

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI**  
**KRÁLOVÉ**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Aktivita acetylcholinesterázy po interakci galantaminu a L-**  
**carnitinu**

**Activity of acetylcholinesterase after interaction of**  
**galantamine and L-carnitine**

Děkuji tímto Mudr. Josefu Herinkovi, DrSc. za pomoc a odborné vedení v průběhu diplomové práce a za nemalé úsilí věnované jejímu zpracování.

Dále děkuji Mgr. Danielu Jůnovi z Katedry toxikologie Vojenské lékařské fakulty JEP v Hradci Králové za cenné rady při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením MUDr. Josefa Herinka, DrSc. a pouze s použitím literatury citované v textu a uvedené v seznamu literatury.

V Hradci Králové 7.5.2007

Jindřiška Fousová

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	asymetrická molekulární forma cholinesteráz
A $\beta$	beta-amyloid
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADAS-cog	Alzheimer's Disease Cooperative Study-Cog-chování z hlediska kognitivních funkcí
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChRs	acetylcholinové receptory
ALC	acetyl-L-carnitin
ApoE <sub>4</sub>	apolipoprotein E <sub>4</sub>
APP	amyloidový prekurzorový protein
$\alpha$ -BgT	$\alpha$ -bungarotoxin
BuChE	butyrylcholinesteráza
CIBIC-plus	komplexní posouzení nezávislým lékařem založené na rozhovoru s pacientem a jeho pečovatelem
CNS	centrální nervový systém
DAD	Disability Assessment in Dementi
DNTB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
G	globulární molekulární forma cholinesteráz
GAL	galantamin
HEB	hemato-encefalická bariéra
ChAT	cholinacetyltransferáza
IChE	inhibitor acetylcholinesterázy
L-CAR	L-carnitin
mAChRs	muskarinové acetylcholinové receptory
7-MEOTA	7-methoxytaksin
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
SDAT	senilní demence Alzheimerova typu

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE.....</b>	<b>8</b>
<b>2.TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Cholinergní systém.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Význam a syntéza ACh.....	9
2.1.2 Acetylcholinové receptory (AChRs).....	10
2.1.2.1 Nikotinové receptory (nAChRs).....	10
2.1.2.1.1 Klasifikace nAChRs.....	10
2.1.2.1.2 Charakteristika neuronálních nAChRs.....	10
2.1.2.1.3 Vazebná místa nAChRs.....	11
2.1.2.2 Muskarinové receptory ( mAChRs ).....	11
2.1.3 Význam cholinergního systému pro paměť a učení.....	12
2.1.4 Postižení cholinergního systému u SDAT.....	12
<b>2.2 Úloha cholinesteráz, zejména AChE, v organismu.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Klasifikace, vlastnosti a funkce cholinesteráz.....	14
2.2.2 Molekulární formy cholinesteráz.....	15
2.2.3 Charakteristika lidské AChE.....	15
2.2.3.1 Hydrolýza Ach.....	16
2.2.4 Charakteristika lidské BuChE.....	17
2.2.5 Neenzymové funkce cholinesteráz.....	17
<b>2.3 Léčebné využití reverzibilních inhibitorů AChE.....</b>	<b>18</b>
2.3.1 Inhibitory AChE v terapii SDAT.....	18
2.3.2 Úloha cholinergních mechanismů při vzniku SDAT.....	18
2.3.3 Strategie léčby SDAT.....	20
2.3.4 Možné mechanismy terapeutického účinku.....	20
2.3.4.1 Účinek na cholinesterázy.....	20
2.3.4.2 Účinky na cholinergní receptory.....	21

2.3.5 Léčiva SDAT ze skupiny inhibitorů cholinesteráz.....	21
2.3.5.1 Akridinivé deriváty.....	21
2.3.5.2 Karbamátové deriváty.....	21
2.3.5.3 Piperidinové deriváty.....	22
2.3.5.4 Alkaloidy.....	22
2.3.6 Další možná léčiva SDAT.....	22
2.3.6.1 Prekurzory syntézy acetylcholinu.....	22
2.3.6.2 Látky zlepšující cholinergní přenos pomocí ovlivnění jiných mediátorových systémů.....	22
2.3.6.3 Ostatní látky, např. látky zlepšující vstup prekurzorů ACh do neuronu.....	23
<b>2.4 Galantamin.....</b>	<b>24</b>
2.4.1 Struktura galantaminu a jeho derivátů.....	24
2.4.2 Farmakodynamika galantaminu.....	25
2.4.3 Farmakokinetika galantaminu.....	26
2.4.4 Účinky galantaminu.....	27
2.4.4.1 Reverzní neuromuskulární blokáda.....	27
2.4.4.2 Centrální mechanismy řízení dýchání.....	28
2.4.4.3 Učení, paměť a další ovlivnění chování.....	28
2.4.4.4 Účinky na neurologická poškození.....	29
2.4.4.5 Účinky u mánie a schizofrenie.....	29
2.4.4.6 Endokrinní účinky.....	29
2.4.4.7 Účinky galantaminu ve vztahu k SDAT.....	30
2.4.5 Dlouhodobé podávání galantaminu.....	32
2.4.6 Toxicita galantaminu.....	32
2.4.7 Nežádoucí účinky galantaminu.....	32
<b>2.5. Farmakologie L-carnitinu.....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Endogenní a exogenní původ carnitinu v těle.....	34
2.5.2. Biologický význam carnitinu.....	35
2.5.3 Význam carnitinu v CNS.....	36
2.5.4 Acetyl-L-carnitin.....	37
2.5.4.1 Neuroprotektivní účinky ALC.....	37

<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Uspořádání pokusu.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Stanovení aktivity AChE.....</b>	<b>39</b>
3.2.1 Princip metody.....	39
3.2.2 Použité chemikálie a roztoky.....	40
3.2.3 Použité přístroje.....	40
3.2.4 Pracovní postup.....	40
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>42</b>
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>44</b>
5.1 Výhody použití Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE.....	44
5.2 Efekt L-CAR na AChE aktivitu GAL.....	45
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>7. SOUHRN.....</b>	<b>48</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>49</b>

# 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) je závažným organickým postižením mozku, které tvoří nejméně 50 % všech demencí. Etiologie této nemoci není dosud známá, ví se však, že má multifaktorový charakter a na jejím vzniku se podílejí jak negenetické tak i některé genetické faktory. Je to choroba zejména pokročilého stáří a proto jsou jí nejvíce ohroženy vyspělé společnosti s prodlužující se délkou života a v tomto směru také více ženy než muži. SDAT postihuje více či méně všechny mediátorové systémy mozku, rozhodující pro postupnou ztrátu intelektu jsou však narušené cholinergní funkce mozku v přímé souvislosti s degenerativními změnami v cholinergních neuronech některých struktur, zejména pak nucleus basalis Meynerti. Byl to právě zjištěný cholinergní deficit, který podnítl úvahy o možnosti terapeutického ovlivnění cholinergních funkcí. Přibližně od poloviny sedmdesátých let 20. století pak probíhá v tomto směru cílený výzkum a vývoj parasymptomimetických látek s potenciálním terapeutickým účinkem.

Prvním lékem s prokazatelným klinickým efektem u mírných forem SDAT byl tacrin, uvedený počátkem devadesátých let minulého století do širšího klinického použití v USA. V zemích EU tento lék nedoznal širšího uplatnění pro poměrně výrazný hepatotoxický efekt. O něco později však zde byla do klinické praxe uvedena další léčiva a to donepezil, rivastigmin a galantamin (GAL). GAL je řazen mezi inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) s duálním účinkem a to proto, že – vedle nepřímého parasymptomimetického efektu – má i přímé působení na acetylcholinové receptory (nAChRs), zejména pak na receptory nikotinové.

L-carnitin (L-CAR) je zase známý tím, že zvyšuje transport některých látek přes buněčné membrány, navíc má i slabou cholinergní aktivitu. Z těchto důvodů je L-CAR pokládán za vhodného kandidáta pokusů o cílenou biodistribuci léčiv do centrálního nervového systému (CNS).

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda preventivní podání L-CAR ovlivní efekt GAL. Jako ukazatel efektu bylo zvoleno stanovení aktivity AChE ve vybraných částech mozku a hypofýzy laboratorních potkanů. Pracovní hypotéza vycházela z předpokladu zesílení inhibičního účinku GAL po předchozím podání L-CAR.



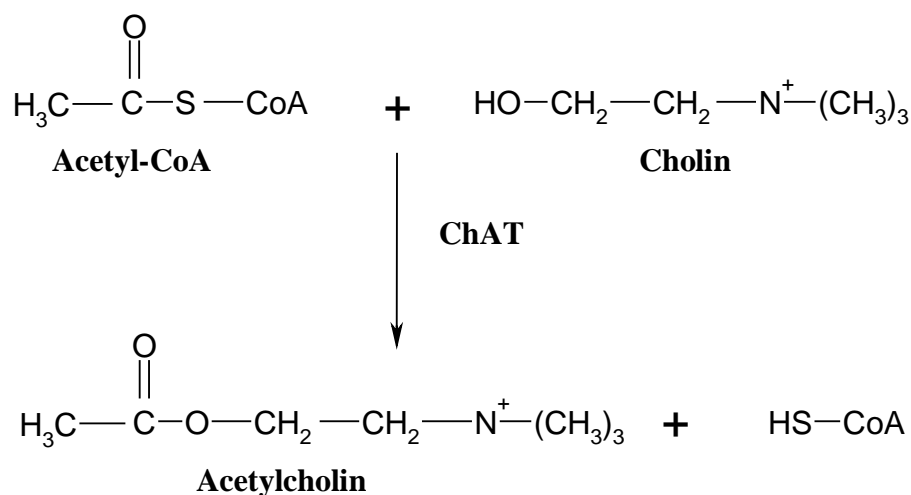
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cholinergní systém

#### 2.1.1 Význam a syntéza acetylcholinu (Ach)

Ach je hlavním neurotransmiterem ve vegetativním nervovém systému a zároveň důležitým mediátorem centrálního nervového systému.

Prekurzorem Ach je cholin, který je transportován z krevního řečiště do neuronu. V těle neuronu cholin reaguje s acetylCoA za vzniku Ach, tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferáza (ChAT). Syntetizovaný Ach je shromažďován v synaptických vezikulech. Po stimulaci nervového zakončení vezikula splynou s presynaptickou membránou a exocytózou se Ach uvolňuje do synaptické šterbiny, kde interaguje s postsynaptickými muskarinovými nebo nikotinovými receptory a poté je za účasti enzymu AChE rozložen na cholin a acetát. Při SDAT bylo v kůře mozkové a hipokampu post mortem nalezeno výrazné snížení množství ChAT–tedy dochází k výraznému snížení syntézy Ach, což se projeví poklesem koncentrace Ach v synaptických vezikulech a cholinergní neuron je tak de facto vyřazen z činnosti <sup>1,2</sup>.



Obr.1 Syntéza acetylcholinu

## 2.1.2 Acetylcholinové receptory (AChRs)

AChRs rozdělujeme na dva typy: muskarinové a nikotinové podle schopnosti přírodních alkaloidů muskarinu a nikotinu napodobit účinky Ach. S iontovým kanálem spojený AChR, který zprostředkovává rychlé, excitační působení Ach se nazývá nikotinový AChR ( nAChR ). Metabotropní AChR, který zprostředkovává pomalé působení acetylcholinu, se nazývá muskarinový AChR ( mAChR ). Tento receptor může být jak excitačního, tak inhibičního typu <sup>8</sup>.

### 2.1.2.1 Nikotinové receptory (nAChRs)

#### 2.1.2.1.1 Klasifikace nAChRs

Existují nejméně tři podtypy nikotinových receptorů: neuromuskulární nAChRs, které se nacházejí na nervosvalové ploténce, ganglionární nAChRs v gangliích vegetativního nervového systému a neuronální nAChRs, které se nachází v nervovém systému. Preklinické a klinické studie naznačují, že neuronální nAChRs mohou sehrávat důležitou úlohu v zprostředkování antinocicepce a kognitivních funkcí, navíc se zřejmě uplatňují jako modulátory uvolňování některých dalších neurotransmiterů <sup>8</sup>.

