

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

**Efekt L-karnitinu na anticholinesterázovou aktivitu
galantaminu**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

HRADEC KRÁLOVÉ, 2009

STANISLAVA FABIÁNOVÁ

Děkuji svému konzultantovi Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za odborné vedení v průběhu rigorózní práce a za cenné rady a připomínky, které mi při plnění zadané práce poskytl.

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně pod vedením pana Doc. MUDr. Josefa Herinka, DrSc. Veškeré zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury v závěru práce.

V Hradci Králové dne *14.8.2009*

Fabiánová
.....

Stanislava Fabiánová

Seznam zkratek

A β	beta-peptidy
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
APH1	anterior pharynx-defective phenotype 1
APO E	apolipoprotein E
APP	amyloidní prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
A2M	α 2-makroglobulin
BuChE	butyrylcholinesteráza
CaM kináza II	kináza II závislá na kalmodulinu
CAT	cholinacetyltransferáza
CBD	kortikobazální degenerace
CK-1	kaseinkináza 1
CDK5	cyklin-dependentní kináza 5
DAT	demence Alzheimerova typu
DLB	demence s Lewyho tělisky
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
FAD	familiární autozomálně dominantní forma demence Alzheimerova typu s časným nástupem
FTLD	frontotemporální lobární degenerace
GAL	galantamin

γ-BB	γ-butyrobetain
GSK-3	glykogen syntáza kináza-3
HTML	β-hydroxytrimethyllysin
IChE	inhibitory cholinesteráz
IDE	inzulin degradující enzym
L-CAR	L-karnitin
LTP	dlouhodobá potenciace
mAChR	muskarinové acetylcholinové receptory
MAP	proteiny asociované s mikrotubuly
MND	motor neuron disease
nAChR	nikotinové acetylcholinové receptory
NCT	nikastrin
NMDA	excitační receptor N-methyl-D-aspartátové kyseliny glutamátového typu
NRF	nervový růstový faktor
PEN 2	presenilinový enhancer 2
PHF	párová helikální filamenta
PKA, PKC	proteinkináza A, C
PND	Parkinsonova nemoc s demencí
PSEN 1	presenilin 1
PSEN 2	presenilin 2
PSP	progresivní supranukleární paralýza

SD	smíšená demence
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
TMABA	γ -trimethylaminobutyraldehyd
TML	ϵ -N-trimethyllysin
VaD	vaskulární demence

Obsah

1. Úvod a cíl práce	8
2. Klasifikace demencí	10
2.1 Epidemiologie	10
2.2 Etiologie	10
2.3 Rizikové faktory vzniku demence.....	11
2.4 Klinické příznaky demence	12
2.5 Demence Alzheimerova typu	13
2.6 Vaskulární demence	13
2.7 Demence s Lewyho tělísky a demence při Parkinsonově nemoci	17
2.8 Frontotemporální lobární degenerace.....	20
2.9 Smíšené demence	23
3. Demence Alzheimerova typu – etiopatogeneze, klinický obraz, diagnostika a současné možnosti léčby	25
3.1 Etiopatogeneze demence Alzheimerova typu	26
3.1.1 Extracelulární depozita – kaskáda amyloidových proteinů.....	27
3.1.2 Intracelulární depozita – degenerace neurocytoskeletu	29
3.1.3 Apoptóza u demence Alzheimerova typu.....	32
3.1.4 Poruchy centrálního cholinergního systému u demence Alzheimerova typu	33
3.1.5 Genetická podstata demence Alzheimerova typu	38
3.2 Klinický obraz demence Alzheimerova typu.....	45
3.3 Diagnostika demence Alzheimerova typu	47
3.4 Léčba demence Alzheimerova typu	48
3.4.1 Podávání nepřímých cholinomimetik (inhibitorů cholinesteráz).....	49
3.4.2 Podávání prekurzorů acetylcholinu	53
3.4.3 Podávání přímých agonistů muskarinových a nikotinových receptorů .	54
3.4.4 Podávání látek ovlivňujících cholinergní systém pomocí ovlivnění jiných neurotransmiterových systémů	54
3.4.5 Podávání dalších látek, např. látek zlepšujících vstup cholinu do neuronů, syntézu a uvolnění acetylcholinu.	54
3.4.6 Látky zlepšující narušenou glutamátergí transmissi.....	55
3.4.7 Neurotrofické růstové faktory	57
3.4.8 Snížení buněčné reakce na neurodegeneraci.....	58
3.4.9 Léky snižující oxidativní stres.....	58
3.4.10 Látky zlepšující mozkový metabolismus	59
4. Farmakologie galantaminu.....	61
4.1 Farmakodynamika galantaminu	62
4.2 Farmakokinetika galantaminu	63
5. L-karnitin	66
5.1 Chemická struktura L-karnitinu	67
5.2 Syntéza L-karnitinu	68
5.3 Farmakologie L-karnitinu	69
6. Experimentální část	71

6.1	Uspořádání pokusu	71
6.1.1	Odběr vzorků mozku	71
6.1.2	Stanovení aktivity acetylcholinesterázy Ellmanovou metodou - princip metody	71
6.1.3	Použité chemikálie a roztoky	73
6.1.4	Použité přístroje	73
6.1.5	Pracovní postup	73
6.2	Výsledky	74
7.	Diskuse	77
8.	Závěr	79
9.	Souhrn	80
10.	Literatura	81

1. Úvod a cíl práce

Demence je progresivní a ireverzibilní klinický syndrom způsobený neurodegenerativním poškozením mozku. Se vzrůstajícím věkem stoupá její výskyt. Ve věkové kategorii nad 85 let trpí demencí přibližně 30 - 50% osob. Demence výrazně postihuje jedince v psychice i v jeho sociálních funkcích. Navíc výrazně ovlivňuje okolí nemocného. Nejčastější formou demence je demence Alzheimerova typu (DAT, asi 50 – 65%). Ta se řadí k nejzávažnějším onemocněním, a také k nejnákladnějším na léčbu. Závažnost spočívá v četnosti, míře postižení kvality života nemocných i v tom, že DAT představuje jednu z nejčastějších primárních příčin smrti. V mozku pacientů s DAT dochází k postižení všech oddílů cholinergního systému. Ten je porušen i u dalších typů demencí, např. u parkinsonských či ischemicko-vaskulárních. Komplexní etiologie DAT v současnosti není přesně známa, proto léčba tohoto onemocnění není kauzální, ale pouze symptomatická. Hlavním cílem současné léčby je tedy oddálení progresy symptomů nemoci. Využívají se postupy, které ovlivňují známé patogenetické procesy. V současné době jsou u alzheimerovských demencí používány dva typy farmakoterapie: inhibitory cholinesteráz (IChE) a parciální nekompetitivní inhibitory NMDA receptorů (excitační receptory N-methyl-D-aspartátové kyseliny) - memantin.

Užití IChE je nejužívanější postup v terapii DAT, především lehkých až středních forem. Tyto látky patří do skupiny kognitiv (léky ovlivňující příznivě centrální cholinergní transmissi). V klinické praxi jsou používány tři zástupci této skupiny – donepezil, rivastigmin a galantamin (GAL).

GAL vedle inhibice acetylcholinesterázy (AChE) také alostericky moduluje presynaptické i postsynaptické nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR). GAL se váže na jiné vazebné místo receptoru než acetylcholin (ACh), čímž zesiluje jeho působení. Presynapticky to vede k ovlivnění vyplavování ACh i jiných neurotransmiterů. Postsynaptická modulace potom zvyšuje cholinergní transmissi v příslušných částech mozku.

L-karnitin (L-CAR) je přírodní látka vyskytující se ve tkáních savců. L-CAR je nepostradatelný pro produkci energie ve tkáních, které jsou závislé na beta-oxidaci mastných kyselin. Zprostředkovává transport mastných kyselin s delším řetězcem přes mitochondriální membránu do mitochondriální matrix, kde probíhá jejich oxidace

a zajišťuje i zpětný transport toxických zbytků beta-oxidace. Je známo, že L-CAR zvyšuje přestup některých chemických látek přes biologické membrány.

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit, zda preventivní podání L-CAR může zvýšit antiacetylcholinesterázovou aktivitu GAL cílenou na centrální nervový systém mozku laboratorního potkana. Jako ukazatel efektu bylo zvoleno stanovení aktivity AChE ve frontální kůře, hipokampu, septu, bazálních gangliích a hypofýze. Bylo předpokládáno, že předléčba L-CAR zesílí inhibiční efekt GAL.

2. Klasifikace demencí

Diagnostika a léčba onemocnění s progredujícím kognitivním deficitem, zejména DAT a dalších onemocnění vedoucích k demenci, je závažným medicínským a sociálním problémem vyššího středního věku. Počet lidí starších 60 let celosvětově výrazně narůstá zejména v průmyslově rozvinutých zemích (Jirák a Laňková, 2007).

Demence je progresivní a ireverzibilní klinický syndrom způsobený neurodegenerativním poškozením mozku. Je charakterizována multifokálním nebo globálním poškozením vyšších korových funkcí zahrnujících paměť, myšlení, orientaci, chápání, počítání, exekutivní funkce (= výkonné funkce; organizované duševní pochody, které vedou k realizaci cíleného chování, zajišťují samostatné a účelné jednání člověka), schopnost učení, schopnost řeči a úsudek, přitom vědomí nebývá zastřené. Sekundárně dochází i k postižení nekognitivních funkcí, zejména k poruchám chování (behaviorální symptomy), ke ztrátě soběstačnosti a v konečném důsledku ke smrti.

Demence může být rozdělena podle klinických příznaků, neuropatologie a/nebo etiologie (Grossman a spol., 2006; Jirák a Laňková, 2007; Pidrman, 2007).

2.1 Epidemiologie

Demence je globálním problémem a přestává se týkat pouze tzv. vyspělých zemí. Vzestupná incidence souvisí s prodlužováním délky života, a s tím souvisejícím obecným stárnutím populace. Celková prevalence demence představuje asi 1% a stoupá s věkem. Ve věku nad 65 let činí 4 - 7% a po každých pěti letech se zdvojnásobuje. Ve věku nad 85 let trpí demencí 30 - 50% osob, ženy častěji než muži (Jirák a Laňková, 2007; Pidrman, 2007).

2.2 Etiologie

Demence lze rozdělit do dvou skupin:

1. *primární*: demence atroficko – degenerativního původu
2. *sekundární*: demence symptomatické, kde se etiologicky uplatňují systémové choroby, vaskulární postižení, infekce, intoxikace, úrazy a další léze postihující mozek

Největší podíl všech demencí tedy tvoří atroficko - degenerativní demence. Nejčastější z nich je pak DAT (asi 50 - 65%). Druhou nejčastější degenerativní demencí je demence s Lewyho tělísky (DLB, 10 - 15%), vzácnější je skupina frontotemporální demence (nověji frontotemporální lobární degenerace, FTLD, přibližně 5%). Vaskulární demence (VaD) tvoří odhadem 10 - 15% všech demencí. Řada pacientů s DAT, DLB a FTLD má současně přítomnou i vaskulární složku, jedná se pak o tzv. „smíšené demence“ (SD). Zbývajících necelých 10% tvoří demence jiné etiologie (Pidrman, 2003; Jiráček a Laňková, 2007).

Etiologická klasifikace demencí

- primární degenerativní demence
 - frontotemporální postižení: „Pickův komplex“
 - parietotemporální postižení: DAT
 - subkortikální postižení: např. Huntingtonova nemoc, Parkinsonova nemoc s demencí (PND)
- vaskulární demence: např. multiinfarktová demence, strategicky umístěné infarkty, ischemicko - hypoxická demence, jiné mechanismy - kombinace několika faktorů
- sekundární demence: metabolické poruchy, poruchy výživy, intoxikace, záněty CNS, infekce aj.
- ostatní: při současném výskytu různých etiologických faktorů u jednoho nemocného hovoříme o SD (Jiráček a Laňková, 2007).

2.3 Rizikové faktory vzniku demence

- *neovlivnitelné faktory*: věk, genetické faktory, např. familiární autozomálně dominantní forma demence Alzheimerova typu s časným nástupem (FAD, klinické příznaky se objevují již po 45. roce věku) nebo FTLD
- *ovlivnitelné faktory*: vaskulární faktory (kouření, obezita, diabetes, hypertenze a zvýšený cholesterol), nadměrné pití alkoholu a úrazy hlavy (Jiráček a Laňková, 2007).

2.4 Klinické příznaky demence

Existují tři základní okruhy postižení u demencí:

1. oblast kognitivních (poznávacích) funkcí: paměť, pozornost, motivace, vnímání, intelekt, exekutivní funkce aj.
2. behaviorální a psychické symptomy demence: poruchy chování, nálady, emotivity, spánku apod., vyskytují se u 70 - 90% pacientů s demencí
3. oblast aktivit denního života: zahrnuje celou škálu běžných činností nemocného, nejprve jsou porušeny složité profesní aktivity, později s progresí demence dochází k postižení i bazálních aktivit, jako je péče o sebe sama, osobní hygieny, oblékání apod.

Většina demencí, u nichž je postižení kortikální nebo kortiko - subkortikální (např. DAT), začíná poruchami paměti a dalších kognitivních funkcí. U tzv. podkorových demencí (PND, vaskulární převážně subkortikální demence a další) se nejdříve vyskytuje tzv. dysexekutivní syndrom (porucha výkonných funkcí - neschopnost být motivován k provedení složitějších aktivit, naplánování těchto aktivit, seřazení dílčích podúkolů správně za sebou, provedení akce a správné zhodnocení. (Jirák a Laňková, 2007).

Diagnózu demence lze stanovit na základě klinického obrazu – psychiatrického a psychologického vyšetření. K jejímu určení nestačí pouze patologický nález zobrazovacích technik, neboť míra atrofie či funkčního postižení nemusí zákonitě korespondovat se stupněm demence (Pidrman, 2007).

Aby mohla být stanovena diagnóza syndromu demence, musí kognitivní deficit ovlivňovat sociální nebo pracovní statut pacienta a musí být vyloučena jiná, nedegenerativní příčina symptomů demence (Jirák a Laňková, 2007).

Terapie demence zahrnuje nejen léčbu samotné kognitivní poruchy, ale i behaviorálních a psychických symptomů demence. Léčba by měla vést primárně ke zlepšení kvality života pacienta a následně také ke zlepšení kvality života jeho pečovatele (Jirák a Laňková, 2007).

2.5 Demence Alzheimerova typu

DAT je nejčastější demencí v populaci. Jedná se o primární degenerativní onemocnění mozku neznámé etiologie s charakteristickým neuropatologickým a neurochemickým obrazem. Začíná obvykle plíživě, rozvíjí se pomalu během let a trvale progreduje. Onemocnění v průměru trvá 9 let. Mezi časná příznaky patří poruchy paměti – vstíplivosti i výbavnosti, porušena je zejména krátkodobá (pracovní) paměť, starší vzpomínky bývají zpočátku dobře zachovány. Proto se DAT někdy říká „amnestická demence“. Rozvíjejí se poruchy vizuoprostorových funkcí - výrazně je postižena orientace, nemocní často bloudí, dále dochází k poruše exekutivních (frontálních) funkcí - porucha abstraktního myšlení, snížená pozornost, schopnost plánování a organizace, schopnost provádět ve správném pořadí i velmi jednoduché činnosti. Postupně dochází k deterioraci všech symbolických funkcí (fatických, praktických, gnostických). Řeč ztrácí svoji plynulost, je obsahově prázdná, pacienti často hledají slova. Rozvíjejí se behaviorální a psychické symptomy demence. V pozdních stádiích onemocnění pacienti přestávají být schopni komunikovat s okolím, bývají apatičtí, nepoznávají své blízké, postupně s nimi ztrácejí i oční kontakt, jsou inkontinentní. Celková doba přežití kolísá od 5 do 19 let od počátku vzniku prvních příznaků. V současné době je DAT ireverzibilním onemocněním (Pidrman, 2003; Grossman a spol., 2006; Jiráková a Laňková, 2007; Pidrman, 2007).

2.6 Vaskulární demence

VaD patří vedle DAT a DLB mezi nejčastější příčiny demence ve stáří. Přibližně 10 - 15% všech demencí je vaskulárního původu (Rusina a Matěj, 2007).

VaD se liší od DAT začátkem, klinickými rysy i pozdějším průběhem onemocnění. Pro anamnézu jsou typické ischemické ataky přechodného rázu s krátce narušeným vědomím, přechodnými parézami nebo ztrátou vidění. Demence může také následovat po několika akutních cerebrovaskulárních příhodách nebo po jednom větším záchvatu (méně často). Patologické kognitivní a další symptomy se objevují náhle a často fluktuují (Jiráková a Laňková, 2007; Pidrman; 2007).

Ke stanovení diagnózy VaD se vyžaduje: přítomnost demence, cerebrovaskulární onemocnění prokazatelné klinicky a zobrazovacími metodami a jejich vzájemná souvislost. Ta je definována buď časovou návazností (tj. rozvoj demence do 3 - 6 měsíců po proběhlém iktu) nebo vlastním průběhem kognitivních poruch (náhlý vznik

a/nebo kolísavý průběh a schodovité zhoršení). Pozornost musí být věnována i topografii a velikosti vaskulárních ložisek v mozkové tkáni. Uvedená diagnostická kritéria mají svá omezení - žádné z nich spolehlivě nerozliší VaD a SD, rovněž nezohledňují včasná stadia onemocnění (Rusina a Matěj, 2007).

Typy vaskulárních demencí a jejich klinický obraz:

Existuje několik forem cerebrovaskulárního postižení, které mohou vést ke vzniku demence – postižení důležité (z hlediska kognice strategické) oblasti mozkového parenchymu, vícečetná ložiska (multiinfarktová demence) a posléze rozsáhlá, často splývající ložiska v bílé hmotě hemisfér vedoucí k subkortikálnímu typu deteriorace. Samostatnou kapitolu tvoří demence rozvíjející se po iktu, kdy se nemusí jednat vždy jen o čistě VaD, ale iktus někdy může demaskovat demenci dosud probíhající klinicky němě. Časté jsou i SD, většinou se jedná o kombinaci VaD a DAT. Vzácně se mohou vyskytnout i dědičně podmíněné VaD (Whalley a Murray, 2003; Rusina a Matěj, 2007).

- **Strategický infarkt** – jedná se o postižení rozsáhlejší a pro kognici významné oblasti mozkové tkáně krvácením nebo ischemií, které může způsobit těžkou kognitivní alteraci, jejíž klinický obraz bude odpovídat lokalizaci léze. Předpokládá se, že takovéto izolované postižení může samo o sobě vysvětlit demenci, aniž by byla nutná přítomnost dalšího etiologického faktoru (např. komorbidita s některým neurodegenerativním onemocněním). Typickým příkladem strategicky uloženého subkortikálního infarktu je oboustranná thalamická léze způsobující těžký dysexekutivní syndrom a osobnostní změny vlivem přerušení subkortikálních okruhů a spojů. Příkladem korových lézí a odpovídajícího klinického obrazu může být poškození frontálního laloku s rozvojem afázie, apraxie, dezinhibice nebo apatie (Rusina a Matěj, 2007).
- **Multiinfarktová demence** - vzniká následkem opakovaných iktů v kůře a podkorových oblastech s drobnějším nebo i rozsáhlejším mozkovým postižením. Jedná se o nejčastější VaD. Kognitivní postižení se liší podle lokalizace a rozsahu ložisek. Multiinfarktová demence se zpravidla projevuje skokovým zhoršováním kognice i ložiskových neurologických projevů u pacientů s anamnézou opakovaných drobných iktů. Plynulá progrese

onemocnění je mnohem vzácnější. Většina pacientů má současně hypertenzi, diabetes mellitus, dyslipidémii. Schodovitý ráz progrese tak odpovídá postupně se objevujícím novým drobným iktům, z nichž každý „přiloží“ další symptomy a v konečném důsledku se objeví obraz nepochybné kognitivní alterace. U většiny pacientů se multiinfarktová demence postupně zhorší do obrazu těžké subkortikální demence (Pidrman, 2007; Rusina a Matěj, 2007).

- **Subkortikální ischemická leukoencefalopatie** - toto onemocnění je výsledkem poškození cév malého kalibru, nejčastěji v důsledku aterosklerotických nebo hypertonických cévních změn. Typické jsou rozsáhlé a často splývající ischemické zóny v bílé hmotě mozkových hemisfér. Tyto zóny odpovídají oblastem demyelinizace subkortikálních struktur a jsou často provázeny i lakunárními infarkty (hlavními rizikovými faktory jsou i zde hypertenze a diabetes). Primárně zde tedy dochází k poškození podkorových struktur, proto i klinický obraz odpovídá subkortikální demenci. Kognitivní poruchy se projevují především bradypsychizmem, apatií, poruchou paměti zejména ve výbavnosti (na rozdíl od hipokampální amnézie u DAT, pro níž je typická porucha nejen výbavnosti, ale zejména všípivosti). Častá je porucha soustředění a pracovní paměti. Významně narušeny jsou i exekutivní funkce (plánování a organizování, řešení problémů, schopnosti abstraktního myšlení, zahájení a přerušování komplexních pochodů) a dochází k poruchám nálady, osobnosti a sociální integrace (Rusina a Matěj, 2007).
- **Změny v bílé hmotě bez projevů demence a rizikové faktory vaskulární demence** – na možnost subkortikální ischemické leukoencefalopatie by mělo být pomýšleno u starších pacientů s rozvíjejícími se poruchami chování ve smyslu dysexekutivního syndromu, zejména pokud mají v anamnéze hypertenzi, diabetes, kouření nebo syndrom spánkové apnoe. V posledních letech se věnuje větší pozornost ischemické chorobě srdeční jako rizikovému faktoru cerebrovaskulárního poškození nejen pro možnost kardioembolizační mozkové cévní příhody, ale rovněž pro rozvoj kognitivní deteriorace ve vyšším věku (Whalley a Murray, 2003; Rusina a Matěj, 2007).

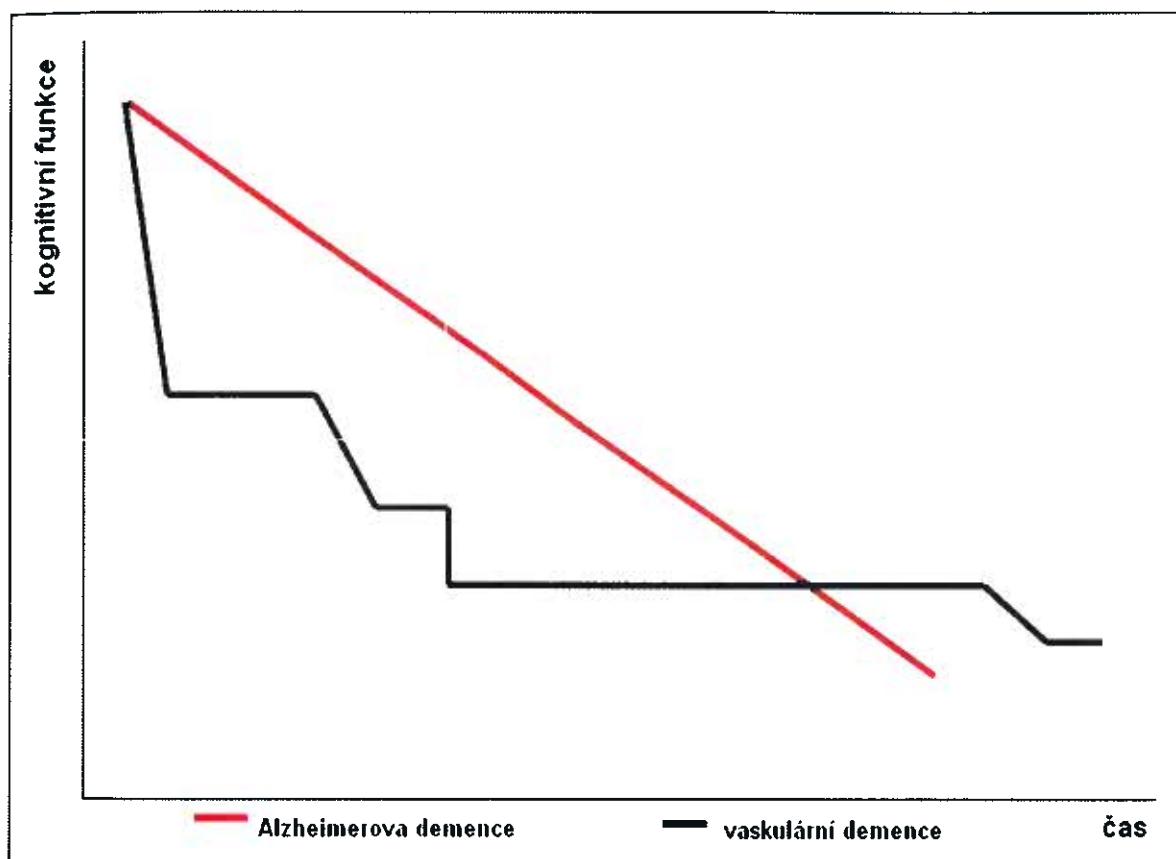
U řady starších lidí jsou přítomny změny v bílé hmotě, které mají ischemicko – vaskulární charakter. Ve většině těchto případů lze identifikovat přítomnost

více vaskulárních rizikových faktorů současně. Léze v bílé hmotě zvyšují riziko rozvoje kognitivní deteriorace a mohou mít klinický dopad i tam, kde ještě nebyla splněna kritéria pro demenci. Často se totiž v těchto případech vyskytuje deprese a mírné motorické postižení (Rusina a Matěj, 2007).

