

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové  
Psychiatrická klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové

## **DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**Sérové koncentrace D-serinu a glycinu  
ve vztahu k negativním příznakům:  
dysfunkce NMDA receptoru v patogenezi schizofrenie**

Autor: MUDr. Jaromír Hons

Školitel: prof. MUDr. Jan Libiger, CSc.

Doktorský studijní program: Psychiatrie

Hradec Králové 2008



## **Poděkování**

Autor práce s úctou děkuje svému školiteli, prof. MUDr. Janu Libigerovi, CSc., za odborné vedení během postgraduálního studia, námět tématu práce, pomoc při formulování výzkumných cílů, metodologické podněty a všeobecnou podporu při realizaci výzkumného projektu.

Poděkování za spolupráci patří PharmDr. Martině Ulrychové, RNDr. Evě Čermákové, ing. Jaroslavě Vávrové, Ph.D. a MUDr. Jiřímu Masopustovi.

# Obsah

1. Úvod.....	7
2. Negativní příznaky schizofrenie.....	8
3. Neurotransmitterový model schizofrenie .....	9
3.1. Dopaminová hypotéza.....	9
3.2. Glutamátová hypotéza.....	9
4. Glutamátergní neurotransmitterový systém.....	11
4.1. Struktura glutamátergního systému v CNS.....	11
4.2. Glutamát.....	12
4.2.1. Syntéza glutamátu v CNS.....	12
4.2.2. Transport glutamátu v CNS.....	13
4.3. Glutamátové receptory.....	14
4.3.1. Iontropní receptory.....	15
4.3.2. Metabotropní receptory.....	17
5. Látky ovlivňující glutamátergní systém.....	18
5.1. Agonisté NMDA receptoru.....	20
5.1.1. Syntéza, metabolismus a transport D-serinu.....	22
5.1.2. Syntéza, metabolismus a transport glycinu.....	25
5.1.3. Distribuce D-serinu a glycinu v CNS a v periférii.....	27
5.1.4. Transport D-serinu a glycinu přes HEB.....	28
5.2. Agonisté NMDA receptoru u schizofrenie.....	29
5.2.1. Sérové koncentrace D-serinu a glycinu u schizofrenie.....	29
5.2.2. D-serin a glycin v augmentační terapii schizofrenie.....	30
6. Klinická studie.....	32
6.1. Cíle studie.....	32
6.2. Hypotézy studie.....	32
6.3. Vstupní kritéria.....	32
6.4. Vylučovací kritéria.....	32
6.5. Subjekty studie.....	33
6.6. Metodika.....	33
6.6.1. Průběh klinické studie.....	33
6.6.2. Schéma klinického hodnocení.....	34
6.6.3. Vyšetřovací metody.....	34

6.6.3.1. Stanovení sérových koncentrací excitačních AMK.....	34
6.6.3.2. Vyšetření psychopatologie.....	36
6.6.4. Statistické hodnocení.....	37
6.7. Výsledky.....	37
7. Diskuze.....	55
8. Závěr.....	59
9. Literatura.....	60
10. Seznam použitých zkratk.....	72
11. Seznam publikací doktoranda.....	73
12. Přílohy.....	76



# 1. Úvod

Schizofrenie je charakterizována výskytem širokého spektra klinických příznaků vedoucích k deformaci prožívání a chování pacienta, ke změně vztahu k realitě, osobnostních charakteristik a sociálních vztahů. Klinicky se toto onemocnění projevuje pozitivními příznaky jako jsou halucinace, bludy a dezorganizace myšlení a jednání. U nemocných se velmi často vyskytují také příznaky negativní (afektivní oploštění, alogie, abulie, anhedonie, sociální stažení atd.), postižení kognitivních funkcí (paměť, pozornost a řídicí funkce) a afektivní příznaky (deprese, úzkost, dysforie, mánie). Ve srovnání s antipsychotiky 1. generace jsou v ovlivnění negativních příznaků, kognitivního deficitu a afektivních příznaků účinnější antipsychotika 2. generace. Mnohdy ovšem nelze ani těmito moderními léky dosáhnout dostatečného léčebného účinku se zajištěním plné remise příznaků. Přetrvávání příznaků často znemožňuje plnohodnotné funkční zapojení nemocných do běžného života a zhoršuje prognózu nemoci.

K objasnění příčin rezistence některých příznaků k léčbě antipsychotiky je nutné detailní poznání heterogenních příčin patologických procesů a s nimi spojených variant schizofrenní symptomatiky. V patofyziologii schizofrenie se kromě dopaminergní dysfunkce uplatňuje porucha funkce glutamatergního neurotransmiterového systému spojená s hypofunkcí NMDA receptorů. Svědčí pro to účinky kompetitivních antagonistů NMDA receptoru fencyklidinu a ketaminu způsobujících u zdravých lidí rozvoj příznaků podobných schizofrenii a léčebné účinky některých látek ovlivňujících funkci glutamatergních NMDA receptorů. V klinických studiích jsou u nemocných schizofrenií testovány látky modulující funkci ionotropních a metabotropních glutamatergních receptorů. Využití látek ovlivňujících glutamatergní systém by tak u schizofrenie umožnilo terapeutické ovlivnění nejen pozitivních symptomů, ale i mechanismu zodpovědného za kognitivní deficit a negativní symptomy.

Pro poznání role dysfunkce glutamatergního systému v patogenezi schizofrenie je důležité stanovení biochemických markerů funkční úrovně tohoto systému v CNS. Testování vztahů těchto markerů ke specifickým psychopatologickým dimenzím by mohlo vést ke klinické a laboratorní diferenciaci schizofrenních psychóz. Formulování typologie potenciálně klinicky a biochemicky rozdílných subtypů schizofrenního onemocnění umožní predikci odpovědi na léčbu cílenou na úpravu glutamatergní dysfunkce v CNS.

## 2. Negativní příznaky schizofrenie

Negativní příznaky schizofrenie jsou projevem oslabení nebo ztráty některých psychických funkcí v důsledku chorobného procesu. Mezi negativní příznaky se obvykle řadí snížení šíře a intenzity emočních projevů (afektivní oploštění), snížení plynulosti a produktivity myšlení a řeči (alogie), snížení schopnosti iniciovat cílevědomé jednání (abulie, apatie), neschopnost prožívat radost (anhedonie), psychomotorický útlum, emoční stažení, omezení zájmů, sociální stažení a autismus. Primární negativní příznaky, které se vyskytují již jako prodromy, zvýrazňují se po proběhlé epizodě a přibývají s trváním nemoci, patří k „jádrovým“ příznakům schizofrenie (Libiger, 2002). Mohou být též jako přechodné negativní příznaky jen součástí akutní epizody nemoci. Sekundární negativní příznaky jsou většinou navozené léčbou antipsychotiky 1. generace nebo souvisí s přítomností depresivního syndromu.

Dichotomické rozdělení schizofrenní symptomatiky na pozitivní a negativní příznaky má původ v práci anglického neurologa Johna Hughlinse-Jacksona (1835-1911) (Mohr, 1998; Libiger, 2002). V 80. letech 20. století se Crow snažil vystihnout heterogenitu patologických procesů a s nimi spojených klinických variant návrhem modelu dvou různých forem schizofrenního onemocnění: typu I s pozitivními příznaky a bez zřetelných strukturálních změn v CNS a typu II se zřejmou mozkovou atrofií a negativními příznaky (Crow, 1980). Typ II byl charakterizován nejen snížením objemu tkáně v kortikolimbických oblastech CNS a převažujícími negativními příznaky, ale také přítomností kognitivního deficitu, deteriorací intelektu a nedostatečnou odpovědí na léčbu antipsychotiky (Crow, 1985). Rozdělení schizofrenie na základě přítomnosti syndromu pozitivní nebo negativní symptomatiky navrhla Andreasenová (Andreasen et Olsen, 1982; Andreasen et al. 1990). Na pojetí negativních příznaků jako primární a trvalé charakteristiky schizofrenního onemocnění je založen koncept deficitního syndromu (Carpenter et al. 1988). Mezi diagnostická kritéria pro deficitní syndrom u schizofrenie byl zařazen zúžený afekt, snížený emoční projev, zchudnutí řeči a pokles zvědavosti i zájmu, snížený pocit smyslu a cíle v jednání a snížená sociální aktivita (Carpenter et al. 1988; Libiger, 2002).

V souvislosti s neúčinností antidopaminergních antipsychotik na primární negativní příznaky a s častým rozvojem sekundárních negativních příznaků po léčbě je neurochemický podklad negativní symptomatiky přičítán hypodopaminergnímu stavu zejména v oblasti frontální kůry. Klinické účinky agonistů NMDA receptoru glycinu (Javitt et al. 1994; Heresco-Levy et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1999; Javitt et al. 2001; Heresco-Levy et al.



2004) a D-serinu (Tsai et al. 1998; Heresco-Levy et al. 2005) na negativní příznaky posilují úvahy o významu dysfunkce glutamatergního systému.

## **3. Neurotransmitterový model schizofrenie**

### **3.1. Dopaminová hypotéza**

Nálezy zobrazujících studií ze druhé poloviny 90. let prokazující hyperfunkci dopaminového systému v CNS u nemocných schizofrenií upevnily dominantní postavení dopaminové hypotézy schizofrenie (Hietala et al. 1995; Laruelle et al. 1996; Breier et al. 1997; Dao-Castellana et al. 1997). Tato hypotéza objasňující patofyziologii schizofrenie se soustřeďuje na mechanismus antipsychotických účinků neuroleptik: blokádu dopaminových D<sub>2</sub> receptorů (Matthysse, 1973; Snyder et al. 1974; Carlsson, 1978). Dopaminová hypotéza byla formulována na základě poznání indukce psychózy psychostimulancii (např. d-amfetaminem), která zvyšují centrální dopaminergní neurotransmisi a mohou produkovat pozitivní symptomy schizofrenie jako jsou halucinace, bludy a další poruchy myšlení. Dalším zdrojem hypotézy byla korelace klinické potence neuroleptik s jejich afinitou k D<sub>2</sub> receptorům. Neuroleptika blokují aktivující efekt dopaminu a jeho agonistů na chování a tento účinek je závislý na dávce. Post mortem prováděné studie (Cross et al. 1981) stejně tak jako zobrazující studie prováděné in vivo (Wong et al. 1986; Joyce et al. 1988) poskytují důkazy, že dysfunkce dopaminergní neurotransmise je důležitým patofyziologickým činitelem schizofrenního onemocnění. Dopaminergní hyperfunkce vysvětluje v první řadě patogenezi pozitivních příznaků, dopaminergní hypofunkce v prefrontální kůře může mít podíl na vzniku negativních příznaků (MacKay et al. 1980; Berman et al. 1990). Je však obtížné chápat dysfunkci dopaminergní neurotransmise jako jediný etiologický zdroj spektra klinických příznaků a deteriorujícího průběhu schizofrenie.

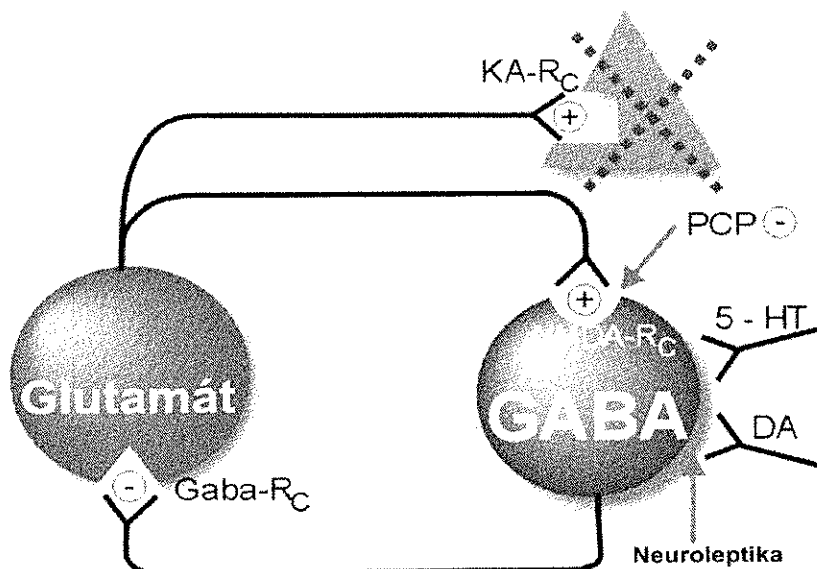
### **3.2. Glutamátová hypotéza**

K formulaci alternativního patofyziologického modelu schizofrenie vedla pozorování klinických účinků nekompetitivního antagonisty NMDA receptoru fencyklidinu. Fencyklidin („andělský prach“, PCP) způsobuje u zdravých lidí rozvoj schizofrenii podobných negativních a pozitivních příznaků (Luby et al. 1959). Spektrum příznaků po podání fencyklidinu zdravým subjektům se pohybuje od stavů deperzonalizace až k hluboké dezorganizaci myšlení. U nemocných schizofrenií dochází po podání fencyklidinu k zintenzivnění poruch myšlení a návratu akutní agitované fáze nemoci, objevuje se hostilita a agresivita (Domino et Luby,

1981). Změna klinického stavu po podání fencyklidinu trvá u nemocných schizofrenií od 4 do 6 týdnů, u zdravých subjektů od 1 do 4 hodin (Gao et al. 1991). Dramatická exacerbace příznaků u nemocných schizofrenií navozená podáním fencyklidinu a výrazně delší doba trvání ve srovnání se zdravými subjekty vedla k předpokladu dysfunkce NMDA receptorů u schizofrenie (Luby et al. 1959). Na základě pozorovaných klinických účinků antagonistů NMDA receptoru a nálezů až 50% snížení koncentrace glutamátu v mozkomíšním moku u nemocných schizofrenií (Kim et al. 1980) byla zformulována glutamátová hypotéza schizofrenie. Předpoklad deficitu glutamatergní funkce a/nebo zvýšení dopaminergní funkce (Kim et al. 1980) vedl k teorii dopaminergní inhibice glutamatergního přenosu.

Psychotogenní účinek antagonistů NMDA receptoru fencyklidinu a ketaminu (Javitt et Zukin, 1991; Krystal et al. 1994; Malhotra et al. 1996; Micallef et al. 2003; Krystal et al. 2005) je dáván do souvislosti s ovlivněním funkce NMDA receptorů lokalizovaných na GABAergních interneuronech v kortikálních a limbických oblastech CNS (Olney et al. 1993; Olney et Farber, 1994). Hypofunkce NMDA receptorů vede k redukcí glutamatergní aktivace inhibičních GABAergních interneuronů. Snížený GABAergní tonus pak dezinhibuje nejen monoaminergní neurotransmisi, ale také kortikolimbické glutamatergní eferentní neurony (obr. 1). Důsledkem je nadměrná stimulace glutamatergních non-NMDA receptorů na postsynaptických neuronech (Olney et al. 1993; Olney et Farber, 1994). Nadměrné vyplavování glutamátu a přetrvávající aktivace non-NMDA receptorů může vést

**Obrázek 1:** Schematická prezentace hypotézy dysfunkční glutamatergní kortikolimbické neurotransmise u schizofrenie (DA, dopamin; 5-HT, serotonin; GABA, GABAergní interneuron; Gaba-R<sub>C</sub>, GABA receptor; Glutamát, glutamatergní neuron; KA-R<sub>C</sub>, non-NMDA kainátový receptor; NMDA-R<sub>C</sub>, NMDA receptor; PCP, fencyklidin).



ke zvýšení vtoku sodíkových a vápníkových kationtů do postsynaptických neuronů s následným neurotoxickým účinkem, excitotoxickou neuronální smrtí a z toho vyplývajícími neurodegenerativními změnami. Přetrvávající aktivace non-NMDA glutamatergních receptorů tedy může produkovat zpožděnou degeneraci neuronů s cytopatologickými vlastnostmi apoptózy. Systémové podávání fencyklidinu a odvozených nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů způsobuje opožděnou neuronální degeneraci v kortikálních a limbických oblastech CNS (*Olney et al. 1989; Olney et Farber, 1994*). Z tohoto modelu vyplývá, že hypofunkce kortikolimbických GABAergních interneuronů by mohla zvyšovat excitabilitu glutamatergních eferentních neuronů vycházejících z těchto oblastí. Za normálních okolností jsou totiž tyto neurony GABAergními interneurony inhibovány. Důsledkem dezinhibice je snížená schopnost ovlivněné kortikální oblasti filtrovat přicházející informační excitační vstupy umožňující přístup irelevantních informací. Místní poškození inhibiční regulace aferentní a eferentní excitační neurotransmise by mohlo zodpovídat za takové příznaky schizofrenie jako jsou halucinace, bludy a další poruchy myšlení (*Olney et Farber, 1995*).

## **4. Glutamatergní neurotransmiterový systém**

Hlavními neuromediátorovými aminokyselinami v CNS jsou kyselina glutamová, kyselina asparagová, glycin a kyselina gama-aminomáselná (GABA, kyselina 4-aminomáselná). Ve většině oblastí CNS je excitační neuronální transmise zprostředkována solemi endogenních excitačních aminokyselin – glutamátem a aspartátem. Neurony obsahující excitační aminokyseliny hrají důležitou roli v neuropsychologických funkcích jako je učení a paměť. Ze systému excitačních aminokyselin v CNS je zatím nejlépe charakterizován glutamatergní systém.

### **4.1. Struktura glutamatergního systému v CNS**

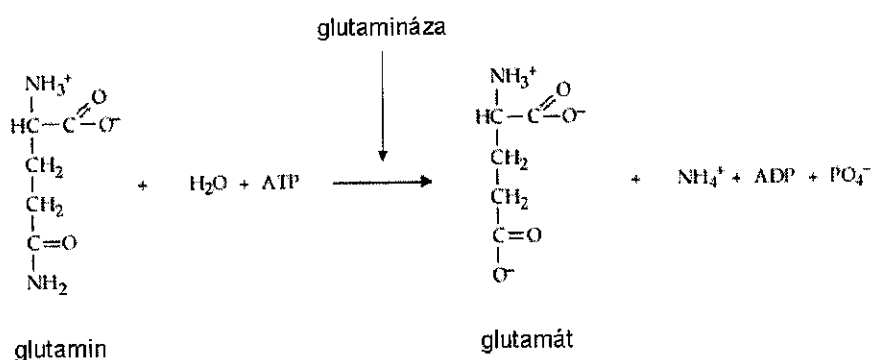
V CNS jsou glutamatergní dráhy organizovány do dvou hlavních systémů. Dráhy descendentního systému vedou z kůry mozkové do subkortikálních struktur, zejména bazálních ganglií, thalamu, pontu, mozkového kmene a míchy. Prostřednictvím těchto glutamatergních neuronů je zajišťována descendentní kontrola subkortikálních struktur (*Greenamyre et Porter, 1994*). Antagonistický efekt má ascendentní dopaminový systém. Glutamatergní neurony sestupného (kortiko-subkortikálního, limbického) systému antagonizují aktivační účinky dopaminergních mezokortikálních drah. Axony ascendentního glutamatergního neuronálního systému vycházející z hipokampu vedou k bazálním gangliím

a cingulu. Ostatní glutamatergní dráhy jsou široce distribuované ve všech částech kůry mozkové i v limbické kůře (dlouhé intrakortikální dráhy - kortikokortikální projekce). Velká hustota glutamatergních drah je také uvnitř hipokampální formace, glutamatergní jsou neurony v nucleus subthalamicus, hlavní dráhy vstupující do mozečku, vlákna vycházející z oliva inferior a pontinních jader. V mozečku jsou glutamatergní jen excitační neurony v mozečkové kůře a mozečkové granulární buňky. Glutamát je také jedním z neurotransmiterů primárních sensorických vláken (*Greenamyre et Porter, 1994*).

## 4.2. Glutamát

L-glutamát je všeobecně chápán jako hlavní rychle působící excitační neuropřenašeč na synapsích CNS obratlovců. Pre- a postsynaptické glutamátové receptory zprostředkující rychlou excitační neurotransmisi byly nalezeny na neuronech ve všech částech CNS (*Greenamyre et Porter, 1994; Bunney et al. 1995*). Glutamát se podílí na zprostředkování synaptické plasticity včetně dlouhodobé potenciace („long-term potentiation“, LTP) a dlouhodobé deprese („long-term depression“, LTD) a hraje tak důležitou roli v učení a paměti (*Tamminga, 1998*). Úloha glutamátu je také zmiňována v souvislosti s excitotoxickým mozkovým poškozením (*Whetsell et Shapira, 1993*).

Obrázek 2: Syntéza glutamátu



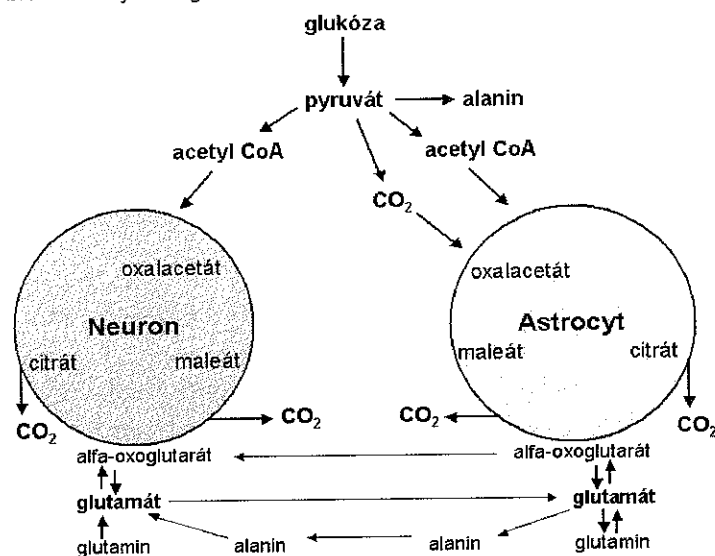
### 4.2.1. Syntéza glutamátu v CNS

Glutamát, sůl kyseliny glutamové, je stavebním kamenem při syntéze proteinů. Pokud je v CNS využíván jako neurotransmiter, je konvertován z glutaminu. Glutamin je v neuronech přeměňován na glutamát pomocí mitochondriálního enzymu glutaminázy (obr. 2). Pak je glutamát skladován v synaptických vezikulech pro pozdější uvolňování během neurotransmise. Značná část glutamátu uvolněného do synaptické štěrbině

je vychytávána gliovými buňkami přiléhajícími k neuronu. Gliové buňky a neurony mají velmi těsné strukturální a metabolické vazby. V případě glutamátových neuronů mohou sousední glie poskytovat glutamin jako prekurzor pro přeměnu na neurotransmitter glutamát. Toho je dosaženo nejprve převedením glutamátu na glutamin v gliové buňce za pomoci enzymu glutaminsyntetázy. Glutamin je pak transportován do neuronu ke konverzi na glutamát (nebo GABA) a ten použit jako neurotransmitter. Synaptické vezikuly aktivně kumulují glutamát procesem závislým na  $Mg^{2+}$  a ATP.

Glutamát se nachází v CNS stejně jako aspartát ve vysokých koncentracích a uvolňuje se při elektrické stimulaci v závislosti na vstupu  $Ca^{2+}$  do buňky. Glutamát neprostupuje hematoencefalickou bariérou (HEB) a je v CNS syntetizován z glukózy a dalších prekurzorů. Enzymy pro jeho metabolismus se nacházejí v neuronech a gliových buňkách. Pyruvát (jako produkt glykolýzy za anaerobních podmínek) je přeměněn na acetyl-koenzym A, ten vstupuje do Krebsova citrátového cyklu, jehož meziprodukty 2-oxoglutarát (alfa - oxoglutarát) a oxalacetát jsou užívány pro biosyntézu aminokyselin, zvláště kyseliny glutamové a asparagové (obr. 3).

Obrázek 3: Syntéza glutamátu.

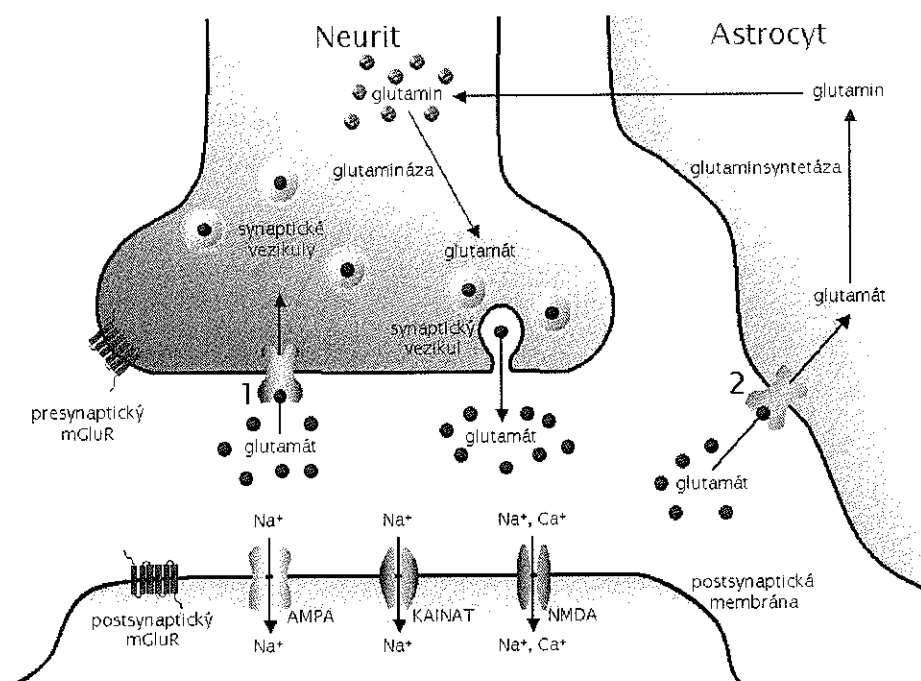


#### 4.2.2. Transport glutamátu v CNS

Glutamát nemůže vzhledem k svému náboji difundovat přes buněčnou membránu. Účinek glutamátu není ukončován jeho enzymatickým rozkladem jako u jiných neurotransmitterů. Na nervových zakončeních a gliových buňkách se vyskytuje vysokoafinitní transportní systém. Ze synaptické štěrby je glutamát odstraňován dvěma transportními pumpami, tzv. glutamátovými transportéry (obr. 4). Presynaptický glutamátový transportér funguje

podobně jako všechny další neurotransmitterové transportéry např. u aminových neurotransmitterových systémů (dopamin, serotonin, cholin). Druhým typem je transportní pumpa lokalizovaná na sousední gliové buňce. Existují však přinejmenším 3 druhy těchto transportérů či přenašečů: glutamátový přenašeč, glutamát-aspartátový přenašeč a přenašeč excitačních aminokyselin. První dva jsou zřejmě primárními přenašeči glutamátu a aspartátu do glií, třetí hlavně do neuronů.

Obrázek 4: Glutamátové transportéry (1 - presynaptický glutamátový transportér, 2 - glutamátový transportér lokalizovaný na gliové buňce).



### 4.3. Glutamátové receptory

Excitační aminokyseliny, v první řadě L-glutamát, L-aspartát a příbuzné deriváty, účinkují vazbou na receptory, které jsou lokalizovány na neuronech ve všech částech CNS. Existuje přes 20 různých zástupců skupiny glutamátových receptorů ve 2 hlavních skupinách - receptorů ionotropních a metabotropních (tab. 1). Iontropní receptory kontrolují iontové kanály permeabilní pro kationty. Otevření těchto kanálů umožňuje tok sodíkových a vápníkových iontů do intracelulárního prostoru. Vazba glutamátu na ionotropní receptor vede k aktivaci iontového kanálu a jeho otevření. Metabotropní receptory jsou spojeny s G proteinem. Vazba glutamátu na metabotropní receptor vyvolává účinek nepřímo prostřednictvím aktivace G proteinu, který moduluje aktivitu vnitrobuněčných posílů - aktivuje fosfolipázu C nebo inhibuje adenylátcyklázu. Důsledkem aktivace tohoto typu receptorů mohou být jak neuroprotektivní, tak neurotoxické účinky. Metabotropní receptory

zprostředkovávají dlouhotrvající elektrické změny v CNS, tzv. dlouhodobou potenciací (LTP), která hraje důležitou roli při procesu učení (Greenamyre et Porter, 1994; Bunney et al. 1995).

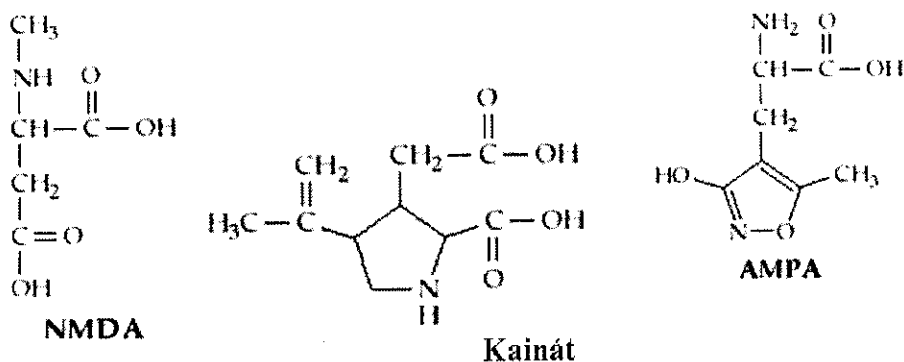
**Tabulka 1:** Podjednotky jednotlivých typů glutamátových receptorů (NMDA, N-methyl-D-aspartát; AMPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina).

Iontropní receptory			Metabotropní receptory		
NMDA	AMPA	Kainát	Skupina I.	Skupina II.	Skupina III.
NR 1	Glu R1	Glu R5	mGlu R1	mGlu R2	mGlu R4
NR 2A	Glu R2	Glu R6	mGlu R5	mGlu R3	mGlu R6
NR 2B	Glu R3	Glu R7			mGlu R7
NR 2C	Glu R4	KA 1			mGlu R8
NR 2D		KA 2			
NR 3A					
NR 3B					

#### 4.3.1. Iontropní glutamátové receptory

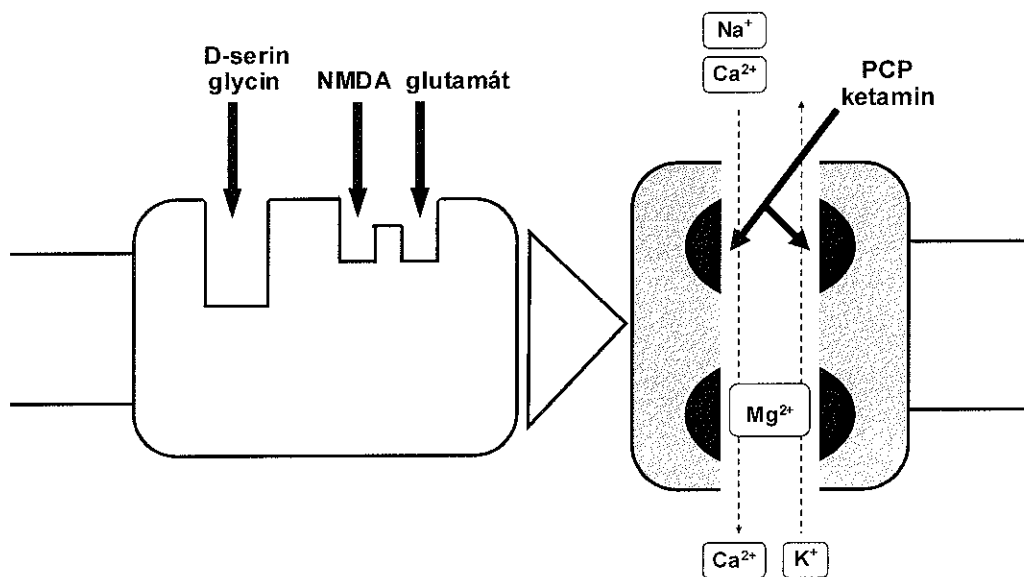
Funkční ionotropní receptory tvoří bílkovinné podjednotky, které byly charakterizovány biofyzikálně a farmakologicky (tab. 1). Genová exprese jednotlivých podjednotek v různých neuronech CNS je řízena ontogenetickými a fylogenetickými vlivy. Funkční i farmakologické vlastnosti glutamátergních receptorů spojených s iontovým kanálem jsou rozdílné v důsledku odlišného podjednotkového složení. Existuje několik typů těchto glutamátem aktivovaných komplexů receptor-iontový kanál. Na základě farmakologických a elektrofyziologických studií byly charakterizovány 3 třídy ionotropních glutamátových receptorů. Jsou pojmenovány po ligandech (agonistech), které se na ně selektivně váží (obr. 5).

**Obrázek 5:** Ligandy ionotropních receptorů (NMDA, N-methyl-D-aspartát; AMPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina)



Ligandem NMDA receptorů je N-methyl-D-aspartát (NMDA). Podjednotky NMDA receptorů jsou kódovány sedmi geny označovanými NR1, NR2A - NR2D, NR3A a NR3B. Jak farmakologické vlastnosti (afinita k agonistům glutamátu a glycinu), tak biofyzikální vlastnosti (vodivost a průměrná doba otevření jednotlivých iontových kanálů) jsou ovlivněny podjednotkovým složením NMDA receptorů. Třída AMPA receptorů se skládá ze čtyř podjednotek (GluR1-4) a vykazuje vysokou afinitu k alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionátu, derivátu propionové kyseliny (AMPA). Podjednotky AMPA receptorů jsou kódovány geny označovanými GluR1 - GluR4 a kombinace podjednotek vytváří funkční receptor-iontový kanál. Třída AMPA receptorů je velmi různorodá a široce distribuovaná v CNS. Zajišťuje po většinu času velký podíl glutamátergního přenosu. Skupina kainátových receptorů se sestává ze dvou druhů selektivních podjednotek (GluR5-7 a KA 1-2). Jsou kódovány též více geny označovanými GluR5-GluR7, KA1 a KA2 (*Henderson et al. 1990; Greenamyre et Porter, 1994; Bunney et al. 1995*).

Obrázek 6: NMDA receptor-model (NMDA, N-methyl-D-aspartát; PCP, fencyklidin).



V současnosti je nejlépe zmapovaným podtypem receptorů excitačních aminokyselin NMDA receptor (obr. 6). Jedná se vlastně o komplex receptoru a rychlého excitačního kalciového kanálu, jehož propustnost pro ionty závisí na vazbě ligandů na receptor. Četná vazebná místa fungující jako modulátory jsou lokalizována uvnitř a okolo komplexu receptoru a iontového kanálu. Pro otevření iontového kanálu je nutná současná aktivace dvou základních typů vazebných míst: primární vazebné místo váže NMDA, glutamát nebo aspartát (tzv. glutamátové nebo NMDA vazebné místo) a tzv. glycinové modulační místo váže



koagonisty glycin nebo D-serin. Další vazebná místa váží polyaminy a  $Zn^{2+}$ . Na napětí závislé modulační místo lokalizované uvnitř nebo blízko iontového kanálu váže hořčíkový kationt, který může tento kalciový kanál blokovat. Další inhibiční modulační místo lokalizované uvnitř iontového kanálu je někdy nazýváno "PCP místem", protože se na toto místo váže fencyklidin (PCP). Na stejném vazebném místě se váží i další nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru, ketamin a MK-801 (dizocilpin) (*Domino et Luby, 1981; Javitt et Zukin, 1991; Greenamyre et Porter, 1994*).

Během rychlého excitačního přenosu jsou presynapticky uvolněným glutamátem aktivovány současně jak NMDA, tak AMPA a kainátové receptory, což vede k depolarizaci a vzniku impulzní aktivity v postsynaptickém neuronu. Komponenta excitačního postsynaptického proudu, která vzniká aktivací AMPA a kainátových receptorů, trvá zpravidla několik milisekund, zatímco komponenta vzniklá aktivací NMDA receptorů trvá desítky až stovky milisekund. Vlastnosti iontových kanálů aktivovaných glutamátem mohou být ovlivněny řadou faktorů. Amplituda a doba trvání excitačních postsynaptických proudů na glutamátergických synapsích je u různých neuronů odlišná. Iontové kanály jsou po aktivaci glutamátem propustné pro  $Ca^{2+}$ . Důsledkem zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  v postsynaptickém neuronu je řada enzymaticky řízených reakcí vedoucích k dlouhodobým změnám excitability a vzniku paměťových stop. Za patologických stavů, jako je např. ischemie nebo hypoglykémie, může vlivem zvýšené koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$  docházet k poškození nervových buněk, které může vést až k jejich zániku.

Ionotropní NMDA a non-NMDA receptory jsou přítomny na většině neuronů v CNS, včetně neuronů dopaminergních. Expres NMDA receptorových podjednotek byla prokázána ve všech oblastech CNS. Vyšší hustota NMDA receptorů je v limbickém systému, zejména v hipokampu. NR1 podjednotka je výrazně exprimována ve většině neuronů CNS, zatímco NR2 podjednotka vykazuje v dospělém mozku jednoznačně temporální lokalizaci. Kainátové a AMPA receptory jsou z největší části lokalizovány v telencefalu, ovšem každá skupina v odlišných oblastech (*Greenamyre et Porter, 1994; Bunney et al. 1995*). Celkově je distribuce AMPA receptorů podobná distribuci NMDA receptorů, což je v souladu s funkčním propojením těchto dvou receptorových skupin.