#### 2.1.2.1.2 Charakteristika neuronálních nAChRs

Neuronální nAChRs se skládají pouze z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek se specifickými strukturálními, funkčními a farmakologickými vlastnostmi. Účastní se fyziologických účinků Ach na chování a zprostředkovávají odpovědi CNS na nikotin. Jsou spojeny s dalšími přenašečovými systémy a jejich exprese se mění během vývoje a stárnutí stejně tak i u nemocí jako autismus, SDAT, Parkinsonova choroba a Lewyho demence.

Na základě vazebných studií s  $\alpha$ -bungarotoxinem ( $\alpha$ -BgT) byly v lidském mozku identifikovány dva podtypy neuronálních nAChRs a to vysokoafinitní  $\alpha$ -BgT receptory s nízkou afinitou k nikotinu a naopak nAChRs s nízkou afinitou k  $\alpha$ -BgT, ale s vysokou afinitou nejen k nikotinu, ale i k Ach, karbamylcholinu a cytizinu.

Každá z nAChR podjednotek vykazuje charakteristické fenotypové a strukturální znaky a to:

1. velkou hydrofilní doménu vázající vlastní neurotransmitter,
2. vysoce variabilní C-terminální doménu ústící do cytoplasmy, kde může být fosforylována,
3. serii čtyř uzavřených transmembránových domén, označovaných M1-M4, kdy M2 doména pravděpodobně tvoří stěnu iontového kanálu<sup>8</sup>.

#### 2.1.2.1.3 Vazebná místa nAChRs

V hydrofilní extracelulární oblasti obou alfa podjednotek existují vazebná místa jak pro agonisty, jako je neurotransmitter Ach, tak pro kompetitivní antagonisty, jako je např. d-tubokurarin. Agonisté po navázání na vazebná místa zapříčiní otevření kanálu, zatímco kompetitivní antagonisté soutěží o tyto místa a jejich obsazením tak inhibují farmakologický účinek agonisty. Hlavními částmi vazebných míst jsou zbytky aromatických aminokyselin.

Alfa podjednotky také nesou alosterické vazebné místo pro inhibitory acetylcholinesteráz jako je fyzostigmin a zřejmě i neurotransmitter 5-hydroxytryptamin (5-HT), které snad mohou aktivovat receptor i bez interakce s klasickými vazebnými místy<sup>8</sup>.

#### 2.1.2.2 Muskarinové receptory ( mAChRs )

Muskarinové receptory jsou lokalizovány v neuronech centrálního a periferního nervového systému, v srdečním a hladkém svalstvu a v exokrinních žlázách. Existuje pět podtypů těchto receptorů ( M1-M5 ). Na periférii mAChRs vyvolávají kontrakci hladkých svalů, žlázovou sekreci a modulaci srdeční frekvence a kontraktilní síly. V CNS zprostředkovávají kontrolu motoriky, regulaci teploty, kardiovaskulární regulaci a paměť<sup>8</sup>.

### 2.1.3 Význam cholinergního systému pro paměť a učení

Cholinergní systém vytváří vlákna projikující difúzně do mozkové kůry z nucleus basalis Meynerti, především pak do temporální a entorhinální kůry. Mezi cholinergní spoje patří dále tzv. asociativní vlákna spojující vzájemně jednotlivé korové oblasti. Velká koncentrace cholinergních vláken se vyskytuje v bazálních gangliích, jsou přítomny i v septu (septo-hipokampové projekce). Centrální cholinergní systém je důležitý pro paměťové mechanismy a pro udržení správné kvalitativní úrovně vědomí. U SDAT je postižen dříve než ostatní mediátorové systémy. Anticholinergní látky, procházející hematoencefalickou bariérou (HEB), mohou blokovat po dobu svého efektu osvojení nových paměťových stop. Dříve naučené paměťové obsahy se však nemění<sup>1,6</sup>.

### 2.1.4 Postižení cholinergního systému u SDAT

Specificky bývá postižen presynaptický oddíl cholinergního neuronu, zatímco postsynaptické útvary (muskarinové a nikotinové receptory) zůstávají zachovány<sup>1,3</sup>.

V presynaptickém oddílu dochází ke snížení hladiny enzymu syntetizujícího Ach – ChAT. Ach je syntetizován z cholinu a acetylkoenzymu A. Acetylkoenzym A je vytvářen v Krebsově cyklu a mimo jiné slouží k produkci hlavního zdroje energie, ATP. Za určitých podmínek, jako je hypoxie, je ATP preferenčně vytvářen na úkor Ach, který je pak deficitní. Dalším limitujícím faktorem je dostatečný přísun cholinu. Tato látka není produkována přímo v mozku a navíc velmi špatně prochází HEB. V mozku se získává především štěpením látek obsahujících cholin, jako je fosfatidylcholin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin. Po uvolnění z presynaptického zakončení se Ach váže na své postsynaptické i presynaptické receptory. Důležité pro paměťové mechanismy jsou muskarinové receptory typu M1. Stimulace nikotinových receptorů (nebo alosterická modulace) zlepšuje cholinergní přenos a zřejmě vede také k uvolnění nervových růstových faktorů.

V synaptické štěrbině jsou molekuly Ach odbourávány enzymy cholinesterázami. Za normálních podmínek se uplatňují AChE. U SDAT se však také uplatňuje BuChE. Lidská AChE má několik forem, z nichž v mozku se vyskytují dvě: majoritní forma, označována jako G4 a minoritní forma, označována jako G1. U SDAT klesá počet molekul G4 a stoupá počet molekul G1. BuChE je novotvořena

v aktivovaných gliových elementech, tvořících lem plaků, a rovněž se účastní na odbourávání Ach. Uvolněný cholin se pak vstřebává do presynaptického oddílu neuronu mechanismem, který se nazývá vysokoafinitní cholinový uptake. Tento mechanismus je  $\text{Na}^+$  -dependetní a probíhá při neuronální aktivitě (tzv. firingu), tzn. že se v průběhu nervové aktivity tento uptake cholinu zvyšuje.

Bylo prokázáno, že cholinesterázy se podílejí na tvorbě beta-amyloidu ( $\text{A}\beta$ ), a tak zasahují přímo do základních neurodegenerativních mechanismů SDAT. Inhibice cholinesteráz tedy působí u SDAT komplexněji, než jen pouhým zlepšením cholinergní transmise<sup>1,2,3</sup>.

## 2.2 Úloha cholinesteráz, zejména AChE, v organismu

### 2.2.1 Klasifikace, vlastnosti a funkce cholinesteráz

Cholinesterázy tvoří skupinu živočišných enzymů ze skupiny serinových hydroláz, jejichž společným rysem je fakt, že hydrolyzují estery cholinu a jsou inhibovány organofosfáty a karbamáty. Rozlišujeme dva typy cholinesteráz :

1. Acetylcholinesteráza ( AChE, EC 3.1.1.7 ) , která také bývá označována jako pravá, specifická nebo typ 1. Tento enzym se nachází v erythrocytech, nervosvalové ploténce, plicích, slezině a ve všech částech mozku.

2. Butyrylcholinesteráza ( BuChE, EC 3.1.1.6 ), nazývaná také nepravá cholinesteráza, pseudocholinesteráza nebo – vzhledem k vysoké aktivitě v plazmě - sérová cholinesteráza. BuChE se dále vyskytuje v játrech, slinivce břišní, hladkých svalech, srdci a v bílé hmotě mozku <sup>5,8</sup> .

Přirozeným substrátem AChE je Ach, který je jejím účinkem hydrolyzován na cholin a acetát. Také BuChE hydrolyzuje Ach, ale výrazně pomaleji než jiné acylcholin, zejména butyrylcholin a propionylcholin. Hydrolyzuje však celou řadu vesměs exogenních substrátů, jako např. sukcinylcholin, heroin, aspirin, kokain, tetrakain apod. AChE a BuChE mají navzájem odlišnou kinetiku hydrolyzy ACh i molekulární strukturu.

Zatímco AChE hraje významnou a nezastupitelnou roli při přenosu nervového vzruchu v CNS, funkce BuChE byla dlouhou dobu nejasná. Její funkce byly zčásti objasněny v poslední době. Účastní se např. metabolismu lipoproteinů, buněčné adheze a neurogeneze, do určité míry působí jako scavenger toxických molekul a patrně se podílí na formování amyloidového prekursorového proteinu (APP). V lidském mozku se tento protein nachází v neuronech, gangliích, placích a klubkách u SDAT.

Depozita A $\beta$  a neurofibrilární klubka vykazují hromadění jak BuChE, tak i AChE <sup>3,5,8</sup> .

### 2.2.2 Molekulární formy cholinesteráz

AChE i BuChE existují v několika molekulárních formách, které je možno rozdělit na globulární (G) a asymetrické (A). G formy jsou tvořeny jednou ( $G_1$ ), dvěma ( $G_2$ ) nebo čtyřmi ( $G_4$ ) identickými katalytickými subjednotkami. Subjednotky mají hmotnost 77 kDa a do dimeru se spojují disulfidovými můstky. G formy existují v solubilní a membránově vázané formě. Membránově vázané formy mají malou nekatalytickou subjednotku, tzv. kotvu, která fixuje enzym v membráně. Asymetrické formy AChE se skládají z jednoho ( $A_4$ ), dvou ( $A_8$ ) nebo tří tetrametrů ( $A_{12}$ ) spojených pomocí peptidických kolagenu-podobných řetězců, tzv. ocásků. Tyto A formy se nacházejí převážně na nervosvalových ploténkách, kde jsou ocáskem zakotveny do bazální laminární membrány.

V mozku savců se vyskytují převážně G formy AChE a to ve formě  $G_4$  a  $G_1$ . Zatímco v lidském mozku je z 80% zastoupena  $G_4$  forma AChE, v erytrocytech převládá dimer  $G_2$ . Distribuce molekulárních forem AChE je rozdílná i na synapsích.  $G_4$  formy jsou přítomny především v presynaptické oblasti, zatímco  $G_1$  formy jsou postsynaptické. V krevní plasmě a v mozkomíšním moku byly identifikovány hlavně  $G_4$  formy AChE. Přes tuto multiplicitu mají všechny molekulární formy AChE ekvivalentní katalytickou aktivitu<sup>1,5</sup>.

### 2.2.3 Charakteristika lidské AChE

Biologickou rolí AChE je ukončení přenosu v cholinergních synapsích nervového systému rychlou hydrolyzou neurotransmiteru Ach.

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci  $\alpha$  a  $\beta$ .  $\beta$  -řetězec obsahuje tzv.  $\beta$ -anionické místo a oblast hydrofobních interakcí (také  $\gamma$  -anionické místo). Aktivní – katalytické – centrum enzymu, na němž dochází k rozkladu Ach, je lokalizováno na  $\alpha$ -řetězci.

Hlavní doménou enzymu tedy je katalytické aktivní místo složené ze dvou subjednotek představovaných aktivním esteratickým místem umístěným v centrální kavitě a periferním  $\alpha$ -anionickým místem. Esteratická část obsahuje katalytickou triádu vázající karboxylovou skupinu Ach, zatímco anionická část váže kladnou kvarterní část molekuly Ach. Esteratická část obsahuje katalytickou triádu Ser 200, His 440 a

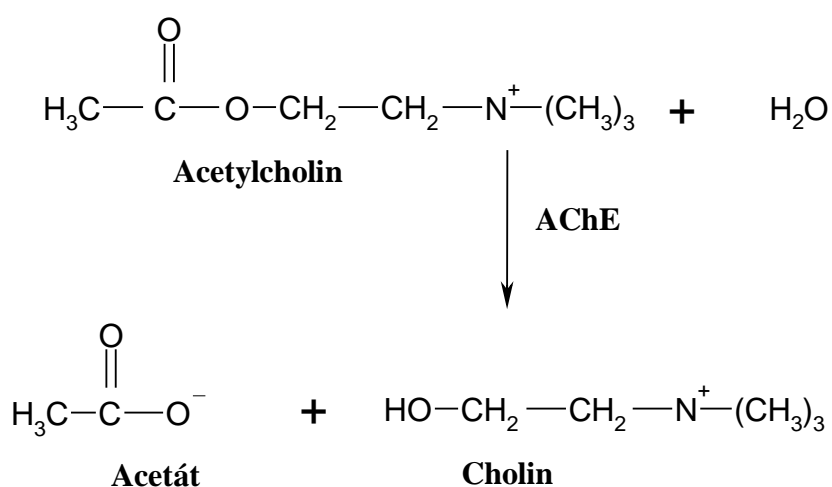
Glu 327. Anionická část je určena Trp 84, Phe 330 a Phe 331. Její rolí je správně orientovat nabitou část substrátu, která vstupuje do aktivního centra. Aktivní centrum toho enzymu je umístěno v kavitě pronikající hluboko do středu globule, kdy vlastní katalytické centrum tvořené hydroxylovou skupinou serinu se nachází na samém dně této kavity.