- **Demence rozvíjející se po iktu** - až u třetiny pacientů hospitalizovaných s cévní mozkovou příhodou se do několika měsíců objeví příznaky demence, přičemž tato tendence stoupá s rostoucím věkem. Z etiopatogenetického hlediska se jedná o značně heterogenní skupinu onemocnění – od multiinfarktové demence přes následky strategického korového infarktu po dekompenzaci subkortikální leukoencefalopatie, častá je i SD (Rusina a Matěj, 2007).
- **Hereditární vaskulární demence** - nejčastější formou hereditární VaD je CADASIL (autozomálně dominantně dědičná mozková angiopatie se subkortikálními infarkty a leukoencefalopatií), jejímž podkladem je mutace v genu *Notch3* na 19. chromozomu. Onemocnění probíhá pod obrazem progredující VaD, převážně subkortikálního charakteru, s prvními projevy často v mladším věku (5. - 6. decenium). Opakované ikty a tranzitorní ischemické ataky postihují až 80% pacientů. Bolesti hlavy většinou charakteru migrény bývají až ve 40% případů. Někdy se přidružují psychiatrické projevy a vzácněji epilepsie (Rusina a Matěj, 2007).

V současné době kauzální terapie rozvinuté VaD neexistuje. Je tedy nezbytné věnovat pozornost primární a sekundární prevenci cerebrovaskulárních onemocnění. Prevence iktů zahrnuje široké spektrum možností, např. úpravu životosprávy, léčbu hypertenze, diabetu a dyslipidémie. Dále je nezbytné věnovat pozornost nejen včasné a účinné léčbě samotného iktu, ale i všem dostupným možnostem prevence recidivy cévní mozkové příhody (např. antiagregační léčba, v indikovaných případech warfarinizace, kompenzace hypertenze aj.). K ovlivnění VaD je podávána řada látek z různých lékových skupin. Jedná se např. o vasoaktivní substance, neuroprotektiva, nootropika a kognitiva. Z výsledků metaanalýz vyplývá, že většina těchto léků nemá prokazatelný efekt na kognitivní výkonnost nebo další progresi VaD. Nejvíce podkladů je pro podávání pentoxifyllinu a extraktů ginkgo biloba. Oba léky mají mírný přínos ve srovnání s kontrolní skupinou, která byla léčena placebem. V posledních letech se objevily větší randomizované studie

prokazující efekt podávání IChE a memantinu u pacientů s VaD nebo SD. U pacientů s VaD se předpokládá cholinerní deficit v souvislosti s postižením cholinerních drah v podkoří a lézí cholinerních jader ve frontobazální krajině na jedné straně a glutamátově navozené neurotoxicity ischemických ložisek na straně druhé. Přestože existuje řada dostupných údajů o účinnosti a dobré toleranci kognitiv u VaD, jejich podávání v současné době není všeobecně přijímáno a v řadě zemí (včetně ČR) není schválena jejich úhrada v této indikaci (Rusina a Matěj, 2007; Sheardová a spol., 2007).



Obrázek 1: Klinický průběh vaskulární demence a demence Alzheimerova typu (upraveno podle: Pidrman, 2007).

2.7 Demence s Lewyho tělísky a demence při Parkinsonově nemoci

DLB a PND patří mezi tzv. synukleinopatie, tj. proteinopatie, které se vyznačují patologickým ukládáním proteinu α -synukleinu v neuronech a glii ve specifických oblastech kůry a podkoří. Mezi synukleinopatie se dále řadí: multisystémová atrofie a onemocnění Hallervorden-Spatz. Protein α -synuklein je u těchto onemocnění obsažen v Lewyho tělískách - patologickém markeru pro diagnózu PND a DLB, dále

v dystrofických Lewyho neuritech a/nebo neuronálních a gliových inkluzích. Lewyho tělíška jsou tedy inkluze tvořené abnormálně fosforylovanými neurofilamentovými proteiny agregovanými s ubiquitinem a α -synukleinem (McKeith, 2002; Rektorová, 2004).

DLB a PND sdílejí společné klinické symptomy a patologický substrát. Liší se především časovou posloupností rozvoje jednotlivých charakteristických příznaků a lokalizací patologických lézí. Proto někteří autoři považují PND a DLB za různé klinické projevy téhož onemocnění s patognomickou přítomností variabilního množství Lewyho tělísek v mozkovém kmeni (PND) a kortexu (DLB). Hlavní rozdíl mezi oběma jednotkami je tedy v časovém rozvoji jednotlivých symptomů (demence je pozdním projevem PND, zatímco u DLB předchází projevům parkinsonizmu nebo se projeví do 12 měsíců po nástupu parkinsonské symptomatiky (Rektorová, 2004; Grossman a spol., 2006; Jiráček a Laňková, 2007).

Příčinou parkinsonizmu u pacientů s PND a DLB je deficit dopaminu. Případný cholinergní deficit se jeví jako hlavní příčina kognitivní dysfunkce a psychotických symptomů (Aarsland a spol., 2004; Rektorová, 2004).

U všech pacientů s PND dochází k degeneraci dopaminergních buněk v substantia nigra pars compacta (buněčný komplex A 9), která je u většiny pacientů v menším rozsahu kombinována s degenerací dopaminergních buněk ve ventrálním tegmentu (buněčný komplex A 10) a s degenerací buněk noradrenergických (locus coeruleus), cholinergních (nucleus basalis Meynerti) a serotoninergních (nuclei dorsales rapheae). Jestliže dojde k zániku buněk pouze v komplexu A 9, klinické symptomy jsou převážně motorické, avšak zároveň se mohou objevit i drobné kognitivní poruchy, které jsou obvykle lehkého stupně. Jedná se o tzv. poruchu exekutivních funkcí, které se uplatňují při úkonech směřujícím k určitému cíli (naplánování, iniciace, zaměření a udržení pozornosti, motivace k dosažení specifického cíle, Rektorová, 2004).

Kognitivní poruchy mohou progredovat do demence až u 20 - 40% pacientů. Rozvoj PND snižuje kvalitu života, zvyšuje stres pečovatele, zkracuje dobu setrvání pacienta v kruhu rodiny a urychluje jeho umístění do ústavu s ošetrovatelskou péčí. Demence významně zkracuje dobu přežití pacientů s PND. Patofyziologicky se zřejmě uplatňuje jednak současný úbytek buněk v buněčném komplexu A10

a jednak rozsáhlejší degenerativní procesy, včetně zániku cholinergních, ale i adrenergických a serotoninergních buněk a přerušení jejich vzestupných drah. Neuropsychologický profil PND je charakterizován progresivním „dysexekutivním“ syndromem s paměťovým deficitem a poruchou abstraktního myšlení. I když u většiny pacientů s PND jsou zároveň přítomny Lewyho tělíska v kortexu a patologický nález charakteristický pro DAT (neuritické plaky a neurofibrilární smotky), pouze nanejvýš třetina pacientů s PND splňuje klinická a kvantitativní patologická kritéria pro koexistenci DAT nebo DLB (Rektorová, 2004).

DLB sdílí klinické a patologické rysy DAT a PND. Vzájemné odlišení činí problémy – kde začínají a končí hranice těchto tří poruch (McKeith, 2002; Konrád, 2004).

Pro DLB je typické kolísání kognitivních funkcí, spontánní příznaky parkinsonizmu a vizuální halucinace. Jestliže se objeví parkinsonský syndrom jako první příznak demence, dochází k plnému rozvoji onemocnění maximálně do dvou let. Diagnózu DLB podporuje senzitivita na antipsychotika (jejich podání by vedlo k rozvoji těžkého život ohrožujícího stavu – výraznému zhoršení parkinsonského syndromu), přechodné poruchy vědomí, opakované pády, synkopy, bludy a halucinace v jiných než vizuálních modalitách. Na rozdíl od PND jsou uváděny těžší časné poruchy vizuopercepčních, vizuokonstruktivních a vizuoprostorových schopností. Morfologicky se u DLB nacházejí Lewyho tělíska převážně v limbickém kortexu, ale i v podkorových strukturách (McKeith, 2002; Aarsland a spol., 2004; Rektorová, 2004; Pidrman, 2007).

„Čistá“ DLB se vyskytuje zřídka, až v 90% jsou nacházeny změny typické pro DAT (neuritické plaky a tauopatie – „*tangles*“). Neurochemicky a z hlediska léčebné strategie je významné snížení cholinergní aktivity, které je výraznější než u DAT. Jde o následek degenerace cholinergních projekčních presynaptických neuronů v mozkovém kmeni a bazálních oblastech hemisfér (nucleus basalis Meynerti) podobně jako u DAT. Deficit kortikální AChE koreluje s tíží kognitivního deficitu a vizuálních halucinací (McKeith, 2002; Konrád, 2004; Rektorová, 2004).

DLB je nemocí pozdního věku s průměrným věkem počátku nemoci 75 - 80 let. Při znalosti diagnózy se lze vyhnout iatrogennímu poškození klasickými neuroleptiky (např. levopromazinu, haloperidolu, perfenazinu) a zvolit vhodnou farmakoterapii.

V současnosti se jí zdají být především IChE, po kterých byla dokonce pozorována dramatictější zlepšení než u DAT a některá atypická antipsychotika (Konrád, 2004; Pidrman, 2007).

2.8 Frontotemporální lobární degenerace

Toto onemocnění začíná relativně časně, obvykle před 65. rokem věku a ve srovnání s DAT mají nemocní s FTLD kratší dobu přežití a rychlejší progresi poruch kognitivních funkcí a funkčního deficitu. Pozitivní rodinná anamnéza je popisována u 30 - 50% případů, přibližně v 10 - 40% se jedná o autozomálně dominantní přenos. Incidence u mužů a žen je srovnatelná (Snowden a spol., 2002; Rektorová, 2006).

Z klinického hlediska lze hovořit o třech hlavních formách FTLD:

- 1) behaviorálně – dysexekutivní varianta s postupným progresivním nárůstem behaviorálních projevů
- 2) progresivní non – fluentní afázie
- 3) sémantická demence

Klinické projevy těchto tří variant se mohou v průběhu progresse onemocnění navzájem kombinovat (Snowden a spol., 2002; Rektorová, 2006).

„Pickův komplex“ je jednotka, která podle některých autorů zahrnuje celé heterogenní spektrum FTLD, jak po stránce patologické, tak i klinické. Projevy se mohou navzájem kombinovat a zahrnují progresivní afázii, behaviorální příznaky, dysexekutivní syndrom, parkinsonismus, apraxii a tzv. postižení centrálního motoneuronu (jednotka s ubiquitin pozitivními a tau negativními inkluzemi, Rektorová, 2006).

Před více než sto lety Arnold Pick poprvé popsal demenci s frontotemporální atrofií, ale teprve o několik let později popsal Alois Alzheimer tzv. Pickovy buňky (balonovitě zduřelé achromatické neurony) a Pickova tělíska (argyrofilní intraneuronální cytoplazmatické inkluze obsahující tau-protein), které se objevují nejvíce v limbických a paralimbických strukturách frontálních a temporálních laloků a jsou patognomickým nálezem pro Pickovu nemoc. V 80. a 90. letech minulého století několik skupin vědců popsalo řadu pacientů, jejichž klinický obraz sice připomínal Pickovu nemoc, ale kteří neměli typický histologický nález a lišili

se i z hlediska klasické lobární atrofie. Tato onemocnění dostávala postupně celou řadu jmen: např. frontotemporální demence, frontální degenerace non - Alzheimerovského typu, primární progresivní afázie, sémantická demence atd. (Snowden a spol., 2002; Rektorová, 2006).

Klinické projevy jednotlivých forem FTLD:

- *behaviorálně - dysexekutivní varianta* – plíživý počátek a pomalá progresse, časná deteriorace společenských aktivit, časná změna chování a neschopnost regulovat své chování, mentální rigidita, změny příjmu potravy, stereotypní řeč, mluvení bez přestávek aj.
- *progresivní non - fluentní afázie* – plíživý počátek a pomalá progresse, hlavním příznakem je progresivní expresivní afázie (charakterizována především fonologickými a gramatickými chybami a potížemi s vybavováním slov), problémy se čtením a psaním, porozumění významu slov a vět zůstává relativně zachováno aj.
- *sémantická demence* – plíživý počátek a pomalá progresse, nemocný má problém s pojmenováním a porozuměním významu slov a vět, řečový projev je plynulý a gramaticky správný, relativně zachovaná je též schopnost opakování slov a hlasitého čtení a psaní často užívaných slov, je přítomna zraková asociační agnózie (nemocný má problém rozpoznat/identifikovat viděné objekty), sémantické postižení je tedy jak ve složce verbální, tak i neverbální, toto postižení je v kontrastu s ušetřením zrakově prostorových funkcí a recentní autobiografické paměti (Rektorová, 2006).

Do spektra FTLD (Pickova komplexu) jsou některými autory řazeny progresivní supranukleární paralýza (PSP) a kortikobazální degenerace (CBD).

V případě PSP je parkinsonský syndrom doprovázen parézou sdruženého vertikálního pohledu (zejména směru dolů) v rámci kortiko/bulbární poruchy, která se projevuje rovněž poruchou polykání, dále je typická časná porucha stoje a chůze s pády nazad a postupně se rozvíjející demence.

CBD je vzácné neurodegenerativní onemocnění s extrapyramidovými symptomy (hypokinetické – hypokineze, akineze, rigidita; hyperkinetické – tremor, chorea, tik aj.), s projevy ložiskových neokortikálních lézí a demencí. CBD se projevuje kombinací asymetrického syndromu akineticko-rigidního s ideomotorickou apraxií,

astereognozií (chybné rozpoznávání předmětů hmatem při zavřených očích) a poruchou čítí především ve formě grafestezie (porucha prostorového a plošného vnímání dotykových podnětů) a diskriminačního čítí na jedné horní končetině. Dále jsou přítomny např. centrální pyramidová symptomatika (porucha hybnosti, postižení svalového tonu, hemiparézy, hemiplegie), poruchy chůze, amyotrofický syndrom (= kombinace postižení centrálního a periferního motoneuronu projevující se např. smíšenou parézou, poruchou motoriky, svalovou atrofií, poruchou hybnosti, bulbárními příznaky – porucha polykání aj.) a pozdní kognitivní deficit, který progreduje do demence. Obvykle se onemocnění objevuje v pozdně dospělém věku, nástup příznaků je pozvolný, ale rychle progredující. Doba přežití je 5 - 7 let, pacienti zpravidla umírají na interkurentní onemocnění (Rektorová, 2006).

Vedle klinického dělení existuje z neuropatologického pohledu komplikované a stále se vyvíjející dělení FTLD podle imunohistochemického obrazu a charakteru intracelulárních inkluzí.

Jedná se o:

- tauopatie: Pickova nemoc, frontotemporální demence vázaná na chromozom 17, CBD, PSP, DAT, demence s argyrofilními zrny. Tau-protein se podílí na stavbě a stabilitě mikrotubulů. V lidském dospělém mozku lze nalézt 6 izoforem tau-proteinu, které se liší zastoupením aminokyselinových repetitivních sekvencí v oblastech vazebných zakončení. V elektronovém mikroskopu lze rozeznat tzv. „3 - R“ a „4 - R“ izoformy tau proteinu, jejichž rozlišení může pomoci v přesnější patologické diagnostice, např. PSP a CBD patří mezi tauopatie s přítomností depozitů 4-R izoforem tau proteinu, zatímco Pickova nemoc se vyznačuje přítomností 3 - R izoforem
- ubiquitinopatie (= proteinopatie vyznačující se patologickým ukládáním ubiquitinu) - ubiquitin pozitivní a tau negativní FTLD: FTLD - MND („*motor neuron disease*“), tedy s projevy syndromu amyotrofické laterální sklerózy nebo FTLD - U s ubiquitin pozitivními neurity a/nebo intraneuronálními inkluzemi ve frontálních/temporálních lalocích a/nebo v gyrus dentatus, avšak bez přítomnosti MND inkluzí v kmenových motoneuronech a bez přítomnosti projevů MND.

- FTLD bez specifického histologického obrazu, ale s typickým klinickým obrazem a frontotemporální atrofií mozku

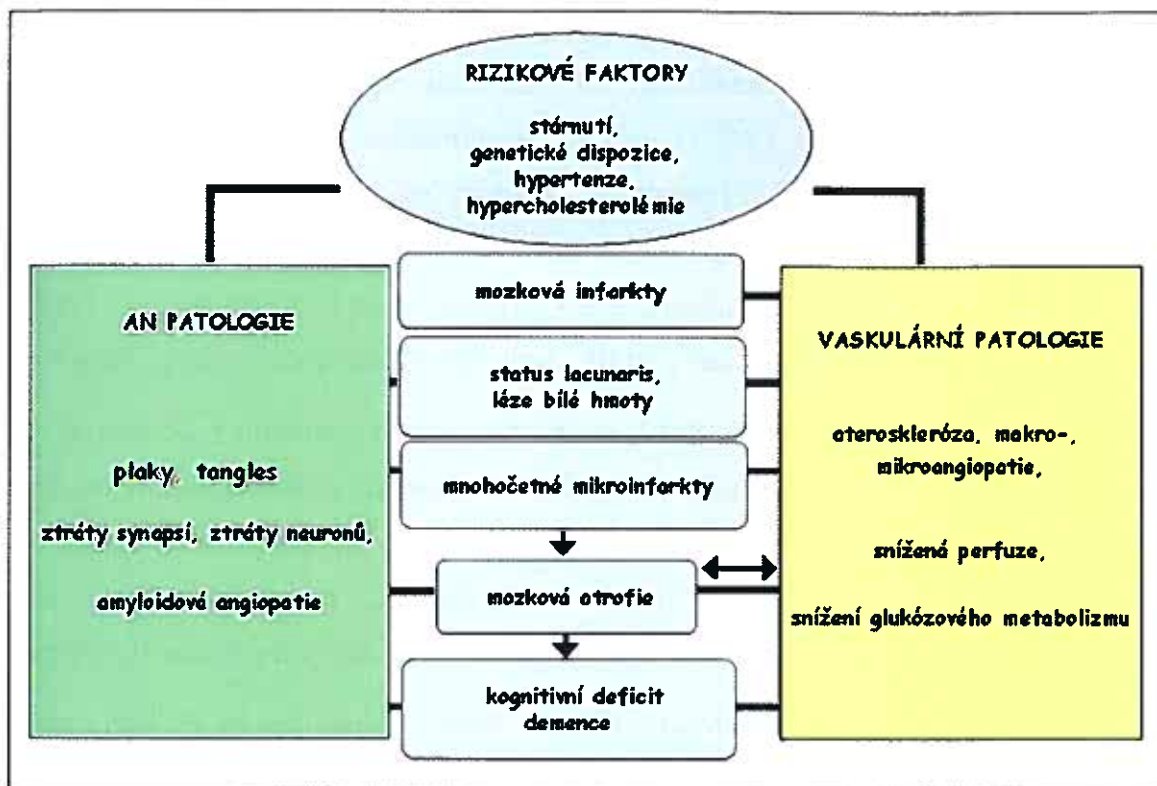
U pacientů s FTLD byl opakovaně prokázán deficit v serotoninovém a dopaminovém neurotransmitterovém systému, zatímco cholinergní systém zůstává relativně intaktní. Farmaka používaná při léčbě DAT tedy nejsou efektivní v léčbě FTLD. Naopak se zdá, že některá léčiva působící na serotoninový systém (např. inhibitory zpětného vychytávání serotoninu) mohou zlepšit nejen depresi, ale i další patologické behaviorální projevy. Přesto nebylo zaznamenáno zlepšení samotných kognitivních funkcí, navíc se jednalo o malé otevřené studie nebo kazuistiky. Doposud tedy není dostatečné množství důkazů o efektivitě jakékoliv léčby FTLD (Snowden a spol., 2002; Rektorová, 2006).

2.9 Smíšené demence

U řady nemocných s demencí je, jak již bylo řečeno, mozek současně postižen více typy chorobných procesů. Tato komorbidita je významná zejména u DAT. Asi nejčastější je kombinace DAT a VaD. Vzhledem k významným vzájemným přesahům obou nemocí je rozlišení mezi oběma poruchami mnohdy nesnadné. Podle některých autorů až u 60% pacientů s DAT lze nalézt více nebo méně pokročilé cerebrovaskulární změny. Na druhou stranu ischemické postižení vnitřní temporální krajiny a frontobazální oblasti může vyvolat klinický obraz podobný DAT. Mezi DAT a cerebrovaskulárními změnami existuje silná vazba a synergické efekty. Pro přítomnost VaD svědčí schodovité horšení, kolísavý průběh, přítomnost významných vaskulárních rizikových faktorů (diabetes, hypertenze, iktus v anamnéze) a ložiskový nález při klinickém vyšetření. Směrem k DAT naopak bude směřovat anamnestický údaj poruchy paměti a postupného zhoršování kognitivní výkonnosti patrný již před iktem. V poslední době se ukazuje, že některé vaskulární rizikové faktory mohou přispívat k rozvoji nejen VaD, ale i DAT. Jedná se např. o hypertenzi, hypercholesterolemii, hyperhomocysteinémii. Velká pozornost je věnována i genotypu apolipoproteinu E (APO E, viz níže). K odlišení VaD od DAT pomůže neuropsychologické vyšetření a zobrazovací metody (CT a především MRI). Neuropsychologické vyšetření nachází u VaD i postižení exekutivních funkcí a pozornosti, paměť je narušena více v sémantické oblasti. U DAT naopak dochází k většímu postižení anterográdní epizodické paměti. Příznačná je porucha ukládání nových informací do dlouhodobé paměti. Rovněž dochází k oslabování paměťových

stop, což lze ověřit nálezem zhoršené vštípivosti i výbavnosti verbálního i vizuálního materiálu.

Současně se dále vyskytuje DAT a synkleinopatie (např. DLB) a další kombinace postižení mozku. Prevalence SD v populaci není známá (Whalley a Murray, 2003; Konrád, 2007; Rusina a Matěj, 2007).



Obrázek 2: Patogenetické faktory ve vývoji smíšené demence (podle Jellingera, upraveno podle: Konrád, 2007).

3. Demence Alzheimerova typu – etiopatogeneze, klinický obraz, diagnostika a současné možnosti léčby

DAT patří mezi na věku závislá neurodegenerativní onemocnění s charakteristickými neuropatologickými změnami, které jsou společné pro všechny postižené. Demence je organické onemocnění mozku vedoucí k úbytku kognitivních funkcí a později i ke změnám chování a úplné degradaci osobnosti. Etiologie tohoto onemocnění není známa, ví se však, že má multifaktoriální charakter a na jejím vzniku se podílí genetické i negenetické faktory. U DAT existuje interindividuální variabilita, co se týče doby vzniku, rychlosti progresu i některých dalších klinických odchylek. Značně se mohou lišit genetické predispozice jednotlivých pacientů a množství a druh nejrůznějších faktorů, které ovlivňují rozvoj a průběh choroby (Kupka a spol., 2000; Fabiánová 2008; Jiráček, 2008; Šťastný, 2008).

DAT je jednou z hlavních primárních příčin smrti. V současné době není DAT vyléčitelným onemocněním, dá se však příznivě ovlivnit tak, že dojde k oddálení těžkých stadií. Jsou však již vyvíjeny terapeutické přístupy, které pravděpodobně povedou k vyléčení nebo alespoň k zastavení progresu tohoto zhoubného onemocnění (Fabiánová 2008; Jiráček, 2008).

Ve věku nad 65 let trpí klinicky vyjádřenou formou demence asi 4 – 7% populace (jednotlivé statistiky se výrazně liší) a minimálně polovina z nich trpí DAT. V průmyslově vyspělých zemích je DAT jednou z nejrozšířenějších nemocí vůbec. Odhaduje se, že v České republice je minimálně 70 000 pacientů s klinicky vyjádřenou DAT, ale pravděpodobně jich bude více. Vzhledem k tomu, že demence u nás nejsou správně diagnostikovány – dochází k nadhodnocování diagnózy VaD, nebo zůstávají nerozpoznány (Jiráček, 2008; Šťastný, 2008).

3.1 Etiopatogeneze demence Alzheimerova typu

U pacientů s DAT jsou přítomny významné neuropatologické nálezy. U většiny z nich lze prokázat kortikosubkortikální atrofii mozku. Stupeň atrofie obvykle odpovídá stupni postižení kognitivních funkcí, ne však ve všech případech. Při DAT dochází k degeneraci určitých mozkových proteinů a ke tvorbě proteinů patologických (Jiráček, 2008).

Základní neuropatologické nálezy u demence Alzheimerova typu:

- atrofie mozku
- narušená cholinergní neurotransmise
- tvorba insolubilního beta-amyloidu, formace plaků
- sterilní zánět
- amyloidová angiopatie
- degenerace intraneuronálního tau-proteinu, tvorba neurofibrilárních smotků
- působení volných kyslíkových radikálů
- excitotoxicita (nadměrné uvolňování excitačních aminokyselin – glutamátu a aspartátu) → zvýšená stimulace receptorů pro glutamát a aspartát → nadměrný influx kalciových iontů do neuronů → narušení dlouhodobé potenciace (long - term potentiation, LTP) a zvýšená apoptóza neuronů
- vysoký obsah monoaminoxidázy B
- snížené množství nervových růstových faktorů (NRF; Jiráček, 2008)

Vysvětlení molekulárních mechanismů vzniku DAT nabízejí dvě hlavní hypotézy:

1. hypotéza kaskády amyloidových proteinů
2. hypotéza degenerace cytoskeletu

Obě se opírají o jiné, širší patogenetické koncepce, zejména teorii kalciového signálu a teorii volných radikálů (Veselý a spol., 2002).

V mozkové tkáni pacientů trpících DAT se hromadí nadměrně fosforylované složky cytoskeletu nervových buněk. V těchto fosforylačních dějích hrají významnou úlohu enzymy glykogen syntáza kináza-3 (GSK-3) a cyklin-dependentní kináza 5 (CDK5). Tyto enzymy fosforylují klíčové aminokyseliny bílkoviny zvané amyloidní

prekurzorový protein (APP) a tau-proteinu. Poruchy regulace aktivity těchto enzymů se objevují již v časných stádiích vývoje DAT, který pokračuje masivním zánikem neuronů a rozkladem kognitivních funkcí pacientů (Veselý a spol., 2002; Iqbal a Grundke-Iqbal, 2008).

