

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**BIOCHEMICKÉ MARKERY PARKINSONOVY NEMOCI**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Terezie Marková

## **PROHLÁŠENÍ**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěla bych velmi poděkovat své vedoucí bakalářské práce PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce.

# OBSAH

1	Úvod a cíle práce .....	3
2	Parkinsonova nemoc .....	4
2.1	Průběh Parkinsonovy nemoci .....	4
2.2	Klinické příznaky.....	4
2.3	Patogeneza .....	6
2.4	Etiologie.....	6
2.5	Parkinsonismus .....	7
2.6	Léčba.....	7
2.6.1	L-dopa (levodopa).....	7
2.6.1.1	Kombinace levodopy s inhibitory DOPA-dekarboxylázy.....	8
2.6.2	Inhibitory dekompozice dopaminu .....	8
2.6.2.1	Selegilin.....	8
2.6.2.2	Inhibitory COMT (katechol-O-metyltransferázy).....	8
2.6.3	Dopaminoví agonisté .....	9
2.6.4	Anticholinergika .....	9
2.6.5	Amantadin.....	9
2.6.6	Chirurgická intervence.....	10
3	Biochemické markery Parkinsonovy nemoci .....	11
3.1	Proč potřebujeme markery Parkinsonovy nemoci? .....	11
3.2	Jaké jsou problémy při využití biomarkerů v klinické praxi?.....	12
3.3	Klinické testování .....	12
3.4	Potenciální biomarkery Parkinsonovy nemoci .....	13
3.4.1	Genetické biomarkery.....	13
3.4.1.1	Parkin mutace .....	14
3.4.2	Biomarkery tělních tekutin .....	14

3.4.2.1	$\alpha$ -Synuklein .....	15
3.4.2.2	Markery oxidačního stresu .....	18
3.4.2.3	Kyselina močová .....	19
3.4.3	Mitochondriální dysfunkce .....	19
3.4.3.1	Dysfunkce elektronového transportního řetězce .....	19
3.4.3.2	Tvorba reaktivních forem kyslíku .....	20
3.4.3.3	Zapojení železa .....	20
3.4.3.4	Neurotoxiny spojující mitochondriální dysfunkci a Parkinsonovu nemoc .....	21
3.5	Zobrazování změn v mozku .....	23
3.5.1	Pozitronová emisní tomografie (PET) a jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) .....	23
3.5.2	Transkraniální ultrazvuk (TCUS) .....	24
4	Závěr .....	26
5	Literatura .....	27
5.1	Knihy a vědecké články .....	27
5.2	Internet .....	28

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Klíčové patologické změny u Parkinsonovy nemoci probíhají v mozkovém kmene, kde jsou bohužel během života ukryty před přímým studiem. To společně s proměnlivými klinickými příznaky činí objektivní a nezaujaté sledování nemoci složitým. Rovněž optimalizace léčby vyžaduje velmi přesné informace o procesech nemoci probíhajících v mozku. Proto je cílem studia biomarkerů zlepšit znalosti o klinických i patologických parametrech této nemoci. To je však komplikováno nejen nepřístupností mozkového kmene, ale i slabou korelací mezi probíhajícími patologickými procesy a klinickými projevy nemoci (Michell a kol., 2004).

Parkinsonovu nemoc lze v časných stádiích jen těžko rozpoznat. Začíná se o ní uvažovat až s nástupem prvních příznaků. Ideální by bylo, kdyby se počínající nemoc dala prokázat jednoduchým testem ještě před projevem prvních klinických příznaků a včas zahájená léčba by tak mohla zabránit jejímu rozvoji. Cílem této práce je v literatuře vyhledat biomarkery, kterým se věnují současné studie, a které se zdají být slibné pro další výzkum a zavedení do praxe.

## **2 PARKINSONOVA NEMOC**

Příznaky Parkinsonovy nemoci poprvé popsal londýnský lékař James Parkinson, který svá pozorování shrnul roku 1817 v knize s názvem „O třaslavé obrně“ (v originálním znění „An Essay on the Shaking Palsy“). V této knize popisuje příznaky nemoci u šesti pacientů a poukazuje na fakt, že se vzájemnou kombinací těchto příznaků se ve své lékařské praxi ještě neseťkal a ani v odborné literatuře nejsou uvedeny žádné případy s podobnými projevy. Zájem o toto dosud nespecifikované onemocnění brzy vedl k objevení dalších pacientů se stejnými příznaky, k potvrzení Parkinsonových závěrů dalšími lékaři a k pojmenování nového onemocnění po jeho objeviteli (Internet 1).

### **2.1 Průběh Parkinsonovy nemoci**

Parkinsonova nemoc je neurodegenerativní onemocnění, postihující 100 až 150 pacientů na 100 000 obyvatel. Avšak u osob starších 60 let je výskyt nemoci častější, onemocní asi 1 člověk ze 100, tzn. 1 %.

Začátek nemoci je typický v 6. a 7. decéniu, začátek před 40. rokem je možný (tzv. early onset), vzácná je juvenilní forma začínající v adolescenci. Úloha dědičnosti v případě Parkinsonovy nemoci nebyla prokázána. Výjimku tvoří příímí příbuzní pacientů s Parkinsonovou nemocí, u kterých se nemoc projevila před 40. rokem věku a zároveň se v jejich příbuzenstvu vyskytuje více než jeden případ onemocnění touto chorobou. (Internet 1; Rektorová, 2009).

### **2.2 Klinické příznaky**

Parkinsonova nemoc je charakterizována asymetrickým plíživým začátkem příznaků (v přibližně 75 % případů) s hypokinezí, akinezí či bradykinezí a klidovým tremorem, který při pohybu přinejmenším zpočátku mizí. Tremor se v začátku nemoci často projevuje jako jednostranný nebo na jedné straně důraznější. Dalšími z hlavních příznaků je dobrá a trvalá odpověď na dopaminergní substituci, rigoru podobné zvýšení tonu (aneb fenomén ozubeného kola), objevují se poruchy posturálních reflexů a také bolesti postižené tělní strany nebo v zádech nejsou vzácné. Protilehlá tělní strana je ve většině případů postižena během několika málo roků také (Mumenthaler a kol., 2008).

Vyskytuje se také pomalá řeč (bradylalie), může být přítomna dysartrie (hůře se vyslovují hlásky „l“, „r“, „p“ a „b“), palilalie (opakování slabiky anebo celého slova na začátku věty), tachyfemie (postupné zrychlování řeči až drmolení na konci výdechu). Pacient s Parkinsonovou nemocí je nápadný tím, že zaujímá strnulou polohu, málo se hýbe, mluví tichým a monotónním hlasem, píše malými písmeny (mikrografie). Obličej je nehybný, maskovitý, nemění se s emocemi, mrkání je méně časté (hypomimie).

Zvláštní kapitolou jsou poruchy chůze a stoje, které patří k základním příznakům Parkinsonovy nemoci. Chůze je šouravá s malými krůčky, chybí synkinézy horních končetin, které zůstávají v klidu, připažené. Někdy se pacient nemůže rozejít nebo při chůzi náhle „zamrzne“ (akinetický freezing). Zvláště obtížné je zahájení pohybu - pacient se musí soustředit na provedení pohybů, které dříve prováděl automaticky. Obtížně zvládá různé pohyby současně, např. mluvení a zapínání knoflíku. Na poruchách stoje a chůze se podílejí i další mechanismy, jako je porucha provádění automatických pohybů a zejména rigidita (Rektorová, 2009).



**Obr. 1.** Ilustrace Parkinsonovy nemoci z knihy „A Manual of Diseases of the Nervous System“ z roku 1886 od Sira Williama Richarda Gowerse.

(Dostupný z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Parkinsonova\\_nemoc](http://cs.wikipedia.org/wiki/Parkinsonova_nemoc))

Jako další příznaky Parkinsonovy nemoci se mohou objevit hypersomnie (nadměrná spavost), hyposmie (oslabení čichu) a psychické příznaky jako rozlady,



deprese a nutkavé stavy hraničící s obsesivním myšlením (nutkavé myšlenky vracející se stále ke stejnému tématu).