### 4.3.2 Metabotropní glutamátové receptory

Na rozdíl od ionotropních receptorů, které jsou přímo spojeny se specifickými iontovými kanály a zprostředkovávají rychlý excitační přenos, metabotropní receptory jsou spojeny

s přenosem signálu cestou proteinů vázících guaninový nukleotid, tzv. G proteinů. Následné změny sekundárních posílů generují v porovnání s ionotropními receptory pomalejší synaptický přenos. Velká dostupnost glutamátu jako neurotransmiteru v kombinaci s velmi rozšířenou distribucí metabotropních receptorů je podstatou tohoto hlavního modulačního systému sekundárních posílů v CNS (*Schoepp et Conn, 1993*).

Zatím bylo izolováno osm cDNA klonů metabotropních receptorů, které jsou označovány mGluR1-mGluR8 (tab. 1). Skupina metabotropních receptorů bývá rozdělena do 3 podskupin podle sekvenčních podobností, vlastností spojených s přenosem signálu a farmakologického profilu. Receptory první skupiny jsou spojeny s hydrolýzou fosfatidylinositolu (mGluR1, R5). Receptor mGluR1 také stimuluje syntézu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a vyplavování arachidonové kyseliny se selektivním agonistickým účinkem. Receptory druhé skupiny jsou spojeny s inhibicí adenylátcyklázy (mGluR2, R3). Receptory třetí skupiny inhibují hromadění cAMP, ale vykazují také selektivní agonistickou aktivitu (mGluR4, R6, R7, R8).

Metabotropní receptory jsou jako skupina široce exprimovány ve všech oblastech CNS. Lokalizace jednotlivých skupin i podtypů jsou odlišné, ale v některých oblastech se překrývají. Přesná receptorová segregace svědčí pro velmi důležitou funkčně specializační roli jednotlivých receptorových podjednotek. Lokalizace je převážně postsynaptická, mGluR2 podtyp je také zřejmě lokalizován jako presynaptický receptor kortikostriatální glutamatergní dráhy (*Schoepp et Conn, 1993*).

## 5. Látky ovlivňující glutamatergní systém

Ne všechny látky působící specificky agonisticky nebo antagonisticky na ionotropní nebo metabotropní glutamátové receptory (tab. 2) jsou testovány s perspektivou klinického využití. V klinických studiích byly prokázány léčebné účinky glycinu (*Javitt et al. 1994; Heresco-Levy et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1999; Javitt et al. 2001; Heresco-Levy et al. 2004; Heresco-Levy et Javitt, 2004*), D-serinu (*Tsai et al. 1998; Heresco-Levy et al. 2005*) a D-cykloserinu (*Goff et al. 1995; Goff et al. 1996; Goff et al. 1999; Heresco-Levy et al. 1998; Heresco-Levy et al. 2002; Evins et al. 2002*), látek agonisticky působících na glycinovém modulačním místě glutamatergního NMDA receptoru, na schizofrenní symptomatiku. Testovány jsou také klinické účinky látek regulujících extracelulární hladiny agonistů NMDA receptoru v CNS (inhibitory transportu glycinu a D-serinu) a látek ovlivňujících funkci AMPA receptoru, tzv. ampakinů. Podávání ampakinu CX516

při augmentaci terapie antipsychotiky u nemocných schizofrenií vedlo k významnému zlepšení kognitivních funkcí (Goff et al. 2001). Antagonista glutamátergních AMPA a kainátových receptorů topiramát při augmentaci léčby antipsychotiky psychotické příznaky u nemocných se schizofrenií nezlepšoval (Dursun et Deakin, 2001).

**Tabulka 2:** Látky ovlivňující glutamátové receptory (AMPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina; NMDA, N-methyl-D-aspartát; L-CCG-IV, (2S, 3R, 4S)-alfa(karboxycyklopropyl)glycin; D-AP5, D-2-amino-5-fosfo-pentanová kyselina; D-AP7, D-2-amino-7-fosfo-pentanová kyselina; ACBD, 1-aminocyklobutan-1,3-dikarboxylát; CGS19755, cis-4-(fosfomethyl)piperidin-2-karboxylová kyselina; CGP37849, D,L-(E)-2-amino-4-methyl-5-fosfo-3-pentenová kyselina; CPP, 3-(-2-karboxypiperazin-4-yl)propyl-1-fosfonová kyselina; CPPene, (E)-4-(3-fosfo-2-propenyl)piperazin-2-karboxylová kyselina; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxalin -2,3-dion; DNQX, 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion; MNQX, 5,7-dinitroquinoxalin -2,3-dion; NBQX, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxalin; L689,560,4-trans-2-karboxy-5,7-dichloro-4-fenylaminokarbonyl-amino-1,2,3,4-tetrahydroquinolin; ATPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-tertbutyl-4-isoxazol-propio-nát; HA966,3-amino-1-hydroxypyrolidin-2-on; Br-HIBO,(S)-4-bromohomoibotenát; Aniracetam, 1-(-4-methoxybenzoyl)-2-pyrolidinon; 1-BCP, 1-(1,3 benzodioxol-5-ylkarbonyl)-piperidin; GYKI 52466, 1-(4-aminofenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin; trans-ACPD, 1-aminocyklopentan-trans-1,3-dikarboxylová kyselina; L-CCG-I, (2S, 3S, 4S)-alfa(karboxycyklopropyl)glycin; L-AP-4, L-2-amino-4-fosfobutyrová kyselina; trans-2,4-ADA, trans-azetidín-2,4-dikarboxylová kyselina; L-AP-3, L-2-amino-4-fosfopropionová kyselina; (+)-MCPG, (+)-alfa-methyl-4-karboxyfenylglycin; (S)-4CPG, (S)-4-karboxyfenylglycin).

Typy receptorů	Agonisté		Antagonisté	
	Kompetitivní	Modulační	Kompetitivní	Modulační
NMDA	NMDA	glycin; D-serin	D-AP5; D-AP7	7-chlorokynurenát
	L-CCG-IV	D-cykloserin	CGS19755	5,7-dichlorokynurenát
AMPA	ACBD		CGP37849	MNQX
			D-CPP	L689,560
Kainát			D-CPPene	HA966
			<u>Blokátory iontového kanálu</u>	
Metabotropní			MK-801 (dizocilpin)	
			PCP (fencyklidin)	
AMPA	AMPA	Aniracetam	NBQX	GYKI 52466
	ATPA	1-BCP	CNQX	
Kainát	Br-HIBO	Cyklothiazid	DNQX	
	5-fluorowillardiin			
Metabotropní			<u>Kompetitivní</u>	
			NBQX, CNQX, DNQX	
Metabotropní	trans-ACPD; Ibotenát		L-AP3	
	L-CCG-I; L-AP4		(+)-MCPG	
Metabotropní	3,5-dihydroxyfenylglycin		(S)-4CPG	
	trans-2,4-ADA			

Kompetitivní antagonisté NMDA receptoru fencyklidin, ketamin a dizocilpin nejsou jediné látky snižující funkci glutamátergního neurotransmiterového systému. Vyplavování glutamátu může být inhibováno látkami blokujícími sodíkové a vápníkové kanály, látkami snižujícími hladinu draslíku, toxiny, které brání fúzi vezikulů s presynaptickou membránou, a agonisty

presynaptických glutamátergních metabotropních receptorů. Antiepileptikum III. generace lamotrigin (3,5-diamino-6-[2,3-dichlorofenyl]-1,2,4-triazin) snižuje uvolňování glutamátu a aspartátu stabilizací presynaptické membrány prostřednictvím inhibice a blokády presynaptických sodíkových kanálů závislých na úrovni depolarizačního napětí. Lamotrigin má stabilizační účinek na membrány neuronů také inhibicí a blokádu na napětí závislých vápníkových kanálů a účinkem na draslíkové kanály. Látky jako lamotrigin, které snižují vyplavování glutamátu, mohou redukovat hyperglutamátergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů navozené jejich antagonisty ketaminem či fencyklidinem. V klinických studiích lamotrigin významně snižoval intenzitu pozitivních a negativních příznaků i kognitivního deficitu navozených psychotomimetickým účinkem ketaminu u zdravých jedinců (*Anand et al. 2000*) i psychotické symptomy v augmentaci léčby antipsychotiky u nemocných rezistentní schizofrenií (*Dursun et Deakin, 2001; Tiihonen et al. 2003; Kremer et al. 2004*). Účinek lamotriginu je vysvětlován presynaptickým snížením vyplavování glutamátu a následným snížením aktivace postsynaptických non-NMDA receptorů v kortikálních oblastech.

## 5.1. Agonisté NMDA receptoru

Nejvýznamnějším předpokladem vyplývajícím z hypotézy glutamátergní hypofunkce jako patofyziologické komponenty schizofrenie je možné terapeutické využití látek ovlivňujících glutamátergní systém. Látky, které zvyšují aktivaci NMDA receptorů, by tak mohly redukovat intenzitu klinické schizofrenní symptomatiky. Na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru působí jako plní selektivní koagonisté glycin a D-serin (*Mothet et al. 2006; Scolari et al. 2007*) a jako parciální agonista D-cykloserin (*Henderson et al. 1990; Watson et al. 1990; Emmett et al. 1991*).

D-cykloserin, antibiotikum s tuberkulostatickým účinkem, který prochází přes HEB (*Iwainky 1988; Wlaz et al. 1994*), zlepšoval v klinických studiích při augmentaci léčby antipsychotiky negativní příznaky (*Goff et al. 1995; Heresco-Levy et al. 1998; Goff et al. 1999; Evins et al. 2002; Heresco-Levy et al. 2002*) a výkon v kognitivních testech (*Goff et al. 1995*). Ve studii Cascelly způsobovala denní dávka 250 mg D-cykloserinu u pacientů se schizofrenií zhoršení stavu (*Cascella et al. 1994*). Ovšem ani u dávky 50 mg p.d. neprokázal Goff v 6 měsíční studii vyšší terapeutický účinek D-cykloserinu na negativní a kognitivní symptomatiku ve srovnání s placebem u nemocných s výraznou negativní symptomatikou léčených klasickými antipsychotiky (*Goff et al. 2005*). Nižší účinnost nebo neúčinnost parciálního agonisty může být ovlivněna nižší relativní afinitou ke glycinovému

modulačnímu místu NMDA receptoru na rozdíl od vysoké afinity plných agonistů glycinu a D-serinu. Tuto možnost potvrzuje retrospektivní srovnání účinnosti D-cykloserinu a glycinu u souborů nemocných s přetrvávající negativní symptomatikou, kteří se zúčastnili dvojité slepých studií účinnosti jednotlivých agonistů při augmentaci terapie antipsychotiky. Glycin byl ve srovnání s D-cykloserinem v ovlivnění negativních příznaků účinnější (*Heresco-Levy et Javitt, 2004*).

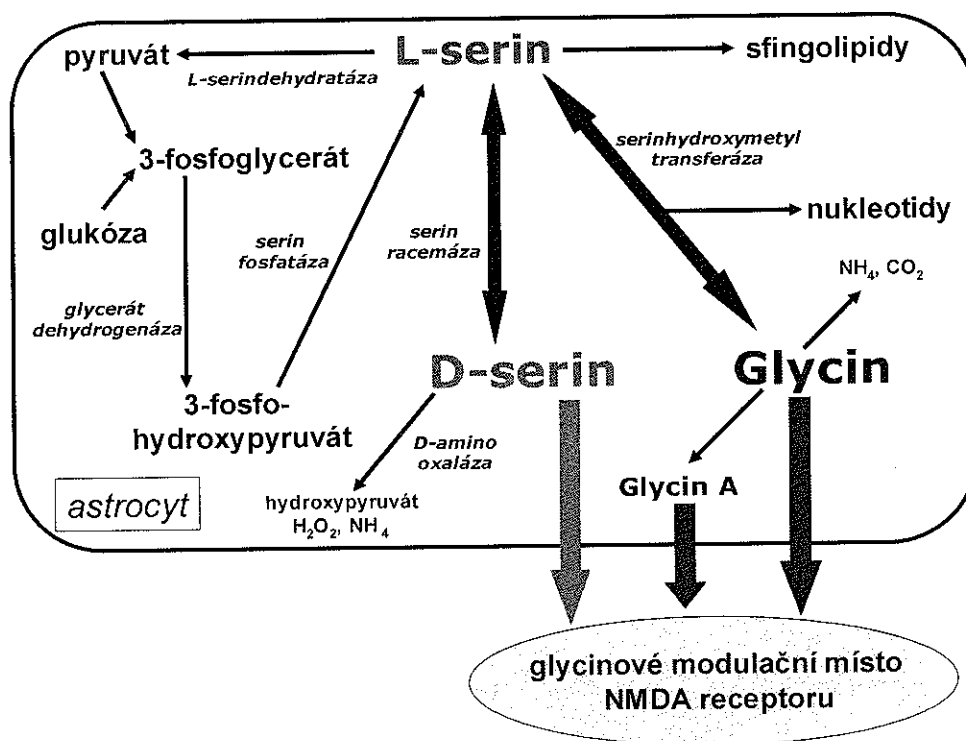
Glycin a D-serin jsou syntetizovány v astrocytech a vyplavovány do synaptické štěrbiny. Astrocyty tak jako dynamické elementy ovlivňují synaptickou transmissi a synaptogenezi. Oba koagonisté svým účinkem na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru za fyziologických podmínek modulují glutamátergní neurotransmissi a jejím prostřednictvím také dlouhodobou potenciaci (LTP) (*Scolari et al. 2007*). LTP je dlouhodobé ovlivnění synaptické plasticity, které se v rámci glutamátergní neurotransmise projevuje jako přetrvávání zvýšené efektivity synaptického přenosu. Dochází tak nejen ke zvýšení permeability iontových kanálů spojených s NMDA a AMPA receptory, ale také ke zvýšení počtu těchto receptorů. Na LTP se podílejí také metabotropní glutamátové receptory (mGluR), kainátové receptory LTP spouští. Jednou z hlavních oblastí, kde se D-serin prostřednictvím modulace aktivity NMDA receptorů a LTP podílí na indukci synaptické plasticity je hipokampus. Protože podání D-aminooxidázy (DAAO) inhibuje LTP, D-serin se zřejmě v této oblasti ve srovnání s glycinem jako endogenní koagonista podílí vyšší měrou na modulaci funkce NMDA receptorů. V tomto kontextu bylo prokázáno, že deficit LTP není spojen s nízkými hladinami glycinu a D-serin tak pravděpodobně funguje jako hlavní modulátor na glycinovém místě NMDA receptoru (*Mothet et al. 2006*). Synaptické koncentrace D-serinu a glycinu se zatím nepodařilo stanovit (*Wolosker et al. 2002*). K aktivaci NMDA receptoru, otevření iontového kanálu pro sodíkové a vápníkové ionty a následné depolarizaci postsynaptického neuronu vede vazba D-serinu nebo glycinu na glycinové místo současně s vazbou glutamátu na primární vazebné místo NMDA receptoru. Vazebná potence D-serinu pro aktivaci všech podjednotek NMDA receptoru je ve srovnání s glycinem třikrát vyšší, zvláště při určité kombinaci NR1 a NR2 jednotky (*Matsui et al. 1995*). V porovnání s glycinem byla u D-serinu také prokázána až stokrát vyšší funkční účinnost v potenciaci spontánní synaptické aktivity v motoneuronech nervus hypoglossus zprostředkované NMDA receptorem (*Wolosker et al., 2002*). Tyto nálezy nasvědčují tomu, že je D-serin efektivnější při aktivaci kanálu spojeného s NMDA receptorem. Je pravděpodobné, že je to zejména v souvislosti s rozdílným metabolismem a mechanismy transportu. Transportní systémy D-serinu jsou nízkoafinitní (*Schell et al. 2004*). V porovnání

s glycinem a dalšími typickými neurotransmitery tak může D-serin zůstat déle v extracelulárním prostoru a v oblasti synapse tak delší dobu ovlivňovat postsynaptické receptory.

### 5.1.1. Syntéza, metabolismus a transport D-serinu

D-serin je v CNS syntetizován výlučně v cytosolové matrix astrocytů šedé hmoty mozkové (Schell et al. 1995; Schell et al. 1997; Wolosker et al. 1999). Imunohistochemickými metodami bylo prokázáno, že D-serin obsahují především astrocyty předního mozku, které jsou lokalizovány velmi blízko synapsí obsahujících NMDA receptory (Schell et al. 2004). Endogenní D-serin je v CNS tvořen sekvenční konverzí z L-serinu za účasti enzymu D-serinracemázy závislé na pyridoxal-5'-fosfátu (B6) (obr. 7) (Wolosker et al. 1999; Schell et al. 2004). Pyridoxal-5'-fosfát je hlavní gliální kofaktor, který stimuluje aktivitu serinracemázy. Distribuce serinracemázy je v CNS velmi podobná distribuci D-serinu, nejvyšší výskyt byl prokázán v předním mozku (Martineau et al. 2006; Scolari et al. 2007).

Obrázek 7: Metabolismus D-serinu a glycinu v astrocytu - schéma.

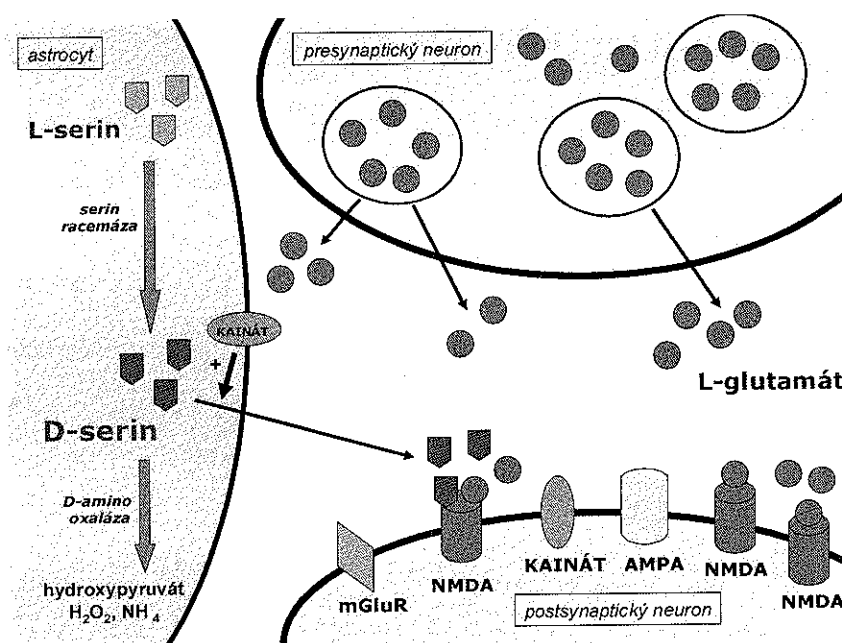


Aktivita serinracemázy je regulována zejména  $\text{Ca}^{2+}$  (Cook et al. 2002),  $\text{Mg}^{2+}$  a ATP (De Miranda et al. 2002), které jako fyziologické kofaktory zvyšují její aktivitu a tím i syntézu D-serinu (Martineau et al. 2006). K výraznému zvýšení syntézy D-serinu vede

také interakce serinracemázy a tzv. proteinu GRIP („glutamate receptor interacting protein“). GRIP slouží jako proteinová konstrukce pro AMPA receptory. Aktivace AMPA receptoru vede k fosforylaci receptoru a následné disociaci AMPA receptoru od tohoto proteinu. Vazba GRIP a serinracemázy indukují její aktivitu. Takto vede také aktivace AMPA receptoru ke zvýšení syntézy D-serinu (Kim et al. 2005). Aktivitu serinracemázy inhibuje glycin (Martineau et al. 2006) a oxid dusný (NO), aktivovat serinracemázu indukcí denitrosylace může D-serin (Shoji et al. 2006). V regulaci aktivity serinracemázy a tedy i syntézy D-serinu hrají roli i některé metabolity L-asparťové kyseliny (Dunlop et al. 2005).

Koncentrace D-serinu na synapsi je ovlivněna hlavně jeho syntézou související s aktivitou serinracemázy (Wolosker et al. 2002) a difúzí (Schell et al. 2004). Nebyly zatím přesně popsány mechanismy regulující vyplavování D-serinu z astrocytů do extracelulárního prostoru (Martineau et al. 2006). D-serin kumulovaný v astrocytech je pravděpodobně vyplavován v závislosti na aktivaci non-NMDA receptorů (Wolosker et al. 2002), které exprimují astrocyty typu 2 (obr. 8). Vazba agonistů non-NMDA receptorů kainátu nebo AMPA vede ke vtoku  $\text{Na}^+$  do astrocytů a následné aktivaci na  $\text{Na}^+$  závislých transportérů

Obrázek 8: Vyplavování D-serinu z astrocytu do synaptické štěrby - schéma.



aminokyselin, které transportují D-serin z astrocytů do extracelulárního prostoru (Schell et al., 2004). Kromě aktivace non-NMDA receptorů by se na vyplavování D-serinu mohly podílet i samotné gliové buňky prostřednictvím na  $\text{Ca}^{2+}$  závislé exocytózy (Martineau et al. 2006). Byl již také popsán mechanismus závislý na  $\text{Ca}^{2+}$ , který transportuje D-serin z astrocytů

po aktivaci nejen AMPA a kainátových receptorů, ale také po aktivaci metabotropních receptorů (*Mothet et al. 2005*). Kinetika transportu D-serinu je podobná tzv. ASCT typu transportéru neutrálních aminokyselin (ASCT, alanin-serin-cystein transportér). Vyplavování D-serinu může potencovat také extracelulární L-serin (*Schell et al. 2004*), nejčastěji je D-serin transportován na  $\text{Na}^+$  závislým protitransportem s L-serinem. L-serin je účinnější než kainát, který aktivací non-NMDA receptorů indukuje vyplavování D-serinu (*Ribeiro et al. 2002*). Primárním zdrojem D-serinu v CNS jsou astrocyty, ale D-serin vyplavují transportním mechanismem nezávislým na  $\text{Ca}^{2+}$  po stimulaci NMDA receptorů také některé neurony (*Kartvelishvily et al. 2006*).

Ze synaptické štěrbině může být D-serin odstraněn transportními proteiny exprimovanými v membránách neuronů a glií (*Wolosker et al. 2002*). Astrocyty exprimují na  $\text{Na}^+$  závislý transportér aminokyselin, který má nízkou afinitu a specificitu pro D- i L-serin. Podle kinetiky vychytávání je ale pravděpodobné, že extracelulární D- a L-serin mohou být vychytávány pomocí transportního systému podobnému ASCT typu transportéru (*Hayashi et al. 1997*). V kortikálních astrocytech byl prokázán dvousměrný transport D-serinu transportním systémem neutrálních aminokyselin nezávislým na  $\text{Na}^+$  (Asc-1), který má k D- a L-serinu vysokou afinitu (*Wolosker et al. 2002*). Asc-1 byl lokalizován také na presynaptických zakončeních, dendritech a tělech neuronů (*Matsuo et al. 2004*).

Koncentrace volného D-serinu v CNS jsou asi třetinové ve srovnání s koncentracemi L-serinu (*Hashimoto et Oka, 1997*). Schopnost L-serindehydratázy formovat z L-serinu pyruvát eliminací vody je větší než schopnost serinracemázy konvertovat L-serin na D-serin. Proto je jen jedna čtvrtina molekul L-serinu konvertována na D-serin (*Strisovsky et al. 2005*). Serinracemáza katalyzuje také konverzi D-serinu na L-serin, i když s nižší afinitou (*Wolosker et al. 1999*). D-serin může být konvertován na L-serin racemázou a následně na glycin serinhydroxymethyltransferázou (*Tsai et al. 1998*). Naopak zvýšená hladina glycinu může vést ke zvýšení hladiny D-serinu díky tzv. systému štěpícímu glycin („glycine cleavage system“) (*Iwama et al. 1997*).

D-serin je metabolizován enzymem D-aminooxidázou (DAAO). DAAO je peroxisomální flavoprotein, který je lokalizován v astrocytech pontu, mozečku a prodloužené míchy (*Schell et al. 1995*) a selektivně katalyzuje oxidativní deaminaci neutrálních D-aminokyselin. Přestože metabolizuje více než 90% celkového D-serinu bez vlivu na hladiny jiných aminokyselin, selektivně snižuje odpověď NMDA receptoru jen o 50-70% (*Wolosker et al. 2002*). Distribuce exprese genu pro DAAO v CNS inverzně koreluje s imunoreaktivitou D-serinu a s distribucí NMDA receptorů (*Schell et al. 1997; Wolosker et al. 2002*). Nejvyšší



aktivita DAAO byla zjištěna v mozečku (*Volpe et al. 1970; Horiike et al. 1994; Wolosker et al. 2002*), pontu a prodloužené míše (*Volpe et al. 1970*). Přítomnost DAAO je v CNS zřejmě omezena jen na tyto oblasti s velmi nízkým výskytem D-serinu. Nižší aktivita DAAO byla prokázána ve středním mozku a velmi nízká aktivita v kůře a předním mozku (*Horiike et al. 1994*). U myši postrádající DAAO nebyly prokázány změny koncentrací D-serinu v předním mozku (*Hashimoto et al. 1993*) a DAAO tak zřejmě hladiny D-serinu v předním mozku vůbec neovlivňuje.

### 5.1.2. Syntéza, metabolismus a transport glycinu

Glycin v CNS pochází převážně z gliových buněk a je tvořen sekvenční konverzí z L-serinu (obr. 8). Tuto konverzi katalyzuje enzym serinhydroxymetyltransferáza za účasti kofaktoru tetrahydrofolátu. Vyplavování glycinu z glií je nonvezikulární a nezávislé na  $\text{Ca}^{2+}$ . Glycin mohou transportním mechanismem závislým na  $\text{Ca}^{2+}$  vyplavovat také nervová zakončení vyskytující se v blízkosti inhibičních glycinových receptorů (*Berger et al. 1998*). Dalším zdrojem glycinu v CNS může být demetylace sarkosinu (N-metylglycinu) za účasti flavoenzymu sarkosindehydrogenázy, který se vyskytuje v mitochondriích mozkových a jaterních buněk (*Eschenbrenner et Jorns, 1999*).

Glycin působí kromě svého koagonistického účinku na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru také jako hlavní inhibiční neurotransmitter v oblasti míchy a mozku kmene (*Legendre, 2001*). Vazbou na inhibiční strychnin-senzitivní glycinové receptory zvyšuje propustnost iontových kanálů pro chloridové anionty. Následná hyperpolarizace postsynaptické neuronální membrány antagonizuje depolarizační stimuly a vede k inhibici postsynaptického neuronu. V některých oblastech CNS je dokonce glycin vyplavován společně s hlavním inhibičním neurotransmiterem GABA (*Aragón et López-Corcuera, 2003*). V souvislosti se svým zapojením v metabolismu CNS a neselektivním účinkem na inhibiční glycinové receptory a NMDA receptory plní glycin funkci inhibičního i excitačního neurotransmiteru (*Tsai et al. 1998*). Ve srovnání s inhibičním glycinovým receptorem má k NMDA receptoru glycin až stokrát vyšší afinitu (*Matsui et al. 1995*). Podtyp NMDA receptoru, k jehož aktivaci a otevření iontového kanálu vede jen vazba glycinu, se skládá z NR1 a NR3 podjednotky (*Chatterton et al. 2002*). NR3 jednotka nahradila standardně přítomnou NR2 podjednotku, která váže glutamát. Gen pro NR3 podjednotku je exprimován v některých oblastech míchy - excitační glycinové synapse existují na míšních neuronech,

kteře obsahují větší počet postsynaptických NMDA a méně inhibičních glycinových receptorů.

Účinek glycinu na synapsi je ukončován primárně vychytáváním vysokafinitním transportním systémem, který byl nalezen v mozkovém kmeni a hřbetní míše, kde je vysoká hustota inhibičních glycinových receptorů. Aktivita tohoto transportního systému ovlivňuje take koncentraci glycinu na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru (*Bergeron et al. 1998*). Koncentrace glycinu v blízkosti NMDA receptorů je kontrolována gliovými buňkami, které nesou tzv. glycinový transportér GLYT-1. Glycin je po vazbě na glycinové místo NMDA receptoru poměrně rychle transportován glycinovým transportérem do gliových buněk a metabolizován (*Schell et al. 2004*) multienzymovým mitochondriálním systémem („glycine cleavage system“), jehož distribuce je v CNS analogická distribuci NMDA receptorů (*Sakata et al. 2001*). S tím souvisí také proces přeměny glycinu na L-serin, který je pak konvertován na D-serin.

Byly identifikovány dva glycinové transportéry, které patří mezi velkou skupinu neurotransmiterových transportérů závislých na sodíkových a chloridových iontech. Oba transportéry pojmenované GLYT-1 a GLYT-2 (*Javitt et al. 2005*) mají podobné kinetické a farmakologické vlastnosti, vysokou afinitu ke glycinu, ale jejich funkce a distribuce je odlišná. GLYT-1 zajišťuje transport glycinu v gliových buňkách, především v astrocytech, ale byl prokázán i v některých dendritech a nervových zakončeních míšních excitačních neuronů (*Jursky et Nelson, 1996; Cubelos et al. 2005*). GLYT-1 se vyskytuje v CNS v nejvyšších koncentracích v míše, mozkovém kmeni a strukturách mezimozku. Je však rozsáhle distribuován v celém CNS včetně oblastí bez glycinergní neurotransmise, např. v kůře a talamu (*Zafra et al. 1995*). Výskyt GLYT-1 odpovídá distribuci NMDA receptorů (*Williams et al. 2004*). V předním mozku v oblastech bohatých na synapse obsahující NMDA receptory byl GLYT-1 prokázán v gliových buňkách i v subpopulacích glutamátergních neuronů (*Cubelos et al. 2005*). GLYT-1 zajišťuje mechanismem zpětného vychytávání do gliových buněk regulaci koncentrace glycinu na excitačních synapsích (*Zafra et al. 1995*). Vyplavování i zpětná absorpce glycinu do glie je tedy přímo ovlivňována právě jen transportérem GLYT-1 mechanismem závislým na sodíkových a chloridových iontech (*Javitt et al. 2005*). Mechanismus zpětného vychytávání glycinu do gliových buněk je tak účinný, že glycinové modulační místo NMDA receptoru není na synapsích např. v prefrontální kůře a hipokampu saturováno a blokáda zpětného vychytávání glycinu selektivními inhibitory např. sarkosinem, zvyšuje funkce závislé na NMDA receptoru (*Bergeron et al. 1998*). Glycin je přítomen v mozkomíšním moku v mikromolárních

koncentracích, které saturují vazebné místo, ale hlavní roli v udržování koncentrace glycinu uvnitř synapse na subsaturační úrovni hraje právě GLYT-1. Význam GLYT-1 potvrzuje i účinek inhibitoru GLYT-1, analogu sarkosinu. N[3-(4'-fluorofenyl)-3-(4'-fenylfenoxy)propyl] sarkosin zvyšuje neurotransmisi zprostředkovanou NMDA receptory (Bergeron et al. 1998). GLYT-1 byl prokázán i mimo CNS v neuronech sítnice, mimo neuronální buňky také v játrech a pankreatu (Jursky et Nelson, 1996).

GLYT-2 je primární neuronální transportér, jehož distribuce je analogická výskytu inhibičních glycinových receptorů s maximální koncentrací v mozkovém kmeni, mozečku a míše. Ve velmi nízké koncentraci je přítomen také ve strukturách mezimozku (Zafra et al. 1995; Jursky et Nelson, 1996; Williams et al. 2004). Mimo CNS se GLYT-2 vyskytuje v periferních tkáních v makrofázích a mastocytech (Borowsky et al. 1993), prokázán byl také v A buňkách Langerhansových ostrůvků pankreatu (Gammelsaeter et al. 2004).

### 5.1.3. Distribuce D-serinu a glycinu v CNS a v periférii

Nález vyšší koncentrace D-serinu v předním mozku koreluje s distribucí NMDA receptorů (Schell et al. 1997). Vysoké koncentrace D-serinu v CNS byly prokázány v prefrontální, parietální a temporální kůře, dále také v hipokampu a striatu (Hashimoto et Oka, 1997). Nižší koncentrace D-serinu jsou v limbických oblastech předního mozku, mezimozku a středním mozku, velmi nízké v pontu, mozečku a míše. Vysoké hladiny D-serinu ve frontální kůře přetrvávají i ve vyšším věku (Hashimoto et Oka, 1997). Distribuce vyšší koncentrace glycinu v CNS je inverzní k distribuci NMDA receptorů kromě pontu, mozečku, bulbus olfactorius a prodloužené míchy, kde je ale také přítomný D-serin (Scolari et al. 2007). S distribucí NMDA receptorů koreluje maximální hladina glycinu jen v oblasti mozkového kmene. Některé zdroje uvádějí podobnou či nižší extracellární koncentraci glycinu ve srovnání s D-serinem v prefrontální kůře a striatu (Hashimoto et al. 1995). Hladiny glycinu jsou vyšší v pontu, míše a mozečku, tedy v oblastech, kde není D-serin detekovatelný (Schell et al. 1997).

Glycin je v periférii syntetizován v játrech a vyskytuje ve všech lidských tkáních a biologických tekutinách. D-serin se ve velmi nízkých koncentracích vyskytuje v krevním séru, slinách a moči. (Hashimoto et al. 1997). De novo syntéza D-serinu může zřejmě probíhat u savců kromě CNS i v periferních tkáních. Pravděpodobný zdroj D-serinu v séru jsou játra, protože jen v hepatocytech byla vedle astrocytů v CNS prokázána významná koncentrace serinracemázy (Schell et al. 2004). Proč periferní tkáně produkují a vyplavují

D-serin není zcela jasný. Některé periferní tkáně (např. makrofagy, osteoklasty) exprimují NR1 podjednotku NMDA receptoru, se kterou D-serin interaguje. Transport D-serinu v periferních tkáních probíhá zřejmě prostřednictvím exchangerů nebo transportérů. V ledvinách je D-serin metabolizován DAAO nebo je z organismu vylučován močí (Schell et al. 2004).

#### 5.1.4. Transport D-serinu a glycinu přes HEB

Vztah mezi „pólem“ D-serinu v CNS a v periferních tkáních není jasný. Transport přes HEB je u neutrálních AMK limitován (Hashimoto et al. 1997). D-serin prochází HEB špatně (Schell et al. 2004), ale ve srovnání s glycinem (Oldendorf, 1971; Wolosker et al. 2002; Tsai et al. 1998) a L-serinem (Oldendorf, 1973) proniká do CNS lépe a ve větším množství. D- a L-serin využívají podobné transportní systémy, např. vychytávání D- a L-serinu v HEB je zajišťován podtypem 1 transportního systému L, který není závislý na Na<sup>+</sup> (Yamamoto et al. 2001). Dodávku exogenního D-serinu do CNS tak zřejmě zajišťuje preferenční stereoselektivní transport D-serinu přes HEB (Bauer et al. 2005), jehož mechanismus není zatím znám.

Možnost transportu D-serinu přes HEB dokumentují výsledky studií na hlodavcích. Po intraperitoneálním podání D-serinu dochází u krys ke zvýšení koncentrací D-serinu nejen ve všech periferních tkáních, ale také ve všech oblastech CNS, zejména v kůře, striatu, hipokampu, hypotalamu, středním mozku, pontu, prodloužené míše a mozečku (Hashimoto et Chiba, 2004). K následnému poklesu zvýšené koncentrace dochází v periferních tkáních rychleji než v CNS. K relativně rychlému poklesu na původní koncentraci D-serinu dochází v mozečku, pontu a míše, zatímco v kůře, striatu, hipokampu a hypotalamu klesá koncentrace D-serinu postupně až po 7 dnech po aplikaci (Hashimoto et Chiba, 2004). Odlišná dynamika metabolizace D-serinu v mozečku, pontu a míše souvisí zřejmě s vyšší aktivitou DAAO v těchto oblastech. Ke zvýšení koncentrací L-serinu v některých periferních tkáních a v CNS po periferním podání D-serinu (Hashimoto et Chiba, 2004) dochází zřejmě v souvislosti s tím, že serinracemáza může konvertovat D-serin na L-serin (Wolosker et al. 1999). Ke zvýšení koncentrací D-serinu v CNS dochází u krys po periferním podání L-serinu (Schell et al. 2004). Po intraperitoneálním podání L-serinu se v CNS u krys zvýšily koncentrace L-serinu a D-serinu především v kůře, striatu a hypotalamu (Hashimoto, 2002). Koncentraci extracelulárního D-serinu v mediální frontální kůře u krys zvyšovala také intraperitoneální aplikace D-cykloserinu. D-cykloserin tedy zřejmě kromě svého parciálně agonistického

účinku na glycinovém místě NMDA receptoru moduluje koncentrace D-serinu v CNS (Fujihira et al. 2007). Přestože glycin proniká přes HEB hůře než D-serin (Oldendorph, 1971; Tsai et al. 1998; Wolosker et al. 2002), také periferní podání glycinu vede ke zvýšení hladiny glycinu v mozkomíšním moku (Henderson et al. 1990).

## 5.2. Agonisté NMDA receptoru u schizofrenie

### 5.2.1. Sérové koncentrace D-serinu a glycinu u schizofrenie

Na patofyziologii schizofrenie se podílí dysfunkce glutamátergního systému v prefrontální kůře a limbickém systému (Schell et al. 2004). Pokud je tato dysfunkce spojená se sníženou aktivitou NMDA receptorů, mohli bychom u nemocných schizofrenií předpokládat změny metabolismu agonistů NMDA receptorů D-serinu a glycinu.

