

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Srovnání účinnosti inhibitorů acetylcholinesterasy
takrinu, rivastigminu a donepezilu při léčbě
kognitivní poruchy vyvolané 3-quinuclidinyl
benzilátem u laboratorního potkana**

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Specialista: RNDr. Jan Misík, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Mgr. Stela Pavlíčková

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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

.....

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli panu RNDr. Janu Misíkovi, PhD. za zpracování statistické analýzy, za jeho odborné vedení, věnovaný čas, trpělivost, neocenitelné rady, vstřícnost a ochotu pomoci při práci v laboratoři, během konzultací a sepisování této práce. Dále bych ráda poděkovala paní PharmDr. Marii Vopršálové, CSc. za pomoc, věnovaný čas a ochotu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Stela Pavlíčková

Školitel: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Jan Misík, Ph.D.

Název rigorózní práce: Srovnání účinnosti inhibitorů acetylcholinesterasy takrinu, rivastigminu a donepezilu při léčbě kognitivní poruchy vyvolané 3-quinuclidinyl benzilátem u laboratorního potkana.

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k zániku neuronů, úbytku mozkové tkáně a narušení funkce cholinergního systému. Patofyziologické změny doprovázející chorobu se projevují zejména poruchou paměti a dalších kognitivních funkcí. Současná léčba spočívá pouze v oddálení progresu onemocnění za použití kognitiv – inhibitorů acetylcholinesterasy (dříve – takrinu, dnes – donepezilu, rivastigminu a galantaminu) a NMDA (N-methyl-D-aspartát) antagonisty memantinu. Cílem této práce bylo zhodnocení potenciálního příznivého účinku tří vybraných inhibitorů acetylcholinesterasy takrinu, rivastigminu a donepezilu na farmakologicky vyvolanou kognitivní poruchu u laboratorního potkana. Efekt léčiv při korekci kognitivního deficitu vyvolaného látkou 3-quinuclidinyl benzilátem byl zkoumán pomocí dvou odlišných behaviorálních metodik - vodního bludiště a pasivního vyhýbání. Metoda vodního bludiště je zaměřena na studium prostorové orientace, zatímco test pasivního vyhýbání patří mezi metody emotivního učení. Zvolené testy byly založeny na odlišných principech a cílových strukturách mozku a jejich kombinace tak umožňovala komplexnější pohled na srovnání účinku vybraných látek. Z testů vyplývá, že nejlepší výsledky bylo dosaženo u rivastigminu, který byl efektní u obou zvolených metod, což bylo dáno zřejmě především jeho komplexními účinky

jako duálního inhibitoru (inhibice acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy). Naopak nejslabší efekt vykazoval takrin, který působí především na periférii než v centrálním nervovém systému (vyšší afinita především k butyrylcholinesterase). Donepezil vykazoval slibné účinky ve vodním bludišti, avšak v testu pasivního vyhýbání nebyl pozorován výrazný efekt (vyšší afinita především k acetylcholinesterase).

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Stela Pavlíčková

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

Supervisor specialist: RNDr. Jan Misík, Ph.D.

Title of rigorosa thesis: Comparison of efficacy of acetylcholinesterase inhibitors tacrine, rivastigmine and donepezil for the treatment of cognitive disorders induced by 3-quinuclidinyl benzylate in rat

Alzheimer's disease is a severe neurodegenerative disorder connected with neuronal death, brain tissue loss and functional disruption of the cholinergic system. Pathophysiological changes are manifested especially as deterioration of memory and other cognitive functions. Current treatment consists mainly of pro-cognitive drugs – acetylcholinesterase inhibitors (previously - tacrine, today - donepezil, rivastigmine and galantamine) and NMDA (N-methyl-D-aspartate) antagonist memantine which can delay the disease progression. The aim of this study was to evaluate the therapeutic effect of three selected acetylcholinesterase inhibitors - tacrine, rivastigmine and donepezil on pharmacologically induced cognitive disorder in rats. As an amnesic drug, 3-quinuclidinyl benzylate was used and the effect of selected inhibitors was investigated using two different behavioral methods - water maze and passive avoidance test. The method of the water maze was focused on the study of spatial orientation, while the passive avoidance test belongs to the methods of emotional learning. Selected tests were based on different principles and target structures of the brain so their combination allowed us more comprehensive investigation. Best results were achieved with rivastigmine which was effective in both tests probably due to its properties such as dual inhibition effect (inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase)

which favorize rivastigmine against both other drugs. Weakest effect showed tacrine which acts primarily in the periphery than in the central nervous system (especially higher affinity to butyrylcholinesterase). Donepezil showed promising activity in the water maze, but there was no significant effect in the passive avoidance test (higher affinity to acetylcholinesterase).

OBSAH

1 SEZNAM ZKRATEK.....	1
2 ÚVOD.....	2
3 TEORETICKÁ ČÁST.....	4
3.1 KOGNITIVA.....	4
3.1.1 <i>Acetylcholin</i>	5
3.1.2 <i>Cholinergní hypotéza</i>	9
3.1.3 <i>Cholinesterasy</i>	10
3.2 INHIBITORY CHOLINESTERAS.....	11
3.2.1 <i>Takrin</i>	12
3.2.2 <i>Donepezil</i>	13
3.2.3 <i>Rivastigmin</i>	15
3.3 ALZHEIMEROVA CHOROBA.....	17
3.3.1 <i>Příčiny</i>	17
3.3.2 <i>Patofyziologie</i>	18
3.3.3 <i>Léčba a diagnostika</i>	21
3.4 MODELY PRO TESTOVÁNÍ LÉČIV ALZHEIMEROVY CHOROBY.....	22
3.4.1 <i>Genetické modely</i>	23
3.4.2 <i>Senescenční modely</i>	23
3.4.3 <i>Farmakologické modely</i>	23
3.4.3.1 <i>3-quinuclidinyl benzilát</i>	24
3.5 MOŽNOSTI PREKLINICKÉHO TESTOVÁNÍ.....	25
3.5.1 <i>Morrisovo vodní bludiště</i>	26
3.5.1.1 <i>Princip vodního bludiště</i>	26
3.5.2 <i>Metoda vyhýbání</i>	28
3.5.2.1 <i>Pasivní vyhýbání</i>	28
4 CÍL PRÁCE.....	30
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
5.1 METODIKA.....	31
5.1.1 <i>Chemikálie, jejich původ</i>	31
5.1.2 <i>Laboratorní zvířata</i>	31
5.1.3 <i>Přístroje</i>	32
5.1.4 <i>Metodika vodního bludiště</i>	32
5.1.5 <i>Metodika pasivního vyhýbání</i>	33
5.1.6 <i>Statistická analýza</i>	34
6 VÝSLEDKY.....	35
7 DISKUZE.....	47

8 ZÁVĚR.....	50
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ.....	51

1 SEZNAM ZKRATEK

A β	β amyloid
acetyl-CoA	acetyl koenzym A
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidový prekurzorový protein
BChE	butyrylcholinesterasa
ChAT	cholinacetyltransferasa
CNS	centrální nervový systém
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
FDA	Food and Drug Administration
i.m.	intramuskulární podání
i.p.	intraperitoneální podání
M	muskarinový receptor
MMSE	Mini-Mental State Examination
NFT	neurofibrilární klubka
N _M	nikotinový receptor muskulární
NMDA	N-methyl-D-aspartát
N _N	nikotinový receptor neuronální
QNB	3-quinuclidinyl benzilát
T-protein	tau protein

2 ÚVOD

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které představuje obrovský zdravotnický problém. Odhaduje se, že touto chorobou trpí na celém světě přibližně 44 milionů lidí, přičemž se tento počet každých 20 let zdvojnásobuje a v roce 2050 bude pravděpodobně až trojnásobný (Alzheimer's Association, 2014). Nárůst výskytu neurodegenerativních chorob lze předpokládat vzhledem k celkovému stárnutí populace, přesné příčiny však nejsou zcela zřejmé. Při Alzheimerově chorobě dochází k degenerativnímu zániku neuronů, úbytku mozkové tkáně a narušení funkce cholinergního systému. Patofyziologické změny doprovázející tuto chorobu se projevují zejména poruchou paměti a dalších kognitivních funkcí omezujících každodenní aktivity pacientů. I přes značný pokrok v oblasti medicíny nebyl dosud objeven lék, který by tuto chorobu vyléčil. Současná léčba spočívá pouze v oddálení progresu onemocnění za použití kognitiv - inhibitorů acetylcholinesterasy (dříve – takrinu, dnes – donepezilu, rivastigminu a galantaminu) a NMDA (N-methyl-D-aspartát) antagonisty memantinu.

Z hlediska vývoje a preklinického testování nových léčiv ve výzkumu Alzheimerovy choroby je k dispozici několik obecně uznávaných modelů. Jedním z prvních a dosud často využívaných přístupů je farmakologické ovlivnění cholinergního systému experimentálních zvířat. Tento model vychází z cholinergní hypotézy rozvoje Alzheimerovy choroby a našel uplatnění především v oblasti testování inhibitorů cholinesterasy. Je všeobecně známé, že farmakologický zásah do centrálního cholinergního systému použitím anticholinergik (atropin, skopolamin, 3-quinclidinyl benzilátu - QNB) má vliv na učení a paměť. Nedostatek cholinergního přenosu je spojený s behaviorálními změnami a poruchami kognitivních funkcí, které připomínají typický průvodní znak neurodegenerativních onemocnění. Tyto poruchy lze s použitím inhibitorů cholinesteras zlepšit.

V současné době existují různé inhibitory cholinesterasy, které se vzájemně liší svými biologickými, fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Na základě těchto odlišných vlastností nás zajímalo, jestli můžeme s použitím

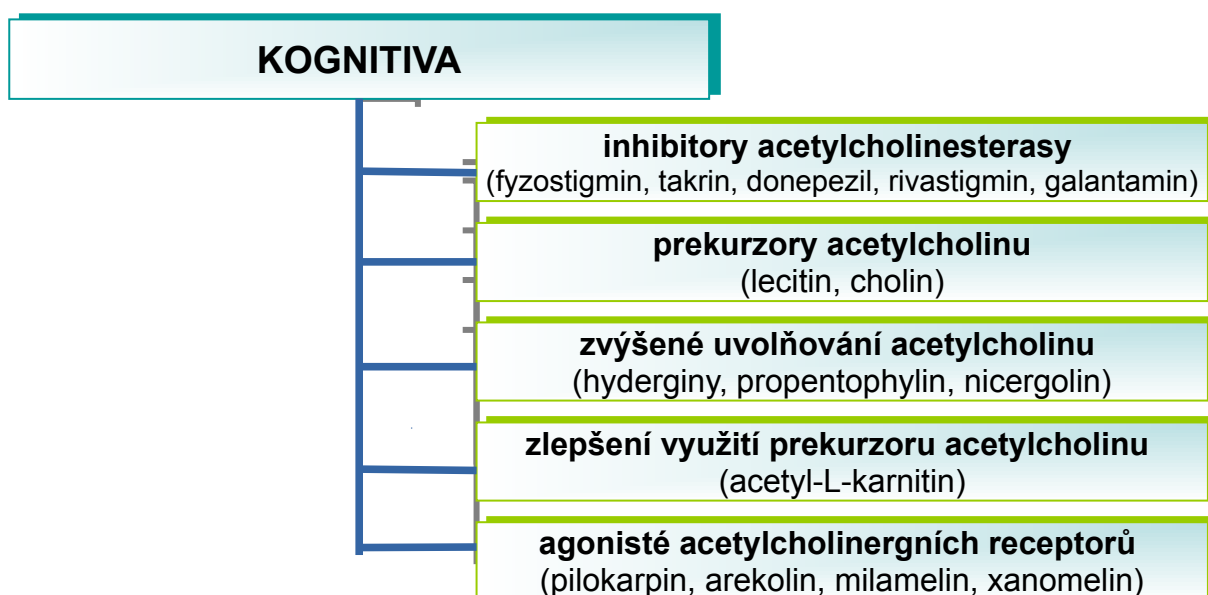
behaviorálních metod (Morrisova vodního bludiště, Pasivního vyhýbání) odhalit kromě samotné inhibice i jejich další potenciální rozdíly v účinnosti při léčbě kognitivních poruch. Toho by se dalo dále využít jako standardu pro srovnání účinnosti nově syntetizovaných léčiv, odvozených od testovaných struktur.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Kognitiva

Jako kognitiva se označují látky, které zlepšují pozornost a paměťové schopnosti především svým cholinomimetickým působením, případně i dalšími účinky (Obr. 1). Správná funkce cholinergního systému mozku je nezbytná pro paměťové funkce a pro udržení kvalitativní úrovně vědomí (Lincová et al. 2007). Nejlépe se osvědčily látky posilující transmitterové funkce acetylcholinu (ACh) inhibicí acetylcholinesterasy (AChE), enzymu jeho biodegradace – tzv. inhibitory acetylcholinesterasy (Lincová et al. 2007).

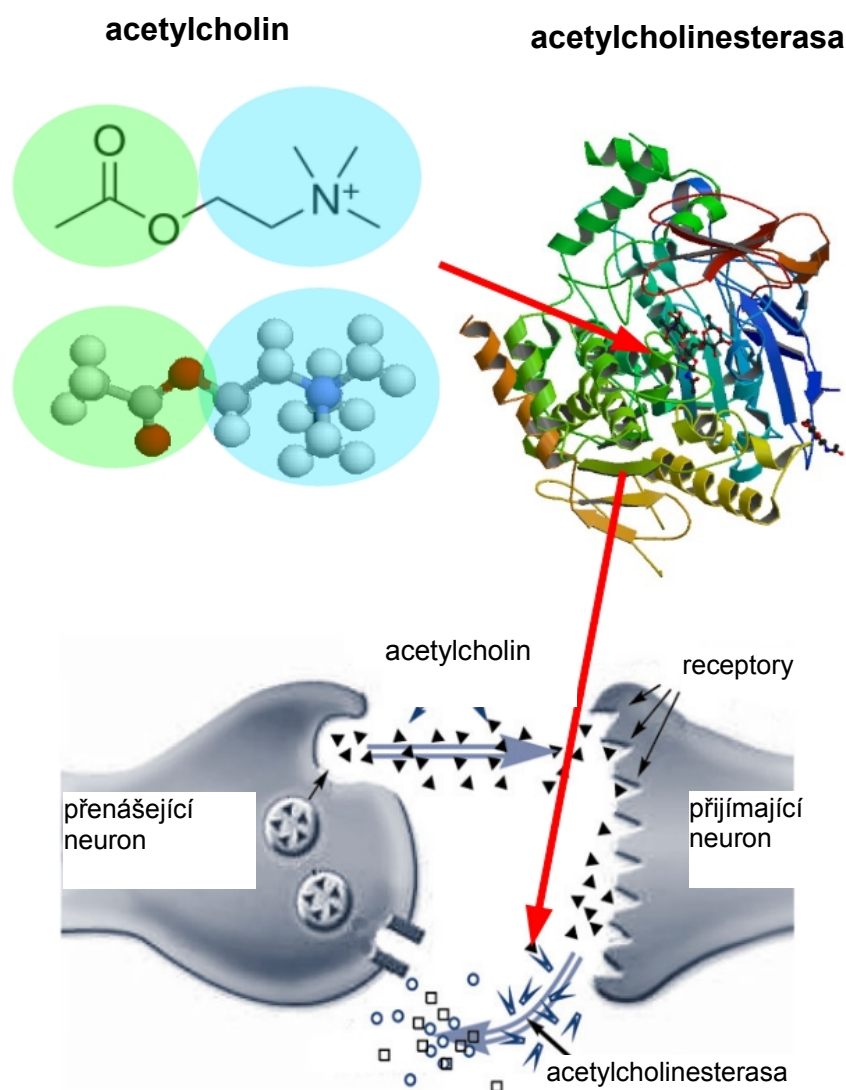
Další ze zkoušených možností cholinergního léčebného působení je podávání prekurzorů ACh nebo látek zvyšujících jeho uvolňování či látek zlepšujících vstup prekurzoru ACh do neuronů. Tyto přístupy se dosud však klinicky jednoznačně neuplatnily, stejně jako případná stimulace cholinergních receptorů (Lincová et al. 2007).



Obr. 1 Rozdělení kognitiv

3.1.1 Acetylcholin

ACh je neurotransmitter a neuromodulátor vegetativního nervového systému i CNS (centrálního nervového systému). Jedná se o malou molekulu složenou z acetylu a cholinu. Tato molekula obsahuje dvě velmi důležitá a prostorově oddělená místa, která jsou významná pro vazbu na cholinergní receptor – pozitivně nabitý dusík a esterický podíl s negativním parciálním nábojem. Je možné, že hydrofobními interakcemi přispívá k vazbě také methylenový řetězec (Obr. 2). Životnost komplexu ACh s receptorem se pohybuje v rozsahu milisekund (Lincová et al. 2007, Lüllmann et al. 2004).

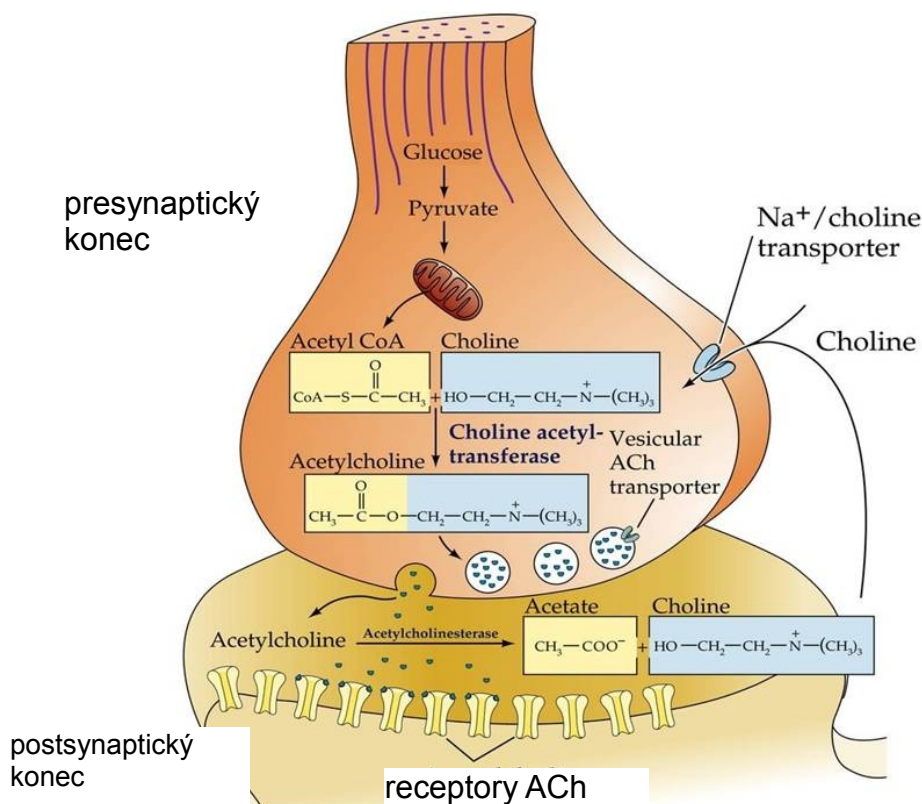


Obr. 2 Acetylcholin

Převzato z: Anonym (2014)

ACh je mediátorem nervosvalového spojení, pregangliových parasympatických a sympatických vláken, postgangliových sympatických vláken inervujících potní žlázy a postgangliových parasympatických vláken. V CNS je zodpovědný za operační paměť, schopnost učení, motoriku a pozornost (Lincová et al. 2007, Rokyta 2000).

