Z.; Zhang, Y.Q.; Wu, K.; Wang, Z.Z.; Qi, X.R., Tissue distribution and pharmacodynamics of rivastigmine after intranasal and intravenous administration in rats. *Curr Alzheimer Res* **2012**, *9*, 315-325.
60. Tayeb, H.O.; Yang, H.D.; Price, B.H.; Tarazi, F.I., Pharmacotherapies for alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *134*, 8-25.
61. Rai, D.K.; Sharma, B., Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain. *Molecular biotechnology* **2007**, *37*, 66-71.
62. Bucarechi, F.; Prado, C.C.; Branco, M.M.; Soubhia, P.; Metta, G.M.; Mello, S.M.; de Capitani, E.M.; Lanaro, R.; Hyslop, S.; Costa, J.L., *et al.*, Poisoning by illegal

- rodenticides containing acetylcholinesterase inhibitors (chumbinho): A prospective case series. *Clin. Toxicol.* **2012**, *50*, 44-51.
63. Rampa, A.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Bisi, A., Hybrid-based multi-target ligands for the treatment of alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2716-2730.
64. Bai, D.L.; Tang, X.C.; He, X.C., Huperzine a, a potential therapeutic agent for treatment of alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 355-374.
65. Liu, J.; Zhang, H.Y.; Tang, X.C.; Wang, B.; He, X.C.; Bai, D.L., Effects of synthetic (-)-huperzine a on cholinesterase activities and mouse water maze performance. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **1998**, *19*, 413-416.
66. Luo, W.; Li, Y.P.; He, Y.; Huang, S.L.; Li, D.; Gu, L.Q.; Huang, Z.S., Synthesis and evaluation of heterobivalent tacrine derivatives as potential multi-functional anti-alzheimer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 2609-2616.
67. Jogani, V.V.; Shah, P.J.; Mishra, P.; Mishra, A.K.; Misra, A.R., Nose-to-brain delivery of tacrine. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1199-1205.
68. Knapp, M.J.; Gracon, S.I.; Davis, C.S.; Solomon, P.R.; Pendlebury, W.W.; Knopman, D.S., Efficacy and safety of high-dose tacrine - a 30 week evaluation *Alzheimer Dis. Assoc. Dis.* **1994**, *8*, S22-S31.
69. Davis, K.L.; Thal, L.J.; Gamzu, E.R.; Davis, C.S.; Woolson, R.F.; Gracon, S.I.; Drachman, D.A.; Schneider, L.S.; Whitehouse, P.J.; Hoover, T.M., *et al.*, A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for alzheimers-disease. *New Engl. J. Med.* **1992**, *327*, 1253-1259.
70. da Silva, V.B.; de Andrade, P.; Kawano, D.F.; Morais, P.A.B.; de Almeida, J.R.; Carvalho, I.; Taft, C.A.; da Silva, C., In silico design and search for acetylcholinesterase inhibitors in alzheimer's disease with a suitable pharmacokinetic profile and low toxicity. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 947-960.
71. Rainer, M., Galanthamine in alzheimer's disease - a new alternative to tacrine? *CNS Drugs* **1997**, *7*, 89-97.
72. Lilienfeld, S., Galantamine - a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with alzheimer's disease. *CNS Drug. Rev.* **2002**, *8*, 159-176.
73. Darreh-Shori, T.; Soininen, H., Effects of cholinesterase inhibitors on the activities and protein levels of cholinesterases in the cerebrospinal fluid of patients with alzheimer's disease: A review of recent clinical studies. *Curr. Alzheimer Res.* **2010**, *7*, 67-73.

74. Thomsen, T.; Kewitz, H., Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine in vitro and in vivo. *Life Sci.* **1990**, *46*, 1553-1558.
75. Berg, L.; Andersson, C.D.; Artursson, E.; Hornberg, A.; Tunemalm, A.K.; Linusson, A.; Ekstrom, F., Targeting acetylcholinesterase: Identification of chemical leads by high throughput screening, structure determination and molecular modeling. *PLoS One* **2011**, *6*, e26039.
76. Cheewakriengkrai, L.; Gauthier, S., A 10-year perspective on donepezil. *Expert Opin. Pharmaco.* **2013**, *14*, 331-338.