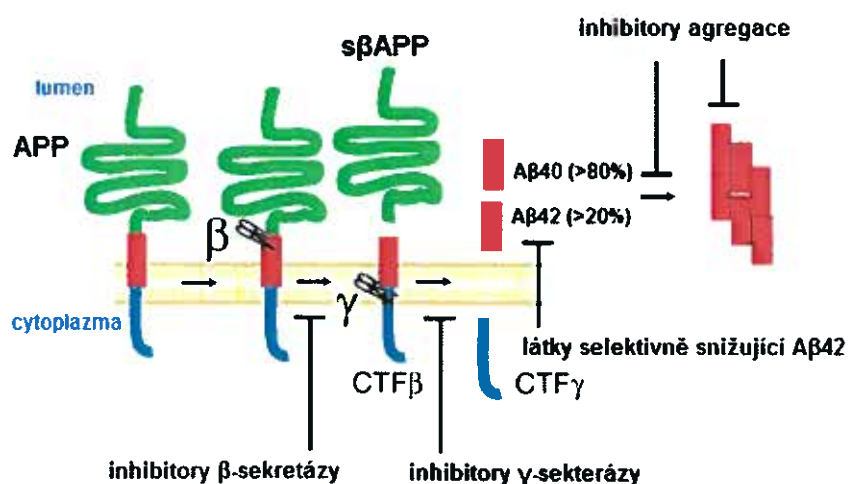
Děje v buňkách ovládají mechanismy zpracování signálů. Signální kaskády kontrolují hlavně rovnováhu mezi fosforylací proteinů, kterou zajišťují kinázy a defosforylací, již obstarávají fosfatázy. Enzymy GSK-3 a CDK5 jsou členy dvou blízkých rodin. Oba enzymy fosforylují aminokyseliny serin nebo threonin obsažené v sekvencích Lys-Ser/Thr-Pro a patří k enzymům naváděným na své substráty prolinem (prolin-dependentní kinázy). GSK-3 je konstitutivně aktivní enzym, který je v mozku přítomen ve dvou izoformách, GSK-3a a GSK-3b. Isoformy vznikají odlišným sestřihem produktu jediného genu. Rodina cyklin-dependentních kináz zahrnuje celkem devět členů označovaných CDK1-9. Většina z nich zaujímá klíčové pozice v kontrolních bodech buněčného dělení. CDK5 je výjimečná tím, že buňky, v nichž je její aktivita nejvyšší, jsou nedělící se pre-terminálně anebo terminálně diferencované neurony. Druhou zvláštností CDK5 je, že její regulační podjednotkou není cyklin, jako u většiny ostatních CDK, ale aktivační protein p35 nebo protein p39 (Veselý a spol., 2002).

3.1.1 Extracelulární depozita – kaskáda amyloidových proteinů

Primárním zdrojem beta-amyloidu je APP. Zralý APP je integrálním glykoproteinem povrchové membrány nervových buněk, který hraje roli v buněčné adhezi a membránové integritě. APP se vyskytuje v několika izoformách. V endoplazmatickém retikulu a v *cis*-Golgiho cisternách lze prokázat přítomnost nezralé, N-glykosylované formy APP, zatímco zralá N- a O-glykosylovaná transmembránová forma APP je v *trans*-Golgiho cisternách a v plazmatické membráně. Jak cytoplazmatická, tak extracelulární doména zralého APP mohou být fosforylovány.

Bylo zjištěno, že přibližně 90% APP štěpí enzym α -sekretáza. Tento enzym z membrány uvolňuje rozpustný fragment (sAPP) s předpokládanou neuroprotektivní funkcí. V membráně zůstává menší fragment tvořený 83 aminokyselinami (C83), který ovlivňuje aktivitu některých genů. Tento fragment se poté štěpí přímo v membráně γ -sekretázou. Z fragmentu C83 vzniká peptid p3 (Mr

~ 3000). Enzymová aktivita α -sekretázy však po 45. roce věku klesá a postupně je nahrazována β -sekretázou, proamyloidním enzymem, který štěpí APP v jiném místě než α -sekretáza. Přitom se uvolňuje menší fragment ($s\beta$ APP) a v membráně zůstává zakotvený řetězec 99 aminokyselin (C99). Z něho γ -sekretáza, enzymový komplex obsahující presenilin a tři další intramembránové proteiny, nikastrin (NCT), „anterior pharynx-defective phenotype 1“ (APH1) a presenilinový enhancer 2 (PEN 2), uvolňuje méně specifickým způsobem peptidy tvořené 37 - 43 aminokyselinami ($A\beta$; viz obr. 3). Z těchto peptidů je nejvíce zastoupen polypeptid tvořený 40 aminokyselinami ($A\beta_{40}$), který je poměrně dobře rozpustný, zatímco o 2 aminokyseliny delší peptid $A\beta_{42}$ je zastoupen jen 5 - 10%. Při DAT je však tvorba produktů posunuta ve prospěch silně amyloidogenního a neurotoxického peptidu $A\beta_{42}$. Takto vzniklé delší beta-peptidy nejprve oligomerují, tzn. spojují se dvě částice mezi sebou (oligomerizace $A\beta$ peptidů významně zvyšuje jejich neurotoxicitu), následně pak dochází ke koagulaci těchto peptidů v extracelulárním prostoru, a tím ke vzniku patologického proteinu beta-amyloidu. Na tomto procesu se významně podílí presenilin 1 (PSEN 1) a presenilin 2 (PSEN 2) - proteiny tvořící část γ -sekretázového komplexu. Agregací beta-amyloidu pak následně vznikají senilní plaky. Amyloidové plaky se tedy hromadí vně buněk a bývají zvláště hojné v hipokampu a v přilehlé kůře (Felician a Sandson, 1999; Veselý a spol., 2002; Nussbaum a Ellis, 2003; Rosenthal a Khotianov, 2003; Klafki a spol., 2006; Bartoš a Řířpová, 2007; Jirář, 2008; Šřastný, 2008).



Obrázek 3: Tvorba beta-amyloidu a místa možného terapeutického účinku (upraveno podle: Golde, 2003).

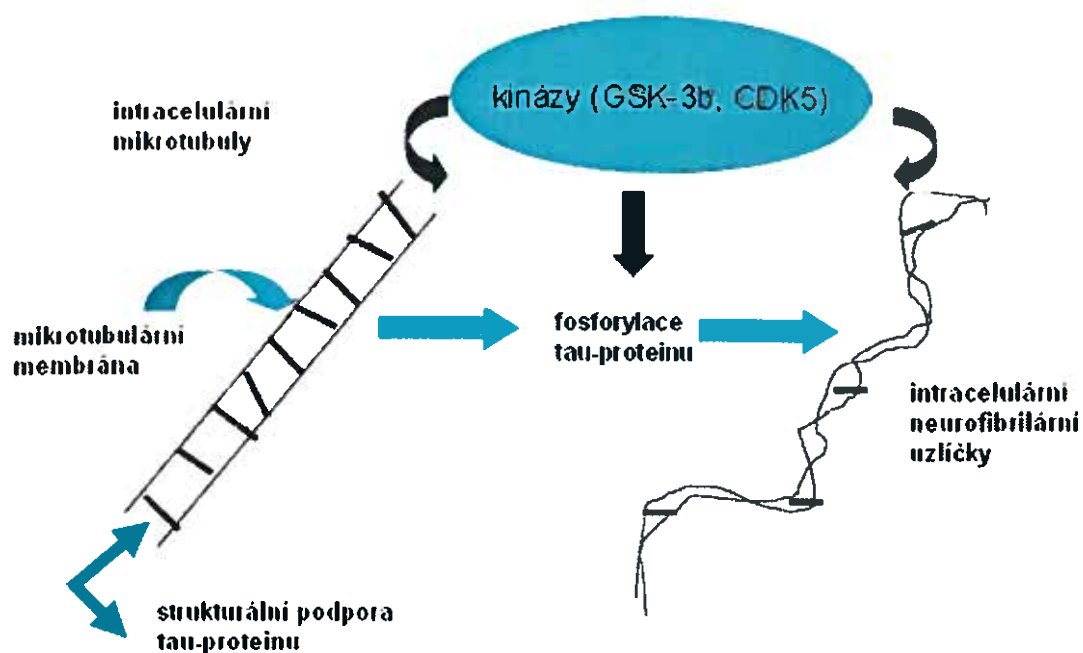
3.1.2 Intracelulární depozita – degenerace neurocytoskeletu

Zatímco beta-amyloid se ukládá intersticiálně, neurofibrilární smotky (tangles), jejichž hlavní složkou jsou tzv. párová helikální filamenta (PHF), se v mozcích pacientů trpících DAT nacházejí uvnitř nervových buněk. PHF obsahují především nadměrně fosforylovaný tau-protein (Veselý a spol., 2002).

Fyziologické funkce tau-proteinu: tau-protein je členem velké rodiny proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAP), tento fosfoprotein má důležitou úlohu v axonálním transportu a je vysoce hydrofilní a tepelně stálý. V lidském mozku se vyskytuje v šesti hlavních izoformách. Tyto izoformy obsahují 352 – 451 aminokyselin kódovaných 11 exony na chromosomu 17, které se při sestřihu mRNA různě kombinují. Změněný poměr jednotlivých izoform a zvýšená fosforylace tau-proteinu při DAT způsobují, že je tau-protein uvolňován z mikrotubulárního aparátu neuronů, což destabilizuje jejich cytoskelet. Tau-protein má přirozeně denaturovanou náhodnou strukturu a vyznačuje se proto mimořádnou prostorovou proměnlivostí. To ho předurčuje pro funkci vazebného proteinu. V řetězci tau-proteinu jsou tři až čtyři úseky opakujících se aminokyselinových sekvencí, které jsou bohaté na bazické postranní řetězce a kterými tau-protein ovlivňuje strukturu a funkci mikrotubulů. Zároveň může tyto sekvence využít pro vazbu jiných proteinů, např. aktinu, kalmodulinu, α -synukleinu, fosfatázy PP 2A a 2B nebo-li kalcineurinu a jiných. Váže také kinázu p35/CDK5, jejímž je zároveň substrátem. Oblasti lemující opakované aminokyselinové sekvence tau-proteinu patrně působí jako jakési čelisti, jež uchytí tau-protein ve správné pozici na mikrotubulech. Samotné opakované sekvence pak podporují polymerizaci mikrotubulů a stabilizují je. K produktivní vazbě tau-proteinu na mikrotubuly, bez níž není výstavba tubulů možná, stačí jediná zmíněná sekvence. Pro adhezi tau-proteinu na mikrotubuly jsou kritické fosforylace aminokyselin Thr(231), Ser(235), Ser(262) a Ser(404). Dále se na ní podílejí aminokyseliny Lys(274) a Lys(281). Pro následnou mikrotubulární agregační funkci tau-proteinu jsou zejména důležité volné postranní řetězce aminokyselin Ser(202) a Thr(205). Tau-protein se fyziologicky fosforyluje na 8–10 místech. Na jeho fosforylaci se může podílet řada proteinkináz. Pre-fosforylace tau-proteinu proteinkinázami A nebo C (PKA, PKC), kaseinkinázou 1 (CK-1; casein kinase 1) anebo kinázou II závislou na kalmodulinu (CaM kinázou II; calmodulin-dependent kinase II), které nejsou při navádění na substrát závislé na prolinu, výrazně zesiluje

následnou fosforylaci tau-proteinu prolin-dependentními kinázami. CDK5 specificky fosforyluje tau-protein v pozicích Ser(202), Thr(205), Ser(235) a Ser(404), zatímco GSK-3b modifikuje Ser(199), Thr(231), Ser(396), Ser(413) a slabě Ser(404). Fosforylace tau-proteinu prostřednictvím CDK5 má dva účinky: 1. zvyšuje aktivitu GSK-3b vůči tau-proteinu, nebo ji dokonce umožňuje – zejména fosforylaci Thr(231); 2. inhibuje další fosforylaci tau-proteinu kinázami PKC a CK-1, nikoliv však kinázou PKA nebo CaM kinázou II. MAPK/Erk také dovede fosforylovat Ser(235) a vytvářet tak podmínky pro fosforylaci Thr(231). Fosforylované postranní skupiny tau-proteinu se mohou zbavit fosforečných substituentů společným působením fosfatázy PP-2A, anebo kalcineurinu (Felician a Sandson, 1999; Veselý a spol., 2002; Bartoš a Řípová, 2007; Iqbal a Grundke-Iqbal, 2008; Šťastný, 2008; Castellani a spol., 2009).

Patobiochemie tau-proteinu: fosforylace tau-proteinu může probíhat asi na 80 pozicích, většina z nich, i když ne všechny, jsou motivy Lys-Ser/Thr-Pro. Nejdelší izoforma tau-proteinu lidského mozku obsahuje 17 takových motivů. Pozornost zasluhuje zjištění, že GSK-3b i CDK5 se hromadí v neurofibrilárních tangles už v raných stádiích jejich vzniku a že vzestup aktivity obou enzymů předchází tvorbu neurofibrilárních tangles. Za normálních okolností zřejmě existuje dynamická rovnováha, kdy se určitá frakce CDK5 váže na tau-protein a sekvstruje se tak v mikrotubulárním kompartmentu. Kináza p35/CDK5 se váže na tau-protein prostřednictvím své katalytické podjednotky. Po fosforylaci se tau-protein z vazby uvolňuje a komplex p35/CDK5 - tau-protein - mikrotubuly se rozpadá. Hyperfosforylaci tau-proteinu se tedy přestává udržovat mikrotubulární síť, což vede k narušení axonálního transportu. Současně hyperfosforylované formy tau-proteinu tvoří neurofibrilární tangles v buněčných tělech neuronů, zejména ve frontální, parietální a temporální kůře, v hipokampu a amygdale. Takto poškozené nervové buňky podléhají apoptóze. Proces nepoznaně (preklinicky) probíhajícího nitrobuněčného a následně i mimobuněčného hromadění neurofibrilárního materiálu je v mozcích osob s genetickým rizikem DAT významně urychlen. Tento materiál pak poškozuje synaptická spojení, což souvisí s rozvojem demence a vede k manifestaci klinických projevů nemoci (Veselý a spol., 2002; Rosenthal a Khotianov, 2003; Bartoš a Řípová, 2007; Iqbal a Grundke-Iqbal, 2008; Jiráček, 2008; Šťastný, 2008).

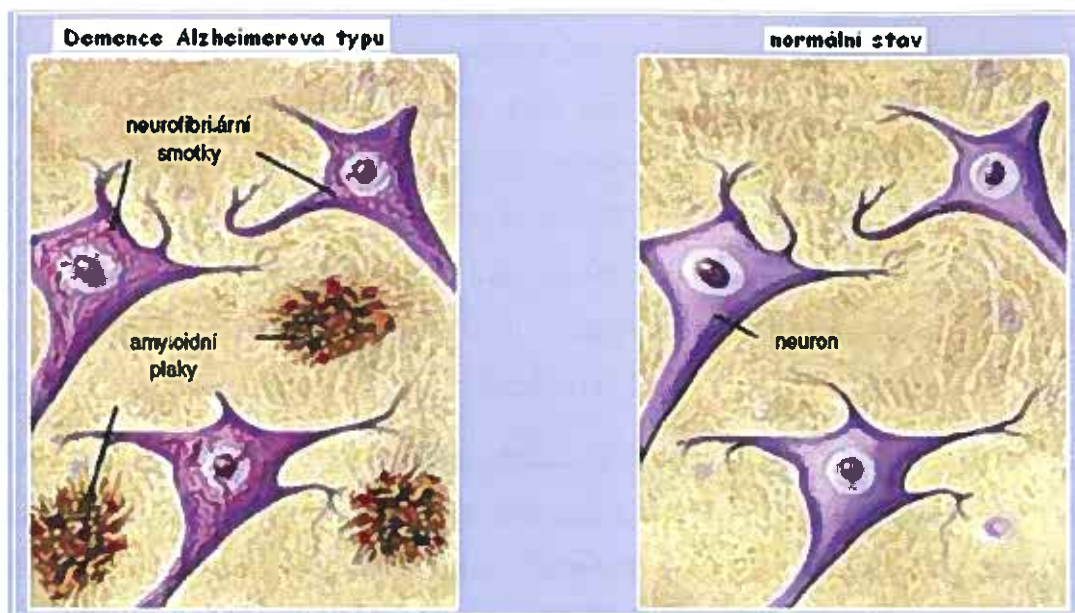


Obrázek 4: Fosforylace tau-proteinu ¹ (upraveno podle: Rosenthal a Khatianov, 2003).

Prolylizomeráza Pin1. Fosforylace tau-proteinu na Thr(231) kinázou GSK-3b je nezbytná pro rozpoznání tau-proteinu prolylizomerázou Pin1. Interakce mezi tau-proteinem a Pin1 je funkčně neobyčejně významná. Hyperfosforylovaný tau-protein se nemůže vázat na mikrotubuly, ale Pin1 může jeho normální agregační a stabilizační tubulární funkce obnovit. V mozcích pacientů s DAT je nedostatek solubilní formy Pin1. Pin1 se v nich hromadí převážně v PHF. To znemožňuje normální regulaci MAP a dalších fosfoproteinů, za niž je Pin1 odpovědná. V konečných důsledcích tento řetězec, který začíná fosforylací tau-proteinu prostřednictvím CDK5 a pokračuje fosforylací Thr(231) od GSK-3b, spouští programovanou buněčnou smrt. GSK-3b také fosforyluje, a tím inhibuje klíčový enzym glykolýzy – pyruvátdehydrogenázu. Následně vázne přeměna pyruvátu na acetyl-CoA, který chybí pro syntézu Ach. Nedostatek Ach je pro DAT charakteristický. Naproti tomu AChE, enzym odpovědný za štěpení Ach, se hojně vyskytuje jak v mezibuněčných depozitech, tak v neurofibrilárních tangles. Hyperfosforylace tau-proteinu má ještě jeden důsledek - tau-protein se stává rezistentním proti proteolytickému štěpení. Hromadění tau-proteinu pak může ovlivnit řadu jiných procesů důležitých pro život a funkci buněk, jako jsou ubiquitinace,

¹ Úlohou tau-proteinu v buňce je strukturální podpora mikrotubulů. Nadměrná fosforylace tau-proteinu vede ke tvorbě neurofibrilárních tangles.

oxidace, glykace nebo vazby glykoproteinů, a tak uzavírat bludný kruh vedoucí zániku buněk (Veselý a spol., 2002).



Obrázek 5: Schematický mikroskopický obraz mozku pacienta s demencí Alzheimerova typu a obraz zdravého člověka (upraveno podle: Bartoš a Řípková, 2007).

3.1.3 Apoptóza u demence Alzheimerova typu

V oblasti plaků dochází ke vzniku sterilního zánětu s uvolněním působků akutní zánětlivé fáze (interleukiny, cytokiny a volné kyslíkové radikály) a k aktivaci astrocytů a mikroglíí. Mozek nemocného s DAT je tedy pod vlivem těžkého oxidativního stresu, v důsledku nadměrné tvorby kyslíkových radikálů (peroxydy, hydroxyskupina, singletový kyslík, NO) vzniklých vlivem beta-amyloidu, nebo následkem dysbalance vápníku v neuronech a jejich mitochondriích. Dále dochází k aktivaci zánětlivých enzymů cyklooxygenáz, k uvolnění nadměrného množství excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát), které se vážou v CNS na své receptory. Nadměrná stimulace tzv. ionotropních receptorů (zejména NMDA) vede k otevření kalciových kanálů a zvýšenému influxu kalcia do neuronů. NMDA receptory se vyskytují ve velkém množství v celém mozku a jsou nezbytné pro jeho normální činnost. Synaptické NMDA receptory společně s dalšími typy ionotropních glutamátových receptorů zprostředkovávají excitační synaptický přenos přibližně na polovině všech synapsí v mozku a míše. Při hyperexcitaci pak na receptorové úrovni dochází k výskytu přenosových šumů, které znemožňují fyziologický přenos signálů. Tím dochází k narušení mechanismu LTP. Navíc nadměrným vstupem iontů kalcia do nervových

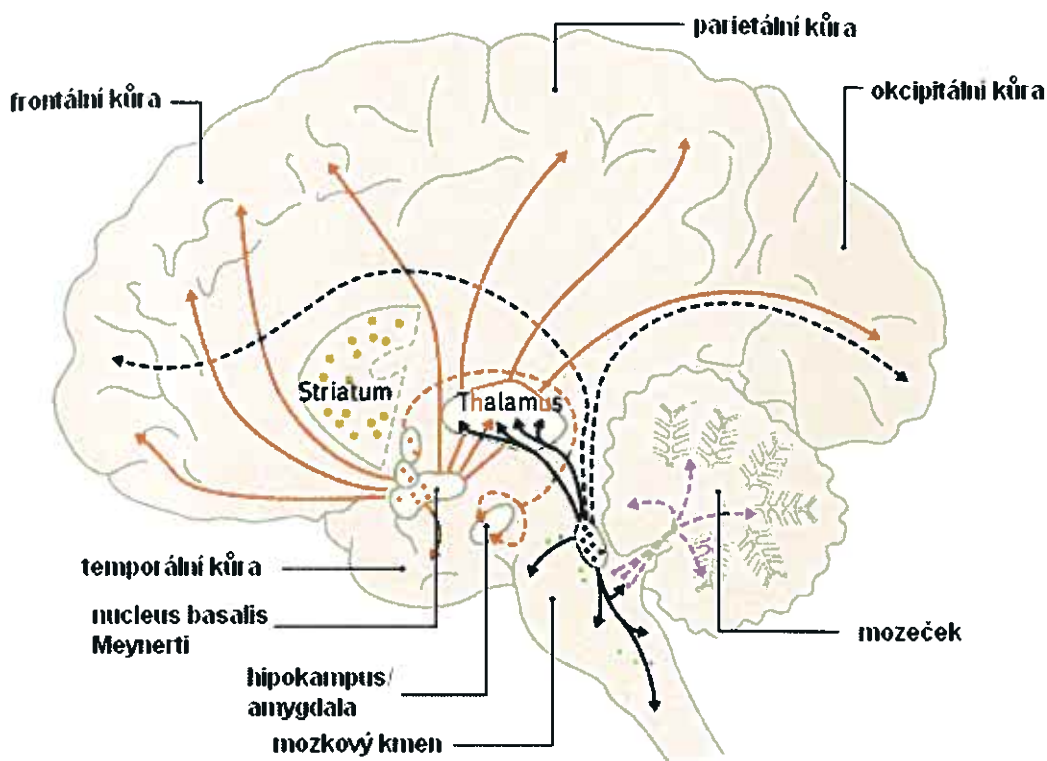
buněk dochází k aktivaci peptidázy calpain (kalciem aktivovaný enzym podléjící se na degradaci proteinů), která přeměňuje aktivační protein CDK5 p35 na protein p25. Obecným rysem, který provází zánik buněk apoptózou, je zvýšení aktivity CDK5. Vzestup aktivity CDK5 je důsledkem proteolytické přeměny jejího aktivačního proteinu p35 na protein p25. Vznik p25 vede k dramatickému přesunu CDK5 do cytoplazmy neuronů, kde p25/CDK5 zůstává – na rozdíl od p35/CDK5 – dlouhodobě aktivní. Tvorba komplexu p25/CDK5 ohlašuje vstup buněk na cestu jejich programované smrti. V mozcích pacientů s DAT jsou přítomny vysoké koncentrace p25 (Veselý s spol., 2002; Rosenthal a Khotianov, 2003; Petrovič a spol., 2004; Bartoš a Řípková, 2007; Fabiánová, 2008; Jiráček, 2008; Šťastný, 2008).

U DAT se tedy výrazně zvyšuje apoptóza a v důsledku toho dochází ke vzniku kortikosubkortikální atrofii mozku. Dále dochází k úbytku počtu synapsí a ke snížení synaptické plasticity, ke snížení tvorby některých NRF a k dalším degenerativním změnám (Patočka, 2002; Bartoš a Řípková, 2007; Jiráček, 2008).

3.1.4 Poruchy centrálního cholinergního systému u demence Alzheimerova typu

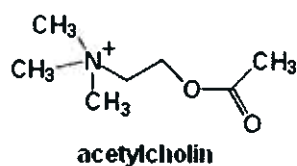
Centrální cholinergní systém je neurotransmiterový systém mozku, který hraje důležitou roli v procesech učení a paměti a jeho porucha vede především k poruše krátkodobé a střednědobé paměti (zejména je porušena konsolidační fáze paměti – vstřípení nových paměťových obsahů). Tento systém je zvláště narušen u DAT, dále pak u DLB, u PND a také u VaD (Fabiánová, 2008).

U pacientů s DAT jsou postiženy všechny oddíly cholinergního systému, v časných fázích pak především presynaptické části cholinergních neuronů (Fabiánová, 2008).



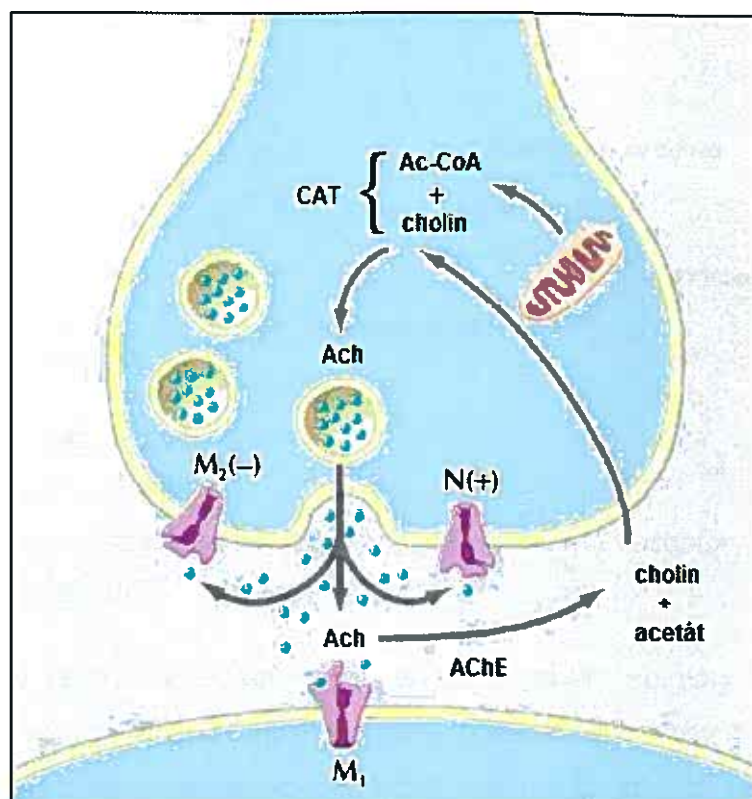
Obrázek 6: Schématický obrázek centrálního cholinergního systému² (upraveno podle: Keverne a Ray, 2008).