Je syntetizován v cytoplazmě presynaptických neuronů z acetyl-CoA (acetyl koenzym A) a cholinu prostřednictvím velice specifického enzymu ChAT (cholinacetyltransferasy). Tento enzym přenáší acetylovou skupinu z acetyl-CoA na cholin za vzniku ACh. ACh je poté pomocí speciálních transportérů přenášen do vezikul neuronu, kde dochází k jeho skladování. Pouze malá část se vyskytuje extravezikulárně. V důsledku změny akčního potenciálu dochází k jeho vyplavení do synaptické štěrbině, kde se naváže na receptory. Účinek ACh je však rychle ukončen cholinesterasami, které ho rozkládají zpět na cholin a kyselinu octovou. Cholin je poté zpětně vycytáván a použit k další syntéze ACh (Obr. 3) (Lincová et. al. 2007, Siegel et al. 1999).



Obr. 3 Cyklus ACh

Převzato z: Anonym (2001)

ACh uvolněný nervovou stimulací vyvolává periferní účinky interakcí se dvěma základními typy acetylcholinových receptorů – receptory muskarinovými a nikotinovými. Byly identifikovány dva podtypy nikotinových a pět podtypů muskarinových receptorů. Tato heterogenita cholinergních receptorů umožňuje rozsáhlou škálu účinků ACh a cholinergní stimulace (Lincová et al. 2007).

Nikotinový receptor je spojen napětově řízenými iontovými kanály a strukturně se dělí na dva podtypy – neuronální N_N , který se nachází ve vegetativních gangliích a v CNS; a muskulární N_M , který je přítomný na nervosvalové ploténce. Oba typy těchto receptorů mají podobnou molekulární strukturu. Na rozdíl od nikotinových receptorů, po navázání ACh na muskarinové receptory, které jsou spřaženy s G-proteinem, dochází ke spuštění signální kaskády a tvorby dalších signálních molekul. Jejich odpověď na stimulaci je tedy daleko pomalejší. Celkem bylo identifikováno pět podtypů muskarinových receptorů (M_{1-5}). $M_{2,4}$ mají inhibiční odpověď a $M_{1,3,5}$ excitační. Tyto receptory se nachází na postsynaptických buněčných membránách efektorových orgánů ovlivněných parasymptikem a v CNS. Funkční význam je nejlépe definován u receptorů $M_{1,2,3}$. Po aktivaci receptorů dochází k různým účinkům a funkcím, které jsou popsány v tabulce (Tab. 1) (Lincová et al. 2007, Siegel et al. 1999).

Účinky ACh se dají farmakologicky napodobit dvěma základními způsoby. Přímá parasymptomimetika působí na stejné cílové místo jako ACh, tj. na muskarinový receptor. Prakticky se osvědčují pouze takové látky, které jsou rozkládány cholinesterasou pomaleji než ACh, nebo které se nerozkládají vůbec. Naopak nepřímá parasymptomimetika (inhibitory cholinesterasy) inhibují cholinesterasu a tím blokují rozklad tělu vlastního ACh (Lüllmann et al. 2004).

Tab. 1 Podtypy acetylcholinových receptorů

receptory	nikotinové		muskarinové		
	muskulární	neuronální	M ₁ neuronální	M ₂ kardiální	M ₃ hladké svaly/žlázy
hlavní lokalizace	nervosvalová ploténka	ganglia CNS senzorická nervová zakončení	CNS (mozková kůra, periferní neurony aj.) parietální buňky žaludku	srdce - síně - SA, AV uzel - srdeční komory presynaptická nervová zakončení	exokrinní žlázy hladké svaly endotel ..
účinek na úrovni buňky	Otevření iontového kanálu pro kationty, depolarizace buněčné membrány - excitace		stimulace PLC (IP ₃ , DAG) ↑ Ca ²⁺ ; ↓ permeability pro K ⁺ , depolarizace, excitace	↓ aktivity AC (↓ cAMP- ↓ Ca ²⁺), aktivace K ⁺ -kanálu inhibice	aktivace PLC (IP ₃ , DAG) ↑ Ca ²⁺ stimulace
funkce	nervosvalový přenos	neurotransmise v gangliích; presynaptická facilitace v CNS	CNS excitace (paměť); žaludek (sekrece HCl); zvýšení motility GIT	- srdce – inhibice - presynaptická inhibice - neuronální inhibice	Sekrece kontr. hladkých svalů, GIT aj. vazodilace (NO)

AV – atrioventrikulární, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, DAG – diacylglycerol, IP₃ – inositoltrifosfát, NO – oxid dusný, PLC – fosfolipasa C, SA - sinoatriální

Převzato z: Lincová et al. (2007)

3.1.2 Cholinergní hypotéza

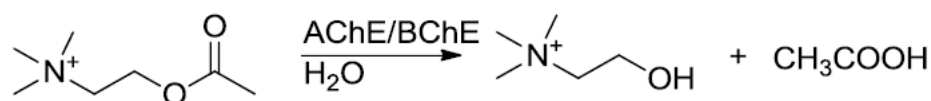
Cholinergní hypotéza, publikovaná roku 1982 Bartusem et al., se snažila objasnit poruchy učení, paměti a celkový kognitivní úpadek u Alzheimerovy choroby. Předpokládalo se, že za kognitivní symptomy u Alzheimerovy choroby je zodpovědný právě deficit cholinergní neurotransmise. Cholinergní úbytek přispívá ke kognitivním poruchám, jako jsou pokles koncentrace, pozornosti a rychlosti zpracování informace, poruchám učení a paměti a dále nemalou mírou také k poruchám chování. Tato hypotéza vychází z nálezu poklesu počtu cholinergních neuronů v mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou. Experimentálními studii bylo dále zjištěno, že blokací cholinergních receptorů skopolaminem je vyvoláno podobné zhoršení paměti jako u Alzheimerovy choroby. Následným podáním cholinergní látky fyzostigminu se tento proces zvrátil a došlo ke zlepšení paměti, což podporuje důležitou roli ACh v procesu učení a paměti. Při dalším podrobnějším zkoumání mozků pacientů s Alzheimerovou chorobou byl objeven úbytek aktivity a množství ChAT a dále snížení zpětného vychytávání cholinu presynaptickými neurony oproti fyziologickému stavu. Při Alzheimerově chorobě tedy dochází k postižení všech oddílů cholinergního systému – nacházíme snížení celkového množství neuromediátoru ACh, deficit ChAT, která je odpovědná za syntézu ACh a také úbytek AChE, enzymu, který ACh odbourává. Je zajímavé, že hladina dalšího enzymu odbourávajícího ACh, BChE (butyrylcholinesterasy) významně a progresivně stoupá (Bartus et al. 1982, Davies et al. 1976, Aigner et al. 1986, Wilcock et al. 1982, Brunovský 2007, Craig et al. 2011).

Hypotéza cholinergní neurotransmise byla základem pro vývoj presynaptické, synaptické a postsynaptické léčby určené k posílení a udržení aktivity zbývajícího cholinergního systému. Ukázalo se, že inhibice cholinesterasy je oproti přímé terapii agonisty receptorů mnohem lépe snášena a je také výhodnější z důvodu zesílení přirozeného fázického uvolňování ACh na rozdíl od celkové tonické stimulace muskarinových a nikotinových receptorů. Z tohoto důvodu se nejdůležitějšími látkami k ovlivnění rozvoje Alzheimerovy choroby a posílení kognitivních funkcí stala nepřímá cholinomimetika –

inhibitory AChE. Klinické studie prokázaly výrazné zpomalení progresu a zlepšení kognitivních funkcí při podávání inhibitorů AChE oproti placebo. Inhibitory oddalují progresi symptomů, zlepšují denní aktivity i neuropsychiatrické symptomy. Bohužel tento efekt není trvalý a nemoc dále progreduje (Wilcock et al. 1982, Brunovský 2007, Craig et al. 2011).

3.1.3 Cholinesterasy

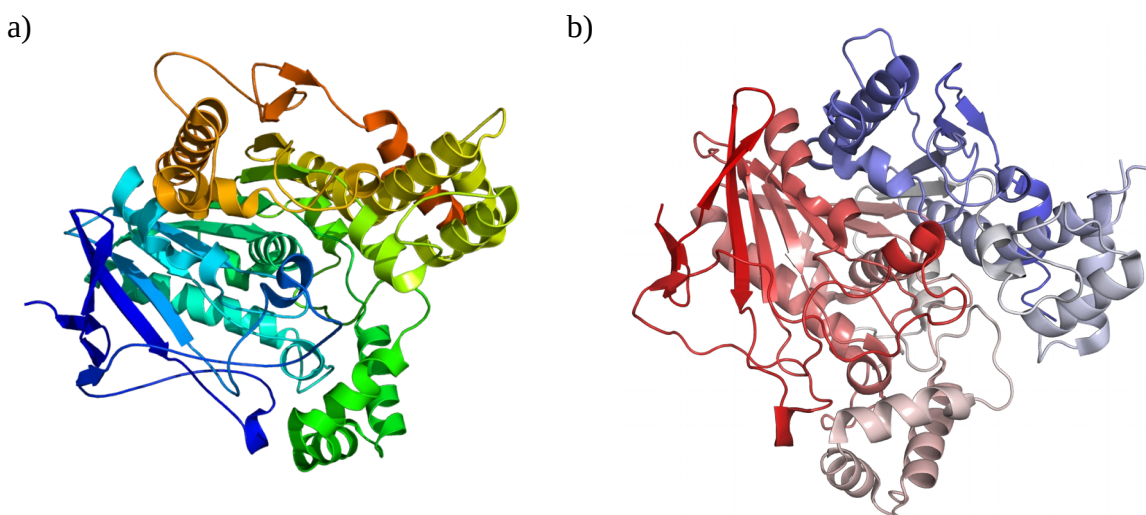
Cholinesterasy jsou hydrolytické enzymy, jejichž primární funkcí je katalytická hydrolýza ACh na cholin a kyselinu octovou (Obr. 4) a tím dochází k ukončení jeho působení v synapsi. Jedná se o základní proces umožňující obnovu cholinergního systému. Cholinesterasy mohou případně hydrolyzovat i jiné objemnější substráty (Pohanka 2011).



Obr. 4 Hydrolýza ACh

Jsou popsány dva základní typy cholinesteras – acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE). Oba enzymy jsou strukturně podobné (Obr. 5), jejich lokalizace a funkce se však liší. Oba enzymy se totiž podílejí na tom, že se ACh nevyskytuje v plazmě v detekovatelných množstvích, působí tedy skutečně pouze jako neurotransmitter, a nikoli jako hormon. Název acetylcholinesterasy je odvozen od jejího přirozeného substrátu – ACh a nachází se v krevních buňkách, cholinergních neuronech a nervových synapsích. AChE se účastní cholinergní neurotransmise, kde hydrolyzuje především ACh uvolněný nervovou stimulací do synaptické štěrbině a uvnitř nervových zakončení odpovídá za rozklad cytoplazmatického ACh. Je pro život nepostradatelná. Druhým degradačním enzymem je méně substrátově specifická tzv. pseudocholinesterasa (BChE, plazmatická cholinesterasa),

kteřá přednostně rozkládá jiné substráty než ACh (např. butyrylcholin, suxamethonium, procain, propanidid). Nachází se v tělesných tekutinách včetně krve. Ve srovnání s AChE není důležitost BChE zatím plně pochopena, může hrát roli jako reverzní cholinesterasa v případě inhibice AChE. (Lincová et al. 2007, Pohanka 2011).



Obr. 5 AChE (a) a BChE (b)

Převzato z: Anonym (2009)

3.2 *Inhibitory cholinesteras*

Inhibitory cholinesteras jsou širokou skupinou látek s různými biologickými, fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Tyto látky vedou k blokádě enzymů odbourávajících v synaptické štěrbině ACh (AChE a u Alzheimerovy choroby patologicky zmnožené, jinak minoritní BChE), a tím nepřímo zlepšují porušenou acetylcholinergní transmissi. Inhibitory AChE hrají důležitou roli v biochemických procesech lidského těla, což vyplývá z fyziologické důležitosti AChE. Význam inhibice BChE zůstává zatím nejasný, uplatňuje se pravděpodobně jako detoxikační enzym plazmy. Selektivní inhibitory BChE se využívají spíše jen k diagnostice. Bylo prokázáno, že neselektivní inhibitory cholinesteras (např. rivastigmin nebo takrin) mají zpravidla zesílený účinek

na kognitivní funkce (Greig et al. 2002, Jirák 2009, Pohanka 2011).

Inhibitory je možné rozdělit do několika skupin. Podle místa jejich účinku, chemické struktury, selektivity či reversibility inhibice. Nežádoucí účinky inhibitorů vyplývají zejména z jejich nadměrné cholinergní stimulace. Dochází ke zvýšené žlázoové sekreci (pocení, slinění), mióze, zvracení, nevolnosti, křečím v trávicím ústrojí, průjmům, polakisurii a bronchokonstrikci. Ovlivnění srdeční činnosti vede ke snížení srdečního výdeje, k bradykardii a při vyšších dávkách i k poklesu tlaku krve. U látek s centrálními účinky může zpočátku dojít k excitaci, křečím, zmatenosti a nakonec ke kómatu (Lincová et al. 2007).

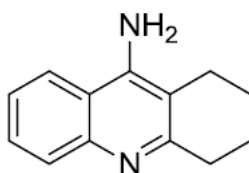
Inhibitory AChE jsou v posledních několika desetiletích jednou z nejstudovanějších skupin léčiv v oblasti zlepšení kognitivních funkcí a léčby symptomů u Alzheimerovy choroby (Jirák 2009).

Dále budou podrobněji popsány tři vybrané inhibitory cholinesteras, které jsme v této práci testovali z hlediska působení na kognitivní funkce - takrin, donepezil a rivastigmin.

3.2.1 Takrin

V roce 1993 byl americkou FDA (Food and Drug Administration) schválen k léčbě Alzheimerovy choroby inhibitor cholinesteras - takrin. Chemicky se jedná o 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (Obr. 6), který byl původně vyvinut jako antibakteriální látka. Takrin je neselektivní, nekompetitivní, reversibilní, duální inhibitor, který blokuje obě cholinesterasy – AChE i BChE, přičemž vykazuje vyšší afinitu k BChE. Maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 1 až 2 hodiny po podání. Takrin je metabolizován v játrech přes cytochrom P450 a jeho terminální eliminační poločas je 2 až 3 hodiny. Průměrná biologická využitelnost takrinu je 17% s variabilitou 2-36% mezi jednotlivými pacienty. Optimální denní dávka pro dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 120-160 mg/den. S ohledem na krátký poločas a vysoký výskyt vedlejších účinků je počáteční dávka nízká a titrována směrem nahoru – 10 mg čtyřikrát denně. Dávka se každé 4 týdny zvyšuje o 10 mg v závislosti na snášenlivosti až k maximální dávce 40 mg čtyřikrát denně. Nejčastějšími nežádoucími účinky

jsou gastrointestinální potíže, které se projevují jako nevolnost, zvracení, anorexie a průjem. Kvůli relativně vysoké hepatotoxicitě, která vyžaduje časté monitorování jaterních transaminás, a častým gastrointestinálním problémům, byl takrin stažen z trhu a dnes se používá spíše jako modelová látka pro výzkum dalších léčiv (Davis et al. 1995, Emilien et al. 2000, Ahmed et al. 2006, Hake 2001).



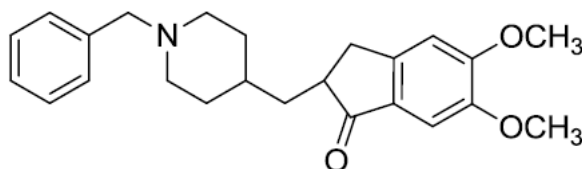
Obr. 6 Takrin

3.2.2 Donepezil

V roce 1997 byl do terapie Alzheimerovy choroby zaveden další inhibitor cholinesteras – donepezil. Chemicky se jedná o 2,3-dihydro-5,6-dimethoxy-2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)methyl]-inden-1(1*H*)-on (Obr. 7). Donepezil je piperidinový derivát, který je schopen nekompetitivně a reverzibilně blokovat centrálně aktivní AChE. Tato inhibice vede ke zvýšené koncentraci ACh v oblasti synaptické štěrbiny, což je velmi užitečné při léčbě stavů, které jsou charakterizovány jeho nedostatkem. V preklinických studiích působil reverzibilní, nekompetitivní a na dávce závislou inhibici AChE a prokázal vyšší účinnost než takrin. Na rozdíl od takrinu je pro donepezil typická poměrně vysoká selektivita k AChE lokalizované v CNS. Naopak vykazuje poměrně malou účinnost v oblasti periferie, účinek na BChE je tedy velmi slabý (Emilien et al. 2000, Jiráček et al. 2004).