77. Pohanka, M., Spectrophotometric assay of aflatoxin b1 using acetylcholinesterase immobilized on standard microplates. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 1306-1315.
78. Plageman, L.R.; Pauletti, G.M.; Skau, K.A., Characterization of acetylcholinesterase in caco-2 cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2002**, *227*, 480-486.
79. Zhukovskii, Y.G., On establishment of individuality of the cholinesterase enzyme in the studied preparation. *J. Evol. Biochem. Physiol.* **2003**, *39*, 281-290.
80. Giacobini, E., Cholinesterases: New roles in brain function and in alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 515-522.
81. Grigoryan, H.A.; Hambardzumyan, A.A.; Mkrtchyan, M.V.; Topuzyan, V.O.; Halabyan, G.P.; Asatryan, R.S., Alpha,beta-dehydrophenylalanine choline esters, a new class of reversible inhibitors of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *171*, 108-116.
82. Tecles, F.; Ceron, J.J., Determination of whole blood cholinesterase in different animal species using specific substrates. *Res. Vet. Sci.* **2001**, *70*, 233-238.
83. Debord, J.; Laubarie, C.; Dantoine, T., Microcalorimetric study of the inhibition of butyrylcholinesterase by carbamates. *Anal. Biochem.* **2008**, *373*, 247-252.
84. Kamal, M.A.; Klein, P.; Luo, W.; Li, Y.; Holloway, H.W.; Tweedie, D.; Greig, N.H., Kinetics of human serum butyrylcholinesterase inhibition by a novel experimental alzheimer therapeutic, dihydrobenzodioxepine cymserine. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 745-753.
85. Nagasawa, T.; Sagisaki, H.; Tani, Y.; Ogata, K., Purification and characterization of butyrylcholine-hydrolyzing enzyme from pseudomonas polycolor. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *429*, 817-827.
86. Monteiro, M.; Quintaneiro, C.; Morgado, F.; Soares, A.M.; Guilhermino, L., Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish

- pomatoschistus microps: Application to biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *62*, 341-347.
87. Masson, P.; Froment, M.T.; Gillon, E.; Nachon, F.; Darvesh, S.; Schopfer, L.M., Kinetic analysis of butyrylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetanilides. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1774*, 1139-1147.
  88. Montenegro, M.F.; Moral-Naranjo, M.T.; de la Cadena, P.M.; Campoy, F.J.; Munoz-Delgado, E.; Vidal, C.J., The level of aryl acylamidase activity displayed by human butyrylcholinesterase depends on its molecular distribution. *Chem. Biol. Interact.* **2008**, *175*, 336-339.
  89. Montenegro, M.F.; Maria, T.M.; de la Cadena, M.P.; Campoy, F.J.; Munoz-Delgado, E.; Vidal, C.J., Human butyrylcholinesterase components differ in aryl acylamidase activity. *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 425-432.
  90. Pohanka, M.; Karasova, J.Z.; Kuca, K.; Pikula, J.; Holas, O.; Korabecny, O.; Cabal, J., Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and vx. *Talanta* **2010**, *81*, 621-624.
  91. Bazire, A.; Gillon, E.; Lockridge, O.; Vallet, V.; Nachon, F., The kinetic study of the inhibition of human cholinesterases by demeton-s-methyl shows that cholinesterase-based titration methods are not suitable for this organophosphate. *Toxicol. In Vitro* **2011**, *25*, 754-759.
  92. Bartling, A.; Worek, F.; Szinicz, L.; Thiermann, H., Enzyme-kinetic investigation of different sarin analogues reacting with human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Toxicology* **2007**, *233*, 166-172.
  93. Gabrovskaa, K.; Marinov, I.; Godjevargova, T.; Portaccio, M.; Lepore, M.; Grano, V.; Diano, N.; Mita, D.G., The influence of the support nature on the kinetics parameters, inhibition constants and reactivation of immobilized acetylcholinesterase. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *43*, 339-345.
  94. Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V., Jr.; Feather-Stone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **1961**, *7*, 88-95.
  95. Pohanka, M., Cholinesterases in biorecognition and biosensor construction, a review. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 1849-1868.
  96. Eyer, P.; Worek, F.; Kiderlen, D.; Sinko, G.; Stuglin, A.; Simeon-Rudolf, V.; Reiner, E., Molar absorption coefficients for the reduced ellman reagent: Reassessment. *Anal. Biochem.* **2003**, *312*, 224-227.