Při DAT dochází k narušení zejména cholinergních vláken, která difúzně projikují z nucleus basalis Meynerti do neokortexu, ale i dalších vláken, např. kmenových, podílejících se na regulaci kvalitativní úrovně vědomí (Felician a Sandson, 1999; Fabiánová, 2008). Dále při DAT dochází k poklesu hladiny enzymu cholinacetyltransferázy (CAT), který syntetizuje Ach z cholinu a acetyl-koenzymu A. Ach je neuromediátor uvolňovaný cholinergními neurony. Jedná se o acetyler cholinu (Fabiánová, 2008)



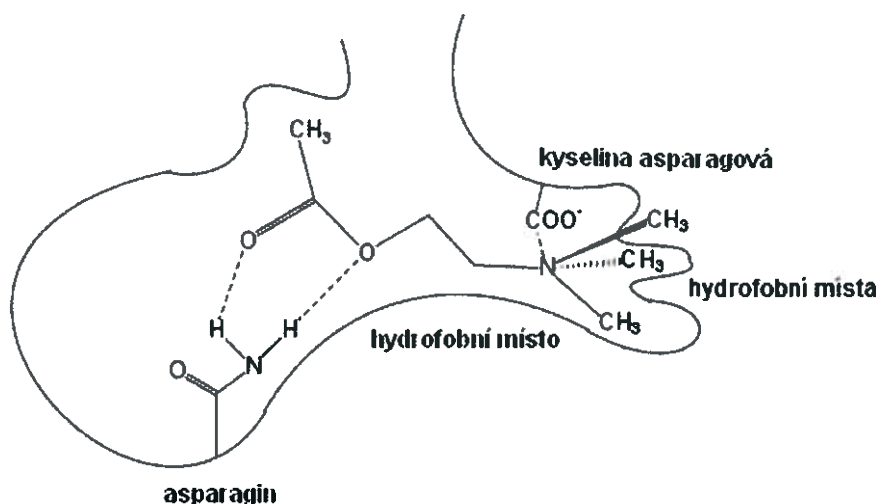
Obrázek 7: Struktura neuromediátoru acetylcholinu (upraveno podle: Houghton a Howes, 2005).

² Sagitální pohled na cholinergní dráhy. Neurony jsou označeny tečkami, interneurony pak čárkovanými šipkami. Červené šipky znázorňují projekci cholinergního systému z nucleus basalis Meynerti do korových oblastí a hipokampu, černé šipky znázorňují cholinergní systém mozkového kmene.



Obrázek 8: Syntéza neuromediátoru acetylcholinu z acetyl-CoA a cholinu za katalýzy enzymu cholinacetyltransferázy. Acetylcholin je uvolňován do synaptické štěrbině a váže se na nikotinové a muskarinové receptory. Enzym acetylcholinesteráza štěpí acetylcholin na cholin a kyselinu octovou (upraveno podle: Gauthier, 2002).

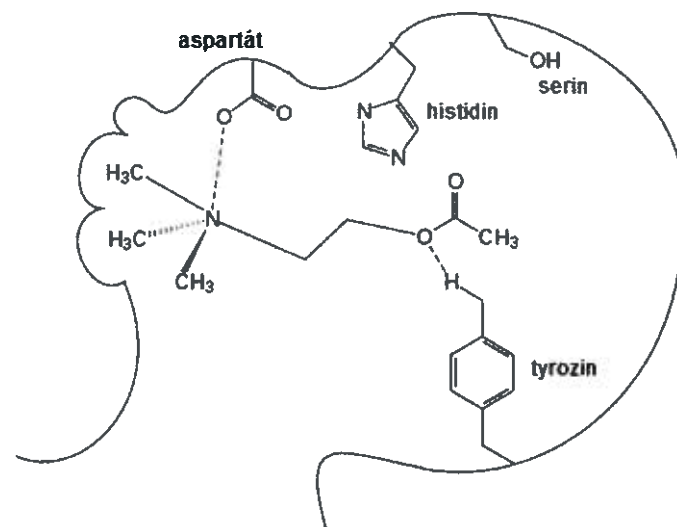
Acetyl-koenzym A je tvořen v Krebsově cyklu a kromě tvorby Ach je substrátem pro syntézu adenosintrifosfátu (ATP). Za určitých podmínek, jako je hypoxie, jsou přednostně produkovány molekuly ATP na úkor Ach, který se tak může stát deficitní. Cholin obtížně přechází přes hematoencefalickou bariéru. Jeho zdrojem jsou zejména fosfolipidy, např. fosfatidylcholin. Do neuronů je pak přenášen mechanismem označovaným jako vysokoafinitní Na^+ -dependentní cholinový transport (uptake). V průběhu nervové aktivity se transport cholinu do nervových buněk zvyšuje. U DAT je však tento vysokoafinitní cholinový uptake snížen a klesá tedy nabídka substrátu pro syntézu Ach. Důsledkem toho je snížené uvolnění Ach na presynaptických zakončeních. Po uvolnění z presynaptických zakončení se Ach váže na své postsynaptické receptory - nAChR a muskarinové (mAChR). Při DAT dochází ke snížení počtu nAChR zejména v kortexu, hipokampu a dalších oblastech. Počet postsynaptických mAChR zůstává – alespoň v počátečních fázích nemoci - relativně nezměněn. Na tomto poznatku je založena i současná léčebná strategie (Fabiánová, 2008).



Obrázek 9: Vazba acetylcholinu na nikotinový acetylcholinový receptor ³ (upraveno podle: Houghton a Howes, 2005).

Po uvolnění z vazby na receptory je Ach odbouráván enzymy cholinesterázami na kyselinu octovou a cholin. Cholin je poté opět mechanismem vysokoafinitního transportu přenášen do presynaptického oddílu neuronu. Inhibicí cholinesteráz tedy dojde k prodloužení životnosti molekul Ach na synapsích, a ke zvýšení jeho vazby na nAChR a mAChR. Za normálních okolností se při odbourávání Ach uplatňuje zejména AChE, u DAT a u DLB navíc i butyrylcholinesteráza (BuChE). Ve zdravém mozku se AChE vyskytuje v neuronech a axonech a BuChE v oblastech glie a v endotelových buňkách. Molekuly BuChE jsou u DAT tvořeny transformovanými gliovými elementy v oblasti plaků. Dále se cholinesterázy u této nemoci podílejí na tvorbě nerozpustného beta-amyloidu, proto inhibice cholinesteráz příznivě zasahuje i do základních mechanismů neurodegenerace (Klařki a spol., 2006; Fabiánová, 2008).

³ Důležitou částí molekuly Ach je amin, který poskytuje pozitivní náboj a váže se na aspartát receptoru. Část molekuly Ach vytváří vodíkové vazby s asparaginem receptoru a malé skupiny umožňují vázat se na hydrofobní místa blízko aspartátu.

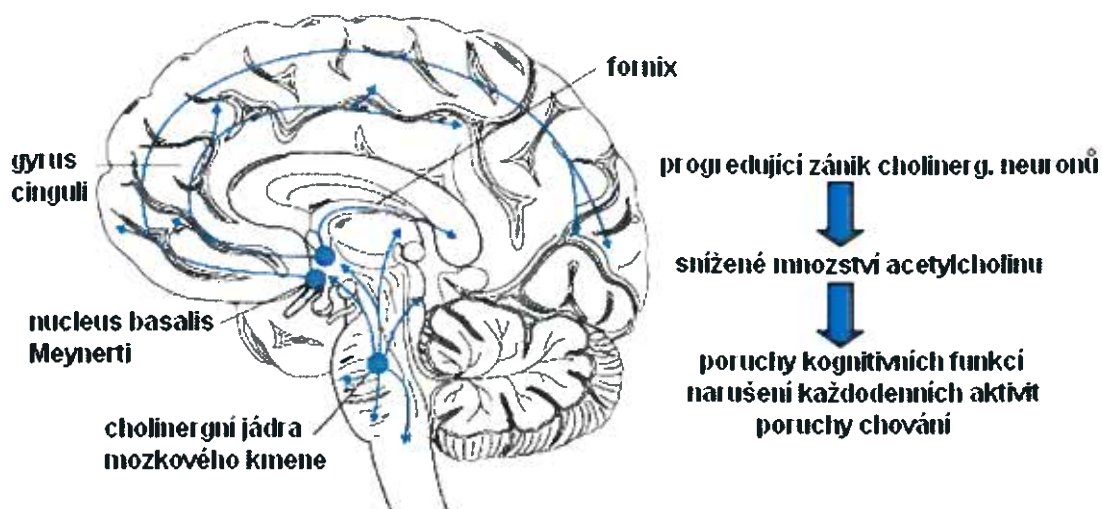


Obrázek 10: Interakce mezi acetylcholinem a aktivním místem acetylcholinesterázy ⁴ (upraveno podle: Houghton a Howes, 2005).

Již v časném stadiu DAT dochází k značnému deficitu Ach v entorhinální kůře, hipokampu a přilehlých oblastech temporální kůry. Postupně dochází k cholinergní denervaci v temporálních lalocích a v přilehlých limbických a paralimbických oblastech. Cholinergní inervace thalamu, striata, a také cholinergní systém mozkového kmene zůstávají relativně neporušené. Cholinergní léze u DAT tedy není generalizovaná. V průběhu nemoci však dochází k postupné degeneraci i ostatních neurotransmiterových systémů a také k vzájemné potenciaci různých neurodegenerativních mechanismů (Fabiánová, 2008).

U DAT je tedy centrální cholinergní systém postižen primárně, narušeny jsou však i ostatní mediátorové systémy mozku, např. glutamátergní (Fabiánová, 2008).

⁴ Obrázek ilustruje jednotlivé aminokyselinové zbytky AChE, které jsou považovány za nejdůležitější v procesu vazby Ach. Zejména se jeví důležitou vazbu dusíku s pozitivním nábojem molekuly Ach na aspartát AChE. Pozitivně nabitý dusík je běžnou částí mnoha alkaloidů, proto není překvapením, že mnoho účinných IChE je právě ze skupiny alkaloidů.



Obrázek 11: Cholinergní deficit u demence Alzheimerova typu (upraveno podle: Brunovský, 2006).

3.1.5 Genetická podstata demence Alzheimerova typu

DAT vykazuje značnou genetickou heterogenitu, přesto existují genetické determinanty hlavních forem této nemoci. Výzkum v oblasti genetiky vztahující se k DAT přinesl objev 3 genů (APP, PSEN 1 a PSEN 2), které odpovídají za FAD a pouze jediný kandidátní gen (APOE) pro DAT. V současnosti existují i významné doklady o existenci dalších genů mající vztah k oběma hlavním formám DAT (Šťastný, 2008).

Přehled rizikových genů u presenilní familiární formy demence Alzheimerova typu:

Studie z počátku 90. let 20. století prokázaly vazbu FAD s genetickými mutacemi nejen na chromozomu 21 (APP gen), ale i na chromozomech 19, 14 a 1, kde jsou lokalizovány geny, které mají vztah ke γ -sekretázovému komplexu (Šťastný, 2008).

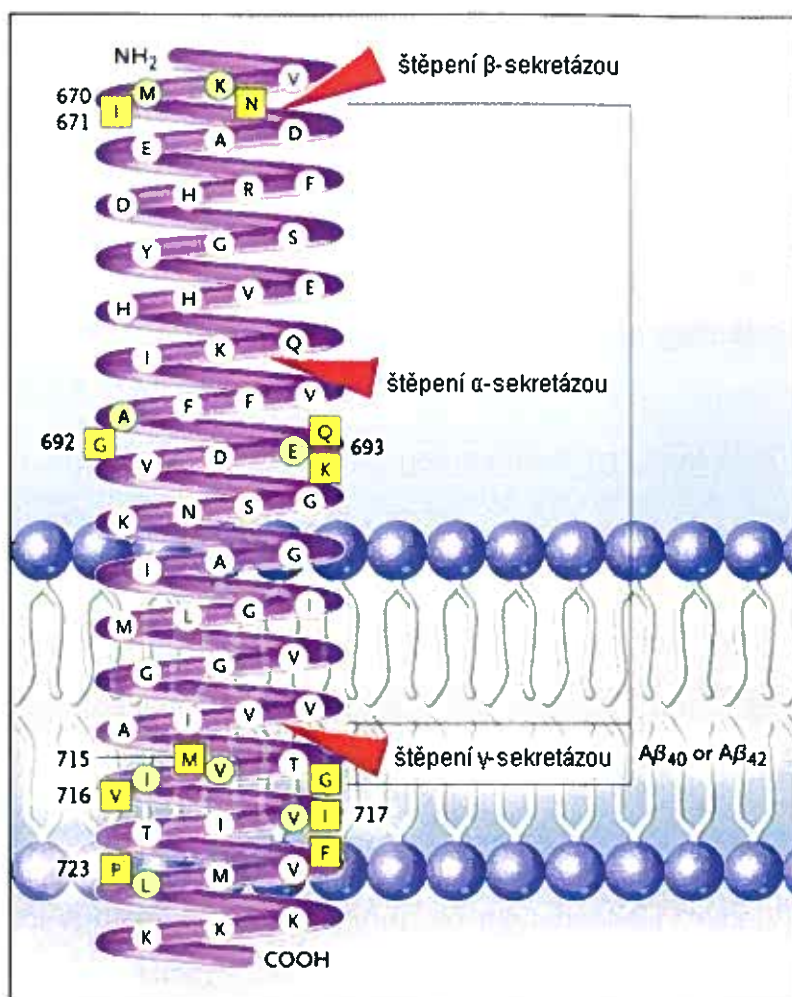
Chromozom 21 (oblast 21q21.2-3 pro APP gen)

Lidský APP gen kóduje syntézu membránového proteinu typu I, jehož funkce může být trofická, adhezní nebo receptorová. APP je exprimován v různých tkáních s nejvyšší expresí v nervových buňkách CNS. Z více než 10 jeho izoform, které vznikají sestřihem genu majícího 19 exonů, převažují v mozku transkripty APP 695, APP 751 a APP 770. V současnosti je známo 23 jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) tohoto genu, z nichž 19 nepochybně způsobuje FAD nebo demenci související

s mozkovým krvácením. Mutace APP genu se podílejí přibližně na 5 - 10% všech případů FAD. Jedna z mutací APP genu zvaná „holandská“ (E693Q), podmiňuje ukládání A β peptidů pouze do stěny mozkových cév, takže její nositelé jsou vážně ohroženi mozkovým krvácením. Všechny tyto mutace byly nalezeny v místech působení β - a γ -sekretázy nebo v jejich blízkosti. Přitom mutace v místě působení β -sekretázy činí z APP lepší enzymový substrát, zatímco mutace blízko místa působení γ -sekretázy zvyšují tvorbu A β 42 a současně mění poměr A β 40/A β 42 ve prospěch více agregujícího delšího polypeptidu. Ačkoliv mutace v APP genu jsou méně četné než mutace v genech pro preseniliny, podporují původní amyloidní hypotézu DAT. Často je provázejí drobná, četná krvácení nalézaná především uvnitř amyloidních depozit (Veselý a spol., 2002; Šťastný, 2008).

Chromozom 14 (oblast 14q24.3 pro PSEN1 gen)

Řada prací prokázala, že mutace APP genu mohou vysvětlit jen malou část případů FAD a že hlavní místo pro tuto formu demence leží na chromozomu 14. Další studie prokázaly, že na tomto chromozomu existuje více než 140 mutací, ať již jako SNP nebo jako mikrolece či mikroinzerce. Přestože tyto mutace postihují 1/3 z celkového počtu 467 aminokyselin tvořících protein PSEN 1, jejich biochemický a klinický důsledek byl objasněn jen částečně. Bylo zjištěno, že inkorporaci mutovaného proteinu do γ -sekretázového komplexu provázel zvýšený podíl A β 42 na poměru mezi hladinami A β 40 a A β 42. Ten však byl v některých případech podmíněn sníženou tvorbou A β 40 bez zvýšení celkového množství A β peptidů. Tato skutečnost může podmiňovat neurotoxicitu podobnou té, která provází mutace genu APP. Zvýšená toxicita a paměťový deficit však byly pozorovány téměř výhradně v animálních modelech DAT, takže zbývá doložit skutečný význam těchto SNP u osob s FAD. V současnosti víme, že PSEN 1 je katalytickou podjednotkou γ -sekretázového komplexu odpovědného za štěpení APP fragmentu C99, a proto je na něj zaměřen intenzivní farmakologický výzkum (Šťastný, 2008).



Obrázek 12: Změněné aminokyselinové zbytky v blízkosti transmembránové domény APP vzniklé následkem missense mutací zapříčiňujících presenilní familiární formu demence Alzheimerova typu⁵ (upraveno podle: Nussbaum a Ellis, 2003).

Chromozom 19 (oblast pro PEN2 gen)

PEN 2 protein, tvořený 101 aminokyselinami, je spolu s proteinem APH1 součástí komplexu, jehož funkcí je stabilizace a funkční aktivita γ-sekretázy. Zvýšená exprese tohoto genu zvyšuje enzymovou aktivitu komplexu a v konečném důsledku zvyšuje tvorbu Aβ₄₂. Nedávná studie prokázala v tomto genu přítomnost významné mutace (D90N) s vazbou do místa nacházejícího se proximálně od genu APOE, který

⁵ Aminokyseliny jsou na obrázku označeny jednopísmennými zkratkami. Čísla označují pozice zaměněných aminokyselin. Změněné aminokyselinové zbytky jsou v blízkosti míst, která jsou štěpena α- β- a γ-sekretázami, jak označují červené trojúhelníky. Normální aminokyselinové zbytky jsou v zelených kolečkách, zatímco zaměněné aminokyselinové zbytky missense mutacemi jsou ve žlutých rámečcích. Missense mutace jsou tedy mutace vedoucí k záměně aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Tyto mutace vedou ke zvýšené akumulaci toxického Aβ₄₂.

je společně s PEN 2 lokalizován na chromozomu 19 (Šťastný, 2008).

Chromozom 7 (oblast 7 q36 pro PAXIP1 gen)

Ve 1270 nizozemských rodinách byla zjištěna mutace Ala626 v genu, který kóduje protein interagující s PAX aktivační doménou. Tato mutace nebyla prokázána ve skupině 320 kontrolních osob. Pokud však nebude přesvědčivě prokázáno, že PAXIP1 má funkční význam pro vznik nemoci v těchto rodinách, jeho důležitost pro FAD bude malá nebo žádná (Šťastný, 2008).

Chromozom 1 (oblast 1q42.1 pro PSEN2 gen a oblast 1q23 pro NCT gen).

Molekulu PSEN 2 tvoří 448 aminokyselinových zbytků, které vykazují 67% sekvenční shodu s PSEN 1 a zastupují jeho enzymovou aktivitu v γ -sekretázovém komplexu. V řetězci PSEN 2 bylo identifikováno jen 10 mutací, 4 z nich neměly vliv na poměr hladin A β 40/A β 42. Přestože zbývající SNP v PSEN 2 genu byly asociovány s FAD, jejich význam pro vznik nemoci je stále předmětem diskuse (Šťastný, 2008).

Na stejném chromozomu je i genový lokus pro NCT, který má v γ -sekretázovém komplexu funkci substrátového receptoru. Je jeho největší podjednotkou tvořenou 709 aminokyselinami. Mutace nebo delece postihující 5 aminokyselin v pozici 336-340, podle nichž má genový lokus označení DYIGS motiv, vedou ke změně tvorby A β peptidů (Šťastný, 2008).

Tauopatie, demence Alzheimerova typu a frontotemporální lobární degenerace

Přítomnost neurofibrilárních klubiček tvořených fosforylovaným tau-proteinem je charakteristickým rysem skupiny poruch označovaných jako tauopatie. Studie australských a německých pracovníků (Laws a spol., 2007) podporuje původní představu o tom, že kromě prokázané vazby MAPT genu (gen kódující tau-protein) k FTLD existuje i jeho asociace s DAT (Šťastný, 2008).

Tau-protein asociovaný s mikrotubuly reprezentuje v mozku 6 izoforem s řetězcem tvořených 352 až 441 aminokyselinovými zbytky, který je kódovaný jediným genem. Na chromozomu 17 tento gen obsahuje 16 exonů odpovídajících za mRNA, jejíž alternativní sestřižení v místě exonu 2, 3 a 10 podmiňuje vznik zmíněných izoforem. Nejdelší izoforma tau-proteinu obsahuje 79 zbytků aminokyselin serinu (Ser) a threoninu (Thr), které odpovídají za stupeň její

fosforylace. Specifickou fosforylací zajišťuje skupina fosfokináz, z nichž CDK 5 fosforyluje tau-protein specificky v pozicích Ser-202 a Thr-205, Ser-231 a Ser-404, zatímco GSK-3b tuto reakci zajišťuje pro Ser-199, Thr-231, Ser-396, Ser-413 a pro Ser-404. Částečně fosforylovaný tau-protein vykazuje vysokou vazebnou afinitu k buněčným mikrotubulům, které stabilizuje, a tím zajišťuje tvar a funkci buněk. Naopak hyperfosforylace tohoto proteinu vazbu omezuje, a tím zvyšuje koncentraci tau-proteinu v buněčné cytoplazmě. Hyperfosforylovaný tau-protein se současně stává odolným vůči proteolytické degradaci a jeho hromadění ovlivňuje transport různých molekul, včetně APP, což dále zvyšuje tvorbu A β 42. Zvýšená adhezivita hyperfosforylovaného tau-proteinu podmiňuje jeho agregaci a následně i tvorbu neurofibrilárních klubíček uvnitř buněk. Proces akumulace tau-proteinu může řadu let předcházet zániku neuronů, ale bývá od počátku provázen progredujícím kognitivním deficitem (Šťastný, 2008).

V současné době je známo přibližně 40 mutací v genu MAPT, které podmiňují vznik autozomálně dominantní FTLD. Většina těchto mutací a jednodušených delecí byla zjištěna v oblasti exonu 9 až 13, tj. v té části molekuly tau-proteinu, která odpovídá za její vazbu do mikrotubulů. Další dvě mutace byly zjištěny i v exonu 2. Uvedené mutace mohou vysvětlit sice jen 1/5 všech FTLD, ale ve skutečnosti téměř polovinu případů, kdy osoby trpěly familiární formou nemoci. V protikladu k „amyloidním mutacím“, mutace MAPT genu však nebyly provázeny depozity A β peptidů, ale většinou jen nepravidelnými shluky tau-proteinu. V souvislosti s tím byla zvláštní pozornost věnována mutaci Arg406Trp, která způsobuje dědičnou tauopatii, která se však klinicky podobá DAT. Pozdější mapování míst obsahujících polymorfizmy označené jako H1 a H2 dále podpořilo asociaci DAT s tímto genem. V řadě případů se však asociace netýkala FAD, neboť klinické projevy nemoci se objevovaly až po 65. roce věku a u některých osob dokonce vykazovaly primární vztah ke genu pro APOE (Šťastný, 2008).

Kandidátní geny pro senilní formu demence Alzheimerova typu

Pouze několik málo míst vykazovalo vazbu na DAT. Výjimkou jsou mutace v genu pro APOE, který vykazuje mohutnou asociaci s uvedenou formou demence (Šťastný, 2008).

Chromozom 19 (oblast 19q13 pro APOE gen)

Cholesterol transportující protein APOE je ligandem pro neuronální lipoproteinové receptory, na kterých kompetuje o vazbu s reelinem, proteinem, který se významně podílí na časných fázích vývoje mozku. Tyto receptory pro vazbu nízkodenzitních lipoproteinů kontrolují především synaptickou funkci a mají zásadní význam pro procesy učení, paměti a chování, které úzce souvisejí s DAT. Gen APOE odpovědný za proteinovou expresi má 3 alely označené jako $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ a $\epsilon 4$, které jsou převáděny do kombinace dvou aminokyselin (cystein, arginin) v pozici 112 a 158 (lokus $\epsilon 2$: Cys/Cys; lokus $\epsilon 3$: Cys/Arg a lokus $\epsilon 4$: Arg/Arg). Nejfrekventovanější alelou je $\epsilon 3$, dále pak $\epsilon 4$ a nejméně frekventovanou je $\epsilon 2$. Přitom alela $\epsilon 4$ významně zvyšuje predispozici k DAT, zatímco alela $\epsilon 2$ je dáována do souvislosti se sníženým rizikem nemoci. U heterozygotů s APOE $\epsilon 4$ je riziko zvýšeno asi 3násobně, u homozygotů s touto alelou je riziko asi 15násobně vyšší. Současně se urychluje i časový nástup příznaků demence (Felician a Sandson, 1999; Theuns a Broeckhoven, 2000; Veselý a spol., 2002; Rosenthal a Khotianov, 2003; Šťastný, 2008).