U nemocných schizofrenií byly post mortem zjištěny vysoké koncentrace D-serinu v prefrontální a parietální kůře, a naopak velmi nízké koncentrace v mozečku a míše (Kumashiro et al. 1995). Distribuce D-serinu koreluje s distribucí NMDA receptorů, ale hladiny D-serinu, L-serinu a glycinu se v prefrontální a parietální kůře neliší od hladin u zdravých subjektů (Kumashiro et al. 1995). Naopak Bendiková zjistila u nemocných schizofrenií 25% snížení koncentrace D-serinu a poměru D-serin/L-serin v mozkomíšním moku (Bendikov et al. 2007). V parietální kůře nebyly koncentrace D-serinu a L-serinu odlišné od zdravých subjektů. U nemocných schizofrenií byly ale nalezeny snížené koncentrace proteinu serinracemázy ve frontální kůře (39%) a hipokampu (21%) a snížený hipokampální poměr serinracemáza/DAAO (34%) (Bendikov et al. 2007). Nález nízké koncentrace D-serinu v mozkomíšním moku u nemocných schizofrenií by mohl přímo souviset se sníženou koncentrací proteinu serinracemázy a zvýšenou koncentrací proteinu DAAO. U nemocných schizofrenií byly kromě nižších koncentrací D-serinu v mozkomíšním moku (Bendikov et al. 2007) nalezeny také významně nižší hladiny D-serinu v krevním séru (Hashimoto et al. 2003; Yamada et al. 2005). Ve srovnání se zdravými subjekty byly naopak vyšší sérové koncentrace serinu a L-serinu. K úvahám o snížené aktivitě serinracemázy u schizofrenie vedl nález nižšího procentuálního zastoupení D-serinu v serinu v krevním séru (Hashimoto et al. 2003), které bylo zjištěno také v mozkomíšním moku u neléčených nemocných s první epizodou schizofrenie (Hashimoto et al. 2005).

Také nálezy nižších koncentrací glycinu a hodnoty poměru glycin/serin v krevní plazmě ve srovnání se zdravými subjekty (Sumiyoshi et al. 2004; Neeman et al. 2005) svědčí pro změny metabolismu agonistů NMDA receptorů u nemocných schizofrenií. Zajímavá

je naznačená souvislost nižší sérové koncentrace glycinu s vyšší intenzitou negativních příznaků (*Sumiyoshi et al. 2004; Neeman et al. 2005*). Při augmentaci D-cykloserinem bylo zlepšení negativních příznaků u nemocných schizofrenií léčených klozapinem spojeno se zvýšením sérové koncentrace glycinu (*Goff et al. 1996*). Souvislost změny metabolismu glycinu a intenzity negativních příznaků u schizofrenie potvrzuje také výraznější snížení intenzity negativních příznaků při augmentaci D-cykloserinem u nemocných s nižší koncentrací glycinu v séru před léčbou (*Heresco-Levy et al. 1998*).

### **5.2.2. D-serin a glycin v augmentační léčbě schizofrenie**

Účinnost agonistů NMDA receptoru byla testována v klinických studiích u nemocných schizofrenií při augmentaci léčby antipsychotiky. Přestože nebyly mechanismy transportu D-serinu a glycinu přes HEB dosud zcela objasněny, jejich pozitivní klinický účinek u nemocných schizofrenií po periferním podání tento transport předpokládá. D-serin při augmentaci léčby antipsychotiky 2. generace zlepšoval ve srovnání s placebem pozitivní a negativní příznaky, kognitivní deficit (*Tsai et al. 1998; Heresco-Levy et al. 2005*) a depresivní příznaky (*Heresco-Levy et al. 2005*). Zvýšení sérové koncentrace D-serinu predikovalo výraznější zlepšení negativních, pozitivní a kognitivních příznaků (*Tsai et al. 1998*). Sérové koncentrace glycinu nebyly podáváním D-serinu ovlivněny (*Heresco-Levy et al. 2005*). U nemocných schizofrenií léčených klozapinem (*Tsai et al. 1999*) a risperidonem (*Lane et al. 2005*) nevedla augmentace D-serinem ke zlepšení schizofrenních příznaků, přestože po léčbě D-serinem došlo ke zvýšení sérových koncentrací D-serinu (*Tsai et al. 1999*). Neúčinnost D-serinu u nemocných léčených klozapinem může souviset s parciálně nebo plně agonistickým účinkem klozapinu na NMDA receptorech.

Již v roce 1994 Javitt prokázal, že glycin při augmentaci léčby antipsychotiky 1. generace významně snižuje intenzitu negativních příznaků u nemocných s chronickou schizofrenií (*Javitt et al. 1994*). V dalších studiích byl nejen potvrzen účinek glycinu na negativní příznaky (*Heresco-Levy et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1999; Javitt et al. 2001; Heresco-Levy et al. 2004*), ale byl zaznamenán také léčebný účinek na kognitivní deficit (*Heresco-Levy et al. 1996; Javitt et al. 2001; Heresco-Levy et al. 2004*), pozitivní (*Heresco-Levy et al. 2004*) a depresivní příznaky schizofrenie (*Heresco-Levy et al. 1996*). Léčba glycinem vedla ke zvýšení sérových koncentrací glycinu (*Heresco-Levy et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1999; Evins et al. 2000; Javitt et al. 2001*) a nález vyšší koncentrace glycinu v séru po léčbě byl spojen s výraznějším klinickým účinkem (*Heresco-Levy et al.*

2004). Zlepšení negativních příznaků bylo nejvýraznější u nemocných s nejnižší sérovou koncentrací glycinu před započítím léčby (Heresco-Levy et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1999). V kontrastu s těmito výsledky Buchanan ve své studii účinek glycinu na negativní příznaky a kognitivní deficit při augmentaci léčby antipsychotiky nepotvrdil (Buchanan et al. 2007). Glycin nezlepšuje negativní a pozitivní příznaky (Potkin et al. 1999; Evins et al. 2000) a kognitivní deficit (Evins et al. 2000) také při augmentaci léčby klozapinem. Monoterapie klozapinem vedla u nemocných s chronickou schizofrenií rezistentní na léčbu ve srovnání s léčbou augmentovanou glycinem k výraznému zlepšení pozitivní symptomatiky (Potkin et al. 1999). Tento náález nabízí vzhledem k předpokladu agonistického účinku klozapinu na NMDA receptoru teorii interference antipsychotického účinku klozapinu a glycinu. Klinické účinky agonistů NMDA receptoru shrnují výsledky metaanalýzy 18 krátkodobých studií, která neprokázala účinek D-serinu a glycinu na pozitivní příznaky a kognitivní deficit. D-serin a glycin u nemocných schizofrenií jen mírně a statisticky nevýznamně zlepšovaly negativní příznaky (Tuominen et al. 2005). Objasnění mechanismu transportu glycinu vedlo ke klinickému testování látek ovlivňujících aktivitu glycinového transportéru GLYT-1 a tím i extracelulární hladinu glycinu v CNS. Tzv. inhibitory GLYT-1 stimulují hypofunkční NMDA glutamátergní receptory a tím modulují podkorovou dopaminergní neurotransmisi, např. ve striatu (Javitt et al. 2005). Mezi inhibitory GLYT-1 patří např. glycyldodecylamid (GDA) nebo látka ALX5407. Předmětem klinického zkoušení je ale především sarkosin (N-metylglycin). Sarkosin kromě inhibice GLYT-1 moduluje funkci transportérů zařazených do tzv. systému transportérů A, které ovlivňují také transport glycinu a glutaminu. Perspektivou je využití inhibitorů GLYT-1 právě k ovlivnění extracelulární koncentrace a funkce agonistů glycinového vazebného místa hypofunkčních NMDA receptorů u schizofrenie. Sarkosin v augmentaci léčby antipsychotiky významně zlepšuje pozitivní, negativní a kognitivní symptomatiku nejen ve srovnání s placebem (Tsai et al. 2004), ale také pozitivní a negativní symptomatiku ve srovnání s D-serinem (Lane et al. 2005). Pokud však byla sarkosinem augmentována léčba klozapinem, nevedlo to ke zlepšení příznaků schizofrenie (Lane et al. 2006). Tento náález je v souladu s výsledky studií u nemocných, u nichž byla léčba klozapinem augmentována glycinem (Potkin et al. 1999; Evins et al. 2000) nebo D-serinem (Tsai et al. 1999).

## **6. Klinická studie**

### **6.1. Cíle studie**

Popis změn metabolismu D-serinu a glycinu u nemocných schizofrenií ve srovnání se zdravými kontrolními subjekty.

Popis vztahu sérových koncentrací D-serinu a glycinu a intenzity negativních příznaků u nemocných schizofrenií.

### **6.2. Hypotézy studie**

#### **Hypotéza 1:**

U nemocných schizofrenií je významně nižší koncentrace D-serinu v krevním séru ve srovnání s koncentrací D-serinu v krevním séru u zdravých kontrolních subjektů.

#### **Hypotéza 2:**

U nemocných schizofrenií je významně nižší koncentrace glycinu v krevním séru ve srovnání s koncentrací glycinu v krevním séru u zdravých kontrolních subjektů.

#### **Hypotéza 3:**

Intenzita negativních příznaků u nemocných schizofrenií negativně koreluje s koncentrací D-serinu v krevním séru.

#### **Hypotéza 4:**

Intenzita negativních příznaků u nemocných schizofrenií negativně koreluje s koncentrací glycinu v krevním séru.

### **6.3. Vstupní kritéria**

- Podepsání informovaného souhlasu nemocným.
- Diagnóza schizofrenie dle kritérií 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí (MKN-10).
- Věk 18 - 65 let.

### **6.4. Vylučovací kritéria**

- Prokazatelný abúzus alkoholu nebo jiných psychoaktivních látek v posledních 6 měsících.
- Elektrokonvulzivní terapie v posledních 5 měsících.
- Těhotenství, laktace.
- Mentální retardace.



## **6.5. Subjekty studie**

Do klinické studie byli po podepsání informovaného souhlasu zařazováni nemocní schizofrenií a zdraví dobrovolníci starší 18 let, kteří byli seznámeni na úrovni odpovídající jejich vzdělání a rozumové úrovni s obsahem a záměrem výzkumu. Informovaný souhlas a protokol studie EAK01-05 byly schváleny Etickou komisí FN HK, LF UK a VLA JEP v Hradci Králové na zasedání dne 12.5. 2005. U nemocných byla diagnostikována schizofrenie dle kritérií 10. revize MKN. Všichni nemocní byli v době své účasti ve studii z klinického hlediska ve stabilním stavu ambulantně léčeni na Psychiatrické klinice FN v Hradci Králové. Demografické a anamnestické údaje byly získány od nemocných nebo z jejich lékařské dokumentace. Do studie nebyli zařazeni nemocní, kteří byli v posledních 5 měsících léčeni elektrokonvulzivní léčbou, těhotné nebo nemocné po porodu v období laktace, nemocní s přítomností abúzu psychoaktivních látek v posledních 6 měsících nebo pozitivním nálezem v toxikologickém vyšetření moči. U nemocných nebylo dle anamnestických údajů, dle výsledků somatického vyšetření nebo výsledků laboratorních vyšetření prokázáno neurologické nebo kardiovaskulární onemocnění nebo poruchy ledvinných funkcí. Psychofarmakologická ani jiná medikamentózní léčba, kterou nemocní užívali, nebyla v souvislosti se zařazením do studie měněna. U zdravých dobrovolníků nebylo dle anamnestických údajů, dle výsledků somatického vyšetření nebo výsledků laboratorních vyšetření prokázáno neurologické nebo kardiovaskulární onemocnění nebo poruchy ledvinných funkcí. Zdraví dobrovolníci neužívali žádná psychofarmaka.

## **6.6. Metodika**

### **6.6.1. Průběh klinické studie**

Před zařazením do klinické studie byla v rámci výběru nemocných provedena kompletace demografických a anamnestických dat. Nemocní byli psychiatricky vyšetřeni, byla posouzena přítomnost vstupních kritérií. Po podepsání informovaného souhlasu a zařazení do studie nemocní pokračovali v léčbě indikované v rámci ambulantní péče včetně užívání nasazených psychofarmak. Nemocným schizofrenií a zdravým dobrovolníkům byl ráno mezi 8.00 a 9.30 hod. po 12 hodinovém lačnění proveden odběr žilní krve (cca 20 ml) k laboratornímu stanovení koncentrací excitačních aminokyselin. Sérové koncentrace serinu, D-serinu a glycinu byly stanoveny metodou vysokovýkonné kapalinové chromatografie („high-performance liquid chromatography“, HPLC) v laboratořích Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové. Nemocní byli následně během

dalších 4 hodin psychiatricky vyšetření, psychopatologie byla hodnocena pomocí posuzovacích stupnic PANSS (The Positive and Negative Syndrome Scale; 30 položek, skór 1-7) (Kay et al. 1987) a SANS (The Scale for the Assessment of Negative Symptoms; 30 položek, skór 0-5) (Andreasen, 1989). Bylo provedeno také vyšetření tělesného stavu nemocných, byl změřen krevní tlak, puls a hmotnost. Vyšetření klinického stavu nemocných a hodnocení psychopatologie bylo provedeno jedním kvalifikovaným psychiatrem se zkušeností v použití posuzovacích stupnic. Výsledky vyšetření byly zaznamenány do záznamů klinické studie a do ambulantní dokumentace nemocných.

### 6.6.2. Schéma klinického hodnocení

Screening (1-2 dny)

- psychiatrické vyšetření pacienta
- posouzení vstupních kritérií
- kompletace anamnestických a demografických dat
- podepsání informovaného souhlasu

Vizita (1 den)

- odběr krve (cca 20 ml) k laboratornímu stanovení koncentrací excitačních aminokyselin (D-serin, serin, glycin) v krevním séru metodou HPLC
- psychiatrické vyšetření pacienta
- hodnocení psychopatologie posuzovacími stupnicemi - PANSS a SANS

Ukončení klinického hodnocení

### 6.6.3. Vyšetřovací metody

#### 6.6.3.1. Stanovení sérových koncentrací excitačních AMK

Chemikálie: Standardní roztoky byly získány ředěním jednotlivých enantiomerů aminokyselin (Sigma-Aldrich, Německo). Pro přípravu mobilní fáze byly použity metanol, kyselina octová (Penta, ČR), octan sodný bezvodý (Sigma-Aldrich, Německo) a NaOH (Kulich, ČR). Voda byla čištěna pomocí MilliQ Plus systému (Millipore, USA). Derivatizační činidla byla připravena z N-acetyl-L-cysteinu (NAC), 3-merkaptopropionové kyseliny (MPA), o-ftaldialdehydu (OPA) (Sigma-Aldrich, Německo), kyseliny borité a metanolu (Penta, ČR).

Příprava vzorků: Venózní krev byla odebrána do zkumavek BD Vacutainer® SST™ II Advance. Vzorky byly transportovány do laboratoře do 1 hodiny po odběru, ihned po příjmu

materiálu bylo odděleno sérum od krvinek pomocí centrifugace (2000 g, 10 min) a vzorky byly deproteinovány metodou ultrafiltrace pomocí kolonek Microcon - 10 kDa, 0,5 ml (Millipore, USA). Jako vnitřní standard byl použit roztok D-norvalinu (340  $\mu\text{mol/l}$ ). Do ultrafiltračních kolonek bylo aplikováno 500  $\mu\text{l}$  séra a 50  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu a vzorky byly po promíchání centrifugovány (13 000 g, 20 min, 4°C). Deproteinované vzorky byly uchovávány při teplotě -20 °C.

Derivatizace: Derivatizační činidlo obsahovalo 50 mg OPA v 5 ml metanolu, 10 ml 0,2 mol/l kyseliny borité v 0,2 mol/l KCl, 10 ml 0,2 mol/l NaOH a činidlo s thiolovou skupinou: pro stanovení glycinu a celkového serinu 2 ml MPA a pro separaci D-serinu 1,52 g NAC. Hodnota pH derivatizačního činidla byla upravena na 9,3 pomocí 1 mol/l NaOH. Poměr činidla a vzorku vstupujícího do reakce byl 2:1 a čas potřebný k reakci byl 10 minut (*Vasanits et al. 2000; Kutlan et al. 2002; Kutlan et al. 2003; Molnar-Perl, 2003*). Po ukončení automatického derivatizačního kroku se na kolonu dávkovalo 20  $\mu\text{l}$  vzorku.

Analýza: Chromatografická analýza byla prováděna na systému HPLC typ LC-10A vp (Shimadzu, Japonsko) vybaveným degaserem, mixérem mobilních fází, pumpou, autosamplerem, držákem na kolonu s termostatem a fluorescenčním detektorem. Chromatografická separace byla provedena v režimu gradientové eluce v systému reverzní fáze. Pro stanovení D-serinu byl jako mobilní fáze použit 0,21 mol/l octanový pufr o hodnotě pH 5,6 (A) a metanol (B) (*Zhao et al. 1995*). Na začátku separace byla kolona proplachována mobilními fázemi v poměru 75:25 a po 150 minutách byl poměr mobilních fází 39,2:60,8. Průtok mobilních fází byl 0,5 ml/min. Separace byla prováděna na dvou sériově zapojených kolonách Lichrocard 250x4 mm Lichrospher RP-18e s velikostí částic sorbentu 5  $\mu\text{m}$  (Merck). Kolona byla temperována na teplotu 22 °C. Signál byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru ( $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}}$  454/337) (*Zhao et al. 1995; Vasanits et al. 2000; Kutlan et al. 2002*). Průměrná reprodukovatelnost byla pro D-serin 4,54 %, hodnota bias 1,58 %, limity detekce byly stanoveny na 0,27  $\mu\text{mol/l}$ .

Serin a glycin byly separovány za použití 3 mobilních fází: (A) 0,05 mol/l octanový pufr o hodnotě pH 7,3, (B) 0,1 mol/l octanový pufr – acetonitril – metanol (46:44:10) a (C) metanol (*Vasanits et al. 2000; Kutlan et al. 2002; Kutlan et al. 2003*). Gradienty průtoků mobilních fází během chromatografického procesu jsou uvedeny v tabulce (tab. 3). Separace byla prováděna na koloně Lichrocard 250x4 mm Lichrospher RP-18e s velikostí částic sorbentu 5  $\mu\text{m}$  (Merck). Kolona byla temperována na teplotu 40 °C. Signál byl detekován pomocí fluorescenčního detektoru ( $\lambda_{\text{em}}/\lambda_{\text{ex}}$  455/230 nm) (*Zhao et al. 1995; Vasanits et al. 2000; Kutlan et al. 2002*). Průměrná reprodukovatelnost byla pro serin 8,91 %

a pro glycin 6,14 %. Hodnota bias byla 1,91 % pro serin a 4,2 % pro glycin, limity detekce byly stanoveny na 2,58  $\mu\text{mol/l}$  pro serin a 0,85  $\mu\text{mol/l}$  pro glycin.

Tabulka 3: Optimální gradienty pro simultánní analýzu serinu a glycinu.

čas (min)	průtok (ml/min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	0,8	100	0	0
16		72	28	
17		100	0	
18	0,8			
18,2	1,3			
25				0
30				10
50	1,3	33,3	56,7	10
51	0,8	100	0	0

### 6.6.3.2. Vyšetření psychopatologie

Psychopatologie u nemocných schizofrenií byla hodnocena psychiatrickými posuzovacími stupnicemi:

PANSS – The Positive and Negative Syndrome Scale (*Kay et al. 1987*)

(bodové rozpětí skórování v jednotlivých položkách: 1-7)

PANSS – celkový skór

PANSS – subskór škály pozitivních příznaků – 7 položek (P1 – P7)

PANSS – subskór škály negativních příznaků – 7 položek (N1 – N7)

PANSS – subskór škály obecné psychopatologie – 16 položek (G1 – G16)

SANS – The Scale for the Assessment of Negative Symptoms (*Andreasen, 1989*)

(bodové rozpětí skórování v jednotlivých položkách: 0-5)

SANS – celkový skór

SANS – subskór škály Citová oploštělost nebo otupělost – 9 položek

SANS – subskór škály Alogie – 6 položek

SANS – subskór škály Abulie, apatie – 5 položek

SANS – subskór škály neschopnost prožitku, nespolečenskost – 6 položek

SANS – subskór škály Zájem, pozornost – 4 položky

#### 6.6.4. Statistické hodnocení

V průběhu studie byla v jednotlivých skupinách získávána následující data:

- skupina nemocných s dg. schizofrenie dle 10. revize MKN:  
věk, pohlaví, diagnóza typu schizofrenie, doba trvání nemoci, medikace, sérová koncentrace D-serinu, sérová koncentrace serinu, sérová koncentrace glycinu, skóry posuzovacích stupnic k hodnocení psychopatologie SANS, PANSS.
- kontrolní skupina zdravých subjektů:  
věk, pohlaví, sérová koncentrace D-serinu, sérová koncentrace serinu, sérová koncentrace glycinu.

Pro jednotlivé soubory dat a skóre byl stanoven průměr, směrodatná odchylka, medián a rozpětí hodnot. Ke stanovení rozdílů hodnot proměnných mezi skupinou nemocných a skupinou zdravých dobrovolníků byl použit t-test, v případě nenormálního rozložení dat neparametrické testy Kolmogorov-Smirnov test a Mann-Whitney *U* test. Rozdíly hodnot proměnných mezi jednotlivými skupinami jsou prezentovány pomocí krabičkových grafů (box plot). Ke stanovení asociace jednotlivých proměnných byly použity neparametrické Spearmanovy korelační koeficienty. Asociace hodnot sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu s hodnotami skóre posuzovacích stupnic psychopatologie jsou prezentovány pomocí bodových grafů (scatter plot) s regresními přímkami. Zvolená hladina významnosti byla  $\alpha = 0,05$ .

### 6.7. Výsledky

Do klinické studie bylo zařazeno 50 nemocných schizofrenií (33 mužů a 17 žen; průměr  $\pm$  SD věk,  $35,1 \pm 11,1$  roků; medián, 31,5 roku; min-max, 21-62 roků) a věkově a pohlavím zpárovaná skupina 50 zdravých dobrovolníků (33 mužů a 17 žen; průměr  $\pm$  SD věk,  $35,1 \pm 11,1$  roků; medián, 32 roků; min-max, 19-59 roků). Ve skupině nemocných byl nejčastěji diagnostikován paranoidní typ schizofrenie ( $n=35$ ), dále reziduální ( $n=7$ ), nediferencovaný ( $n=5$ ), hebefrenní ( $n=2$ ) a simplexní typ ( $n=1$ ). 49 nemocných bylo léčeno antipsychotiky. Jedna nemocná neužívala žádná psychofarmaka. V době účasti ve studii trvala její nemoc 2 roky a nemocná byla z klinického hlediska ve stabilním stavu. 4 nemocní byli léčeni monoterapií antipsychotikem 1. generace, 36 nemocných užívalo v monoterapii

antipsychotikum 2. generace. 5 nemocných bylo léčeno kombinací antipsychotika 1. a 2. generace, 4 nemocní kombinací dvou antipsychotik 2. generace. Charakteristiky skupiny nemocných jsou shrnuty v tabulkách (tab. 4, 5).

Tabulka 4: Charakteristiky skupiny nemocných schizofrenií (n = 50; mg/d, miligram na den).

<b>Pohlaví</b>	
Muži	n = 33
Ženy	n = 17
<b>Typ schizofrenie (MKN-10)</b>	
Paranoidní (F 20.0)	n = 35
Hebefrenní (F 20.1)	n = 2
Nediferencovaný (F 20.3)	n = 5
Reziduální (F 20.5)	n = 7
Simplexní (F 20.6)	n = 1
<b>Medikace</b>	
<b>Monoterapie (dávka)</b>	
flufenazin dekanóát (25 mg/14-35d)	n = 3
chlorpromazin (50 mg/d)	n = 1
amisulprid (100-800 mg/d)	n = 3
ziprasidon (80-160 mg/d)	n = 3
risperidon dlouho působící (25-37,5 mg/14d)	n = 6
sertindol (12-24 mg/d)	n = 2
olanzapin (5-20 mg/d)	n = 9
quetiapin (600-1400 mg/d)	n = 3
klozapin (100-500 mg/d)	n = 8
aripiprazol (15 mg/d)	n = 2
<b>Kombinace (dávka)</b>	
haloperidol dekanóát (50 mg/14-21d) + risperidon (1,5-6 mg/d)	n = 2
haloperidol dekanóát (50 mg/21d) + olanzapin (35 mg/d)	n = 1
haloperidol (3 mg/d) + risperidon (6 mg/d)	n = 1
haloperidol (1,5 mg/d) + quetiapin (800 mg/d)	n = 1
klozapin (150-450 mg/d) + aripiprazol (15 mg/d)	n = 2
risperidon dlouho působící (25-37,5 mg/14d) + aripiprazol (15 mg/d)	n = 2

Tabulka 5: Demografické ukazatele skupiny nemocných schizofrenií (n = 50; SD, směrodatná odchylka; Min-Max, minimum-maximum).

<b>Demografický ukazatel</b>	<b>Průměr ± SD</b>	<b>Medián</b>	<b>Min-Max</b>
<b>Věk (roky)</b>	35,1 ± 11,1	31,5	21 - 62
<b>Trvání nemoci (roky)</b>	10,4 ± 10,4	6	1 - 40
<b>Dávka antipsychotika - chlorpromazinový ekvivalent (mg)</b>	344 ± 323	200	0 - 1867

Z krevních vzorků odebraných nemocným schizofrenií a zdravým dobrovolníkům byly stanoveny koncentrace D-serinu, serinu (D-serin + L-serin) a glycinu v krevním séru metodou vysokovýkonné kapalinové chromatografie (HPLC). Deskriptivně statisticky zpracované laboratorní výsledky včetně hodnot poměrů sérových koncentrací D-serinu a serinu (D-serin/serin) a glycinu a serinu (glycin/serin) jsou shrnuty v tabulce (tab. 6).

**Tabulka 6:** Sérové koncentrace excitačních aminokyselin u skupin nemocných schizofrenií a zdravých dobrovolníků (SD, směrodatná odchylka; min-max, minimum-maximum).

Sérová koncentrace	Nemocní schizofrenií (n=50)			Zdraví dobrovolníci (n=50)		
	průměr ± SD	medián	min-max	průměr ± SD	medián	min-max
D-serin (μmol/l)	3,30 ± 1,53	2,75	1,18 – 8,29	3,10 ± 1,59	2,73	1,16 – 7,96
serin (μmol/l)	83,09 ± 27,70	81,4	38,2 – 136,6	100,87 ± 21,72	99,35	61,9 - 146
D-serin/serin	0,043 ± 0,023	0,036	0,014 - 0,110	0,031 ± 0,014	0,029	0,010 - 0,067
glycin (μmol/l)	176,52 ± 69,97	176	84,2 – 373,6	226,95 ± 70,40	225,5	105,7 – 422,9
glycin/serin	2,13 ± 0,46	2,04	1,44 - 3,16	2,27 ± 0,61	2,19	1,43 - 4,69

U nemocných schizofrenií nebyla nalezena souvislost hodnoty sérové koncentrace D-serinu (median, 2,75 μmol/l) s věkem ( $r = -0,07$ ,  $p = 0,64$ , Spearmanův korelační koeficient). U nemocných jsme souvislost s věkem neprokázali ani u sérové koncentrace serinu (D-serin + L-serin) (median, 81,4 μmol/l;  $r = -0,20$ ,  $p = 0,16$ ), u hodnoty poměru D-serin/serin (median, 0,036;  $r = 0,05$ ,  $p = 0,73$ ), u sérové koncentrace glycinu (median, 176 μmol/l;  $r = -0,17$ ,  $p = 0,24$ ) a u hodnoty poměru glycin/serin (median, 2,04;  $r = -0,02$ ,  $p = 0,91$ ). Souvislost sérové koncentrace D-serinu (median, 2,73 μmol/l;  $r = 0,19$ ,  $p = 0,19$ ), serinu (median, 99,4 μmol/l;  $r = 0,10$ ,  $p = 0,47$ ), hodnoty poměru D-serin/serin (median, 0,029;  $r = 0,15$ ,  $p = 0,28$ ), sérové koncentrace glycinu (median, 225,5 μmol/l;  $r = 0,05$ ,  $p = 0,75$ ) a hodnoty poměru glycin/serin (median, 2,19;  $r = -0,08$ ,  $p = 0,57$ ) s věkem jsme nenalezli ani u zdravých dobrovolníků.

V hodnotě sérové koncentrace D-serinu jsme mezi skupinou nemocných schizofrenií a skupinou zdravých dobrovolníků nenalezli rozdíl ( $z = -0,82$ ,  $p = 0,410$ , Mann-Whitney  $U$  test) (tab. 7). Sérová koncentrace serinu byla u nemocných ve srovnání se zdravými nižší

( $z = 3,17$ ,  $p = 0,006$ , Kolmogorov-Smirnov test) (graf 1) a hodnota poměru D-serin/serin vyšší ( $z = -2,81$ ,  $p = 0,022$ , Kolmogorov-Smirnov test) (graf 2). Sérová koncentrace glycinu

**Tabulka 7:** Srovnání hodnot sérových koncentrací excitačních aminokyselin mezi skupinou nemocných schizofrenií a skupinou zdravých dobrovolníků (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; <sup>1</sup> Mann-Whitney  $U$  test; <sup>2</sup> Kolmogorov-Smirnov test; SD, směrodatná odchylka).

Sérová koncentrace		Nemocní schizofrenií (n=50)	Zdraví dobrovolníci (n=50)	$p$
D-serin (μmol/l)	průměr ± SD	3,30 ± 1,53	3,10 ± 1,59	0,410 <sup>1</sup>
	medián	2,75	2,73	
serin (μmol/l)	průměr ± SD	83,09 ± 27,70	100,87 ± 21,72	0,006** <sup>2</sup>
	medián	81,4	99,35	
D-serin/serin	průměr ± SD	0,043 ± 0,023	0,031 ± 0,014	0,022* <sup>2</sup>
	medián	0,036	0,029	
glycin (μmol/l)	průměr ± SD	176,52 ± 69,97	226,95 ± 70,40	0,0004*** <sup>1</sup>
	medián	176	225,5	
glycin/serin	průměr ± SD	2,13 ± 0,46	2,27 ± 0,61	0,343 <sup>1</sup>
	medián	2,04	2,19	

byla u nemocných schizofrenií ve srovnání se zdravými významně nižší ( $z = 3,54$ ,  $p = 0,0004$ , Mann-Whitney  $U$  test) (graf 3). Hodnota poměru glycin/serin u nemocných se od zdravých nelišila ( $z = 0,95$ ,  $p = 0,343$ , Mann-Whitney  $U$  test).

Doba trvání nemoci (median, 6 roků; min-max, 1-40 roků) u nemocných schizofrenií nesouvisela s hodnotou sérové koncentrace D-serinu (median, 2,75 μmol/l;  $r = 0,13$ ,  $p = 0,36$ ), serinu (median, 81,4 μmol/l;  $r = -0,14$ ,  $p = 0,33$ ), s hodnotou poměru D-serin/serin (median, 0,036;  $r = 0,21$ ,  $p = 0,14$ ), hodnotou sérové koncentrace glycinu (median, 176 μmol/l;  $r = -0,17$ ,  $p = 0,24$ ) ani s hodnotou poměru glycin/serin (median, 2,04;  $r = -0,13$ ,  $p = 0,38$ ). Nezaznamenali jsme souvislost mezi dávkou antipsychotik vyjádřenou hodnotou chlorpromazinového ekvivalentu (Bazire, 2002; Woods, 2003) (median, 200 mg) a hodnotou



sérové koncentrace D-serinu ( $r = 0,23$ ,  $p = 0,10$ ), serinu ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,19$ ), hodnotou poměru D-serin/serin ( $r = 0,18$ ,  $p = 0,20$ ), hodnotou sérové koncentrace glycinu (median, 176  $\mu\text{mol/l}$ ;  $r = 0,16$ ,  $p = 0,25$ ) a hodnotou poměru glycin/serin (median, 2,04;  $r = -0,07$ ,  $p = 0,62$ ).

Výsledky hodnocení psychopatologie u nemocných schizofrenií pomocí psychiatrických posuzovacích stupnic PANSS a SANS jsou shrnuty v tabulce (tab. 8). Hodnota sérové

**Tabulka 8:** Výsledky vyšetření psychopatologie u skupiny nemocných schizofrenií (PANSS, The Positive and Negative Syndrome Scale; SANS, The Scale for the Assessment of Negative Symptoms; SD, směrodatná odchylka; Min-Max, minimum-maximum).

<b>Psychopatologický ukazatel</b>	<b>Průměr <math>\pm</math> SD</b>	<b>Medián</b>	<b>Min-Max</b>
<b>PANSS: celkový skór</b>	49,1 $\pm$ 10,9	46,5	33 - 79
<b>PANSS: skór P1-P7</b>	11,1 $\pm$ 4,0	9	7 - 24
<b>PANSS: skór N1-N7</b>	14,0 $\pm$ 5,7	13	7 - 33
<b>PANSS: skór G1-G16</b>	24,1 $\pm$ 4,3	23	16 - 36
<b>SANS: celkový skór</b>	27,7 $\pm$ 18,5	24,5	0 - 80
<b>SANS: citová oploštělost</b>	8,4 $\pm$ 6,0	8,5	0 - 26
<b>SANS: alogie</b>	3,7 $\pm$ 3,9	3	0 - 16
<b>SANS: abulie a apatie</b>	3,8 $\pm$ 3,5	3	0 - 13
<b>SANS: neschopnost prožitku a nespolečenská</b>	7,6 $\pm$ 6,1	6,5	0 - 22
<b>SANS: zájem a pozornost</b>	4,2 $\pm$ 3,3	4	0 - 12

koncentrace D-serinu nesouvisela s hodnotou celkového skóru PANSS ( $r = 0,01$ ,  $p = 0,93$ ), hodnotami skóru subškál pozitivních příznaků PANSS (P1-P7) ( $r = 0,08$ ,  $p = 0,60$ ), negativních příznaků PANSS (N1-N7) ( $r = 0,02$ ,  $p = 0,89$ ), všeobecné psychopatologie PANSS (G1-G16) ( $r = 0,01$ ,  $p = 0,94$ ) ani s hodnotou celkového skóru škály SANS ( $r = -0,08$ ,  $p = 0,58$ ). U nemocných jsme neprokázali ani souvislost sérové koncentrace D-serinu a hodnot skóru subškál citové oploštělosti ( $r = -0,003$ ,  $p = 0,98$ ), alogie ( $r = -0,16$ ,  $p = 0,27$ ), abulie a apatie ( $r = -0,04$ ,  $p = 0,76$ ), neschopnosti prožitku

a nespolečenskosti ( $r = -0,15$ ,  $p = 0,29$ ) a skóru subškály zájem a pozornost ( $r = 0,07$ ,  $p = 0,65$ ) stupnice SANS. Hodnota koncentrace serinu v krevním séru u nemocných schizofrenií nesouvisela s hodnotou celkového skóru PANSS ( $r = -0,22$ ,  $p = 0,12$ ) a hodnotami skóru subškály PANSS pro hodnocení intenzity pozitivních příznaků (P1-P7) ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,34$ ) a subškály PANSS všeobecné psychopatologie (G1-G16) ( $r = -0,17$ ,  $p = 0,25$ ). Souvislost jsme našli mezi hodnotou sérové koncentrace serinu a hodnotou skóru subškály PANSS pro hodnocení intenzity negativních příznaků (N1-N7) ( $r = -0,39$ ,  $p = 0,005$ ) (graf 4). S hodnotou sérové koncentrace serinu u nemocných negativně asociovaly hodnoty celkového skóru SANS ( $r = -0,44$ ,  $p = 0,001$ ) (graf 5) a skóru subškál citové oploštělosti ( $r = -0,38$ ,  $p = 0,006$ ), alogie ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,008$ ) a neschopnosti prožitku a nespolečenskosti ( $r = -0,52$ ,  $p = 0,00009$ ) stupnice SANS. U hodnot skóru subškál zájem a pozornost ( $r = -0,26$ ,  $p = 0,07$ ) a abulie a apatie ( $r = -0,25$ ,  $p = 0,08$ ) jsme souvislost se sérovou koncentrací serinu nenalezli. Hodnota poměru D-serin/serin neasociovala s hodnotami celkových skóru a skóru subškál PANSS a SANS, souvislost na hranici statistické významnosti jsme zaznamenali u skóru subškály pro hodnocení negativních příznaků (N1-N7) SANS ( $r = 0,28$ ,  $p = 0,049$ ). Asociace jednotlivých proměnných s hodnotami sérových koncentrací D-serinu, serinu a hodnotou poměru D-serin/serin jsou shrnuty v tabulce (tab. 9).

Hodnota sérové koncentrace glycinu u nemocných schizofrenií negativně asociovala s hodnotou celkového skóru PANSS ( $r = -0,30$ ,  $p = 0,03$ ), ale skór subškály pozitivních příznaků PANSS (P1-P7) ( $r = -0,06$ ,  $p = 0,70$ ) a skór subškály všeobecné psychopatologie PANSS (G1-G16) ( $r = -0,23$ ,  $p = 0,11$ ) s hladinou glycinu nesouvisel. Hodnota sérové koncentrace glycinu u nemocných negativně asociovala s hodnotou skóru subškály negativních příznaků PANSS (N1-N7) ( $r = -0,38$ ,  $p = 0,007$ ) (graf 6), celkového skóru škály SANS ( $r = -0,40$ ,  $p = 0,004$ ) (graf 7) a skóru subškál citové oploštělosti ( $r = -0,33$ ,  $p = 0,02$ ), alogie ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,008$ ) a subškály neschopnosti prožitku a nespolečenskosti ( $r = -0,50$ ,  $p = 0,0002$ ) stupnice SANS. Hodnoty skóru subškál abulie a apatie ( $r = -0,15$ ,  $p = 0,30$ ) a zájem a pozornost ( $r = -0,24$ ,  $p = 0,09$ ) s koncentrací glycinu v séru neasociovaly.