Pitevní studie ukázaly, že diagnóza Parkinsonovy nemoci v 10 – 30 % neodpovídá skutečnosti. Následující příznaky varují před nesprávnou diagnostikou Parkinsonovy nemoci: neúčinnost dopaminergní substituce, náhlý začátek a rychlá progresse, postižení pouze dolních končetin, zřetelná asymetrie a chybějící oboustrannost, které v průběhu nemoci nevymizí, tedy nerozšíří-li se na druhou polovinu. Pokud se v časném stádiu nemoci objeví vznik pádů a autonomních příznaků (ortostatická hypotenze, impotence, poruchy močového měchýře aj.) nejspíš se o Parkinsonovu nemoc nejedná. Objeví-li se však tyto příznaky (deprese, strach, nespavost, poruchy funkce močového měchýře, ortostatická hypotenze, bolesti, halucinace) až v pozdějším průběhu nemoci, diagnóza se tím potvrdí (Mumenthaler a kol., 2008).

### **2.3 Patogeneza**

Podkladem onemocnění je odumírání neuronů a makroskopicky zřejmá depigmentace v pars compacta substantiae nigrae a snížení tvorby dopaminu. Nedostatek dopaminu zapříčiní dysregulaci striata. Hlavní klinické projevy nemoci jsou způsobeny právě touto poruchou. Přežívající neurony obsahují málo nebo žádný melanin. Parkinsonova nemoc patří mezi tzv. synukleinopatie, tj. proteinopatie, které se vyznačují patologickým ukládáním proteinu  $\alpha$ -synukleinu v neuronech. Tento protein je obsažen v Lewyho tělískách, dystrofických Lewyho neuritech a/nebo v neuronálních a gliových inkluzích (Rektorová, 2009; Tichý a kol., 1997).

### **2.4 Etiologie**

Proč dochází ke snížení produkce dopaminu a odumírání dopaminergních buněk není známo. Hlavní etiopatogenetické představy se zabývají možnostmi exotoxického (selektivní dopaminergní toxin MPTP) či endotoxického (nadměrná tvorba volných radikálů ve striatonigrálním systému) poškození dopaminergních buněk nebo dědičného postižení mitochondriálního genomu (Tichý a kol., 1997).

Etiologicky lze rozlišit dvě formy Parkinsonovy nemoci: familiární forma, u které nemoc začíná typicky před 40. rokem věku a klinické nálezy mohou být odlišné (bez tremoru, s časným výskytem frontální demence), a sporadická forma s klasickými projevy (Mumenthaler a kol., 2008).

## 2.5 Parkinsonismus

Lidé trpící parkinsonismem mají příznaky podobné Parkinsonově nemoci způsobené jinou chorobou.

Mezi nejčastější onemocnění projevující se parkinsonismem se řadí neurodegenerativní onemocnění mozku: syndromy Parkinson plus (multisystémová atrofie, progresivní supranukleární paralýza), Alzheimerova choroba, demence s Lewyho tělísky, Westphalovy varianty Huntingtonovy chorey a hereditární spinocerebelární ataxie; dále sekundární metabolické syndromy: Wilsonova nemoc, hypoparatyreóza a pseudohypoparatyreóza, hypotyreóza; infekční nemoci: postencefalitický a paraencefalitický syndrom, AIDS parkinsonismus a Creutzfeldtova-Jakobova nemoc. Projevy parkinsonismu způsobují také toxické syndromy: poškození CO, MPTP (1-metyl-4-fenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin), těžkými kovy (Mn), polékový parkinsonismus a onemocnění jiné etiologie postihující bazální ganglia: trauma mozku, tumor, cévní mozková příhoda (Rektorová, 2009).

## 2.6 Léčba

Při Parkinsonově nemoci je hlavní snahou posunout porušenou rovnováhu mezi dopaminergní a cholinergní inervací zpět do fyziologického rozmezí. Jedná se tedy o zmírnění nerovnováhy mezi účinkem dopaminu a acetylcholinu na rozhodujících synapsích v corpus striatum. Tuto nerovnováhu je možné ovlivnit dvěma způsoby. Prvním je posílení dopaminergní složky a to buď pomocí zvýšení koncentrace dopaminu podáním levodopy, konzervací vytvořeného dopaminu inhibitorem *monoaminoxidázy typu B* selegilinem nebo inhibitorem *katechol-O-metyltransferázy* entakaponem anebo aktivací dopaminových receptorů dopaminovým D<sub>2</sub>-agonistou bromokryptinem. Druhou možností je oslabení cholinergní složky inhibicí muskarinových receptorů nebo použitím amantadinu, i když cílové místo působení i mechanismus účinku jsou nejasné.

### 2.6.1 L-DOPA (LEVODOPA)

Protože dopamin neproniká hematoencefalickou bariérou, dá se jeho obsah ve striatu zvýšit pouze podáním fyziologického prekurzoru dopaminu, levodopy. Levodopa je aminokyselina, která je transportována z krve do likvoru. *DOPA-dekarboxyláza*, která je v organismu hojně rozšířena, přemění v CNS levodopu

na dopamin. Je ovšem třeba podávat vysoké dávky levodopy (4 – 8 g denně), aby se jí do mozku přesunulo dostatečné množství, protože dopamin z ní vzniká prakticky všude, zejména ve střevní stěně a v játrech. Protože použité dávky levodopy jsou při této terapii vysoké, objevují se silné dopaminergní nežádoucí účinky: ortostatická hypotenze, arytmie a zvracení. Metoda podávání samotné levodopy byla opuštěna, protože se podařilo vyvinout kombinovaný terapeutický postup, který je účinnější a vyvolává méně nežádoucích účinků.

### **2.6.1.1 Kombinace levodopy s inhibitory DOPA-dekarboxylázy**

Inhibitory *DOPA-dekarboxylázy* snižují přeměnu levodopy na periférii, nikoliv však v mozku, nesmí ale proniknout do CNS. Současné podání levodopy a inhibitorů *DOPA-dekarboxylázy* má velké výhody: denní dávka levodopy se dá výrazně snížit (0,3 - 0,6 g), protože i její periferní ztráty jsou sníženy, a zmírněny jsou také nežádoucí účinky. Dávkování se řídí účinkem, tj. mírou zlepšení Parkinsonovy nemoci, a dále mírou nežádoucích účinků. Terapii je třeba zahájit nízkými dávkami a dávkování pozvolně zvyšovat až do dosažení optimálního účinku. V průběhu doby však tato terapie ztrácí účinnost. Příkladem farmakologicky používaných inhibitorů jsou karbidopa a benserazid.

## **2.6.2 INHIBITORY DEKOMPOZICE DOPAMINU**

### **2.6.2.1 Selegilin**

Selegilin je inhibitor *monoaminoxidázy typu B* (MAO-B). Dopamin se oxidativně deaminuje *monoaminoxidázou*, a tím se biologicky inaktivuje. V organismu jsou přítomny dva typy MAO, MAO typu A a MAO typu B, které se liší substrátovou specificitou, rozdílnou reaktivitou vůči inhibitorům a rozdílnou lokalizací. Dopamin se rozkládá ve striatu účinkem MAO-B a tuto dekompozici lze snížit právě selegilinem. Zdá se však, že selegilin nesplnil pozitivní očekávání, která zpočátku vyvolával. Klinické studie totiž ukázaly, že inhibitor MAO-B nezlepšil očekávanou délku života u pacientů s Parkinsonovou nemocí.

### **2.6.2.2 Inhibitory COMT (katechol-O-metyltransferázy)**

Levodopa se na periférii inaktivuje také enzymem COMT. Proto inhibice tohoto enzymu působí příznivě při terapii Parkinsonovy nemoci levodopou. Inhibitory tohoto enzymu jsou tolkapon a entakapon. Jsou účinné při kombinační léčbě levodopou s inhibitorem *DOPA-dekarboxylázy*. „Konzervují“ levodopu a dopamin, zesilují a tím

i prodlužují požadovaný účinek. Tolkapon byl brzy po zavedení do prodeje opět stažen pro nebezpečí poškození jater. Hodnotu terapie entakaponem zatím ještě není možné posoudit (Lüllmann a kol., 2002).