Chromozom 12 (oblast 12p13-p12.3 pro geny A2M a LRP1)

Tento gen je zodpovědný za expresi $\alpha 2$ -makroglobulinu (A2M), proteinu, který je podobně jako APOE ligandem receptoru pro nízkodenzitní lipoproteiny. V krevní cirkulaci na sebe váže celou řadu proteinů tělních tekutin a v nervové tkáni i A β 42. Komplex $\alpha 2$ -makroglobulin – A β 42 se transportuje do buněk, kde se degraduje; $\alpha 2$ -makroglobulin tak brání vzniku amyloidových plaků. V genu A2M existuje vedle SNP také inzerční/deleční polymorfismus v oblasti exonů 17 a 18, který v homozygotním zastoupení urychluje pokles schopnosti pozdější figurální rekognice. Žádné významné změny v dlouhodobé paměti však nebyly zjištěny v případě genu LRP1, který je odpovědný za expresi proteinu vztahujícího se k výše uvedené skupině receptorů pro nízkodenzitní lipoproteiny. Tento receptor se podílí na odstraňování A β peptidů skrze hematoencefalickou bariéru prostřednictvím APOE, ale polymorfizmy v jeho genu neprokázaly asociaci s DAT (Veselý a spol., 2002; Šťastný, 2008).

Chromozom 11 (oblast 11q23-q24 pro SORL1 gen)

Genetická asociace mezi DAT a SNP v genu SORL1 byla prokázána i pro expresi receptoru se vztahem k sortilinu, dalšímu zástupci skupiny receptorů pro nízkodenzitní lipoproteiny. Tento receptor odpovídá za buněčný přenos a umístění APP, pokud je jeho exprese snižena, APP je přesunut do metabolické dráhy, kde se z něho přednostně uvolňují A β peptidy. Studie Rogaeva a spol. (2007) dokládá, že změny v expresi SORL1 lze přiřadit k příčinám DAT (Šťastný, 2008).

Chromozom 10 (oblast 10q23-q25 pro IDE gen)

Jedná se o gen tvořený 24 exony, které kódují inzulin degradující enzym (IDE), a dlouhými nepřepisovanými sekvencemi. Enzym štěpí peptidy typu inzulinu, ale i A β peptidy, takže zvýšení hladiny zejména A β 42 v podmínkách hyperinzulinemie vede k „soutěžení“ obou peptidů o stejný enzym. Proto hyperinzulinemie u osob trpících diabetem typu 2, ale prokazovaná často i u osob s nadváhou nebo srdečně-cévními poruchami, představuje významný rizikový faktor pro vznik DAT. Předpokládá se, že gen IDE má příčinný vztah k DAT bez zastoupení alely ϵ 4, zatímco další geny, nacházející se v těsné blízkosti IDE, mohou představovat rizikový faktor pro DAT v přítomnosti této alely (Šťastný, 2008).

V současnosti lze potvrdit, že 5 - 10% osob trpí FAD, zatímco až 90% nemocných trpí multifaktoriálně podmíněnou formou DAT, která vykazuje nemendelovský typ dědičnosti při zcela výjimečném postavením genu APOE. Proti jednoznačné genetické determinaci vzniku DAT svědčí jednak skutečnost, že onemocnění vznikne současně pouze u 40 % jednovaječných dvojčat a jednak to, že u nich vznikne v různém věku. Úloha vnějších faktorů je patrná i ze zjištění, že nemusí vždy onemocnět ani osoby, které jsou ApoE ϵ 4 homozygotní (Veselý a spol., 2002; Šťastný, 2008).

Tabulka 1: Genetické a negenetické faktory mající vztah k predikci demence Alzheimerova typu (upraveno podle: Šťastný, 2008).

Familiární forma demence Alzheimerova typu						Senilní forma demence Alzheimerova typu				
genetické riziko			ostatní faktory			genetické riziko			ostatní faktory	
faktor	Chr21 ↓ APP	Chr19 ↓ PEN2	Chr14 ↓ PSEN 1	Chr1 ↓ PSEN 2	prostředí + MAPT	Chr19 ↓ APOE	Chr12 ↓ A2M	Chr11 ↓ SORL 1	Chr10 ↓ IDE	DM typu2 + kardiovaskul. ch. + věk, vzdělání, zánět, trauma
produkt	↓				↓	↓				
	zvýšená produkce Aβ peptidů a smotků					změna uvolňování, transportu a ukládání Aβ peptidů				
	↓									
	oxidační stres, synaptická dysfunkce, neurotoxicita, smrt neuronů									
	↓									
	DEMENCE									
	↓									
	SMRT ORGANISMU									

3.2 Klinický obraz demence Alzheimerova typu

Důležitou skutečností je fakt, že DAT začíná latentně, a to již 10 – 20 let před prvními klinickými příznaky. Vzhledem k tomu, že etiopatogeneze této nemoci není zcela jasná a vzhledem k omezeným diagnostickým možnostem, je DAT rozpoznána většinou až v době, kdy v mozku již proběhly významné a hlavně nevratné změny. DAT začíná pomalu, nenápadně. Relativně brzy se objevují poruchy soudnosti, logického myšlení, orientace v prostoru a čase. Dále pak dochází k poruchám paměti (Jiráček, 2008; Šťastný, 2008).

Paměť je schopnost ukládat, uchovávat a vybavovat informace většinou osvojené učení. V lidském mozku je několik paměťových systémů, které se liší svým obsahem, časovým rozpětím, jež pokrývají a svým anatomickým podkladem. Vzhledem k tomu, že paměť není jednotná funkce, nejsou jednotné ani její poruchy. Klinický obraz dysfunkcí jednotlivých typů paměti se tedy liší, vzhledem k různým anatomickým substrátům jednotlivých typů paměti (Fabiánová, 2008).

Paměť lze dělit podle několika kritérií. Jedno z nich je na deklarativní (syn. explicitní) a nedeklarativní (syn. implicitní). Deklarativní paměť představuje vědomé vybavení událostí nebo faktických znalostí. Ta se dále rozděluje na paměť sémantickou (paměť pro fakta, pojmy, významy slov a znalost předmětů)

a epizodickou (paměť pro události a jejich souvislosti vázané na konkrétní čas a prostor, zachycuje časovou posloupnost – „příběh“). Nedeklarativní paměť představuje zdánlivě nevědomé vybavení informací, které však byly předtím naučeny nebo podvědomě uloženy v paměti. Její obsahy nelze vyjádřit slovy. Existuje řada druhů nedeklarativní paměti, příkladem může být paměť pro dovednosti (procedurální), po naučení nejsou její obsahy závislé na vědomé pozornosti (např. řeč, chůze, řízení automobilu apod.), dále pak priming (doslovně spěšná instrukce, podněcování, instruování předem; Fabiánová, 2008).

Pro poruchy paměti při DAT je příznačné, že je nejdříve a nejvíce postižena epizodická paměť (vyžadující správnou funkci hipokampu). Z časového hlediska je pak více postižena paměť recentní než paměť pro staré události. Dále také dochází k poruchám sémantické paměti – vědomostí, pojmů apod. (Bartoš a Řípková, 2007; Fabiánová 2008; Jiráček, 2008).

DAT má průběh progredientní, progresse může být téměř lineární a bez větších krátkodobých výkyvů. Pokud jsou tyto výkyvy přítomny, bývá to většinou v důsledku příměsí vaskulární patologie či interkurentních somatických onemocnění, včetně dehydratace nebo vlivu nevhodné medikace. Relativně brzy se připojují poruchy aktivit denního života, jejichž stupeň obvykle odpovídá stupni demence. V počátečních stádiích zapomínají postižení pouze složitější aktivity, s progresí demence však degradují i jednodušší aktivity a u těžkých demencí jsou postiženy i aktivity naprosto bazální (Jiráček, 2008).

U DAT se také vyskytují tzv. behaviorální a psychologické příznaky demence. V pozdních stádiích DAT bývají postižení nesoběstační, zcela odkázáni na pomoc druhých (Jiráček, 2008).

DAT trvá průměrně od počátku příznaků do exitu asi 7 – 10 let. V některých případech postižení přežívají déle než 15 let, jindy umírají časně – do tří let od objevení se prvních příznaků (zejména u geneticky podmíněných forem s časným začátkem; Jiráček, 2008).

Alzheimerovští pacienti umírají v důsledku neurodegenerace jako základní příčiny smrti na bronchopneumonie, úrazy. Hypoteticky dochází k selhání neurohumorálního řízení homeostázy, k selhání adaptace organismu a imunitní odpovědi. Pacienti někdy umírají na úrazy, které by neutrpěl stejně starý člověk bez přítomnosti DAT

(Jirák, 2008).

3.3 Diagnostika demence Alzheimerova typu

Nejprve je nutné stanovit diagnózu demence. K této diagnóze se využívá jednak psychologické vyšetření s využitím diagnostických kognitivních a behaviorálních stupnic a dalších neuropsychologických škál a dále se využívá i vyšetření laboratorní a zobrazovací (Kupka a spol., 2000; Jirák, 2008).

Jako screeningový test je nejčastěji používán MMSE (Mini-Mental State Examination), tento test ovšem není vždy spolehlivý. Může poskytovat především falešně negativní výsledky. Test kreslení hodin (Clock – drawing test) je pro DAT specifitější, avšak ani ten není jednoznačně specifický. Užitečné jsou složitější testy kognitivních funkcí, především ADAS – cog (Alzheimer disease assessing test – kognitivní složka).

Diagnosticky důležitý je průběh a klinický obraz demence – pomalá progresse, lineární progresse deteriorace, poruchy epizodické paměti jako iniciální poruchy poznávacích funkcí a postupně i dalších složek paměti, časný úpadek osobnosti aj. (Jirák, 2008)

Z morfologických zobrazovacích metod se k diagnostice používá transmisní výpočetní tomografie (CT) a zobrazení nukleární magnetickou rezonancí (MRI), z funkčních pak pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní tomografie (SPECT). Funkční zobrazovací metody sledováním distribuce vhodných indikátorů označených radioaktivními zářiči mohou poskytnout informaci o regionálním průtoku krve mozkem, regionálním metabolismu určitých mozkových struktur, zejména metabolismu glukózy a o distribuci a hustotě neuroreceptorů v postižených oblastech mozku. Využití funkčních zobrazovacích metod je založeno na zjištění, že u nemocných s DAT je vedle globální atrofie mozku pozorována v pozdních stádiích i atrofie temporálních laloků, zejména redukce počtu neuronů v hipokampální oblasti, která je úměrná postižení paměťových funkcí, ale zřejmě s větším časovým předstihem i změnám metabolismu a krevního průtoku. Vedle toho lze ovšem předpokládat i postižení neurotransmitterových systémů v určitých oblastech mozku (Kupka a spol., 2000).

Pro potvrzení diagnózy jsou dále využívány laboratorní vyšetření. Pomocí biochemických ukazatelů by bylo užitečné sledovat průběh nemoci, odpověď

na léčbu nebo určovat stadium onemocnění. Mozkomíšni mok jako tekutina v těsném kontaktu s CNS odráží biochemické změny mozku. Hlavními markery jsou změny poměru některých proteinů v mozkomíšním moku oproti kontrolním non-alzheimerovským osobám: zvýšená hladina tau- a fosforylovaného tau-proteinu, snížená hladina A β 42. Koncentrace celkového beta-amyloidu v mozkomíšním moku u pacientů s DAT a kontrolní skupinou byla podobná. Detailnější výzkum ukázal, že různé izofomy beta-amyloidu mohou podle délky aminokyselinové sekvence lépe rozlišovat nepostížené od nemocných. U pacientů s DAT byla zjištěna, na rozdíl od zdravých jedinců a pacientů s jinými neurodegeneracemi, snížená hladina A β 42 v mozkomíšním moku asi na polovinu. Koncentrace tau-proteinu v mozkomíšním moku je v průměru asi 3x zvýšená u pacientů s DAT oproti kontrolní skupině. Zvýšené hodnoty tau-proteinu jsou i Jakob-Creutzfeldtovy choroby a po iktu, což jsou však onemocnění snadno odlišitelná klinicky. Existuje celá řada dalších markerů DAT, které jsou však méně specifické než uvedené předchozí markery (Bartoš a Řípková, 2007; Bartoš a Řípková, 2008; Jiráček, 2008).

3.4 Léčba demence Alzheimerova typu

Vlastní farmakoterapii demencí, včetně DAT, lze rozdělit na farmakoterapii kognitivních funkcí (paměť, vnímání, pozornost aj.) a na farmakoterapii ostatních funkcí (poruch chování, emocí, spánku, léčbu přidružených delirií apod., často se zde používá souhrnného označení „behaviorální“ funkce (Fabiánová, 2008).

Současná léčba DAT se zakládá na oddálení progresu jejich symptomů zejména podporováním cholinergní neurotransmise. Centrální cholinergní systém lze pozitivně ovlivnit několika mechanismy vedoucími ke zvýšení nabídky molekul Ach k vazbě na receptory:

- **Podávání nepřímých cholinomimetik (inhibitorů cholinesteráz, IChE).**
- **Podávání prekurzorů acetylcholinu.**
- **Podávání přímých agonistů muskarinových a nikotinových receptorů.**
- **Podávání látek nepřímo ovlivňujících cholinergní systém pomocí ovlivnění jiných neurotransmiterových systémů.**
- **Podávání dalších látek, např. léčiv zlepšujících vstup cholinu do neuronů, syntézu a uvolnění acetylcholinu.**

Z léčiv se u DAT v současné době nejvíce uplatňují IChE, jejichž účinek byl prokázán kontrolovanými klinickými studiemi a spočívá zejména ve zpomalení progresu demence a v prodloužení soběstačnosti pacienta. V současné době je v ČR (podobně jako ve většině států Evropy) používán donepezil, rivastigmin a GAL, další látky jsou klinicky zkoušeny. IChE jsou indikovány u lehkých až středně těžkých forem onemocnění, pro těžší stadia je pak indikován antagonist glutamátových NMDA receptorů memantin (Brunovský, 2007; Sheardová a spol., 2007; Fabiánová, 2008).

3.4.1 Podávání nepřímých cholinomimetik (inhibitorů cholinesteráz)

Jedná se o prozatím a – vedle memantinu - neúčinnější typ farmakoterapie u DAT a DLB. Zablokováním enzymu AChE dojde k delšímu přežívání molekul Ach, a tím se zvyšuje jejich možnost vázat se na mAChR a nAChR. Principem IChE je kompetice s Ach na molekule AChE (Ellis, 2005; Klafki a spol., 2006; Fabiánová, 2008).

Existují tři typy inhibice acetylcholinesterázy:

- *Reverzibilní* – inhibitor nebo jeho aktivní metabolit vytváří s molekulou AChE reverzibilní komplex, který trvá tak dlouho, dokud je inhibitor nebo jeho aktivní metabolit přítomen v plazmě.
- *Ireverzibilní* - dochází ke vzniku komplexu AChE - inhibitor, tento komplex je již trvalý, nedochází k uvolnění takto inhibované AChE.
- *Pseudoireverzibilní* - dochází ke kompetitivnímu vytěsnění molekuly Ach z vazebného místa enzymu inhibitorem a ten je pak sám AChE odbouráván. Po jeho odbourání se molekula enzymu funkčně obnoví, působení inhibitoru však trvá déle než jeho přítomnost v plazmě (Fabiánová, 2008).

Požadavky na inhibitory acetylcholinesterázy:

- Musí procházet přes hematoencefalickou bariéru.
- Neměly by ovlivňovat periferní cholinesterázy (hrozí nežádoucí účinky)
- Měly by být schopny ovlivnit obě izoformy AChE, G2 i G4.

Po podávání terapeutických dávek IChE v klinických studiích došlo ve srovnání s placebem k přechodnému zlepšení kognitivních funkcí. Toto zlepšení je individuální

u různých pacientů a trvá asi půl roku až rok, kdy dosáhne výchozí úrovně před zahájením léčby. Poté se kognitivní výkonnost dostává pod tuto úroveň, ale klesá pomaleji než po placebo (Fabiánová, 2008).

Nežádoucí vedlejší účinky IChE jsou odvozeny především od toho, že tyto látky do určité míry nespecificky ovlivňují i periferní cholinesterázy. Mezi nežádoucí účinky patří nechutenství, nauzea, zvracení, úbytek na váze, křeče a bolesti hlavy aj. (Fabiánová, 2008)

Výskyt nežádoucích účinků v akutní fázi léčby lze snížit jednak pozvolným zvyšováním (titrací) dávky, dále je lze ovlivnit některými dalšími faktory. Ke snížení vede například podání s jídlem nebo krátce po jídle, rovněž nemocní mužského pohlaví a nemocní s vyšší hmotností mají menší výskyt akutních nežádoucích účinků (Fabiánová, 2008).

Absolutní kontraindikací podání IChE je vředová choroba gastroduodenální a těžší poruchy převodního systému srdečního (Fabiánová, 2008).

IChE pozitivně ovlivňují jak kognitivní funkce, tak i funkce behaviorální. Tyto látky nemoc nezastavují, avšak jejich podání prodlužuje aktivní období pacienta, tedy období lehké demence, kdy je nemocný ještě relativně soběstačný a nezatěžuje tolik svoji rodinu a jiné pečovatele (Fabiánová, 2008).

Rozdělení inhibitorů cholinesteráz podle chemického složení:

- Karbamátové deriváty
- Akridinové deriváty
- Piperidinové deriváty
- Inhibitory ze skupiny alkaloidů

Karbamátové deriváty

Jsou to látky, které pseudoireverzibilně inhibují AChE. Do této skupiny patří *rivastigmin (Exelon®)*. Inhibuje obě mozkové izoformy AChE i BuChE, avšak inhibice AChE je v CNS 10násobně mohutnější ve srovnání s periferií. Rivastigmin rovněž stimuluje aktivitu CAT, zvyšující syntézu Ach. Není biotransformován v játrech a neinteraguje s cytochromovým systémem, je biotransformován přímo

cholinesterázami, má tedy málo lékových interakcí na úrovni biotransformace. *Rivastigmin* je indikován u mírných až středně těžkých forem DAT a DLB (Švestka, 1999 b; Fabiánová, 2008).

Akridinové deriváty

Jde o látky účinné, avšak s významnými nežádoucími účinky. AChE inhibují reverzibilně. *Tacrin* (*tetrahydroaminoakridin*) byl klinicky účinný (*Cognex*[®]), ovšem pro svoji hepatotoxicitu byl stažen z klinického užití. Výrazněji než vlastní AChE inhiboval BuChE. U nás vyvíjený *7-methoxytacrin* vykazoval menší hepatotoxicitu, jeho vývoj však nebyl dokončen. Zkoušejí se další akridinové deriváty (Fabiánová, 2008).

Piperidinové deriváty

Reverzibilně inhibují obě mozkové izoformy AChE, podstatně neinhibují BuChE. *Donepezil* (*Aricept*[®]) je ve světě nejužívanějším IChE. Má dlouhý biologický poločas eliminace, což umožňuje dávkování jedenkrát denně. Biologická využitelnost *donepezilu* se blíží 100% s vrcholem koncentrace v plazmě za 2 - 4 hodiny po perorálním podání. Váže se na plazmatické bílkoviny (albumin a α_1 -kyselý glykoprotein) a má dva aktivní metabolity. Je biotransformován v játrech cytochromem P-450, izoenzymy CYP 2D6 a 3A4 a poté glukuronidován. Má velmi málo lékových interakcí. *Donepezil* je používán u mírných až středně těžkých forem DAT a u DLB. Dalšími účinky *donepezilu* jsou: nepřímá stimulace mAChR a nAChR zvýšenou koncentrací Ach v synapsích CNS, zvýšení extraneuronální koncentrace noradrenalinu a příp. dopaminu, snížení průniku kyslíkových radikálů membránami neuronů a zlepšení metabolismu glukózy v CNS (Mayeux a Sano, 1999; Švestka, 1999 a; Fabiánová, 2008).

Inhibitory ze skupiny alkaloidů

Tyto látky reverzibilně inhibují AChE. *Huperzin A* je alkaloid získaný z čínského rašeliníku *Huperzia errata* a tradičně se využívá v čínské medicíně. Bylo s ním provedeno několik klinických studií, které potvrdily, že jde o perspektivní látku. Další látkou ze skupiny alkaloidů je GAL (*Reminyl*[®], viz samostatná kapitola; Fabiánová, 2008)

Tabulka 2: Inhibitory acetylcholinesterázy (Fabiánová, 2008)⁶

léky (u nás dostupné)	Donepezil (Aricept®)	Rivastigmin (Exelon®)	Galantamin (Reminyl®)
na trhu (rok)	1997	1998	2000
selektivita inhibice AChE	vysoká	vysoká (G1 forma)	vysoká
chemická skupina	piperidiny	karbamáty	alkaloidy
inhibované enzymy	AChE	AChE BuChE	AChE
charakter inhibice AChE	reverzibilní	pseudoireverzibilní	reverzibilní
ovlivnění nACh receptorů	ano	?	ano: alosterická modulace
T1/2 (hod)	70-80	12	5-8
hepatální metabolismus	P4502D6+3A4	0, nejsou lékové interakce	P4502D6+3A4
denní dávka (mg)	5-10	6-12	20-40
titrace účinné dávky	ne	ano	ano
schéma dávkování	1 x denně	2 x denně	2 x denně

⁶ V mozku pacientů s DAT dochází k degeneraci cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti, k poklesu celkového množství Ach, korové AChE a CAT, zvýšení BuChE a ke ztrátě nAChR a mAChR.

Tabulka 3: Vztah mezi cholinergní aktivitou v centrálních a periferních lokalitách a nežádoucími účinky spojenými s užíváním inhibitorů cholinesteráz při léčbě demence. (upraveno podle: Brunovský, 2006)⁷

oblast cholinergní aktivity	nežádoucí účinky	Rivastigmin (Exelon®)	Donepezil (Aricept®)	Galantamin (Reminyl®)
centrální				
hypothalamus (area postrema)	gastrointestinální (nevolnost, zvracení)	+++	++	++
nc. caudatus	extrapyramidové symptomy	+/-	++	+/-
mozkový kmen	poruchy spánku	+/-	++	+/-
medulla oblongata (kardiorespirační centra)	kardiovaskulární a respirační	+/-	+	+
frontální/temporální lalok	neklid	+	++	++
periferní				
periferní inhibice	bradykardie a změny EKG	+/-	+	+
periferní nervosvalová ploténka	svalové křeče a slabost	+/-	++	+/-
močový měchýř	močová inkontinence	+/-	+	+/-

3.4.2 Podávání prekurzorů acetylcholinu

Samotný Ach je po parenterálním podání velmi rychle odbourán, proto ho nelze terapeuticky využít. Cholin neprochází v dostatečném množství hematoencefalickou bariérou, navíc může působit depresogenně. Netvoří se v neuronech, ale vzniká v CNS z látek, které jej obsahují jako je např. fosfatidylcholin. Proto se v terapii využívají látky obsahující fosfatidylcholin, především *lecitin*. Účinek těchto látek v léčbě DAT typu a dalších demencí je však sporný. Diskutován je zejména dostatečný prostup přes hematoencefalickou bariéru. U nás se používají různé formy *sojového lecitinu* nebo *cholin alfoscerát*. U těchto látek však nebyl prokázán kontrolovanými klinickými studii léčebný efekt. Užívají se tedy spíše jako dietetické přípravky nebo pomocná léčiva při základní terapii IChE (Fabiánová, 2008).

⁷ Cholinergní aktivita: +/- malá či žádná; + mírná; ++ střední; +++ silná

3.4.3 Podávání přímých agonistů muskarinových a nikotinových receptorů

Tato léčebná strategie není dosud běžně používána, jde však o velmi perspektivní terapii, kdy jsou zkoumány agonisté obou typů receptorů. U dosud zkoušených muskarinových agonistů brání jejich klinickému použití vysoký výskyt nežádoucích účinků, přestože byla prokázána jejich účinnost na kognitivní funkce. Byly zkoušeny např. *oxotremorin*, *arecolin*, *xanomelin*. V současnosti je vlastně využíván pouze GAL jako agonista nikotinových receptorů (viz samostatná kapitola, Fabiánová, 2008).

3.4.4 Podávání látek ovlivňujících cholinergní systém pomocí ovlivnění jiných neurotransmiterových systémů

Tento přístup je zatím ve stadiu klinického zkoušení, je však pravděpodobně perspektivní. Jedná se např. o zkoušení některých β -karbolinů. Tyto látky jsou částečnými blokátory receptoru typu GABA_A. Systém γ -aminomáselné kyseliny je inhibiční a na svých synapsích s cholinergním systémem jej tonicky inhibuje. Některé β -karboliny tuto tonickou inhibici cholinergního systému blokují. Do klinické praxe dosud nebyly zavedeny pro vysoký počet nežádoucích účinků (Fabiánová, 2008).

3.4.5 Podávání dalších látek, např. látek zlepšujících vstup cholinu do neuronů, syntézu a uvolnění acetylcholinu.

Jedná se o chemicky a farmakologicky nejednotnou skupinu látek. V terapii DAT ani jiných demencí zatím nenašla výraznější uplatnění. Výsledky klinického zkoušení jsou nejednoznačné. Patří sem i L-CAR (viz samostatná kapitola, Fabiánová, 2008).