Periferní vazebná místa enzymu lokalizovaná na  $\alpha$ -řetězci jsou pokládána za místa alosterická ať již ve vztahu k inhibičním, tak i aktivačním dějům. Např. po navázání některých modulátorů na  $\beta$ -anionické místo může dojít k urychlení hydrolýzy Ach.

Samotný enzym je syntetizován v tělech neuronů a do distální části jejich axonů a do synapsí je aktivně transportován axoplazmatickým tokem<sup>5,8</sup>.

### 2.2.3.1 Hydrolýza Ach

K hydrolýze Ach účinkem AChE dochází tak, že se molekula substrátu přimkne k aktivnímu centru enzymu. Klíčové místo dále představuje hydroxylová skupina serinu, která uskutečňuje nukleofilní atak na elektrofilní uhlíkový atom substrátu, v tomto případě esterové spojení mezi cholinem a acylovou skupinou. Dochází k dočasné vazbě mezi enzymem (s OH skupinou serinu) a substrátem. Tak se stává enzym neaktivním. Poté dojde k hydrolýze této vazby za vzniku cholinu a zbytku kyseliny octové (tj. acetátu) za současného „odkrytí“ esterového místa a tedy i k obnovení aktivity enzymu<sup>8</sup>.



Obr.2 Rozklad acetylcholinu



#### 2.2.4 Charakteristika lidské BuChE

BuChE je glykoprotein složený ze čtyř identických subjednotek. Každá subjednotka je tvořena peptidickým řetězcem složeným z 574 aminokyselin a z 9 cukerných zbytků. Sérová BuChE je syntetizována v játrech a její poločas je 12 dnů. Její koncentrace je 5 mg/l séra a je významným detoxikačním enzymem pro karbamátová a organofosfátová insekticida a transformačním enzymem pro některá léčiva<sup>5,8</sup>.

#### 2.2.5 Neenzymové funkce cholinesteráz

Přítomnost cholinesteráz v různých buňkách a tkáních vedla již dříve k úvahám o jejich dalších než výlučně enzymatických funkcích. Významné bylo zjištění, že AChE podporuje růst axonů a formování synapsí a působí také jako „morfogenní molekula“. Morfogenních proteinů je dnes známo více druhů, např. glutactin, gliotaktin, neurotaktin a neuroligin, a není bez zajímavosti, že všechny mají – podobně jako cholinesterázy - ve své aminokyselinové sekvenci zabudovány serinovou esterázovou doménu. Tyto morfogenní proteiny nemají vlastní enzymovou aktivitu, ale fungují jako adhezivní látky v interakcích buňka-buňka a serinová esterázová doména při tom hraje významnou úlohu. To je zřejmě důvod, proč podobně morfogenní účinek vykazuje i AChE a také BuChE, tedy proteiny s podobnou strukturou. Bylo prokázáno, že serinová esterázová doména v cholinesterázách má podobné adhezivní vlastnosti jako např. neurotactin. První experimentální důkazy o morfogenním účinku AChE byly podány v roce 1993, kdy bylo zjištěno, že exprese AChE vede k potlačení růstu neuritů v tkáňových kulturách neuronů. K podobným závěrům vedly i další práce, které prokázaly, že diferenciaci neuritů je možno modulovat zvýšenou expresí AChE. Cholinergní regulace růstu neuritů, dávaná do souvislosti s ukládáním paměťové stopy, je pravděpodobně jedním z důvodů, proč anticholinerní látky (parasymptolytika) zhoršují paměť<sup>5</sup>.

## 2.3 Léčebné využití reverzibilních inhibitorů AChE

### 2.3.1 Inhibitory AChE (IACHe) v terapii SDAT

Hlavním léčebným využitím IACHe je terapie SDAT, případně i dalších poruch paměti. Za nejčastější příčinu těchto onemocnění je všeobecně považován deficit v cholinergním nervovém systému, především pak mizení presynaptických receptorů a snížení syntézy Ach. Výše uvedený cholinergní deficit pak vede k poruše kognitivních funkcí. Mezi kognitivní funkce patří paměť, intelekt, pozornost, schopnost učení, vnímání a exekutivní (tzn. výkonné) funkce, tzn. motivace, schopnost naplánovat jednotlivé úkony, seřadit jednotlivé dílčí úkony při provádění komplexnějších úkonů správně za sebou aj. IACHe patří do kognitiv, což je skupina léčiv, která se používá k léčbě poruch kognitivních funkcí prostřednictvím pozitivního ovlivnění přenosu signálu v centrálním acetylcholinergním systému. Podávání IACHe tak představuje v současnosti nejvyužívanější cestu ke zvýšení dostupnosti Ach<sup>1,6</sup>.

Tyto inhibitory musí procházet HEB a vzhledem k nutnosti dlouhodobého podávání pokud možno specificky inhibovat AChE v CNS, nikoli především periferně distribuovanou BuChE a AChE, aby nežádoucí účinky byly co nejnižší<sup>5,11</sup>.

### 2.3.2 Úloha cholinergních mechanismů při vzniku SDAT

Na SDAT je možno pohlížet – alespoň na počátku onemocnění - jako na cholinergní poruchu CNS, vyvolanou snížením aktivity ChAT s následným nedostatkem Ach zabezpečujícího nejrůznější funkce CNS (viz kap.2.1.4). V průběhu SDAT je těžce - již v ranných stádiích - poškozena entorhinální kůra. Na rozdíl od normálního stárnutí jsou zřetelně postiženy i pyramidové neurony hipokampálního sektoru CA1. Při SDAT numericky rovněž atrofují cholinergní neurony bazálního telencefala, čemuž odpovídá jak pokles AChE, tak ChAT v kůře velkého mozku.

Na patogenezi SDAT se podílí tvorba a ukládání patologických proteinů a to A $\beta$  a  $\tau$ -proteinu. A $\beta$  je patologický protein, který v agregované podobě tvoří základ senilních plaků. Je tvořen z APP, což je látka tělu vlastní, která má sama i určité neuroprotektivní účinky. APP je štěpen na kratší fragmenty enzymem  $\gamma$ -sekretázou. Fragmenty štěpení APP jsou za normálních podmínek solubilní. Při SDAT však dochází

k poruše štěpení APP, při kterém vzniká převaha nesolubilních fragmentů, především abnormálního fragmentu s dlouhým řetězcem. Tyto fragmenty nastartují kaskádu dějů, která vede k jejich agregaci a tedy i tvorbě senilních plak. Na periférii vyvrážděných plaků vznikají dystrofické neurity. V amyloidových depozitech mozku byly nalezeny jak AChE tak BuChE. Předpokládá se, že cholinesterázy by mohly působit jako patologický chaperon, který indukuje konformační změny  $\beta$ -amyloidového proteinu.

T- protein tvoří součást mikrotubulů a to hlavně axonových, kde se váže na tubulin. U SDAT dochází k abnormální fosforylaci  $\tau$ -proteinu, vznikají párová helikální filamenta, která jsou podstatou tzv. „tangles“ (neurofibrilární klubka). Takto postižené neurony později zanikají <sup>1, 3, 4, 8, 10</sup>.

S SDAT má zřejmě souvislost i K varianta BuChE spojená s výskytem alely pro apolipoprotein E<sub>4</sub> (ApoE<sub>4</sub>), který je významným rizikovým faktorem vzniku pozdní formy nemoci. Souběžně s bližším poznáním významu mozkové BuChE pro funkci CNS jsou jako léčiva SDAT vyvíjeny i specifické inhibitory právě tohoto enzymu <sup>5, 13</sup>.

V průběhu stárnutí byl u krys pozorován úbytek membránově vázané G<sub>4</sub> formy a zvýšení relativního podílu rozpustné G<sub>1</sub> a G<sub>2</sub> formy. Stejně změny byly zaznamenány ve frontálním a parietálním kortexu, v hipokampu a v cholinergních projekčních jádrech v mozcích pacientů s SDAT. Protože postsynapticky lokalizované G<sub>1</sub> zůstávají zachovány, lze předpokládat že terapeutickou implikací by dále mohly být selektivní inhibitory G<sub>1</sub> <sup>1, 5</sup>.

Ach je také důležitý pro účinky nervového růstového faktoru (NGF). NGF patří do skupiny trofických faktorů. Existují trofické faktory nespecifické (sem patří skupina gangliosidů) a specifické- sem patří NGF. Receptory NGF se nacházejí v mozku i v periférii. Ve stárnoucím mozku dochází k poklesu denzity NGF receptorů. Podávání acetyl-L-carnitinu (ALC) starým krysám tomuto poklesu částečně zabraňuje. Působení NGF bylo prokázáno jak v periférii, tak i v CNS. Příznivě působí na regeneraci nervové tkáně a chrání neurony před buněčnou smrtí během jejich vývoje. Dále bylo zjištěno, že cholinergní neurony in vitro reagují na přítomnost NGF zvýšením aktivity ChAT. Gangliosidy samotné neovlivňují aktivitu tohoto enzymu, ale zesilují účinek NGF na tento enzym. In vivo bylo nalezeno analogické působení, kdy po opakovaném intraventrikulárním podávání NGF došlo ke zvýšení aktivity ChAT v průběhu ontogeneze krys v hipokampu, kortexu a septální oblasti. Navíc byla prokázána existence NGF receptorů, které jsou spojeny s cholinergními systémy. Tato receptorová místa jsou jak vysokoafinitní, tak i nízkoafinitní.

Podávání látek, které příznivě působí na cholinergní systém, může tedy omezit úbytek neuronů a prodloužit jejich život a tím také zamezit rozvoji demencí <sup>2</sup>.

### **2.3.3 Strategie léčby SDAT**

Současná strategie terapie SDAT spočívá ve snaze zvýšit hladinu mozkového Ach podáváním IChE či inhibitorů BuChE někdy i v kombinaci s podáváním prekurzorů Ach. Samotné podávání prekurzorů Ach, aniž by bylo omezeno jeho odbourávání, není totiž příliš účinné.

Terapeutický účinek IChE byl klinicky objektivně prokázán alespoň v případě mírných až středních forem SDAT. Tento efekt spočívá především ve zpomalení progresu demence a v prodloužení soběstačnosti pacientů. Kromě kognitivních funkcí ovlivňují IChE příznivě i nekognitivní funkce a aktivity denního života <sup>1, 6, 13</sup>.

### **2.3.4 Možné mechanismy terapeutického účinku**

Hlavním mechanismem účinků inhibitorů AChE je inhibice centrální AChE a následné snížení odbourávání Ach, kterého je při SDAT nedostatek. Na vlastním efektu se tedy mohou – vedle přímého receptorového účinku - podílet i tzv. necholinergní účinky IChE <sup>1, 2, 7, 8</sup>.

#### **2.3.4.1 Účinek na cholinesterázy**

IChE kompetují na molekule AChE s Ach. Existují tři způsoby inhibice AChE:

- Reverzibilní – inhibitor vytvoří s molekulou AChE reverzibilní komplex, který trvá po dobu, po kterou je aktivní látka přítomna v mozkové tkáni.
- Ireverzibilní – inhibitor vytvoří s molekulou AChE komplex, který je trvalý a molekula AChE je tak vyřazena z činnosti. Tento způsob inhibice se v terapii SDAT nepoužívá. Takto působící sloučeniny se používají jako chemické bojové látky.

- Pseudoireverzibilní – inhibitor kompetitivně vytěsňuje z molekuly AChE Ach a je pak sám AChE odbouráván. Po jeho odbourání se molekula AChE funkčně obnoví. Působení látky trvá déle než je její přítomnost v plazmě<sup>4,6,7</sup>.