97. Sinko, G.; Calic, M.; Bosak, A.; Kovarik, Z., Limitation of the ellman method: Cholinesterase activity measurement in the presence of oximes. *Anal Biochem* **2007**, *370*, 223-227.
98. Zitova, A.; O'Mahony, F.C.; Kurochkin, I.N.; Papkovsky, D.B., A simple screening assay for cholinesterase activity and inhibition based on optical oxygen detection *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 1746-1755.
99. Evans, O., On-line deoxygenation in reductive (and oxidative) amperometric detection: Environmental applications in the liquid chromatography of organic peroxides. *Analyst* **1999**, *124*, 1811-1816.
100. No, H.Y.; Kim, Y.A.; Lee, Y.T.; Lee, H.S., Cholinesterase-based dipstick assay for the detection of organophosphate and carbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *594*, 37-43.
101. Wu, Z.L.; Podust, M.L.M.; Guengerich, F.P., Expansion of substrate specificity of cytochrome p450 2a6 by random and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 41090-41100.
102. Tingfa, D.; Shiguang, Z.; Mousheng, T., A new micro-detection tube for cholinesterase inhibitors in water. *Environmental Pollution* **1989**, *57*, 217-2222.
103. Miao, Y.; He, N.; Zhu, J.J., History and new developments of assay for cholinesterase activity and inhibition. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5216-5234.
104. Guilbault, G.G.; Kramer, D.N., Resorufin butyrate and indoxyl acetate as fluorogenic substrates for cholinesterase. *Anal. Chem.* **1965**, *37*, 120-123.
105. Pohanka, M., Acetylcholinesterase based dipsticks with indoxylacetate as a substrate for assay of organophosphates and carbamates *Anal. Lett.* **2012**, *45*, 367-374.
106. Wang, K.; Li, H.N.; Wu, J.; Ju, C.; Yan, J.J.; Liu, Q.; Qiu, B., Tio<sub>2</sub>-decorated graphene nanohybrids for fabricating an amperometric acetylcholinesterase biosensor. *Analyst* **2011**, *136*, 3349-3354.
107. Liu, G.; Lin, Y., Biosensor based on self-assembling acetylcholinesterase on carbon nanotubes for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides and nerve agents. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 835-843.
108. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K., Amperometric biosensor for evaluation of competitive cholinesterase inhibition by the reactivator hi-6. *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 2507-2512.
109. Sydnese, L.K., Update the chemical weapons convention. *Nature* **2013**, *496*, 25-26.

110. Smallwood, K.; Trapp, R.; Mathews, R.; Schmidt, R.; Sydnese, L.K., Impact of scientific developments on the chemical weapons convention (iupac technical report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 851-881.
111. Thomas, J.B., Horrific "cults" and comic religion manga after aum. *Jpn. J. Relig. Stud.* **2012**, *39*, 127-151.
112. Eason, M.P., Sarin exposure: A simulation case scenario. *South. Med. J.* **2013**, *106*, 55-62.
113. Loh, Y.; Swanberg, M.M.; Ingram, M.V.; Newmark, J., Case report: Long-term cognitive sequelae of sarin exposure *Neurotoxicology* **2010**, *31*, 244-246.
114. Pohanka, M.; Romanek, J.; Pikula, J., Acute poisoning with sarin causes alteration in oxidative homeostasis and biochemical markers in wistar rats. *J. Appl. Biomed.* **2012**, *10*, 187-193.
115. Pohanka, M.; Pikula, J.; Kuca, K.; Kassa, J., Biochemical insight into soman intoxication and treatment with atropine, hi-6, trimedoxime, and k203 in a rat model. *Brat. Med. J.* **2011**, *112*, 539-544.
116. Pohanka, M.; Novotny, L.; Karasova, J.Z.; Bandouchova, H.; Zemek, F.; Hrabanova, M.; Misik, J.; Kuca, K.; Bajgar, J.; Zitka, O., *et al.*, Asoxime (hi-6) impact on dogs after one and tenfold therapeutic doses: Assessment of adverse effects, distribution, and oxidative stress. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 75-81.