Donepezil se v doporučených dávkách (5 – 10 mg/den) velmi dobře vstřebává a dosahuje až 100% biologické dostupnosti. Maximální plazmatická koncentrace je přímo závislá na velikosti podané látky. V plazmě se významně váže na bílkoviny krevní plazmy (z 96%). Donepezil je po podání poměrně intenzivně metabolizován játry (cytochrom P-450) na farmakologicky aktivní metabolity, avšak i přesto zůstává určité, poměrně malé množství nezměněno

v podobně mateřské molekuly. Donepezil je z větší části vyloučen ledvinami (23-57%), pouze 9-15% podané látky se vylučuje stolicí. Na rozdíl od takrinu má dlouhý biologický poločas (70%), což umožňuje dávkování jedenkrát denně. Nejběžnějšími nežádoucími vedlejšími účinky jsou průjmy, nechutenství, nevolnost, zvracení, svalové křeče a únava. Donepezil nevykazuje hepatotoxické působení, proto není nutné sledovat hladiny jaterních enzymů (Hake 2001, Jiráček et al. 2004).



Obr. 7 Donepezil

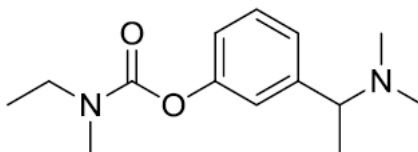
V četných preklinických studiích byl prokázán pozitivní účinek donepezilu v souvislosti s léčbou výrazného omezení úbytku paměti. Minimální účinná dávka donepezilu vedoucí ke zvrácení indukovaného paměťového deficitu byla oproti takrinu ve většině provedených studií prokazatelně nižší. Nicméně v jedné studii byla dávka obou látek identická, a to i navzdory subkutánnímu podání takrinu. V dalších studiích donepezil významně zeslaboval skopolaminem navozené zhoršení výkonnosti v různých behaviorálních testech na laboratorních potkanech. V porovnání s takrinem bylo k dosažení srovnatelné účinnosti dostačující podání trojnásobně nižší dávky (Kirkby et al. 1996, Dooley et al. 2000, Jiráček et al. 2004).

Donepezil je indikován u střední a mírné Alzheimerovy choroby, u demence s Lewyho tělísky a jeho pozitivní vliv je sledován u i vaskulárních demencí, Parkinsonovy choroby a Downova syndromu (Jiráček et al. 2004)

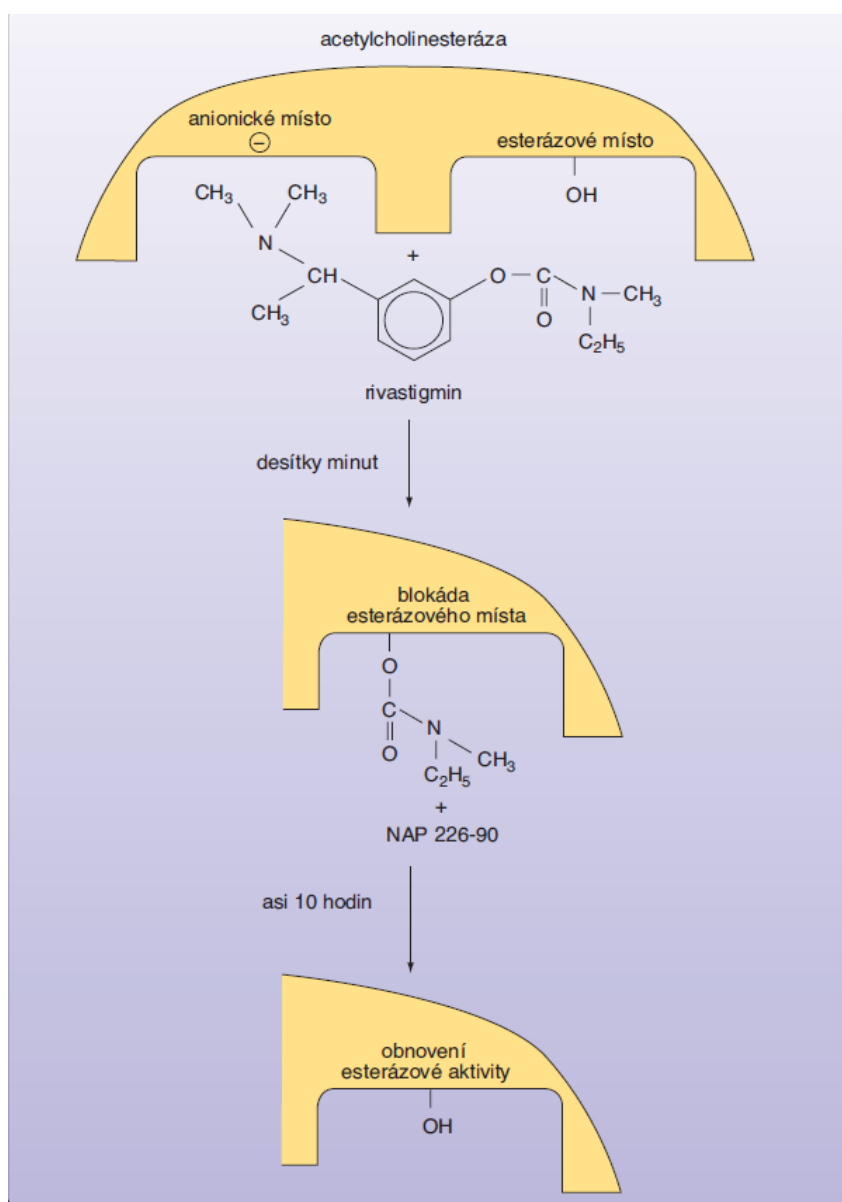
3.2.3 Rivastigmin

V roce 2000 byl schválen a zaveden do léčby Alzheimerovy choroby další cholinesterasový inhibitor – rivastigmin. Tato látka patří do skupiny karbamátů a chemicky se jedná o (S)-{3-[α -(dimethylamino)ethyl]fenyl}-N-ethyl-N-methylkarbamát (Obr. 8). Rivastigmin je středně dlouhodobě působící pseudoireversibilní inhibitor AChE i BChE, který se váže do esterové části enzymu. Pseudoireversibilní inhibice AChE spočívá v dlouhodobé inhibici enzymu i v době, kdy již byl inhibitor eliminován z organismu. Rivastigmin se váže do aktivního místa enzymu a je štěpen za vzniku metabolitu, který je okamžitě vyloučen ledvinami. Aktivní místo enzymu je však ještě několik hodin blokováno karbamátovým zbytkem rivastigminu (Obr. 9). Inhibice trvá přibližně 10 hodin. Na rozdíl od ostatních karbamátů vykazuje rivastigmin mnohem větší účinnost na G_1 monomerní AChE, která má v mozku u pacientů s Alzheimerovou chorobou zvýšenou roli. G_1 je totiž v mozku zdravého člověka zcela minoritní, ale v mozku člověka s Alzheimerovou chorobou její podíl výrazně roste (Jirák et al. 2003, Rakonczay 2003).

Rivastigmin se po perorálním podání dobře a rychle absorbuje (více než 96% podané látky). Biologická dostupnost se pohybuje přibližně kolem 35% a je do značné míry ovlivněna first-pass efektem (prvním průchodem játry). Vazba na plazmatické bílkoviny je poměrně nízká – 40%, ve stejné míře se rivastigmin váže na erythrocyty. Biotransformace probíhá rychle a intenzivně zejména v játrech, v menší míře i v tenkém střevě. Z organismu je eliminován poměrně rychle ledvinami (až z 90%). Biologický poločas se pohybuje v závislosti na typu podání mezi 1,4 až 1,7 hodiny. Protože se na biotransformaci enzymatický systém cytochromu P-450 prakticky nepodílí, nevzniká riziko klinicky významných interakcí. Hlavními nežádoucími účinky rivastigminu je nevolnost, průjem a zvracení, které lze do jisté míry ovlivnit titrací dávky. Počáteční dávka rivastigminu je 1,5 mg dvakrát denně. Každé 2 až 4 týdny by měla být dvakrát zvýšena o 1,5 mg až na maximální dávku 6 mg dvakrát denně (Hake 2001, Jirák et al. 2003).



Obr. 8 Rivastigmin



Obr. 9 Schéma pseudoireversibilní inhibice AChE rivastigminem

Převzato z: Jiráček et al. (2003)

Léčiva takrin, donepezil a rivastigmin našly své uplatnění především v léčbě Alzheimerovy choroby. U nejdříve používané látky takrinu se však objevují závažné nežádoucí účinky, zejména hepatotoxické, proto se dnes v léčbě již nevyužívá. Později uvedený rivastigmin a donepezil jsou v tomto ohledu výhodnější a v terapii se používají dodnes.

3.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které jako první popsal roku 1906 německý psychiatr Alois Alzheimer. Jedná se o chronické, progresivní onemocnění nervové soustavy na podkladě degenerativního zániku neuronů s charakteristickými histopatologickými změnami. Alzheimerova choroba představuje nejčastější formu demence – syndromu, který se projevuje poruchou paměti (zejména krátkodobé), doprovázené narušením některé z dalších kognitivních funkcí (afázie, apraxie, agnózie, exekutivní dysfunkce), omezením každodenních aktivit a často i výskytem přidružených behaviorálních symptomů (Höschl 1999, Brunovský 2007, Pohanka 2012).

V současné době Alzheimerova choroba představuje velký zdravotnický a socioekonomický problém a přináší obrovskou zátěž pro zdravotnické systémy vyspělých zemí.

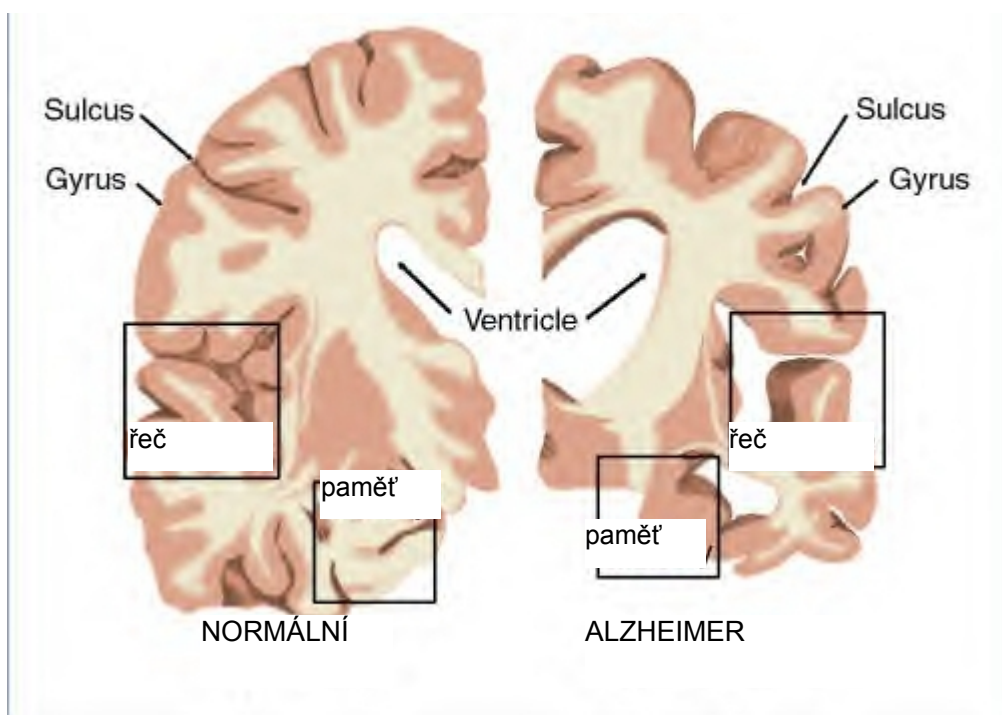
3.3.1 Příčiny

Příčiny Alzheimerovy choroby nejsou dosud plně objasněny. Panuje však shoda, že se jedná o multifaktoriální onemocnění, ve kterém hrají svou roli vnější i vnitřní faktory. Jedním z nejrizikovějších faktorů pro vznik choroby je věk. Incidence s věkem prudce narůstá a od 65. roku je odhadováno, že touto nemocí trpí každý osmý člověk. Dalšími důležitými faktory jsou genetická zátěž, cerebrovaskulární onemocnění, kardiovaskulární choroby, obezita, dyslipidemie, diabetes, špatné návyky (alkohol, kouření) či traumata mozku. Naopak protektivně pravděpodobně působí psychická i fyzická aktivita, vyšší

vzdělání a vyvážená strava typu středomořské diety (Qiu et al. 2007, Mayeux a Yaakov 2012, Reitz a Mayeux 2014).

3.3.2 Patofyziologie

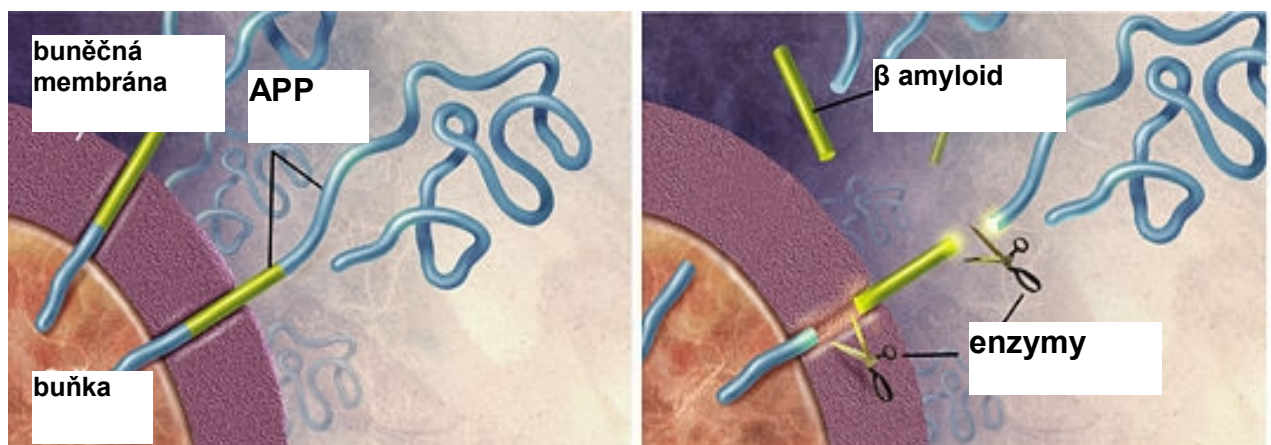
Patofyziologie Alzheimerovy choroby je velmi komplexní a stále ne plně objasněna. V průběhu onemocnění dochází k poškození převážné části mozku a transmitterových systémů. Základním jevem je postupná ztráta mozkové tkáně a naopak zvětšování mozkových komor a množství mozkomíšního moku (Obr. 10). Příčin degenerace neuronů se zdá být několik. Klíčovými patologickými změnami je hromadění β amyloidu ($A\beta$) a výskyt hyperfosforylovaného τ -proteinu (tau protein) (Braak a Tredici 2012, Mayeux a Reitz 2014).



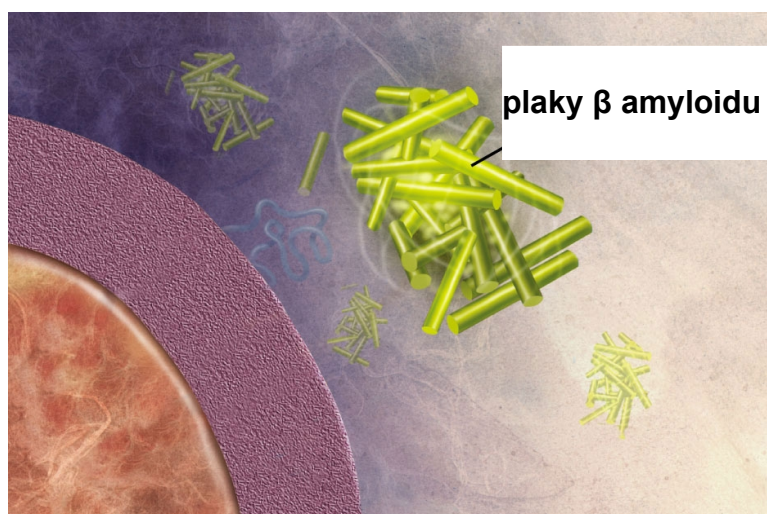
Obr. 10 Příčný řez mozkiem pacienta s Alzheimerovou chorobou (vpravo) v porovnání se zdravým mozkiem (vlevo)

Převzato z: Anonym (2010)

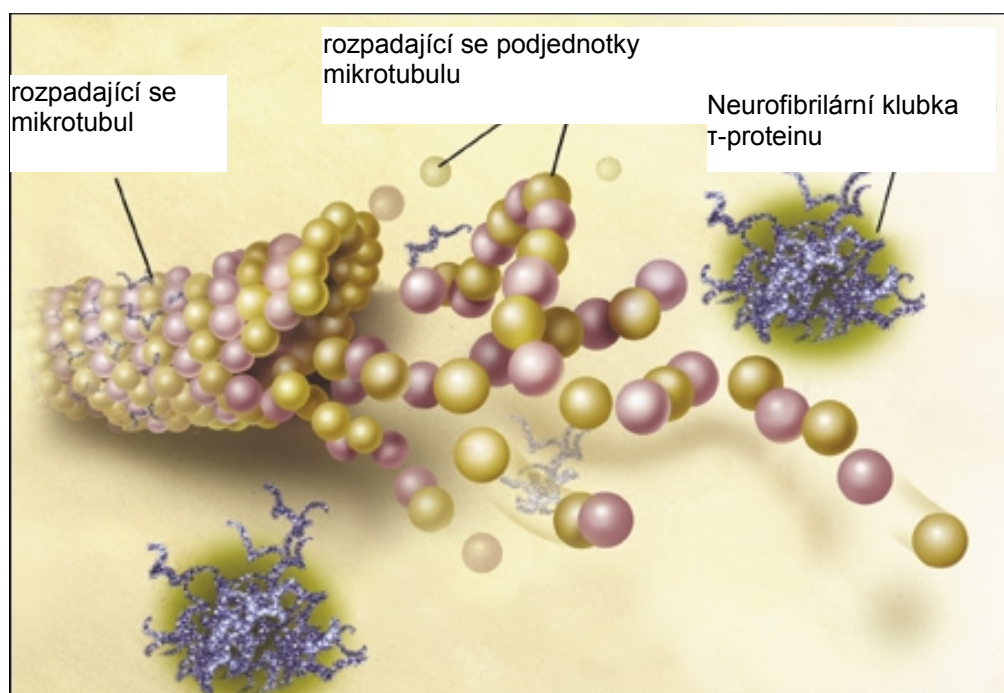
Faktorem nejčastěji spojovaným se vznikem Alzheimerovy choroby je tvorba a ukládání A β plaků v mozkové tkáni. A β vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je za normálních podmínek štěpen enzymem α -sekretasou na kratší fragmenty. Tyto krátké fragmenty se podílí na neuroplasticitě a pravděpodobně působí neuroprotektivně. Za patologických okolností je však APP štěpen β - a γ -sekretasou na delší fragmenty (Obr. 11), které jsou nerozpustné, koagulují a polymerují v A β . Ten se ukládá v cévách a v neuropilu, kde vytváří tzv. Alzheimerovské plaky (neuritické plaky) (Obr. 12). V oblasti plaků dochází k neurodegeneraci a k odumírání neuronů, tvorbě sterilního zánětu a gliového lemu. Intraneuronálně dále dochází k degeneraci τ -proteinu. τ -protein se v částečně fosforylovaném nebo defosforylovaném stavu váže na mikrotubuly, které zpevňuje. Za patologických okolností jsou z τ -proteinu odštěpovány krajní aminokyseliny a dochází k hyperfosforylaci. Takto pozměněný τ -protein vytváří v neuronech tzv. neurofibrilární klubka (NFT) (Obr. 13), čímž narušuje cytoarchitektoniku buňky a tím může způsobit její smrt (Revet et al. 2012; Braak a Tredici 2012). Navíc je přítomnost NFT a neuritických plaků spojena se silným oxidačním stresem okolních struktur včetně DNA (deoxyribonukleová kyselina) ostatních buněk a také s imunitní odpovědí, která často vede ještě k dalším poškozením (Akiyama et al. 2000, Cameron a Landreth 2010, Sardi et al. 2011, Braak a Tredici 2012, Zhao a Zho 2013).