#### 2.3.4.2 Účinky na cholinergní receptory

Galantamin (GAL) je alosterický modulátor nikotinových receptorů. Alosterická modulace presynaptických receptorů vede nejen k zlepšenému uvolňování Ach, ale také GABA, glutamátu, 5-HT a noradrenalinu. GAL navozuje zvýšení denzity nikotinových receptorů v těch oblastech mozku, které se podílejí na paměti a procesu učení<sup>1,27</sup>.

#### 2.3.5 Léčiva SDAT ze skupiny inhibitorů cholinesteráz

Klinicky se používají a zkoušejí inhibitory z několika chemických skupin<sup>6</sup>.

##### 2.3.5.1 Akridinové deriváty

Jsou to látky účinné, ale mají rovněž významné nežádoucí účinky. Patří mezi reverzibilní IChE. Nejznámějším zástupcem této skupiny je **tacrin**, který byl - i přes svou nespornou a klinickými studiemi prokázanou účinnost - stažen z klinického užití pro hepatotoxicitu<sup>1,8</sup>.

##### 2.3.5.2 Karbamátové deriváty

Jsou to látky s pseudoreverzibilním způsobem inhibice AChE. Inhibují AChE tak, že dochází ke karbamoylaci esteratického místa aktivního centra tohoto enzymu, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu. Rychlost dekarbamoylace a s ní spojená obnova enzymové aktivity je závislá na charakteru alkylů vázaných na dusík karbamoylové skupiny. Prvním zkoušeným farmakem z této skupiny byl **fyostigmin**. Klinicky se však nepoužívá pro úzké terapeutické okno a také pro množství nežádoucích účinků. **Rivastigmin** je moderní látka v současnosti využívaná klinicky. Je to vlastně cholinergní dualista, který kromě inhibice obou izoform AChE inhibuje i BuChE<sup>1</sup>.

### 2.3.5.3. Piperidinové deriváty

Vyvolávají reverzibilní inhibici AChE a – proti rivastigminu - podstatně neovlivňují BuChE. Ovlivňují obě mozkové formy AChE. Mezi nejznámější zástupce této skupiny patří **donepezil**. V současné době je nejpoužívanějším IChE, má dlouhý poločas eliminace (cca 70 hodin) a dva aktivní metabolity prodlužující jeho účinek. Donepezil je biotransformován v játrech cytochromem P-450, ale není hepatotoxický<sup>1</sup>.

### 2.3.5.4 Alkaloidy

Působí reverzibilní inhibici AChE. Do této skupiny patří **huperzin A**, alkaloid získaný z čínského rašelíníku *Huperzia serrata* a využívaný již v tradiční čínské medicíně. Další látkou je **GAL**, který ovlivňuje cholinergní systém duálně. Působí jednak jako reverzibilní IChE a dále jako alosterický modulátor presynaptických i postsynaptických nikotinových receptorů (viz kap.2.4)<sup>1, 8, 27, 28</sup>.

## 2.3.6 Další možná léčiva SDAT

### 2.3.6.1 Prekurzory syntézy acetylcholinu

Použití těchto látek má spíše doplňkový význam k terapii IChE. Nejčastěji je používán sojový lecitin, ze kterého je pomalu uvolňován cholin. Lecitin však málo prochází HEB, proto je nezbytné podávání vysokých dávek, což je často v praxi opomíjeno<sup>1</sup>.

### 2.3.6.2 Látky zlepšující cholinergní přenos pomocí ovlivnění jiných mediátorových systémů

Tato strategie je také nadějná, v současné době je klinicky využíván antagonist N-methyl-D-aspartátových receptorů **memantin**. Několik dalších látek je ve stadiu klinického zkoušení. Jedná se např. o inverzní agonisty GABAergního systému ze skupiny  $\beta$ -karbolinů zvyšující cholinergní přenos tím, že potlačí tlumivý vliv GABA na cholinergní systém<sup>1</sup>.

### 2.3.6.3 *Ostatní látky, např. látky zlepšující vstup prekurzorů Ach do neuronu*

Do této skupiny farmak patří **L-CAR a ALC**, které tímto způsobem zlepšuje syntézu Ach<sup>1,22</sup>.

## 2.4 Galantamin

GAL je alkaloid, který byl poprvé izolován z cibulí sněženek rodu *Galanthus* Woronowi (r.1952), dále byl také nalezen v *G.nivalis* a dalších rostlin z čeledi Amaryllidaceae. Bylo zaznamenáno, že GAL je schopen potlačit tubokurarinem navozenou svalovou paralýzu a potencuje působení Ach na kosterní sval, tyto účinky jsou spojeny se schopností inhibovat aktivitu AChE. GAL byl již v minulosti v zemích východního bloku široce využíván při terapii Myastenie gravis a jako doplňková léčba při anestezii, zatímco na západě pouze na experimentální úrovni.

GAL je terciární amin s  $pK_a$  8,32, jeho lipofilita mu zajišťuje dostatečný a snadný průchod přes HEB a tedy i centrální účinky.

Působí i jako antagonist dechového útlumu navozeného opioidy ( morfin, pethidin ). Ačkoli je strukturně velmi podobný kodeinu, nemá jeho analgetický účinek, ale podléhá stejným biotransformačním procesům. V několika klinických studiích s GAL bylo prokázáno signifikantní zlepšení kognitivních symptomů SDAT <sup>9, 19, 27, 28</sup>.

### 2.4.1 Struktura GAL a jeho derivátů

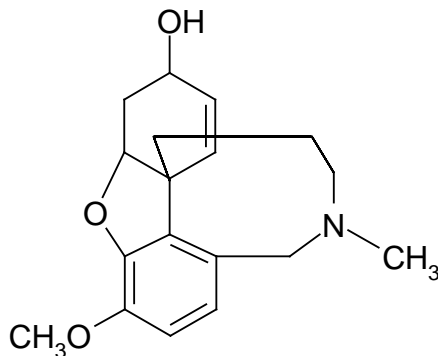
Pro vazebné schopnosti a tedy i biologický účinek GAL jsou v jeho molekule důležitá 4 místa: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, samotný cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina.

Obměnou methoxyskupiny nebo terciární aminoskupiny (např. na kvarterní amoniovou sůl nebo hydrofilní sloučeniny) byly připraveny deriváty GAL, které byly polárnější než původní molekula a vykazovaly větší inhibici AChE. Jejich polarita však brání průniku do CNS, což výrazně limituje jejich léčebné využití.

Další možností modifikace molekuly GAL je příprava bis- interagujících ligandů substitucí terciární aminoskupiny nebo methoxyskupiny, Bylo zjištěno, že délka alkylenového řetězce v těchto derivátech je klíčovým faktorem pro zvyšování inhibiční schopnosti sloučeniny, kdy se jako optimální jeví 8členný methylenový řetězec. Terminální ftalimodová nebo amoniová skupina na bočním alkylovém řetězci umožňuje interakci sloučeniny jak s katalytickým, tak i periferním místem AChE, přičemž amoniová skupina je vhodnější pro svoji lepší vazbu s hydrofobní aromatickou



kavitou. Z hlediska vazby na AChE jsou n-substituované deriváty účinnější než O-substituované deriváty<sup>9</sup>.



Obr.3 Chemická struktura galantaminu

#### 2.4.2 Farmakodynamika GAL

GAL působí jako acetylcholinový dualista:

- kompetitivně a reverzibilně inhibuje AChE a tím zvyšuje dostupnost Ach pro postsynaptické mAChRs,
- alostericky moduluje nAChRs<sup>6,9,27</sup>.

Alosterické modulatory nAChRs se neúčastní synaptického přenosu přímo, takže nevyvolávají, na rozdíl od přímých agonistů nebo antagonistů, změny citlivosti či počtu cholinergních receptorů, které jsou pro jejich opakované podávání typické. In vitro se tedy GAL váže na místo na nAChR, které je odlišné od vazebného místa přirozeného agonisty Ach. Pokud se nAChR naváže GAL současně s Ach, receptorová odpověď se násobí. Alostericky potencující ligandy tedy samy o sobě nevyvolávají signifikantní odezvu, v přítomnosti s přirozeným mediátorem však zvyšují průchodnost iontových kanálů, a tak i potencují submaximální Ach indukované odpovědi. Aktivace presynaptických nAChRs způsobuje zvýšené uvolňování Ach, ale i glutamátu, 5-HT a GABA. Dlouhodobé podávání GAL navozuje zvýšení denzity nAChRs v oblastech mozku, které se podílejí na paměti a procesu učení. Jedná se zejména o hipokampus, entorhinální a frontální kůru.

U kompetitivního inhibitoru nezávisí stupeň inhibice ani tak na jeho absolutní koncentraci, jako spíše na poměru koncentrace inhibitoru a substrátu, tzn. že neúčinnější je inhibitor při nízké koncentraci substrátu, jaká je na postsynaptické membráně při jeho deficitu, ve srovnání s mnohem vyšší koncentrací Ach na presynaptické membráně při fyziologických poměrech synaptického přenosu. Dále je velmi málo ovlivněna funkce negativní zpětné vazby přes presynaptické receptory a tím i eventuální snižování terapeutického efektu, naopak AChE situována na postsynaptickém elementu je výrazně inhibována<sup>1,9,27</sup>.

GAL je 50-60x silnějším inhibitorem AChE než BuChE a 10x více inhibuje AChE v lidských erythrocytech než v CNS<sup>27</sup>.

GAL se váže ve spodní části kavity AChE a interaguje jak s acyl-vazebnou kapsou (Phe-288, Phe-290) prostřednictvím své methoxyskupiny, tak s cholin-vazebným místem (Trp-84)- prostřednictvím cyklohexenového kruhu<sup>9</sup>.

### 2.4.3 Farmakokinetika GAL

Farmakokinetika GAL je lineární 1.řádu a to v širokém dávkovém rozmezí (u člověka 5-35 mg).

GAL se po p.o. podání snadno absorbuje. Při studii vlivu jídla na jeho absorpci bylo zjištěno, že jídlo sice neovlivňuje celkovou dostupnost, ale zpomaluje a snižuje maximální dosaženou hladinu GAL v plazmě ( $C_{max}$ ).

Vazba na plazmatické bílkoviny je slabá (18%). Distribuce GAL z centrálního kompartmentu do tkání a orgánů probíhá pasivní difuzí slabé báze s  $pK_a$  8,32. V plazmě a mozku myší byl ve sledovaném rozmezí dávek (4-8 mg/kg i.v.) prokázán lineární vztah mezi použitou dávkou a zjištěnou koncentrací. Dále byla zjištěna intracelulární kumulace, protože v buňkách a erythrocytech je sice jen mírně, ale pro samotnou kumulaci dostatečně nižší pH než v plazmě (7,0 a 7,2 vs 7,4). Kumulační faktory byly zjištěny u myší 1,34 pro erythrocyty, 2,10 pro mozek, 3,13 pro svalové buňky bránice, 2,28 pro plíce, téměř 10 pro ledviny a téměř 5 pro játra. Koncentrace GAL v mozku myší kopírovala koncentraci v krvi, ale byla o 2,1 vyšší z důvodu pasivní difuze přes HEB řízené pH gradientem mezi vnitřním a vnějším prostředím neuronů. Protože HEB nijak nelimituje volnou difuzi GAL, je jeho koncentrace v cerebrospinální tekutině a krevní plazmě téměř stejná a může odpovídat i koncentraci inhibitoru v synaptické štěrbině.

Biologická dostupnost GAL po podání tablet a roztoku byla minimálně 85%. Z velmi vysoké biologické dostupnosti lze vyvodit, že „first-pass“ efekt nehraje důležitou roli.

Při studiu biotransformace GAL u zdravých mužů bylo zjištěno, že 25% dávky se vylučuje nezměněno močí, téměř 20% dávky bylo vyloučeno ve formě O-demethylgalantamin glukuronidu, 5% jako N-demethylgalantamin a méně než 2% jako epigalantamin, který vzniká redukcí intermediátu galantaminonu. V moči ani plazmě nebyl detekován neglukuronidovaný O-demethylgalantamin, což naznačuje, že glukuronid je tvořen přímo v cytozolu buněk, v jejichž endoplazmatickém retikulu probíhá demethylace. Hlavními metabolickými cestami tedy jsou N-oxidace, N-demethylace, O-demethylace, glukuronidace a epimerace. Vytvářejí se tak metabolity O-demethylgalantamin, O-demethyl-norgalantamin, epigalantamin, galantaminon a norgalantamin (jediný biologicky aktivní metabolit). Biologický poločas činí 7-8 hodin.