### **2.6.3 DOPAMINOVÍ AGONISTÉ**

Působí přímo na receptory D<sub>2</sub>, méně na další receptorové subtypy. V současnosti jsou k dispozici preparáty, které se liší svým chemickým složením, působí selektivně na různé podskupiny dopaminových receptorů a mají různě dlouhý biologický poločas. Nejčastější agonisté jsou z řad derivátů kyseliny lysergové, bromokryptin a lisurid. Jejich nevýhodou je však množství nežádoucích účinků. Mezi novější patří pergolid a kabergolin, což jsou deriváty námelových alkaloidů, které se zdají být vhodné pro kombinaci s levodopou.

### **2.6.4 ANTICHOLINERGIKA**

Vyrovňávají nerovnováhu mezi neurotransmitery v bazálních gangliích (převahu acetylcholinergní inervace nad insuficientní dopaminergní aktivitou) blokadou určitého podílu cholinergních receptorů. Protože jde o receptory muskarinového typu, projevy Parkinsonovy nemoci se zmírňovaly po podání atropinu nebo extraktů z rulíku. Potřebné dávky atropinu mohou být ovšem velmi vysoké, což zapříčiní vyřazení parasympatických reakcí a vyvinutí příslušných vegetativních poruch, jako sucho v ústech, poruchy akomodace, tachykardie, obstipace, retence moči. Centrálními nežádoucími účinky tak vysokých dávek atropinu jsou pak zmatenost a halucinace. Podařilo se vyvinout i nová anticholinergika, která pronikají do CNS lépe než atropin. Tím vznikne příznivější poměr mezi centrálními a periferními účinky. Jsou to např. benzatropin, biperiden, metixen, procyklidin. I při použití těchto látek však musíme počítat s nežádoucími účinky atropinového charakteru.

### **2.6.5 AMANTADIN**

Tato látka, původně zavedená jako virostatikum, má v některých případech Parkinsonovy nemoci příznivé účinky, které často již po krátké době mizí. Mechanismem účinku je snad blokáce iontových kanálů glutamátových receptorů NMDA (*N-methyl-D-aspartátového*) typu.

### **2.6.6 CHIRURGICKÁ INTERVENCE**

Z možných chirurgických intervencí je v současné době metodou volby hluboká mozková stimulace (deep brain stimulation; DBS). Jedná se o funkční neurochirurgický výkon, který ovlivňuje základní příznaky Parkinsonovy nemoci a motorické pozdní hybné komplikace vyvolané farmakoterapií. K indikaci této léčby se přistupuje při výrazném funkčním omezení pacienta a při vyčerpání možností medikamentózní terapie. Motorický efekt stimulace dlouhodobě přetrvává, avšak i tento chirurgický zákrok je opět „pouze“ symptomatickou léčbou, která nezastavuje progresi vlastního neurodegenerativního onemocnění mozku. Tato léčba tedy neovlivňuje možný rozvoj neuropsychiatrické symptomatiky včetně demence, naopak přítomnost těchto symptomů je kontraindikací zařazení pacienta do chirurgického programu (Lüllmann a kol., 2002; Rektorová, 2009).

## **3 BIOCHEMICKÉ MARKERY PARKINSONOVY NEMOCI**

### **3.1 Proč potřebujeme markery Parkinsonovy nemoci?**

Biomarkery jsou objektivně měřitelné a hodnotitelné veličiny, které jsou indikátory normálního nebo patologického děje a lze je využít též pro sledování účinnosti terapie (Morgan a kol., 2010). Jedním z hlavních cílů sledování biomarkerů je pomoci včas diagnostikovat danou nemoc. U Parkinsonovy nemoci se sledují dva cíle: prvním je citlivost biomarkerů, tedy oddělení jedinců zdravých od nemocných ještě před rozvinutím příznaků, a druhým cílem je specifčnost biomarkerů, tedy odlišení idiopatické Parkinsonovy nemoci od jejich symptomatických napodobitelů.

Jakmile je stanovena diagnóza Parkinsonovy nemoci, úloha biomarkerů se mění. Stávají se z nich nepřímé ukazatele, které poskytují určitou míru objektivity (pokud jsou správně vyhodnoceny) a potenciálně také umožňují zkrácení klinických studií i snížení počtu pacientů potřebných pro potvrzení významnosti získaných závěrů. Cílem studií je získat právě tyto ukazatele, které budou dostatečně ověřené pro použití v praxi. Příkladem může být měření krevního tlaku a cholesterolu, u nichž bylo v klinických studiích jasně prokázáno spojení s mortalitou při infarktu myokardu a mrtvici.

Pro Parkinsonovu nemoc žádné takové markery v současnosti bohužel neexistují. Je totiž těžké s jistotou určit rozsah účinnosti léčby pouze klinickým hodnocením, protože příznaky se v průběhu času mění a většina hodnocení pacientů je velmi subjektivní. Pokusy o překonání této subjektivity zahrnují použití stupnic, u nichž je variabilita mezi pacienty přiměřená, ačkoli jsou tyto stupnice zaměřeny pouze na posouzení motorických deficitů. Další překážkou je, že některé potenciálně neuroprotektivní látky (například agonisté dopaminu) mají symptomatické účinky, které nesouvisí s jejich vlivem na průběh nemoci. To rovněž ovlivňuje schopnost klinických hodnotících stupnic zjistit neuroprotektivní projevy, i přesto že jsou pacienti hodnoceni po 12 hodinách „vymývacího období“ bez neuroprotektivních látek, protože dopaminergní stimulace trvá mnohem déle. Tudíž je třeba nalézt biomarker, který spolehlivě rozpozná zpomalení patologického procesu, aniž by se spoléhal na příznaky.

Než bude možné biomarkery pro Parkinsonovu nemoc použít, je nezbytné určit přesně, co markery měří, a tudíž jaké informace nám mohou a nemohou poskytnout. Existují sice základní procesy nemoci (např. výskyt Lewyho tělísek, degenerace

neuronů, vyčerpání dopaminu atd.), ale ty nemusí vycházet pouze z idiopatické Parkinsonovy nemoci. Problémem u Parkinsonovy nemoci je nízká klinicko-patologická korelace, takže nelze spolehlivě předpovídat klinické projevy, jestliže je znám patologický průběh a naopak.

Ve zkratce by se tedy dalo říci, že biomarkery jsou potřeba hlavně pro potvrzení diagnózy, k monitorování rozvoje nemoci a prokázání účinnosti léčby (Michell a kol., 2004).

### **3.2 Jaké jsou problémy při využití biomarkerů v klinické praxi?**

Je třeba, aby biomarkery, které mají být použity, byly důsledně ověřeny, v ideálním případě použitím více než jednoho léku pro stejnou indikaci v určité populaci. Byly navrženy i různé statistické metody, aby reprezentovaly podíl léčebného účinku, který je markerem zachycen.

Biomarkery obecně mají pozitivní předpovědní hodnotu, která poskytuje míru pravděpodobnosti, že pacient s pozitivním výsledkem dané onemocnění opravdu má. Samozřejmě, že jsou zde snahy o zlepšení této předpovědní hodnoty, ale to by se nyní dalo provést pouze zvýšením jejich specifčnosti (vnitřních vlastností testů, které bohužel měnit nemůžeme), nebo zvýšením výskytu choroby (snad testováním jen těch se zvýšeným rizikem). Kliničtí lékaři mají přirozenou tendenci kombinovat biomarkery, když se setkají se symptomatickým pacientem, u kterého předpokládají, že má danou chorobu a u níž se výsledky testů zatím projevují jako negativní. Použití více diagnostických biomarkerů však může zvyšovat pravděpodobnost chyby, tedy diagnostikování zdravého člověka jako nemocného.

Problémem tedy zůstává, že zatím není znám biomarker pro Parkinsonovu nemoc, který by ji spolehlivě potvrdil u všech jedinců a zároveň by se s jeho pomocí dal spolehlivě sledovat i průběh této nemoci (Michell a kol., 2004).