Hodnota poměru glycin/serin u nemocných nesouvisela s hodnotou celkového skóru PANSS ( $r = -0,19$ ,  $p = 0,18$ ), skóru subškály PANSS pro hodnocení negativních příznaků (N1-N7) ( $r = -0,06$ ,  $p = 0,68$ ) a skóru subškály PANSS všeobecné psychopatologie (G1-G16) ( $r = -0,14$ ,  $p = 0,32$ ). Hodnota poměru glycin/serin negativně asociovala s hodnotou skóru

**Tabulka 9:** Asociace demografických a psychopatologických ukazatelů s hodnotami sérových koncentrací D-serinu a serinu a hodnotou poměru D-serin/serin u skupiny nemocných schizofrenií (*r*, Spearmanův korelační koeficient; *p*, hladina významnosti; \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; PANSS, The Positive and Negative Syndrome Scale; SANS, The Scale for the Assessment of Negative Symptoms).

Demografické a psychopatologické ukazatele	D-serin		serin		D-serin/serin	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Věk	- 0,07	0,64	- 0,20	0,16	0,05	0,73
Trvání nemoci	0,13	0,36	- 0,14	0,33	0,21	0,14
Dávka antipsychotika – chlorpromazinový ekvivalent	0,23	0,10	0,19	0,19	0,18	0,20
PANSS: celkový skór	0,01	0,93	- 0,22	0,12	0,21	0,15
PANSS: skór P1-P7	0,08	0,60	0,14	0,34	- 0,02	0,88
PANSS: skór N1-N7	0,02	0,89	- 0,39	<b>0,005**</b>	<b>0,28</b>	<b>0,049*</b>
PANSS: skór G1-G16	0,01	0,94	- 0,17	0,25	0,19	0,18
SANS: celkový skór	-0,08	0,58	- 0,44	<b>0,001**</b>	0,25	0,08
SANS: citová oploštělost	-0,003	0,98	- 0,38	<b>0,006**</b>	0,26	0,07
SANS: alogie	-0,16	0,27	- 0,37	<b>0,008**</b>	0,14	0,32
SANS: abulie a apatie	-0,04	0,76	- 0,25	0,08	0,10	0,47
SANS: neschopnost prožitku a nespolečenskost	-0,15	0,29	- 0,52	<b>0,00009***</b>	0,26	0,06
SANS: zájem a pozornost	0,07	0,65	- 0,26	0,07	0,27	0,06

subškály PANSS pro hodnocení intenzity pozitivních příznaků (P1-P7) ( $r = -0,32$ ,  $p = 0,02$ ). Nenalezli jsme vztah mezi hodnotou poměru sérových koncentrací glycin/serin a intenzitou negativní symptomatiky hodnocené celkovým skórem SANS ( $r = -0,03$ ,  $p = 0,85$ ) a skóry subškál citové oploštělosti ( $r = 0,0007$ ,  $p = 0,99$ ), alogie ( $r = -0,05$ ,  $p = 0,75$ ), abulie a apatie ( $r = 0,15$ ,  $p = 0,29$ ), neschopnosti prožitku a nespolečenskosti ( $r = -0,08$ ,  $p = 0,60$ ) a skóru subškály zájem a pozornost ( $r = -0,06$ ,  $P = 0,70$ ). Asociace jednotlivých proměnných

s hodnotou sérové koncentrace glycinu a hodnotou poměru glycin/serin jsou shrnuty v tabulce (tab. 10).

Tabulka 10: Asociace demografických a psychopatologických ukazatelů s hodnotou sérové koncentrace glycinu a hodnotou poměru glycin/serin u skupiny nemocných schizofrenií (*r*, Spearmanův korelační koeficient; *p*, hladina významnosti; \* *p* < 0,05; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; PANSS, The Positive and Negative Syndrome Scale; SANS, The Scale for the Assessment of Negative Symptoms).

Demografické a psychopatologické ukazatele	glycin		glycin/serin	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Věk	- 0,17	0,24	- 0,02	0,91
Trvání nemoci	- 0,17	0,24	- 0,13	0,38
Dávka antipsychotika – chlorpromazinový ekvivalent	0,16	0,25	- 0,07	0,62
PANSS: celkový skór	- 0,30	<b>0,03*</b>	- 0,19	0,18
PANSS: skór P1-P7	- 0,06	0,70	- <b>0,32</b>	<b>0,02*</b>
PANSS: skór N1-N7	- <b>0,38</b>	<b>0,007**</b>	- 0,06	0,68
PANSS: skór G1-G16	- 0,23	0,11	- 0,14	0,32
SANS: celkový skór	- <b>0,40</b>	<b>0,004**</b>	- 0,03	0,85
SANS: citová oploštělost	- <b>0,33</b>	<b>0,02*</b>	- 0,0007	0,99
SANS: alogie	- <b>0,37</b>	<b>0,008**</b>	- 0,05	0,75
SANS: abulie a apatie	-0,15	0,30	0,15	0,29
SANS: neschopnost prožitku a nespolečenská	- <b>0,51</b>	<b>0,0002***</b>	- 0,08	0,60
SANS: zájem a pozornost	- 0,24	0,09	- 0,06	0,70

K detailnějšímu posouzení asociace intenzity negativní symptomatiky s hodnotami sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu byla skupina nemocných schizofrenií rozdělena kvartily na skupiny podle dosažené hodnoty celkového skóru SANS. Hodnoty

sérových koncentrací aminokyselin u skupiny 12 nemocných s nejnižší intenzitou negativních příznaků (1. skupina, celkový skóre SANS  $\leq 14,5$ ) byly porovnány s hodnotami u skupiny 12 nemocných s nejvyšší intenzitou negativních příznaků (4. skupina, celkový skóre SANS  $\geq 39$ ) (tab. 11). Mezi oběma skupinami jsme nenalezli rozdíl v hodnotě sérové koncentrace D-serinu ( $p = 0,977$ , Mann-Whitney  $U$  test). U skupiny nemocných s nejvyšší intenzitou negativních příznaků dle celkového skóre SANS (4. skupina) jsme zjistili významně nižší hodnotu sérové koncentrace serinu ( $p = 0,0008$ , t-test) (graf 8), vyšší hodnotu poměru D-serin/serin ( $p = 0,039$ , t-test) a nižší hodnotu sérové koncentrace glycinu ( $p = 0,002$ , t-test) (graf 9).

**Tabulka 11:** Srovnání věku a sérových koncentrací excitačních aminokyselin mezi 1. a 4. skupinou u nemocných schizofrenií rozdělené dle hodnot celkového skóre SANS ( $p$ , hladina významnosti; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; <sup>1</sup>Mann-Whitney  $U$  test, <sup>2</sup>t-test).

Věk / Sérová koncentrace	1. skupina (n=12; SANS: celkový skóre $\leq 14,5$ )			4. skupina (n=12; SANS: celkový skóre $\geq 39$ )			$p$
	průměr $\pm$ SD	medián	min-max	průměr $\pm$ SD	medián	min-max	
Věk (roky)	32,6 $\pm$ 8,9	30,5	21-53	34,4 $\pm$ 12,0	32,5	21-61	0,676 <sup>2</sup>
D-serin ( $\mu\text{mol/l}$ )	3,25 $\pm$ 1,11	3,45	1,18-5,24	3,51 $\pm$ 1,99	2,59	1,57-8,29	0,977 <sup>1</sup>
serin ( $\mu\text{mol/l}$ )	100,1 $\pm$ 25,9	97,8	42,6-136,6	65,9 $\pm$ 16,1	64,3	38,2-94,6	<b>0,0008***<sup>2</sup></b>
D-serin/serin	0,033 $\pm$ 0,012	0,034	0,017-0,059	0,056 $\pm$ 0,031	0,041	0,026-0,110	<b>0,039*<sup>2</sup></b>
glycin ( $\mu\text{mol/l}$ )	210,1 $\pm$ 59,4	196,5	98,9-309,5	137,0 $\pm$ 44,4	121,8	84,2-231,3	<b>0,002**<sup>2</sup></b>
glycin/serin	2,15 $\pm$ 0,50	2,08	1,46-3,16	2,10 $\pm$ 0,49	1,96	1,44-2,91	0,797 <sup>2</sup>

Ve skupině nemocných jsme mezi oběma pohlavími nezjistili rozdíly ve věku, v délce trvání nemoci, v dávce antipsychotik vyjádřené hodnotou chlorpromazinového ekvivalentu ani v intenzitě psychotické symptomatiky vyjádřené hodnotami celkových skóre psychiatrických posuzovacích stupnic PANSS a SANS (tab. 12). Nemocné ženy měly v porovnání s nemocnými muži statisticky nevýznamně nižší sérovou koncentraci D-serinu ( $p = 0,052$ , Mann-Whitney  $U$  test). U nemocných mužů jsme zaznamenali nevýznamnou lineární souvislost mezi hodnotou sérové koncentrace D-serinu a celkovým skórem PANSS ( $r = 0,20$ ,  $p = 0,26$ ) (graf 13), u žen nevýznamnou negativní

asociaci hodnoty koncentrace D-serinu v séru s hodnotou celkového skóru PANSS ( $r = -0,35$ ,  $p = 0,16$ ) (graf 13) a celkového skóru SANS ( $r = -0,30$ ,  $p = 0,24$ ) (graf 14).

**Tabulka 12:** Srovnání demografických a psychopatologických ukazatelů a sérových koncentrací excitačních aminokyselin mezi pohlavími ve skupině nemocných schizofrenií ( $p$ , hladina významnosti; <sup>1</sup> Mann-Whitney  $U$  test, <sup>2</sup> t-test, <sup>3</sup> Kolmogorov-Smirnov test; PANSS, The Positive and Negative Syndrome Scale; SANS, The Scale for the Assessment of Negative Symptoms; SD, směrodatná odchylka).

Demografické a psychopatologické ukazatele / Sérová koncentrace	Muži (n=33)		Ženy (n=17)		$p$
	průměr ± SD	medián	průměr ± SD	medián	
Věk (roky)	34.1 ± 10.5	31	36.9 ± 12.0	33	0,512 <sup>1</sup>
Trvání nemoci (roky)	9.5 ± 10.1	6	11.9 ± 11.1	5	0,781 <sup>1</sup>
Dávka antipsychotika - chlorpromazinový ekvivalent (mg)	342 ± 350	200	348 ± 284	266	0,628 <sup>1</sup>
D-serin (μmol/l)	3.56 ± 1.57	2.91	2.78 ± 1.33	2.46	0,052 <sup>1</sup>
serin (μmol/l)	81,7 ± 27,6	78,6	85,8 ± 28,6	92,5	0,652 <sup>1</sup>
D-serin/serin	0,048 ± 0,025	0,039	0,034 ± 0,013	0,036	0,202 <sup>3</sup>
glycin (μmol/l)	171,6 ± 59,5	173,4	186,1 ± 88,1	182,5	0,492 <sup>2</sup>
glycin/serin	2,14 ± 0,45	2,03	2,12 ± 0,50	2,04	0,909 <sup>2</sup>
PANSS: celkový skór	48.3 ± 10.5	46	50.8 ± 11.8	47	0,456 <sup>2</sup>
SANS: celkový skór	26,4 ± 17,2	23	30.1 ± 21.3	27	0,517 <sup>2</sup>

Při srovnání hodnot sérových koncentrací serinu a glycinu mezi oběma pohlavími jsme ve skupině nemocných schizofrenií a ve skupině zdravých dobrovolníků nezjistili rozdíly (tab. 13). Při srovnání skupin nemocných a zdravých žen jsme nenalezli rozdíly v hodnotách sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu. Nemocní muži měli ve srovnání se zdravými muži významně nižší sérovou koncentraci serinu ( $p = 0,003$ , t-test), glycinu ( $p = 0,0001$ , t-test) a vyšší hodnotu poměru D-serin/serin ( $p = 0,001$ , Mann-Whitney  $U$  test) (tab. 14).

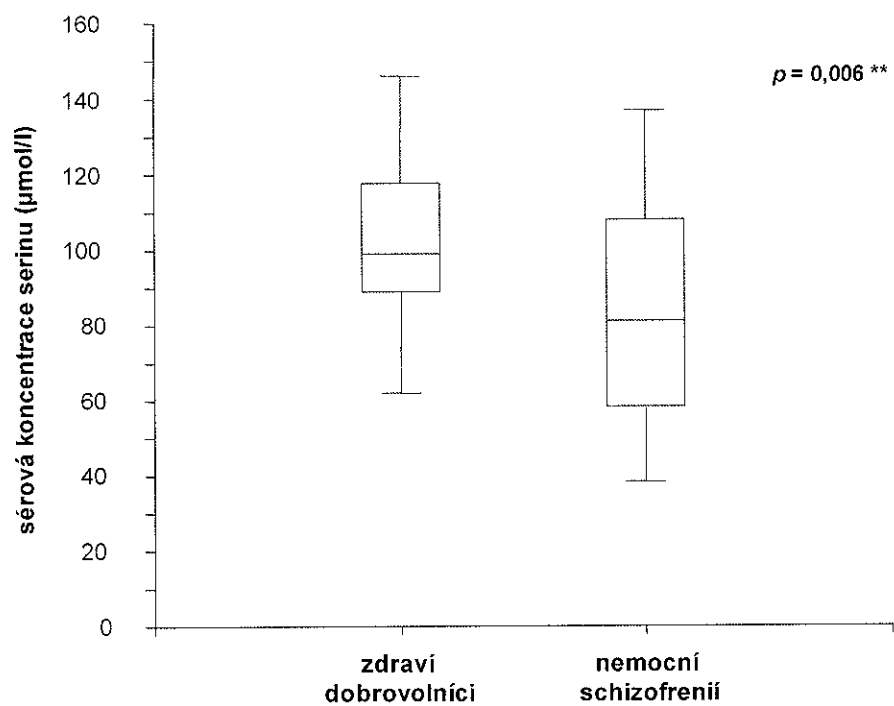
**Tabulka 13:** Srovnání věku a sérových koncentrací excitačních aminokyselin mezi pohlavími ve skupině nemocných schizofrenií a ve skupině zdravých dobrovolníků (*p*, hladina významnosti; <sup>1</sup> Mann-Whitney *U* test, <sup>2</sup> t-test, <sup>3</sup> Kolmogorov-Smirnov test).

Věk / Sérová koncentrace	Nemocní			Zdraví		
	muži (n=33)	ženy (n=17)	<i>p</i>	muži (n=33)	ženy (n=17)	<i>p</i>
	medián	medián		medián	medián	
Věk (roky)	31	33	0,512 <sup>1</sup>	32	32	0,335 <sup>1</sup>
D-serin (μmol/l)	2,91	2,46	0,052 <sup>1</sup>	2,62	2,79	0,247 <sup>1</sup>
serin (μmol/l)	78,6	92,5	0,652 <sup>1</sup>	99,5	96,9	0,773 <sup>2</sup>
D-serin/serin	0,039	0,036	0,202 <sup>3</sup>	0,027	0,030	0,304 <sup>2</sup>
glycin (μmol/l)	173,4	182,5	0,492 <sup>2</sup>	238,5	188,9	0,253 <sup>2</sup>
glycin/serin	2,03	2,04	0,909 <sup>2</sup>	2,28	2,05	0,123 <sup>3</sup>

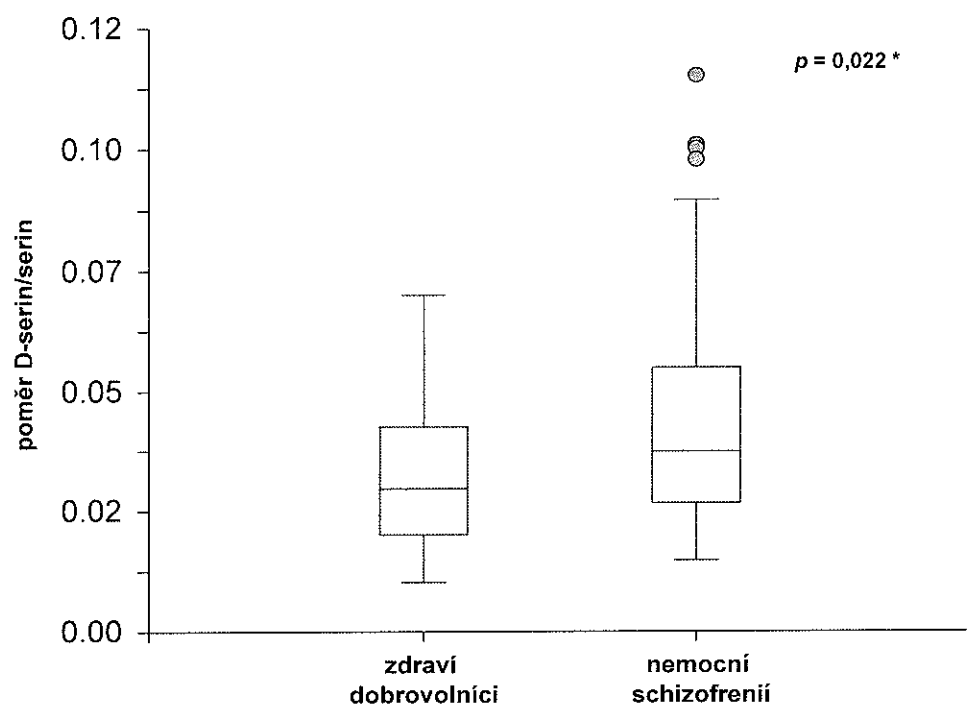
**Tabulka 14:** Srovnání věku a sérových koncentrací excitačních aminokyselin mezi nemocnými schizofrenií a zdravými dobrovolníky ve skupině mužů a ve skupině žen (*p*, hladina významnosti; \*\* *p* < 0,01; \*\*\* *p* < 0,001; <sup>1</sup> Mann-Whitney *U* test, <sup>2</sup> t-test, <sup>3</sup> Kolmogorov-Smirnov test).

Věk / Sérová koncentrace	Muži			Ženy		
	nemocní (n=33)	zdraví (n=33)	<i>p</i>	nemocné (n=17)	zdravé (n=17)	<i>p</i>
	medián	medián		medián	medián	
Věk (roky)	31	32	0,949 <sup>1</sup>	33	32	0,783 <sup>1</sup>
D-serin (μmol/l)	2,91	2,62	0,067 <sup>1</sup>	2,46	2,79	0,209 <sup>1</sup>
serin (μmol/l)	78,6	99,5	0,003** <sup>2</sup>	92,5	96,9	0,113 <sup>1</sup>
D-serin/serin	0,039	0,027	0,001** <sup>1</sup>	0,036	0,030	0,968 <sup>2</sup>
glycin (μmol/l)	173,4	238,5	0,0001*** <sup>2</sup>	182,5	188,9	0,382 <sup>2</sup>
glycin/serin	2,03	2,28	0,454 <sup>3</sup>	2,04	2,05	0,637 <sup>2</sup>

Graf 1: Sérová koncentrace serinu - srovnání skupiny zdravých dobrovolníků a skupiny nemocných schizofrenií (krabičkový graf; \*\*  $p < 0,01$ ).

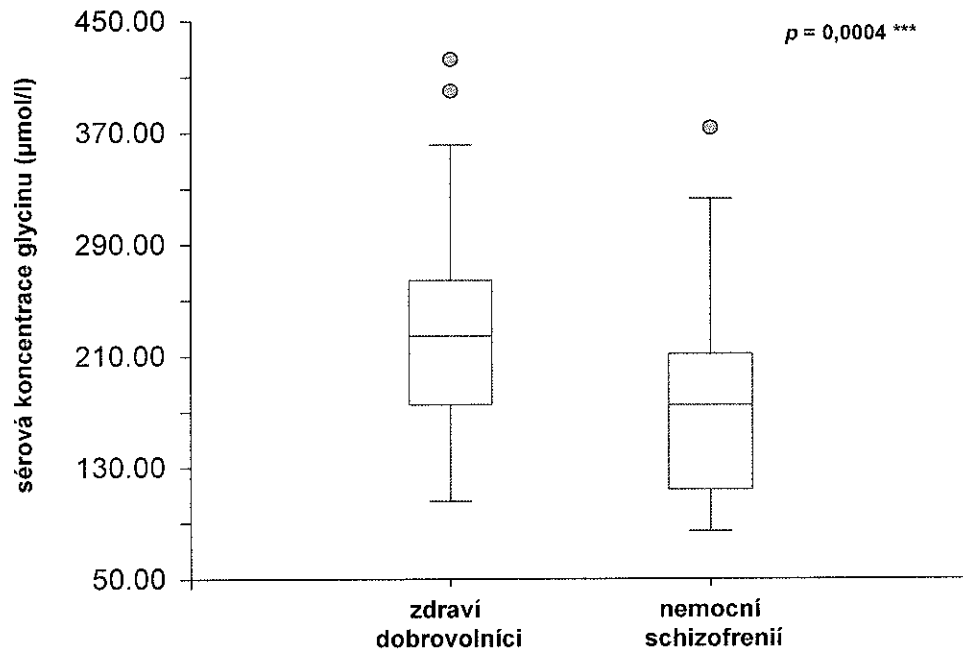


Graf 2: Hodnota poměru D-serin/serin - srovnání skupiny zdravých dobrovolníků a skupiny nemocných schizofrenií (krabičkový graf; \*  $p < 0,05$ ).

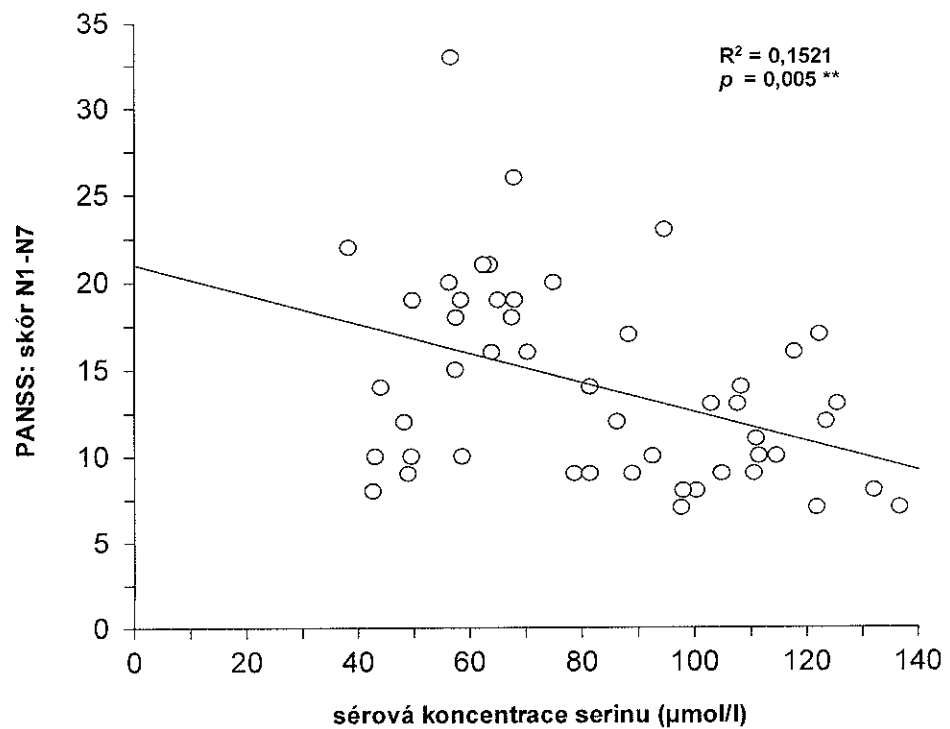




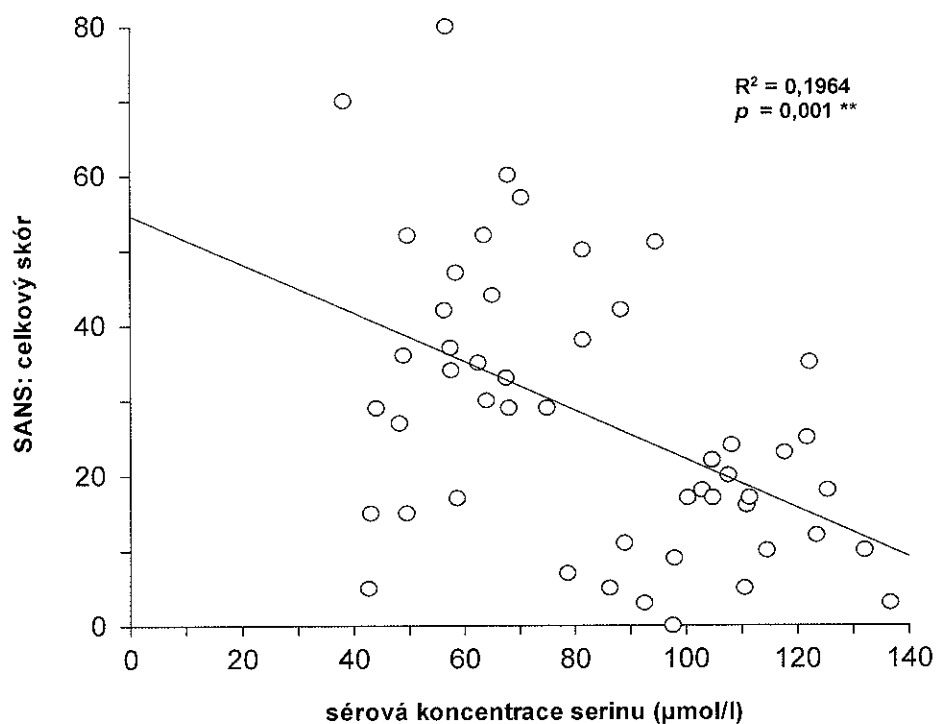
Graf 3: Sérová koncentrace glycinu - srovnání skupiny zdravých dobrovolníků a skupiny nemocných schizofrenií (krabičkový graf; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



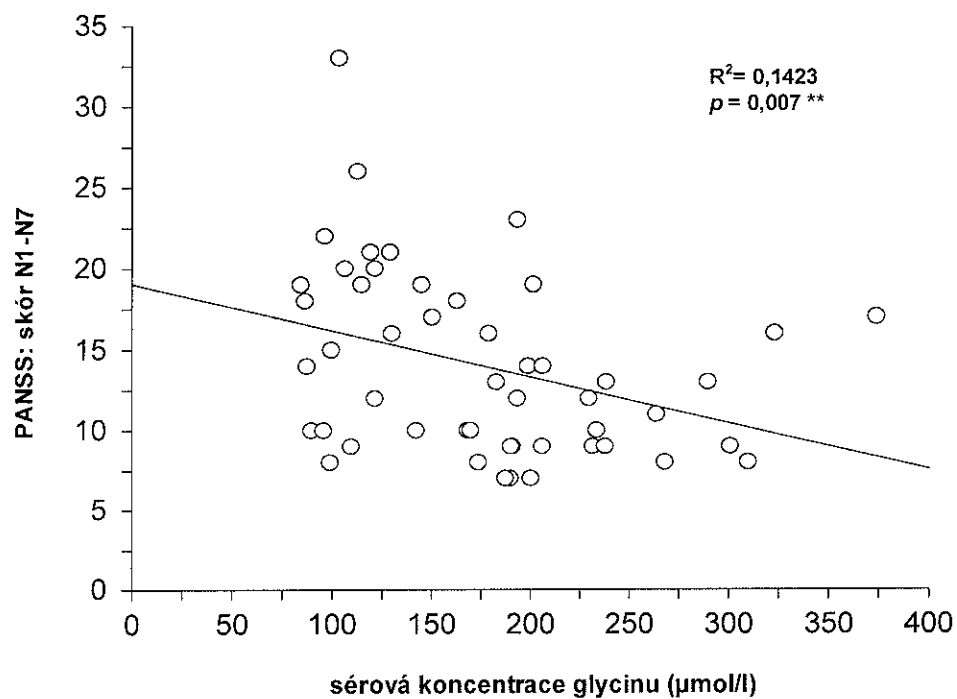
Graf 4: Vztah sérové koncentrace serinu a skóru subškály N1-N7 PANSS u skupiny nemocných schizofrenií (bodový graf s regresní přímkou;  $R^2$ , koeficient determinace; \*\*  $p < 0,01$ ).



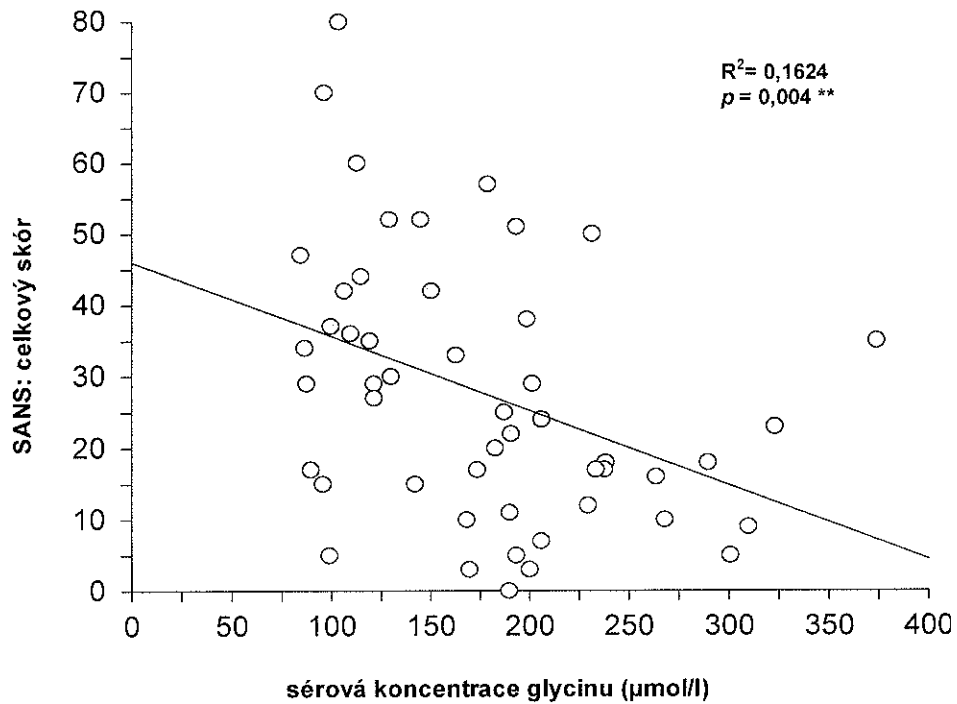
Graf 5: Vztah sérové koncentrace serinu a celkového skóru SANS u skupiny nemocných schizofrenií (bodový graf s regresní přímkou;  $R^2$ , koeficient determinace;  $** p < 0,01$ ).



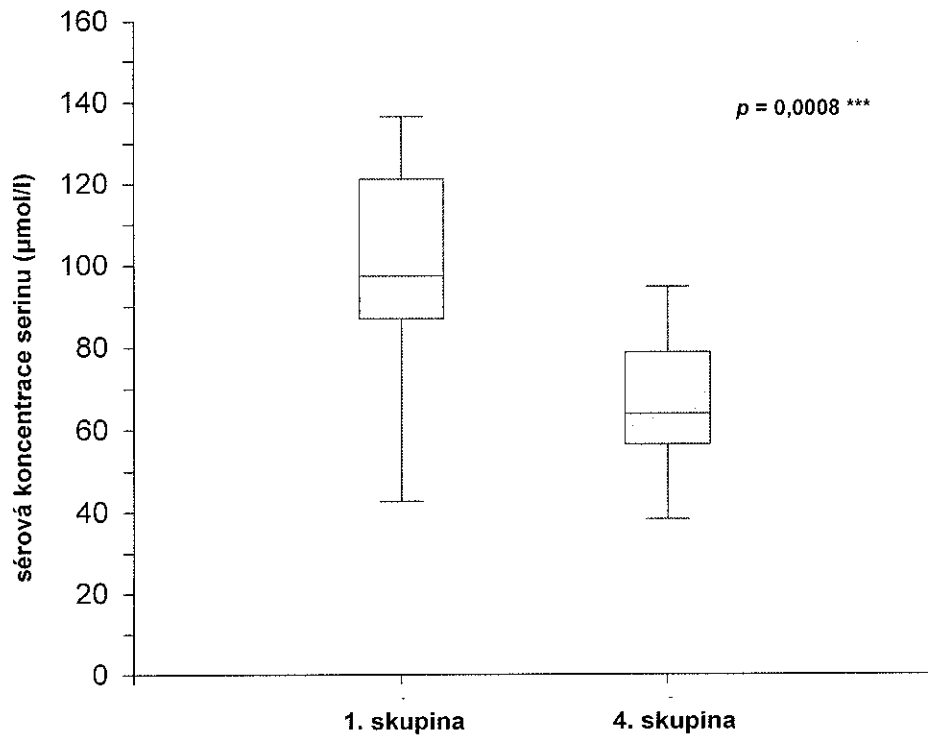
Graf 6: Vztah sérové koncentrace glycinu a skóru subskály N1-N7 PANSS u skupiny nemocných schizofrenií (bodový graf s regresní přímkou;  $R^2$ , koeficient determinace;  $** p < 0,01$ ).



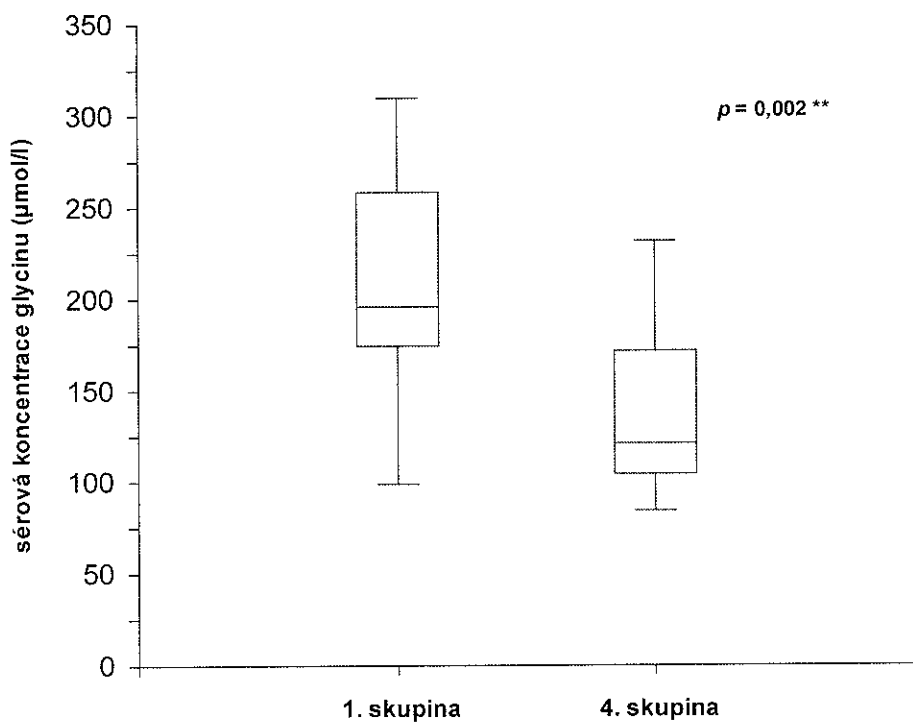
Graf 7: Vztah sérové koncentrace glycinu a celkového skóru SANS u skupiny nemocných schizofrenií (bodový graf s regresní přímkou;  $R^2$ , koeficient determinace; \*\*  $p < 0,01$ ).