GAL je substrátem cytochromu P450 2D6 a 3A4<sup>9,27</sup>.

#### **2.4.4 Účinky GAL**

##### **2.4.4.1 Reverzní neuromuskulární blokáda**

GAL byl testován u 40 pacientů pro jeho schopnost zvrátit neuromuskulární blokádu, která byla navozena podáním periferně působících myorelaxancií – alcuronium, pancuronium, gallamin a tubukurarin. GAL hydrobromid byl podán i.v. v 5 mg dávkách do celkové dávky 20 mg. Svalová paralýza navozená všemi čtyřmi myorelaxancií byla úspěšně potlačena. V případě podání neostigminu byla svalová paralýza odstraňována sice nižší dávkou než po GAL, ale po delší latenci. U pacientů byl dále pozorován malý pokles srdečního pulzu a u 40% pacientů byla pozorována zvýšená salivace.

Při vzájemném srovnání byl tedy GAL přibližně 20x slabší než neostigmin. Aby došlo k odvrácení svalové paralýzy, která nastala po podání pancuronium, musel být podán GAL v dávce 600 µg/ kg a neostigmin v dávce 18 µg/ kg. Výše uvedené zjištění, že paralýza byla po podání neostigminu odvrácena pomaleji, než po podání GAL, naznačilo možnost odlišného působení GAL<sup>27,28</sup>.

#### 2.4.4.2 Centrální mechanismy řízení dýchání

Podle ruských a bulharských údajů byl GAL efektivnější než neostigmin při postanestetické úpravě vědomí. Tento účinek byl přisuzován jak centrálně stimulačnímu působení, tak jeho schopnosti antagonizovat působení analgetik morfiového typu (viz výše).

Schopnost GAL odvrátit respirační útlum navozený dextromoramidem byl studován u králíků v anestézii. GAL v dávce 3 mg/kg indukoval rychlý zvrát k normálnímu dýchání. Morfiový dualista nalorphin však vykázal rychlejší obnovení respirace. Použití GAL bylo spojeno s typickými parasymptolytickými nežádoucími účinky, zejména sliněním, močením a defekací. Účinky GAL, fyzostigminu, naloxonu a dvou aminopyridinů na útlum dýchání navozeného morfinem byly také testovány u králíků bez použití anestézie. GAL v dávce 4 mg/kg i.v. částečně obnovil dýchací frekvenci a normalizoval změny kyslíku a oxidu uhličitého v krvi, aniž by došlo k ovlivnění analgetických účinků morfinu <sup>28</sup>.

#### 2.4.4.3 Učení, paměť a další ovlivnění chování

##### *Preklinické studie*

Bylo provedeno několik experimentálních studií, které zkoumaly účinky GAL na paměť myší a krys. Amnézie u těchto zvířat byla navozena injekcí centrálně působícím antagonistou muskarinových receptorů, skopolaminem. Výkony zvířat byly měřeny testem pasivního vyhnutí se, v T-bludišti a ve vodním Morrisově bludišti. Intraperitoneální injekce GAL znatelně zvýšila výkon těchto zvířat. GAL tedy odvrátil skopolaminem navozený cholinergní deficit těchto zvířat <sup>9,27,28</sup>.

V další studii GAL zlepšil výkon postižených myší, u kterých byl cholinergní deficit navozen podáním neurotoxinu, ibotniiová kyselina, v pasivním testu vyhnutí se. Nejefektivnější dávka byla 3 mg/kg, dávka 4 mg/kg dávala nižší odezvu. Tato experimentální studie ukázala, že opakované dávky GAL zůstávají účinné a že zvířata se nestávají tolerantní k účinku léku <sup>28</sup>.

V jiné studii se uvádí, že po intracerebroventrikulárním podání GAL v dávce 1,0 µg/kg se významně snížil počet nutných tréninkových sérií pro osvojení aktivního i pasivního vyhýbání se aversnímu podnětu u potkanů. Tuto nabytou

dovednost si GAL ovlivněná zvířata pak udržela po delší dobu než zvířata kontrolní. Prokazatelně zde bylo ovlivněno paměťové upevnění. Dávka 0,5 µg/kg tento efekt neměla<sup>9,28</sup>.

#### **2.4.4.4 Účinky GAL u neurologických poruch**

GAL byl použit při studiu vlivu centrálních cholinergních drah na znovuoobnovení funkčních spojení po poškození určitých oblastí motorické kůry. Bylo sledováno za jak dlouho se obnoví pohyb končetin koček s lokalizovaným poškozením motorické kůry. U zvířat s podáním centrálně působícího antagonisty nAChRs obnova pohybů trvala 10-16 dní, zatímco u zvířat injikovaných stejným antagonistou nAChRs v kombinaci s GAL (2,5 mg/kg) k obnově docházelo za 5-10 dní. V kombinaci s centrálně působícím muskarinovým antagonistou GAL významně prodloužil čas potřebný k obnově pohybů. Autoři usoudili, že kortikální mozková plasticita vedoucí k funkčnímu obnovení může být prodloužena cholinergním přenosem, který zahrnuje mAChRs<sup>28</sup>.

#### **2.4.4.5 Účinky u mánie a schizofrenie**

.Tyto nemoci jsou spojeny s nerovnováhou neurotransmiterů. Deprese je spojována s nízkou hladinou monoaminů. Manie může zahrnovat sníženou aktivitu cholinergního přenosu, a tato hypotéza vedla k podávání GAL u manických pacientů. U GAL bylo zjištěno, že způsobil rapidní zlepšení symptomů<sup>28</sup>.

#### **2.4.4.6 Endokrinní účinky**

Další účinek GAL, který byl prvně zaznamenán během výzkumu jeho použití v anestezii, je jeho schopnost zvýšit hladiny hydrokortisonu v plazmě. Jednotlivá dávka 20 mg GAL ( s 1,5 mg atropinu) způsobila dlouhodobé zvýšení plazmatického hydrokortisonu z 0,54 µmol/l na 0,8 µmol/l. Neostigmin nevyvolal podobný účinek, mechanismus tohoto efektu GAL však nebyl vysvětlen. V další provedené studii bylo zaznamenáno, že GAL (0,3 mg/kg i.v.) vyvolal vzestup plazmatických hladin adrenokortikotropního hormonu (ACTH ) ve skupině 8 pacientů, kteří podstoupili operaci. Neostigmin však tento účinek nevyvolal. Z tohoto zjištění autoři usoudili, že

GAL stimuluje uvolňování ACTH centrálním působením a že ACTH potom stimuluje uvolnění hydrokortisonu. Je však nejasné, zda tento účinek GAL je spojen s jeho anticholinesterázovým účinkem<sup>28</sup>.

#### 2.4.4.7 Účinky GAL ve vztahu k SDAT

##### *Experimentální studie*

Studie provedené na králících vykázaly komplexní interakci mezi nAChRs, A $\beta$  a AChE. A $\beta$  inhibuje uvolnění Ach a reuptake cholinu. Navíc dochází ke zvýšenému influxu Ca<sup>2+</sup> iontů do buňky a následnému zániku neuronů. AChEs byly nalezeny v centru amyloidových plaků a takto vzniklý komplex je pak daleko toxičtější než amyloidové plaky samotné. Bylo ukázáno, že nikotin a aktivace jak nAChRs  $\alpha$ 7 tak  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 mají neuroprotektivní účinky<sup>14, 15, 29</sup>.

Jako alostericky potencující ligand GAL zlepšuje funkci nAChRs, zvyšuje afinitu Ach navázat se na receptory a zvyšuje uvolňování dalších neurotransmiterů, které jsou spojeny s učením, pamětí a kognicí, jako např. glutamátu a noradrenalinu. Tyto neurotransmitery, včetně Ach, zvyšují excitabilitu hipokampálních neuronů. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že GAL významně zvyšuje excitabilitu hipokampálních neuronů díky jeho inhibičnímu působení na AChE, čímž zlepšuje i cholinergní přenos přes mAChRs. Toto kombinované působení jak na muskarinovou tak nikotinovou transmissi vede obecně ke zlepšení schopnosti starých lidí učit se novým úkolům a pochopitelně i ke zlepšení projevů pacientů trpících SDAT<sup>29</sup>.

Experimenty na kortikálních neuronech ukázaly, že GAL chrání tyto neurony před A $\beta$  indukovanou glutamátovou toxicitou. Mecamylamin, antagonist nAChRs, neinhiboval ten to GAL vyvolaný neuroprotektivní účinek, stejně tak ani atropin, antagonist mAChRs.

Také  $\alpha$ -BgT (1,0nM), antagonist  $\alpha$ 7 nAChRs, zcela nepotlačil GAL vyvolanou neuroprotekcii. Dihydro- $\beta$ -erytroidin (100,0nM), působící jako antagonist  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nAChRs, také neinhiboval GAL vyvolanou neuroprotekcii. Výše uvedené látky však významně inhibovaly neuroprotekcii indukovanou samotným nikotinem. Z těchto dat vyplývá, že nikotin uplatňuje svůj neuroprotektivní účinek pouze přes nAChRs, kdy se váže na stejné vazebné místo jako Ach, zatímco možný účinek GAL je

zprostředkován přes alostericky modulující místo nAChRs a zřejmě i další mechanismy.

Při vzájemné kombinaci bylo zjištěno, že GAL zvyšuje nikotinem vyvolaný neuroprotektivní účinek. Současné podání těchto látek mělo v tomto směru aditivní charakter. Nově bylo prokázáno, že stimulace  $\alpha 7$  nAChRs má neuroprotektivní účinek zprostředkován přes PI3K kaskádu a Akt, která je cílem PI3K a je fosforylována nikotinem. Předléčba GAL zvýšila nikotinem-indukovanou Akt fosforylaci, což indikovalo, že GAL buď může modulovat nAChRs, čímž se stávají citlivějšími ke stimulaci nikotinem, nebo GAL může přímo indukovat ochranný signál. Tohoto děje se účastní  $\alpha 7$  nAChRs, neboť jejich cílená redukce v buněčných kulturách vyústila ve významnou redukci fosforylace Akt indukované GAL.

Je třeba dalších testů k objasnění, zda účinek GAL vázaný na fosforylaci Akt je produkován přímou aktivací nAChRs, kooperativním účinkem s přirozenými agonisty v médiu nebo konformační změnou vyvolanou GAL, která může přímo regulovat protein-kinázy asociované s AChRs <sup>15</sup>.

### *Klinické studie*

GAL byl srovnáván s placebem v léčbě lehké až středně těžké SDAT v 7 kontrolovaných studiích zahrnujících celkem 3955 nemocných. Denní dávky testovaného léku činily 8-40 mg a byly podávány po dobu 12-29 týdnů. GAL byl významně účinnější než placebo v redukci nejen kognitivních dysfunkcí, ale i BPSD (nekognitivních, tzn. behaviorálních a psychických příznaků SDAT) a zlepšoval denní aktivity nemocných.

Klinicky relevantní zlepšení kognitivních funkcí, změna ADAS-cog (jedenáctisložkový test k měření kognitivních funkcí) průměrně o 4 body, byly pozorovány u 41 % léčených a velmi výrazné zlepšení, tj. změna ADAS-cog průměrně o 7 bodů, u 18 % nemocných. Pokud vezmeme v úvahu skutečnost, že SDAT je progresivní onemocnění a terapeutickým úspěchem je již další nezhoršení kognitivního deficitu, pak léčebná úspěšnost GAL byla pozorována u 63 % léčených. Nejvyšší terapeutickou účinnost měla dávka 24 mg/den a poněkud nižší či stejnou pak dávka 32 mg/den. Podle škály CIBIC-plus ( sedmistupňová metoda založená na rozhovorech s pacienty a pečovateli) účinnost denních dávek stoupala od 8 do 32 mg, přičemž 8 mg GAL nebylo účinnější

než placebo. Nižší výskyt nežádoucích účinků byl zaznamenán při pomalejší titraci dávek<sup>16, 19, 27</sup>.