Obr. 11 Štěpení APP na A β

Převzato z: Anonym (2013)

Obr. 12 Plaky A β

Převzato z: Anonym (2013)

Obr. 13 Neurofibrilární klubka τ -proteinu

Převzato z: Anonym (2013)

K poškození neuronů dále dochází také působením excitačních aminokyselin, zejména glutamátu, který je hlavním excitačním neuromediátorem CNS. V mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou bývají hladiny těchto aminokyselin nedostatečně regulovány a při jejich vazbě na ionotropní receptory dochází k nadměrnému influxu vápenatých iontů do neuronu, který vede k apoptóze buňky. Tento mechanismus je důležitý, protože glutamátové NMDA receptory lze farmakologicky blokovat a poskytovat tak účinnou neuroprotektivní léčbu (Revett et al. 2012).

3.3.3 Léčba a diagnostika

Léčba Alzheimerovy choroby je velmi problematická. Absence kauzální terapie vede pouze ke zpomalování progresu onemocnění pomocí inhibitorů AChE (kognitiv) a antagonistů NMDA receptorů. Inhibitory AChE donepezil, rivastigmin a galantamin jsou určeny k léčbě mírné až středně závažné demence, NMDA antagonistem memantin je určen pro střední až těžké demence. Tato farmakologická léčba je ale málo výhodná, protože přináší oddálení těžkých stádií maximálně o dva roky, navíc není účinná u všech pacientů a je také finančně náročná. Součástí léčby bývají většinou antidepresiva, neuroleptika a anxiolytika, která tlumí další přidružené symptomy (Höschl a Hořejší 1999, Jiráček 2009).

V současné době je ve vývoji velké množství látek, především chorobu modifikujících léčiv například na bázi modifikace nebo ovlivnění tvorby A β , τ -proteinu, od kterých je očekávána mnohem vyšší účinnost a zastavení progresu onemocnění (Holtzman et al. 2011).

Nicméně je pro úspěšnou léčbu velmi důležitá včasná diagnóza. Základem pro odhalení pacientů s demencí jsou orientační kognitivní a paměťové testy. Nejrozšířenějším testem je Mini-Mental State Examination (MMSE), který dokáže odhalit pacienta s demencí od normální populace. Tyto testy bohužel selhávají v diagnostice časných stádií nemoci, kdy už ale bývá mozek často nevratně poškozen. Proto jsou tyto testy brány pouze jako orientační a je nutné je doplnit o další speciální metody jako jsou například

magnetická rezonance mozku nebo vyšetření mozkomíšního moku, které jsou mnohem citlivější a dokáží odhalit počáteční Alzheimerovu chorobu před prvními kognitivními příznaky (Pidrman 2007, Ressler et al. 2009, Alzheimer's Association 2014).

3.4 Modely pro testování léčiv Alzheimerovy choroby

Jak již bylo popsáno výše představují neuropsychiatrické poruchy závažný zdravotní problém. Mají negativní vliv na kvalitu života a jsou obrovskou sociálně-ekonomickou zátěží. Pochopení toho, co se skutečně děje v CNS je stále velmi omezené, zejména ve vztahu k normálnímu a patologickému chování. Dosud není plně objasněno mnoho patogenních mechanismů neurodegenerativních onemocnění, což zabraňuje jejich kauzální léčbě. Symptomatická léčba často vede k nedostatečným terapeutickým výsledkům a v mnoha případech je doprovázena závažnými vedlejšími účinky. Pro pochopení mechanismů onemocnění a hledání dalších nových léčiv lze v preklinickém výzkumu využít testování na zvířatech (Stuchlík et al. 2012).

Používání zvířecích modelů, ve kterých se napodobují patologické stavy vyskytující se u cílových subjektů, přispělo a může i nadále významně přispívat k pokroku medicíny. Zvířecí modely jsou výzkumné nástroje ke studiu patofyziologických mechanismů, ale také jsou důležité při hodnocení a rozvoji terapeutických a diagnostických metod a materiálů, jakož i v oblasti vzdělávání a odborné přípravy. Kvalita a užitečnost modelu často závisí na jeho platnosti a posouzení kognitivních schopností v důležitém aspektu validace a experimentálního využití modelů pro studium neurokognitivních poruch. Byla vyvinuta široká škála modelů, ale bohužel dosud neexistuje žádný komplexní ani ideální model, který by bylo možné ve výzkumu plně aplikovat. Nicméně se nabízí mnoho možností a přístupů, které nám umožňují lépe pochopit patogenezí onemocnění i potenciál nových léčiv (D'Hooge a De Deyn 2001, Laurijssens et al. 2013).

3.4.1 Genetické modely

Transgenní technologie poskytuje jedinečnou příležitost využívat při studiu Alzheimerovy choroby geneticky modifikované organismy. Tyto transgenní modely jsou generovány buď zavedením genetické mutace do stávající genetické výbavy nebo mutací genů ve své normální poloze. Například mutací genu APP, který hraje důležitou roli v patofyziologii onemocnění. Nejčastěji používaným druhem pro transgenní modelování je laboratorní myš (Laurijssens et al. 2013).

3.4.2 Senescenční modely

Jednou ze základních limitací u zvířecích modelů, na kterou neustále narážíme, je fakt, že dosud nemáme k dispozici zvířata trpící Alzheimerovou chorobou se všemi jejími rysy a příznaky. Snad nejbližší se z tohoto hlediska jeví přirozené senescenční modely, které vycházejí z komplexu neurodegenerativních změn nastávajících u většiny živočichů v průběhu přirozeného stárnutí. Nelze říci, že by zvířata trpěla Alzheimerovou chorobou v pravém slova smyslu. Jedná se spíše o komplex patofyziologických změn, které stárnutí provázejí a některými svými projevy mohou tuto chorobu připomínat. Jedním z průvodních jevů stárnutí zvířete je zhoršení kognitivních funkcí, což může sloužit jako přirozený model paměťových deficitů a demence (Neha et al. 2014, Misík et al. 2014).

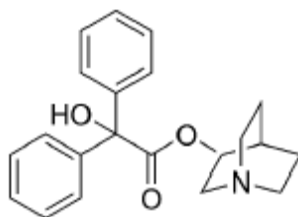
3.4.3 Farmakologické modely

Příznaky podobné projevům neurodegenerativního onemocnění lze u experimentálních zvířat vyvolat vnějším zásahem – např. podáním určitých chemických látek či fyzickým poškozením některých struktur mozku. Experimentální zásahy jsou nejčastěji uskutečněny podáním farmakologické látky, která poruchu vyvolá, což umožňuje následné testování látek, které mohou tento stav zvrátit (Stuchlík et al. 2012). Ve velké míře se v preklinickém

testování nových kognitivních látek používá tropanový alkaloid skopolamin jako standardní model navozující cholinergní amnézii u pokusných zvířat (D'Hooge a De Deyn 2001, De-Mello a Carobrez 2002, Gacar et al. 2011, Falsafi et al. 2012). Skopolamin ovlivňuje cholinergní neurotransmisi prostřednictvím blokády musakrinových receptorů, což vede ke zhoršení kognitivních funkcí. Jako alternativu ke skopolaminu je možné použít další cholinergní antagonisty, např. látku 3-quinuclidinyl benzilát (QNB), trihexyfenidyl, biperiden a další (Krejčová et al. 2004, Kunešová et al. 2008, Misík et al. 2014).

3.4.3.1 3-quinuclidinyl benzilát

QNB (Obr. 14) je esterem kyseliny glykolové a byl původně zkoumán jako spasmolytická látka v léčbě gastrointestinálních potíží. Vzhledem k velkému počtu nežádoucích účinků bylo testování po určité době přerušeno a sloučenina byla předána americké armádě pro případné využití jejich psychomimetických vlastností. Následně byla látka zavedena do výzbroje jako psychicky zneschopňující bojová látka. V roce 1990 byly zásoby QNB oficiálně zničeny, kvůli nepředvídatelným účinkům a v rámci mezinárodní úmluvy o zákazu chemických zbraní. V dnešní době se QNB používá zejména pro identifikaci M-receptorů pomocí několika laboratorních technik. Díky svým psychomimetickým vlastnostem jej lze také využít ke generování kognitivního deficitu u zvířecích modelů neurodegenerativních onemocnění (Misík et al. 2013).



Obr. 14 Chemická struktura QNB

QNB je neselektivní kompetitivní antagonist cholinergních receptorů. Podobně jako některé přírodní alkaloidy, např. skopolamin nebo atropin, QNB soutěží s ACh o místo na muskarinových receptorech v CNS i na periférii. QNB tvoří bílé krystaly s bodem tání 157°C a bodem varu 322°C (za této teploty dochází k rozkladu látky). Hydrochlorid 3-quinuclidinyl benzilátu je velmi dobře rozpustný ve vodě, látka je v roztoku stálá. QNB patří k málo toxickým látkám, avšak psychiku ovlivňuje již ve velmi nízkých dávkách. Při intoxikaci dochází ke změnám vyplývajícím z ovlivnění autonomních, centrálních, neurologických, motorických, behaviorálních a psychologických funkcí (Hrdina et al. 1983, Fusek a Hrdina 1984, Misik et al. 2013).

Jako antidota se podávají látky ze skupiny reverzibilních inhibitorů cholinesteras, jako je fyzostigmin, takrin a jeho derivát 7-MEOTA, který dokáže normalizovat v krátké době klinické příznaky intoxikace (Hrdina et al. 1983, Fusek a Hrdina 1984).

3.5 Možnosti preklinického testování

Stav CNS můžeme nepřímo hodnotit podle projevů životních funkcí a chování experimentálních zvířat. Byla popsána celá řada behaviorálních metodik, skládající se z jednoduchých testů, zaměřených na senzomotorické funkce, až po komplexní behaviorální testy, soustřeďující se na sociální interakce, emocionalitu, učení a paměť. Různé varianty těchto testů a jejich modifikace je možné aplikovat na většinu zvířecích modelů. Z hlediska Alzheimerovy choroby se uplatňují zejména testy zaměřené na učení a paměť. V popředí zájmu je především paměť prostorová, protože je považována za obdobu lidské deklarativní paměti. Oba typy paměti (prostorové u zvířat a deklarativní u lidí) spojuje i skutečnost, že jsou závislé na hippocampu. Velmi efektivní metodou zkoumání prostorové orientace u hlodavců se proto stalo vodní bludiště. Díky různým modifikacím lze testovat prostorové učení, krátkodobou i dlouhodobou paměť a její deficit. Mezi další významné metody studia paměti a učení u hlodavců patří také metody založené na averzní motivaci – test pasivního vyhýbání. Jedná se o emotivní formu učení, která je

do značné míry závislá na funkci amygdaly (Misík et al. 2014).

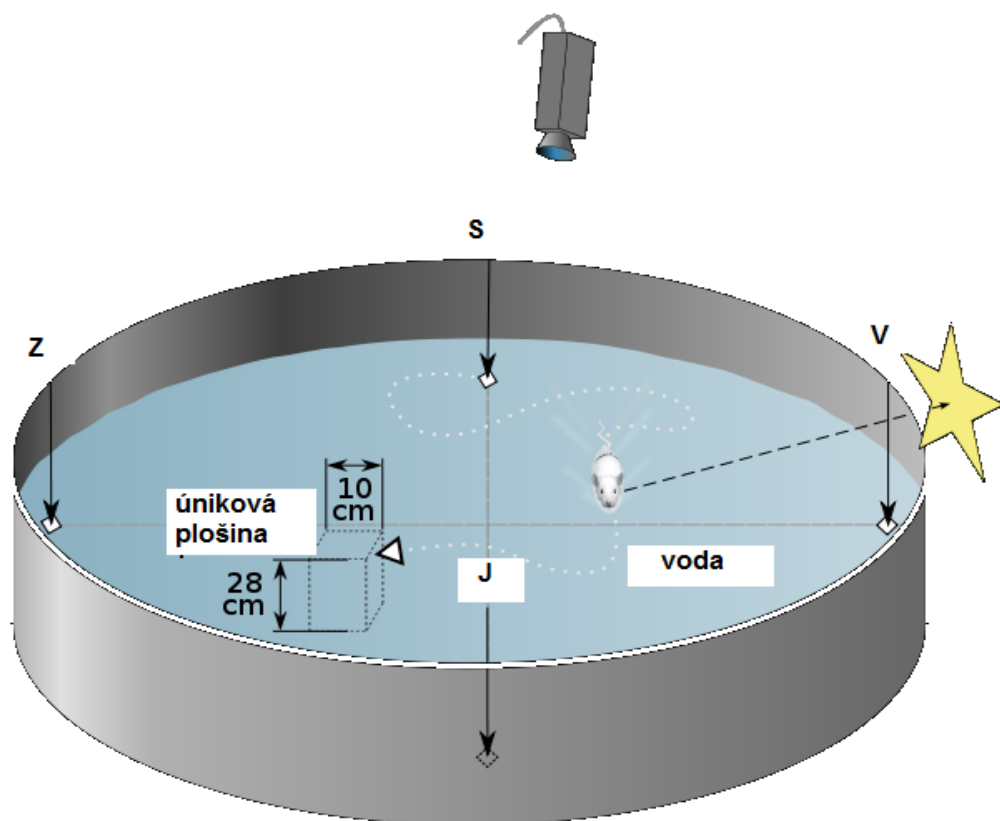
3.5.1 Morrisovo vodní bludiště

Od počátku 20. století byla vyvinuta řada experimentálních postupů pro zvířata, které využívaly únik z vody jako negativní motivaci v behaviorálních testech učení a paměti. Metodika vodního bludiště je primárně určená pro měření prostorové orientace. Díky velkému množství modifikací se stala velmi důležitou také pro testování experimentálně vyvolaných deficitů prostorové orientace (indukované např. stárnutím, lézemi, či aplikací farmak) a krátkodobé i dlouhodobé prostorové paměti (Morris 1981, Morris 1984). Metodika vodního bludiště byla použita ve více než 1500 publikovaných pracích a patří tak k předním behaviorálním metodikám při studiu neurodegenerativních a neuropsychiatrických onemocnění (D'Hooge a De Deyn 2001, Terry 2009).

Metodika byla představena počátkem 80. let neurobiologem Richardem G. Morrisem (Morris 1981, Morris 1984).

3.5.1.1 Princip vodního bludiště

Morrisovo vodní bludiště představuje kruhový bazén naplněný vodou (Obr. 15). Experimentální zvíře má za úkol nalézt excentricky umístěný ostrůvek (úniková plošina) – jedná se o jedinou možnou „únikovou cestu“ z bludiště. Při hledání tohoto ostrůvku se zvíře řídí pouze dostupnými orientačními body. (D'Hooge a De Deyn 2001, Franěk 2008, Stuchlík et. al 2012, Mili et al. 2013).



Obr. 15 Morrisovo vodní bludiště

Převzato z: Anonym (2008)

Pokusy ve vodním bludišti potvrdily, že potkan má schopnost si zapamatovat a velmi rychle analyzovat prostorové vztahy mezi orientačními body v okolí, svoji polohu a polohu únikového ostrůvku. Potkan si vytváří tzv. „kognitivní mapy“ prostředí. Orientace podle kognitivní mapy je základním předpokladem pro navigaci ke skrytým cílům. Jsou popsány dva typy této navigace - alotetická orientace, tj. proces integrování informací o prostorových vztazích mezi orientačními body, které se nacházejí v okolí zvířete (ve vodním bludišti je tento typ orientace klíčový), a idiotetická orientace, při které dochází ke zpracování informací generovaných během aktivního nebo pasivního pohybu. Rozlišujeme dva podtypy – inerciální, při které dochází ke zpracování informace o lineárním a úhlovém zrychlení generovaném ve vestibulárním aparátu; a substrátová, kdy dochází k integraci informace z proprioceptorů

s eferentními kopiemi motorických příkazů, aby nakonec informovala subjekt o jeho vlastním pohybu vzhledem k substrátu (země, voda) (Franěk 2008).

Pohyb potkana je nejčastěji monitorován pomocí videokamery propojené s počítačem a zařízením na analýzu obrazu. Při použití vhodného softwaru je možné vyhodnocovat celou řadu parametrů, nejčastěji měříme dobu latence, tj. čas, který zvíře stráví hledáním skrytého ostrůvku. Dále můžeme analyzovat dráhu, či čas strávený v jednotlivých kvadrantech bludiště atd. Z dalších parametrů můžeme sledovat i tigmotaxi, což je doba strávená „kroužením“ po obvodu bludiště. Dále směrový úhel, tzn. úhel, který svírá cesta k plošince se skutečným směrem, jímž se potkan vydá a Wishawovu chybu, což je poměr doby, která je potřebná k dosažení plošinky a doby latence (Franěk 2008).