### **3.3 Klinické testování**

Jakákoliv forma klinického testování od neuropsychologie až po klinickou neurofyziologii spoléhá na fenotypové vyjádření chorobného procesu, a proto nemůže (bez markeru odrážejícího patologický proces) zjistit preklinické období ztráty neuronů. Nicméně tyto testovací postupy by mohly být schopny citlivě detekovat mírný časné příznaky a projevy v rizikových skupinách, které by jinak chyběly při rutinním klinickém hodnocení. Proto mohou účinně zkrátit prediagnostické období a mohou být

užitečné v urychlování časné léčby. Přesto biomarker, který by přesně měřil klinické projevy, bude mít jen omezené uplatnění při posuzování patologických průběhů, neboť by byly zahrnuty pouze symptomatické účinky léků působících na chorobu. Avšak klinické markery jsou nezbytné pro sledování kolísání symptomů jako odpovědi na léčbu, která je konečným ukazatelem pro pacienty i lékaře. Kromě toho, za předpokladu, že Parkinsonova nemoc je velmi heterogenní, tyto markery pravděpodobně pomohou rozvrstvit nemocné z dané populace podle průběhu nemoci. To by se mohlo být užitečné při zavádění nových způsobů léčby, jako je například transplantace buněk, protože časná data naznačují, že některé podskupiny obyvatel s Parkinsonovou nemocí reagují lépe než ostatní.

Klinické testování zahrnuje afektivní a psychologické testy, klinickou neurofyziologii, testy motorických výkonů a testování zraku a čichu (Michell a kol., 2004).

### **3.4 Potenciální biomarkery Parkinsonovy nemoci**

Ideální biochemický marker by měl být snadno měřitelný a měl by přesně odrážet degenerativní procesy probíhající v bazálních gangliích. Navíc jakýkoli vztah s klinickými projevy by měl vzniknout pouze sekundárně. Také by markery neměly být ovlivněny například symptomatickou léčbou.

#### **3.4.1 GENETICKÉ BIOMARKERY**

Existuje řada genetických faktorů, které mohou hrát roli v citlivosti, nebo vést k rozvoji Parkinsonovy nemoci. Avšak drtivá většina případů Parkinsonovy nemoci ( $\geq 85\%$ ) je sporadických a dědičné nejsou. Výraznější roli mají určité genetické mutace. U pacientů s juvenilním počátkem Parkinsonovy nemoci by se dalo uvažovat o komerčně dostupných testech na zjištění PARK2 nebo parkin mutace, vzhledem k tomu, že až 75% pacientů s juvenilním parkinsonismem může mít tuto autozomálně recesivní formu Parkinsonovy nemoci. Bylo by vhodné zvážit testování mutace *serin/treonin kinázy* (též „leucine-rich repeat kinase“) u autozomálně dominantních forem parkinsonismu, protože je to nejběžnější genetická forma Parkinsonovy nemoci u bělochů, u 20 - 40 % židovské populace Ashkenazi a u severoafrických Arabů. Mutace v genu kódujícím *glukocerebrosidázu* jsou také častěji přítomny u pacientů s Parkinsonovou nemocí oproti kontrolám, což naznačuje, že jsou s rozvojem nemoci silně spojeny (Morgan a kol., 2010).



### 3.4.1.1 *Parkin mutace*

Parkin je *E3 ubikvitin-proteinligáza*. Mutace v genu pro parkin (gen PARK2 na chromosomu 6) byla poprvé popsána v roce 1998 u japonských pacientů s autosomálně recesivní juvenilní Parkinsonovou nemocí. Následně byla tato mutace zjištěna i u případů autosomálně recesivního časného nástupu nemoci.

Mutace se v přibližně 50 % případů nalézají pouze v jediné parkin alele, což může naznačovat, že se tam nachází další, ještě nezjištěná, intronová nebo promotorová mutace nebo dochází k ovlivnění dosud neurčenými genetickými faktory. Další studie pacientů s parkin mutací potvrdily dřívější nástup nemoci a pomalejší progresi. Ovšem nebyly zjištěny žádné klinické příznaky, které by pomohly rozlišit nemoc s parkin mutací od jiných forem časného nástupu parkinsonismu.

Jedním ze substrátů parkinu je také  $\alpha$ -synuklein, což nám poskytuje spojení mezi parkin mutací a idiopatickou Parkinsonovou nemocí. V několika případech parkin mutace byla provedena neuropatologická vyšetření a pouze v jednom z nich byla nalezena typická Lewyho tělíska v substantia nigra. Probíhají tedy pokusy zjistit základní mechanismy nepřítomnosti Lewyho tělísek v onemocnění s parkin mutací. Předpokládá se, že úplná ztráta funkce parkinu, která se může objevit například díky delecí alely, vede k buněčné smrti bez přítomnosti Lewyho tělísek, zatímco neúplná ztráta funkce parkinu (např. bodová mutace v genu) může vést k rozvoji parkinsonismu s Lewyho tělisky. Studie u pacientů s parkin mutací mají za cíl zjistit, do jaké míry je tato hypotéza pravdivá.

Doposud bylo pro Parkinsonovu nemoc objeveno devět lokusů (se čtyřmi geny), ale byly hlášeny i mutace v dalších genech, které vyústily v parkinsonské příznaky. Identifikace místa, a poté mutace způsobující onemocnění, je prvním krokem. Pak přichází postupné odhalování funkce normálních a abnormálních produktů genu, aby se pak pochopení patogeneze onemocnění mohlo převést v účinnou terapii (Karen E. Morrison, 2003).

### 3.4.2 BIOMARKERY TĚLNÍCH TEKUTIN

Jednoduchý krevní test by byl pro diagnostiku Parkinsonovy nemoci ideální, ale i přes některé slibné kandidáty zatím nejsou k dispozici žádné krevní, mozkomíšní, nebo tkáňové (např. kožní) markery, které by byly prokázány a široce validovány jako diagnostické markery Parkinsonovy nemoci. Z dosud identifikovaných biomarkerů patří k nejvíce studovaným  $\alpha$ -synuklein, zkoumají se však i další (Morgan a kol., 2010).

### 3.4.2.1 $\alpha$ -Synuklein

$\alpha$ -Synuklein je malý protein, který má zvláštní význam pro pochopení Parkinsonovy nemoci a podobných poruch. Nejen že je  $\alpha$ -synuklein charakteristický pro Parkinsonovu nemoc (přítomen v Lewyho tělískách), ale i mutace v genu pro  $\alpha$ -synuklein (*SNCA*) mohou způsobit dědičné formy Parkinsonovy nemoci. Exprese normálního  $\alpha$ -synukleinu může zvýšit riziko vzniku sporadických a nefamiliárních forem Parkinsonovy nemoci. Obě formy jsou charakterizovány výraznými ztrátami neuronů, včetně dopaminergních neuronů v substantia nigra. Proto se předpokládá, že  $\alpha$ -synuklein, obzvláště v jeho mutantní formě, nebo za podmínek, kdy je zvýšena úroveň jeho exprese, je toxický v tom smyslu, že je spojen se zvýšenou mírou neuronální buněčné smrti. Může být stanovován v plazmě, v mozkomíšním moku a jeho zvýšená exprese se projevuje v kožních fibroblastech, což je potenciálně snadno dostupná tkáň pro stanovení diagnostických biomarkerů.