#### **2.4.5 Dlouhodobé podávání GAL**

Po šesti měsíčním dvojitě slepém podávání GAL či placebo 636 nemocným s SDAT bylo testované kognitivum dále podáváno otevřeně v dávce 24 mg/den dalších 18 měsíců, tedy celkem 2 roky. Po 1. roce terapie GAL se terapie kognitivních funkcí (ADAS-cog) a denních aktivit (DAD) signifikantně nelišila od iniciálních hodnot. Po 2 letech léčba GAL vedla k významně úspěšnějšímu ovlivnění kognitivní dysfunkce (podle ADAS-cog) než by činil předpokládaný pokles u neléčených pacientů<sup>16, 18, 19, 27</sup>.

#### **2.4.6 Toxicita GAL**

GAL je jen mírně toxický. LD<sub>50</sub> pro potkana p.o. je 83,6 mg/kg.

Dále byla sledována šestiměsíční chronická toxicita u dospělých potkanů. Při podávání perorálních dávek, ekvivalentním terapeutickým denním dávkám u lidí, nebyly zaznamenány žádné odchylky od biometrických, hematologických a morfologických parametrů. Následná gravidita i porod probíhaly normálně<sup>9</sup>.

#### **2.4.7 Nežádoucí účinky GAL**

Nežádoucí účinky GAL vyplývají s jeho cholinomimetického působení. Nejčastějšími jsou nauzea, vomitus, průjem, flatulence, bolesti břicha, nechutenství a snížení tělesné hmotnosti. Dostavují se nejčastěji v období titrace léku a většinou jsou přechodného charakteru, např. nauzea v průměru vymizí do 5-7 dnů. Při pomalé titraci dávek, tj. při zvyšování denní dávky GAL jen o 8 mg každé 4 týdny, byly pozorovány uvedené gastrointestinální příznaky méně často. Cholinomimetika zvyšují žaludeční sekreci, proto musí být pacienti poučeni a sledováni pro možné krvácení do gastrointestinálního traktu, které zvláště hrozí nemocným s gastroduodenálním vředem<sup>7, 9, 27</sup>.

Inhibitory cholinesteráz se vyznačují také vagotonickým působením a mohou vést k bradykardii, eventuálně k síňokomorovému bloku. Některé z těchto účinků byly zaznamenány u lidí při používání GAL během anestezie. Cílený výzkum byl proveden



na 14 operovaných pacientech. Pozornost byla kladena na stabilizaci hladin krevních plynů a změny v srdečním rytmu. GAL v denní dávce 20 mg vyvolával velmi mírnou bradykardii (71 tepů/min k 69 tepů/min) a měl zanedbatelný účinek na krevní tlak. Vyskytly se však interindividuální rozdíly: u 6 pacientů srdeční frekvence klesla k 55 tepů/min, což bylo spojeno s menšími arytmiemi. Obdobně skupině pacientů byl GAL podáván společně s atropinem (0,5 mg). Celkově i zde byla také mírná bradykardie, ale pouze u 2 z 15 pacientů byl zaznamenán vyšším pokles srdeční frekvence. Autoři proto v těchto případech doporučují kombinaci GAL s atropinem<sup>27,28</sup>.

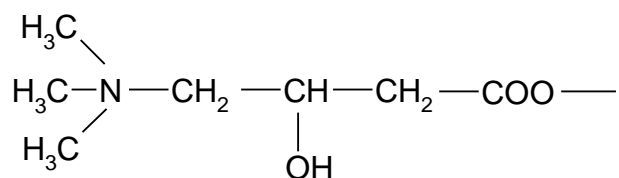
Dalšími nežádoucími účinky byly insomnie (5% léčených), únavnost (5%), synkopa(2%)<sup>27</sup>.

## 2.5. Farmakologie L-carnitinu

### 2.5.1 Endogenní a exogenní původ carnitinu v těle

L-CAR je ze 30% syntetizován v těle ze dvou esenciálních aminokyselin – lyzinu a methioninu a zbytek je dodáván potravou. L-CAR je syntetizován u většiny eukaryotických organismů, u člověka je produkován pouze v játrech, ledvinách a mozku, ačkoli jeho prekurzor  $\gamma$  - butyrobetain je syntetizován ve všech tkáních. Enzym, který konvertuje  $\gamma$  - butyrobetain na L-CAR se nazývá butyrobetain hydroxyláza. Koncentrace L-CAR v mozku je nízká, jen asi 10% toho co v srdci, svalech a játrech. Tyto rozdíly v distribuci potvrzují ztížený průnik přes HEB, případně i existenci aktivního transportního systému. K tvorbě L-CAR je zapotřebí přítomnost vitamínu C, pyridoxinu (vitamin B<sub>6</sub>), niacinu a železa<sup>13,26</sup>.

Při průmyslové výrobě vzniká L- i D- forma L-CAR. V přírodě se však vyskytuje jen L- forma a jen ta je biologicky aktivní. D- carnitin, pravotočivá, neúčinná a toxická forma, kompetuje s L- CAR o transportní proteiny a může tak vyvolat příznaky jeho nedostatku<sup>13</sup>.



Obr.4 Chemická struktura carnitinu

U savců je carnitinová zásoba tvořena z neesterifikovaného L-CAR a mnoha acylcarnitinových esterů. Z těchto esterů je nejvýznamnější ALC. Hladina L-CAR je udržována absorpcí z potravy, z menší části přímou syntézou v organismu a renální reabsorpcí. Absorpce L- CAR se uskutečňuje částečně přes transportérový přenašeč, částečně i pasivní difuzí. Aktivní transport je závislý na teplotě, přítomnosti Na<sup>+</sup> iontů a ATP. Vstřebávání negativně ovlivňuje nedostatek Na<sup>+</sup> iontů, přítomnost D- carnitinu a ALC<sup>13,20</sup>.

Po orálních dávkách 0,5-6,0 g čistého L-CAR je absolutní biologická dostupnost L-CAR 5-18%. Biologická dostupnost L-CAR obsaženého v potravě je naopak vysoká, kolem 75 %. Tedy farmakologické dávky L-CAR jsou absorbovány méně účinněji než relativní malá množství L-CAR přítomného v potravě. Cirkulující L-CAR je distribuován do dvou kineticky definovaných kompartmentů: jeden větší a pomalo-obratový je představován kosterním svalstvem a myokardem a druhý menší a rychlo-obratový je představován především játry a ledvinami. L-CAR a jeho estery s krátkým řetězcem se neváží na plazmatické bílkoviny.

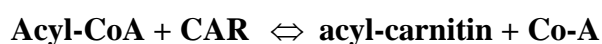
L- CAR je z těla eliminován hlavně ledvinami. Za normálních podmínek je hodnota renální clearance pouhých 1-3 ml/min, což značí velmi vysokou tubulární reabsorpci (98-99%)<sup>20,21</sup>.

## 2.5.2. Biologický význam carnitinu

L- CAR hraje důležitou roli v buněčném metabolismu. Jeho úkolem je zajistit adekvátní saturaci Krebsova cyklu acetyl-CoA a to jak z pyruvátdehydrogenázového systému, tak především z  $\beta$ -oxidace mastných kyselin<sup>30</sup>.

L-CAR je nezbytný pro přenos mastných kyselin s dlouhým řetězcem do mitochondriální matrix, kde dochází k jejich  $\beta$ -oxidaci. Přenašečový systém je tvořen několika enzymy: carnitinpalmitoyltransferázou I na vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány a carnitintranslokázou a carnitinpalmitoyltransferázou II na jejím vnitřním povrchu

Aby mohly být mastné kyseliny přeneseny do mitochondrie, musí být aktivovány reakcí s CoA, výsledkem je příslušný acyl-CoA. Tato reakce probíhá dle rovnice:



Tato aktivace probíhá v cytozolu. A jak se tedy acyl-CoA dostane přes vnitřní mitochondriální membránu dovnitř mitochondrie? Nejprve je acylová skupina cytosolového acyl-CoA přenesena na carnitin za současného uvolnění CoA do jeho cytosolové rezervy. Výsledný acylkarnitin je transportním systémem přenesen do mitochondriální matrix. Acylová skupina je přenesena na molekulu CoA z mitochondriální rezervy. Uvolněný carnitin je opět vrácen do cytosolu<sup>20,30</sup>.

Peroxisomy také obsahují carnitinacyltransferázy a enzymatický systém pro  $\beta$ -oxidaci. Tento systém se částečně uplatňuje při zkracování mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem<sup>25</sup>.

Další funkcí L-CAR je odstraňování toxických acylových skupin z mitochondriální matrix do cytosolu a dále do krevního řečiště prostřednictvím acyl-carnitinu.

L-CAR ovlivňuje také oxidaci glukózy. Ta je primárně závislá na poměru mezi acyl-Coa a CoA uvnitř mitochondrií. Právě tento poměr je regulován L-CAR, který tak rozhoduje, bude-li přednostně podporována  $\beta$ -oxidace tuků nebo naopak oxidace glukózy. Snížením poměru acyl-CoA/CoA v mitochondriích je zvýšena aktivita pyruvátdehydrogenázového systému a energie se pak získává alternativní cestou z glykogenu nebo přímo z glukózy.

Nejsou-li při nedostatku L-CAR mastné kyseliny dostatečně odbourávány, zvyšuje se v cytosolu jejich koncentrace, což působí toxicky. Snižuje se hladina  $K^+$  iontů a zvyšuje se hladina  $Na^+$  a  $Ca^{2+}$  iontů. Následně se rozvíjí edém, dochází k poruše poměru ATP/ADP, vznikají produkty oxidace a peroxidace lipidů, což může vést až k nekróze buňky<sup>13,30</sup>.

### 2.5.3 Význam carnitinu v CNS

Přirozená součást savčí tkáně L-CAR je známý tím, že zvyšuje průnik některých látek nebo chemických skupin biologickými bariérami. Z tohoto důvodu je pokládán za vhodného kandidáta pokusů o cílenou biodistribuci farmak do CNS. Na druhé straně nebylo dosud prokázáno, že by L-CAR byl přímým neurotransmiterem. Zaznamenána však byla jeho slabá cholinomimetická aktivita, která snad alespoň zčásti souvisí se stimulačním působením L-CAR na aktivitu ChAT. Sám L-CAR nemá přímý vliv na AChE aktivitu. Mozek je energeticky závislý na glukóze a ketolátkách a to více než na mitochondriální oxidaci mastných kyselin s dlouhými řetězci. Funkce L-CAR spočívá ve stimulaci glykolýzy a nepřímém ovlivnění excitačních funkcí<sup>13</sup>.

## 2.5.4 Acetyl-L-carnitin

ALC je ester L-CAR a kyseliny octové. Je rovněž přirozenou komponentou savčí tkáně. Snadno proniká přes HEB do mozkomíšního moku a ovlivňuje hypotalamo-hypofyzární-adrenokortikální osu. Zaznamenané neurobiologické účinky ALC zahrnují modulaci:

1. mozkového energetického a fosfolipidového metabolismu,
2. buněčných makromolekul, zahrnující neurotrofické faktory a neurohormony,
3. synaptickou plasticitu,
4. synaptický přenos<sup>13,17</sup>.

### 2.5.4.1 Neuroprotektivní účinky ALC

Inhibice mitochondriálního dýchacího řetězce snižuje produkci ATP. ALC ovlivňuje udržení klíčových mitochondriálních proteinů pro maximální energetickou produkci a může také hrát za určitých okolností jistou neuroprotektivní úlohu. Ve studii modelu ischemického poškození na izolovaném preparátu kortikostriálních neuronů krys byla sledována ALC zprostředkovaná neuroprotektce. Samotná ischemie byla navozena roztokem, ve kterém nebyla přítomna glukóza a kyslík byl vyměněn za dusík. Předléčba ALC snížila některé důsledky ischemie. Tento neuroprotektivní účinek byl specifický, neboť předléčba dvěma jinými sloučeninami odvozených od carnitinu tento účinek neměla. Popsaný neuroprotektivní účinek je závislý na vysokoafinitním systému vychytávajícím cholin a také na aktivaci muskarinových M2 receptorů<sup>22</sup>.