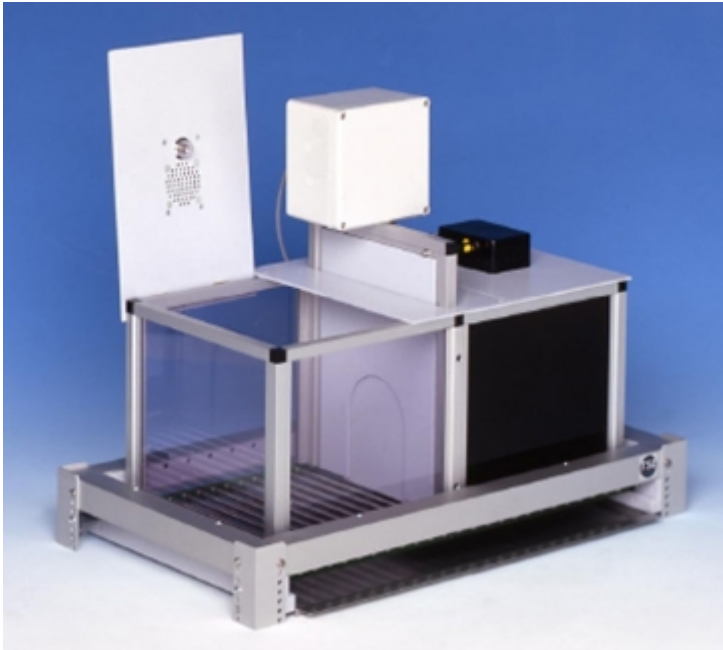
3.5.2 Metoda vyhýbání

Pro experimentální zkoumání emotivního učení lze využít metodu vyhýbání. Rozlišujeme dva základní typy vyhýbání - pasivní a aktivní. Při aktivním vyhýbání má potkan za úkol aktivně vykonat nějakou činnost, aby se vyhnul trestu (aktivita vede k úspěchu). Jedná se vlastně o formu operantního podmiňování. Při pasivním vyhýbání má potkan za úkol potlačit některé své přirozené instinkty, aby se vyhnul potrestání (nečinnost vede k úspěchu). Jako negativní motivace se nejčastěji používá bolestivý podnět, např. elektrošok (Cheng et al. 2014).

3.5.2.1 Pasivní vyhýbání

Metoda pasivního vyhýbání využívá přirozené tendence potkanů opustit osvětlenou plochu a ukrýt se v tmavém prostředí. V laboratorních podmínkách se pro studium využívá box pasivního vyhýbání (tzv. Shuttle box, např. TSE Active avoidance system), který se skládá z jedné osvětlené komory a jedné tmavé komory, oddělené gilotinovými dvířky (Obr. 16). Před začátkem testu jsou dveře otevřené a potkan se může volně pohybovat a seznámit se s prostředím (tzv. habituace). Ve fázi tréninku (prvotní expozice po habituaci) obdrží potkan při vstupu do tmavého prostoru mírný pulzující elektrický šok do končetin

pomocí mřížky v podlaze. V testu (opětovná expozice) má potkan za úkol setrvat v pro něj nepřírozeném osvětleném prostředí po stanovený čas a vyhnout se tak prostředí tmavému. Zaznamenává se doba latence, tj. čas, který potkan stráví v osvětleném prostředí (TSE Systems International Group 2010, Misík 2013).



Obr. 16 Box pasivního vyhýbání (TSE, Německo)

Převzato z: TSE Systems International Group 2010

4 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zhodnocení potenciálního příznivého účinku tří inhibitorů AChE takrinu, rivastigminu a donepezilu na farmakologicky vyvolanou kognitivní poruchu u laboratorního potkana. Vybrané inhibitory jsou s výjimkou takrinu v současnosti využívány v klinické praxi k léčbě Alzheimerovy choroby a slouží zároveň jako standardy při vývoji a testování nových potenciálních léčiv, např. duálních inhibitorů. Jak již bylo uvedeno v předchozích kapitolách, vybrané inhibitory se vzájemně liší v celé řadě vlastností, jako je např. chemická povaha látky, selektivita k jednotlivým typům cholinesterasy, či biologická dostupnost. Srovnání jejich účinnosti za použití behaviorálních testů provedených za standardizovaných podmínek tak může odhalit jejich odlišný potenciál, který může, kromě samotného inhibičního potenciálu, do značné míry záviset právě na odlišných vlastnostech jednotlivých látek. Dalším přínosem srovnání účinků takrinu, rivastigminu a donepezilu spočívá v získání standardu pro srovnání s účinky nově syntetizovaných látek odvozených od těchto mateřských struktur.

Terapeutické dávky takrinu (3.0 mg.kg^{-1}), rivastigminu (0.6 mg.kg^{-1}) a donepezilu (0.75 mg.kg^{-1}) byly vybrány na základě samostatného experimentu tak, aby působily vyrovnaně s ohledem na inhibici cholinesterasy v mozku potkana ($\sim 10 \%$). Efekt léčiv při korekci kognitivního deficitu vyvolaného látkou QNB byl zkoumán pomocí dvou odlišných behaviorálních metodik - vodního bludiště a pasivního vyhýbání. Metoda vodního bludiště je zaměřena na studium prostorové orientace, zatímco test pasivního vyhýbání patří mezi metody emotivního učení. Zvolené testy byly tedy založeny na odlišných principech a cílových strukturách mozku a jejich kombinace tak umožňovala komplexnější pohled na srovnání účinku vybraných látek.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Metodika

5.1.1 Chemikálie, jejich původ

Quinclidinyl benzilát hydrochlorid (QNB) byl syntetizován de novo na Fakultě vojenského zdravotnictví v Hradci Králové a byl v 90% čistotě (stanoveno metodou HPLC). Jako dávka vyvolávající kognitivní deficit byly použity 2 mg.kg⁻¹ pro oba testy. QNB byl ředěn fyziologickým roztokem (0,9% NaCl, Noviko s.r.o., ČR) bezprostředně před podáním. Inhibitory takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride), rivastigmin ((S)-N-ethyl-3-[(dimethyl-amino)ethyl]-N-methyl-phenylcarbamate hydrogentartrate) a donepezil (1-benzyl-4-[(5,6-dimethox-1-indanon)-2-yl] methylpiperidine hydrochloride) byly dodány firmou Sigma Aldrich s.r.o. (ČR). Veškeré látky byly podávány zvířatům ve standardním objemu 1 ml.kg⁻¹ pomocí i.p. injekce.

5.1.2 Laboratorní zvířata

Při pokusech byli použiti samci laboratorních potkanů kmene Wistar ve věku 10 až 12 týdnů, o tělesné hmotnosti 250 – 300 g z chovné stanice Velaz (ČR). Potkani byli chováni ve skupinách po 6 za konvekčních podmínek (stálá teplota 21 ± 1 °C, 12 h světelný režim). Potkani byli krmeni standardní dietou pro malé laboratorní hlodavce ad libitum. Doba aklimatizace byla nejméně 10 dní před testováním. Používání zvířat v této studii bylo formálně schváleno Etickou komisí Fakulty vojenského zdravotnictví v České republice. Všechny postupy ovlivňující zvířata byly v souladu se současnou legislativou (2010/63/EU).

5.1.3 Přístroje

Morrisovo vodní bludiště

System analýzy obrazu (TSE VideoMot2, Německo)

Box pasivního vyhýbání (TSE Německo)

5.1.4 Metodika vodního bludiště

Morrisovo vodní bludiště se skládá z černého kruhového bazénu o průměru 180 cm, naplněného vodou o teplotě 25 °C až do hloubky 25 cm. Bludiště bylo teoreticky rozděleno do čtyř shodných kvadrantů číslovaných 1 – 4 ve směru hodinových ručiček. Kruhová úniková plošina o průměru 15 cm byla umístěna ve středu kvadrantu číslo 3; 37,5 cm od okraje bazénu. Umístění plošiny bylo konstantní po celou dobu experimentu. Plošina byla stejné barvy jako bludiště s antireflexním povrchem, ponořená 1 cm pod hladinou vody. To znamená, že úniková plošina byla pro plovoucího potkana neviditelná. V bludišti se nenacházely žádné orientační body, proto se potkan řídil pouze vzdálenými orientačními body, nacházejícími se mimo prostor bludiště. Hlavní orientační body zahrnovaly např. okna (na jižní a západní straně), stolní počítač (severozápadní strana), nábytek a další vybavení experimentální místnosti.

Denní tréninky byly prováděny od 8 hod. do 11 hod. po dobu 4 po sobě jdoucích dnů. Denní trénink sestával z 8 po sobě následujících plavbách za den. Na konci čtvrtého dne prodělal každý potkan celkem 32 plaveb. Potkani byli vypouštěni z 8 variabilních startovních pozic po obvodu bludiště. Čtyři výchozí pozice byly jasně definovány středy kvadrantů, další 4 startovní pozice se nacházeli na rozhraní sousedních kvadrantů bludiště. Všechny výchozí pozice byly odděleny konstantní vzdáleností 70 cm. Pořadí startů bylo voleno náhodně.

Potkani byli vypouštěni z dané startovní pozice čelem ke stěně bludiště. V okamžiku vypuštění zvířete byl zahájen videomonitoring. Záznam byl ukončen, jakmile potkan dosáhl únikové plošiny. Pokud potkan ostrůvek nenalezl do stanové maximální doby (60 sekund), byl k němu doveden

manuálně. Na únikové plošině strávil každý potkan určitou dobu (15 sekund), po kterou mohl analyzovat prostorové vztahy mezi bludištěm a okolním prostředím. Tento postup se opakoval pro různé startovní pozice po obvodu bazénu. Interval mezi jednotlivými plavbami byl 20 minut. Každá plavba byla nahrávána a analyzována pomocí obrazového sledovacího systému (TSE VideoMot2, Bad Homburg, Německo), který poskytl data, např. dobu latence (s), celkovou vzdálenost plavby (cm) a celkovou rychlost ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$).

Látka QNB byla zvířatům podána 30 min před každým denním tréninkem. Léčené skupiny obdržely dávku inhibitoru 15 min po podání QNB. Kontrolní QNB skupina (pozitivní QNB kontrola) obdržela namísto léčiva fyziologický roztok ($1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), blanková kontrolní skupina obdržela dvě i.p. injekce fyziologického roztoku (30 a 15 min). Pro zjištění vlivu samotných léčiv na výkon ve vodním bludišti byla třem experimentálním skupinám podána pouze léčiva 15 min po aplikaci fyziologického roztoku namísto roztoku QNB.

5.1.5 Metodika pasivního vyhýbání

Aparát pasivního vyhýbání (Shuttle box, TSE systems, Německo) sestával ze dvou kompartmentů – osvětlené a tmavé části, oddělené automatickými dvířky. Potkan umístěný do světlé části aparátu instinktivně vyhledá zatemněnou část. Po vstupu do tmavé části však obdrží mírný elektrický výboj. Je-li zdravý potkan umístěn po 24 zpět do boxu, většinou potlačí přirozenou reakci a setrvá ve světlé části (tzv. „strachové podmiňování“ angl. fear conditioning).

Experimentální zvířata byla vystavena aparátu pasivního vyhýbání celkem třikrát. V prvním kontaktu (habituační) bylo zvířatům umožněno volně prozkoumávat aparát po dobu 3 minut. Po 1 hod byla vystavena tréninku (podmiňování), kdy se oddělovací dvířka po vstupu do tmavé části uzavřela a potkan obdržel mírný elektrický impuls (0,8 mA). Po 24 od tréninku následoval samotný test, kdy bylo zvíře vloženo do osvětlené části a byl sledován čas (latence) vstupu do tmavé části. Časový limit byl stanoven na 3 minuty.

Testované látky byly zvířatům podávány jednorázově ve shodných dávkách i časech jako v testu vodního bludiště a to vždy před fází tréninku. Kontrolní skupiny zaměřené na samotná léčiva nebyly do testu pasivního vyhýbání zahrnuty z důvodu redukce počtu experimentálních zvířat.

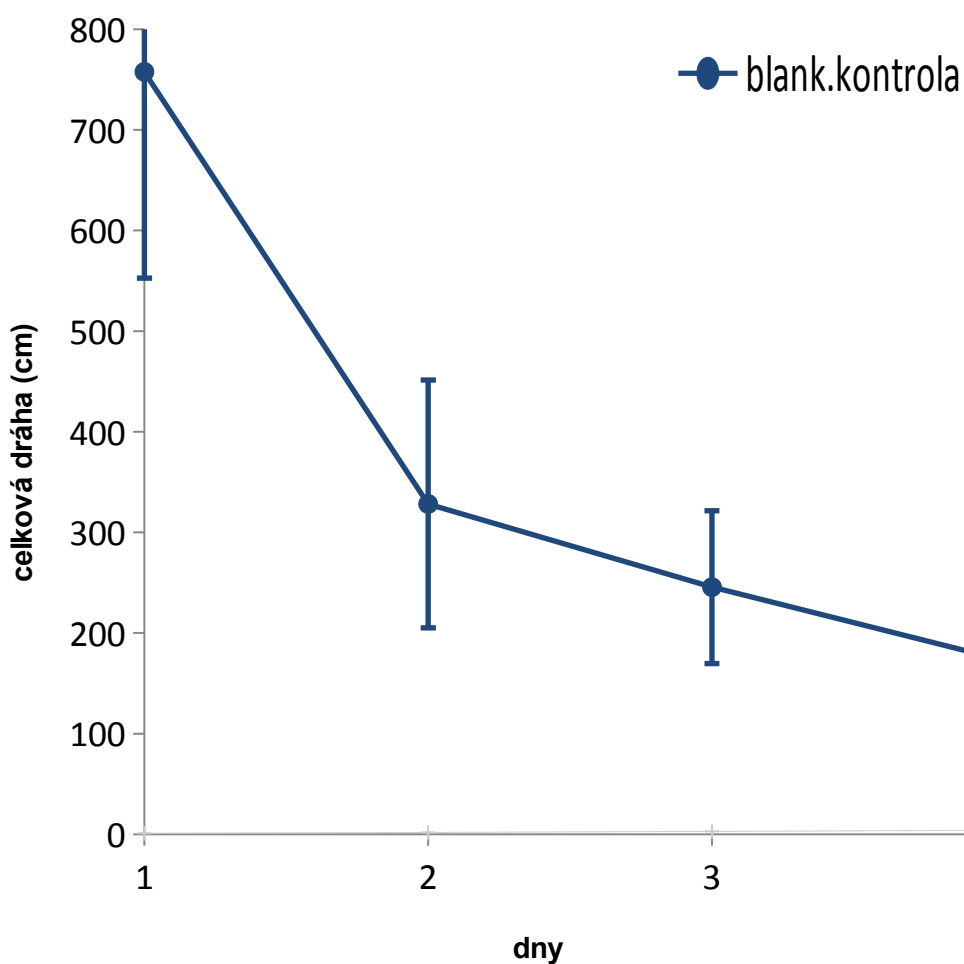
5.1.6 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena s použitím programu Statistica software'98 Edition. Data z testu vodního bludiště byla zlogaritmována a podrobena analýze variance (ANOVA) pro opakovaná měření. Z důvodu vlivu podaných léčiv na rychlost plavby byla analyzována celková dosažená dráha, která je k vlivu rychlosti plavby rezistentní, na rozdíl od běžně užívané latence. Data z testu pasivního vyhýbání byla podrobena neparametrickým testům - Kruskal-Wallis testu s post hoc srovnáním skupin a Mann-Whitney U-testu. Všechna data jsou v práci prezentována jako průměr \pm S.E.M. (střední chyba průměru). Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny na hladině významnosti $2\alpha=0.05$.

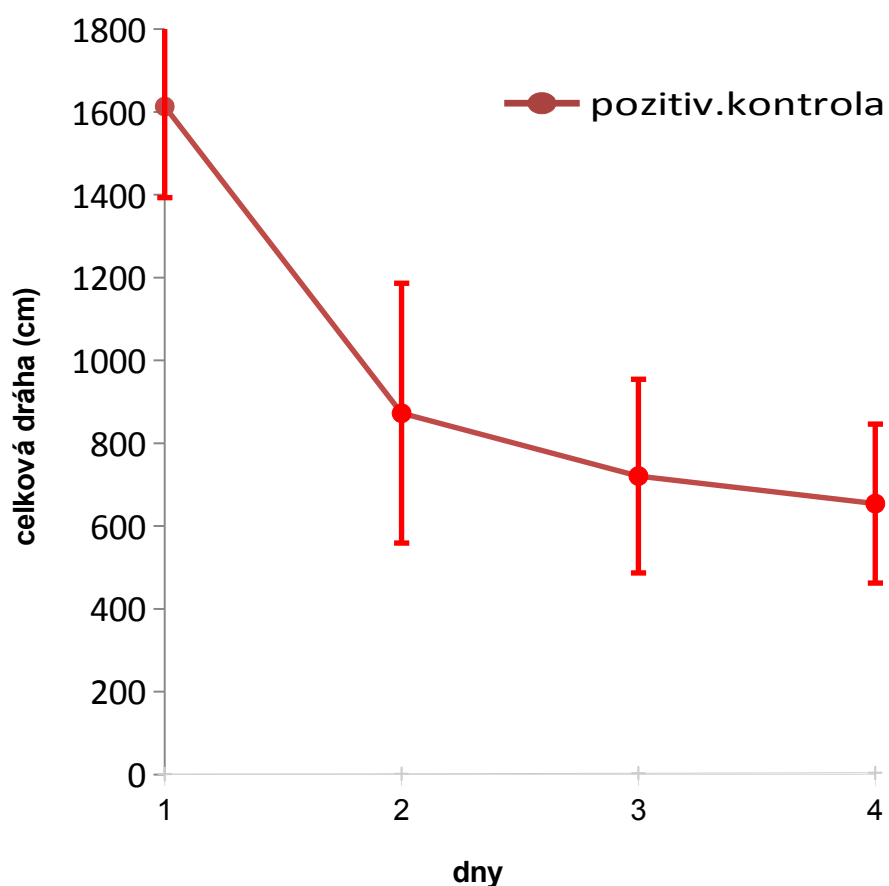
6 VÝSLEDKY

VODNÍ BLUDIŠTĚ

Po čtyřech dnech tréninku si kontrolní skupina potkanů plně osvojila úlohu vodního bludiště se skrytým ostrůvkem (Obr. 17) a čtvrtý den již dosahovala téměř asymptotické křivky učení. Oproti tomu u skupiny, které byla podávána denně před začátkem tréninku látka QNB došlo k výraznému zhoršení výkonu (Obr. 18).