Další možnosti léčby demence Alzheimerova typu představují např.:

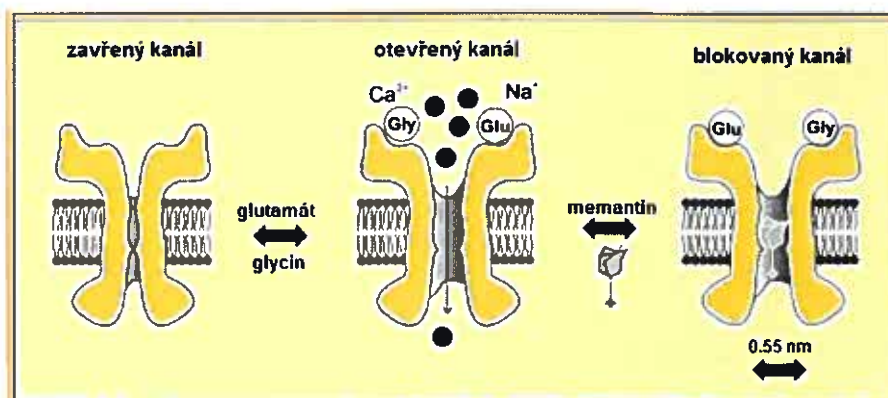
- **Látky zlepšující narušenou glutamátergní transmisi**
- **Neurotrofické růstové faktory**
- **Snížení buněčné reakce na neurodegeneraci**
- **Léky snižující oxidativní stres**
- **Látky zlepšující mozkový metabolismus**

3.4.6 Látky zlepšující narušenou glutamátergní transmissi

S postupující progresí DAT dochází k postižení mozkového systému excitačních aminokyselin (zejména glutamátu). Tento systém patří v rámci CNS mezi nejrozšířenější, je např. velmi významný pro mechanismy učení a paměti. Ionotropní receptor typu NMDA zprostředkovává v součinnosti s tzv. AMPA/kainátovým receptorem mechanismus LTP – při opakovaném působení stejného podnětu je každý následný postsynaptický potenciál větší než předchozí. Toto je jeden ze základních mechanismů učení a paměti. Podráždění NMDA receptorů je spojeno s otevřením kalciových kanálů a se zvýšeným vstupem iontů vápníku do neuronů. Pro paměť je nezbytná správná funkce glutamátergního systému. U DAT typu i u dalších neurodegenerativních a cerebrovaskulárních onemocnění dochází k nadměrnému uvolňování molekul glutamátu i dalších excitačních kyselin, a tím k nadměrnému vstupu kalcia do buňky. Na receptorové úrovni pak dochází k výskytu přenosových šumů, které znemožňují fyziologický přenos signálů. Tím je narušen mechanismus LTP. Navíc nadměrným influxem iontů kalcia dochází k aktivaci řady intraneuronálních enzymů (především proteinkináz a fosfatáz), k destabilizaci vnitřního prostředí neuronů, k aktivaci patologických genů včetně genu pro apoptózu – programovanou buněčnou smrt a neurony ve zvýšené míře zanikají (Klafki a spol., 2006; Fabiánová, 2008).

Terapeuticky užitečné jsou proto parciální inhibitory NMDA receptorů, které brání výše uvedeným jevům. V praxi je zatím používána jediná látka této skupiny, *memantin* (*Ebixa*[®]). *Memantin* je parciální, nekompetitivní, antagonist napěťově závislých NMDA receptorů, který blokuje účinek glutamátu. Předpokládá se, že u nemocných s DAT působí neuroprotektivně snížením influxu kalcia do buněk (a tak brání apoptóze) a zlepšuje i mechanismus LTP v procesu učení a paměti. *Memantin* je tricyklický primární amin, chemický název 1-amino-3,5-dimethyladamantan. Patří do skupiny aminoadamantanů - organických látek vyznačujících se tricyklickou strukturou (viz obr. 15). V *in vitro* studiích bylo prokázáno, že se memantin váže i na jiné typy receptorů, např. nAChR či 5-HT₃ receptory, ale tyto typy interakcí nejsou pro jeho farmakologický účinek příliš významné. Léčivo se podává *per os* a je obecně velmi dobře tolerováno. Může se kombinovat s IChE i dalšími farmaky. Bylo prokázáno synergické působení *memantinu* a IChE. *Memantin* je určen především k léčbě středních až těžších (ne však pokročilých

až terminálních) stadií DAT a příbuzných demencí. V současné době je jedinou schválenou látkou pro léčbu střední až těžší formy demence u DAT v Evropě a Spojených státech (Patočka, 2002; Petrovič a spol., 2004; Klafki a spol., 2006; Sheardová a spol., 2007; Fabiánová, 2008; Konrád, 2008; Patočka a Dvořák, 2008).

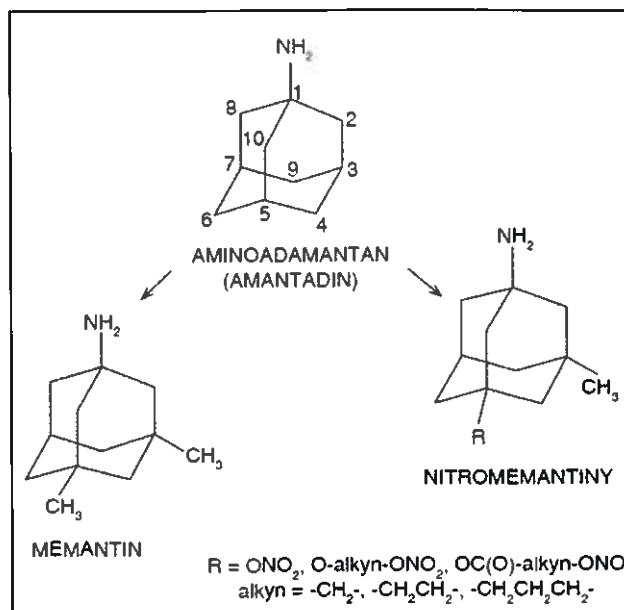


Obrázek 13: Blokáda iontových kanálů NMDA receptorů memantinem⁸ (upraveno podle: Petrovič a spol., 2004).

Skutečnost, že nitroglycerin, jako zdroj NO reguluje nepříměnou aktivitu NMDA receptoru vedl k myšlence, že by *memantin*, který funguje jako antagonist NMDA receptorů, mohl zvýšit svou neuroprotektivní účinnost, kdyby se stal ještě zdrojem NO (nitroglycerin sám není vhodné neuroprotektivum). Nadměrná aktivita NMDA receptoru může být totiž snížena nitrosylací – tento fakt vedl k nápadu připravit léky nazvané nitromemantiny. Jako S-nitrosylace se označuje vznik S-nitrosothiolů (-SNO) kovalentní vazbou cysteinových zbytků proteinů s NO. Nitrosylační místa jsou lokalizována na N-terminálním konci extracelulární domény NMDA receptoru a S-nitrosylace sulfhydrylové skupiny cysteinu sice omezuje prostupnost kanálu pro ionty, ale zcela jej neuzavírá. Na NMDA receptoru existuje 5 cysteinových zbytků, které mohou reagovat s NO. Předběžné studie ukazují, že nitromemantiny mají větší neuroprotektivní účinek než samotný memantin. K tomu, aby se dostaly k pacientům,

⁸ Iontový kanál NMDA receptoru je v nepřítomnosti agonisty vždy uzavřený. V důsledku vazby agonistů (glutamátu a N-methyl-D-aspartátu) dochází ke konformačním změnám, které mohou vyústit v otevření kanálu. Tím prochází podél elektrochemického gradientu (tj. do nitra buňky) ionty Na⁺ a Ca²⁺. Tento tok iontů vede k depolarizaci a zvýšení intracelulární koncentrace Ca²⁺. Memantin vstupuje do iontového kanálu podobně jako Na⁺ a Ca²⁺. Vzhledem ke své velikosti, která je větší než pór iontového kanálu (0,55 nm), však nemůže projít a blokuje průchod Na⁺ a Ca²⁺ kanálem.

je však třeba vykonat ještě mnoho výzkumné práce, pokud se tak vůbec někdy stane (Patočka a Dvořák, 2008).



Obrázek 14: Strukturální vzorce aminoadamantanu, memantinu a patentované skupiny nitromemantinu (Patočka a Dvořák, 2008).

Další látky užívané ke zlepšení kognitivních funkcí nemají účinnost již tak přesvědčivě dokázanou jako IChE a *memantin*. Jejich použití není již jednoznačně založeno na dostatečných důkazech zejména ve formě kontrolovaných klinických studií, někdy je spíše empirické (Fabiánová, 2008).

3.4.7 Neurotrofické růstové faktory

Tyto mozkové hormony slouží v dospělosti k reparativním procesům v mozku, podílejí se na neuronální plasticitě, na tvorbě dendritických trnů, a tím nových synapsí. U různých demencí bývá zjištěn úbytek nervových růstových hormonů nebo jejich receptorů v důsledku sníženého počtu neuronů. NRF je prototypem neurotrofického růstového faktoru, má proto úzkou vazbu k udržování funkce cholinergního systému bazálních partií předního mozku. Cholinergní neurony předního mozku jsou jediné buňky mozku dospělého člověka, které exprimují velké množství nízkoafinitních receptorů p75 pro NRF. NRF zvyšuje množství hipokampálního Ach a zpomaluje úbytek cholinergních buněk a atrofii po lézích fornixu, což je důkazem prospěšnosti NRF jako neuroprotektiva pro buňky bazálních partií předního mozku a nemocných s DAT. Nervové růstové hormony jsou proteiny, obvyklý způsob podání není často možný, mj. pro jejich nedostatečnou průchodnost

hematoencefalickou bariérou. Nadějný je vývoj přípravků, působících uvolnění nervových růstových hormonů prostřednictvím tyrosinkinázových (Trk) receptorů. *Selegilin* je inhibitor monoaminoxidázy B s antioxidačním účinkem. Působí rovněž jako uvolňovač NRF nebo sám působí jako růstový faktor v tkáňových kulturách. *In vivo* však tento efekt zatím dokázán nebyl (Mayeux a Sano, 1999; Fabiánová, 2008).

Nadějnou cestou vedoucí k zvýšení hladiny NRF a ke zlepšení trofiky mozku je implantace embryonálních kmenových buněk, ale tato metoda je teprve ve stadiu preklinického výzkumu (Fabiánová, 2008).

3.4.8 Snížení buněčné reakce na neurodegeneraci

V mozku nemocných s DAT dochází ke změnám buněk mikroglie, zvyšuje se jejich počet a roste jejich velikost. Tento fakt a přítomnost komplementu v plakách amyloidu vedlo k rozpracování koncepce zánětlivého původu DAT. Bylo publikováno, že osoby užívající protizánětlivé léky skupiny nesteroidních antirevmatik mají menší počet buněk mikroglie a méně často se u nich vyvine DAT. V klinických studiích však bylo prokázáno pouze slabé zlepšení kognitivních funkcí u nemocných s mírnou formou DAT (Fabiánová, 2008).

3.4.9 Léky snižující oxidativní stres

Mozek nemocného s DAT je pod vlivem těžkého oxidativního stresu. Jedná se o důsledek nadměrné tvorby kyslíkových radikálů (peroxydy, hydroxyskupina, singletový kyslík, NO) vzniklých vlivem A β , nebo následkem dysbalance vápníku v neuronech a jejich mitochondriích. Dochází k peroxidaci lipidů neuronálních membrán a k inaktivaci některých klíčových enzymů. Proto se látky vychytávající volné kyslíkové radikály, event. snižující možnost jejich vzniku (scavengery volných radikálů) používají jak preventivně, tak léčebně. Léky jako např. *alfa-tokoferol* (*E-vitamin*), *idebenon* nebo *estrogen* mají silné antioxidační účinky, jejich účinnost se liší. Přípravky obsahující selen mají také své teoreticky odůvodněné použití – selen je součástí přirozeného enzymu glutationperoxidázy, likvidujícího volné radikály. Inhibitor monoaminoxidázy B-typu, *selegilin*, snižuje tvorbu volných radikálů tím, že zabraňuje biodegradaci dopaminu. Je poměrně často používán v léčbě demencí. Toto použití je ale spíše empirické. Výsledky klinických studií však nepřinášejí uspokojivé důkazy efektivity těchto látek. Mezi další potenciální léčivo

DAT se řadí *kurkumin*. *Kurkumin* vykazuje antioxidační (interaguje se superoxidovým anionem a hydroxylovým radikálem a funguje jako scavenger volných radikálů) a protizánětlivé účinky (je inhibítozem COX-2), chrání hepatocyty a neurony před účinkem některých látek, má antibakteriální, antimutagenní a antialergenní účinky, zasahuje do procesu dělení buněk a apoptózy, inhibuje některé enzymy apod. Schopnost *kurkuminu* inhibovat peroxidaci lipidů je větší než u *alfa-tokoferolu*. *Kurkumin* má silný anti-amyloidogenní efekt. Inhibuje akumulaci A β v CNS (Fabiánová, 2008).

3.4.10 Látky zlepšující mozkový metabolismus

U demencí i lehkých poruch poznávacích funkcí bývá zjišťován defekt oxidativního mozkového metabolismu. Toto zjištění vedlo k zavedení tzv. zvyšovačů mozkového metabolismu (cerebral metabolic enhancers), jako jsou dihydrované námelové alkaloidy, ale především nootropní farmaka (zvyšují využití glukózy a kyslíku). Od užití dihydrovaných námelových alkaloidů se pro malou účinnost ustupuje. Rovněž se výrazně ustoupilo od užití vazodilatačních přípravků (např. od *klomethiazolu*) pro malou účinnost a možnost vyvolání tzv. fenomenu okradení („steal“ fenomén) v případě cévních mozkových lézí. V těchto případech jsou cévy v postižené oblasti paralytické, použitím vazodilatancí, se však rozšíří zdravé cévy v nepostižené oblasti, čímž paradoxně dojde k ještě většímu ochuzení postižené oblasti. Některé látky s vazodilatačním působením však mají i jiné efekty a jsou proto potenciálně užitečné. Zlepšují především mikrocirkulaci a reologické (průtokové) vlastnosti krve. Mezi tyto látky náleží např. *pentoxifyllin* (*Agapurin*[®], *Trental*[®]) nebo *nartidrofuryl* (*Enelbin*[®]). Jejich místo je především v terapii VaD, avšak použití je opět spíše empirické, nikoli založené na rozsáhlých kontrolovaných klinických studiích. Rozsáhlé klinické studie neprokázaly výraznější efekty nootropik v ovlivnění průběhu DAT. Nootropika se proto používají u jiných demencí, postkomočních a postintoxikačních stavů, u DAT a příbuzných demencí pak pouze jako podpůrná terapie (Fabiánová, 2008).

Nové možnosti léčby DAT otevírá existence kauzálních souvislostí mezi hyperfosforylací APP, tau-proteinu a jiných proteinů a degenerací neuronů. Na hyperfosforylacii se podstatným způsobem podílejí kinázy GSK-3b a p25/CDK5. Opakovaně se ukázalo, že jak inhibitory GSK-3b, tak inhibitory CDK5 stabilizují neurony a chrání je před programovanou buněčnou smrtí. GSK-3b lze reverzibilně

inhibovat ionty lithia, které také brání hyperfosforylaci tau-proteinu. Vzhledem k tomu, že jejich podávání se považuje za relativně bezpečné, je možno uvažovat i o jejich dlouhodobém využití v léčbě DAT. Dále byly popsány nízkomolekulární inhibitory GSK-3b, jako jsou *bis-indolylmaleimid* (není příliš specifický) a *hymenialdisin*. CDK5 inhibují prakticky všechny syntetické inhibitory, které selektivně zasahují podskupinu cyklin-dependentních kináz příbuzných CDK1. Jde o klasické inhibitory olomoucín, butyrolakton a flavopiridol, ke kterým nově přibyly další. Apoptózu lze odvrátit aplikací kteréhokoliv účinného inhibitoru p25/CDK5, včetně nových purinových derivátů olomoucínové řady. Největší naději však v současné době vzbuzují tzv. indirubiny a paullony, neboť výběrově zasahují jak GSK-3b, tak p25/CDK5. Očekává se, že z jejich výzkumu vzejdou nová terapeutika neurodegenerativních chorob. Dále se věnuje se pozornost specifické aktivaci fosfatáz, které by byly schopné odstranit zhoubné následky nadměrné fosforylace klíčových proteinů. Na jednom z čelních míst je vývoj specifických inhibitorů sekretáz odpovědných za štěpení APP a za tvorbu A β . Zvýšení stability buněk počítá také s vývojem selektivních inhibitorů calpainu (Veselý a spol., 2002; Klafki a spol., 2006).

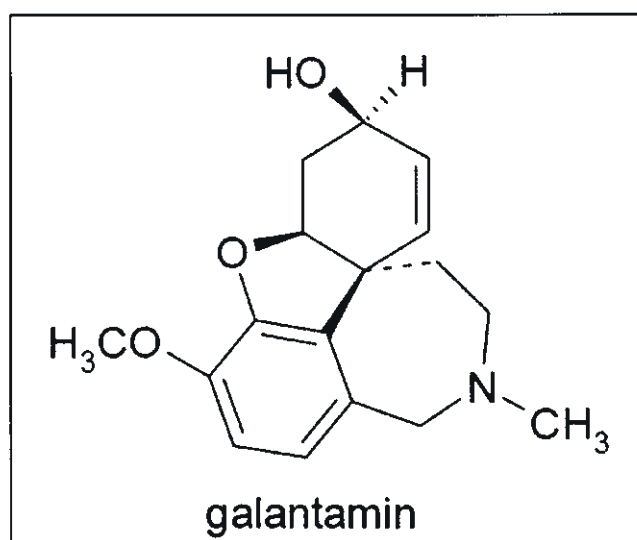
Kognitivní farmakoterapie DAT je jen jedna stránka léčby. Velmi důležitá je také nekognitivní farmakoterapie, léčba všech interkurentních somatických onemocnění, aktivace nemocného, reedukace především základních životních návyků a dovedností, ošetrovatelská péče a rehabilitace (Fabiánová, 2008).

4. Farmakologie galantaminu

Gal je terciární alkaloid, který byl původně izolován z cibulí sněženky *Galanthus woronowi* a později z dalších rostlin čeledi *Amaryllidaceae* (amarylkovité). Náhodně byl objeven bulharskými farmakology Proskurninou a Jakovlevem při izolaci z divokých sněženek počátkem padesátých let dvacátého století. Začátkem šedesátých let byl popsán inhibiční vliv GAL na AChE a v roce 1964 postup hematoencefalickou bariérou do CNS. V první polovině devadesátých let byla objevena jeho schopnost alosterické modulace nikotinových receptorů. V současné době je vyráběn synteticky (Jiráček, 2001; Švestka, 2004; Fabiánová, 2008).

GAL je strukturně velmi podobný kodeinu a podléhá stejným biotransformačním procesům. Některými klinickými studiemi bylo prokázáno signifikantní zlepšení kognitivních i nekognitivních symptomů DAT. Výhoda GAL oproti jiným inhibitorům AChE používaným v terapii DAT je jeho schopnost alostericky modulovat nAChR, což vede ke zvýšení množství Ach (Krejčová a Ševelová, 2003).

GAL inhibuje G2 a G4 izoformy cholinesteráz. Je rezistentní vůči hydrolýze. Pro jeho vazebné schopnosti, a tedy biologický účinek jsou v jeho molekule důležitá 4 místa: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina (Jiráček, 2001; Krejčová a Ševelová, 2003; Pidman a spol., 2003).



Obrázek 15: Struktura galantaminu (Krejčová a Ševelová, 2003).

Obměnou methoxyskupiny a terciální aminoskupiny (např. na kvarterní amoniovou sůl nebo hydrofilní sloučeniny) byly připraveny deriváty GAL, které vykazovaly větší inhibici AChE než samotný GAL. Tyto deriváty však byly polárnější než původní molekula, což bránilo jejich průniku do CNS, a tedy výrazně omezilo jejich použití. Nadějným derivátem GAL je jeho ester (acylovaná hydroxylová skupina v poloze 6) n-butylkarbamát GAL, který je méně toxický než GAL, méně polární a lépe tedy proniká do CNS (Krejčová a Ševelová, 2003; Pidrman a spol., 2003).

4.1 Farmakodynamika galantaminu

Cílovými místy účinku GAL v organismu jsou: nervosvalové spoje, centrální cholinergní synapse, periferní orgány inervované parasympatickými vegetativními vlákny (Krejčová a Ševelová, 2003).

Na cholinergní synapsi působí GAL dvěma mechanismy:

- Inhibuje kompetitivně a reverzibilně AChE, která biodegraduje Ach. Účinnost GAL je tedy závislá na koncentraci Ach. Čím je koncentrace Ach vyšší, tím je nižší inhibice AChE. GAL se váže na acetylové i cholinové vazebné místo. Inhibicí AChE brání GAL biodegradaci Ach, a tím se jeho koncentrace v synaptických štěrbinách zvyšuje. GAL je 50 - 60krát silnějším inhibitorem AChE než BuChE, avšak 10krát více inhibuje AChE v lidských erythrocytech než v CNS.
- Působí jako alosterický modulátor na presynaptických i postsynaptických nAChR (v CNS, svalech a gangliích), především podtypu $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 7$. V přítomnosti GAL je zvýšená vazebná afinita Ach na nAChR nebo i zvýšená propustnost kanálů odpovídající aktivovaným receptorům.

Tyto procesy mohou probíhat současně (Švestka, 2004; Krejčová a Ševelová, 2003).

Alosterické modulátory nAChR se neúčastní přenosových dějů přímo, nevyvolávají tedy na rozdíl od agonistů či antagonistů změny citlivosti nebo počtu receptorů. *In vitro* se GAL váže na místo nAChR, které je odlišné od vazebného místa pro agonisty Ach. Pokud se na nAChR naváže GAL a Ach zároveň, odpověď těchto receptorů na Ach se zesílí. Alostericky potencující ligandy, tedy samy o sobě nevyvolávají signifikantní odezvu. V přítomnosti přirozeného mediátoru však zvyšují

průchodnost iontových kanálů, a tak i potencují submaximální Ach indukované odpovědi. Aktivace presynaptických nikotinových receptorů způsobuje zvýšené uvolňování Ach a dále i glutamátu (zlepšení procesu učení a paměti), serotoninu (omezení emočních poruch, jako je úzkost a deprese), GABA (zajišťuje stabilní chování, např. odstraněním agresivity). Aktivací nikotinových receptorů na glutamátových neuronech dochází k uvolňování glutamátu, a ten prostřednictvím AMPA a NMDA receptorů stimuluje tvorbu neurotrofního růstového hormonu v buňkách hipokampu. Dlouhodobé podávání GAL zvyšuje počet nAChR v určitých oblastech mozku, které se podílejí na mechanismech učení a paměti. Jde především o oblast hipokampu a prefrontální kůry. Třetí složkou mechanismu působení GAL je jeho neuroprotektivní účinek. GAL zvyšuje koncentraci antiapoptotického elementu bcl-2, chrání buňky před toxicitou β -amyloidu a brání amyloidogenní cestě štěpení APP zakončené vznikem nerozpustného β -amyloidu. GAL je specifickým inhibitorem AChE, který minimálně ovlivňuje BuChE (Krejčová a Ševelová, 2003; Švestka, 2004).

4.2 Farmakokinetika galantaminu

GAL se rychle absorbuje z gastrointestinálního traktu, maximální koncentrace v krvi je dosaženo za 0,5 – 2 h po požití. Tato absorpce probíhá nezávisle na lékové formě (tableta, obdukovaná tableta, roztok). Jídlo neovlivňuje celkovou dostupnost GAL, ale zpomaluje jeho absorpci a snižuje maximální dosaženou hladinu v plazmě (C_{max}). Jeho biologická dostupnost představuje téměř 100%. Po vstřebání se GAL váže na plazmatické proteiny přibližně jen z 18%, jeho lipofilita umožňuje snadný průchod přes hematoencefalickou bariérou, takže hladina v CNS je 3x vyšší než v plazmě (Švestka, 2004; Krejčová a Ševelová, 2003).

Denní terapeutická dávka GAL pro léčbu DAT je obvykle 16 mg. Klinické studie prokázaly, že vyšší dávky kognitivní funkce pacientů již nezlepšují. GAL je jen mírně toxický, LD_{50} pro potkana je po p.o. podání 83,6 mg/kg.

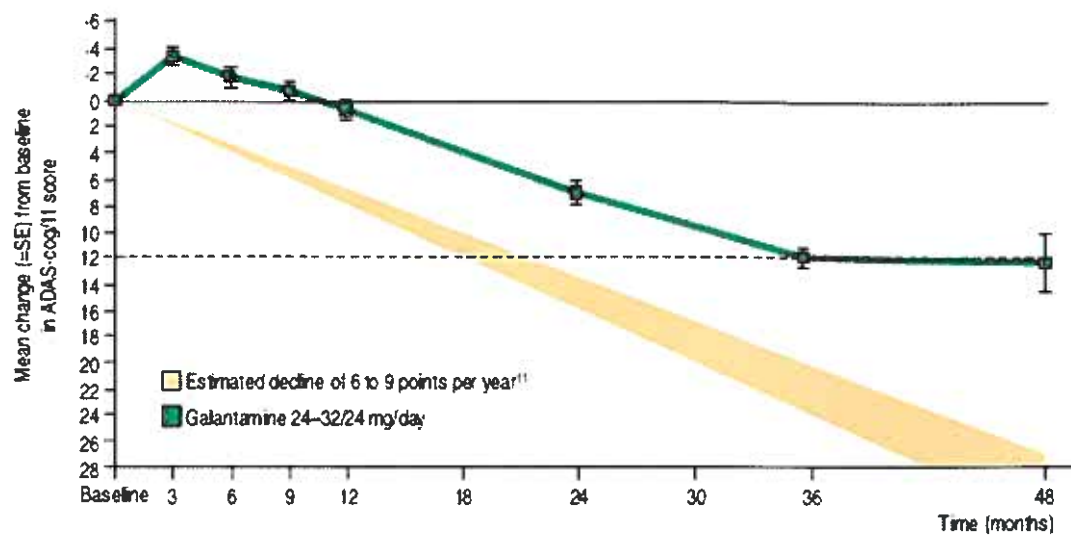
Nežádoucí účinky GAL souvisí s jeho cholinergními vlastnostmi. Řadí se mezi ně např. nevolnost, zvracení, závrať, bolest břicha, průjem, lehká bolest hlavy aj. Nežádoucím efektem je ztráta chuti k jídlu a redukce hmotnosti. Tyto účinky mohou být tlumeny antidoty. Po profylaktickém podání periferního antidota N-

methylskopolamin hydrobromidu byly nežádoucí účinky zřetelně sníženy (Krejčová a Ševelová, 2003).

GAL se metabolizuje v játrech pomocí izoenzymů CYP450D6 a 3A4 za vzniku jediného biologicky aktivního metabolitu norgalantaminu, jehož koncentrace v plazmě však dosahuje pouze 10 % mateřské látky a dále i několika inaktivních metabolitů. Biodegradace prostřednictvím CYP450 představuje 75 % podané dávky. GAL se eliminuje zejména močí, 18–22 % z podané dávky se vylučuje nezměněno. Biologický poločas činí asi 7–8 hodin. Hlavními biotransformačními cestami jsou N-oxidace, N-demetylace, O-demetylace, glukuronidace a epimerizace. Tímto způsobem se vytvářejí metabolity norgalantamin (jediný biologicky aktivní), O-demetylgalantamin, O-demetyl-norgalantamin, epigalantamin a galantaminon (všechny biologicky inaktivní, Švestka, 2004).