117. Pohanka, M.; Hrabanova, M.; Kuca, K., Diagnosis of intoxication by the organophosphate vx: Comparison between an electrochemical sensor and ellman's photometric method. *Sensors* **2008**, *8*, 5229-5237.
118. Kuca, K.; Cabal, J.; Yung, Y.S.; Musilek, K.; Soukup, O.; Jun, D.; Pohanka, M.; Musilova, L.; Karasova, J.; Novotny, L., *et al.*, Reactivation of human brain homogenate cholinesterases inhibited by tabun using newly developed oximes k117 and k127. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, *105*, 207-210.
119. Jun, D.; Paar, M.; Binder, J.; Marek, J.; Pohanka, M.; Stodulka, P.; Kuca, K., Preparation and in vitro evaluation of monoquaternary inhibitors of brain cholinesterases. *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6*, 500-503.
120. Karasova, J.Z.; Kassa, J.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Novotny, L.; Kuca, K., Effect of seven newly synthesized and currently available oxime cholinesterase reactivators on cyclosarin-intoxicated rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 3065-3075.

121. Binder, J.; Paar, M.; Jun, D.; Pohanka, M.; Hrabínová, M.; Opletalová, V.; Kuca, K., New bisquaternary isoquinolinium inhibitors of brain cholinesterases – synthesis and anticholinesterase activity. *Lett. Drug Des. Discov.* **2010**, *7*, 643-647.
122. Kuca, K.; Gupta, R.C.; Musilek, K.; Jun, D.; Pohanka, M., In vitro identification of novel acetylcholinesterase reactivators. *Toxin Rev.* **2009**, *28*, 238-244.
123. Kuca, K.; Marek, J.; Karasová, J.Z.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Kalasz, H., Novel acetylcholinesterase reactivator – oxime k048 – reactivation activity in vitro. *Med. Chem.* **2010**, *6*, 1-5.
124. Kuca, K.; Cabal, J.; Jun, D.; Musilek, K.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Pejchal, J.; Oh, K.; Yang, G.Y.; Jung, Y.S., Reactivation of vx inhibited ache by novel oximes having two oxygen atoms in the linker. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *30*, 85-87.
125. Pohanka, M.; Musilek, K.; Kuca, K., Progress of biosensors based on cholinesterase inhibition. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1790-1798.
126. Pohanka, M., Biosensors based on cholinesterases. *Chem. Listy* **2013**, *107*, 121-125.
127. Bidmanová, S.; Pohanka, M.; Cabal, J.; Prokop, Z.; Damborsky, J., Early warning biosensors for detection of chemical warfare agents. *Chem. Listy* **2010**, *104*, 302-308.
128. Pohanka, M.; Fusek, J.; Adam, V.; Kizek, R., Carbofuran assay using gelatin based biosensor with acetylcholinesterase as a recognition element. *Int. J. Electrochem. Sc.* **2013**, *8*, 71-79.
129. Pohanka, M.; Binder, J.; Kuca, K., Sarin assay using acetylcholinesterases and electrochemical sensor strip. *Defence Sci J* **2009**, *59*, 300-304.
130. Pohanka, M.; Dobes, P.; Drtinová, L.; Kuca, K., Nerve agents assay using cholinesterase based biosensor. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 1177-1182.
131. Pohanka, M.; Kuca, K.; Kassa, J., New performance of biosensor technology for alzheimer's disease drugs: In vitro comparison of tacrine and 7-methoxytacrine. *Neuroendocrinol. Lett.* **2008**, *29*, 755-758.
132. Pohanka, M.; Kuca, K.; Jun, D., Aflatoxin assay using an amperometric sensor strip and acetylcholinesterase as recognition element. *Sens. Lett.* **2008**, *6*, 450-453.
133. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K., Amperometric biosensor for real time assay of organophosphates. *Sensors* **2008**, *8*, 5303-5312.
134. Pohanka, M.; Drobik, O.; Krenková, Z.; Karasová, J.Z.; Pikula, J.; Cabal, J.; Kuca, K., Voltammetric biosensor based on acetylcholinesterase and different immobilization protocols: A simple tool for toxic organophosphate assay. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 1254-1264.

135. Pohanka, M.; Karasova, J.Z.; Kuca, K.; Pikula, J., Multichannel spectrophotometry for analysis of organophosphate paraoxon in beverages. *Turk. J. Chem.* **2010**, *34*, 91-98.