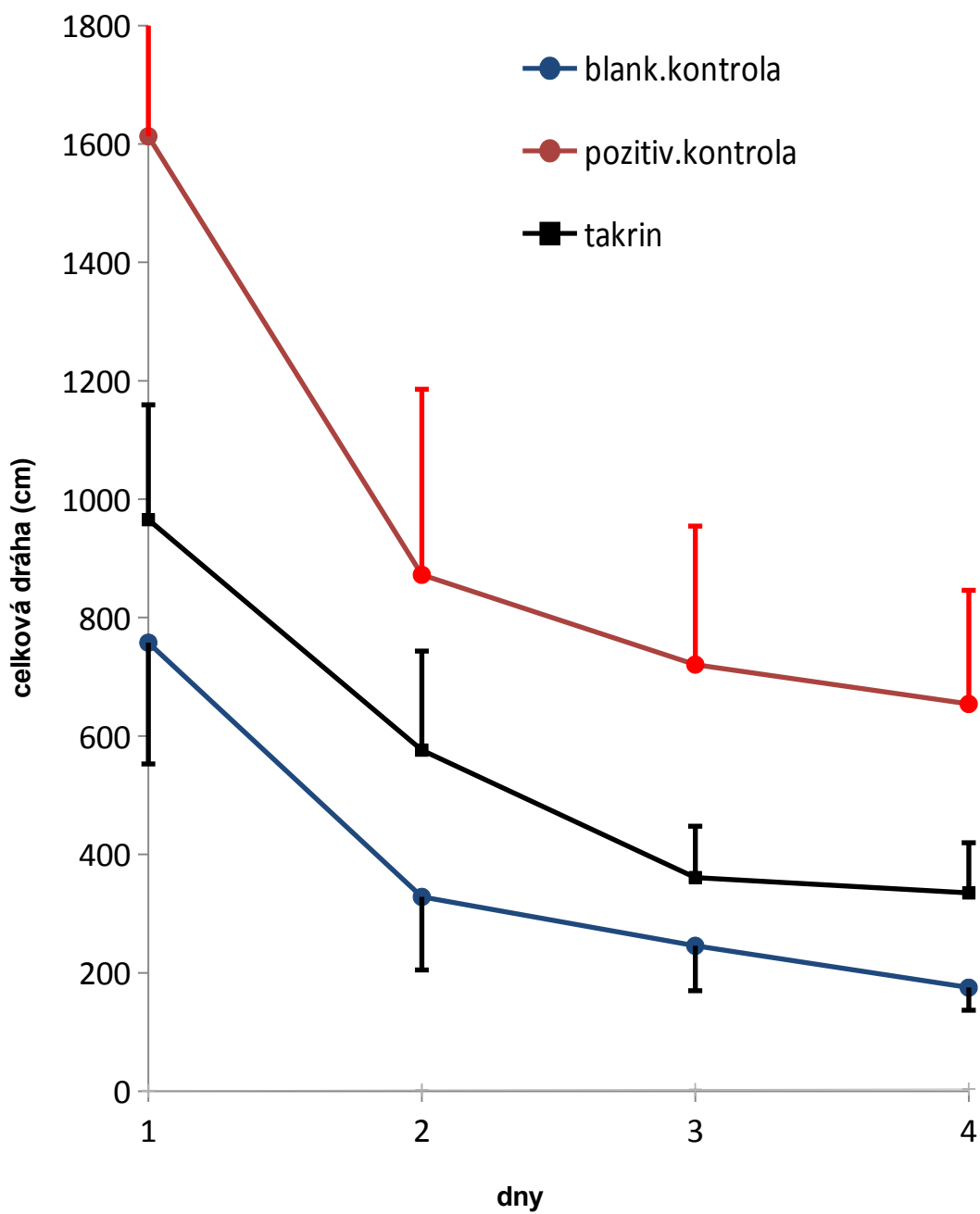
Obr. 17 Výkon kontrolní skupiny potkanů při osvojování úlohy vodního bludiště se skrytým ostrůvkem. Je uvedena průměrná dráha dosažení ostrůvku (cm) pro jednotlivé dny.



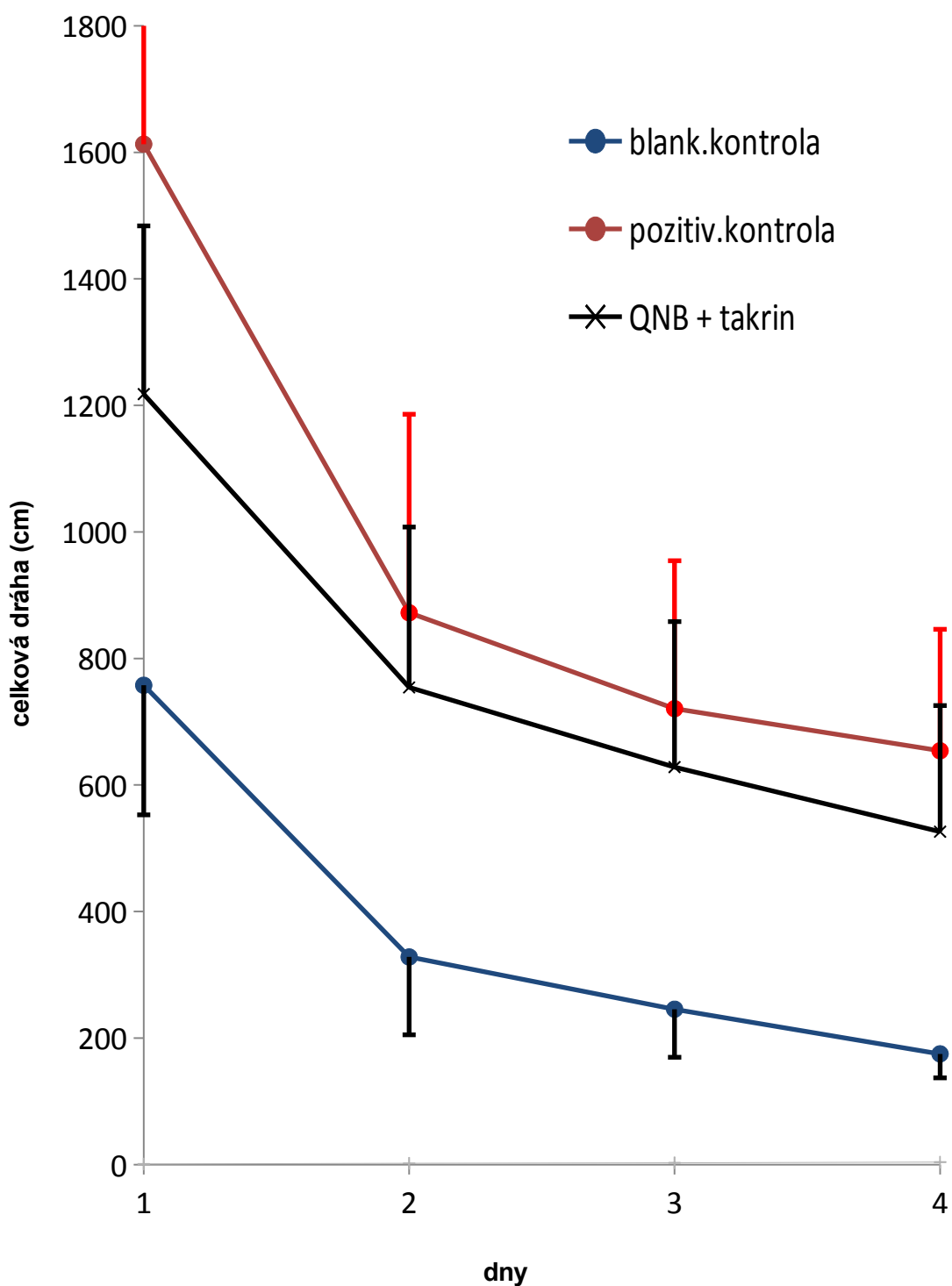
Obr. 18 Vliv látky QNB na délku dráhy potkana ve vodním bludišti. Uveden průměr pro jednotlivé dny tréninku.

Látka QNB měla kromě negativního vlivu na učení také vliv na rychlost plavání ($p < 0.001$, Kruskal-Wallis test). Zatímco kontrolní potkani plavali průměrnou rychlostí $25,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, potkani ovlivnění látkou QNB (i v kombinaci s inhibitory) plavali rychlostí $27,6 - 30,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Z tohoto důvodu byla také při vyhodnocení vlivu léčiv na učení ve vodním bludišti preferována délka dráhy před časem dosažení ostrůvku.

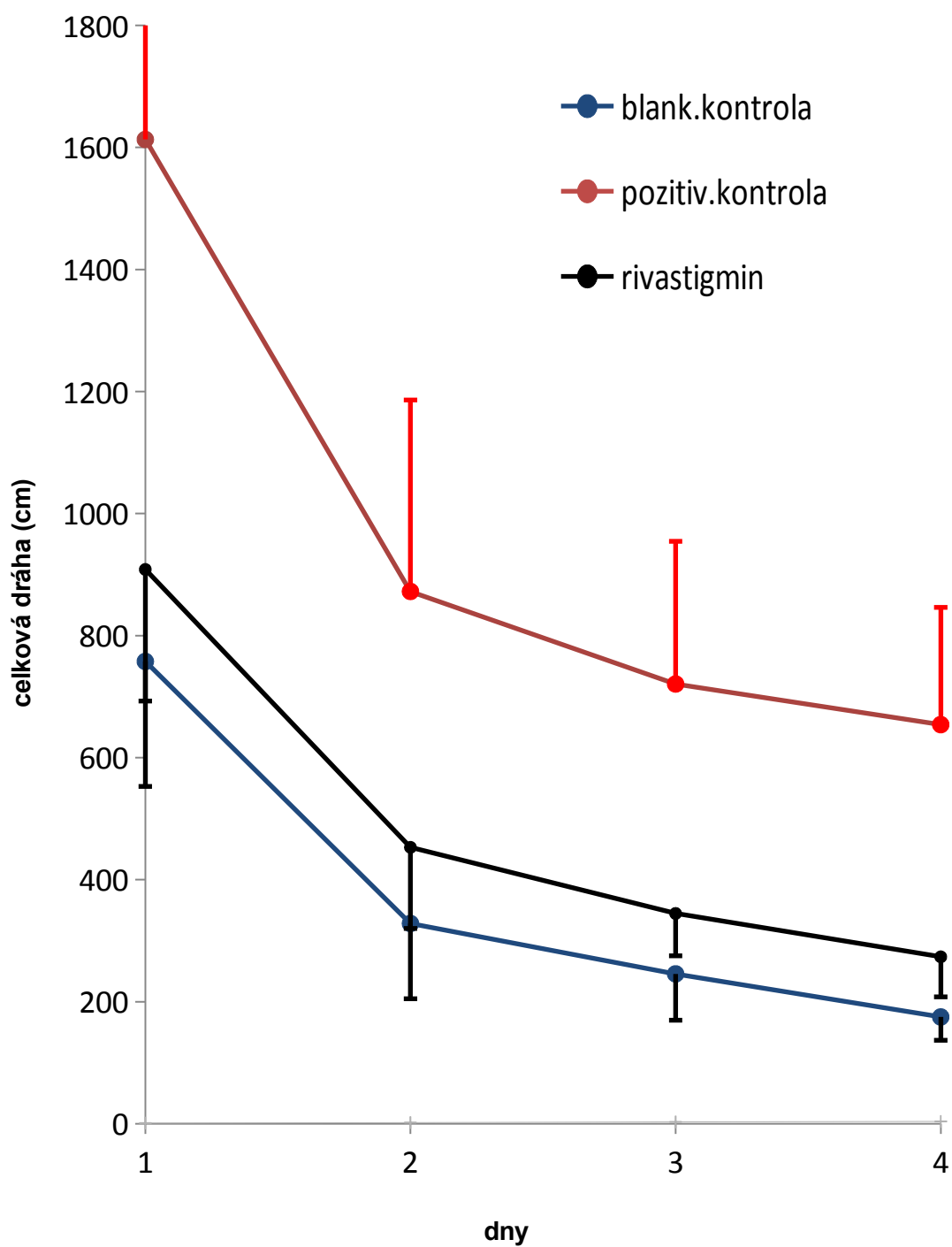
Následující obrázky (Obr. 19-24) znázorňují vliv jednotlivých léčiv na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola). Křivka učení je sestavena z průměrů pro jednotlivé dny tréninku.



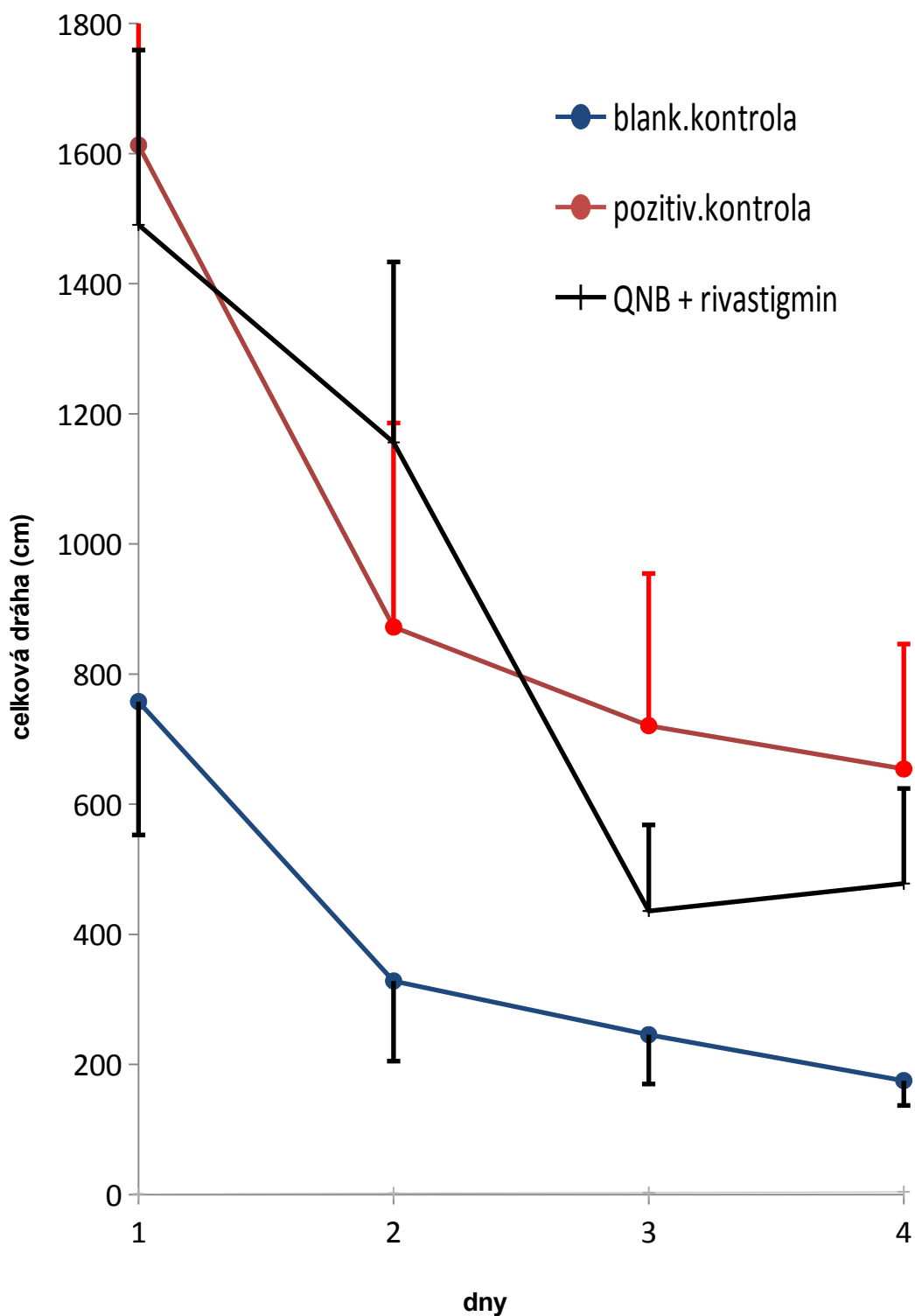
Obr. 19 Vliv léčiva takrinu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola).