Žádná z dostupných studií neprokázala mutagenní či teratogenní účinek GAL. Po řadě klinických studií byl GAL zaregistrován pro léčbu DAT roce 2000 v některých zemích Evropské unie, v roce 2001 v USA a v České republice pod názvem Reminyl[®] firmy Janssen-Cilag. GAL je indikován u mírných až středně těžkých forem DAT (Jiráček, 2001; Švestka, 2004; Jiráček a Zemková, 2002; Krejčová a Ševelová, 2003).

Pro stanovení GAL v biologických materiálech mohou být využity různé metody, např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, kapilární zónová elektroforéza, průtoková injekční analýza, radioimunoanalýza nebo enzymoimunoanalýza (Krejčová a Ševelová, 2003).

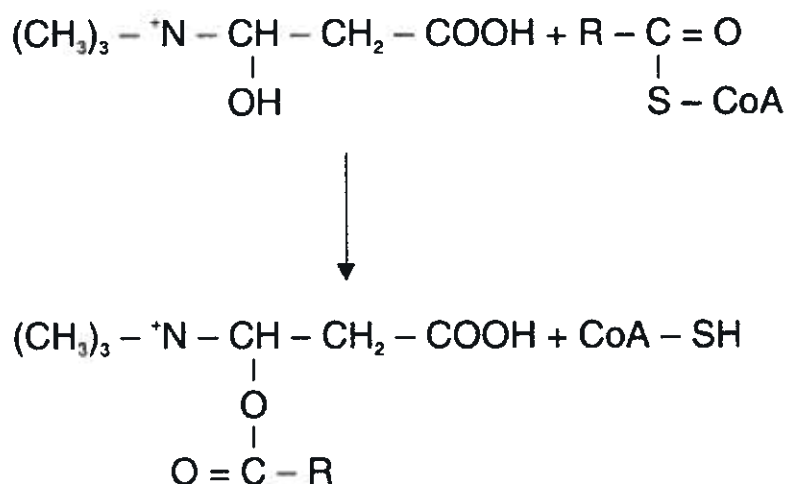


Obrázek 16: Efekt dlouhodobé léčby galantaminem⁹ (Franková, 2004).

⁹ Zelená křivka znázorňuje kognitivní pokles při léčbě GAL v průběhu čtyřleté léčby, oranžová křivka znázorňuje předpokládaný kognitivní pokles u nemocných bez léčby.

5. L-karnitin

L-CAR je přírodní látka vyskytující se ve tkáních savců. L-CAR je nepostradatelný pro produkci energie ve tkáních, které jsou závislé na beta-oxidaci mastných kyselin. Zprostředkovává transport mastných kyselin s delším řetězcem přes mitochondriální membránu do mitochondriální matrix, kde probíhá jejich oxidace a zajišťuje i zpětný transport toxických zbytků beta-oxidace. Z tohoto poznatku vyplývá zásadní význam pro energetický metabolismus buněk a tkání, které jsou závislé na získávání energie touto cestou (příčně pruhované svalstvo, myokard a další). Aktivace nižších mastných kyselin a jejich oxidace v mitochondriích může probíhat nezávisle na L-CAR. Cytoplazmatické mastné kyseliny s dlouhým řetězcem ve formě acyl-CoA se přeměňují na acylkarnitiny pomocí enzymu karnitinacyltransferázy-I, která je umístěna na vnější mitochondriální membráně. V této reakci je acylová skupina přemístěna z CoA na hydroxylovou skupinu L-CAR. Vzniklý O-acylkarnitin je transportován přes vnitřní mitochondriální membránu karnitinacyltranslokázou, která transportuje acylkarnitin dovnitř výměnou za L-CAR transportovaný ven. Uvnitř mitochondrie tento acylkarnitin reaguje s intramitochondriálním CoA za katalýzy karnitinacyltransferázou-II, která se vyskytuje na vnitřní straně mitochondriální membrány. Takto je v mitochondriální matrix opět vytvořen acyl-CoA a uvolněn L-CAR, který je opět karnitinacyltranslokázou přenesen do cytoplazmy (Pettegrew a spol., 2000; Vaz a Wanders, 2002; Cibulka, 2005; Svoboda a spol., 2005).



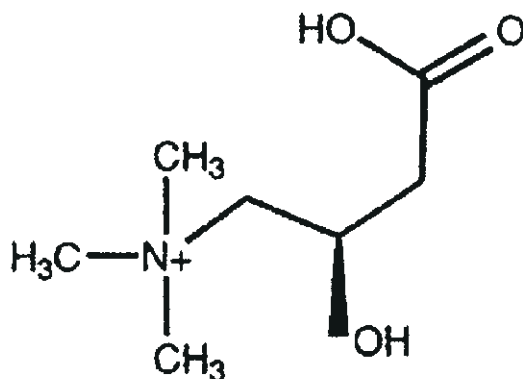
Obrázek 17: Reakce karnitinu s acyl-CoA za vzniku O-acylkarnitinu (Cibulka, 2005).

L-CAR neovlivňuje jen metabolismus mastných kyselin, ale také produkci energie z aminokyselin a sacharidů. Předpokládá se, že zvyšuje produkci energie z těchto

zdrojů zvýšením aktivity enzymových komplexů pyruvátdehydrogenázy a fruktokinázy v důsledku snížení intramitochondriálního poměru acetyl-CoA/CoA. Intramitochondriální pokles poměru acetyl-CoA/CoA stimuluje aktivitu pyruvátdehydrogenázového poměru, což vede ke zvýšené oxidaci glukózy. A právě tento poměr je regulován L-CAR, který tak rozhoduje, bude-li přednostně stimulována beta-oxidace mastných kyselin nebo oxidace glukózy. L-CAR tak moduluje přísun energie z různých oxidačních pramenů. Jeho další funkcí je odstraňování různých acylových zbytků z organismu. Je známo, že L-CAR zvyšuje přestup některých chemických látek přes biologické membrány a usnadňuje eliminaci některých xenobiotik (Herink a spol., 2001; Cibulka, 2005).

5.1 Chemická struktura L-karnitinu

Chemicky se jedná o kyselinu 3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselnou, což je nízkomolekulární látka podobná aminokyselinám s tím rozdílem, že atom dusíku je umístěn na 4. atomu uhlíku (v molekulách aminokyselin je aminoskupina umístěna na 2. uhlíku). Atom dusíku poskytuje čtyři vazby, proto se jedná o tzv. kvarterní amin. Atom dusíku nese kladný náboj. Molekula L-CAR obsahuje jeden asymetrický atom uhlíku, jedná se o třetí atom uhlíkatého řetězce. Látky s asymetrickým uhlíkem jsou obvykle opticky aktivní, tj. otáčejí rovinu polarizovaného světla. V přírodě se vyskytuje pouze levotočivý L-CAR, pouze tato forma je biologicky účinná. Pravotočivá forma, D-CAR, je nejen neúčinná, ale je i toxická, neboť kompetitivně inhibuje transportní systémy pro L-CAR, a způsobuje tak jeho nedostatek v buňkách. Při průmyslové výrobě by se proto mělo dbát na čistotu vyráběného L-CAR (Cibulka, 2005).

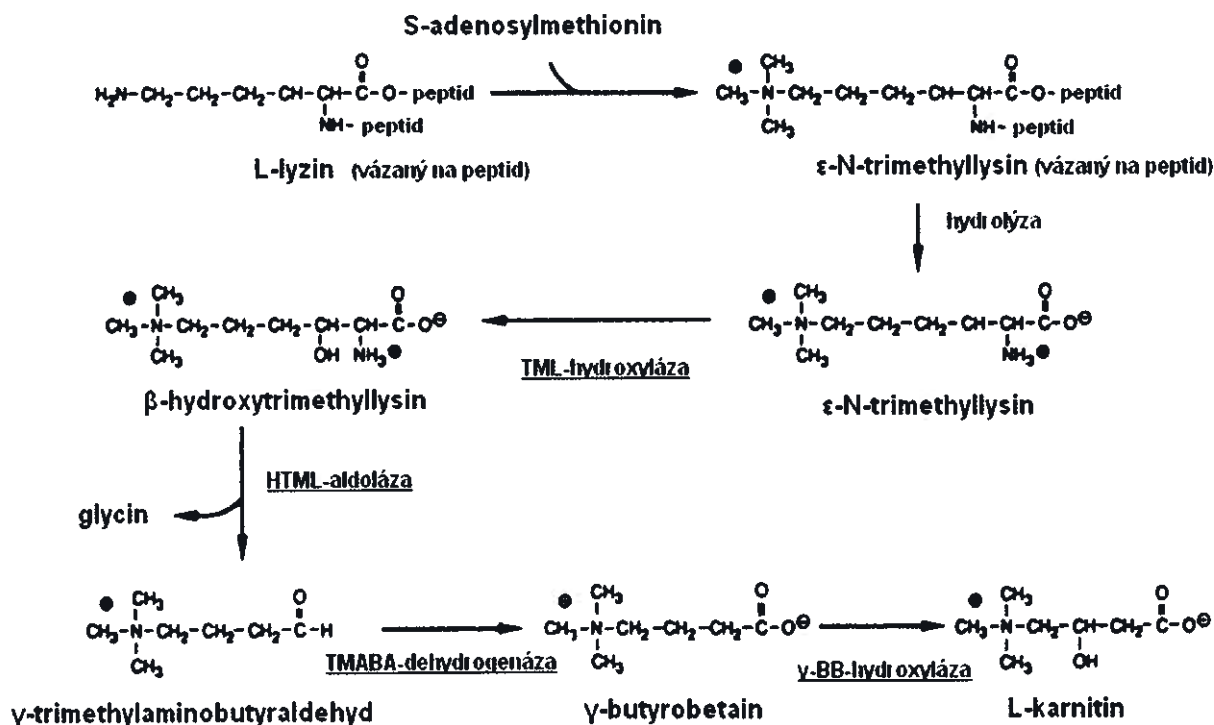


L-karnitin

Obrázek 18: Chemická struktura L-karnitinu (upraveno podle: Pettegrew a spol., 2000).

5.2 Syntéza L-karnitinu

L-CAR byl izolován ze zvířecího masa a jeho název pochází z latinského slova *caro-maso*. L-CAR je přijímán převážně z potravy, největší množství se vyskytuje v mase. Částečně je organismus schopen krýt svou potřebu endogenní syntézou, která probíhá v játrech, ledvinách a mozku. L-CAR je syntetizován ze dvou esenciálních aminokyselin lyzinu a methioninu. Lyzin poskytuje zdroj dusíku a uhlíkatý řetězec, zatímco S-adenosylmethionin dodává tři methylové skupiny. K jeho tvorbě je zapotřebí vitamin C, pyridoxin, niacin a železo. Nejprve dochází k metylaci lysinu S-adenosylmethioninem za účasti specifické lysinmethyltransferázy (ϵ -N-L-lysine methyltransferase) a vzniká ϵ -N-trimethyllysin (TML). Ten je dále hydroxylován v pozici beta TML-hydroxylázou na β -hydroxytrimethyllysin (HTML), který je rozštěpen HTML-aldolázou na γ -trimethylaminobutyraldehyd (TMABA) a glycin. TMABA je postupně oxidován TMABA-dehydrogenázou na γ -butyrobetain (γ -BB). V konečné fázi je γ -BB hydroxylován γ -BB-hydroxylázou v pozici beta a vzniká tak L-CAR (Pettergrew a spol., 2000; Vaz a Wanders, 2002; Cibulka, 2005; Yu Cao a spol., 2009).

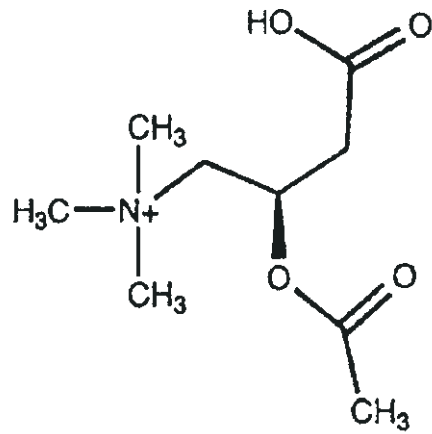


Obrázek 19: Syntéza L-karnitinu u savců (upraveno podle: Rebouche, 1991).

5.3 Farmakologie L-karnitinu

Střevní resorpce L-CAR přijatého potravou probíhá zejména v duodenu a jejunu, méně v ileu. L-CAR je absorbován z gastrointestinálního traktu pasivním a aktivním transportním mechanismem. Bylo zjištěno, že L-CAR je do buněk střevní sliznice relativně lehce přijat, ale pomalu je vydáván do oběhu. Po perorálním podání se plazmatická hladina zvýší až po 8 hodinách. Játra přijímají L-CAR cestou portálního oběhu a následně ho uvolňují do systémové cirkulace. L-CAR je malá, ve vodě rozpustná molekula, snadno se filtruje přes ledvinné glomeruly a z 95% je reabsorbován, zbytek se vylučuje ve formě acylkarnitinů močí. Jedná se o množství 100-300 $\mu\text{mol}/\text{den}$. Je-li překročen ledvinový práh při vysokých koncentracích v séru, např. při i.v. injekci, je L-CAR rychle vylučován močí. Renální reabsorpce má tedy významnou úlohu při udržování homeostázy L-CAR. Ve většině tkání je koncentrace L-CAR 20-50krát vyšší než v plazmě. Mezi buňkami jednotlivých tkání je velká variabilita v míře transportu L-CAR a z toho vyplývající rozdíly v jeho koncentraci. Transport závisí na extracelulární koncentraci sodíku, pravděpodobně jde o mechanismus společného transportu se sodíkem (ko-transport). Jedná se o sekundárně aktivní transportní systém, který přenáší L-CAR do buňky proti koncentračnímu gradientu (Pettergrew a spol., 2000; Vaz a Wanders, 2002; Cibulka, 2005).

Acetyl-L-karnitin je ester L-CAR a kyseliny octové. Acetyl-L-karnitin je intracelulárním přenašečem acetylové skupiny přes mitochondriální membránu, což podporuje uvolňování Ach, zvyšuje aktivitu CAT a má antioxidační účinky. Neváže se na plazmatické proteiny. Snadno proniká hematoencefalickou bariérou. Po i.v. podání stoupá hladina acetyl-L-karnitinu rychleji než L-CAR. Výsledky klinických studií u pacientů s DAT jsou však rozporuplné (Pettergrew a spol., 2000).



Acetyl-L-karnitin

Obrázek 20: Chemická struktura acetyl-L-karnitinu (upraveno podle: Pettegrew a spol., 2000).

6. Experimentální část

6.1 Uspořádání pokusu

V této rigorózní práci bylo k pokusům použito celkem 24 samců laboratorního potkana kmene *Wistar albino*, konvenčního chovu, krmených peletovanou standardní Larsenovou dietou a s přísunem vody *ad libitum*. Hmotnostní rozpětí zvířat se pohybovalo v rozmezí 195-230 gramů.

Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin po šesti jedincích:

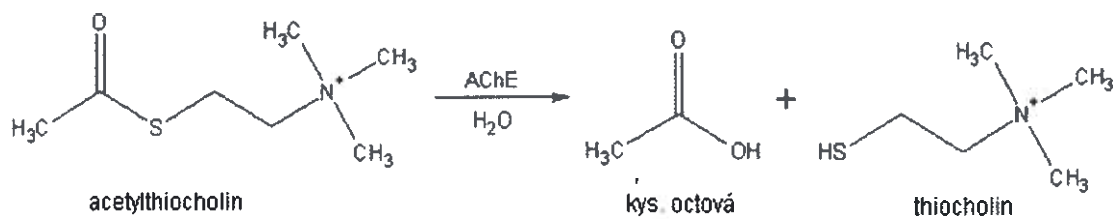
1. kontrolní skupině byl i.m. podán pouze fyziologický roztok v dávce 0,1 ml/100g hmotnosti
2. kontrolní skupině byl podán L-CAR v dávce 250 mg/kg p.o. v intervalu 24 hodin (tedy 3 po sobě následující dny)
3. kontrolní skupině byl podán GAL v dávce 10,0 mg/kg i.m.
4. pokusné skupině byl podán 3x L-CAR v dávce 250 mg/kg p.o. v intervalu 24 hod., 30 min. po podání poslední dávky L-CAR byl injikován GAL v dávce 10,0 mg/kg i.m.

6.1.1 Odběr vzorků mozku

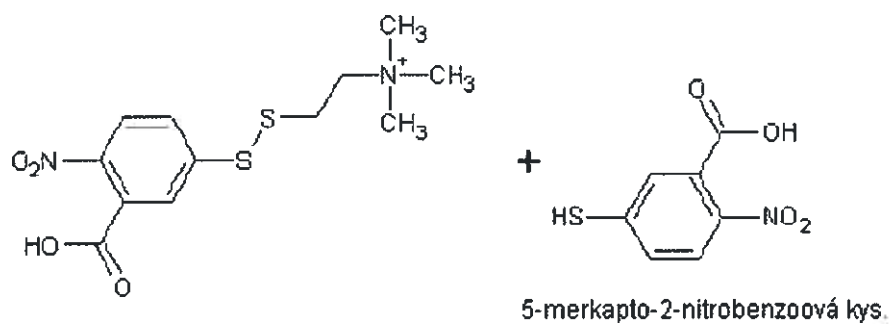
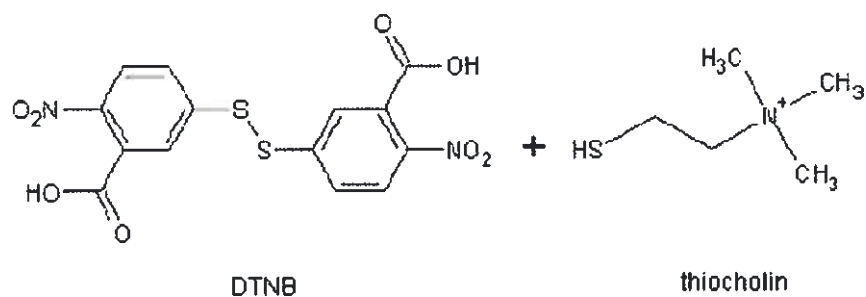
Zvířata byla usmrcena dekapitací za 30 minut po podání testované látky. Následovalo šetrné vyjmutí mozku a jeho bezprostřední zmrazení při nízké teplotě pro pozdější odběr vzorků (čelní korová oblast, hipokampus, septum, bazální ganglia a hypofýza).

6.1.2 Stanovení aktivity acetylcholinesterázy Ellmanovou metodou - princip metody

Jedná se o spektrofotometrickou metodu. AChE štěpí substrát – acetylthiocholin na thiocholin a kyselinu octovou. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB) a jeho zbytek – 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina, je fotometrován při 412 nm. (Ellman a spol., 1961; Bajgar, 1972)



hydrolýza acetylthiocholinu za katalýzy AChE



reakce thiocholinu s DTNB

Obrázek 21: Schéma reakce (upraveno podle: Zlámal, 2008)

6.1.3 Použité chemikálie a roztoky

- 0,2 M TRIS-HCl pufr: 24,2 g 1,1,1-tris-(hydroxymethyl)aminomethan se rozpustí v 1000 ml destilované vody. 50 ml tohoto roztoku se smíchá s 38,4 ml 0,2 M HCl, doplní se destilovanou vodou na 200 ml a pH se upraví na 7,6.
- DTNB – činidlo na SH- skupiny: 0,1 g DTNB se rozpustí v 50,0 ml 0,2 M TRIS pufru.
- Substrát: 0,029 g acetylthiocholin-jodidu se rozpustí v 10 ml destilované vody.
- Kalibrační roztok: vodný roztok cystein – HCl v koncentracích od $1 \cdot 10^{-4}$ do $5 \cdot 10^{-6}$ M.
- Vzorek pro měření: homogenát řezů příslušných vzorků tkáně laboratorního potkana - 1 mg mozkové tkáně/1 ml destilované vody.

6.1.4 Použité přístroje

Univerzální spektrofotometr, skleněné kyvety.

6.1.5 Pracovní postup

Z řezů příslušných vzorků tkáně laboratorního potkana (frontální kůra, hipokampus, septum, bazální ganglia a hypofýza) byl připraven homogenát (1 mg mozkové tkáně/1 ml destilované vody). Do kyvety bylo k 1 ml homogenátu přidáno 0,4 ml DTNB a 0,4 ml TRIS pufru. Reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Fotometruje se při 412 nm a registruje se změna absorbance. Z hodnot absorbance bylo odečítáno a zaznamenáváno odpovídající množství SH- skupin v reakční směsi. Pro kalibraci byl místo místo homogenátu použit roztok různých koncentrací cysteinu.

ERRATA

str. 73 doplnit: výrobce GAL – ICN Biochemicals (USA)

výrobce L-CAR – Sigma-Aldrich (USA)

typ a výrobce spektrofotometru – Helios Alpha, Electron-Corporation,

Velká Británie

program pro vytvoření grafů – Microsoft Office Excel

program pro výpočet statistických dat – Statistica (edice 98)

6.2 Výsledky

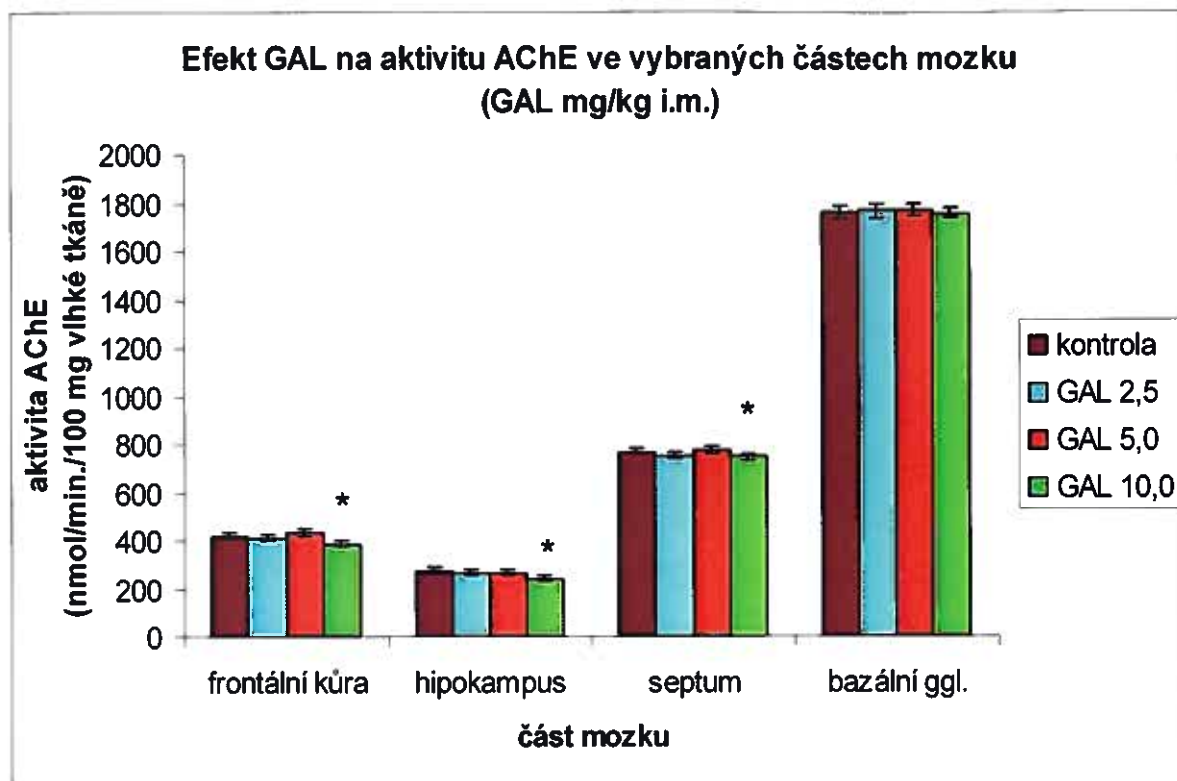
Po podání kontroly 3 (GAL v dávce 10,0 mg/kg) došlo ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE ve frontální kůře, v hipokampu a hypofýze ve srovnání s 1. kontrolní skupinou, které byl podán pouze fyziologický roztok (0,1 ml/100g) a 2. kontrolní skupinou, které byl podán L-CAR (3x 250 mg/kg v intervalu 24 hod.). Ve frontální kůře klesla aktivita AChE o 8,1% (386 nmol/min/100 mg tkáně) oproti kontrole 1 (420 nmol/min/100 mg tkáně) a o 9,2% oproti kontrole 2 (425 nmol/min/100 mg tkáně). V hipokampu činil statisticky významný pokles aktivity AChE 11,7% (242 nmol/min/100 mg tkáně) ve srovnání s kontrolou 1 (274 nmol/min/100 mg tkáně) a 8,4% ve srovnání s kontrolou 2 (264 nmol/min/100 mg tkáně). V hypofýze klesla aktivita AChE o 27,8% (1,3 nmol/min/100 mg tkáně) ve srovnání s kontrolou 1 (1,8 nmol/min/100 mg tkáně) a o 29% ve srovnání s kontrolou 2 (1,83 nmol/min/100 mg tkáně). V septu a bazálních gangliích došlo po podání 10,0 mg/kg GAL pouze k nepatrnému poklesu aktivity AChE oproti kontrolám 1 a 2.