V další studii bylo sledováno, zda L-CAR jako potenciální antioxidant, je schopný ochránit neurony před neurotoxickým efektem glutamátu a kainátu. Glutamátem navozená intracelulární kumulace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů a tvorba volných radikálů je faktorem přispívajícím k buněčné smrti u hypoxicko-ischemického poškození mozku. Glutamát ( $10^{-7}$  M) a jeden z jeho receptorových agonistů kainátová kyselina ( $10^{-4}$  M) byly přidávány do prostředí kultur savčích neuronů. Na tomto modelu pak byl měřen neuroprotektivní účinek ALC, který byl v dávkách  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  M aplikován buněčným kulturám. L-CAR v dávkách  $10^{-4}$  M a  $10^{-3}$  M významně blokoval glutamátem indikovanou neurotoxicitu. L-CAR také blokoval kainátem indukovanou neurotoxicitu, ale pouze v dávce  $10^{-4}$  M. Na jiných experimentálních modelech bylo pozorováno, že ALC zvyšuje hladiny a využívání NGF a zvyšuje aktivitu ChAT. Zvýšení

hladin NGF v CNS bylo dosaženo po opakovaném podávání ALC zvířatům různého věku, což indikuje přímý účinek látky na NGF systém, který je nezávislý na stáří a případných degenerativních změnách neuronů. Dlouhodobé podávání ALC kompletně zabraňuje poklesu aktivity ChAT.

Možný neuroprotektivní efekt ALC a L-CAR se tedy může zakládat na zabraňování či alespoň oddálení na stárnutí závislém poklesu NGF a ChAT <sup>23, 24, 31</sup>.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Uspořádání pokusu

Schéma kontrolních skupin laboratorních potkanů:

Ovlivnění anticholinesterázové aktivity GAL L-CAR

3x voda p.o., 3.den fyziologický roztok i.m.

3x voda p.o., 3.den GAL (2,5 mg/kg i.m.)

3x voda p.o., 3.den GAL (10 mg/kg i.m.)

Schéma pokusných skupin

3x denně L-CAR 250 mg/kg p.o., 3. den GAL 2,5 mg/kg i.m.

3x denně L-CAR 250 mg/kg p.o., 3.den GAL 10 mg/kg i.m.

Poté byli potkani usmrceni a byly měřeny změny AChE aktivity v hypofýze a v mozku (frontální kůra, hipokampus, mediální septum a bazální ganglia).

### 3.2 Stanovení aktivity acetylcholinesterázy

#### 3.2.1 Princip metody

Aktivita cholinesteráz byla měřena kolorimetricky Ellmanovou metodou za pomoci 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB) modifikovaným postupem podle Bajgara. Jako substrát byl použit ester thiocholinu, acetylthiocholin jodid, který je acetylcholinesterázou štěpen na thiocholin a kyselinu octovou. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, a její zbytek- 5- merkapto-2-nitrobenzeová kyselina byl měřen fotometricky při vlnové délce  $\lambda = 412 \text{ nm}$ <sup>12, 33</sup>.

### 3.2.2 Použité chemikálie a roztoky

- 0,2 M TRIS-HCl pufr:  
24,2 g 1,1,1-tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Lachema Brno, ČR) se rozpustí v 1000 ml destilované vody. 50 ml tohoto roztoku se smíchá s 38,4 ml 0,2 M HCl, doplní se destilovanou vodou na 200 ml a pH se upraví na 7,6.
- DNTB- činidlo na SH- skupiny:  
0,1 g DNTB (Serva Heidelberg, SRN) se rozpustí v 50 ml 0,2 M TRIS pufru
- Substrát:  
0,029 acetylcholin jodidu (Lachema Brno) se rozpustí v 10 ml destilované vody
- Kalibrační roztok:  
Vodný roztok cystein-HCl (Koch-Light lab.,GB) v koncentracích od  $1 \times 10^{-4}$  M do  $5 \times 10^{-6}$  M.
- Vzorek pro měření:  
1 mg homogenátu mozkové tkáně/1 ml destilované vody<sup>12,33</sup>

### 3.2.3 Použité přístroje

Spektrofotometr UVIKON 942 (firmy Kontron Instruments), skleněné kyvety (l = 0,999)

Torzní váhy (Meopta Praha)

Homogenizátor Ultra Turrax (firmy Janke Kunkel, Švýcarsko)<sup>12,33</sup>

### 3.2.4 Pracovní postup

Z řezů mozkové tkáně laboratorního potkana se připraví homogenát (1 mg mozkové tkáně/ 1 ml destilované vody).

Do kyvety se k 1 ml homogenátu přidá 0,4 ml DTNB a 0,4 ml TRIS pufru. Reakce je zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Fotometruje se při  $\lambda = 412$  nm a registruje se změna absorbance. Pro kalibraci se místo homogenátu do kyvety pipetuje roztok různých koncentrací cysteinu. Fotometruje se proti slepému vzorku, který je zpracován stejně, jen místo cysteinu je přidávána destilovaná voda.



Z hodnot absorbance jsme odečítali a zaznamenávali odpovídající množství SH- skupin v nmolech v reakční směsi <sup>12,33</sup>.

## 4.VÝSLEDKY

Jednorázové dodání nižší dávky GAL (2,5 mg/kg) nemělo ve srovnání s kontrolou statisticky významný efekt na aktivitu AChE ve frontální kůře, hipokampu, septu a bazálních gangliích. Pouze v hypofýze došlo ke statisticky významnému snížení aktivity AChE o 33,7% ( 1,22 nmol/min/100mg tkáně) proti kontrolní skupině ( 1,84 nmol/min/100mg tkáně). Předléčba L-CAR v dávce 250 mg/kg p.o. po 3 dny a následné podání GAL 2,5 mg/kg i.m. vedla opět pouze v hypofýze ke statisticky významnému zesílení inhibice AChE aktivity, a to o 10% vůči samotnému podání GAL.

Po podání vyšší dávky GAL 10 mg/kg došlo ke statisticky významnému zvýšení inhibice AChE aktivity ve frontální kůře, hipokampu a v hypofýze. V čelní kůře byla aktivita AChE o 9,1% (300 nmol/min/100mg tkáně) snížena proti aktivitě AChE u zvířat kontrolní skupiny (330 nmol/min/100mg tkáně). V hipokampu byla AChE aktivita snížena o 14,8% (230 nmol/min/100mg tkáně) proti kontrolní skupině (270 nmol/min/100mg tkáně). V hypofýze byla aktivita AChE snížena o 47,8% (0,96 nmol/min/100mg tkáně) proti kontrolní skupině (1,84 nmol/min/100mg tkáně). V bazálních gangliích byla aktivita AChE dokonce nepatrně zvýšena o 2% proti kontrolní skupině.

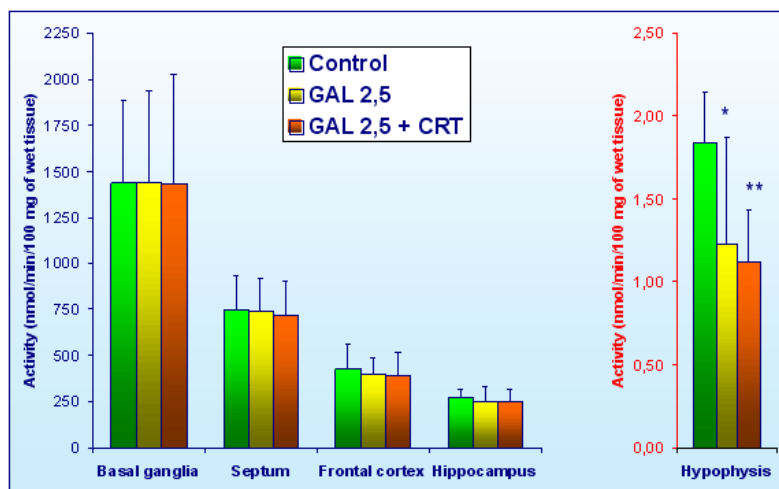
Premedikace L-CAR vedla ke statisticky významnému zesílení inhibičního efektu GAL v hipokampu. Ve frontální kůře a v hypofýze bylo toto zesílení na hranicích statistické významnosti.

V čelní kůře byla aktivita AChE 290 nmol/min/100mg tkáně (snížení o 12,2 % oproti zvířatům kontrolní skupiny -330 nmol/min/100 mg tkáně), proti aktivitě AChE zvířat s podáním samotného GAL (300 nmol/min/100 mg tkáně) byla snížena o 3,1 %.

Aktivita AChE v hipokampu byla 130 nmol/min/100mg tkáně a došlo tedy ke snížení o 51,85 % ve srovnání s aktivitou AChE zvířat kontrolní skupiny (270 nmol/min/100 mg tkáně) a o 36 % proti skupině s podáním samotného GAL (230 nmol/min/100 mg tkáně).

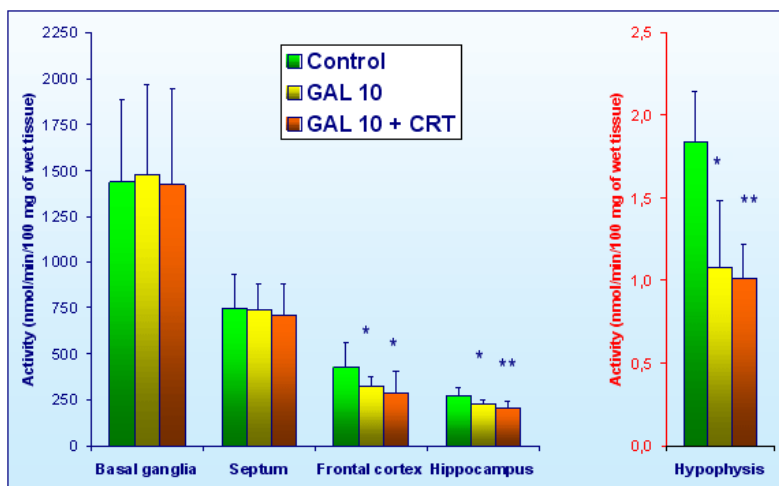
Aktivita AChE v hypofýze (0,91 nmol/min/100 mg tkáně) byla snížena o 51% ve srovnání s kontrolní skupinou (1,84 nmol/min/100 mg tkáně) a o 3 % ve srovnání s podáním samotného GAL.

**Efekt L-karnitinu  
na anticholinesterázovou aktivitu GAL  
(2,5 mg/kg i.m.)**



Graf č. 1

**Efekt L-karnitinu  
na anticholinesterázovou aktivitu GAL  
(10 mg/kg i.m.)**



Graf č. 2

- \* - statisticky významný účinek GAL vůči kontrole
- \* \* - statisticky významný účinek GAL a CRT (= L-CAR) vůči samotnému GAL

## 5. DISKUSE

### 5.1 Výhody použití Ellmanovy metody pro stanovení aktivity AChE

Aktivitu AChE lze stanovit řadou metod. V této práci byla použita modifikace Ellmanovy metody, jejíž výhodou je rychlost provedení samotného měření, specifika a zejména vysoká citlivost.

Uvádí se, že citlivostí tato metoda předčí všechny doposud používané metody pro stanovení aktivity AChE. Např. kalorimetrická metoda na automatickém kalorimetru (Auto-Analyzer) podle Wintera, kdy je detekována změna pH fenolčervení jako indikátorem, je asi 160x méně citlivá a klasická pH-metrická metoda podle Michaela asi 40x méně citlivá.

Vysoká citlivost této metody skutečně dovoluje zaznamenat i minimální změny aktivity enzymu ve studovaných částech mozku laboratorního potkana, což je obecně materiál s velmi nízkou aktivitou AChE ( u lidí je normální aktivita AChE řádově v jednotkách  $\mu\text{molu}/\text{min}/\text{ml}$  krve, tzn. 100-150  $\mu\text{kat}/\text{l}$  zatímco námi změřené hodnoty jsou přibližně ve stovkách  $\text{nmolu}/\text{min}/100$  mg mozkové tkáně).

Metodu je možno použít také pro měření aktivity AChE v erythrocytech či plazmě, což má i klinický význam, např. při diagnostice otrav organofosfáty. Stejně je možné využití této metody pro stanovení aktivity BuChE<sup>12,33</sup>.