136. Pohanka, M.; Jun, D.; Kuca, K., Photometric microplates assay for estimation of the efficacy of paraoxon inhibited acetylcholinesterase reactivation. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 781-784.
137. Lobo, A.; Lopez-Anton, R.; Santabarbara, J.; de-la-Camara, C.; Ventura, T.; Quintanilla, M.A.; Roy, J.F.; Campayo, A.J.; Lobo, E.; Palomo, T., *et al.*, Incidence and lifetime risk of dementia and alzheimer's disease in a southern european population. *Acta Psychiatr. Scand.* **2011**, *124*, 372-383.
138. Dimitrov, I.; Tzourio, C.; Milanov, I.; Deleva, N.; Traykov, L., Prevalence of dementia and mild cognitive impairment in a bulgarian urban population. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* **2012**, *27*, 131-135.
139. Kukull, W.A.; Higdon, R.; Bowen, J.D.; McCormick, W.C.; Teri, L.; Schellenberg, G.D.; van Belle, G.; Jolley, L.; Larson, E.B., Dementia and alzheimer disease incidence: A prospective cohort study. *Arch. Neurol.* **2002**, *59*, 1737-1746.
140. Misiak, B.; Cialkowska-Kuzminska, M.; Frydecka, D.; Chladzinska-Kiejna, S.; Kiejna, A., European studies on the prevalence of dementia in the elderly: Time for a step towards a methodological consensus. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **2013**, doi: 10.1002/gps.3948.
141. Francis, P.T.; Palmer, A.; Snape, M.; Wilcock, G., The cholinergic hypothesis of alzheimer's disease: A review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **1999**, *66*, 137-147.
142. Arendt, T.; Schugens, M.M.; Bigl, V., The cholinergic system and memory - amelioration of ethanol-induced memory deficiency by physostigmine in rat. *Acta Neurobiol. Exp.* **1990**, *50*, 251-262.
143. Navaratnam, D.S.; Priddle, J.D.; McDonald, B.; Esiri, M.M.; Robinson, J.R., Anomalous molecular-form of acetylcholinesterase in cerebrospinal-fluid in histologically diagnosed alzheimers disease. *Lancet* **1991**, *337*, 447-450.
144. Kobayashi, K.; Miyazu, K.; Nakamura, I.; Fukutani, Y.; Yamaguchi, N., Are there sequential morphometrical changes in the nucleus basalis in alzheimers disease. *Eur. Neurol.* **1992**, *32*, 58-64.
145. Moreau, C.; Delval, A.; Tiffreau, V.; Defebvre, L.; Dujardin, L.; Dujardin, K.; Duhamel, A.; Petyt, G.; Hossein-Foucher, C.; Blum, D., *et al.*, Memantine for axial

- signs in parkinson's disease: A randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2013**, *84*, 552-555.
146. Bond, M.; Rogers, G.; Peters, J.; Anderson, R.; Hoyle, M.; Miners, A.; Moxham, T.; Davis, S.; Thokala, P.; Wailoo, A., *et al.*, The effectiveness and cost-effectiveness of donepezil, galantamine, rivastigmine and memantine for the treatment of alzheimer's disease (review of technology appraisal no. 111): A systematic review and economic model. *Health Technol. Asses.* **2012**, *16*, 1.
147. Olivares, D.; Deshpande, V.K.; Shi, Y.; Lahiri, D.K.; Greig, N.H.; Rogers, J.T.; Huang, X., N-methyl d-aspartate (nmda) receptor antagonists and memantine treatment for alzheimer's disease, vascular dementia and parkinson's disease. *Curr. Alzheimer. Res.* **2012**, *9*, 746-758.
148. de los Rios, C., Cholinesterase inhibitors: A patent review (2007-2011). *Expert Opin. Ther. Patents* **2012**, *22*, 853-869.
149. Krall, W.J.; Sramek, J.J.; Cutler, N.R., Cholinesterase inhibitors: A therapeutic strategy for alzheimer disease. *Ann. Pharmacother.* **1999**, *33*, 441-450.