Po podání L-CAR a GAL došlo ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE oproti kontrolním skupinám 1 a 2 ve frontální kůře, v hipokampu a v hypofýze. Ve frontální kůře došlo k poklesu aktivity AChE o 14,5% (359 nmol/min/100 mg tkáně) oproti kontrole 1 (420 nmol/min/100 mg tkáně) a o 15,5% oproti kontrole 2 (425 nmol/min/100 mg tkáně). V hipokampu se snížila aktivita AChE o 21,2% (216 nmol/min/100 mg tkáně) ve srovnání s kontrolou 1 (274 nmol/min/100 mg tkáně) a o 18,2% oproti kontrole 2 (264 nmol/min/100 mg tkáně). V hypofýze pak došlo k poklesu aktivity o 50% (0,9 nmol/min/100 mg tkáně) oproti kontrole 1 (1,8 nmol/min/100 mg tkáně) a o 50,8% oproti kontrole 2 (1,83 nmol/min/100 mg tkáně). V septu a bazálních gangliích nedošlo ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE oproti kontrolám 1 a 2.

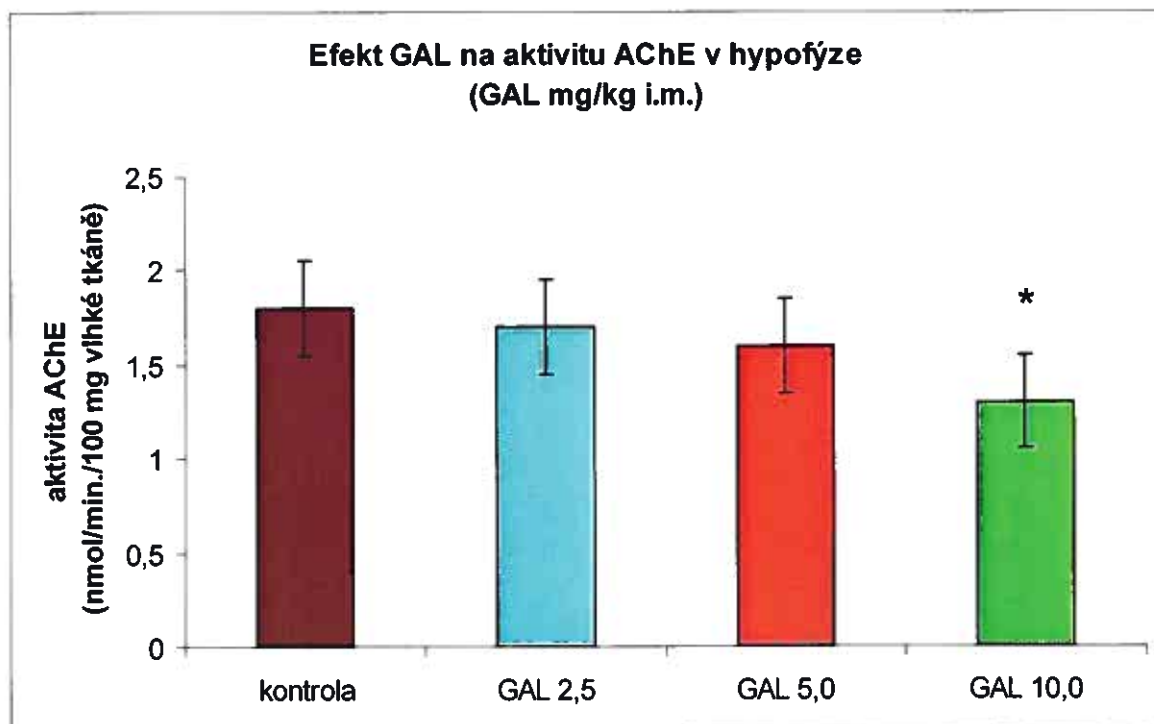
Premedikace L-CAR vedla ke statisticky významnému zesílení inhibičního efektu GAL oproti kontrole 3 (samotný GAL v dávce 10,0 mg/kg) pouze v hipokampu. Ve frontální kůře byl tento účinek na hranici statistické významnosti a v ostatních částech byl pouze nepatrný. V hipokampu klesla aktivita AChE o 10,7% (216 nmol/min/100 mg tkáně) oproti kontrole 3 (242 nmol/min/100 mg tkáně), ve frontální

kůře pak o 7% (359 nmol/min/100 mg tkáně) ve srovnání s kontrolou 3 (386 nmol/min/100 mg tkáně).

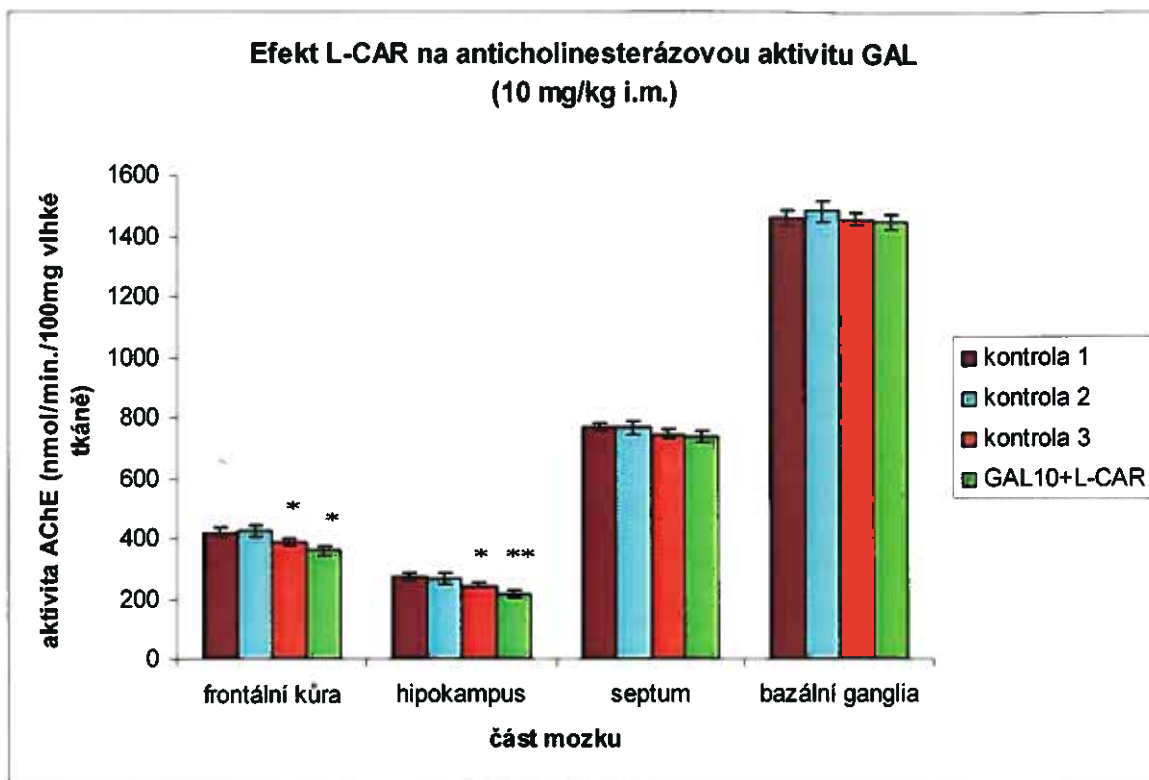
Graf 1: Fabiánová, 2008



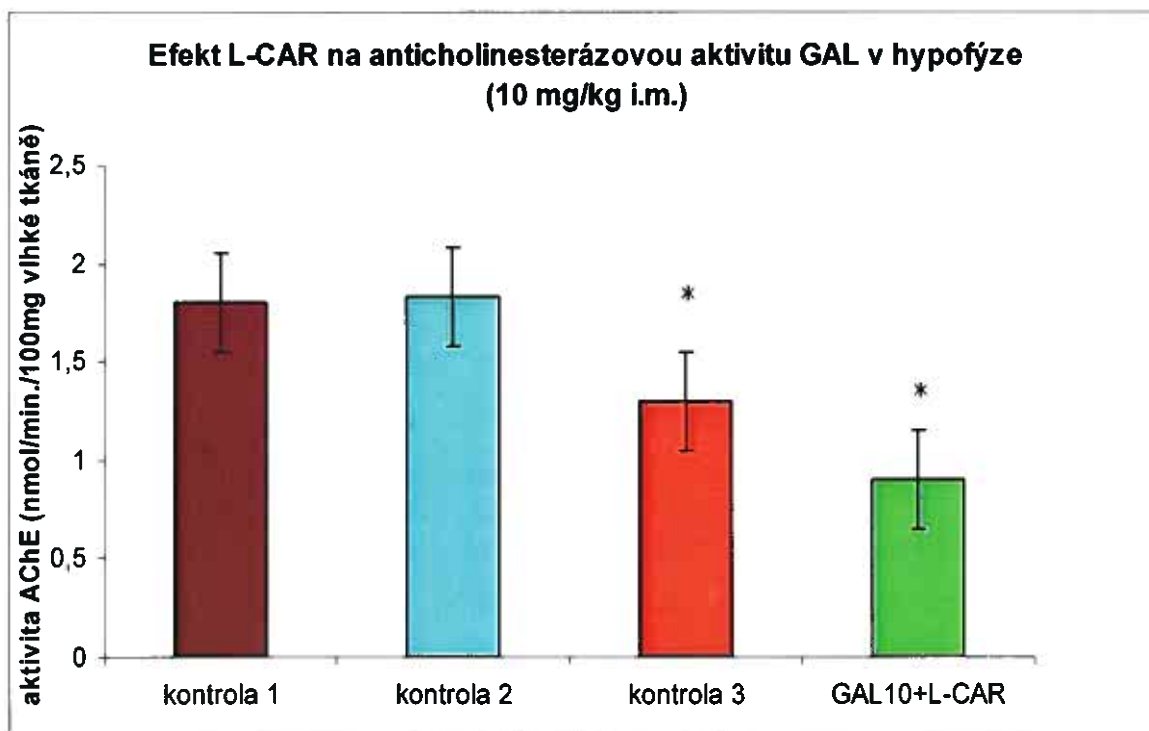
Graf 2: Fabiánová, 2008



Graf 3:¹⁰



Graf 4:



¹⁰ * statisticky významné na 0,05 hladině významnosti proti kontrole 1 a 2

** statisticky významné na 0,05 hladině významnosti proti kontrole 3

7. Diskuse

GAL je terciální alkaloid, který se řadí mezi IChE, což jsou látky, které zablokováním enzymu AChE umožňují delší přežívání molekul Ach, a tím se zvyšuje jejich možnost vázat se na muskarinové a nikotinové receptory. Podávání těchto látek vychází z obecně přijímané tzv. cholinergní hypotézy, podle které převažuje u DAT deficit cholinergní neurotransmise. GAL selektivně inhibuje AChE, tím zpomaluje rozpad synaptického Ach a prodlužuje tak jeho schopnost stimulovat postsynaptické receptory. Výhodou GAL oproti ostatním IChE je jeho schopnost alostericky modulovat nikotinové receptory, což zvyšuje uvolňování Ach v mozku. GAL je látka, která relativně snadno prochází hematoencefalickou bariérou, přesto byla snaha zvýšit jeho dostupnost pro nervovou tkáň. K tomuto záměru byl v této práci testován L-CAR, o kterém je známo, že usnadňuje průnik některých látek přes biologické membrány.

V této rigorózní práci byla stanovována aktivita enzymu AChE jako ukazatel účinku L-CAR na antiacetylcholinesterázovou aktivitu GAL cílenou na centrální nervový systém mozků laboratorních potkanů. Pro měření aktivity AChE byla zvolena frontální kůra, hipokampus, septum, bazální ganglia a hypofýza. Tyto struktury totiž obsahují velké množství cholinergních vláken, která jsou narušena u DAT.

Pro stanovení aktivity AChE existuje několik metod založených na různých principech stanovení. Jde např. o metody radiometrické, elektrometrické, polarografické, fluorimetrické nebo manometrické. (Bajgar, 1972; Krejčová a Ševelová, 2003)

V biologických materiálech může být stanoven i samotný GAL, např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, kapilární zónovou elektroforézou, radioanalýzou aj. (Krejčová a Ševelová, 2003)

Pro měření aktivity AChE byla v této práci použita modifikovaná Ellmanova metoda. Ellmanova metoda je kolorimetrická metoda, která se obecně využívá pro detekci molekul obsahujících síru. Vzhledem k možnosti využití této metody pro stanovení širokého spektra látek obsahujících síru, byla metoda modifikována v řadě analytických pracích.

Výhodou použité modifikované Ellmanovy metody oproti jiným metodám určeným pro stanovení aktivity AChE je specifita reakce, rychlé a jednoduché provedení samotného měření a vysoká citlivost. Právě vysoká citlivost dané metody dovoluje zaznamenat i minimální změny aktivity enzymu, popř. měřit i materiál s velmi nízkou aktivitou AChE. Proto je tato metoda vhodná pro sledování aktivity AChE v různých částech mozku. V nich je totiž aktivita tohoto enzymu výrazně nižší než v jiných biologických materiálech, např. v krvi. Metodu je možno modifikovat i pro stanovení BuChE obměnou substrátu acetylthiocholinu za butyrylthiocholin. Navíc aktivita AChE se v mozku laboratorního potkana pohybuje řádově v desítkách až stovkách nmol/min/100 mg mozkové tkáně, zatímco u lidí je normální aktivita tohoto enzymu řádově v μ molech/min/100 mg tkáně. (Fabiánová, 2008)

Ve své diplomové práci (Fabiánová, 2008) jsem se zabývala efektem GAL na aktivitu AChE ve výše uvedených částech mozku laboratorního potkana. V diplomové práci byly testovány tři koncentrace GAL: 2,5 mg/kg, 5,0 mg/kg a 10,0 mg/kg (viz grafy 1 a 2). Při podání dávek 2,5 a 5,0 mg/kg GAL nedošlo ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE v žádné z testovaných struktur. Ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE došlo pouze při podání nejvyšší testované koncentrace GAL, proto byla v této rigorózní práci testována spolu s L-CAR pouze nejvyšší koncentrace GAL, tedy 10,0 mg/kg. Získané výsledky diplomové práce prokázaly inhibiční efekt GAL na aktivitu AChE, který však v samotném mozku nebyl příliš výrazný. Nejvýrazněji se snížila aktivita enzymu AChE v hypofýze. Vyšší stupeň antiacetylcholinesterázové aktivity v hypofýze mohl být způsoben snadnějším průnikem GAL do této oblasti (hypofýza neleží za hematoencefalickou bariérou na rozdíl od ostatních testovaných struktur).

Výsledky této rigorózní práce dokazují, že premedikace L-CAR vedla k zesílení inhibičního účinku GAL ve srovnání s účinkem samotného GAL. Statisticky významný rozdíl byl však naměřen pouze v hipokampu. Ve frontální kůře byl tento rozdíl na hranici statistické významnosti a v ostatních částech byl pouze nepatrný.

V této práci tedy byla prokázána schopnost L-CAR potencovat antiacetylcholinesterázový efekt GAL.

8. Závěr

Podání samotného GAL v dávce 10,0 mg/kg i.m. vedlo ke statisticky významnému poklesu aktivity AChE ve frontální kůře, v hipokampu a hypofýze. Naměřené výsledky tedy prokazují obecně antiacetylcholinesterázový efekt GAL, který byl nejvýraznější v hypofýze. Předléčba L-CAR p.o. a následné podání GAL i.m. vedlo ke zvýšení tohoto efektu GAL. Nejvýraznější snížení aktivity AChE po premedikaci L-CAR v kombinaci s GAL bylo, v rámci sledovaných struktur, nejvyšší v hipokampu. Ve frontální kůře a v ostatních testovaných částech mozku potkana bylo toto snížení méně výrazné.

Dosažené výsledky mají praktický význam pro možné využití kombinované terapie L-CAR a GAL u pacientů s DAT, kde lze očekávat léčebný přínos.

9. Souhrn

GAL je kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE, který zvyšuje cholinergní neurotransmisi, a tak zlepšuje kognitivní funkce u pacientů s DAT. L-CAR je přírodní látka vyskytující se ve tkáních savců, která zvyšuje přestup některých chemických látek přes biologické membrány. Cílem této práce bylo zjistit, zda preventivní podání L-CAR ovlivní farmakologický účinek GAL. Jako ukazatel efektu testovaných látek bylo zvoleno stanovení aktivity enzymu AChE. Pro stanovení aktivity AChE byla použita kolorimetrická metoda podle Ellmana. Aktivita AChE byla měřena ve frontální kůře, hipokampu, septu, bazálních gangliích a v hypofýze. L-CAR významně zesiloval inhibiční účinek GAL (10,0 mg/kg i.m.) v hipokampu. Ve frontální kůře byl tento efekt na hranici statistické významnosti. Získané výsledky tedy ukazují, že kombinace L-CAR a GAL může být terapeuticky prospěšná u pacientů s DAT.

Summary

GAL is a competitive and reversible AChE inhibitor, which increases the cholinergic neurotransmission and hence improves the cognitive function in patients with DAT. L-CAR is a natural component of the mammalian tissue which increases penetration of some chemical compounds across biological membranes. The aim of this work was to find whether prior administration of L-CAR affects pharmacological effect of GAL. As a marker of the effect of drugs tested a determination of activity of enzyme AChE was chosen. A colorimetric method according to Ellman was used for the determination of AChE activity. The activity of AChE was measured in the frontal cortex, hippocampus, septum, basal ganglia and hypophysis. L-CAR significantly increased inhibitory effect of GAL (10,0 mg/kg i.m.) in the hippocampus. In the frontal cortex this increasing was on the limit of statistical significance. The results obtained demonstrated possibility that the combination of L-CAR and GAL can be therapeutically beneficial in patients with DAT.

10. Literatura

- 1) Aarsland D., Ballard G. C., Halliday G.: Are Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies the same entiti? *Journal of geriatric psychiatry and neurology*, 2004, roč. 17, s. 137 - 145.
- 2) Bajgar.J.: Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. *Vojenské zdravotnické listy*, 1972, roč. XLI, s. 78 - 80.
- 3) Bartoš A., Řípková D.: Biochemické ukazatele Alzheimerovy nemoci včetně derivátů cholesterolu. *Psychiatrie*, 2008, roč. 12, s.145-146.
- 4) Bartoš A., Řípková D.: Pokroky v diagnostice Alzheimerovy nemoci. *Psychiatrie pro praxi*, 2007, roč. 8, s. 17-21.
- 5) Brunovský M.: Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*, 2007, roč. 8, s.112-117.
- 6) Brunovský M.: Účinnost a bezpečnost podávání inhibitorů cholinesteráz. *Farmakoterapie*, 2006, roč. 2, s. 343-349.
- 7) Cao Y, Wang Y., Liu C., Wang L., Han Z., Wang C.: Comparison of pharmacokinetics of L-carnitine, Acetyl-L-carnitine and Propionyl-L-carnitine after single oral administration of L-carnitine in healthy volunteers. *Clinical and Investigative Medicine*, 2009, roč. 32, s.13 – 19.
- 8) Castellani J. R., Zhu X., Lee G. H., Smith A. M., Perry G.: Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: reductionist versus expansionist approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, roč. 10, s.1386-1406.
- 9) Cibulka R.: Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klinická biochemie a metabolismus*, 2005, roč. 13, s. 24-28.
- 10)Ellis M. J.: Cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 2005, roč. 105, s. 145-158.

- 11) Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, roč. 7, s. 88 - 95.
- 12) Fabiánová S.: Efekt galantaminu na aktivitu acetylcholinesterázy ve vybraných částech mozku laboratorního potkana. Diplomová práce, katedra biologických a lékařských věd, FaF Hradec Králové, 2006.
- 13) Felician O., Sandson A. T.: The Neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 1999, roč. 11, s. 19-31.
- 14) Gauthier S.: Advances in the pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *CMAJ*, 2002, roč. 166, s. 616-623.
- 15) Golde E. T.: Alzheimer disease therapy: can the amyloid cascade be halted? *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, roč. 111, s. 11-18.
- 16) Grossman H., Bergmann C., Parker S.: Dementia: a brief review. *The Mount Sinai Journal of Medicine*, 2006, roč. 73, s. 985-992.
- 17) Houghton J. P., Howes J. M.: Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals*, 2005, roč. 14, s. 6 - 22.
- 18) Iqbal K., Grundke – Iqbal I.: Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008, roč. 12, s. 38 - 55.
- 19) Jiráček R.: Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurologie pro praxi*, 2008, roč. 9, s. 240 – 244.
- 20) Jiráček R.: Kognitiva. *Remedia*, 2001, roč. 11, s. 419 - 422.
- 21) Jiráček R., Laňková J.: Demence. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře, 2007.

- 22) Jiráček R., Zemková P.: Psychofarmaka pro pacienty vyššího věku. *Remedia*, 2002, roč. 12, s. 425 – 432.
- 23) Keeverne J., Ray M.: Neurochemistry of Alzheimer's disease. *Psychiatry*, 2008, roč. 7, s. 6 – 8.
- 24) Klafki H. W., Staufenbiel M., Kornhuber J., Wiltfang J.: Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Brain*, 2006, roč. 129, s. 2840 - 2855.
- 25) Konrád J.: Demence s Lewyho tělísky, diagnostika, klinický význam, možnosti léčby, kazuistika. *Psychiatrie pro praxi*, 2004, roč.5, s.9 - 11.
- 26) Konrád J.: 32týdenní otevřené sledování účinnosti a bezpečnosti memantinu u nemocných s demencí u Alzheimerovy nemoci. *Psychiatrie*, 2008, roč.12, s. 130 - 133.
- 27) Konrád J.: Smíšená demence. *Psychiatrie pro praxi*, 2007, roč. 8, s. 129 – 132.
- 28) Kupka K., Urbánek J., Jiráček R., Obenberger J.: Alzheimerova choroba v nálezech funkčních zobrazovacích metod. Vyšetření regionálního průtoku krve mozem pomocí 99m Tc-HMPAO SPECT. *Psychiatrie*, 2000, roč. 4, s. 161 - 167.
- 29) Mayeux R., Sano M.: Treatment of Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 1999, roč. 341, s. 1670 - 1679.
- 30) McKeith G. I.: Dementia with Lewy bodies. *The British Journal of Psychiatry*, 2002, roč. 180, s.144 - 147.
- 31) Nussbaum L. R., Ellis E. C.: Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 2003, roč. 348, s. 1356 – 1364.
- 32) Patočka J.: Memantin a jeho terapeutický potenciál u degenerativních poruch CNS. *Psychiatrie*, 2002, roč. 6, s. 35 - 40.
- 33) Patočka J., Dvořák A.: Od memantinu k nitromemantinu. *Psychiatrie*, 2008, roč. 12, s. 40 - 42.

- 34) Petrovič M., Sedláček M., Horák M., Vyklický L.: Neurofarmakologická podstata působení memantinu v léčbě Alzheimerovy demence. *Klinická farmakologie a farmacie*, 2004, roč. 18, s. 81 - 89.
- 35) Pettegrew J. W., Levine J., McClure R. J.: Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Molecular Psychiatry*, 2000, roč. 5, s. 616 - 632.
- 36) Pidrman V.: Demence – 1. část: diagnostika a diferenciální diagnostika. *Medicína pro praxi*, 2007, roč. 4, s. 83 - 88.
- 37) Pidrman V.: Demence – její klinika a praxe. *Česká geriatrická revue*, 2003, roč. 1, s. 5 – 9.
- 38) Rebouche J. C.: Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1991, roč. 54, s. 1147 - 1152.
- 39) Rektorová I.: Frontotemporální lobární degenerace - diagnóza z neuropsychiatrického pomezí. *Neurologie pro praxi*, 2006, roč. 7, s. 199 - 202.
- 40) Rektorová I.: Kognitivní a behaviorální poruchy u demence při Parkinsonově nemoci a u demence s Lewyho tělísky. *Neurologie pro praxi*, 2004, roč. 5, s. 25 – 28.
- 41) Rosenthal C. T., Khotianov N.: Managing Alzheimer dementia tomorrow. *The Journal of the American Board of Family Practice*, 2003, roč. 16, s. 423 - 434.
- 42) Rusina R., Matěj R.: Vaskulární demence. *Psychiatrie pro praxi*, 2007, roč. 8, s. 81 - 84.
- 43) Sheardová K., Hort J., Rusina R., Bartoš A., Línek V., Rössner P., Rektorová I.: Doporučené postupy pro léčbu Alzheimerovy nemoci a dalších nemocí spojených s demencí. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 2007, roč. 70, s. 589 - 594.

- 44) Snowden J. S., Neary D., Mann M. A. D.: Frontotemporal dementia. *The British Journal of Psychiatry*, 2002, roč. 180, s. 140 - 143.
- 45) Svoboda Z., Květina J., Herink J., Bajgar J., Bartošová L., Palička V., Živný P.: Galantamine antiacetylcholinesterase activity in rat brain influenced by L-carnitine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005, roč. 149, s. 335 - 337.
- 46) Šťastný F.: Genetická podstata Alzheimerovy nemoci a možnost její predikce. *Psychiatrie*, 2008, roč. 12, s. 207 – 213.
- 47) Švestka J.: Nová psychofarmaka: Kognitivum donepezil. a *Psychiatrie*, 1999, roč. 3, s. 36 - 44.
- 48) Švestka J.: Nová psychofarmaka: Kognitivum rivastigmin. b *Psychiatrie*, 1999, roč. 3, s. 110 - 118.
- 49) Švestka J.: Galantamin – duální kognitivum s neuroprotektivním účinkem: update. *Psychiatrie*, 2004, roč. 8, s. 304 - 314.
- 50) Theuns J., Broeckhoven V. C.: Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Human Molecular Genetics*, 2000, roč. 9, s. 2383 - 2394.
- 51) Vaz M. F., Wanders A. J. R.: Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Journal*, 2002, roč. 361, s. 417-429.
- 52) Veselý J., Mačáková J., Dostálová K., Riegrová D.: Nadměrná fosforylace proteinů v rozvoji Alzheimerovy nemoci se zřetelem na nové perspektivy její farmakoerapie. *Psychiatrie*, 2002, roč. 6, s. 17 - 21.
- 53) Whalley J. L., Murray D. A.: Vascular dementia. *The British Journal of Cardiology (Heart and Brain)*, 2003, roč. 10, s. 8 - 14.
- 54) Zlámal T.: Reaktivace inhibovaných cholinesteráz. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká, Brno, 2008, s. 19.