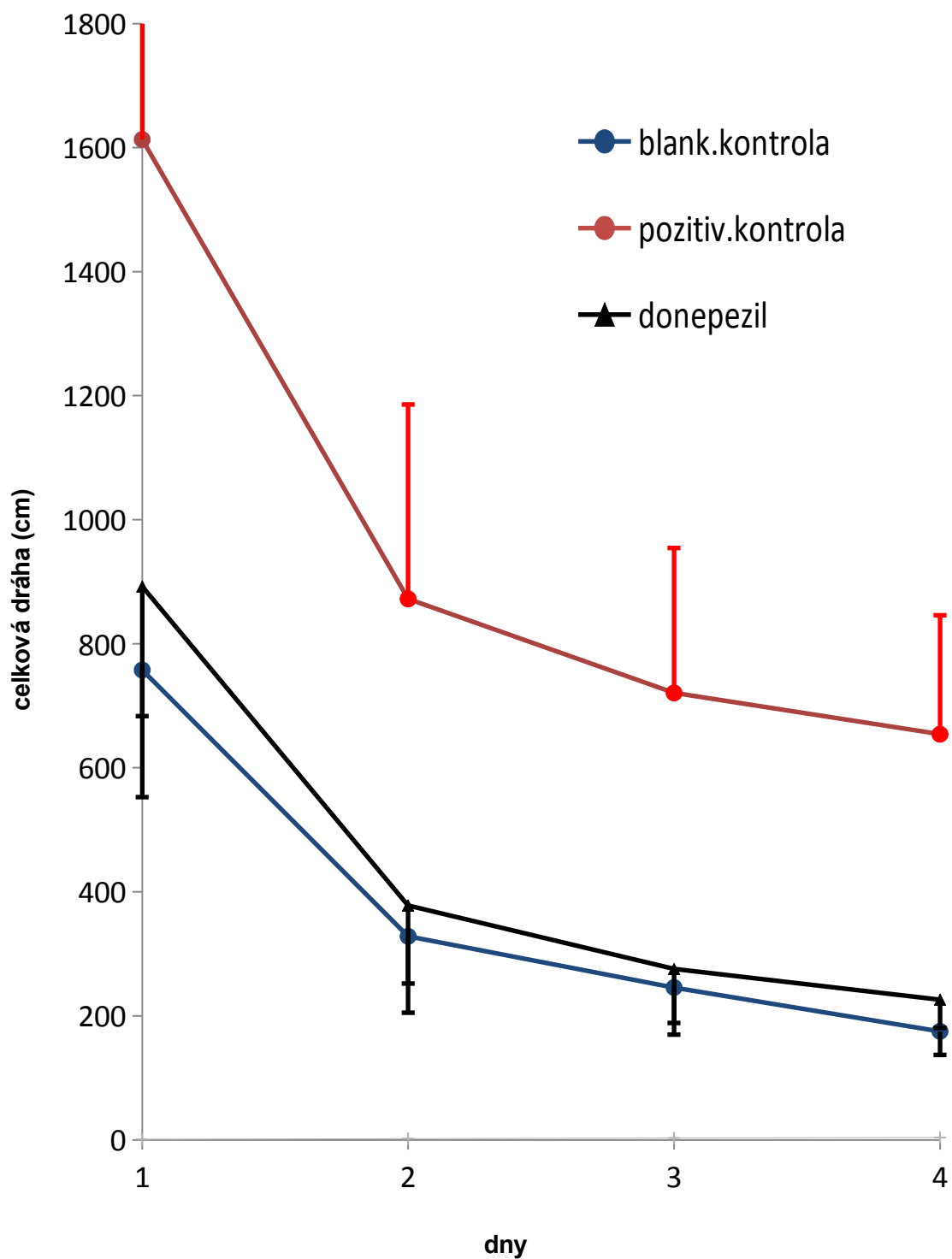
Obr. 20 Vliv léčiva takrinu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola). Znázorněn efekt inhibitoru při léčebném podání (15 min po látce QNB)



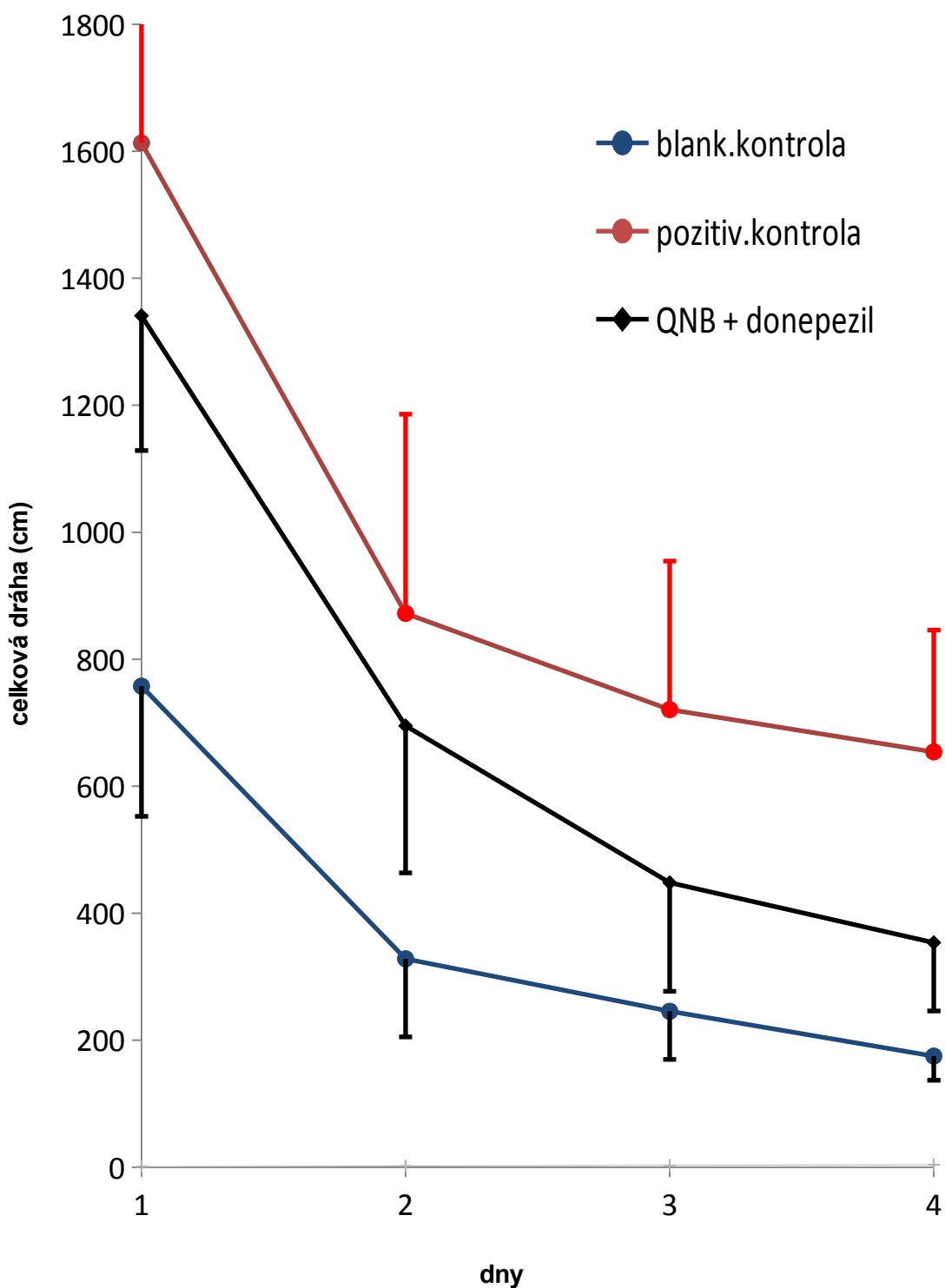
Obr. 21 Vliv léčiva rivastigminu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola).



Obr. 22 Vliv léčiva rivastigminu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola). Znázorněn efekt inhibitoru při léčebném podání (15 min po látce QNB)



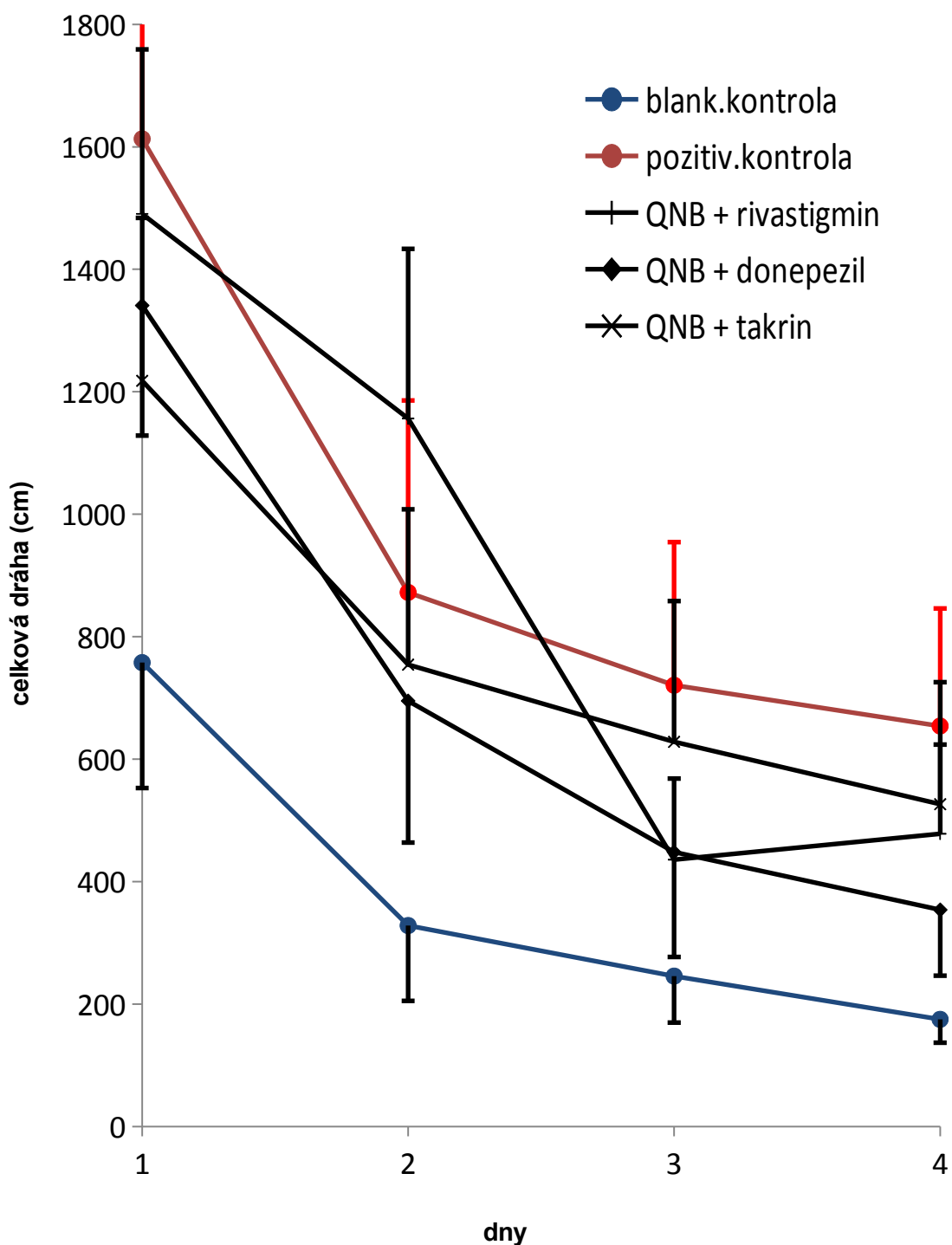
Obr. 23 Vliv léčiva donepezilu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola).



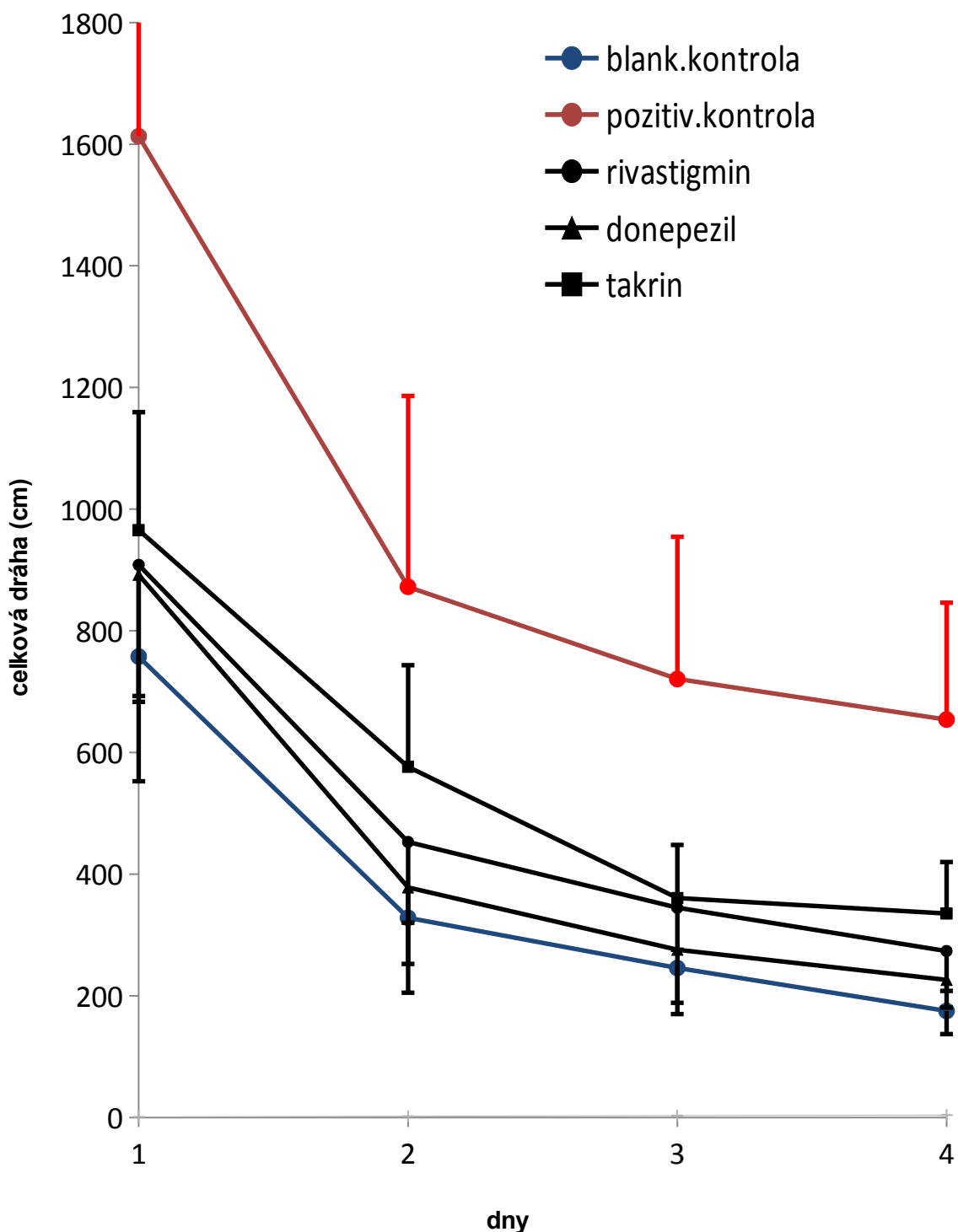
Obr. 24 Vliv léčiva donepezilu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola). Znázorněn efekt inhibitoru při léčebném podání (15 min po látce QNB)

Skupiny, kterým byla 15 min po podání látky QNB aplikována léčiva, dosahovaly lepšího výkonu ve vodním bludišti než neléčená skupina (Obr. 25), přesto však ani jedno z testovaných léčiv zcela nezvrátilo negativní vliv QNB a žádná z léčených skupin nedosáhla výkonu kontrolní skupiny, které byl podán fyziologický roztok. Kontrolní podání samotných léčiv subjektivně mírně zhoršovalo výkon ve vodním bludišti (Obr. 26), tento efekt však nebyl statisticky signifikantní ($p > 0,05$)

Z testovaných léčiv byl pozitivní efekt nalezen u rivastigminu a donepezilu. U obou skupin bylo zaznamenáno významné zlepšení oproti pozitivní kontrole ve třetím a čtvrtém dni ($p < 0,05$). V prvních dvou dnech tréninku nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl. Skupina léčená takrinem sice dosahovala subjektivně lepšího výkonu než pozitivní kontrola, tento efekt však nebyl statisticky průkazný ($p > 0,05$).



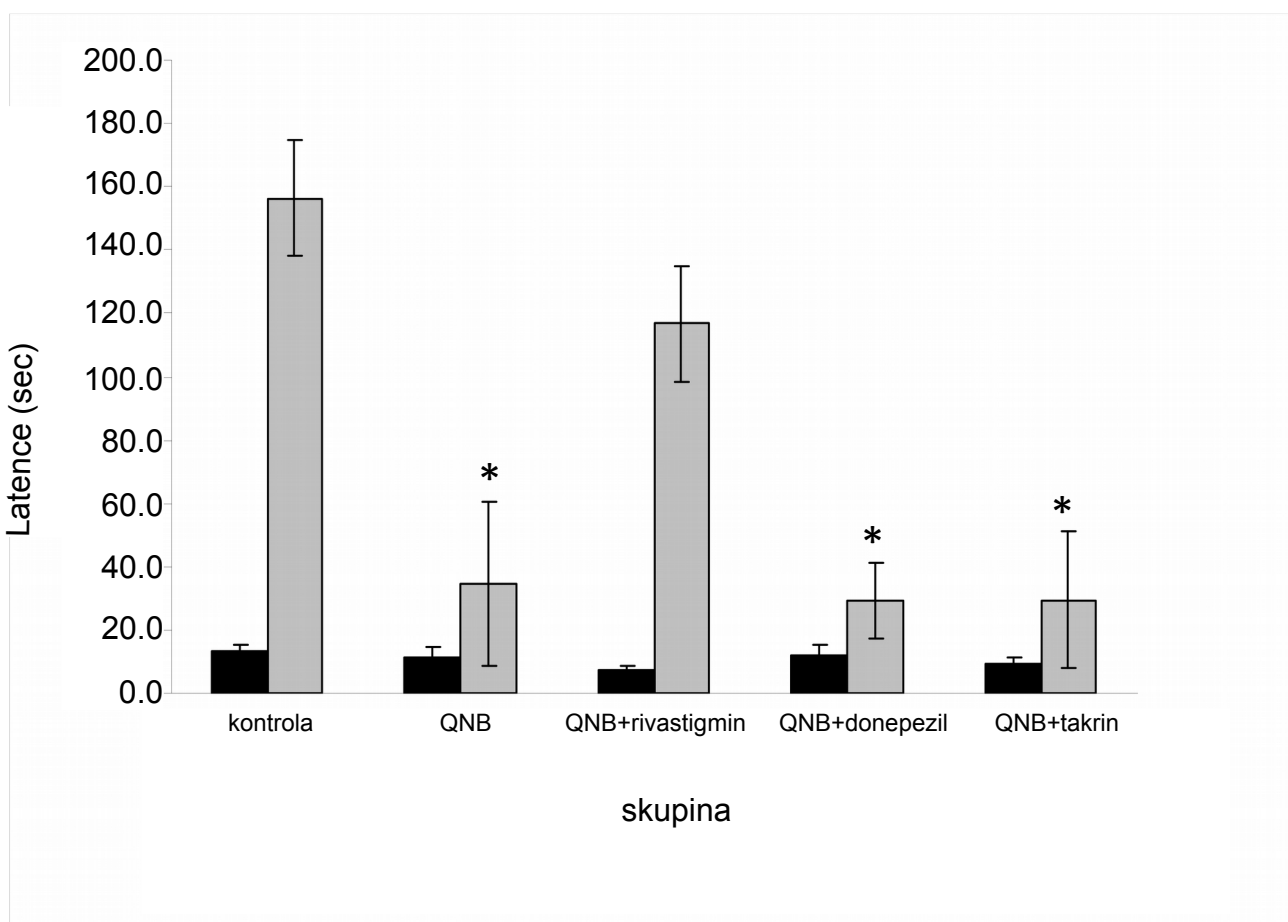
Obr. 25 Vliv léčiv takrinu, rivastigminu, donepezilu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank. kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv. kontrola). Znázorněn efekt inhibitorů při léčebném podání (15 min po látce QNB). Křivka učení je sestavena z průměrů pro jednotlivé dny tréninku.