První člen rodiny bílkovin, ze které  $\alpha$ -synuklein pochází, byl získán z neuromuskulárního spoje elektrického úhoře. Byl pojmenován synuklein, protože protilátky proti němu značí synapse i jádra. Související protein byl získán ze zebřičky pestré během procesu učení písňe, tedy v době obrovské synaptické plasticity. U lidí existují tři isoformy synukleinu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -). Tyto geny jsou specifické pro obratlovce, proto ani jednobuněčné organismy (včetně kvasinek), ani bezobratlí (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*) nemají žádné zjevné homology synukleinu. Kromě toho, sekvence  $\alpha$ -synukleinu primátů se liší od ostatních obratlovců nahrazením alaninu za treonin v poloze 53. Tyto zajímavé údaje o evolučních vztazích v rodině synukleinu jsou důležitá pro pochopení některých experimentálních systémů, kde byl synuklein zkoumán. Ačkoli se jeho vysoké hladiny vyskytují hlavně v mozku, konkrétně v neuronech, můžeme jej nalézt i v jiných tkáních (např. hematopoetických buňkách).  $\alpha$ -Synuklein se může vázat na lipidy a v neuronech je pravděpodobně spojen s presynaptickými váčky a plazmatickou membránou lipidovými můstky. Spojení  $\alpha$ -synukleinu s váčky je modulováno synaptickou činností, kde se proteiny odlučují z váček po elektrické stimulaci neuronu a jen pomalu se znovu navazují. Nicméně u myši s knockoutovaným  $\alpha$ -synukleinem se projeví pouze mírné abnormality v přenosu nervových vzruchů, z čehož vyplývá, že v synapsi zřejmě nemá tento protein zásadní funkci. Existují důkazy, že  $\alpha$ -synuklein může hrát významnou úlohu v přítomnosti

reaktivních forem kyslíku a oxidu dusíku, ačkoliv tyto mechanismy ještě nejsou plně prozkoumány.

Biochemické analýzy ukázaly, že  $\alpha$ -synuklein je hlavní proteinovou složkou Lewyho tělísek a může být i součástí jejich fibrilárních struktur. Uložené patologické formy  $\alpha$ -synukleinu jsou agregované, vykazují nižší rozpustnost než normální protein a mohou být posttranslačně modifikovány. Proto je ukládání  $\alpha$ -synukleinu do Lewyho tělísek ukazatelem stavu onemocnění při Parkinsonově nemoci. Je také důležité si uvědomit, že i když nemůžeme určit, zda se Lewyho tělíska již dříve tvořila v buňkách, které nakonec odumřely, jednotlivé neurony obsahující Lewyho tělíska jsou ty, které přežily proces nemoci (ačkoli mohou být nefunkční). Z toho vyplývá, že  $\alpha$ -synuklein je markerem Parkinsonovy nemoci, ale nebyla však prokázána jeho příčinná role.

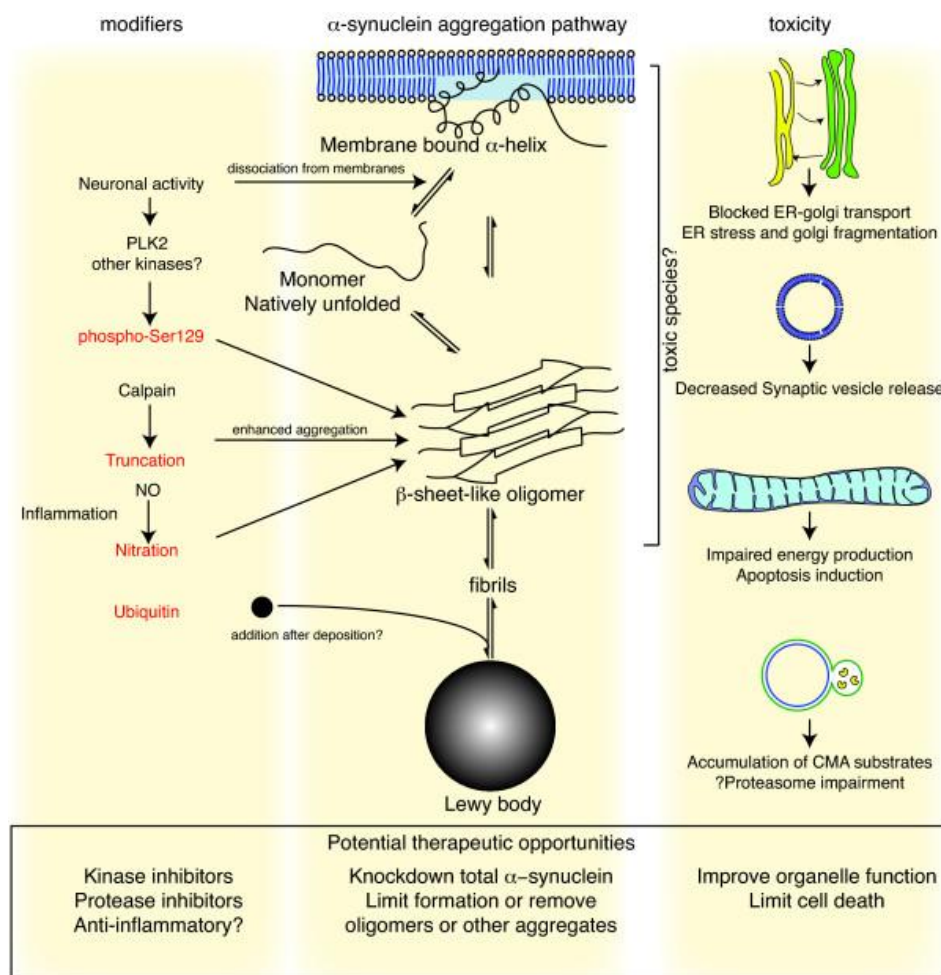
Klíčovým objevem pro pochopení Parkinsonovy nemoci bylo zjištění, že A53T mutace v *SNCA* genu je příčinou dědičného onemocnění. To byl první jasný důkaz, že Mendelův gen by mohl být příčinou Parkinsonovy nemoci, o které se do té doby myslelo, že není genetickým onemocněním. Je zajímavé, že první objevenou mutací byla A53T, tj. navrácení lidského alaninu na místo původního treoninu, která byla nalezena u hlodavců a mnoha dalších živočišných druhů. Od té doby v různých rodinách objeveny další dvě bodové mutace, A30P a E46K. Zajímavé je, že jen několik pacientů s mutacemi A53T a E46K rozšířena depozita synukleinu i klinické projevy nemoci, které zřejmě vyplývají ze stupně zasažení non-dopaminergních systémů, ač je hlášeno mnoho případů Parkinsonovy nemoci.

Druhá významná skupina případů má zmnoženou původní (wild-type) alelu *SNCA* genu. U případů s duplikací *SNCA* se projevuje fenotyp Parkinsonovy nemoci s primárním postižením mozkového kmene, zatímco u postižených s triplikací *SNCA* genu se projevuje demence s Lewyho tělisky, která postihuje několik oblastí mozku. Měření hladiny bílkovin u případů triplikací *SNCA* ukazuje předpokládané zdvojnásobení hladin  $\alpha$ -synukleinu v krvi a jeho depozici v mozkové kůře, kde jsou přítomna i Lewyho tělíska. Proto může být koncentrace  $\alpha$ -synukleinu kauzální pro demenci s Lewyho tělisky.

Třetí část genetických důkazů pochází ze studií zabývajících se mapováním běžných variant *SNCA* genu, které jsou spojeny s celoživotním rizikem rozvoje sporadické Parkinsonovy nemoci. Promotorová oblast (Rep1 polymorfní repeat) i polymorfismy na 3' konci genu jsou spojeny s Parkinsonovou nemocí. Ačkoli není

známo, jak přesně tyto rizikové varianty ovlivňují výskyt Parkinsonovy nemoci v průběhu života, zdá se pravděpodobné, že zvyšují hladiny  $\alpha$ -synukleinu v mozku. Lze tedy říci, že genetická data získaná u lidí silně podporují příčinnou roli  $\alpha$ -synukleinu v Parkinsonově nemoci.

Ať už jsou Lewyho tělíska příčinou nebo následkem, přesto podporují představu, že  $\alpha$ -synukleín je významným pojítkem mezi sporadickou a dědičnou Parkinsonovou nemocí. Různé důkazy určují  $\alpha$ -synukleín jako potenciálně toxický protein, který splňuje požadavky na původce Parkinsonovy nemoci. Otázkou zůstává, jak a v jakém kontextu je  $\alpha$ -synukleín toxický, a jestli s tím můžeme něco udělat (Obr. 2).