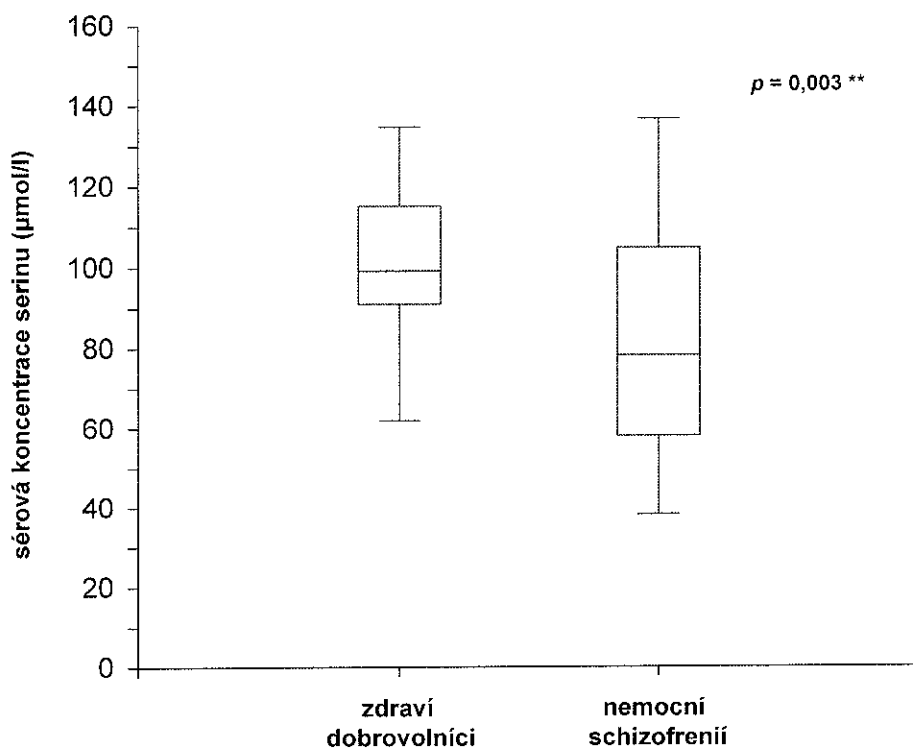
Graf 8: Sérová koncentrace serinu - srovnání 1. a 4. skupiny nemocných schizofrenií rozdělených dle hodnoty celkového skóru SANS (krabičkový graf; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



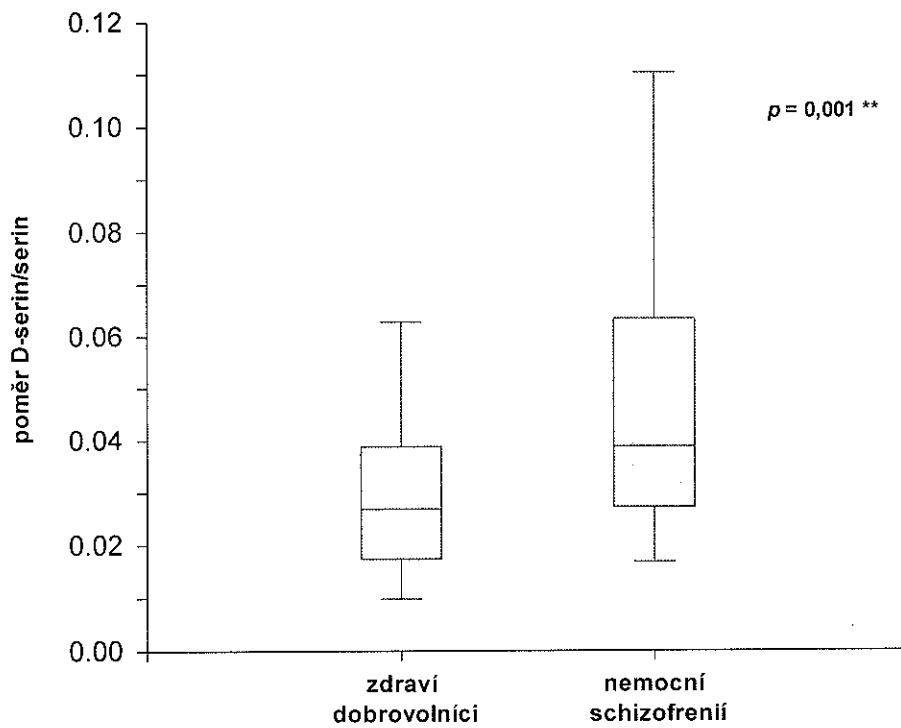
Graf 9: Sérová koncentrace glycinu - srovnání 1. a 4. kvartilu ve skupině nemocných schizofrenií rozdělené (dle hodnoty celkového skóru SANS (krabičkový graf; \*\*  $p < 0,01$ ).



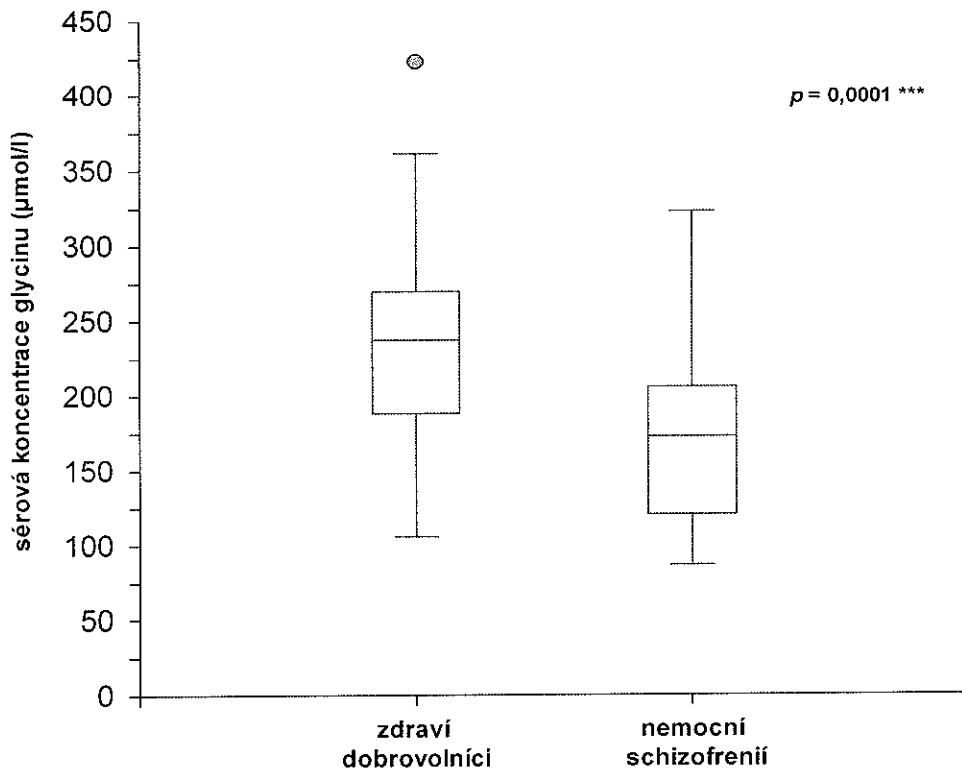
Graf 10: Sérová koncentrace serinu - srovnání nemocných schizofrenií a zdravých dobrovolníků ve skupině mužů (krabičkový graf; \*\*  $p < 0,01$ ).



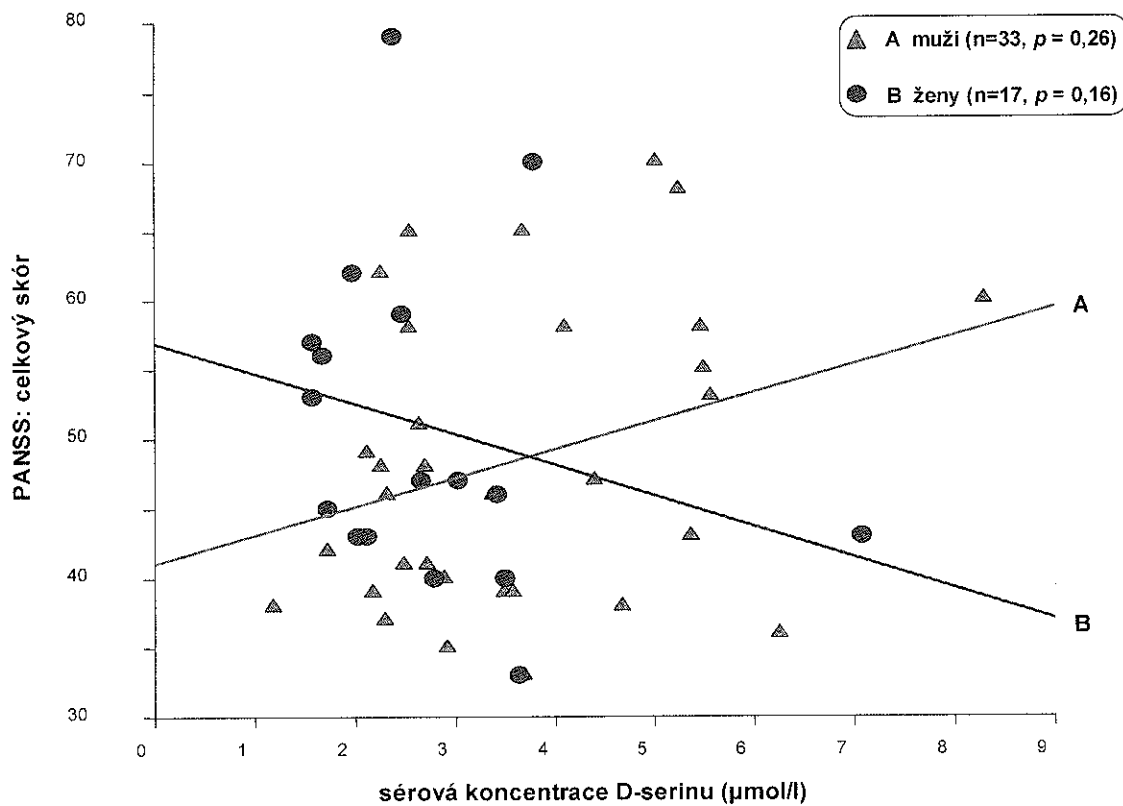
Graf 11: Hodnota poměru D-serin/serin - srovnání nemocných schizofrenií a zdravých dobrovolníků ve skupině mužů (krabičkový graf; \*\*  $p < 0,01$  ).



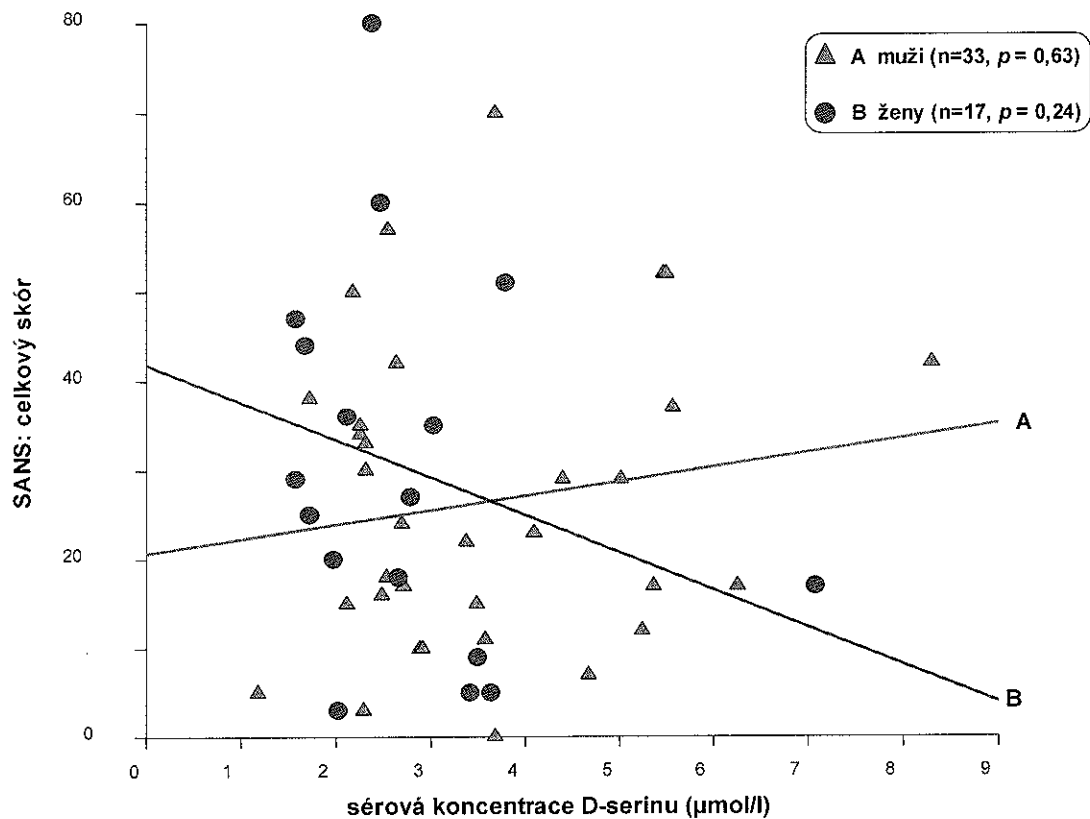
Graf 12: Sérová koncentrace glycinu - srovnání nemocných schizofrenií a zdravých dobrovolníků ve skupině mužů (krabičkový graf; \*\*\*  $p < 0,001$  ).



**Graf 13:** Vztah sérové koncentrace D-serinu a celkového skóru PANSS - pohlavní rozdíly (bodový graf s regresními přímkami).



**Graf 14:** Vztah sérové koncentrace D-serinu a celkového skóru SANS - pohlavní rozdíly (bodový graf s regresními přímkami).



## 7. Diskuze

U souboru 50 ambulantně léčených nemocných schizofrenií jsme ve srovnání s věkově a pohlavím zpárovaným souborem 50 zdravých dobrovolníků nezjistili rozdíl v hodnotě sérové koncentrace D-serinu. Nepotvrdili jsme tak náš předpoklad laboratorně detekovatelné změny sérové koncentrace D-serinu u schizofrenie (hypotéza 1). U nemocných jsme naopak našli sníženou sérovou koncentraci serinu a vyšší hodnotu poměru D-serin/serin. Nepodařilo se tedy potvrdit výsledky předešlých studií, ve kterých byla v rozporu s našimi nálezy u nemocných schizofrenií zjištěna snížená sérová koncentrace D-serinu (*Hashimoto et al. 2003; Yamada et al. 2005*), zvýšená koncentrace serinu a nižší podíl D-serinu v serinu (*Hashimoto et al. 2003*). U nemocných jsme nezaznamenali předpokládaný inverzní vztah mezi hodnotou sérové koncentrace D-serinu a intenzitou negativních příznaků (hypotéza 3). Sérová koncentrace D-serinu nesouvisela ani s intenzitou pozitivních příznaků.

S intenzitou negativních příznaků naopak v našem souboru negativně asociovala hodnota sérové koncentrace serinu. Přítomnost výraznější negativní symptomatiky tak byla u nemocných spojena s nižší koncentrací serinu a vyšším podílem D-serinu v celkovém serinu v krevním séru. Tento nálezný nebyl zatím v literatuře publikován a mohl by souviset s účinky agonistů NMDA receptoru na negativní příznaky (*Tsai et al. 1998; Evins et al. 2002; Heresco-Levy et al. 2005; Tuominen et al. 2005*).

V klinických studiích byly ve srovnání s nepychotickými nemocnými nebo zdravými subjekty u nemocných s psychózou (*Waziri et al. 1983; Waziri et al. 1985; Wilcox et al. 1985; Waziri & Mott, 1986*) a později také u nemocných schizofrenií (*Macciardi et al. 1990; Baruah et al. 1991; Sumiyoshi et al. 2004*) zjištěny vyšší plazmatické koncentrace serinu a nižší plazmatická aktivita serinhydroxymetyltransferázy (*Waziri et al. 1985; Wilcox et al. 1985; Waziri & Mott, 1986*). V některých studiích však nebyly rozdíly v koncentraci serinu mezi nemocnými schizofrenií a zdravými subjekty zaznamenány ani v plazmě (*Perry & Hansen, 1985; Carl et al. 1992; Neeman et al. 2005*) ani v mozkomíšním moku (*Perry & Hansen, 1985*). Snížená sérová koncentrace serinu, která je v souladu s naším nálezem, byla zjištěna jen když byla studována u skupiny nemocných s rezistentní schizofrenií (*Tortorella et al. 2001*).

Ve srovnání s nemocnými muži jsme u nemocných žen našli nevýznamně nižší hodnoty sérové koncentrace D-serinu, které asociovaly s intenzitou psychopatologie negativně. Korelace těchto proměnných byly ale jen slabé a statisticky nevýznamné, stejně tak jako vztah sérových koncentrací D-serinu a intenzity psychopatologie u mužů. Nález rozdílu sérových

koncentrací D-serinu u nemocných schizofrenií nebo u zdravých subjektů ve vztahu k pohlaví nebyl zatím literatuře publikován. Pohlavní rozdíly v hodnotách sérových koncentrací aminokyselin by mohly být způsobeny pohlavními odlišnostmi hormonálních profilů. Při srovnání hodnot sérových koncentrací serinu a glycinu jsme pohlavní rozdíly ve skupině nemocných schizofrenií ani ve skupině zdravých dobrovolníků nezaznamenali. V našem souboru se nám tak nepodařilo replikovat nález zvýšené sérové koncentrace serinu u mužů nemocných schizofrenií (Tomiya et al. 2007). Při srovnání skupin nemocných a zdravých žen jsme nezjistili rozdíly v hodnotách sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu. Nemocní muži měli ve srovnání se zdravými muži významně nižší sérovou koncentraci serinu, glycinu a vyšší podíl D-serinu v celkovém serinu. Pohlavní rozdíly markerů glutamatergní neurotransmise u schizofrenie jsou tak zajímavým tématem pro další výzkum.

Vztah mezi sérovou koncentrací D-serinu a dysfunkcí glutamatergní neurotransmise jako patogenetického faktoru schizofrenie předpokládá souvislost mezi „poolem“ D-serinu v mozku a v periferních tkáních. Také klinický účinek adjuvantní léčby D-serinem na schizofrenní příznaky u nemocných léčených antipsychotiky (Tsai et al. 1998; Heresco-Levy et al. 2005) musí být spojen s průchodem periferně podaného D-serinu přes HEB. V CNS je endogenní D-serin syntetizován výlučně v astrocytech šedé hmoty mozkové (Schell et al. 1995; Schell et al. 1997; Wolosker et al. 1999). V nízkých koncentracích se ale D-serin vyskytuje i v krevním séru, slinách a moči a jeho syntéza může u savců probíhat i v periferních tkáních (Hashimoto et Oka, 1997). Pravděpodobný periferní zdroj D-serinu jsou játra, protože jen v hepatocytech byla, kromě astrocytů v CNS, nalezena významná hladina serinracemázy (Schell et al. 2004). Transport D-serinu v periferních tkáních probíhá prostřednictvím „exchangerů“ nebo transportérů a z organismu se odstraňuje ledvinami. Mechanizmy transportu D-serinu přes HEB nebyly ale dosud objasněny. Transport neutrálních AMK přes HEB je limitován. U D-serinu byl však prokázán preferenční stereoselektivní transport (Bauer et al. 2005). D-serin prochází HEB lépe než glycin (Oldendorf, 1971; Tsai et al. 1998; Wolosker et al. 2002) a ve větším množství proniká do mozku i ve srovnání s L-serinem. D- a L-serin procházejí HEB díky podobným transportním systémům. Hlavní transportní mechanismus D- a L-serinu v HEB je zajišťován na  $\text{Na}^+$  nezávislým transportním systémem, který by mohl být jedním z kandidátů pro dodávku exogenního D-serinu do CNS (Yamamoto et al. 2001). Souvislost mezi „poolem“ D-serinu v periférii a v CNS a možnost transportu přes HEB potvrzují výsledky studií na hlodavcích. Po intraperitoneálním podání D-serinu dochází u krys ke změnám koncentrací D-serinu ve všech periferních tkáních a ve všech oblastech CNS



(Hashimoto et Chiba, 2004). Je tedy velmi pravděpodobné, že existuje přímý vztah mezi koncentrací D-serinu v krevním séru a v CNS. Sérová koncentrace D-serinu by tak může být vhodným markerem funkční úrovně glutamátergní neurotransmise v CNS.

U souboru 50 nemocných schizofrenií jsme ve srovnání se zdravými dobrovolníky zjistili nižší sérovou koncentraci glycinu a potvrdili jsme tak náš předpoklad (hypotéza 2). Tento výsledek je v soulase s nálezy nižších koncentrací glycinu v krevní plazmě u nemocných schizofrenií (Sumiyoshi et al. 2004; Neeman et al. 2005) a mohl by svědčit pro změny metabolismu glycinu u schizofrenie. Hodnota sérové koncentrace glycinu u nemocných v našem souboru negativně asociovala s intenzitou negativních příznaků. Potvrdili jsme tak náš předpoklad, že přítomnost výraznější negativní symptomatiky bude u nemocných spojena s nižší koncentrací glycinu v krevním séru (hypotéza 4). Souvislost nižší koncentrace glycinu s vyšší intenzitou negativních příznaků byla naznačena ve výsledcích některých klinických studií (Goff et al. 1996; Heresco-Levy et al. 1998; Sumiyoshi et al. 2004, Neeman et al. 2005). V naší studii jsme u nemocných ve srovnání se zdravými dobrovolníky nezaznamenali rozdíly v hodnotě poměru sérové koncentrace glycinu a serinu. Nepodařilo se nám tak replikovat dříve publikované nálezy nižší hodnoty poměru glycin/serin v krevní plazmě u schizofrenie (Sumiyoshi et al. 2004; Neeman et al. 2005). Také vztah mezi sérovou koncentrací glycinu a dysfunkcí glutamátergní neurotransmise jako patogenetického faktoru schizofrenie předpokládá souvislost mezi „poolem“ glycinu v mozku a v periferních tkáních. Klinický účinek adjuvantní léčby glycinem (Heresco-Levy et Javitt, 2004; Javitt et al. 1994; Javitt et al. 2001) úzce souvisí s transportem glycinu přes HEB. Přestože glycin proniká HEB hůře než D-serin (Oldendorf, 1971; Tsai et al. 1998; Wolosker et al. 2002), také periferní podání glycinu vede ke zvýšení koncentrace glycinu v mozkomíšním moku (Henderson et al. 1990).

Nálezy sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu v klinických studiích nejsou u nemocných schizofrenií jednotné. Může to být způsobeno malými soubory nebo rozdíly v charakteristikách populací nemocných, rozdíly ve vlivu účinků antipsychotické medikace, dietních návyků nebo rozdílnými metodami stanovení sérových koncentrací excitačních aminokyselin. Jen do dvou studií bylo ve srovnání s naším souborem zařazeno více nemocných schizofrenií (Sumiyoshi et al. 2004; Neeman et al. 2005), soubory v ostatních studiích byly menší. Do naší klinické studie byli zařazeno 50 nemocných v ambulantní péči, kteří byli léčeni převážně antipsychotiky 2. generace a z klinického hlediska byli ve stabilním stavu nevyžadujícím hospitalizaci. V kontrastu s našimi nálezy byly vyšší sérové koncentrace serinu prokázány u populace antipsychotiky neléčených hospitalizovaných

a nehospitalizovaných nemocných (*Sumiyoshi et al. 2004*) a také u populace akutně hospitalizovaných nemocných léčených antipsychotiky 1. a 2. generace (*Baruah et al. 1991*). Hashimoto rozdíl v sérových koncentracích D-serinu a serinu mezi skupinou antipsychotiky léčených a neléčených nemocných schizofrenií nezjistil (*Hashimoto et al. 2003*). V souhlase s našimi výsledky také nenalezl souvislost sérové koncentrace D-serinu a serinu s dávkou antipsychotika vyjádřenou chlopromazinovým ekvivalentem (*Hashimoto et al. 2003*). Nález snížení sérové koncentrace serinu po léčbě antipsychotiky 1. generace byl ale již publikován (*Sumiyoshi et al. 2004*) a vliv farmakoterapie na naše výsledky nelze vyloučit.

Přestože nebyl u nemocných schizofrenií prokázán vliv lačnění na plazmatickou koncentraci glycinu a serinu (*Carl et al. 1992*), může být koncentrace aminokyselin v krevním séru ovlivněna příjmem aminokyselin obsažených v potravě (*Friedman, 1999*). V některých klinických studiích byla ke stanovení sérových koncentrací aminokyselin od subjektů odebírána krev nalačno po předchozí speciální dietě (*Baruah et al. 1991; Tortorella et al. 2001*). V jiných studiích odběru nalačno žádná dietní opatření nepředcházela (*Hashimoto et al. 2003; Neeman et al. 2005*). V naší studii jsme vzorek krve odebírali ráno po nočním 12 hodinovém lačnění. Průměrné sérové koncentrace D-serinu u nemocných a zdravých v naší studii byly ve srovnání s hodnotami zjištěnými stejnou metodou (HPLC), bez předchozí speciální diety a v podobně velkém souboru nemocných a kontrol (*Hashimoto et al. 2003*) nižší. Při srovnání s koncentracemi zjištěnými u nemocných po předchozí speciální dietě (*Baruah et al. 1991; Tortorella et al. 2001*) byla u našich nemocných nižší také průměrná koncentrace glycinu a serinu. Průměrné hodnoty sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu se v naší studii u skupiny nemocných schizofrenií a skupiny zdravých dobrovolníků pohybovaly v mezích laboratorních referenčních hodnot (*Brückner et al. 1995; Neeman et al. 2005; Heresco-Levy et al. 2007*)

Další příčinou nekonzistentních výsledků může být rozdílná metodika stanovení sérových koncentrací aminokyselin v jednotlivých studiích. Senzitivita metody stanovení je důležitá zejména u D-serinu, jehož fyziologické koncentrace jsou v krevním séru u zdravých lidí velmi nízké. V publikovaných klinických studiích byla ke stanovení plazmatické koncentrace serinu použita plynová chromatografie (*Waziri & Mott, 1986*), ionexová chromatografie (*Perry & Hansen, 1985; Neeman et al. 2005*), plynová chromatografie a hmotnostní spektrometrie (*Baruah et al. 1991*) a vysokotlaká kapalinová chromatografie (*Waziri & Mott, 1986; Carl et al. 1992*). V naší studii jsme stanovovali sérové koncentrace aminokyselin pomocí vysokovýkonné kapalinové chromatografie (HPLC) stejně tak jako ve studiích, jejichž výsledky jsou v rozporu s našimi nálezy (*Hashimoto et al. 2003; Sumiyoshi et al.*

2004; Yamada et al. 2005). Náš nález nižší koncentrace serinu u nemocných schizofrenií při použití metody HPLC koresponduje jen s výsledkem studie Tortorelly (Tortorella et al. 2001).

## 8. Závěr

V této práci jsme se snažili u nemocných schizofrenií prokázat souvislost sérových koncentrací D-serinu a glycinu, potencionálních biochemických markerů glutamátergní dysfunkce v CNS, s přítomností a intenzitou negativních příznaků. U nemocných jsme potvrdili hypotézu negativní asociace sérové koncentrace glycinu s intenzitou negativních příznaků. Sérová koncentrace glycinu byla u nemocných ve srovnání se zdravými subjekty nižší. U nemocných jsme ale nenalezli vztah mezi sérovou koncentrací D-serinu a intenzitou negativních příznaků ani přítomnost nižší sérové koncentrace D-serinu ve srovnání se zdravými subjekty. U nemocných byl vyšší podíl D-serinu v serinu při nižší hodnotě sérové koncentrace serinu, která negativně asociovala s intenzitou negativních příznaků. Tento nález je v rozporu s výsledky většiny dosud publikovaných studií a může souviset s odlišnou laboratorní metodikou nebo rozdílnou populací nemocných. Lze ho však dát do souvislosti s účinky agonistů NMDA receptoru na negativní příznaky.

Objasnění rozdílů v nálezech sérových koncentrací D-serinu, serinu a glycinu má u nemocných schizofrenií velký praktický význam vzhledem k perspektivě léčby agonisty NMDA receptorů. Pro poznání role dysfunkce glutamátergního systému v patogenezi schizofrenie je důležité stanovení biochemických markerů funkční úrovně tohoto systému v CNS. Hledání vztahu sérových koncentrací excitačních aminokyselin ke specifickým psychopatologickým dimenzím umožní laboratorní a klinickou diferenciaci schizofrenních psychóz. Předpokládáme, že stanovení biochemických a klinických profilů povede k identifikaci specifických subtypů schizofrenie. Formulování takové typologie umožní cílenou léčbu na ovlivnění glutamátergní dysfunkce v CNS. Výsledky naší studie posilují význam stanovení sérové koncentrace glycinu při hledání subtypu schizofrenního onemocnění s převahou negativních příznaků.

Klinická studie, která je podkladem dizertační práce, byla realizována za finanční podpory výzkumného záměru MSM 0021620816.

## 9. Literatura

1. Anand A, Charney DS, Oren DA, Berman RM. Attenuation of the Neuropsychiatric Effects of Ketamine With Lamotrigine. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57:270-276.
2. Andreasen NC, Olsen S. Negative versus positive schizophrenia. Definition and validation. *Arch Gen Psychiat* 1982; 39:789-794.
3. Andreasen NC. The Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS): conceptual and theoretical foundations. *Br J Psychiatry Suppl* 1989; (7):49-58.
4. Andreasen NC, Flaum M, Swayze II VW, Tyrrell G, Arndt S. Positive and negative symptoms in schizophrenia. A critical reappraisal. *Arch Gen Psychiat* 1990; 47: 615-621.
5. Aragón C, López-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransmitters. *Eur J Pharmacology* 2003; 479:249-262.
6. Baruah S, Waziri R, Hegwood TS, Mallis LM. Plasma serine in schizophrenics and controls measured by gas chromatography-mass spectrometry. *Psychiatry Res* 1991; 37:261-270.
7. Bauer D, Hamacher K, Bröer S, Pauleit D, Palm C, Zilles K, Coenen HH, Langen KJ. Preferred stereoselective brain uptake of D-serine - a modulator of glutamatergic neurotransmission. *Nucl Med Biol* 2005; 32(8):793-797.
8. Bazire S. *Psychotropic Drug Directory* 2002. Quay Books Division, Mark Allen Publishing Ltd. UK:143.
9. Bendikov I, Nadri C, Amar S, Panizzutti R, De Miranda J, Wolosker H, Agam G. A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007; 90(1-3):41-51.
10. Berger AJ, Dieudonné S, Ascher P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J Neurophysiol* 1998; 80(6):3336-3340.
11. Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15730-15734.
12. Berman KF, Weinberger DR. Prefrontal dopamine and deficit symptoms in schizophrenia. In Greden JF, Tandon R et al. *Negative schizophrenic symptoms*. Washington D.C.: American Psychiatric Press 1990: 81-95.
13. Borowsky B, Mezey E, Hoffman BJ. Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene. *Neuron* 1993; 10(5):851-863.

14. Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomeis A, Weinberger DR, Weisenfeld N, Malhotra AK, Eckelman WC. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine - induced synaptic concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(6): 2569-2574.
15. Brückner H, Westhauser T, Godel H. Liquid chromatographic determination of D- and L-amino acids by derivatization with o-phthaldialdehyde and N-isobutryryl-L-cysteine. Applications with reference to the analysis of peptidic antibiotics, toxins, drugs and pharmaceutically used amino acids. *J Chromatogr A* 1995; 711(1):201-215.
16. Buchanan RW, Javitt DC, Marder SR, Schooler NR, Gold JM, McMahon RP, Heresco-Levy U, Carpenter WT. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. *Am J Psychiatry* 2007; 164(10):1593-602.
17. Bunney BG, Bunney WE Jr., Carlsson A. Schizophrenia and glutamate. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press Ltd. 1995; Chapter 101:1205-1214.
18. Carl GF, Brogan MP, Young BK. Is plasma serine a marker for psychosis? *Biol Psychiatry* 1992; 31:1130-1135.
19. Carlsson A. Antipsychotic drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1978; 135:165-173.
20. Carpenter Jr. WT, Heinrichs DW, Wagman AMI. Deficit and nondeficit forms of schizophrenia: the concept. *Am J Psychiat* 1988; 145:578-583.
21. Cascella NG, Macciardi F, Cavallini C, Smeraldi E. D-cycloserine adjuvant therapy to conventional neuroleptic treatment in schizophrenia: an open-label study. *J Neural Transm Gen Sect* 1994; 95(2):105-111.
22. Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 2002; 415(6873):793-798.
23. Cook SP, Galve-Roperh I, Martinez del Pozo A, Rodriguez-Crespo I. Direct calcium binding results in activation of brain serine racemase. *J Biol Chem* 2002; 277(31):27782-27792.
24. Cross AJ, Crow TJ, Owen F. 3H-Flupenthixol binding in post-mortem brains of schizophrenics: evidence for a selective increase in dopamine D2 receptors. *Psychopharmacology* 1981; 74(3):122-124.
25. Crow TJ. Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J* 1980; 280:66-68.

26. Crow TJ. The two-syndrome concept: origins and current status. *Schizophr Bull* 1985; 11:471-486.
27. Cubelos B, Giménez C, Zafra F. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 2005; 15(4):448-459.
28. Dao-Castellana MH, Paillère-Martinot ML, Hantraye P, Attar-Lévy D, Rémy P, Crouzel C, Artiges E, Féline A, Syrota A, Martinot JL. Presynaptic dopaminergic function in the striatum of schizophrenic patients. *Schizophrenia Research* 1997; 23(2): 167-174.
29. De Miranda J, Panizzutti R, Foltyn VN, Wolosker H. Cofactors of serine racemase that physiologically stimulate the synthesis of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor coagonist D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(22):14542-14547.
30. Domino EF, Luby E. Abnormal mental states induced by phencyclidine as a model of schizophrenia. In Domino EF. *PCP (Phencyclidine): historical and current perspectives*. Michigan: NPP Books 1981:401-418.
31. Duncan EJ, Szilagyi S, Schwartz MP, Bugarski-Kirola D, Kunzova A, Negi S, Stephanides M, Efferen TR, Angrist B, Peselow E, Corwin J, Gonzenbach S, Rotrosen JP. Effects of D-cycloserine on negative symptoms in schizophrenia. *Schizophr Res* 2004; 71(2-3):239-248.
32. Dunlop DS, Neidle A. Regulation of serine racemase activity by amino acids. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 133(2):208-214.
33. Dursun SM, Deakin JFW. Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *Journal of Psychopharmacology* 2001; 15(4):297-301.
34. Emmett MR, Mick SJ, Cler JA, Rao TS, Lyengar S, Wood PL. Actions of D-cycloserine at the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor site in vivo. *Neuropharmacology* 1991; 30:1167-1171.
35. Eschenbrenner M, Jorns MS. Cloning and mapping of the cDNA for human sarcosine dehydrogenase, a flavoenzyme defective in patients with sarcosinemia. *Genomics* 1999; 59:300-308.
36. Evins AE, Fitzgerald SM, Wine L, Rosselli R, Goff DC. Placebo-controlled trial of glycine added to clozapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157:826-828.
37. Evins AE, Amico E, Posever TA, Toker R, Goff DC. D-cycloserine added to risperidone in patients with primary negative symptoms of schizophrenia. *Schizophr Res* 2002; 56(1-2):19-23.
38. Friedman M. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *J Agric Food Chem* 1999; 47:3457-3479.

39. Fujihira T, Kanematsu S, Umino A, Yamamoto N, Nishikawa T. Selective increase in the extracellular D-serine contents by D-cycloserine in the rat medial frontal cortex. *Neurochem Int* 2007; 51(2-4):233-236.
40. Gammelsaeter R, Frøyland M, Aragón C, Danbolt NC, Fortin D, Storm-Mathisen J, Davanger S, Gundersen V. Glycine, GABA and their transporters in pancreatic islets of Langerhans: evidence for a paracrine transmitter interplay. *J Cell Sci* 2004; 117(17):3749-3758.
41. Gao XM, Shirikawa O, Tamminga CA. Delayed phencyclidine-induced alterations in local cerebral glucose utilization in rat brain. *Neuro Sci Abst* 1991; 575:1473.
42. Goff DC, Tsai G, Manoach DS, Coyle JT. A dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptic for negative symptoms in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1995; 152:1213-1215.
43. Goff DC, Tsai G, Manoach DS, Flood J, Darby DG, Coyle JT. D-cycloserine added to clozapine for patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996; 153(12): 1628-1630.
44. Goff DC, Tsai G, Levitt J, Amico E, Manoach DS, Schoenfeld DA, Hayden DL, McCarley R, Coyle JT. A placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56(1):21-27.
45. Goff DC, Leahy L, Berman I, Posever T, Herz L, Leon AC, Johnson SA, Lunch G. A placebo-controlled pilot study of the ampakine CX516 added to clozapine in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21(5):484-487.
46. Goff DC, Herz L, Posever T, Shih V, Tsai G, Henderson DC, Freudenreich O, Evins AE, Yovel I, Zhang H, Schoenfeld D. A six-month, placebo-controlled trial of D-cycloserine co-administered with conventional antipsychotics in schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berl.)* 2005; 179(1):144-150.
47. Greenamyre JT, Porter RHP. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 1994; 44:S7-S13.
48. Hashimoto A, Nishikawa T, Konno R, Niwa A, Yasumura Y, Oka T, Takahashi K. Free D-serine, D-aspartate and D-alanine in central nervous system and serum in mutant mice lacking D-amino acid oxidase. *Neurosci Lett* 1993; 152:33-36.
49. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience* 1995; 66:635-643.
50. Hashimoto A, Oka T. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Progress in Neurobiology* 1997; 52:325-353.

51. Hashimoto A. Effect of the intracerebroventricular and systemic administration of L-serine on the concentrations of D- and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *Brain Research* 2002; 955(1-2):214-220.
52. Hashimoto K, Fukushima T, Shimizu E, Komatsu N, Watanabe H, Shinoda N, Nakazato M, Kumakiri C, Okada S, Hasegawa H, Imai K, Iyo M. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60(6):572-576.
53. Hashimoto A, Chiba Y. Effect of systemic administration of D-serine on the levels of D- and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *European Journal of Pharmacology* 2004; 495(2-3):153-158.
54. Hashimoto K, Engberg G, Shimizu E, Nordin C, Lindstrom LH, Iyo M. Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29(5):767-769.
55. Hayashi F, Takahashi K, Nishikawa T. Uptake of D- and L-serine in C6 glioma cells. *Neurosci Lett* 1997; 239:85-88.
56. Henderson G, Johnson JW, Ascher P. Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J Physiol (Lond)* 1990; 430:189-212.
57. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Horowitz A, Kelly D. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of glycine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1996; 169:610-617.
58. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Silipo G, Shimoni J. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of D-cycloserine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 1998; 1(2):131-135.
59. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G, Lichtenstein M. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1999; 56(1):29-36.
60. Heresco-Levy U, Ermilov M, Shimoni J, Shapira B, Silipo G, Javitt DC. Placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics, olanzapine, or risperidone in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002; 159(3):480-482.
61. Heresco-Levy U, Ermilov M, Lichtenberg P, Bar G, Javitt DC. High-dose glycine added to olanzapine and risperidone for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; 55(2):165-171.
62. Heresco-Levy U, Javitt DC. Comparative effects of glycine and D-cycloserine on persistent negative symptoms in schizophrenia: a retrospective analysis. *Schizophr Res* 2004; 66(2-3): 89-96.