Při stanovení aktivity AChE velmi záleží na odběru, způsobu skladování a zpracování biologického materiálu ( v našem případě mozku laboratorního potkana). Tento biologický materiál musí být skladován při nízkých teplotách, tj. okolo  $-20^{\circ}\text{C}$  a ihned po vyjmutí z mrazícího boxu zpracován. V neposlední řadě záleží na způsobu zhotovení řezů mozku; přesné provedení řezů je nezbytným předpokladem úspěchu experimentu a hlavně získání přesných a správných výsledků. Nevýhodou je možnost interference s vlnovou délkou hemoglobinu<sup>13</sup>.

## 5.2 Efekt L-CAR na AChE aktivitu GAL

Přestože GAL dobře přechází přes HEB, přesto je opodstatněná snaha o zvýšení jeho penetrace a tím i zvýšení dostupnosti pro nervovou tkáň. Zvýšená prostupnost předpokládá redukci terapeutických dávek a současně zamezení nebo alespoň snížení potenciálních klinických komplikací, plynoucích z periferního parasymptomimetického účinku. Výhodou může být i vlastní (byť slabá) parasymptomimetická aktivita L-CAR.

Na základě této myšlenky je stavěna i tato práce, zda lze L-CAR použít k usnadnění průniku GAL do CNS a zda je schopen přímo ovlivnit AChE aktivitu GAL. Ke sledování účinku samotného GAL a GAL s L-CAR na aktivitu AChE byly zvoleny bazální ganglia, septum, frontální kůra a hipokampus, neboť jsou to struktury, kde se nachází velké nakupení cholinergních vláken, která jsou postižena u SDAT. K terapii SDAT jsou jako léky první volby používány právě IChE, mezi které patří i sledovaný GAL.

V diplomové práci Mgr. Daniely Prokopové<sup>13</sup> je zkoušen efekt L-CAR na AChE aktivitu 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Samotný p.o. podaný L-CAR v dávce 250 mg/kg statisticky významně nezměnil AChE aktivitu v sledovaných strukturách, kterými byly frontální kůra, hipokampus, septum a bazální ganglia. Opakované podání L-CAR v dávce 100 a 250 mg/kg po 3 dny prohloubilo inhibiční efekt 7-MEOTA na AChE aktivitu, a to především v čelní kůře, septu a bazálních gangliích. Výraznější efekt byl pozorován po vyšší dávce L-CAR (250 mg/kg)<sup>13</sup>. V této práci se proto již nesrovnával efekt různých dávek L-CAR na AChE aktivitu. Použil se L-CAR v jediné dávce (dávka 250 mg/kg se ukázala v citované práci jako optimální) a srovnával se její účinek na AChE aktivitu GAL proti podání samotného GAL, účinek byl navíc sledován také v hypofýze<sup>32</sup>.

Dosažené výsledky ukazují, že premedikace L-CAR, následovaná podáním GAL ve vyšší dávce ukázala vyšší inhibici AChE ve srovnání s podáním samotného GAL. Avšak statisticky významný rozdíl byl pro toto zesílení pozorován pouze v hipokampu. Ve frontální kůře a v hypofýze bylo toto zesílení na hranicích statistické významnosti. Byla tedy dokázána schopnost L-CAR zesílit inhibiční sílu systémově podaného GAL<sup>32</sup>. Předléčba L-CAR a následující podání 7-MEOTA vedlo k nejvýraznějšímu snížení aktivity AChE ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích. Tyto rozdílné výsledky naznačují, že zesílení inhibičního účinku L-CAR nemusí být vyvoláno tím, že

L-CAR zvyšuje prostupnost látek přes HEB. V práci D.Prokopové po opakovaném podání L-CAR došlo sice ke zvýšení hladiny 7-MEOTA v mozku, šlo však o zvýšení statisticky nevýznamné <sup>13</sup>. Zdá se tedy, že snížení aktivity AChE v mozku je dáno interakcí GAL a L-CAR na aktivních centrech enzymu.

Rozdíly v inhibici AChE mezi jednotlivými strukturami mozku a hypofýze mohou znamenat jejich rozdílný význam v působení GAL A L-CAR <sup>13</sup>.

Je také známo, že GAL a L-CAR mají pozitivní vliv na zvýšení aktivity ChAT. Byl tedy pozorován jejich společný účinek na aktivitu ChAT <sup>2,9</sup>.

## 6. ZÁVĚR

Samotný, i.m. podaný GAL (2,5 mg/kg), způsobil statisticky významné snížení AChE aktivity pouze v hypofýze. Stejně tak předléčba L-CAR a následné podání GAL vedla ke statisticky významnému snížení AChE aktivity opět pouze v hypofýze. Samotné podání GAL (10 mg/kg) nejvýrazněji snížilo AChE aktivitu ve frontální kůře, hipokampu a hypofýze. Premedikace L-CAR a následné podání GAL prohloubila inhibiční efekt GAL na AChE aktivitu, tento efekt byl nejvýraznější v hipokampu.

GAL jako alostericky potencující ligand zvyšuje afinitu Ach navázat se nAChRs a zvyšuje uvolňování dalších neurotransmiterů, které jsou spojeny s učením, pamětí a kognicí. Tyto neurotransmitery, včetně Ach zvyšují excitabilitu hipokampálních neuronů. Tento účinek spolu s inhibičním působením na aktivitu AChE, který byl nejvýraznější právě v hipokampu, může tedy zlepšit cholinergní transmissi u pacientů s SDAT.

Z výše uvedených výsledků vidíme, že nejvýraznější snížení aktivity AChE nastalo po předléčbě L-CAR v kombinaci s vyšší dávkou GAL v hipokampu. Zesílení inhibičního efektu GAL ve frontální kůře a v hypofýze bylo méně výrazné. Byla potvrzena hypotéza o zvýšené dostupnosti Ach pro mozkové mAChRs a nAChRs. Dosažené výsledky mají praktický význam pro využití kombinované terapie L-CAR s GAL u pacientů s SDAT, kde lze očekávat další terapeutický benefit alespoň u některých projevu tohoto závažného onemocnění.

## 7. SOUHRN

Cílem práce bylo zjistit, zda preventivní podání L-CAR ovlivní farmakologický efekt GAL. Jako sledovaný ukazatel efektu testovaných látek bylo zvoleno stanovení aktivity AChE. Z metod pro stanovení cholinesteráz byla zvolena kalorimetrická metoda podle Ellmana. Aktivita AChE byla měřena v hypofýze a ve vybraných částech mozku (čelní kůra, hipokampus, septum a bazální ganglia) laboratorního potkana. L-CAR signifikantně zesiloval inhibiční efekt vyšší dávky GAL v hipokampu, v čelní kůře bylo toto zesílení na hranicích statistické významnosti. Kombinace L-CAR a GAL může tedy být prospěšná u pacientů s SDAT.

### Summary

The aim of this work was to find whether prevent administration of L-CAR affect pharmacological effect of GAL. As a marker of the effect of tested drugs was chosen determination of activity of AChE. Calorimetric method according to Ellman for determination of cholinesterases was chosen. Activity of AChE was measured in the hypophysis and brain parts (the frontal cortex, hippocampus, medial septum and basal ganglia) of laboratory rat. L-CAR significantly increased inhibitory effect of higher dose of GAL in hippocampus. In the frontal cortex this increasing was on the limit of statistical significance. The results obtained suggest the benefit of L-CAR and GAL combination in patients with SDAT.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Jirák R.; Koukolík F.: Demence ( Neurobiologie, klinický obraz, terapie). Nakl. Galén, Praha, 2004.
2. Valchář M.: Molekulární podstata nemocí ve stáří a možnosti jejich terapie. Čs.Psychiatrie,86,1990,s.195-204.
3. Jirák R.: Farmakoterapie kognitivních funkcí u demencí se zaměřením na Alzheimerovu chorobu – současné možnosti a perspektivy. Remedia,7,1997,s.92-95.
4. Patočka J., Fusek J.: Současné trendy ve vývoji látek ze skupiny inhibitorů cholinesteráz jako léčiv Alzheimerovy choroby. Čs. Psychiatrie,88,1992, s.258-265.
5. Patočka J., Strunecká A., Řípková D.: Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy choroby. Čs.Fyziologie,50,2001,s.4-10.
6. Jirák R.: Kognitiva. Remedia,11,2001,s.419-422.
7. Švestka J.: Galantamin. Remedia,11,2001,s.445-446.
8. Patočka J., Kuča K., Jun D.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. Acta Medika,47,2004,s.215-228.
9. Krejčová G., Ševelová L.: Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. Vojenské zdravotnické listy,72,2003, s.37-44.
10. Koukolník F.; Jirák.R.: Alzheimerova choroba a další demence. Grada Publishing, Praha,1998.

11. Patočka J.: Inhibitory acetylcholinesterasy – od nervových plynů k léčivům Alzheimerovy choroby. *Chemické listy*,92,1998,s.1016-1019.
12. Bajgar.J.: Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy*,41,1972,s.78-80.
13. Prokopová D.: Efekt L-karnitinu na anticholinesterázovou aktivitu 7-methoxytacrinu. Diplomová práce, katedra farmakologie a toxikologie, FaF Hradec Králové 2002.
14. Nakamizo T.; Kawamata J.; Yamashita H.; Kanki R.; Kihara T.; Sawada H.; Akaike A.; Shimohama S.: Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors protects motor neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,330,2005, s.1285-1289.
15. Kihara T.; Sawada H.; Nakamizo T.; Kanki R.; Yamashita H.; Maelicke A.; Shimohama S.: Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks A $\beta$ - enhanced glutamate toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,325, 2004, s. 976-982.
16. Coyle J.; Kershaw P.: Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry*,49,2001, s. 289-299.
17. Pettegrew JW.; Levine J.; McClure RJ.: Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Molecular Psychiatry*,5,2000, s. 616-632.
18. Loy C., Schneider L.: Galantamine for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004.  
([http:// www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed](http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed), listopad 2006)

19. Olin J., Schneider L.: Galantamine for Alzheimer's disease. Cochrane Database Syst Rev. 2001.  
( [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed), listopad 2006)
20. Rebouche CJ.: Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. Annals of the New York Academy of Science,1033,2004, s. 30-41.
21. Evans AM.; Fornasini G.: Pharmacokinetics of L-carnitine. Clinical Pharmacokinetics,42,2003, s. 941-947.
22. Picconi B.; Barone I.; Pisani A.; Nicolai R.; Nenatfi P.; Bernardi G.; Calvani M.; Calabresi P.: Acetyl-l-carnitine protects striatal neurons against in vitro ischemia: The role of endogenous acetylcholine. Neuropharmacology,50,2006, s. 917-923.
23. Tagliatela G.; Navarra D.; Cruciani R.; Ramacci M. T.; Alem g.S.; Angelucci L.: Acetyl-l-carnitine treatment increases nerve growth factor levels and choline acetyltransferase activity in the central nervous system of aged rats. Experimental Gerontology,29,1994, s. 55-66.
24. De Simone R.; Ramacci M.T.; Aloe L.: Effect of acetyl-L.carnitine on forebrain cholinergic neurons of developing rats. International Journal of Developmental Neuroscience,9,1991, s. 39-46.
25. Bremer J.: The role of carnitine in intracellular metabolism. Journal of clinical chemistry and biochemistry,28,1990, s. 297-301.
26. Bremer J.: Carnitine- metabolism and functions. Physiological reviews,63, 1983,1420-1480.
27. Švestka J.: Galantamin-dualistické kognitivum. Psychiatrie,4,2001, s.265-274.
28. Harvey A.L.: The pharmacology of galanthamine and its analogues. Pharmacol. Ther.,68,1995, s. 113-128.

29. Oh M.M.; Wu W.W.; Power J.M.; Disterhoft J.F.: Galantamine increases excitability of CA1 hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience*,137,2006, s. 113-123.
30. Voet D., Voetová J.G.: *Biochemie*. Victoria Publishing a.s.,Praha,1995, s.697-698.
31. Tastekin A.; Gepdiremen A.; Ors R.; Buyukokuroglu M.E.; Halici Z.:L-carnitine protects against glutamate- and kainic acid-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rats.*Brain and Development*,27,2005, s. 570-573.
32. Bajgar J.; Bartosova L., Fusek J.; Svoboda Z., Herink J.; Kvetina J.; Palicka V.; Zivny P. and Blaha V.: Changes of cholinesterase activities in the plasma and some tissues following administration of l-carnitine and galanthamine to rats. *Neuroscience Letters*,411,2007, s.212-216.
33. Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*,7, 1961, s.88-95.