**Obr. 2.** Předpokládané mechanismy toxického působení  $\alpha$ -synukleinu (Cookson 2009).

Vše nasvědčuje tomu, že  $\alpha$ -synuklein může vyvolat toxicitu v různých kontextech, od jednoduchých organismů až k dopaminovým neuronům v substantia nigra primátů. Méně jasné je to, zda se všechny tyto situace přímo týkají lidského onemocnění, kde je úbytek neuronů pravděpodobně dlouhodobější záležitostí. Z praktického hlediska však modely alespoň poskytují možnost zkoumat mechanismy, kterými  $\alpha$ -synuklein spouští nervovou smrt.  $\alpha$ -Synuklein má vlastnosti, včetně potenciálu pro agregaci a posttranslační modifikace, které mohou ovlivnit jeho toxické účinky. Není však jasné, zda jsou pro jeho toxicitu nutné.

Buněčná smrt je tedy významnou součástí patologie Parkinsonovy nemoci. Ačkoli je tento proces stále záhadou,  $\alpha$ -synuklein je hlavním podezřelým na toxický protein. Za předpokladu, že toxicita skutečně vychází z abnormálních forem proteinu včetně zvýšení exprese normálního *SNCA* genu, se objevují dva hlavní aspekty, které by mohly být využity k terapii. Prvním aspektem je náchylnost tohoto proteinu agregaci, kde by mohly být nápomocny antiagregační sloučeniny nebo postupy snižující celkovou expresi  $\alpha$ -synukleinu. Druhým aspektem je existence celé řady molekulárních dějů, které se točí kolem membrány nebo interakcí organel, a mohou také přispět k toxicitě. I tyto děje mohou být terapeuticky využity. Další výzkum by měl být zaměřen na zkoumání výše uvedených možností a vývoj nových modelových systémů, které by lépe odrážely významnou ztrátu neuronů v průběhu Parkinsonově nemoci (Morgan a kol., 2010, Cookson 2009).

#### **3.4.2.2 Markery oxidačního stresu**

Ačkoliv je oxidační stres při Parkinsonově nemoci zvýšen, není pro tuto chorobu specifický. Již se však ví, že hladiny některých markerů oxidačního stresu stoupají s progresí Parkinsonovy nemoci. Mezi ně patří hlavně 8-hydroxy-2-deoxyguanosin, nitrotyrosin a reaktivní formy kyslíku. Také hladiny hydroxylových radikálů v plazmě pacientů s Parkinsonovou nemocí byly významně zvýšeny.

Biomarkery oxidačního stresu se dají snadno stanovit v krvi a moči za použití ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) nebo jinými citlivými metodami. Nicméně existuje mnoho dalších stavů, při kterých se oxidační stres zvyšuje (stárnutí, kouření, intenzivní cvičení, rakovina, chemoterapie) a může být tedy těžké rozlišit primární příčinu tohoto zvýšení (Morgan a kol., 2010).

### **3.4.2.3 Kyselina močová**

Kyselina močová je silný antioxidant a „vychytávač“ volných radikálů. Potlačuje oxidační stres a zabraňuje smrti dopaminergních buněk u zvířecích modelů Parkinsonovy nemoci. Její hladiny v substantia nigra u pacientů s Parkinsonovou nemocí jsou sníženy.

Několik velkých studií prokázalo snížené riziko rozvoje a potenciál pro pomalejší progresi Parkinsonovy nemoci při vyšších hladinách kyseliny močové v séru. Tento důkaz vedl k probíhajícím klinickým studiím inosinu (lék, který zvyšuje hladiny kyseliny močové) jako možné látky pro zpomalení progresy Parkinsonovy nemoci. Vzhledem k těmto vlastnostem se zdá její použití reálné, nicméně se musí počítat i s negativními důsledky zvýšení hladin kyseliny močové (např. ledvinové kameny). Vyšší hladiny kyseliny močové jsou také spojeny s hypertenzí, periferním cévním onemocněním a kardiovaskulárními onemocněními (Morgan a kol., 2010).

### **3.4.3 MITOCHONDRIÁLNÍ DYSFUNKCE**

Parkinsonova nemoc je stále více spojována s mitochondriální dysfunkcí a inhibicí elektronového transportního řetězce. Tato inhibice vede k tvorbě reaktivních forem kyslíku a vyčerpání buněčných energetických zásob, což může následně způsobit poškození až smrt buněk. Několik genů, které jsou spojeny s vrozenými formami Parkinsonovy nemoci, kóduje mitochondriální bílkoviny nebo bílkoviny spojené s mitochondriální dysfunkcí. Toto zjištění dokazuje ústřední úlohu mitochondrií v Parkinsonově nemoci a je podpořeno zjištěními, že toxiny v životním prostředí inhibující mitochondriální dýchací řetězec mohou rovněž vyvolat tuto nemoc (Keane a kol., 2011).

#### **3.4.3.1 Dysfunkce elektronového transportního řetězce**

Neurony mají značnou potřebu energie a jsou vysoce vybaveny mitochondriemi. To je důvodem jejich mimořádné citlivosti k mitochondriální dysfunkci. Existuje více neurologických poruch spojených s mitochondriální dysfunkcí a u všech byla prokázána zvýšená produkce volných radikálů.

Prvním důkazem spojitosti mezi mitochondriální dysfunkcí a Parkinsonovou nemocí je nedostatek mitochondriálního komplexu I v substantia nigra, který byl zjištěn při pitvách nemocných s touto chorobou. Tento nedostatek byl rovněž zjištěn ve frontální mozkové kůře a v periferních tkáních (např. kosterním svalstvu a krevních

destičkách), což naznačuje, že při Parkinsonově nemoci existuje globální snížení aktivity mitochondriálního komplexu I. Tato vada může být způsobena oxidačním poškozením. Inhibice komplexu I může vést k degeneraci zasažených neuronů.

U pacientů s Parkinsonovou nemocí byl hlášen i pokles funkce komplexu III v lymfocytech a krevních destičkách. Byla nalezena souvislost mezi poškozením mitochondriálního komplexu III a nárůstem koncentrace volných radikálů, který může být způsoben zvýšeným únikem elektronů z komplexu III. Inhibice komplexu III způsobuje také výrazné snížení funkce komplexu I (Keane a kol., 2011).

#### **3.4.3.2 Tvorba reaktivních forem kyslíku**

Inhibice komplexu I nebo III způsobuje zvýšené uvolňování elektronů z elektronového transportního řetězce do matrix mitochondrií, které pak reagují s kyslíkem za vzniku jeho reaktivních forem (např. superoxidových a hydroxylových radikálů). K tomuto nárůstu dochází při blokování pohybu elektronů k další molekule akceptoru v řetězci.

Reaktivní formy kyslíku mohou působit jako signální molekuly vyvoláním peroxidace lipidů nebo podporováním excitotoxicity, což vede k modifikaci proteinů a eventuální smrti buňky. Mezi hlavní oblasti, v nichž mohou reaktivní formy kyslíku poškodit buňku, patří oxidační poškození DNA, peroxidace lipidů a oxidace a nitrace bílkovin. Hydroxylové radikály reagují s dvojnými vazbami v DNA bazích, což vede k poškození DNA a zhoršení normální buněčné funkce. Důkazem propojení tohoto mechanismu buněčné smrti s Parkinsonovou nemocí jsou zvýšené hladiny 8-hydroxyguanosinu, který vzniká při oxidačním poškození DNA v substantia nigra pacientů. Také peroxynitrit zvyšuje počet jednořetězcových zlomů v DNA, což způsobuje aktivaci *poly(ADP-ribóza)polymerázy* (PARP), která narušuje mitochondriální dýchací řetězec a produkci ATP vyčerpáním intracelulárních zásob  $\text{NAD}^+$ , a tím prohlubuje původní mitochondriální dysfunkci (Keane a kol., 2011).