63. Heresco-Levy U, Javitt DC, Ebstein R, Vass A, Lichtenberg P, Bar G, Catinari S, Ermilov M. D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment -refractory schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2005; 57(6): 577-585.
64. Hietala J, Syvälahti E, Vuorio K, Rökköläinen V, Bergman J, Haaparanta M, Solin O, et al. Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-naive schizophrenic patients. *Lancet* 1995; 346:1130-1131.
65. Horiike K, Tojo H, Arai R, Nozaki M, Maeda M. D-amino-acid oxidase is confined to the lower brain stem and cerebellum in rat brain: regional differentiation of astrocytes. *Brain Res* 1994; 652:297-303.
66. Iwainky H. Mode of action, biotransformation and pharmacokinetics of antituberculosis drugs in animals and man. In Bartmann K. ed. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer, 1988:124-133.
67. Iwama H, Takahashi K, Kure S et al. Depletion of cerebral D-serine in non-ketotic hyperglycinemia: Possible involvement of glycine cleavage system in control of endogenous D-serine. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:793-796.
68. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148:1301-1308.
69. Javitt DC, Zylberman I, Zukin SR, Heresco-Levy U, Lindenmayer JP. Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am J Psychiatry* 1994; 151: 1234-1236.
70. Javitt DC, Silipo G, Cienfuegos A, Shelley AM, Bark N, Park M, Lindenmayer JP, Suckow R, Zukin SR. Adjunctive high-dose glycine in the treatment of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 2001; 4(4):385-391.
71. Javitt DC, Hashim A, Sershen H. Modulation of striatal dopamine release by glycine transport inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30(4):649-656.
72. Joyce JN, Lexow N, Bird E, Winokur A. Organization of dopamine D1 and D2 receptors in human striatum: receptor autoradiographic studies in Huntington's disease and schizophrenia. *Synapse* 1988; 2(5):546-557.
73. Jursky F, Nelson N. Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* 1996; 67:336-344.
74. Kartvelishvily E, Shleper M, balan L, Dumin E, Wolosker H. Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 2006; 281(20):14151-14162.
75. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 1987; 13(2):261-276.

76. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis of schizophrenia. *Neurosci Lett* 1980; 20:379-382.
77. Kim PM, Aizawa H, Kim PS, Huang AS, Wickramasinghe SR, Kashani AH, Barrow RK, Haganir RL, Ghosh A, Snyder SH. Serine racemase: activation by glutamate neurotransmission via glutamate receptor interacting protein and mediation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(6):2105-2110.
78. Kremer I, Vass A, Gorelik I, Bar G, Blararu M, Javitt DC, Heresco-Levy U. Placebo-controlled trial of lamotrigine added to conventional and atypical antipsychotics in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; 56(6):441-446.
79. Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51:199-214.
80. Krystal JH, Anand A, Moghaddam B. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59:663-664.
81. Krystal JH, Pery EB, Gueorguieva R, Belger A, Madonick SH, Abi-Dargham A, Cooper TB, MacDougall L, Abi-Saab W, D'Souza DC. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62: 985-995.
82. Kumashiro S, Hashimoto A, Nishikawa T. Free D-serine in post-mortem brains and spinal cords of individuals with and without neuropsychiatric diseases. *Brain Research* 1995; 681:117-125.
83. Kutlan D, Presits P, Molnar-Perl I. Behavior and characteristics of amine derivatives obtained with o-phthalaldehyde/3-mercaptopropionic acid and with o-phthalaldehyde/N-acetyl-cysteine reagents. *J Chromatogr A* 2002; 949:235-248.
84. Kutlan D, Molnar-Perl I. New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde derivatives by high-performance liquid chromatography. Analysis of wine, beer and vinegar. *J Chromatogr A* 2003; 987: 311-322.
85. Lane H, Chang Y, Liu Y, Chiu Ch, Tsai G. Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62:1196-1204.
86. Lane H, Huang Ch, Wu P, Liu Y, Chang Y, Lin P, Chen P, Tsai G. Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006; 60(6):645-649.

87. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(17):9235-9240.
88. Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58:760-793.
89. Libiger J. Schizofrenní poruchy. In: Höschl C, Libiger J, Švestka J. *Psychiatrie*, Tigris 2002:341-401.
90. Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R. Study of a new schizophrenomimetic drug - sernyl. *Arch Neurol Psychiatry* 1959; 81: 363-369.
91. Macciardi F, Lucca A, Catalano M, Marino C, Zanardi R, Smeraldi E. Amino acid patterns in schizophrenia: some new findings. *Psychiatry Res* 1990; 32:63-70.
92. MacKay AV, Bird ED, Spokes EG, Rossor M, Iversen LL, Creese I, Snyder SH. Dopamine receptors and schizophrenia: drug effect or illness? *Lancet* 1980; 2(8200):915-916.
93. Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacol* 1996; 14:301-307.
94. Martineau M, Baux G, Mothet JP. D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends in Neurosciences* 2006; 29(8):481-491.
95. Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K. Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 1995; 65:454-458.
96. Matsuo H, Kanai Y, Tokunaga M, Nakata T, Chairoungdua A, Ishimine H, Tsukada S, Ooigawa H, Nawashiro H, Kobayashi Y, Fukuda J, Endou H. High affinity D- and L-serine transporter Asc-1: cloning and dendritic localization in the rat cerebral and cerebellar cortices. *Neurosci Lett* 2004; 358:123-126.
97. Matthysse S. Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? *Fed Proc* 1973; 32:200-205.
98. Micallef J, Tardieu S, Gentile S, Fakra E, Jouve E, Sambuc R, Blin O. Effects of a subanaesthetic dose of ketamine on emotional and behavioral state in healthy subjects. *Neurophysiol Clin* 2003; 33:138-147.
99. Mohr P. Deficitní syndrom ve schizofrenii: přehled. *Psychiatrie* 1998; 2:94-102.
100. Molnar-Perl I. Quantification of aminoacids and amines in the same matrix by high-performance liquid chromatography, either simultaneously or separately. *J Chromatogr A* 2003; 987:291-309.

101. Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(15): 5606-5611.
102. Mothet JP, Rouaud E, Sinet PM, Potier B, Jouvenceau A, Dutar P, Videau C, Epelbaum J, Billard JM. A critical role for the glial-derived neuromodulator D-serine in the age-related deficits of cellular mechanisms of learning and memory. *Aging cell* 2006; 5(3):267-274.
103. Neeman G, Blanaru M, Bloch B, Kremer I, Ermilov M, Javitt DC, Heresco-Levy U. Relation of Plasma Glycine, Serine, and Homocysteine Levels to Schizophrenia Symptoms nad Medication Type. *Am J Psychiatry* 2005; 162:1738-1740.
104. Oldendorf WH. Brain uptake of radio labeled amino acids, amines and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* 1971; 221(6):1629-1639.
105. Oldendorf WH. Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids. *Am J Physiol* 1973; 224(4):967-969.
106. Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 1989; 244:1360-1362.
107. Olney JW et al. Glutamatergic, cholinergic, and GABAergic systems in posterior cingulate cortex: interactions and possible mechanisms of limbic system disease. In Vogt BA, Gabriel M et al. *Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus*. Boston: Birkhauser 1993: 557-580.
108. Olney JW, Farber NB. Efficacy of clozapine compared with other antipsychotics in preventing NMDA-antagonists neurotoxicity. *J Clin Psychiatry* 1994; 55 (9):43-46.
109. Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52(12):998-1007.
110. Perry TL, Hansen S. Interconversion of serine and glycine is normal in psychotic patients. *Psychiatry Res* 1985; 15:109-113.
111. Potkin SG, Jin Y, Bunney BG, Costa J, Gulasekaram B. Effect of clozapine and adjunctive high-dose glycine in treatment-resistant schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1999; 156:145-147.
112. Ribeiro CS, Reis M, Panizzutti R, de Miranda J, Wolosker H. Glial transport of the neuromodulator D-serine. *Brain Res* 2002; 929:202-209.
113. Sakata K, Owada Y, Sato K, Kojima K, Hisanaga K, Shinka T, Suzuki Y, Aoki Y, Satoh J, Kondo H, Matsubara Y, Kure S. Structure and expression of the glycine cleavage system in rat central nervous system. *Mol Brain Res* 2001; 94(1-2):119-130.

114. Schell MJ, Molliver ME, Snyder SH. D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(9):3948-3952.
115. Schell MJ, Brady RO, Molliver ME, Snyder SH. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. *J Neurosci* 1997; 17:1604-1615.
116. Schell MJ. The N-methyl-D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. *Phil Trans R Soc Lond B* 2004; 359:943-964.
117. Schoepp DD, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14:13-20.
118. Scolari MJ, Acosta GB. D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glial language. *Amino Acids* 2007; 33:563-574.
119. Shoji K, Mariotto S, Ciampa AR, Suzuki H. Regulation of serine racemase activity by D-serine and nitric oxide in human glioblastoma cells. *Neurosci Lett* 2006; 392(1-2):75-78.
120. Snyder SH, Banerjee SP, Yamamura HI, Greenberg D. Drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Science* 1974; 184(4143):1243-1253.
121. Strisovsky K, Jiraskova J, Mikulova A, Rulisek L, Konvalinka J. Dual substrate and reaction specificity in mouse serine racemase: identification of high-affinity dicarboxylate substrate and inhibitors and analysis of the beta-eliminase activity. *Biochemistry* 2005; 44(39):13091-13100.
122. Sumiyoshi T, Anil AE, Jin D, Jayathilake K, Lee M, Meltzer HY. Plasma glycine and serine levels in schizophrenia compared to normal controls and major depression: relation to negative symptoms. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7(1):1-8.
123. Šťastný F, Pliss L, Bubeníková V. Úloha N-acetyl-aspartyl-glutamátu v modelu schizofrenie. *Psychiatrie* 2001; Suppl. 3:10-14.
124. Šťastný F, Peková S. Úloha NR1 podjednotky NMDA receptoru v etiopatogenezi schizofrenie: její dysfnkce, PET detekce a farmakologické ovlivnění. *Psychiatrie* 2005; Suppl. 3:12-20.
125. Šťastný F, Vrajová M, Tejkalová H, Peková S, Mareš V, Kozmiková I, Jirásková J, Höschl C, Balcar VJ. Stavba a funkce NMDA receptoru u schizofrenie: od animálních modelů k pacientovi. *Psychiatrie* 2006; Suppl. 2:7-14.
126. Tamminga CA. Schizophrenia and glutamate. *Critical Reviews in Neurobiology* 1998; 12:21- 36.

127. Tiihonen J, Hallikainen T, Ryyanen OP, Repo-Tiihonen E, Kotilainen I, Eronen M, Toivonen P, Wahlbeck K, Putkonen A. Lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Biol Psychiatry* 2003; 54(11):1241-1248.
128. Tomiya M, Fukushima T, Watanabe H, Fukami G, Fujisaki M, Iyo M, Hashimoto K, Mitsuhashi S, Toyo'oka T. Alterations in serum amino acid concentrations in male and female schizophrenic patients. *Clin Chim Act* 2007; 380:186-190.
129. Tortorella A, Monteleone P, Fabrazzo M, Viggiano A, De Luca L, Maj M. Plasma Concentrations of Amino Acids in Chronic Schizophrenics Treated with Clozapine. *Neuropsychobiology* 2001; 44:167-171.
130. Tsai G, Yang P, Chung L, Lange N, Coyle JT. D-serine added to antipsychotics for treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998; 44(11):1081-1089.
131. Tsai G, Yang P, Chung L, Tsai I, Tsai Ch, Coyle JT. D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1999; 156:1822-1825.
132. Tsai G, Lane HY, Yang P, Chong MY, Lange N. Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol Psych* 2004; 55(5):452-456.
133. Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 2005; 72:225-234.
134. Vasanits A, Kutlan D, Sass P, Molnar-Perl I. Retention/quantification properties of the o-phthaldialdehyde-3-mercaptpropionic acid and the o-phthaldialdehyde-N-acetyl-L-cysteine amino acid derivatives in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2000; 870:271-287.
135. Volpe JJ, Lee G, Laster L, Robinson JC. Regional distribution of isoenzymes of D-amino-acidoxidase and acetylcholinesterase in developing primate brain. *Exp Neurol* 1970; 28:76-87.
136. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(8):626-640.
137. Watson GB, Bolanowsky MA, Baganoff MP, Deppeler CL, Lanthorn TH. D-cycloserine acts as a partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Brain Res* 1990; 510(1):158-160.
138. Waziri R, Wilson R, Sherman AD. Plasma serine to cysteine ratio as a biological marker for psychosis. *Br J Psychiatry* 1983; 143:69-73.
139. Waziri R, Mott J, Wilcox J. Differentiation of psychotic from nonpsychotic depression by a biological marker. *J Affective Disord* 1985; 9:175-180.
140. Waziri R, Mott J. Drug effects on serine metabolism in psychiatric patients. *Psychiatry Res* 1986; 18:119-126.

141. Whetsell WO, Shapira NA. Neuroexcitation, excitotoxicity and human neurological disease. *Biology of Disease* 1993; 68:372-387.
142. Wilcox J, Waziri R, Sherman A, Mott J. Metabolism of a ingested serine load in psychotic and nonpsychotic subjects. *Biol Psychiatry* 1985; 20:41-49.
143. Williams JB, Mallorga PJ, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C. Effects of typical and atypical antipsychotics on human glycine transporters. *Schizophr Res* 2004; 71:103-112.
144. Wlaz P, Baran H, Loscher W. Effect of the glycine/NMDA receptor partial agonist, D-cycloserine, on seizure threshold and some pharmacodynamic effects of MK-801 in mice. *Eur J Pharmacol* 1994; 257:217-225.
145. Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13409-13414.
146. Wolosker H, Panizzutti R, De Miranda J. Neurobiology through the looking-glass: D-serine s a new glial-derived transmitter. *Neurochemistry International* 2002; 41(5):327-332.
147. Wong DF, Wagner HN Jr., Tune LE, Dannals RF, Pearlson GD, Links JM, Tamminga CA, Broussolle EP, Ravert HT, Wilson AA, Toung JK, Malat J, Williams JA, O'Tuama LA, Snyder SH, Kuhar MJ, Gjedde A. Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science* 1986; 234(4783):1558-1563.
148. Woods SW. Chlorpromazine equivalent doses for the newer atypical antipsychotics. *J Clin Psychiatry* 2003; 64(6):663-667.
149. Yamada K, Ohnishi T, Hashimoto K, Ohba H, Iwayama-Shigeno Y, Toyoshima M, Okuno A, Takao H, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Shimizu E, Itokawa M, Mori N, Iyo M, Yoshikawa T. Identification of multiple serine racemase (SRR) mRNA isoforms and genetic analyses of SRR and DAO in schizophrenia and D-serine levels. *Biol Psych* 2005; 57:1493-1503.
150. Yamamoto N, Tomita U, Umino A, Nishikawa T. Uptake of D-serine by synaptosomal P2 fraction isolated from rat brain. *Synapse* 2001; 42(2):84-86.
151. Zafra F, Aragón C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 1995; 15: 3952-3969.
152. Zhao M, Bada JL. Determination of  $\alpha$ -dialkylamino acids and their enantiomers in geological samples by high-performance liquid chromatography after derivatization with chiral adduct of o-phthaldialdehyde. *J Chromatogr A* 1995; 690:55-63.

## 10. Seznam použitých zkratek

<b>AMK</b>	aminokyselina
<b>AMPA</b>	alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina
<b>Asc-1</b>	transportní systém neutrálních aminokyselin
<b>ASCT</b>	alanin-serin-cystein transportér
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	kalciový kationt
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát
<b>CNS</b>	centrální nervový systém
<b>D<sub>2</sub></b>	dopaminový receptor – typ 2
<b>DAAO</b>	D-aminooxidáza
<b>GABA</b>	kyselina gama-aminomáselná
<b>GDA</b>	glycyldodecylamid
<b>GluR</b>	glutamátový receptor
<b>GLYT</b>	glycinový transportér
<b>GRIP</b>	protein interagující s glutamátovým receptorem
<b>HEB</b>	hematoencefalická bariéra
<b>LTD</b>	dlouhodobá deprese
<b>LTP</b>	dlouhodobá potenciace
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	hořečnatý kationt
<b>mGluR</b>	metabotropní glutamátový receptor
<b>MKN-10</b>	Mezinárodní klasifikace nemocí - 10. revize
<b>Na<sup>+</sup></b>	sodíkový kationt
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartát
<b>NO</b>	oxid dusný
<b>PCP</b>	fencyklidin
<b>p.d.</b>	pro die
<b>λ<sub>em</sub></b>	emisní vlnová délka
<b>λ<sub>ex</sub></b>	excitační vlnová délka



# 11. Seznam publikací doktoranda

## 1. Původní články a statě ve sbornících:

**Hons J**, Zirko R, Ulrychova M, Cermakova E, Libiger J. D-serine serum levels in patients with schizophrenia: relation to psychopathology and comparison to healthy subjects. – 16.6. 2008 přijat k publikaci v časopise Neuroendocrinology Letters (**IF 0,924**).

**Hons J**, Žirko R, Ulrychová M, Čermáková E, Libiger J. Vztah sérové koncentrace D-serinu a psychopatologie u schizofrenie. – 22.5. 2008 přijat k publikaci v časopise Česká a slovenská psychiatrie.

Slanina M., Žižka J., Klzo L., Novotný J., Ryška P., Špriňar Z., **Hons J.**, Šenkeřík M., Kunc P. Osmotický demyelinizační syndrom – diagnostika magnetickou rezonancí: kazuistika. Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2007; 70/103(3):322-327. (**IF 0,045**)

**Hons J**, Tůma I. Psychiatrická péče v Belgii. Čes. a slov. Psychiat., 98, 2002, No. 7, pp. 408-412.

## 2. Přehledové články:

**Hons J.** Nové možnosti farmakologického ovlivnění glutamatergního systému u schizofrenie. Čes. a slov. Psychiat., 102, 2006, No.2, pp. 85-90.

**Hons J.** Glutamatergní neurotransmise a její role v patofyziologii schizofrenie. Čes. a slov. Psychiat., 100, 2004, No.4, pp. 220-228.

## 3. Abstrakta:

**Hons J**, Žirko R, Ulrychová M, Čermáková E, Libiger J. Porucha metabolismu glycinu v patogenezi negativních příznaků schizofrenie. In Raboch et al. Quo vadis psychiatria. Galén 2008 (sborník abstrakt VII. sjezdu České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí): 42-44.

**Hons J**, Libiger J, Zirko R., Ulrychova M. D-serine serum level in schizophrenia: relation to psychopathology. New Research Abstracts, American Psychiatric Association 2008 Annual Meeting:178-179.

**Hons J**, Zirko R, Bazant J, Ulrychova M, Vavrova J, Cermakova E, Libiger J. D-serine serum level – a marker of glutamatergic dysfunction in schizophrenia. European Psychiatry 2008; 23 (Suppl. 2):120. (**IF 1,463**)

**Hons J.**, Žirko R., Bažant J., Ulrychová M., Vávrová J., Čermáková E. Kognitivní dysfunkce a D-serin u schizofrenie. Psychiatrie 2008; Suppl. 1:30

**Hons J**, Žirko R, Libiger J, Ulrychová M, Vávrová J. Hladina D-serinu v krevním séru – marker glutamatergní dysfunkce u schizofrenie (pilotní studie). In Raboch et al. Nemocná duše-nemocný mozek: klinická zkušenost a fakta. Galén 2006 (sborník abstrakt VI. sjezdu České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí): 48-49.

**Hons J.** Neurotransmise zprostředkovaná NMDA receptorem a její úloha v patofyziologii schizofrenie. *Psychiatrie* 2002; Suppl. 1:16-17.

**Hons J.** Schizofrenie a dysfunkce glutamatergní neurotransmise. *Psychiatrie* 2001; Suppl. 2: 42-43.

#### 4. Prezentace na kongresech a sympóziích:

*formou přednášky:*

**Hons J., Žirko R., Ulrychová M., Čermáková E., Libiger J.** Porucha metabolismu glycinu v patogenezi negativních příznaků schizofrenie. (VII. sjezd České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí, 14.6. 2008)

**Hons J., Žirko R., Bažant J., Ulrychová M., Vávrová J., Čermáková E.** Kognitivní dysfunkce a D-serin u schizofrenie. (50.česko-slovenská psychofarmakologická konference, Lázně Jeseník, 10.1. 2008)

**Hons J., Žirko R., Bažant J., Libiger J., Ulrychová M., Vávrová J., Čermáková E.** Metabolismus excitačních aminokyselin u schizofrenie. (13. česko-slovenský psychiatrický sjezd, 14.9.2007, Brno)

**Hons J., Žirko R., Bažant J., Ulrychová M., Vávrová J., Čermáková E.** Hladina D-serinu v krevním séru – marker glutamatergní dysfunkce u schizofrenie - výsledky studie. (13. celostátní konference biologické psychiatrie, Luhačovice, 7.6. 2007)

**Hons J.** - Nové možnosti farmakologického ovlivnění glutamatergní dysfunkce u schizofrenie. (Regionální psychiatrický seminář, Černý Důl, 7. 4. 2006)

**Hons J., Žirko R., Libiger J., Ulrychová M., Vávrová J.** Hladina D-serinu v krevním séru – marker glutamatergní dysfunkce u schizofrenie (pilotní studie). (VI. sjezd České psychiatrické společnosti s mezinárodní účastí, Špindlerův Mlýn, 9.6. 2006)

**Hons J., Žirko R., Libiger J., Ulrychová M., Vávrová J.** Hladiny excitačních aminokyselin v krevním séru u pacientů se schizofrenií. (Vědecká schůze Psychiatrické společnosti ČLS JEP, Praha, 1.11. 2006)

**Hons J.** Glutamát a schizofrenie. (Regionální psychiatrický seminář, Černá hora, 13.10. 2000)

*formou posteru:*

**Hons J., Libiger J., Žirko R., Ulrychová M.** D-serine serum level in schizophrenia: relation to psychopathology. (161st APA Annual Meeting, 6.5. 2008, Washington, USA)

**Hons J., Žirko R., Bažant J., Ulrychová M., Vávrová J., Čermáková E., Libiger J.** D-serine serum level – a marker of glutamatergic dysfunction in schizophrenia. (16th European Congress of Psychiatry, 6.4. 2008, Nice, Francie)

**Hons J.** Farmakologické ovlivnění glutamatergní dysfunkce v terapii schizofrenie. (Regionální psychiatrický seminář v Černém Dole, duben 2002. IV. sjezd České psychiatrické společnosti, Špindlerův Mlýn, 14.6. 2002).

**Hons J.** Neurotransmise zprostředkovaná NMDA receptorem a její úloha v patofyziologii schizofrenie. (44.česko-slovenská psychofarmakologická konference, Lázně Jeseník, 6.1. 2002).

## 12. Přílohy

**Hons J**, Zirko R, Ulrychova M, Cermakova E, Libiger J. D-serine serum levels in patients with schizophrenia: relation to psychopathology and comparison to healthy subjects. – 16.6. 2008 přijat k publikaci v časopise *Neuroendocrinology Letters* (**IF 0,924**).

**Hons J**, Žirko R, Ulrychová M, Čermáková E, Libiger J. Vztah sérové koncentrace D-serinu a psychopatologie u schizofrenie. – 22.5. 2008 přijat k publikaci v časopise *Česká a slovenská psychiatrie*.

**Hons J**. Nové možnosti farmakologického ovlivnění glutamatergního systému u schizofrenie. *Čes. a slov. Psychiat.*, 102, 2006, No.2, pp. 85-90.

**Hons J**. Glutamatergní neurotransmise a její role v patofyziologii schizofrenie. *Čes. a slov. Psychiat.*, 100, 2004, No.4, pp. 220-228.

# NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS

Including Psychoneuroimmunology, Neuropsychopharmacology, Reproductive Medicine,  
Chronobiology and Human Ethology

June 16, 2008

**Jaromir Hons, M.D.**

Department of Psychiatry, University Hospital,  
Hradec Kralove, Czech Republic

This document is to certify

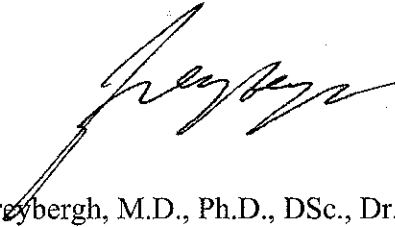
## ACCEPTANCE OF YOUR PAPERS

entitled

**“D-serine serum levels in patients with schizophrenia: relation to  
psychopathology and comparison to healthy subjects.”**

by **Jaromir Hons, Rastislav Zirko, Martina Ulrychova, Eva Cermakova, Jan Libiger,**

to be published in the Neuroendocrinology Letters Volume 29, No.4, August 2008



Professor Peter G. Fedor-Freybergh, M.D., Ph.D., DSc., Dr.h.c.mult.  
*Editor-in-Chief: Neuroendocrinology Letters*

E-mail: [editor@nel.edu](mailto:editor@nel.edu)

Website: [www.nel.edu](http://www.nel.edu)

Online journal: [node.nel.edu](http://node.nel.edu)



# PSYCHIATRICKÁ SPOLEČNOST

České lékařské společnosti J. E. Purkyně

PSYCHIATRIC ASSOCIATION

of the Czech Medical Association J. E. Purkyně

sekretariát: Ke Karlovu 11, 128 08 Praha 2  
telefon: +42-2-24 91 37 52  
fax: +42-2-24 91 37 52  
e-mail: raboch@mbox.cesnet.cz

V Praze dne 22.5.2008

## Potvrzení o přijetí k publikaci

Potvrzují tímto, že práce autorů

*Hons J., Žirko R., Ulrychová M., Čermáková E., Libiger J.*

*Vztah sérové koncentrace D-serinu a psychopatologie u schizofrenie*

prošla řádným připomínkovým recenzním řízením a byla přijata k publikaci v časopise Česká a slovenská psychiatrie a bude publikována v roce 2008.

MUDr. Martin Anders, PhD.  
vedoucí redaktor

---

# Nové možnosti farmakologického ovlivnění glutamatergního systému u schizofrenie

---

Hons J.

Psychiatrická klinika LF UK a FN, Hradec Králové,  
přednosta prof. MUDr. J. Libiger, CSc.

---

## Souhrn

Látky, které moduluji glutamatergní neurotransmisi, jsou již klinicky užívány v terapii Alzheimerovy choroby a v terapii některých afektivních poruch. Dysfunkce glutamatergní neurotransmise se může podílet také na patogenezi schizofrenie. V klinických studiích byly prokázány pozitivní terapeutické účinky látek agonisticky působících na glycinovém modulačním místě NMDA glutamatergních receptorů na schizofrenní symptomatiku. V poslední době je klinicky testován účinek látek regulujících extracelulární hladiny agonistů NMDA receptorů a látek ovlivňujících funkci AMPA receptorů. Východiskem hypotézy glutamatergní hyperfunkce je ovlivnění schizofrenní symptomatiky látkami snižujícími vyplavování glutamátu. Pozitivní účinek lamotriginu byl v adjuvantní terapii prokázán u pacientů se schizofrenií léčených atypickými antipsychotiky.

**Klíčová slova:** glutamát, schizofrenie, agonisté NMDA receptorů, inhibitory transportu glycinu.

## Summary

**Hons J.: Pharmacological Influence on Glutamatergic System in Schizophrenia**

Glutamatergic neurotransmission modulators have been already used in the treatment of Alzheimer's disease and some affective disorders. Dysfunction of glutamatergic neurotransmission may be also involved in pathophysiology of schizophrenia. There is evidence of positive therapeutic effects of agonists of glycine modulatory site of NMDA receptors on symptoms of schizophrenia in clinical trials. The drugs modulating extracellular levels of NMDA receptor agonists and AMPA receptor modulators are currently under clinical evaluation. The hypothesis of glutamatergic hyperfunction proposed the effect of glutamate release-inhibiting drugs in schizophrenia. Positive therapeutic effect of lamotrigine in add-on therapy has been demonstrated in patients with schizophrenia treated with atypical antipsychotics.

**Key words:** glutamate, schizophrenia, NMDA receptor agonists, glycine transport inhibitors.

*Čes. a slov. Psychiat., 102, 2006, No. 2, pp. 85–90.*

---

---

## ÚVOD

V oblasti dysfunkce glutamatergní neurotransmise v CNS se výzkum soustředil zejména na zmapování její role v patofyziologii širokého spektra neurodegenerativních a neuropsychiatrických chorob. Účinek látek modulujících glutamatergní neurotransmisi je již klinicky využíván v terapii Alzheimerovy choroby (memantin), epilepsie (lamotrigin) a v terapii a profylaxi bipolární afektivní poruchy (lamotrigin). Preklinická a klinická sledování prokázala, že látky, které zvyšují neurotransmisi zprostředkovanou ionotropními NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptory, pozitivně terapeuticky ovlivňují příznaky posttraumatické stresové poruchy [17]. V souvislosti s perspektivou klinického užití v léčbě posttraumatické stresové poruchy, úzkostných poruch, depresivních poruch a schizofrenie jsou testovány látky modulující funkci metabotropních glutamatergních receptorů

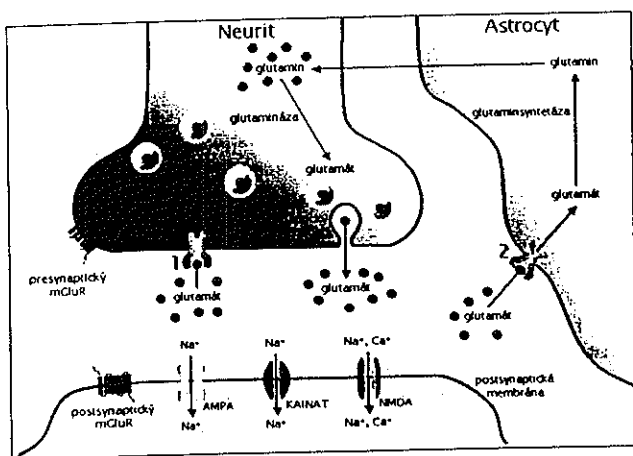
[24]. V patofyziologii schizofrenie hraje velmi pravděpodobně významnou roli dysfunkce kortikolimbické glutamatergní neurotransmise zprostředkované NMDA receptory [2, 27, 28]. Výzkum směřuje k objasnění této role a možnosti medikamentózního ovlivnění patofyziologických mechanismů. Využití látek ovlivňujících glutamatergní systém by u schizofrenie umožnilo terapeutické ovlivnění nejen pozitivních symptomů, ale i mechanismu zodpovědného za kognitivní deficit a negativní symptomy.

## Syntéza a transport glutamátu v CNS

Glutamát, sůl kyseliny glutamové, je hlavní stavební látkou při syntéze proteinů. Pokud je v CNS využíván jako neurotransmitter, je konvertován z glutaminu. Glutamin je v neuronech přeměňován na glutamát pomocí mitochondriálního enzymu glutaminázy. Glutamát je skladován v synaptických vezikulech pro pozdější uvolňování během neurotransmise. Značná část glutamátu

uvolněného do štěrby je vychytávána gliovými buňkami, které přiléhají k neuronu. V případě glutamátových neuronů poskytují sousední buňky gliu glutamin jako prekurzor pro přeměnu na neurotransmitter glutamát. Glutamát je v gliové buňce nejprve převeden na glutamin za pomoci enzymu glutaminsyntetázy. Glutamin je pak transportován do neuronu ke konverzi na neurotransmitter glutamát (nebo GABA) (obr.1) [14].

Glutamát nemůže vzhledem ke svému náboji difundovat přes buněčnou membránu. Na nervových zakončeních a gliových buňkách se vyskytuje vysokoafinitní „uptake“ systém. Účinek glutamátu není ukončován enzymatickým rozkladem látky jako u jiných neurotransmitterových systémů. Ze synaptické štěrby je glutamát odstraňován dvěma transportními pumpami, tzv. glutamátovými transportéry (obr. 1).



Obr. 1. Glutamátové transportéry - schematická prezentace. 1 - presynaptický glutamátový transportér, 2 - glutamátový transportér lokalizovaný na gliové buňce. (AMPA, AMPA receptor; KAINAT, kainátový receptor; NMDA, NMDA receptor)

### Glutamátové receptory

L-glutamát a příbuzné deriváty se váží na receptory, které jsou lokalizovány na neuronech ve všech částech CNS. Složitost exprese glutamátových receptorů a možnost jejich modifikace za fyziologických a patologických okolností jsou faktory, které znesnadňují posouzení jejich role v patogenезi neurologických a psychiatrických onemocnění. Existuje přes 20 různých zástupců skupiny glutamátových receptorů ve 2 hlavních třídách - ve třídě receptorů ionotropních a metabotropních (obr 1). Ionotropní receptory kontrolují iontové kanály permeabilní pro kationty. Otevření těchto kanálů umožňuje tok sodíkových a vápníkových iontů do intracelulárního prostoru. Vazba glutamátu na ionotropní receptor vede k aktivaci iontového kanálu a jeho otevření. Na rozdíl od ionotropních receptorů, které jsou přímo spojeny se specifickými iontovými kanály a zprostředkovávají rychlý excitační přenos, metabotropní receptory jsou spojeny s přenosem signálu cestou proteinů

vázících guaninový nukleotid, tzv. G proteinů. Následné změny sekundárních poslů generují v porovnání s ionotropními receptory pomalejší synaptický přenos [14, 28]. Velká dostupnost glutamátu, jako neurotransmiteru v kombinaci s velmi rozšířenou distribucí metabotropních receptorů, je podstatou tohoto hlavního modulačního systému sekundárních poslů v CNS savců.

## LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ GLUTAMÁTERGNÍ SYSTÉM

V patofyziologii schizofrenie se uplatňuje dysfunkce glutamátergní neurotransmise [21]. Hypotéza glutamátergní hypofunkce předpokládá u schizofrenie hypofunkci mozkových glutamátergních neuronů [2]. Nejvýznamnějším důsledkem této hypotézy je možné terapeutické ovlivnění schizofrenní symptomatiky farmaky zvyšujícími glutamátergní neurotransmisi. Byla zformulována také hypotéza glutamátergní hyperfunkce, jejímž východiskem je možné ovlivnění schizofrenní symptomatiky látkami snižujícími vyplavování glutamátu [21, 26].

Účinek některých látek ovlivňujících glutamátergní systém je u pacientů se schizofrenií klinicky testován. Jde nejen o látky specificky agonisticky nebo antagonisticky působící na ionotropní nebo metabotropní glutamátové receptory, ale také o látky ovlivňující transport agonistů těchto receptorů a látky presynapticky snižující vyplavování glutamátu.

### Agonisté NMDA receptoru

#### Glycin, D-serin

V posledních letech je v centru zájmu terapeutické využití agonistů působících na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru - glycinu a D-serinu. Glycin jako inhibiční neurotransmiter ovlivňuje motorické a senzorické funkce především v mozkovém kmeni a míše. Jako koagonista NMDA receptoru zprostředkovává také excitační neurotransmisi. Glycin, vážící se na glycinové vazebné místo NMDA receptoru, pochází převážně z gliových buněk a je tvořen sekvenční konverzí z L-serinu. D-serin, selektivní plný agonista na glycinovém místě NMDA receptoru, je tvořen z L-serinu za účasti enzymu D-serinracemázy. Farmakokinetické vlastnosti těchto agonistů jsou odlišné. D-serin proniká lépe než glycin hematoencefalickou bariérou. Periferně podaný D-serin má centrální účinky. Periferní podání glycinu vede ke zvýšení jeho hladin v mozkomíšním moku [14].

Metabolismus D-serinu a glycinu v CNS a jejich vztah k modulaci glutamátergní neurotransmise v CNS u schizofrenie je předmětem výzkumu. Zajímavý byl nález významně snížené hladiny D-serinu a serinracemázy v séru u pacientů se schizofrenií v porovnání se zdravými kontrolami [13]. Bylo



již prokázáno, že D-serin v adjuvantní léčbě schizofrenních pacientů léčených klasickými a atypickými antipsychotiky (kromě kombinace s klozapinem) zlepšuje negativní, pozitivní a kognitivní symptomatiku [20, 31]. Již v roce 1994 Javitt demonstroval, že také léčba glycinem v adjuvantní léčbě významně snižuje intenzitu negativní symptomatiku [23]. Účinek glycinu na pozitivní, negativní a kognitivní symptomatiku byl později prokázán v adjuvantní terapii u pacientů se schizofrenií léčených klasickými i atypickými antipsychotiky [18].

#### D-cykloserin

Na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru působí jako parciální agonista D-cykloserin [7, 14, 35], který také prochází hematoencefalickou bariérou [22, 36]. D-cykloserin zvyšuje odpověď NMDA receptoru na endogenní glutamát bez toho, aby přímo aktivoval receptor [29]. Kromě toho jako parciální agonista ve vysokých dávkách narušuje NMDA receptorovou aktivaci, a tím snižuje riziko hyperglutamatergních neurotoxických a konvulzivních účinků [4, 7]. Ve dvojité slepé, placebem kontrolované studii, se skupinou neuroleptiky léčených pacientů s chronickou schizofrenií s převahou negativních symptomů, D-cykloserin v dávce 50 mg p.d. významně redukoval negativní symptomy a výrazně zlepšil výkon v kognitivních testech [9]. Účinek se nedostavil při podávání příliš nízkých (15 mg p.d.) nebo vysokých (250 mg p.d.) dávek D-cykloserinu. Terapeutický účinek na negativní symptomy byl u D-cykloserinu později prokázán v adjuvantní léčbě schizofrenních pacientů léčených klasickými i atypickými antipsychotiky také v dalších studiích [8, 10, 15, 16]. Profil efektu vzhledem k dávce je v souladu s farmakodynamickými vlastnostmi parciálních agonistů (profil „obráceného U“). Ve studii Cascelly způsobovala denní dávka 250 mg D-cykloserinu u pacientů se schizofrenií zhoršení stavu [3]. Ovšem ani u dávky 50 mg p.d. neprokázal Goff v šestiměsíční studii vyšší terapeutický účinek D-cykloserinu na negativní a kognitivní symptomatiku ve srovnání s placebem u pacientů s výraznou negativní symptomatikou léčených klasickými antipsychotiky [12]. Nižší účinnost nebo neúčinnost parciálního agonisty může být ovlivněna nižší relativní afinitou ke glycinovému modulačnímu místu NMDA receptoru na rozdíl od vysoké afinity plných agonistů. Tuto možnost potvrzuje retrospektivní srovnání účinnosti D-cykloserinu a glycinu u souborů pacientů s přetrvávající negativní symptomatikou, kteří se zúčastnili dvojité slepých studií účinnosti jednotlivých agonistů v augmentaci terapie antipsychotiky. U pacientů léčených glycinem byla významně vyšší účinnost na negativní symptomy ve srovnání s D-cykloserinem [19].