150. White, J.D.; Li, Y.; Kim, J.; Terinek, M., A novel synthesis of (-)-huperzine a via tandem intramolecular aza-prins cyclization-cyclobutane fragmentation. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 882-885.
151. Pohanka, M., Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: Implication and counteracting of melatonin. *J. Appl. Biomed.* **2011**, *9*, 185-196.
152. Pohanka, M., Alzheimer's disease and oxidative stress: A link to etiology? A review. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *In press*.
153. Drtinova, L.; Pohanka, M., Potentials of huperine a use in alzheimer disease treatment. *Chem. Listy* **2013**, *107*, 12-15.
154. Pohanka, M.; Hrabínova, M.; Zemek, F.; Drtinova, L.; Bandouchova, H.; Pikula, J., Huperzine induces alteration in oxidative balance and antioxidants in a guinea pig model. *Neuroendocrinol. Lett.* **2011**, *32*, 95-100.
155. Pohanka, M.; Zemek, F.; Bandouchova, H.; Pikula, J., Toxicological scoring of alzheimer's disease drug huperzine in a guinea pig model. *Toxicol. Mech. Method.* **2012**, *22*, 231-235.
156. Pohanka, M.; Novotny, L.; Pikula, J., Metrifonate alters antioxidant levels and caspase activity in cerebral cortex of wistar rats. *Toxicol. Mech. Method.* **2011**, *21*, 585-590.

157. Kracmarova, A.; Bandouchova, H.; Pikula, J.; Pohanka, M., Tacrine is implicated in oxidative stress and accumulation of low molecular weight antioxidants in the laboratory guinea pig model. *Neuroendocrinol. Lett.* **2012**, *33*, 136-144.
158. Soukup, O.; Jun, D.; Karasova, J.Z.; Patocka, J.; Musilek, K.; Korabecny, J.; Krusek, J.; Kaniakova, M.; Sepsova, V.; Mandikova, J., *et al.*, A resurrection of 7-meota? The comparison with tacrine. *Curr. Alzheimer. Res.* **2013**, *10*, 893-906.
159. Chu, Y.F.; Chang, W.H.; Black, R.M.; Liu, J.R.; Sompol, P.; Chen, Y.M.; Wei, H.L.; Zhao, Q.Y.; Cheng, I.H., Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid beta(1-42) levels in an alzheimer's mouse model. *Food Chem.* **2012**, *135*, 2095-2102.
160. Vila-Luna, S.; Cabrera-Isidoro, S.; Vila-Luna, L.; Juarez-Diaz, I.; Bata-Garcia, J.L.; Alvarez-Cervera, F.J.; Zapata-Vazquez, R.E.; Arankowsky-Sandoval, G.; Heredia-Lopez, F.; Flores, G., *et al.*, Chronic caffeine consumption prevents cognitive decline from young to middle age in rats, and is associated with increased length, branching, and spine density of basal dendrites in ca1 hippocampal neurons *Neuroscience* **2012**, *202*, 384-395.
161. Szadujkis-Szadurska, K.; Grzesk, G.; Szadujkis-Szadurski, L.; Gajdus, M.; Matusiak, G., Role of acetylcholine and calcium ions in three vascular contraction models: Angiotensin ii, phenylephrine and caffeine. *Exp. Ther. Med.* **2012**, *4*, 329-333.
162. Glatter, K.A.; Myers, R.; Chiamvimonvat, N., Recommendations regarding dietary intake and caffeine and alcohol consumption in patients with cardiac arrhythmias: What do you tell your patients to do or not to do? *Curr. Threat. Options Cardiovasc. Med.* **2012**, *14*, 529-535.
163. Cummings, K.J.; Commons, K.G.; Trachtenberg, F.L.; Li, A.; Kinney, H.C.; Nattie, E.E., Caffeine improves the ability of serotonin-deficient (pet-1-/-) mice to survive episodic asphyxia. *Pediatr. Res.* **2013**, *73*, 38-45.
164. Golembiowska, K.; Dziubina, A., The effect of adenosine a(2a) receptor antagonists on hydroxyl radical, dopamine, and glutamate in the striatum of rats with altered function of vmat2. *Neurotox. Res.* **2012**, *22*, 150-157.
165. Shin, H.J.; Ryu, J.H.; Kim, S.T.; Zuo, Z.; Do, S.H., Caffeine-induced inhibition of the activity of glutamate transporter type 3 expressed in xenopus oocytes. *Toxicol. Lett.* **2013**, *217*, 143-148.