#### **3.4.3.3 Zapojení železa**

Železo se také může podílet na produkci a šíření oxidačního stresu v mitochondriích dopaminergních neuronů v Parkinsonově nemoci. Je nerozlučně spjata s funkcí mitochondrií a především mozku, protože je nedílnou součástí všech komplexů dýchacího řetězce a příjem železa do mozku je spojen s požadavky na mitochondriální energii. Zvýšená hladina železa v mozku byla dlouho spojována s Parkinsonovou

nemocí. V nedávné době byl pozorován specifický nárůst intracelulárního železa v neuronech substantia nigra u pacientů s Parkinsonovou nemocí, což podporuje předpoklady o zvýšeném hromadění buněčného železa při této nemoci. Železo běžně vstupuje do neuronů prostřednictvím transferinového receptoru a studie naznačují, že v Parkinsonově nemoci dochází rovněž ke snížení funkce tohoto systému.

Reaktivní formy kyslíku s nízkým oxidačním potenciálem, vznikající například díky dysfunkci oxidační fosforylace, mohou zvýšit uvolňování reaktivních forem železa z feritinu, což povede k vytvoření většího počtu reaktivních forem kyslíku, ke zvýšení oxidačního stresu a k poškození buněk. Důkaz, že v Parkinsonově nemoci je přítomna abnormální homeostáza železa je jasný, avšak ještě není objasněno, zda železo hraje roli iniciátora nebo je důsledkem patologických procesů (Keane a kol., 2011).

#### **3.4.3.4 Neurotoxiny spojující mitochondriální dysfunkci a Parkinsonovu nemoc**

Existuje mnoho důkazů, že Parkinsonova nemoc může být způsobena neurotoxiny. Tyto sloučeniny sice působí různými mechanismy, přesto všechny vyvolávají mitochondriální dysfunkci.

Nicméně hypotéza, že inhibice mitochondriálního komplexu I vyvolaná působením neurotoxinů vede k zániku neuronů, vyžaduje další studie. Mitochondriální dysfunkce se totiž může vyskytovat buď souběžně s jiným nemitochondriálním mechanismem buněčné smrti nebo jako vedlejší účinek jiného buněčného poškození (např. akumulace toxických proteinů, zánět nebo poškození DNA).

#### **1-Metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)**

První toxin, který byl spojován s inhibicí mitochondriálního komplexu I a Parkinsonovou nemocí, byl MPTP. Na různých experimentálních zvířecích modelech bylo prokázáno, že způsobuje degeneraci dopaminergních neuronů i příznaky Parkinsonovy nemoci. MPTP snadno prochází hematoencefalickou bariérou, kde je přeměněn na toxický 1-metyl-4-fenylpyridinový ion a pak je přenesen do dopaminergních neuronů. Pasivním transportem je přenášen i do mitochondrií, kde inhibuje mitochondriální komplex I. V modelu Parkinsonovy nemoci u myší, se vyskytuje nitrovaný  $\alpha$ -synuklein, jež poskytuje další spojení mezi MPTP a Parkinsonovou nemocí. Nicméně přes všechny důkazy o tomto spojení stále existují



rozdíly mezi modely a idiopatickou Parkinsonovou nemocí se změnami v progresi onemocnění, akutním nástupem a nedostatkem typické formace Lewyho tělísek.

### Rotenon

Rotenon je široce používaný pesticid a běžně se vyskytující neurotoxin, který je spojován s Parkinsonovou nemocí. Je vysoce lipofilní a snadno prochází hematoencefalickou bariérou, kde vstupuje do nervových buněk a intracelulárních organel, jako jsou mitochondrie, bez pomoci transportérů. Rotenon specificky blokuje vazebná místa komplexu I, způsobuje tak zvýšený transport elektronů z komplexu I, což vede k uvolnění volných radikálů do matrix mitochondrie a tvorbě volných kyslíkových radikálů. Proto rotenon způsobuje příznaky Parkinsonovy nemoci u krys. Může také způsobit agregaci  $\alpha$ -synukleinu. Nicméně existují studie, které popisují poškození neuronů ve striatu (ne však přímo v substantia nigra) rotenonem. Proto nemusí být tento model zcela přesným modelem Parkinsonovy nemoci.

### Parakvat a dikvat

Parakvat a dikvat jsou široce používané herbicidy a je rovněž prokázáno, že jsou spojeny s Parkinsonovou nemocí. Jsou to hydrofilní látky, a proto neprojdou tak snadno hematoencefalickou bariérou a mechanismus, kterým se do mozku dostanou, není zatím objasněn. Parakvat a dikvat mají velmi podobnou strukturu jako MPTP, což naznačuje podobný toxický mechanismus. Nicméně na rozdíl od rotenonu a 1-metyl-4-fenylpyridiniového iontu neinhibují komplex I. Tyto sloučeniny jsou nejprve redukovány komplexem II, *NADPH-cytochrom P450 reduktázou* nebo *cytochrom c reduktázou* na odpovídající radikály, které pak reagují s kyslíkem za vzniku superoxidového radikálu. Ten může způsobit oxidační stres a mitochondriální dysfunkci. Parakvat a dikvat mohou také zvyšovat hladiny  $\alpha$ -synukleinu a způsobovat jeho agregaci.

### 1-Trichlorometyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -karbolin (TaClo)

$\beta$ -Karboly jsou strukturně podobné MPTP. Mohou být neurotoxické pro dopaminergní neurony a způsobovat parkinsonský syndrom. Trichloretylen (TCE) je průmyslové rozpouštědlo používané na suché čištění a jako odmašťovač. Je hlavní environmentální látkou kontaminující ovzduší, vodu i půdu, a proto dochází k expozici nízkým dávkám TCE u různých skupin obyvatelstva. Bylo zjištěno, že TCE může být u člověka přeměněn na  $\beta$ -karbolin TaClo, který je schopen procházet

hematoencefalickou bariérou. Byla objevena silná inhibice mitochondriálního komplexu I *in vitro*. Zajímavé je, že další práce ukázaly, že *N*-metyl-TaClo je silnějším inhibitorem mitochondriálního komplexu I a je neurotoxičtější než TaClo sám. Předpokládá se, že TaClo nebo jiný související toxin může vyvolat Parkinsonovu nemoc, u níž hraje ústřední úlohu mitochondriální dysfunkce (Keane a kol., 2011).

### **3.5 Zobrazování změn v mozku**

#### **3.5.1 POZITRONOVÁ EMISNÍ TOMOGRAFIE (PET) A JEDNOFOTONOVÁ EMISNÍ VÝPOČETNÍ TOMOGRAFIE (SPECT)**

Pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography) je zobrazovací technika nukleární medicíny, která vytváří trojrozměrný obraz nebo obraz funkčních procesů v těle. Systém rozpozná dvojice  $\gamma$ -záření nepřímo emitované radionuklidem, který je zaveden do těla na biologicky aktivní molekule (radiofarmaka). Počítačovou analýzou jsou pak vytvořeny trojrozměrné obrazy koncentrací radionuklidu v těle (Internet 2).

Jednofotonová emisní tomografie (single-photon emission computed tomography) je zobrazovací technika nukleární medicíny, která používá  $\gamma$ -záření, a je schopna poskytnout skutečné 3D informace. Tyto informace jsou obvykle prezentovány jako křížové sekční řezy pacientem, ale mohou být dle potřeby volně přeformátovány.

Základní technika vyžaduje injekci radionuklidu do krevního řečiště pacienta. Radionuklidem je jednoduchý rozpustný iont, nejčastěji galium. Většinou bývá tento značený radioizotop, důležitý pouze pro své radioaktivní vlastnosti, připojen na speciální radioligand, který je zajímavý pro své chemické vlastnosti vazby na určité typy tkání. Toto spojení umožňuje kombinaci ligandu a radioizotopu, které jsou nesený a navázány na požadované místo v těle, kde (vzhledem ke  $\gamma$ -záření izotopu) je koncentrace ligandu viditelná pomocí  $\gamma$ -kamery (Internet 3).

Zobrazování PET a SPECT v Parkinsonově nemoci má mnoho možných aplikací, jako sledování poklesu neurotransmitterových funkcí, vyšetřování metabolické aktivity a monitorování regionálního mozkového krevního toku. Navíc nově vyvíjené ligandy by mohly být schopné poskytnout informace o odpovědi mikroglíí na ztrátu buněk nebo o hromadění proteinů.