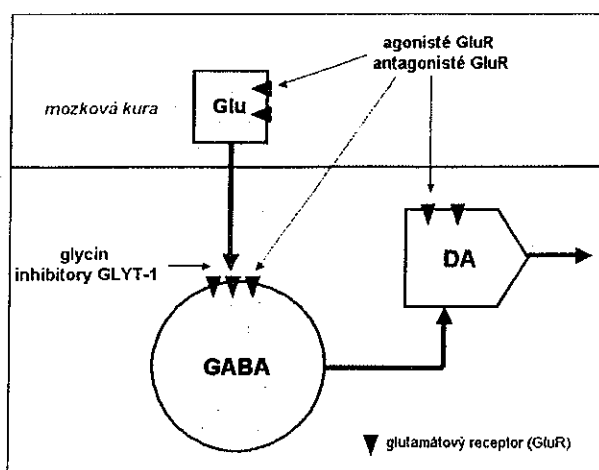
K přehlednému zhodnocení účinnosti agonistů NMDA receptoru (glycin, D-serin, D-cykloserin)

a ampakinu CX516 na schizofrenní symptomatiku byla provedena metaanalýza výsledků 18 krátkodobých studií, do kterých bylo zařazeno celkem 343 pacientů. U pacientů užívajících v augmentaci terapie antipsychotiky glycin a D-serin (n=132) došlo ke zlepšení negativní symptomatiky, D-cykloserin (n=119) byl na negativní symptomatiku méně účinný. U žádné z těchto látek nebyla prokázána účinnost na pozitivní symptomatiku ani klinicky významné zlepšení kognitivních funkcí [34].

#### Látky ovlivňující transport glycinu

Na účinek glycinu v CNS má vliv i jeho transport. Byly identifikovány dva tzv. glycinové transportéry, které patří mezi velkou skupinu neurotransmiterových transportérů závislých na sodíkových a chloridových iontech. Byly pojmenovány GLYT-1 a GLYT-2. Oba transportéry mají podobné kinetické a farmakologické vlastnosti, ovšem jejich distribuce je odlišná. GLYT-1 zajišťuje transport v gliových buňkách, zatímco GLYT-2 je primární neuronální transportér [25]. Distribuce glycinového receptoru je blízká distribuci mRNA kódující GLYT-1. Vyplavování i zpětná absorpce glycinu do glie je tedy přímo ovlivňována právě transportérem GLYT-1. V této souvislosti se zvýšil zájem o látky ovlivňující aktivitu GLYT-1, a tím i extracelulární hladinu glycinu v CNS. Tzv. inhibitory GLYT-1 stimulují hypofunkční NMDA glutamatergní receptory a modulují podkorovou dopaminergní neurotransmisi (obr. 2).

Mezi inhibitory GLYT-1 patří např. glycyldodecylamid (GDA) nebo látka ALX5407. Předmětem klinického zkoušení je ale především sarkosin (N-methylglycin). Sarkosin kromě inhibice GLYT-1 moduluje funkci transportérů zařazených do tzv. systému transportérů A, které moduluje také transport glycinu a glutaminu. Perspektivou je využití



**Obr. 2.** Účinek látek ovlivňujících glutamátové receptory na vyplavování dopaminu ve striatu - schematická prezentace (podle Javitt, 2004).

(DA - dopaminergní neuron; GABA - GABAergní neuron; Glu, glutamatergní neuron)

inhibitorů GLYT-1 k ovlivnění funkce agonistů glycinového vazebného místa hypofunkčních NMDA receptorů u schizofrenie [25, 32]. Slibné jsou výsledky dvojité slepé placebem kontrolované studie, kdy byl sarkosin podáván v dávce 2 g p.d. pacientům se schizofrenií v augmentaci antipsychotické medikace. Ze souboru 38 pacientů byl sarkosin podáván celkem 17 pacientům, u kterých došlo ke klinicky významnému zlepšení pozitivní, negativní, kognitivní a všeobecné schizofrenní symptomatiky [32]. Teprve na počátku je výzkum modulace extracelulárních hladin D-serinu v CNS prostřednictvím inhibice jeho transportu do glií.

### Látky ovlivňující AMPA receptory

Další možností terapeutického ovlivnění dysfunkce glutamatergního systému u schizofrenie je využití látek pozitivně modulujících funkce ionotropních AMPA (alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionát) receptorů, tzv. ampakinů. V klinické studii byl zkoumán účinek ampakinu CX516 v augmentaci terapie atypickými antipsychotiky u pacientů se schizofrenií. Výsledky pilotní placebem kontrolované studie na souboru 19 pacientů publikoval v roce 2001 Goff [11]. U pacientů se schizofrenií léčených klozapinem zaznamenal při podávání CX516 významné zlepšení kognitivních funkcí, především pozornosti a paměti. Nejsou zatím známy výsledky placebem kontrolované čtyřtýdenní studie probíhající na souboru 140 pacientů se schizofrenií, kterým je podáván v augmentaci terapie antipsychotiky (klozapin  $n=80$ , jiné antipsychotikum  $n=60$ ) ampakin CX516 v dávce 900 mg p.d. Studie měla být ukončena v únoru 2005, výsledky nebyly zatím publikovány.

### Antiglutamatergní látky

Látky inhibující vyplavování glutamátu mohou redukovat hyperglutamatergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů. Vyplavování glutamátu může být inhibováno látkami blokujícími sodíkové a vápníkové kanály, látkami snižujícími hladinu draslíku, dále také toxiny, které brání fúzi vezikulů s presynaptickou membránou a agonisty presynaptických glutamatergních metabotropních receptorů [21].

#### Lamotrigin

Jednou z látek stabilizujících neuronální membrány, která inhibuje kortikální vyplavování glutamátu, je lamotrigin. Lamotrigin (3,5-diamino-6-[2,3-dichlorofenyl]-1,2,4-triazin) je antiepileptikum III. generace, jehož účinnost byla prokázána v terapii fokální epilepsie se sekundární generalizací. Výsledky dalších studií prokazují účinnost i v terapii a profylaxi některých afektivních poruch, zejména v terapii bipolární afektivní poruchy. Hlavním mechanismem účinku lamotriginu je inhibice uvolňování glutamátu a aspartátu stabilizací presynaptické membrány prostřednic-

tvím inhibice a blokády presynaptických sodíkových kanálů závislých na úrovni depolarizačního napětí. Lamotrigin má stabilizační účinek na membrány neuronů také inhibicí a blokádu na napětí závislých P a N-typu vápníkových kanálů a účinkem na draslíkové kanály. Lamotrigin zvyšuje GABAergní neurotransmisi, neovlivňuje synaptickou plasticitu a v modelu celkové cerebrální ischemie vykazuje neuroprotektivní efekt. Lamotrigin v klinické studii u zdravých jedinců významně snižoval intenzitu pozitivních a negativních příznaků podobných schizofrenii i kognitivního deficitu navozených psychotomimetickým účinkem ketaminu [1]. Tento účinek lamotriginu je vysvětlován presynaptickým snížením vyplavování glutamátu a následným snížením aktivace postsynaptických non-NMDA receptorů v kortikálních oblastech. Anand tím prokázal, že látky snižující vyplavování glutamátu mohou redukovat hyperglutamatergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů navozené jejich antagonisty jako jsou ketamin či fencyklidín.

Existují i další důkazy pozitivního účinku lamotriginu na schizofrenní symptomatiku. Dursun a Deakin podávali lamotrigin jako augmentaci stále antipsychotické medikace klozapinem u pacientů se schizofrenií rezistentních na terapii po dobu 24 týdnů v dávce 100-300 mg p.d. Při augmentaci lamotriginem zaznamenali výrazný ústup psychotické symptomatiky (dle BPRS – Brief Psychiatric Rating Scale) již během prvních 2 týdnů léčby. Naopak augmentace antipsychotické terapie topiramátem, antagonistou glutamatergních AMPA a kainátových receptorů, nevedla k významnému snížení skóru BPRS [6]. Tiisonen testoval účinnost lamotriginu na pozitivní schizofrenní symptomatiku v randomizované, placebem kontrolované, dvojité slepé, 12 týdnů trvající studii [30]. V augmentaci stávající antipsychotické terapie klozapinem podával lamotrigin v dávce 200 mg p.d. 34 pacientům s chronickou schizofrenií rezistentním na léčbu. Terapie lamotriginem byla výrazně účinnější v redukcii pozitivních symptomů a všeobecných symptomů (dle PANSS – Positive and Negative Symptom Scale) ve srovnání s placebem. Nebyl zaznamenán signifikantní účinek na negativní symptomy. Augmentace léčby lamotriginem zlepšovala pozitivní symptomy především u pacientů se závažnější klinickou symptomatikou (celkový skóre BPRS více jak 45). Výsledky zatím poslední studie účinku lamotriginu v augmentaci léčby klasickými a atypickými antipsychotiky publikovala Kremerová [26]. Do placebem kontrolované dvojité slepé studie zařadila 38 pacientů s rezistentní schizofrenií. Lamotrigin byl titrován do dávky 400 mg p.d. Došlo k významnému snížení intenzity pozitivní a všeobecné schizofrenní symptomatiky (dle PANSS) u pacientů léčených lamotriginem. Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl účinku adjuvantní léčby lamotrigi-

nem mezi skupinou pacientů léčených klasickými antipsychotiky a skupinou pacientů léčených atypickými antipsychotiky.

## ZÁVĚR

V souvislosti s rozšířením antipsychotik 2. generace v léčbě schizofrenie jsme schopni lépe ovlivnit specifické skupiny schizofrenních příznaků. Stále však existuje určité procento pacientů, u kterých přetrvává na léčbu rezistentní negativní symptomatika nebo kognitivní deficit. K objasnění této skutečnosti může přispět detailní poznání heterogenních příčin patologických procesů a s nimi spojených variant schizofrenního onemocnění. Důkaz účasti dysfunkce kortikolimbické glutamatergní neurotransmise v patofyziologii schizofrenie podporuje hypotézu o možném terapeutickém účinku látek ovlivňujících glutamatergní systém na schizofrenní symptomatiku. Chybí zatím definitivní zmapování role dysfunkce glutamatergní neuro-

transmise v patofyziologii schizofrenie. Ověřování účinnosti látek ovlivňujících glutamatergní systém probíhá zatím jen v augmentaci standardní léčby antipsychotiky a soubory pacientů jsou nevelké. Schází více dvojitě slepých randomizovaných studií s ověřením účinnosti látek ovlivňujících tento systém nejen u většího počtu pacientů, ale také v monoterapii. Některé látky působící na glutamatergní systém by mohly v klinické praxi výrazněji terapeuticky ovlivnit zejména přetrvávání negativní schizofrenní symptomatiky a kognitivního deficitu jako nejčastějších příčin dlouhodobě zhoršeného fungování pacientů v sociální oblasti. Zlepšení výsledku léčby s využitím látek ovlivňujících glutamatergní neurotransmitterový systém může posilovat účinek psychoterapeutických a rehabilitačních intervencí a výrazně zlepšit kvalitu života pacientů.

*Tento článek vznikl za finanční podpory z výzkumného záměru Patofyziologie neuropsychiatrických onemocnění a jejich klinické aplikace MSM 0021620816.*

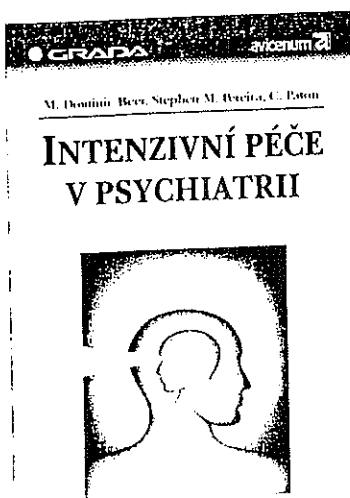
## LITERATURA

1. Anand, A., Charney, D. S., Oren, D. A., Berman, R. M. et al.: Attenuation of the Neuropsychiatric Effects of Ketamine With Lamotrigine. *Arch. Gen. Psychiatry*, 57, 2000, pp. 270-276.
2. Carlsson, A., Hansson, L. O., Waters, N., Carlsson, M. L.: A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 174, 1999, (Suppl 37), pp. 2-6.
3. Cascella, N. G. et al.: D-cycloserine adjuvant therapy to conventional neuroleptic treatment in schizophrenia: an open-label study. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.*, 95, 1994, pp. 105-111.
4. Chessell, I. P. et al.: D-cycloserine, a putative cognitive enhancer, facilitates activation of the N-methyl-D-aspartate receptor-ionophore complex in Alzheimer brain. *Brain Res.*, 565, 1991, pp. 345-348.
5. Crow, T. J.: Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process. *BMJ*, 280, 1980, pp. 66-68.
6. Dursun, S. M., Deakin, J. F. W.: Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *Journal of Psychopharmacology*, 15, 2001, pp. 297-301.
7. Emmett, M. R., Mick, S. J., Cler, J. A., Rao, T. S., Lyengar, S., Wood, P. L.: Actions of D-cycloserine at the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor site in vivo. *Neuropharmacology*, 30, 1991, pp. 1167-1171.
8. Evins, A. E., Skico, E., Posever, T. A., Toker, R., Goff, D. C.: D-Cycloserine added to risperidone in patients with primary negative symptoms of schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 56, 2002, pp. 19-23.
9. Goff, D. C., Tsai, G., Manoach, D. S., Coyle, J. T.: A dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptic for negative symptoms in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 152, 1995, pp. 1213-1215.
10. Goff, D. C., Tsai, G., Levitt, J., Skico, E., Manoach, D. S., Schoenfeld, D. A., Hayden, D. L., McCarley, R., Coyle, J. T.: A placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56, 1999, pp. 21-27.
11. Goff, D. C., Leahy, L., Berman, I., Posever, T., Herz, L., Leon, A. C., Johnson, S. A., Luch, G.: A placebo-controlled pilot study of the ampakine CX516 added to clozapine in schizophrenia. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 21, 2001, pp. 484-487.
12. Goff, D. C., Herz, L., Posever, T., Shih, V., Tsai, G., Henderson, D. C., Freudenreich, O., Evins, A. E., Yovel, I., Zhang, H., Schoenfeld, D.: A six-month, placebo-controlled trial of D-cycloserine co-administered with conventional antipsychotics in schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berl.)*, 179, 2005, pp. 144-150.
13. Hashimoto, K., Fukushima, T., Shimizu, E., Komatsu, N., Watanabe, H., Shinoda, N., Nakazato, M., Kumakiri, C., Okada, S., Hasegawa, H., Imai, K., Iyo, M.: Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 60, 2003, pp. 572-576.
14. Henderson, G., Johnson, J. W., Ascher, P.: Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Physiol. (Lond)*, 430, 1990, pp. 189-212.
15. Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ermilov, M., Silipo, G., Shimoni, J.: Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of D-cycloserine adjuvant therapy for treatment-resistant schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 1, 1998, pp. 131-135.
16. Heresco-Levy, U., Ermilov, M., Shimoni, J., Shapira, B., Silipo, G., Javitt, D. C.: Placebo-controlled trial of D-cycloserine added to conventional neuroleptics, olanzapine, or risperidone in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 159, 2002, pp. 480-482.
17. Heresco-Levy, U., Kremer, I., Javitt, D. C., Gochman, R., Reshev, A., Blararu, M., Cohen, T.: Pilot-controlled trial of D-cycloserine for the treatment of post-traumatic stress disorder. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 5, 2002, pp. 301-307.

18. Heresco-Levy, U., Ermilov, M., Lichtenberg, P., Bar, G., Javitt, D. C.: High-dose glycine added to olanzapine and risperidone for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 55, 2004, pp. 165-171.
19. Heresco-Levy, U., Javitt, D. C.: Comparative effects of glycine and D-cycloserine on persistent negative symptoms in schizophrenia: a retrospective analysis. *Schizophr. Res.*, 66, 2004, pp. 89-96.
20. Heresco-Levy, U., Javitt, D. C., Ebstein, R., Vass, A., Lichtenberg, P., Bar, G., Catinari, S., Ermilov, M.: D-serine efficacy as add-on pharmacotherapy to risperidone and olanzapine for treatment-refractory schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 57, 2005, pp. 577-585.
21. Hons, J.: Glutamatergí neurotransmise a její role v patofyziologii schizofrenie. *Čes. a slov. Psychiat.*, 100, 2004, s. 220-228.
22. Iwainky, H.: Mode of action, biotransformation and pharmacokinetics of antituberculosis drugs in animals and man. In Bartmann K. ed. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer, 1988, pp. 124-133.
23. Javitt, D. C., Zylberman, I., Zukin, S. R., Heresco-Levy, U., Lindenmayer, J. P.: Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am. J. Psychiatry*, 151, 1994, pp. 1234-1236.
24. Javitt, D. C.: Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, 9, 2004, pp. 984-87, 979.
25. Javitt, D. C., Hashim, A., Sershen, H.: Modulation of striatal dopamine release by glycine transport inhibitors. *Neuropsychopharmacology*, 30, 2005, pp. 649-656.
26. Kremer, I., Vass, A., Gorelik, I., Bar, G., Blanaru, M., Javitt, D. C., Heresco-Levy, U.: Placebo-controlled trial of lamotrigine added to conventional and atypical antipsychotics in schizophrenia. *Biol.*, 56, 2004, pp. 441-446.
27. Olney, J. W., Labruyere, J., Price, M. T.: Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science*, 244, 1989, pp. 1360-1362.
28. Tamminga, C. A.: Schizophrenia and glutamate. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12, 1998, pp. 21-36.
29. Thomas, J. W. et al.: Glycine modulation of the phencyclidine binding site in mammalian brain. *Brain. Res.*, 442, 1988, pp. 396-398.
30. Tiihonen, J., Hallikainen, T., Ryyanen, O. P., Repo-Tiihonen, E., Kotilainen, I., Eronen, M., Toivonen, P., Wahlbeck, K., Putkonen, A.: Lamotrigine in treatment-resistant schizophrenia: a randomized placebo-controlled crossover trial. *Biol. Psychiatry*, 54, 2003, pp. 1241-1248.
31. Tsai, G., Yang, P., Chung, L., Lange, N., Coyle, J. T.: D-serine added to antipsychotics for treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 44, 1998, pp. 1081-1089.
32. Tsai, G., Lane, H. Y., Yang, P., Chong, M. Y., Lange, N.: Glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 55, 2004, pp. 452-456.
33. Tůma, I., Pérez, M.: Farmakologické přístupy ke kognitivnímu deficitu u schizofrenie. *Remedia*, 14, 2004, s. 478-483.
34. Tuominen, H. J., Tiihonen, J., Wahlbeck, K.: Glutamatergic drugs for systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research*, 72, 2005, pp. 225-234.
35. Watson, G. B. et al.: D-cycloserine acts as a partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Brain. Res.*, 510, 1990, pp. 158-160.
36. Wlaz, P., Baran, H., Loscher, W.: Effect of the glycine/NMDA receptor partial agonist, D-cycloserine, on seizure threshold and some pharmacodynamic effects of MK-801 in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 257, 1994, pp. 217-225.

Dodáno redakci: 12. 10. 2005  
Po skončení recenzního řízení: 7. 12. 2005

MUDr. Jaromír Hons  
Psychiatrická klinika LF UK a FN  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: honsj@lfhk.cuni.cz



## INTENZIVNÍ PÉČE V PSYCHIATRII

Beer M. D., Pereira S. M., Paton C.

Kniha anglických autorů podává komplexní pohled na systém psychiatrické intenzivní péče v zemích Spojeného království se zvláštním zřetelem zejména na její forenzní a etické aspekty. Jednotlivé části publikace se věnují terapeutickým intervencím, zhodnocením a zvládnutím rizik, struktúře a vedení jednotek intenzivní psychiatrické péče. Podrobně jsou probírány otázky psychologického a psychofarmakologického přístupu k pacientům s akutně vzniklým neklidným chováním a otázky návazné dlouhodobé péče. Je diskutována účelnost postupů využívajících fyzické omezení nemocných. Publikace přináší též mnoho zajímavých podnětů, které mohou sloužit i jako podklady pro tvorbu národních standardů odborných postupů v této oblasti.

Vydala Grada Publishing v roce 2005, ISBN 80-247-0363-7, 304 stran, cena 490 Kč.

Publikaci můžete objednat na adrese: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz

---

# Glutamatergní neurotransmise a její role v patofyziologii schizofrenie

---

Hons J.

Psychiatrická klinika LF UK a FN Hradec Králové,  
přednosta prof. MUDr. J. Libiger, CSc.

---

**Souhrn:** Poruchy funkce neuronů obsahujících excitační aminokyseliny se uplatňují v patofyziologii širokého spektra neurodegenerativních chorob. Dysfunkce neurotransmise zprostředkované excitačními aminokyselinami se může podílet také na patogenezi schizofrenie. Existují dvě glutamátové teorie patofyziologie schizofrenie. Hypotéza glutamatergní hypofunkce předpokládá hypofunkci mozkových glutamatergních neuronů. Nejvýznamnějším důsledkem této hypotézy je možné terapeutické ovlivnění schizofrenní symptomatiky farmaky zvyšujícími glutamatergní neurotransmisi. Byla zformulována také hypotéza glutamatergní hyperfunkce, jejímž východiskem je možné ovlivnění schizofrenní symptomatiky látkami snižujícími vyplavování glutamátu.

**Klíčová slova:** glutamát, schizofrenie, glutamatergní hypotéza, NMDA receptor.

**Summary:** Hons J.: The Role of Glutamatergic Neurotransmission in Pathophysiology of Schizophrenia  
The dysfunction of the neurons containing excitatory amino acids is present in a wide range of neurodegenerative disorders. Schizophrenia may also result from a dysfunction of excitatory amino acid neurotransmission. There are two glutamatergic hypotheses of schizophrenia. Glutamate hypofunction hypothesis supposes hypofunction of cerebral glutamatergic neurons in schizophrenia. The most significant consequence of the hypothesis is a possible use of drugs enhancing glutamatergic neurotransmission in the treatment of schizophrenic symptoms. Glutamate hyperfunction hypothesis was also proposed. It suggests a possible effect of glutamate release-inhibiting drugs in schizophrenia.

**Key words:** glutamate, schizophrenia, glutamatergic hypothesis, NMDA receptor.

Čes. a slov. Psychiat., 100, 2004, No. 4, pp. 220 - 228.

---

## ÚVOD

---

Studium fyziologických a patologických aspektů neurotransmise zprostředkované excitačními aminokyselinami je jednou ze zajímavých oblastí základních a klinických neurověd. Excitační aminokyseliny modulují aktivitu většiny neuronů v centrálním nervovém systému (CNS). Vzhledem k poznatkům získaným v nedávné době se studium excitačních aminokyselin podílí na utváření nových neurovědních konceptů. Roste povědomí velmi důležité role tohoto neurotransmitterového systému v různorodosti fyziologických a chorobných procesů. Neurony obsahující excitační aminokyseliny hrají důležitou roli v neuropsychologických funkcích jako je učení a paměť, a zdá se, že i v patofyziologii širokého spektra neurodegenerativních chorob.

Ze systému excitačních aminokyselin v CNS je zatím nejlépe charakterizován glutamatergní systém. Pre- a postsynaptické glutamátové receptory, zprostředkovávající rychlou excitační neurotransmisi, byly nalezeny na neuronech ve všech částech CNS [9, 22]. V posledních letech se výzkum v oblasti glutamátového systému soustřeďuje především na roli NMDA podtypu glutamátových ionotropních receptorů při synaptické transmissi. Glutamatergní neurotrans-

mise zprostředkovaná NMDA receptory byla zahrnuta do důležitých fyziologických procesů jako je synaptogeneze a neuronová plasticita CNS. Dysfunkce NMDA receptorů, která může být příčinou neurotoxicity a neuronální degenerace, je dávana do souvislosti s neurobiologií onemocnění jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, epilepsie či ischemická mozková příhoda [9, 22, 23]. Dysfunkce kortikolimbické glutamatergní neurotransmise zprostředkované NMDA typem receptorů může hrát velmi významnou roli také v patofyziologii neuropsychiatrických onemocnění jako je schizofrenie [11, 38, 43]. V této souvislosti by využití látek ovlivňujících glutamatergní systém umožnilo terapeutické ovlivnění pozitivních symptomů a mechanismu zodpovědného za kognitivní deficit a negativní symptomy.

---

## NEUROTRANSMITEROVÝ SYSTÉM EXCITAČNÍCH AMINOKYSELIN

---

Hlavními neuromediátorovými aminokyselinami v CNS jsou kyselina glutamátová, kyselina asparagátová, glycin a kyselina gama-aminomáselná (kys. 4-aminomáselná, GABA). Ve většině oblastí CNS je excitační neuronální transmise zprostředkována

Tab. 1. Podjednotky jednotlivých typů glutamátových receptorů.

Ionotropní receptory			Metabotropní receptory		
NMDA	AMPA	Kainát	Skupina I.	Skupina II.	Skupina III.
NR 1	Glu R1	Glu R5	mGlu R1	mGlu R2	mGlu R4
NR 2A	Glu R2	Glu R6	mGlu R5	mGlu R3	mGlu R6
NR 2B	Glu R3	Glu R7			mGlu R7
NR 2C	Glu R4	KA 1			mGlu R8
NR 2D		KA 2			
NR 3A					

(NMDA, *N*-methyl-*D*-aspartát; AMPA, *alfa*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina)

solemi endogenních excitačních aminokyselin – glutamátem, aspartátem a homocysteinem.

## GLUTAMÁTERGNÍ NEUROTRANSMITEROVÝ SYSTÉM

L-glutamát je všeobecně chápán jako hlavní rychle působící excitační neuropřenašeč na synapsích CNS obratlovců. L-glutamát se také podílí na zprostředkování synaptické plasticity, včetně dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD). Takto hraje důležitou roli v učení, paměti a ve vývoji CNS [43]. Úloha L-glutamátu je zmiňována v souvislosti s excitotoxickým mozkovým poškozením [47]. Mezi onemocnění, v jejichž patofyziologii může hrát důležitou roli dysfunkce glutamátergního systému, patří např. epilepsie. Zvýšené vyplavování glutamátu může posílit mechanismy vedoucí k poškození mozkové tkáně, které jsou způsobeny ischemií nebo hypoglykemií. Role glutamátu je zmiňována i v souvislosti s chronickými neurodegenerativními onemocněními jako je Alzheimerova či Huntingtonova choroba [40].

### GLUTAMÁTOVÉ RECEPTORY

Excitační aminokyseliny, v první řadě L-glutamát, L-aspartát a příbuzné deriváty, účinkují přes receptory, které jsou lokalizovány na neuronech ve všech částech CNS. Je známo, že existuje přes 15 různých zástupců skupiny glutamátových receptorů ve dvou hlavních třídách – ionotropní a metabotropní (tab. 1). Ionotropní receptory kontrolují iontové kanály permeabilní pro kationty. Otevření těchto kanálů umožňuje tok draselných nebo vápníkových iontů do intracelulárního prostoru. Vazba glutamátu na ionotropní receptor vede k aktivaci iontového kanálu a jeho otevření. Metabotropní receptory jsou spojeny s G proteinem. Vazba glutamátu na metabotropní receptor vyvolává účinek nepřímo, tedy prostřednictvím aktivace G proteinu, který moduluje aktivitu vnitrobuněčných posílů. Aktivuje fosfolipázu C nebo inhibuje adenylátcyklázu. Tento typ glutamátového receptoru zprostředkovává dlouhotrvající

elektrické změny v CNS, tzv. dlouhodobou potenciaci, která hraje důležitou roli v paměťových funkcích [9, 22]. Složitost exprese glutamátových receptorů a možnosti jejich modifikace za fyziologických a patologických okolností znesnadňují posouzení jejich role v patogenezi neurologických a psychiatrických onemocnění [9, 22, 23].

### Ionotropní glutamátové receptory

V nedávné době byly klonovány podjednotky vytvářející funkční ionotropní receptory (tab. 1). Tyto podjednotky byly dále charakterizovány biofyzikálně i farmakologicky. Genová exprese jednotlivých podjednotek v různých neuronech CNS je řízena ontogenetickými a fylogenetickými vlivy. Funkční i farmakologické vlastnosti glutamátergních receptorů, spojených s iontovým kanálem, jsou rozdílné v důsledku odlišného podjednotkového složení. Existuje několik typů těchto glutamátem aktivovaných komplexů receptoru a iontového kanálu. Na základě farmakologických a elektrofyziologických studií byly charakterizovány tři třídy ionotropních glutamátových receptorů. Jsou pojmenovány po ligandech (agonistech), které se na ně selektivně váží.

Ligandem NMDA receptorů je *N*-methyl-*D*-aspartát (NMDA). Podjednotky NMDA receptorů jsou kódovány šesti geny označovanými NR1, NR2A – NR2D a NR3A. Jak farmakologické vlastnosti (afinita k agonistům glutamátu a glycinu), tak biofyzikální vlastnosti (vodivost a průměrná doba otevření jednotlivých iontových kanálů), jsou ovlivněny podjednotkovým složením NMDA receptorů. Třída AMPA receptorů se skládá ze čtyř jednotek (GluR1–4) a vykazuje vysokou afinitu k *alfa*-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionátu, derivátu propionové kyseliny (AMPA). Podjednotky AMPA receptorů jsou kódovány geny označovanými GluR1–GluR4 a kombinace podjednotek vytváří funkční receptor-iontový kanál. Třída AMPA receptorů je velmi různorodá a široce distribuovaná v CNS. Zajišťuje po většinu času velký podíl glutamátergního přenosu. Léky, které by modulovaly tento systém, nejsou pro klinické použití zatím dostupné. Skupina kainátových receptorů se sestává ze dvou druhů selektivních podjednotek (GluR5–7

a KA 1–2). Jsou kódovány též více geny označovanými GluR5–GluR7, KA1 a KA2.

### **Aktivace ionotropních glutamátových receptorů**

Během rychlého excitačního přenosu jsou presynapticky uvolněným glutamátem aktivovány současně jak NMDA, tak AMPA/kainátové receptory, což vede k depolarizaci a vzniku impulzní aktivity v postsynaptickém neuronu. Komponenta excitačního postsynaptického proudu, která vzniká aktivací AMPA/kainátových receptorů, trvá zpravidla několik milisekund, zatímco komponenta vzniklá aktivací NMDA receptorů trvá desítky až stovky milisekund. Vlastnosti iontových kanálů aktivovaných glutamátem mohou být ovlivněny řadou faktorů. Amplituda a doba trvání excitačních postsynaptických proudů na glutamátergních synapsích je u různých neuronů značně odlišná. Protože jsou iontové kanály aktivované glutamátem propustné pro kalciové ionty, dochází po jejich aktivaci ke zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$ . Kalcium uvnitř buňky spouští řadu enzymaticky řízených reakcí, jež vedou k dlouhodobým změnám excitability a tak ke vzniku paměťových stop. Za patologických stavů, jako je např. ischemie nebo hypoglykémie, může vlivem zvýšené koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$  docházet k poškození nervových buněk, které může vést až k jejich zániku.

### **NMDA receptory**

NMDA receptory jsou v současnosti nejlépe zmapovaným podtypem receptorů excitačních aminokyselin. NMDA receptor je komplex receptoru a rychlého excitačního kalciového kanálu, jehož propustnost pro ionty závisí na vazbě ligandů na receptor. Na NMDA receptoru je pět vazebných, tzv. modulačních míst. Primární neurotransmiterová vazebná místa váží NMDA, glutamát a aspartát. Četná vazebná místa, která fungují jako modulátory, jsou lokalizována jak uvnitř, tak i okolo komplexu receptoru a iontového kanálu. Tři z těchto modulačních míst jsou lokalizována okolo NMDA receptoru – jedno místo váže kromě koagonistů také neurotransmitter glycin, další místo váže polyaminy, třetí váže  $Zn^{2+}$ . Dvě další modulační místa jsou lokalizována uvnitř nebo blízko iontového kanálu. Hořčíkový iont může blokovat kalciový kanál na jednom z těchto míst, pravděpodobně uvnitř nebo blízko iontového kanálu. Toto modulační místo je závislé na napětí, membránový potenciál blokuje vodivost kanálu. Další inhibiční modulační místo lokalizované uvnitř iontového kanálu je někdy nazýváno „PCP místem“, protože se na toto místo váže psychotomimetická látka fencyklidin (PCP). Na stejném vazebném místě se váží i další nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru, ketamin a MK-801 (dizocilpin) [17, 22, 26].

### **Struktura glutamátergního systému v CNS**

V CNS jsou glutamátergní dráhy organizovány do dvou hlavních systémů. Dráhy descendentního systému vedou z mozkové kůry (neokortexu) do

subkortikálních struktur, zejména bazálních ganglií, thalamu, pontu, mozkového kmene a míchy. Prostřednictvím těchto glutamátergních neuronů je zajišťována descendentní kontrola subkortikálních struktur [22]. Antagonistický efekt má ascendentní dopaminový systém. Glutamátergní neurony sestupného (kortiko-subkortikálního, limbického) systému antagonistizují aktivační účinky dopaminergních mezokortikálních drah.

Druhým systémem je ascendentní glutamátergní neuronální systém, jehož axony vycházejí z hipokampu a táhnou se k bazálním gangliím a cingulu. Ostatní glutamátergní dráhy jsou široce distribuované ve všech částech (mozkové kůry, v limbické kůře i neokortexu (dlouhé intrakortikální dráhy – kortikokortikální projekce). Velká hustota glutamátergních drah je také uvnitř hipokampální formace, glutamátergní jsou neurony nucleus subthalamicus, hlavní dráhy vstupující do mozečku, vlákna vycházející z olivy inferior a pontinních jader. V mozečku jsou glutamátergní jen excitační neurony v mozečkové kůře a mozečkové granulózní buňky. Glutamát je také jedním z neurotransmiterů primárních senzoričkových vláken [22].

### **PATOFYZIOLOGIE SCHIZOFRENIE – neurotransmiterový model**

Schizofrenie je heterogenní onemocnění a je nepravděpodobné, že by jakýkoliv individuální etiologický činitel mohl objasnit spektrum pozorovaných klinických příznaků. Nálezy zobrazujících studií získané ve druhé polovině 90. let, které prokazují hyperfunkci dopaminového systému v CNS pacientů se schizofrenií, upevnily dominantní postavení dopaminové hypotézy vzniku schizofrenie [8, 16, 24, 31]. Přes 20 let se hlavní hypotéza, objasňující patofyziologii schizofrenie, soustředila na mechanismus antipsychotických účinků neuroleptik, tedy na blokádu dopaminových  $D_2$  receptorů [10, 35, 41]. Dopaminová teorie se opírala o dva poznatky. Prvním poznatkem byla indukce psychózy psychostimulancií, nepřímými agonisty dopaminu (např. d-amfetaminem). Psychostimulancia, která zvyšují centrální dopaminergní neurotransmisi, mohou způsobovat rozvoj pozitivních schizofrenních symptomů jako jsou halucinace, bludy a další poruchy myšlení. Druhým poznatkem byla korelace klinické potence neuroleptik s jejich afinitou k  $D_2$  receptorům. Neuroleptika blokuji aktivující efekt dopaminu a jeho agonistů na chování a tento účinek je závislý na dávce. Post mortem prováděné studie, stejně tak jako in vivo zobrazující studie [14, 28, 49] poskytují důkazy, že dysfunkce dopaminergní neurotransmise je důležitým prvkem schizofrenního onemocnění. Nicméně existují i nálezy, které výsadní postavení dopaminu v patogenezi schizofrenie oslabují. Ačkoliv byla prokázána přítomnost zvýšené hladiny dopaminu v mozcích schizofreniků, i další neuro-

ransmitery mohou být v patogenezi tohoto onemocnění přinejmenším stejně důležité. Jakákoliv teorie, která by mohla objasnit patofyziologii schizofrenie, musí vzít v úvahu alespoň pět charakteristik tohoto onemocnění: pozitivní symptomy, negativní symptomy, kognitivní deficit, výskyt příznaků v časně dospělosti a funkční úpadek z premorbidní úrovně. Dopaminergní hyperfunkce vysvětluje v první řadě pozitivní příznaky. Dopaminergní hypofunkce může mít podíl na vzniku negativních symptomů [6, 34]. Je ovšem těžké vystačit s dopaminergní dysfunkcí jako s kompletním patogenetickým činitelem zodpovědným za kognitivní deficit, kortikolimbickou atrofií a deteriorující průběh schizofrenního onemocnění. V patofyziologii schizofrenie se s velkou pravděpodobností uplatňuje i dysfunkce dalších neurotransmitterových systémů, především serotonergního [36] a glutamatergního systému.