166. Pohanka, M.; Dobes, P., Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9873-9882.

167. Korabecny, J.; Musilek, K.; Holas, O.; Binder, J.; Zemek, F.; Marek, J.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K., Synthesis and in vitro evaluation of n-alkyl-7-methoxytacrine hydrochlorides as potential cholinesterase inhibitors in alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6093-6095.
168. Korabecny, J.; Holas, O.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Opletalova, V.; Dohnal, V.; Kuca, K., Synthesis and in vitro evaluation of new tacrine derivates-bis-alkylene linked 7-meota. *Lett. Org. Chem.* **2010**, *7*, 327-331.
169. Herich, P.; Kamenicek, J.; Pohanka, M.; Holas, O.; Kozisek, J.; Dlhan, L.; Kuca, K., Planar ni(ii) 1,2-dithiolenes involving tridentate p-donor ligands. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 156-164.
170. Bhat, K.G.; Singhal, V.; Borke, A.S., Successful treatment of vincristine induced ptosis and polyneuropathy with pyridoxine and pyridostigmine in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **2012**, *33*, 185-187.
171. Musilek, K.; Komloova, M.; Zavadova, V.; Holas, O.; Hrabnova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K., *et al.*, Preparation and in vitro screening of symmetrical bispyridinium cholinesterase inhibitors bearing different connecting linkage - initial study for myasthenia gravis implication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1763-1766.
172. Musilek, K.; Pavlikova, R.; Marek, J.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabnova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Dolezal, V.; Dolezal, M., *et al.*, The preparation, in vitro screening and molecular docking of symmetrical bisquaternary cholinesterase inhibitors containing a but-(2e)-en-1,4-diyl connecting linkage. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* **2011**, *26*, 245-253.
173. Musilek, K.; Komloova, M.; Holas, O.; Hrabnova, M.; Pohanka, M.; Dohnal, V.; Nachon, F.; Dolezal, M.; Kuca, K., Preparation and in vitro screening of symmetrical bis-isoquinolinium cholinesterase inhibitors bearing various connecting linkage - implications for early myasthenia gravis treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 811-818.
174. Huston, J.M., The vagus nerve and the inflammatory reflex: Wandering on a new treatment paradigm for systemic inflammation and sepsis. *Surgical Infect.* **2012**, *13*, 187-193.
175. Forsythe, P., The nervous system as a critical regulator of immune responses underlying allergy. *Curr. Pharm. Design* **2012**, *18*, 2290-2304.

176. Kox, M.; Pompe, J.C.; Peters, E.; Vaneker, M.; van der Laak, J.W.; van der Hoeven, J.G.; Scheffer, G.J.; Hoedemaekers, C.W.; Pickkers, P., Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist gts-21 attenuates ventilator-induced tumour necrosis factor-alpha production and lung injury. *Brit. J. Anaesth.* **2011**, *107*, 559-566.
177. Pavlov, V.A.; Ochani, M.; Parrish, W.R.; Rosas-Ballina, M.; Ochani, K.; Al-Abed, Y.; Tracey, K.J., The anti-inflammatory efficacy of galantamine is dependent on the integrity of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Shock* **2007**, *27*, 23-23.
178. Rosas-Ballina, M.; Tracey, K.J., Cholinergic control of inflammation. *J. Intern. Med.* **2009**, *265*, 663-679.
179. Pohanka, M.; Snopkova, S.; Havlickova, K.; Bostik, P.; Sinkorova, Z.; Fusek, J.; Kuca, K.; Pikula, J., Macrophage-assisted inflammation and pharmacological regulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 539-551.
180. Pohanka, M.; Pavlis, O., Neostigmine modulates tularemia progression in balb/c mice. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2012**, *6*, 1317-1322.
181. Pohanka, M.; Pavlis, O., Tacrine can suppress immunity response to tularemia in balb/c mouse model. *J. Appl. Biomed.* **2013**, *11*, 187-193.
182. Pohanka, M.; Pavlis, O.; Pikula, J., Galantamine modulates tularemia pathogenesis in a balb/c mouse model. *Iranian Biomedical Journal* **2012**, *16*, 156-161.