Jedním z cílů tohoto zobrazování je presymptomatická detekce pacientů. Otázkou však zůstává, jestli se u pacientů s preklinickými abnormalitami skutečně

Parkinsonova nemoc rozvine, ztrátu méně než 50 % buněk lze totiž nyní jen těžko detekovat. Proto jsou tu probíhající snahy o zvýšení specifičnosti testů, zahrnující zvýšení podrobnosti tomografie dopaminergního deficitu, který jak se zdá ovlivňuje dorsální putamen již v počátku nemoci. Pozitivní predikční hodnota testu může být zlepšena sledováním jen osob s vysokým rizikem rozvoje Parkinsonovy nemoci, například členů rodiny nebo jedinců s parkin mutací, bohužel totiž v současné době není jasné, koho mimo tyto vzácné familiární formy testovat.

Dalším z cílů studií je rozlišení Parkinsonovy nemoci od ostatních parkinsonských poruch. Různé potenciální diagnostické využití tohoto zobrazování má pomoci zjistit, kteří pacienti s příznaky opravdu mají idiopatickou Parkinsonovu nemoc. Jedním z problémů při interpretaci těchto studií je, že nejsou zvláště reprezentativní ve skutečném životě, kdy je diagnóza často nejasná. Ve většině srovnávacích zobrazovacích studií byli totiž pacienti snadno rozlišitelní klinicky. Nicméně s lepším rozlišením a využitím novějších ligandů budou pravděpodobně tyto významné pokroky v příštích několika letech umožňovat lepší klinické využití těchto slibných nástrojů (Michell a kol., 2004).

### **3.5.2 TRANSKRANIÁLNÍ ULTRAZVUK (TCUS)**

Transkraniální ultrazvuk (transcranial ultrasound) je neinvazivní, snadno opakovatelná diagnostická technika, která je široce používaná pro hodnocení cerebrální hemodynamiky. Omezením této metody jsou špatné insonační podmínky jako například tloušťka lebky, těžká obezita a velmi nízká průtoková rychlost. Během posledních deseti let však byly vyvinuty ultrazvukové kontrastní látky, aby tyto překážky překonaly. Skládají se z granul, jejichž plochy slouží jako ložiska pro adhezi mikrobublinek vzduchu, které zvyšují zpětný rozptyl dopplerovského signálu po intravenózní aplikaci. Mnoho studií prokázalo, že tyto látky jsou bezpečné a zvyšují jistotu diagnózy v 75 až 80 % případů. Nicméně o užití těchto kontrastních látek v běžné klinické praxi není mnoho známo. Kromě toho mohou ultrazvukové kontrastní látky snížit diagnostickou přesnost zvýšením měřené intrakraniální rychlosti průtoku a vznikem tzv. bublinkového šumu („bubble noise“) (Zunker a kol., 2002).

Během posledních deseti let se začala zkoumat zvýšená echogenita substantia nigra u pacientů s Parkinsonovou nemocí. Zdá se, že více než 90 % těchto pacientů má hyperechogenní substantia nigra. Tato hyperechogenní oblast se s postupem progresu Parkinsonovy nemoci nezvětšuje a v pitevních studiích koreluje její velikost s obsahem

tkáňového železa. Zdá se, že echogenní oblasti substantia nigra přímo korelují s věkem nástupu jak idiopatické Parkinsonovy nemoci, tak parkinsonismu. Relativní stálost hyperechogenní oblasti substantia nigra u Parkinsonovy nemoci naznačuje, že toto zjištění je možná markerem pro určení nemoci, nemůže však sloužit jako indikátor její progresu. Nevýhodou může být, že TCUS vyžaduje značné technické odborné znalosti, a navíc pro 10 až 20 % pacientů je nemožné získat odpovídající data (Morgan a kol., 2010).

## 4 ZÁVĚR

V současné době probíhá mnoho studií, které se zabývají hledáním nejrůznějších biomarkerů Parkinsonovy nemoci. Snaží se pochopit mechanismy jejich působení a tak přijít na to proč, a jakým způsobem Parkinsonova nemoc vzniká. Snaží se odhalit ji ještě před projevem prvních příznaků, zjistit jak probíhají její patologické procesy a také přijít na to, jak ji nejlépe léčit.

Slibných biomarkerů je nalézáno mnoho. Nevýhodou však zůstává, že mnoho z nich není specifickým markerem pouze pro Parkinsonovu nemoc, ale že mohou být zjištěny i u mnoha dalších onemocnění. Také nebyl nalezen žádný jednoznačný marker, který by byl prokazatelný jednoduchým testem a mohl tak být rychle zaveden do klinické praxe.

Výzkum biochemických markerů Parkinsonovy nemoci trvá již léta a stále pokračuje. S rozvojem vědy a techniky, získáváním nových poznatků a zlepšováním citlivosti přístrojů se objevují stále nové možnosti pokusů a zkoumání různých látek a procesů v mozku. Proto věřím, i když to bude nejspíše ještě několik let trvat, že se nakonec dočkáme vytouženého specifického biomarkeru, který ulehčí práci mnoha lékařům a pomůže mnoha pacientům.

## 5 LITERATURA

### 5.1 Knihy a vědecké články

- COOKSON M. C. (2009)  **$\alpha$ -Synuclein and neuronal cell death.** Mol. Neurodegener. 4 (9): doi: 10.1186/1750-1326-4-9.
- KAREN E. MORRISON (2003) **Parkin mutations and early onset parkinsonism.** Brain 126 (6): 1250-1251.
- KEANE P. C, KURZAWA M, BLAIN P. G, MORRIS C.M. (2011) **Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease.** Parkinson's Disease 2011: doi: 10.4061/2011/716871.
- LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M., **Farmakologie a toxikologie,** Grada publishing, spol. s r. o., Praha 2002, strany 297 – 302
- MICHELL A. W., LEWIS S.J.G., FOLTYNIE T., BARKER R. A. (2004) **Biomarkers and Parkinson's disease.** Brain 127 (8): 1693–1705.
- MORGAN J. C., MEHTA S. H., SETHI K. D. (2010) **Biomarkers in Parkinson's Disease.** Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 10 (6): 423–430.
- MUMENTHALER M., BASSETTI C., DAETWYLER C., **Neurologická diferenciální diagnostika,** Překlad 5., přepracovaného a doplněného vydání, Grada publishing, a.s., Praha 2008, 376 stran
- REKTOROVÁ I., **Současné možnosti diagnostiky a terapie Parkinsonovy nemoci,** vychází jako příloha časopisu Neurologie pro praxi, Solen, Neurologie pro praxi 2009; 10 (suppl. A), strany A6 – A24
- TICHÝ J. A KOL., **Neurologie,** Karolinum – nakladatelství Univerzity Karlovy, Praha 1997, 322 stran
- ZUNKER P., WILMS H., BROSSMANN J., GEORGIADIS D., WEBER S., DEUSCHL G. (2002) **Echo contrast-enhanced transcranial ultrasound: frequency of use, diagnostic benefit, and validity of results compared with MRA.** Stroke. 33 (11): 2600-2603.

## 5.2 Internet

- Internet 1: **Parkinsonova nemoc**. *Odborný časopis pro lékárníky a laboranty PHARMA NEWS* [online]. Poslední revize 05.2006 [cit. 2010-11-04]. Dostupné z: [http://www.pharmanews.cz/2006\\_05/parkinson.html](http://www.pharmanews.cz/2006_05/parkinson.html).
- Internet 2: **Positron emission tomography** *from Wikipedia, the free encyclopedia* [online]. Poslední revize 02.2011 [cit. 2011-04-27]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Positron\\_emission\\_tomography](http://en.wikipedia.org/wiki/Positron_emission_tomography).
- Internet 3: **Single-photon emission computed tomography** *from Wikipedia, the free encyclopedia* [online]. Poslední revize 02.2011 [cit. 2011-04-27]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Single-photon\\_emission\\_computed\\_tomography](http://en.wikipedia.org/wiki/Single-photon_emission_computed_tomography).