## GLUTAMATERGNI HYPOTÉZA SCHIZOFRENIE

### Hypotéza glutamatergní hypofunkce

K formulaci alternativního modelu schizofrenie vedla dvě odlišná klinická pozorování. Fencyklidin, který blokuje iontový kanál spojený s glutamatergním NMDA receptorem, vyvolává u zdravých lidí jak negativní tak pozitivní symptomy podobné schizofrenii. Fencyklidin (PCP, andělský prach) je nekompetitivní antagonist NMDA receptoru působící na stejném místě jako další nekompetitivní antagonist NMDA receptoru MK-801 (dizocilpin). MK-801 je také schopný indukovat v klinickém obraze schizofrenii podobné příznaky, má podobný psychotogenní účinek jako PCP. Luby ve své studii podával PCP (0,1 mg/kg i.v.) zdravým lidem, u kterých poté zaznamenal změny v psychice a chování [33]. Spektrum těchto změn se pohybovalo od stavů depersonalizace až k hluboké dezorganizaci myšlení. PCP bylo podáváno také postupně čtyřem chronickým schizofrenikům, kteří byli nemocní průměrně 10 let. U těchto pacientů bylo zaznamenáno zintenzivnění poruch myšlení, byl popsán jakýsi návrat akutní agitované fáze onemocnění, objevila se hostilita a agresivita [17]. Změny klinického stavu u těchto čtyř pacientů trvaly po dobu od 4 do 6 týdnů. Naproti tomu u zdravých subjektů trvá efekt změn v chování navozených podáním PCP obvykle od 1 do 4 hodin, jak bylo prokázáno i v další studii [20]. V souvislosti s dramatickými exacerbacemi symptomů u schizofreniků navozenými podáním PCP a vzhledem k chronickému charakteru těchto účinků v porovnání se zdravými lidmi se soudí, že se PCP svým efektem dotýká nějakého základního aspektu tohoto onemocnění [33].

Tato pozorování doplňují nálezy abnormální glutamatergní aktivity v CNS pacientů se schizofrenií. Kim měřil hladiny glutamátu v mozkomíš-

ním moku ve skupině 20 schizofreniků a ve srovnání s nimi u 44 zdravých kontrolních subjektů [29]. U všech pacientů byla diagnostikována paranoidní forma schizofrenie s halucinatorní symptomatikou. Z 20 schizofreniků bylo 16 léčeno neuroleptiky. Hladiny glutamátu v mozkomíšním moku u schizofreniků byly sníženy až o 50% oproti kontrolním subjektům. Rozdíl hladin glutamátu v mozkomíšním moku mezi pacienty léčenými neuroleptiky a pacienty bez medikamentózní léčby nebyl statisticky významný. Tento výsledek byl připsán malému souboru neléčených pacientů.

Na základě těchto nálezů byla navržena glutamatergní hypotéza schizofrenie, která předpokládala deficit glutamatergní funkce a/nebo zvýšení dopaminergní funkce. Vzájemné působení dopaminu a glutamátu vedlo k teorii interakce dopaminu a glutamátu, kdy dopamin inhibuje glutamatergní přenos. Antipsychotická účinnost neuroleptik byla vysvětlována tím, že neuroleptika snižují dopaminergní funkce [29].

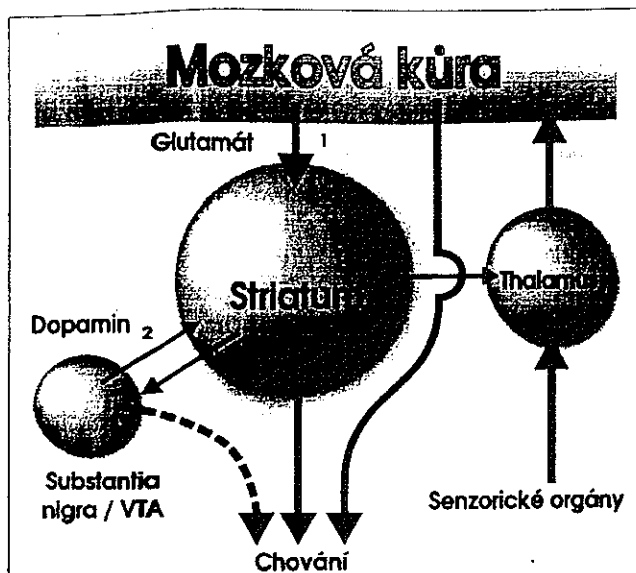
Také kvantitativní mozková morfometrie, neuropsychologické nálezy, evokované potenciály a funkční zobrazovací metody odkryly u schizofrenie strukturální a funkční abnormality, které postihují různé oblasti mozku, včetně temporálního kortexu, hipokampu, oblastí předního cingula, prefrontální arey, amygdaly, nucleus accumbens, striata a thalamu [3, 39, 50]. Tyto mozkové struktury vzájemně spojuje právě excitační glutamatergní systém.

Další zajímavý patofyziologický koncept schizofrenie vychází z tonického excitačního působení glutamátu cestou kortikostriální dráhy na striální struktury, které mají inhibiční efekt na thalamus. Tlumivým účinkem tak omezují množství senzorických vstupů, které pronikají k mozkové kůře. Tento mechanismus představuje selektivní filtrační ochranu mozkové kůry, připouští k mozkové kůře jen důležité informace (obr. 1). Původně byl tento „filtr“ demonstrován elektrofyziologickými experimenty Guntherem Stilleem již v roce 1976 [42]. Předpokládá se, že oslabený glutamatergní tonus snižuje inhibiční působení GABA interneuronů pallidothalamických drah na thalamus, a tím zvyšuje riziko senzorického přetížení integrační kapacity mozkové kůry. Nepřiměřená odpověď na takové přetížení v monoaminergních systémech by mohla vést k rozvoji psychózy. Z těchto pozorování lze odvodit, že by glutamát/aspartatergní kortikostriální dráha mohla být zapojena do patogeneze schizofrenie i dalších psychotických stavů [11].

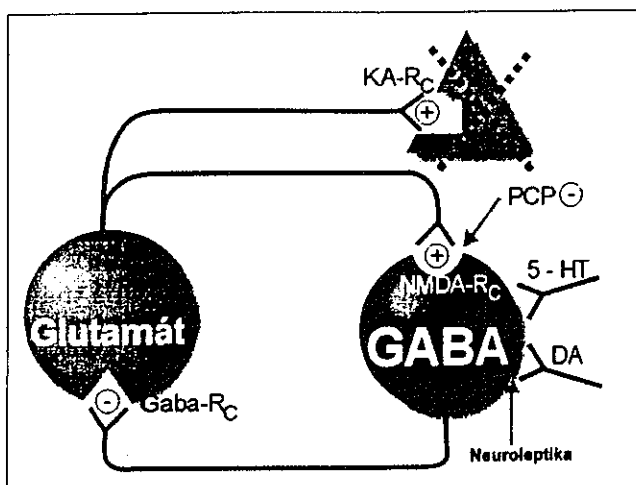
### Hypotéza glutamatergní hyperfunkce

Antagonisté glutamatergního NMDA receptoru jako fencyklidin a ketamin indukují schizofrenii podobné pozitivní, negativní a kognitivní symptomy u zdravých lidí (viz výše), a to zejména prostřednictvím účinku na NMDA receptorech lokalizovaných na GABAergních interneuronech v kortikálních a limbic-





Obr. 1. Ochrana mozkové kůry proti nadměrnému vstupu informací a přetížení integrační kapacity – schematická prezentace. Zpětnovazební regulační systém zahrnuje thalamus a striatum. Ve striatu jsou navzájem vyváženy dva hlavní faktory: glutamatergní tonus působící cestou kortikostriatální dráhy [1] a dopaminergní tonus působící cestou dráhy nigrostriatální [2] (podle Carlssona, 1999).



Obr. 2. Dysfunkce kortikolimbické glutamatergickej neurotransmise u schizofrenie – schematická prezentace (podle Coylea, 1996). (DA, dopamin; 5-HT, serotonin; GABA, GABAergní interneuron; Gaba-R<sub>C</sub>, GABA receptor; Glutamát, glutamatergickej neuron; KA-R<sub>C</sub>, non-NMDA kainátový receptor; NMDA-R<sub>C</sub>, NMDA receptor; PCP, fencyklidin;).

kých oblastech CNS. Olney vysvětluje tento fenomén následujícím modelem: aktivita kortikolimbických GABAergních interneuronů je citlivě ovlivňována NMDA receptorovými antagonisty. Fencyklidin redukuje glutamatergickej aktivaci inhibičních GABAergních interneuronů. Snížený GABAergní tonus pak desinhibuje kortikolimbické glutamatergickej neurony. Zvýšená glutamatergickej eferentní aktivita způsobuje excitotoxickou neuronální smrt přetrvávající aktivací non-NMDA receptorů na postsynaptických neuronech [37, 38]. Z tohoto modelu vyplývá, že hypofunkce kortikolimbických GABAergních interneuronů by mohla zvyšovat

excitabilitu glutamatergickej eferentních neuronů vycházejících z těchto oblastí (obr. 2). Za normálních okolností jsou totiž tyto neurony GABAergními interneurony inhibovány. Důsledkem desinhibice je snížená schopnost ovlivněné kortikální oblasti filtrovat přicházející informační excitační vstupy umožňující přístup irrelevantních informací. Místní poškození inhibiční regulace aferentní a eferentní excitační neurotransmise by mohlo zodpovídat za takové symptomy schizofrenie jako jsou halucinace, bludy a další poruchy myšlení.

Ačkoliv je tento scénář možný, existují i argumenty pro jiné vysvětlení. Mnoho post mortem prováděných výzkumů podporuje funkční hypofunkci GABAergních interneuronů, ovšem nálezy specifických GABAergních dysfunkcí nejsou jednotné. Benesová prokázala, že u nemocných schizofrenií existuje ztráta GABAergních neuronů ve specifických vrstvách předního cingula, tedy redukovaný počet interneuronů [4, 5]. Byla prokázána i snížená aktivita glutamát-dekarboxylázy, enzymu zodpovědného za syntézu GABA [7], a odvozená up-regulace GABA receptorů [4, 5]. Akbarian nepotvrdil redukci počtu GABAergních interneuronů, ovšem prokázal u schizofrenie významné snížení množství glutamát-dekarboxylázy [1]. Redukovaný počet GABAergních interneuronů a schopnost syntetizovat GABA, ať už jednotlivě či v kombinaci, mohou zhoršit inhibiční kontrolu kortikolimbických glutamatergickej eferentních neuronů. Naopak farmakologické intervence, které presynapticky zvyšují GABAergní funkce, by měly mít terapeutické účinky.

Důležitým důsledkem desinhibice kortikolimbických glutamatergickej eferentních neuronů je nadměrná stimulace glutamatergickej non-NMDA receptorů na postsynaptických neuronech (viz výše). Nadměrné vyplavování glutamátu může vést ke zvýšení vtoku sodíkových a vápníkových kationtů do postsynaptických neuronů s následným neurotoxickým účinkem, neuronální smrtí a z toho vyplývajícími neurodegenerativními změnami, které u schizofrenie pozorujeme. Přetrvávající aktivace non-NMDA glutamatergickej receptorů tedy může způsobovat zpožděnou degeneraci neuronů s cytopatologickými vlastnostmi apoptózy, která není spojená se zánětlivou gliální reakcí. Ani v mozcích pacientů se schizofrenií nebyla glióza popsána [4]. Bylo prokázáno, že systémové podávání PCP a odvozených nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů způsobuje zpožděnou neuronální degeneraci v kortikálních a limbických oblastech [38].

## LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ GLUTAMATERGICKEJ SYSTÉM

Blokátory iontového kanálu spojeného s NMDA receptorem jako jsou fencyklidin a dizocilpin nejsou jediné látky ovlivňující glutamatergickej neurotransmiterový systém. V současnosti je známo mnoho látek specificky agonisticky nebo antagonisticky působících na ionotropní nebo metabotropní recep-

Tab. 2. Látky ovlivňující glutamátové receptory.

Typy receptorů	Agonisté		Antagonisté	
NMDA	<u>Kompetitivní</u> NMDA L-CCG-IV ACBD	<u>Modulační</u> glycin D-cykloserin	<u>Kompetitivní</u> D-AP5, D-AP7 CGS19755 CGP37849 D-CPP D-CPPene	<u>Modulační</u> 7-chlorokynurenát 5,7-dichlorokynurenát MNQX L689,560 HA966
			<u>Blokátory iontového kanálu</u> MK-801 (dizociplin) PCP (fencyklidin)	
AMPA	<u>Kompetitivní</u> AMPA ATPA 5-fluorowillardiin Br-HIBO	<u>Modulační</u> Aniracetam 1-BCP Cyklothiazid	<u>Kompetitivní</u> NBQX CNQX DNQX	<u>Modulační</u> GYKI 52466
	Kainát	Kainát Domoát		<u>Kompetitivní</u> NBQX CNQX DNQX
Metabotropní		trans-ACPD L-CCG-1 L-AP4 3,5-dihydroxyfenylglycin trans-2,4-ADA Ibotenát		L-AP3 (+)-MCPG (S)-4CPG

(AMPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionová kyselina; NMDA, N-methyl-D-aspartát; L-CCG-IV, (2S, 3R, 4S)-alfa(karboxycyklopropyl)glycin; D-AP5, D-2-amino-5-fosfo-pentanová kyselina; D-AP7, D-2-amino-7-fosfo-pentanová kyselina; ACBD, 1-aminocyklobutan-1,3-dikarboxylát; CGS19755, cis-4-(fosfomethyl)piperidin-2-karboxylová kyselina; CGP37849, D,L-(E)-2-amino-4-methyl-5-fosfo-3-pentenová kyselina; CPP, 3-(2-karboxypiperazin-4-yl)propyl-1-fosfonová kyselina; CPPene, (E)-4-(3-fosfo-2-propenyl)piperazin-2-karboxylová kyselina; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion; DNQX, 6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion; MNQX, 5,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion; NBQX, 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxalin; L689,560, 4-trans-2-karboxy-5,7-dichloro-4-fenylaminokarbonylamino-1,2,3,4-tetrahydroquinolin; ATPA, alfa-amino-3-hydroxy-5-terbutyl-4-isoxazol-propionát; HA966, 3-amino-1-hydroxypyrolidin-2-on; Br-HIBO, (S)-4-bromohomoibotenát; Aniracetam, 1-(4-methoxybenzoyl)-2-pyrolidinon; 1-BCP, 1-(1,3-benzodioxol-5-ylkarbonyl)-piperidin; GYKI 52466, 1-(4-aminofenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin; trans-ACPD, 1-aminocyklopentan-trans-1,3-dikarboxylová kyselina; L-CCG-I, (2S, 3S, 4S)-alfa(karboxycyklopropyl)glycin; L-AP-4, L-2-amino-4-fosfobutyrová kyselina; trans-2,4-ADA, trans-azetidín-2,4-dikarboxylová kyselina; L-AP-3, L-2-amino-4-fosfopropionová kyselina; (+)-MCPG, (+)-afla-methyl-4-karboxyfenylglycin; (S)-4CPG, (S)-4-karboxyfenylglycin)

tory (tab. 2). V souvislosti s glutamátergní teorií je již terapeutický účinek některých těchto látek u pacientů se schizofrenií klinicky zkoumán.

### Agonisté NMDA receptoru

Nejvýznamnějším předpokladem, který vyplývá z hypotézy glutamátergní hypofunkce jako patofyziologické komponenty schizofrenie, je, že látky, které zvyšují aktivaci glutamátergních NMDA receptorů by měly redukovat intenzitu klinické schizofrenní symptomatiky. Pokud jsou pozitivní symptomy, negativní symptomy a kognitivní deficit způsobeny antagonisty NMDA receptorů, pak by měly reagovat na agonisty NMDA receptorů. Agonisté NMDA receptorů však jako léky nesou významné riziko vzniku křečí a NMDA receptory zprostředkované neuronální degenerace [32]. Na glycinovém modulačním místě NMDA receptoru působí jako parciální agonista D-cykloserin [19, 23, 46], který prochází hematoencefalickou bariérou [25, 48]. D-cykloserin zvyšuje odpověď NMDA re-

ceptoru na endogenní glutamát bez toho, aby přímo aktivoval receptor [44]. Kromě toho jako parciální agonista ve vysokých dávkách narušuje NMDA receptorovou aktivaci, což snižuje jeho neurotoxické a konvulzivní účinky [13, 19]. Ve dvojité slepé, placebem kontrolované studii, se skupinou neuroleptiky léčených pacientů s chronickou schizofrenií s převahou negativních symptomů, D-cykloserin v dávce 50 mg p.d. významně redukoval negativní symptomy a výrazně zlepšil výkon v kognitivních testech [21]. Účinek se nedostavil při podávání příliš nízkých (15 mg p.d.) nebo vysokých (250 mg p.d.) dávek D-cykloserinu. U-profil efektu vzhledem k dávce je v souladu s farmakodynamickými vlastnostmi parciálních agonistů. Na podporu nedostatku efektu vysokých dávek D-cykloserinu Cascella zaznamenal, že denní dávka 250 mg způsobuje u pacientů se schizofrenií zhoršení klinického stavu [12]. Javitt demonstroval, že léčba glycinem také významně snižuje intenzitu negativní symptomatiky [27]. Protože pacienti v těchto studiích byli vždy

léčení také neuroleptiky, vlastní účinek agonistů glycinového modulačního místa na pozitivní symptomy zůstává neobjasněn.

Pokud je hypotéza glutamatergní hypofunkce správná, pak by měla zvýšená funkce NMDA receptoru také snížit intenzitu pozitivních symptomů. Toho by mohlo být dosaženo s minimálním rizikem vedlejších extrapyramidových příznaků. U D-cykloserinu a glycinu byly prokázány terapeutické účinky na negativní symptomy. Svým účinkem se může podílet na zvýšení funkce NMDA receptoru také klopazin. Klinické zkušenosti s neuroleptiky a atypickými antipsychotiky naznačují, že plný terapeutický efekt není patrný během prvních týdnů léčby. Vzhledem k roli NMDA receptorů v dlouhodobé potenciaci a synaptické plasticitě se mohou terapeutické účinky agonistů NMDA receptorů objevit také až s časovým odstupem. Je však třeba stále myslet i na to, že podání látky stimulující glutamatergní systém nese riziko vzniku závažných vedlejších účinků. NMDA receptor je spojen s neuronální excitací, ale také s neurodegenerací. V klinických pokusech by měly být pečlivě zhodnoceny veškeré mechanismy účinku látek ovlivňujících glutamatergní systém, abychom mohli funkce NMDA receptorů bezpečně terapeuticky využít.

#### **Antiglutamatergní látky**

Hypotéza glutamatergní hyperfunkce a výše zmíněné nálezy vedou k předpokladu, že látky inhibující vyplavování glutamátu mohou redukovat hyperglutamatergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů. Tyto látky by pak mohly být využitelné v terapii schizofrenie. Vyplavování glutamátu může být inhibováno látkami blokujícími sodíkové a vápníkové kanály, látkami snižujícími hladinu draslíku, dále také toxiny, které brání fúzi vezikulů s presynaptickou membránou, a agonisty presynaptických glutamatergních metabotropních receptorů. Jednou z látek stabilizujících neuronální membrány, která inhibuje kortikální vyplavování glutamátu, je lamotrigin.

Lamotrigin (3,5-diamino-6-[2,3-dichlorofenyl]-1,2,4-triazin) je antiepileptikum III. generace, jehož účinnost byla prokázána v terapii fokální epilepsie se sekundární generalizací. Výsledky dalších studií prokazují účinnost i v terapii a profylaxi některých afektivních poruch, zejména v terapii bipolární afektivní poruchy. Hlavním mechanismem účinku lamotriginu je inhibice uvolňování glutamátu a aspartátu stabilizací presynaptické membrány cestou inhibice a blokády presynaptických sodíkových kanálů závislých na úrovni depolarizačního napětí. Lamotrigin má stabilizační účinek na membrány neuronů také inhibicí a blokádu na napětí závislých P a N-typu vápníkových kanálů a účinkem na draslíkové kanály. Lamotrigin zvyšuje GABAergní neurotransmisi, neovlivňuje synaptickou plasticitu a může indukovat ochranu proti striatové neurotoxické kainatu, jehož

vyplavování je závislé na vyplavování glutamátu. Lamotrigin by mohl mít v souvislosti se svým farmakodynamickým profilem jedinečné psychotropní vlastnosti spojené s účinkem na kognitivní a behaviorální funkce. Ačkoliv může lamotrigin způsobovat neurobehaviorální toxicitu, je pacienty zpravidla velmi dobře snášen pro svůj příznivý profil vedlejších účinků. V modelu celkové cerebrální ischemie vykazoval lamotrigin neuroprotektivní efekt. Mezi pozitivní psychotropní účinky lamotriginu patří antidysforický efekt, úprava poruch chování u pacientů se závažným kognitivním deficitem a refrakterní epilepsií a pozitivní efekt na kognitivní funkce a chování psychiatrických pacientů.

Anand poskytl důkaz toho, že látky snižující vyplavování glutamátu mohou redukovat hyperglutamatergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů navozené jejich antagonisty jako jsou ketamin či fencyklidin. Ve své studii prokázal, že lamotrigin významně snižuje intenzitu pozitivních a negativních příznaků i kognitivního deficitu navozených psychotomimetickým účinkem ketaminu u zdravých jedinců [2]. Účinek lamotriginu je vysvětlován presynaptickým snížením vyplavování glutamátu a následným snížením aktivace postsynaptických non-NMDA receptorů v kortikálních oblastech. Existují i další důkazy pozitivního účinku lamotriginu na schizofrenní symptomatiku. Dursun a Deakin podávali lamotrigin jako augmentaci stálé antipsychotické medikace klopazinem u pacientů se schizofrenií rezistentních na terapii po dobu 24 týdnů v dávce 100–300 mg p.d. Při augmentaci lamotriginem zaznamenali výrazný ústup psychotické symptomatiky (dle BPRS) již během prvních dvou týdnů léčby. Naopak augmentace antipsychotické terapie topiramátem, antagonistou glutamatergních kainát/AMPA receptorů, nevedla k významnému snížení skóru BPRS [18]. Tiisonen testoval účinnost lamotriginu na pozitivní schizofrenní symptomatiku v randomizované, placebem kontrolované, dvojité slepé, 12 týdnů trvající studii. V augmentaci stávající antipsychotické terapie klopazinem podával lamotrigin v dávce 200 mg p.d. 34 pacientům s chronickou schizofrenií rezistentní na léčbu. Terapie lamotriginem byla výrazně účinnější v redukcii pozitivních symptomů a všeobecných symptomů (dle PANSS) ve srovnání s placebem. Nebyl zaznamenán signifikantní účinek na negativní symptomy. Augmentace léčby lamotriginem zlepšovala pozitivní symptomy především u pacientů se závažnější klinickou symptomatikou (celkový skór BPRS více jak 45) [45].

---

#### **DISKUSE A ZÁVĚR**

Existuje stále více důkazů, že dysfunkce glutamatergního systému může přispívat k rozvoji manifestace schizofrenie. Glutamátová hypotéza prezentuje důležitý fokus pro výzkum schizofrenie

a mohla by pomoci vysvětlit některé patofyziologicky neobjasněné aspekty tohoto onemocnění. Přesné vymezení podílu dysfunkce kortikolimbické glutamatergní neurotransmise v patofyziologii schizofrenie by umožnil lepší terapeutické ovlivnění pozitivních symptomů a mechanismu zodpovědného za kognitivní deficit a negativní symptomy.

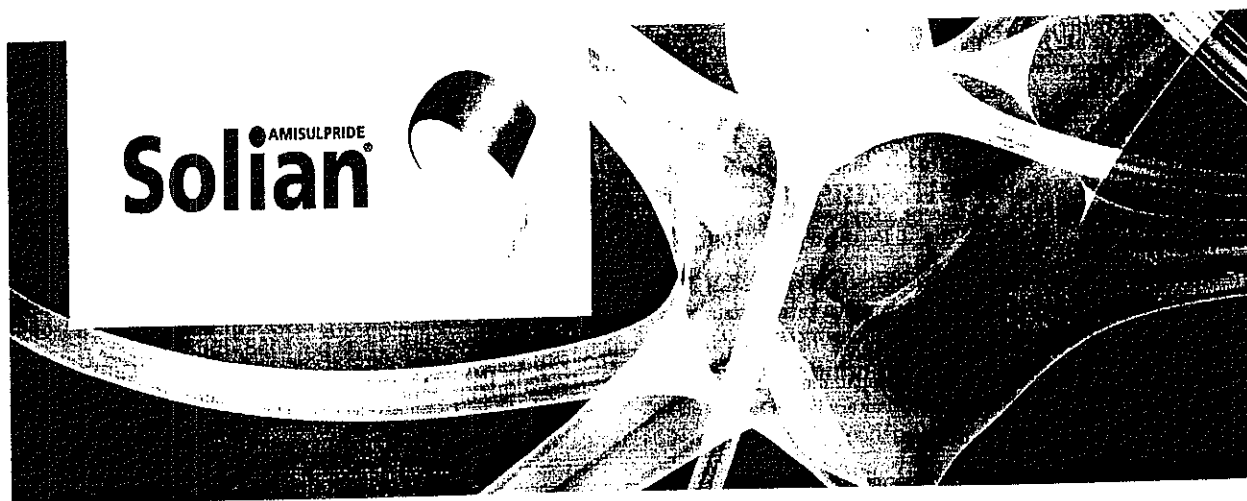
V klinických studiích byl zkoumán účinek látek agonisticky působících na NMDA receptoru (glycin, D-serin, D-cykloserin). Bylo prokázáno, že látky zvyšující funkci NMDA receptorů redukuje negativní symptomy a kognitivní deficit u pacientů s chronickou schizofrenií, kteří jsou současně léčeni neuroleptiky [21]. Výsledky klinických studií prováděných v poslední době naznačují, že důležitou roli v patofyziologických procesech neuropsychiatrických onemocnění, jako je schizofrenie, hrají hyperglutamatergní důsledky dysfunkce NMDA receptorů. Látky, které různými mechanismy snižují vyplavování glutamátu, jsou testovány s perspektivou využití v terapii schizofrenie a dalších neurodegenerativních onemocnění. Lamotrigin je zkoumán jako látka s možným inhibičním účinkem na proces neuronální degenerace zprostředkované

excitačními aminokyselinami u onemocnění jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza nebo cévní mozková příhoda. Výsledky některých otevřených studií prokazují účinnost lamotriginu v adjuvantní terapii u pacientů se schizofrenií léčených atypickými antipsychotiky. Účinek lamotriginu v ovlivnění schizofrenní symptomatiky byl testován především v adjuvantní terapii při medikaci klozapinem a soubory pacientů jsou nevelké [18, 45]. Chybí zatím ověření účinnosti adjuvantní terapie lamotriginem ve dvojité slepé randomizované studii u většího souboru pacientů.

Pozitivní ovlivnění psychotické symptomatiky u pacientů, kteří jen částečně reagují na terapii atypickými antipsychotiky nebo u nich přetrvává reziduální psychotická symptomatika, pozitivně koreluje s prognózou onemocnění schizofrenií. Zlepšení výsledku léčby s využitím augmentace látkami ovlivňujícími glutamatergní neurotransmiterový systém může výrazně zlepšit kvalitu života pacientů se schizofrenií. Dosažení plné remise onemocnění umožní plnohodnotné funkční zapojení těchto pacientů do sociálního a ekonomického života společnosti.

## LITERATURA

1. Akbarian, S., Kim, J. J., Potkin, S. G., Hagman, J. O., Tafazzoli, A., Bunney, W. E., Jr. et al.: Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry*, 52, 1995, pp. 258–266.
2. Anand, A., Charney, D. S., Oren, D. A., Berman, R. M. et al.: Attenuation of the neuropsychiatric effects of ketamine with lamotrigine. *Arch. Gen. Psychiatry*, 57, 2000, pp. 270–276.
3. Andreasen, N. C., Arndt, S., Swayze, V., Cizadlo, T., Flaum, M., O'Leary, D. et al.: Thalamic abnormalities in schizophrenia visualised through magnetic resonance image averaging. *Science*, 266, 1994, pp. 294–298.
4. Benes, F. M.: Is there a neuroanatomic basis for schizophrenia? *Neuroscientist*, 1, 1995, pp. 112–120.
5. Benes, F. M., Sorensen, I., Bird, E. D.: Reduced neuronal size in posterior hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophren. Bull.*, 17, 1991, pp. 597–608.
6. Berman, K. F., Weinberger, D. R.: Prefrontal dopamine and defect symptoms in schizophrenia. In Greden, J. F., Tandon, R. et al.: *Negative schizophrenic symptoms*. Washington D. C. American psychiatric Press, 1990, pp. 81–95.
7. Bird, E. D., Spokes, E. G. S., Iversen, L. L.: Increased dopamine concentration in limbic areas of brain from



- patients dying with schizophrenia. *Brain*, 107, 1979, pp. 211-215.
8. **Breier, A. et al.**: Schizophrenia is associated with elevated amphetamine - induced synaptic concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1997, pp. 2569-2574.
  9. **Bunney, B. G., Bunney, W. E., Jr., Carlsson, A.**: Schizophrenia and glutamate. In *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press Ltd., Chapter, 101, 1995, pp. 1205-1214.
  10. **Carlsson, A.**: Antipsychotic drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 135, 1978, pp. 165-173.
  11. **Carlsson, A., Hansson, L. O., Waters, N., Carlsson, M. L.**: A glutamatergic deficiency model of schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 174, 1999, (Suppl 37), pp. 2-6.
  12. **Cascella, N. G. et al.**: D-cycloserine adjuvant therapy to conventional neuroleptic treatment in schizophrenia: an open-label study. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 95, 1994, pp. 105-111.
  13. **Chessell, I. P. et al.**: D-cycloserine, a putative cognitive enhancer, facilitates activation of the N-methyl-D-aspartate receptor-ionophore complex in Alzheimer brain. *Brain Res.*, 565, 1991, pp. 345-348.
  14. **Cross, A. J. et al.**: 3H-Flupenthixol binding in post-mortem brains of schizophrenics: evidence for a selective increase in dopamine D2 receptors. *Psychopharmacology*, 74, 1981, pp. 122-124.
  15. **Crow, T. J.**: Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process. *BMJ*, 280, 1980, pp. 66-68.
  16. **Dao-Castellana, M. H. et al.**: Presynaptic dopaminergic function in the striatum of schizophrenic patients. *Schizophrenia Research*, 23, 1997, pp. 167-174.
  17. **Domino, E. F., Luby, E.**: Abnormal mental states induced by phencyclidine as a model of schizophrenia. In *Domino, E. F.: PCP (Phencyclidine): historical and current perspectives*. Michigan: NPP Books, 1981, pp. 401-418.
  18. **Dursun, S. M., Deakin, J. F. W.**: Augmenting antipsychotic treatment with lamotrigine or topiramate in patients with treatment-resistant schizophrenia: a naturalistic case-series outcome study. *Journal of Psychopharmacology*, 15, 2001, pp. 297-301.
  19. **Emmett, M. R., Mick, S. J., Cler, J. A., Rao, T. S., Lyengar, S., Wood, P. L.**: Actions of D-cycloserine at the N-methyl-D-aspartate-associated glycine receptor site in vivo. *Neuropharmacology*, 30, 1991, pp. 1167-1171.
  20. **Gao, X. M., Shirikawa, O., Tamminga, C. A.**: Delayed phencyclidine-induced alterations in local cerebral glucose utilization in rat brain. *Neuro. Sci. Abst.*, 575, 1991, p. 1473.
  21. **Goff, D. C., Tsai, G., Manoch, D. S., Coyle, J. T.**: A dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptic for negative symptoms in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 152, 1995, pp. 1213-1215.
  22. **Greenamyre, J. T., Porter, R. H. P.**: Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*, 44, 1994, S7-S13.
  23. **Henderson, G., Johnson, J. W., Ascher, P.**: Competitive antagonists and partial agonists at the glycine modulatory site of the mouse N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Physiol (Lond)*, 430, 1990, pp. 189-212.
  24. **Hietala, J. et al.**: Presynaptic dopamine function in striatum of neuroleptic-native schizophrenic patients. *Lancet*, 346, 1995, pp. 1130-1131.
  25. **Iwainisky, H.**: Mode of action, biotransformation and pharmacokinetics of antituberculosis drugs in animals and man. In *Bartmann, K. ed. Handbook of experimental pharmacology*. Berlin, Springer, 1988, pp. 124-133.
  26. **Javitt, D. C., Zukin, S. R.**: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 148, 1991, pp. 1301-1308.
  27. **Javitt, D. C., Zylberman, I., Zukin, S. R., Heresco-Levy, U., Lindenmayer, J. P.**: Amelioration of negative symptoms in schizophrenia by glycine. *Am. J. Psychiatry*, 151, 1994, pp. 1234-1236.
  28. **Joyce, J. N. et al.**: Organization of dopamine D1 and D2 receptors in human striatum: receptor autoradiographic studies in Huntington's disease and schizophrenia. *Synapse*, 2, 1988, pp. 546-557.
  29. **Kim, J. S., Kornhuber, H. H., Schmid-Burgk, Holzmuller, B.**: Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis of schizophrenia. *Neurosci Lett*, 20, 1980, pp. 379-382.
  30. **Konradi, C. et al.**: The cAMP-response-element-binding protein interacts, but fos protein does not interact, with the proenkephalin enhancer in rat striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1993, pp. 7005-7009.
  31. **Laruelle, M. et al.**: Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 18, 1996, p. 198.
  32. **Lawlor, B. A., Davis, K. L.**: Does modulation of glutamatergic function represent a viable therapeutic strategy in Alzheimer's disease? *Biol. Psychiatry*, 31, 1992, pp. 337-350.
  33. **Luby, E. D. et al.**: Study of a new schizophrenomimetic drug. *Sernyl, Arch. Neurol. Psychiatry*, 18, 1959, pp. 363-369.
  34. **MacKay, A. V. et al.**: Dopamine receptors and schizophrenia: drug effect or illness? *Lancet*, 2, 1980, pp. 915-916.
  35. **Matthysse, S.**: Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? *Fed. Proc.*, 32, 1973, pp. 200-205.
  36. **Meltzer, H. Y.**: Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin-2 pKi values. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 43, 1989, pp. 587-604.
  37. **Olney, J. W. et al.**: Glutamatergic, cholinergic, and GABAergic systems in posterior cingulate cortex: interactions and possible mechanisms of limbic system disease. In *Vogt, B. A., Gabriel, M. et al.: Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus*. Boston, Birkhauser, 1993, pp. 557-580.
  38. **Olney, J. W., Labruyere, J., Price, M. T.**: Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science*, 244, 1989, pp. 1360-1362.
  39. **Shenton, M., Kikinis, R., Jolesz, F., Pollak, S., LeMay, M., Wible, C. et al.**: Abnormalities of the left temporal lobe and thought disorder in schizophrenia: a qualitative magnetic resonance imaging study. *N. Engl. J. Med.*, 327, 1992, pp. 604-612.
  40. **Szwarcz, R., Whetsell, W. O., Jr., Mangano, R. M.**: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparring lesions in rat brain. *Science*, 219, 1983, pp. 316-318.
  41. **Snyder, S. H. et al.**: Drugs, neurotransmitters and schizophrenia. *Science*, 184, 1974, pp. 1243-1253.
  42. **Stille, G.**: Neurophysiological correlates to antipsychotic effects of drug. *Antipsychotic Drugs: Pharmacodynamics and Pharmacokinetics*. ed. Sedvall, F., Uvnas, B. and Zotterman, Y. Oxford: Pergamon Press, 1976, pp. 51-62.
  43. **Tamminga, C. A.**: Schizophrenia and glutamate. *Critical Reviews in Neurobiology*, 12, 1998, pp. 21-36.
  44. **Thomas, J. W. et al.**: Glycine modulation of the phencyclidine binding site in mammalian brain. *Brain Res*, 442, 1988, pp. 396-398.
  45. **Tiihonen, J. et al.**: Lamotrigine in clozapine-resistant schizophrenia: A randomized placebo controlled cross-over trial. *European Neuropsychopharmacology*, 12, 2002, (Suppl 3), P.2.019, S263.
  46. **Watson, G. B. et al.**: D-cycloserine acts as a partial agonist at the glycine modulatory site of the NMDA receptor expressed in *Xenopus oocytes*. *Brain Res.*, 510, 1990, pp. 158-160.
  47. **Whetsell, W. O., Shapira, N. A.**: Neuroexcitation, excitotoxicity and human neurological disease. *Biology of Disease*, 68, 1993, pp. 372-387.
  48. **Wlaz, P., Baran, H., Loscher, W.**: Effect of the glycine/NMDA receptor partial agonist, D-cycloserine, on seizure threshold and some pharmacodynamic effects of MK-801 in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 257, 1994, pp. 217-225.
  49. **Wong, D. F. et al.**: Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science*, 234, 1986, pp. 1558-1563.
  50. **Zipursky, R. B., Lim, K. O., Sullivan, E. V.**: Widespread cerebral gray matter volume deficits in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 49, 1992, pp. 195-205.

Dodáno redakci: 24. 10. 2003  
Po skončení recenzního řízení: 11. 2. 2004

MUDr. Jaromír Hons  
Psychiatrická klinika LF UK a FN  
Sokolská 48  
500 05 Hradec Králové