Obr. 26 Vliv léčiv takrinu, rivastigminu a donepezilu na délku dráhy potkana ve vodním bludišti ve srovnání s kontrolní skupinou (modrá křivka, blank.kontrola) a skupinou, které byla podána látka QNB (červená křivka, pozitiv.kontrola). Znázorněny výkony po aplikaci samotných inhibitorů. Křivka učení je sestavena z průměrů pro jednotlivé dny tréninku.

PASIVNÍ VYHÝBÁNÍ

Kontrolní skupina potkanů v testu pasivního vyhýbání vykazovala vysokou latenci vstupu do tmavé části aparátu (156 sec, Obr. 27). Naopak, u skupiny, které byla podána látka QNB došlo k výraznému snížení testové latence (31 sec, $p < 0.5$, Kruskal-Wallis test) oproti kontrolní skupině. Pouze léčivo rivastigmin v dávce 0.6 mg.kg^{-1} dokázalo zvrátit negativní účinek látky QNB (Obr. 27). Léčiva takrin a donepezil nevykazovala v testovaných dávkách žádný pozitivní efekt na testovou latenci ($p = 1.0$).



Obr. 27 Výkon potkanů v testu pasivního vyhýbání. Je uvedena latence vstupu (sec) při tréninku (černé sloupce) a při testu po 24 hod (šedé sloupce) pro jednotlivé skupiny. Průměr \pm SEM, $n = 8$. *značí signifikantní rozdíl oproti kontrole (srovnávány byly testové latence).

7 DISKUZE

V této studii byl srovnáván potenciál tří inhibitorů acetylcholinesterasy, takrinu, donepezilu a rivastigminu za použití farmakologického modelu cholinergní deplece u experimentálních zvířat. Použití tohoto modelu bylo založeno na předpokladu, že pomocí nepřímého zvýšení cholinergního přenosu v mozku může dojít ke kognitivnímu zlepšení. Tento princip je běžně využíván v preklinickém testování léčiv na bázi inhibitorů AChE, nejčastěji za použití skopolaminu – cholinergního antagonisty, jehož podáním je možné u zvířat vyvolat dočasnou kognitivní poruchu (Aigner a Mishkin 1986, D'Hooge a De Deyn 2001, De-Mello a Carobrez 2002, Gacar et al. 2011, Falsafi et al. 2012, Mili et al. 2013).

V této práci byl skopolamin úspěšně nahrazen jiným cholinergním antagonistou, látkou QNB (Krejčová et al. 2004, Kunešová et al. 2008, Misík 2013, Misík et al. 2013, Misík et al. 2014). Cílem práce bylo přímé srovnání uvedených inhibitorů s použitím behaviorálních metod vodního bludiště a pasivního vyhýbání. Terapeutické dávky inhibitorů byly vybrány tak, aby způsobovaly obdobnou inhibici cholinesterasy v mozku potkana (De-Mello a Carobrez 2002, Krejčová et al. 2004, Kunešová et al. 2008, Gacar et al. 2011). Předpokládané rozdíly v účinnosti inhibitorů by tedy primárně neměly být způsobeny rozdílnou mírou inhibice, nýbrž individuálními vlastnostmi látek, které budou dále diskutovány.

Léčiva rivastigmin ($0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$) a donepezil ($0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$) snižovala negativní vliv látky QNB na prostorové učení v úloze vodního bludiště, pozitivní efekt byl však evidentní až třetí a čtvrtý den tréninku. Lze se tedy domnívat, že bylo zapotřebí určitého času na obnovení funkce cholinergního systému. Ve vodním bludišti byly pozorovatelné trendy ke zlepšení, které však nebyly statisticky signifikantní. Proto byl pokus doplněn o další behaviorální metodiku, kde bylo dosaženo pozitivního výsledku u léčby rivastigminem.

Terapeutické dávky takrinu, které se používají v behaviorálních testech jsou obvykle relativně vysoké (až k $30,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ Kirby et al. 1996), to může být

dáno jeho nízkou biologickou dostupností nebo rychlým metabolismem (Bejar et al. 1999). I v této studii bylo zapotřebí použití vyšších dávek takrinu (3.0 mg.kg^{-1}) oproti rivastigminu (0.6 mg.kg^{-1}) a donepezilu (0.75 mg.kg^{-1}), abychom zaručili vyrovnanou inhibici cholinesteras v mozku potkana. Ze srovnání látek vyšel takrin jako nejméně efektivní. To může být dáno především jeho větším působením na periférii, kde vykazuje vyšší afinitu především k BChE, než v CNS. Působení takrinu na AChE je minoritní. Oproti rivastigminu i donepezilu je takrin zatížen i větší mírou nežádoucích účinků způsobených nadměrnou stimulací cholinergního systému – nevolnost, zvracení, průjem. Tyto účinky vyplývají i z nutnosti vyšších dávek takrinu, který potom vykazuje vysokou hepatotoxicitu (Jiráček 2003, Ahmed et al. 2006, Gacar et al. 2011).

Ze srovnávaných látek bylo nejlepšího výsledku dosaženo s rivastigminem, který byl efektivní v obou behaviorálních testech. Lze tedy předpokládat, že rivastigmin působí na různé struktury v mozku – na hippocampus zodpovědný za prostorovou paměť a na amygdalu ovlivňující emotivní učení. Na rozdíl od takrinu vykazuje rivastigmin větší selektivitu k cholinesterasám v CNS než na periférii (Bejar 1999, Rakonczay 2003, Pohanka 2012). Jeho další výhodou je i jeho dlouhodobá inhibice, která trvá i po eliminaci látky z organismu. To umožňuje jeho nižší dávkování a tím i menší výskyt na dávce závislých nežádoucích účinků (Bejar 1999, Jiráček 2003).

Rivastigmin vykazuje podobnou inhibici jako takrin v kortexu, ale jeho účinnost v oblasti hippocampu je mnohem větší (Bejar et al. 1999), což se ukazuje být velkým přínosem v oblasti prostorové navigace využívané metodou vodního bludiště. Proto byly pravděpodobně pozorovány ve vodním bludišti u rivastigminu lepší výsledky než u takrinu.

Rivastigmin byl efektivní také v úloze pasivního vyhýbání, na rozdíl od zbývajících dvou látek. To může být dáno jeho působením na obě cholinesterasy - AChE i BChE (duální inhibitor). Ve srovnání s takrinem, který vykazuje vyšší afinitu k BChE a donepezilem, který je zase mnohem selektivnější k AChE.

Donepezil zlepšoval prostorové učení ve vodním bludišti, v testu emotivního učení však nebyl efektivní a nedošlo k významnému prodloužení testové latence. Důvodem rozdílné účinnosti léčiva v obou úlohách může být zapojení rozdílných struktur mozku v jednotlivých úlohách a rozdílný vliv léčiv na tyto struktury (vodní bludiště – prostorové učení, pasivní vyhýbání – emotivní učení). Donepezil vykazuje větší selektivitu k AChE, přičemž jeho působení na BChE je minoritní. To může být důvodem jeho menší efektivity v testu emotivního učení, které je založeno především na funkci amygdaly, kde je BChE v majoritním zastoupení (Brunovský 2007). Na rozdíl od takrinu je pro donepezil typická vysoká selektivita k AChE lokalizované v CNS a nízká účinnost v oblasti periferie. Proto mohl donepezil vykazovat lepší výsledky v testu vodního bludiště než takrin (Jirák 2004, Brunovský 2007).

Z dosavadního výzkumu vyplývá, že variabilita účinnosti různých inhibitorů cholinesteras závisí především na jejich centrálním a periferním inhibičním potenciálu, selektivitě vůči jednotlivým typům cholinesteras a jednotlivým oblastem mozku, fyzikálně-chemických vlastnostech a v neposlední řadě na dávkách a tím i vyplývajícím nežádoucím účinkům, které mohly negativně ovlivnit výkon potkanů při behaviorálních testech.

8 ZÁVĚR

Tato studie hodnotí potenciální příznivé účinky jedné dávky tří inhibitorů AChE takrinu, rivastigminu a donepezilu na QNB indukovanou cholinergní ztrátu paměti s využitím dvou behaviorálních metod – Morrisova bludiště a pasivního vyhýbání. Zvolené testy jsou založeny na odlišných principech a cílových oblastech mozku. Metoda vodního bludiště je zaměřena na studium prostorové orientace (hippocampus), zatímco test pasivního vyhýbání patří mezi metody emotivního učení (amygdala).

V sérii provedených pokusů bylo při léčebném podání inhibitorů pozorováno určité behaviorální zlepšení u všech testovaných látek. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u rivastigminu, který byl efektivní u obou zvolených metod, což bylo dáno zřejmě především jeho komplexními účinky jako duálního inhibitoru (afinita k AChE i BChE). Naopak nejslabší efekt vykazoval takrin, který má větší účinky na periférii než v CNS (vyšší afinita k BChE). Donepezil vykazoval účinky ve vodním bludišti, avšak v testu pasivního vyhýbání nebyl pozorován výrazný efekt (vyšší afinita k AChE).

Práce přinesla srovnání standardů látek s použitím behaviorálních metod a je cenným podkladem pro další výzkum a testování nových látek na bázi inhibitorů, odvozených od testovaných struktur.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

1. Ahmed M et al. Inhibition of two different cholinesterases by tacrine. *Chemico-Biological interactions* 2006;162:165-171.
2. Aigner TG, Mishkin M. The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behavioral and neural biology* 1986;1:81-87.
3. Akiyama H et al. Inflammation and Alzheimer's disease, *Neurobiology of aging* 2000;21(3):383-421
4. Alzheimer's Asociation. Alzheimer's Asociation Report: 2014 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia* 2014;10:47-92.
5. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 1982;217:408-414.
6. Bejar C, Wang RH, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats. *Eur.J.Pharmacol* 1999;383:231-240.
7. Braak H, Tredici KD. Alzheimer's disease: Pathogenesis and prevention. *Alzheimer's & Dementia* 2012;8:227–233
8. Brunovský M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurol.pro praxi* 2007;2:112-117.
9. Cameron B, Landreth GE. Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* 2010;37: 503–509
10. Craig LA, Hong NS, Macdonald RJ. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2011;35:1397-1409.

11. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001;36:60-90.
12. Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* 1976;2:1403.
13. Davis KL, Powchik P. Tacrine. *Lancet* 1995;345:625-630.
14. De-Mello N, Carobrez AP. Elevated T-maze as animal model of memory: effects of skopolamine. *Nebav.pharmacol.* 2002;13:139-148.
15. Dooley M, Lamb HM. Donepezil: a review of its use in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 2000;16:199-226.
16. Emilien et al. Prospects for Pharmacological Intervention in Alzheimer Disease. *Arch Neurol.* 2000;57:454-459
17. Falsafi SK, Deli A, Heger H, Pollak A, Lubec G. Skopolamine administration modulates muscarinic, nicotinic and NMDA receptor systems. *PloS One* 2012;7.
18. Franěk M. Praktika pro II. ročník: Morrisovo vodní bludiště. Ústav normální, patologické a klinické fyziologie, UK, 3.LF. 2008
19. Fusek J, Hrdina V. Zneschopňující otravné látky s psychotomimetickým účinkem, svazek 206, VLVDÚ JEP Hradec Králové, 1984.
20. Gacar et al. Beneficial effects of resveratrol on scopolamine but not mecamylamine induced memory impairment in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats. *Pharmacol. Biochem. Nebav.* 2011;99:316-23.
21. Greig NH, Lahiri DK, Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics* 2002;14:77-91.

22. Haga et al. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 2012;482:547-551.
23. Hake AM. Use of cholinesterase inhibitors for treatment of Alzheimer disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2001;68(7): 608-616.
24. Holtzman DM, Morfia JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011;3.
25. Höschl C, Hořejší J. Alzheimerova choroba: tichá epidemie dneška, hrozící katastrofa zítřka: zavírání očí, nebo hledání řešení? zpracováno na základě panelové diskuse. 1. vyd. Praha: Galén 1999;16-18:23-25, 71-72.
26. Hrdina V et al. Toxikologie bojových chemických látek a zdravotnicko-protichemická ochrana. I. díl, svazek 189. VLVDÚ JEP Hradec Králové 1983.
27. Cheng X, Zhou W, Zhang Y. The behavioral, pathological and therapeutic features of the senescence-accelerated mouse prone 8 strain as an Alzheimer's disease animal model. *Ageing Research Reviews* 2014;13:13–37
28. Jiráček R, Slíva J. Donepezilum. *Remedia* 2004;14:464–469.
29. Jiráček R, Vnoučková K. Rivastigminum. *Remedia* 2003;6:372-378.
30. Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Prakt.lékáren.* 2009;5(4):176-178.
31. Kinney HC, Panigrahy A, Rava LA, White WF. 3-Dimensional distribution of H3 quinuclidinyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in the developing human brain-stem. *J.Comp.Neurol.* 1995;362:350-367.

32. Kirkby DL, Jones DN, Barnes JC, Higgins GA. Effects of anticholinesterase drugs tacrine and E2020, the 5-HT(3) antagonist ondansetron, and the H(3) antagonist thioperamide, in models of cognition and cholinergic function. *Nebav. Pharmacol* 1996;7:513–25.
33. Krejčová G, Patočka J, Slaninová J. Effect of humanit analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats. *J. Pept.Sci.* 2004;10:636-639.
34. Kunešová et al. The multiple T-maze in vivo testing of the neuroprotective effect of humanit analogues. *Peptides.* 2008;29:1982-87.
35. Laurijssens B, Aujard F, Rahman A. Animal models of Alzheimer's disease and drug development. *Drug Discovery Today: Technologies* 2013;10(3):319-27.
36. Lincová D et al. *Základní a aplikovaná farmakologie. 2. dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, 2007.
37. Lüllmann H et al. *Farmakologie a toxikologie. 2. české vyd.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2004
38. Mayeux R, Yaakov S. *Epidemiology of Alzheimer Disease.* Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2012.
39. Mili T et al. PWZ-029, an inverse agonist selective for α_5 GABA_A receptors, improves object recognition, but not water-maze memory in normal and scopolamine-treated rats. *Behavioural Brain Research* 2013;241:206-213.
40. Misik J, Vaněk J, Musílek K, Kassa J. Cholinergic antagonist 3-quinuclidinyl benzilate – Impact on learning and memory in Wistar rats. *Nebav Brain Res.* 2014;266:193-200.

41. Misik J et al. Military incapacitating agent BZ(3-quinuclidinyl benzilate)-past, present and future. *Mil.Med. Sci. Lett.* 2013;82:1-5.
42. Misik J. Manuscript. 2013
43. Morris R. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. and Motiv.* 1981;12(2):239-260
44. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Jurnal of Neurosc. Methods.* 1984;11(1):47-60
45. Neha, Sodhi RK, Maggi AS, Singh N. Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Science XXX* 2014;14041:1-14.
46. Pidrman V. Demence – 1. část: diagnostika a diferenciální diagnostika. *Med. Pro Praxi* 2007;2:83-88.
47. Pohanka M. Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008-present). *Expert Opin. Ther. Patents* 2012;1:1-15.
48. Pohanka M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic* 2011;3:219-230.
49. Qiu C, De Ronchi D, Fratiglioni L. The epidemiology of the dementias: an update. *Curr Opin Psychiatry* 2007;20(4):380-5.
50. Rakonczay Z. Potencies and selectivities of inhibitibors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biologica Hungarica* 2003;2:183-189.
51. Reitz CH, Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology* 2014;88:640–651.

52. Ressler P et al. Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a ostatních demencí. *Neurol. pro praxi* 2009;10(4):237-241.
53. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci* 2013;38:6-23.
54. Rokyta R et al. *Fyziologie*. Praha: ISV 2000.
55. Sardi et al. Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmunity Reviews* 2011;11:149–153.
56. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fischer KS, Uhler MD. Synthesis, Storage and Release of Acetylcholine; Acetylcholinesterase and the Termination of Acetylcholine Action; Nicotinic Receptors; Muscarinic receptors; Functional Aspects of Cholinergic Neurotransmission. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
57. Stuchlík A, Petrásek T, Hatalová H, Rambousek L, Nekovarová T, Vales K. Behavioral Tests for Evaluation of Information Processing and Cognitive Deficits in Rodent Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. In: Burne THJ. *Schizophrenia in the 21st Century*. Croatia, 2012:156-180.
58. Terry AV Jr. Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd ed. CRC Press; 2009.
59. TSE Systems International Group. TSE Active Avoidance System: Flexible test system for mice and rats. In: *Animallab* 2010. Dostupné na URL: http://www.animalab.pl/wp-content/uploads/2013/05/TSE_Active-Avoidance_20100429_HR.pdf
Přístup 1.6.2014

60. Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CC. Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *Journal of Neurological Science* 1982;2-3:191-202.
61. World Alzheimer report 2009 – executive summary, Alzheimer's Disease International, 2009.
62. Zhao Y, Zho B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2013;10.

CITACE ELEKTRONICKÝCH ZDROJŮ

Anonym. Fotogalerie. In: Palba.cz. 2014 Dostupné z:

<http://www.palba.cz/forumfoto/displayimage.php?pid=19031&fullsize=1>

Přístup: 4. 3. 2014

Anonym. Index of/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/NeuroT. In: Stewards edu 2001. Dostupné

z:<http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/NeuroT/Image8.gif>. Přístup: 5. 7. 2014

Anonym. Cholinesterase. In:Wikipedia 2009. Dostupné z:

<http://en.wikipedia.org/wiki/Cholinesterase>. Přístup: 15. 3. 2014

Anonym. Dobrý cholesterol snad může snížit riziko Alzheimerovy choroby In: Neviditelný čert 2010. Dostupné z:

<http://www.neviditelnycert.cz/data/files/img/alzheimersdisease.jpg>. Přístup: 10. 5. 2014

Anonym. Alzheimer´s disease. In: upright-health.com 2013 Dostupné z:

<http://www.upright-health.com/alzheimers.html>. Přístup: 27. 4. 2014

Anonym. Morris water navigation task. In: Wikipedia 2008. Dostupné z:

http://en.wikipedia.org/wiki/Morris_water_navigation_task#mediaviewer/File:MorrisWaterMaze.svg. Přístup: 5.11. 2014