

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biologických a lékařských věd

**Srovnání účinku cyklosporinu A a 7-methoxytacrinu na aktivitu  
acetylcholinesterázy ve vybraných částech mozku laboratorního potkana**

Diplomová práce

Hradec Králové, 2008

Jitka Černochová

Ráda bych poděkovala svému konzultantovi Doc. Mudr. Josefu Herinkovi za pomoc a odborné vedení v průběhu diplomové práce a za nemalé úsilí věnované jejímu zpracování.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením Doc. MUDr. Josefa Herinka. Veškeré zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové dne -datum

Jitka Černochová

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-MEOTA - 7- methoxytakrin

AC – adenylátcykláza

Ach - acetylcholin

AChE - acetylcholinesteráza

AChRs - acetylcholinové receptory

AMK - aminokyselina

ATP - adenosintrifosfát

AV uzel – atrioventrikulární uzel

BuChE - butyrylcholinesteráza

CNS - centrální nervový systém

CSA - cyklosporin A

DAG - diacylglycerol

DTNB - 5,5'- dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny

EEG - elektroencefalografie

GIT - gastrointestinální trakt

HPLC - high performance liquid chromatography

ChAT - cholinacetyltransferáza

IP<sub>3</sub> - inositol trifosfát

mAChR - muskarinový acetylcholinový receptor

nAChR - nikotinový acetylcholinový receptor

NMDA - N-methyl-D-aspartát

NMR - nukleární magnetická rezonance

P-gp - P-glykoprotein

PLC - fosfolipáza C

RIA - radioimunoanalýza

S-ALT - sérová alaninaminotransferáza

SDAT - senilní demence Alzheimerova typu

VIP - vazoaktivní intestinální protein

# OBSAH

1. OBSAH	4
2. ÚVOD	7
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
Cholinergní systém	9
Základní principy cholinergního přenosu	9
Syntéza acetylcholinu	10
Receptory pro Ach	11
Nikotinové receptory	11
Mechanismus působení cholinergních látek na nAChR	12
Muskarinové receptory	12
Mechanismus působení cholinergních látek na mAChR	13
Subtypy acetylcholinových receptorů v přehledu	13
Postižení cholinergního systému u SDAT	14
Mechanismus účinku Ach	16
Hydrolýza Ach	17
Úloha cholinesteráz, zejména AChE v organismu	18
Molekulární formy cholinesteráz	19
Charakteristika lidské AChE	20
Metody verifikace AChE	21
Charakteristika lidské BuChE	21
Důvod a způsoby stanovení aktivity cholinesteráz	22
Známé možnosti léčby SDAT	23
Farmakologická léčba	23
Behaviorální léčba demence	26
Inhibitory cholinesteráz	26
Organofosfáty a karbamáty	26
Léčebné využití inhibitorů AChE	26
Léčiva ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteráz	28

Akridinové deriváty	28
Karbamátové deriváty	28
Piperidinové deriváty	28
Alkaloidy	28
Cyklosporin A	28
Chemická struktura	29
Producenti a biosyntéza	30
Mechanismus účinku	31
Interakce CSA s buněčným povrchem	31
Hematoencefalická bariéra a P-glykoprotein	32
Substráty P-glykoproteinu a reverzní činitelé	33
Role P-glykoproteinu v mozkových kapilárách	33
-Eflux léčiv	34
- Sekrece nebo exkrece	34
- Další funkce P-glykoproteinu	34
Účinek CSA na P-glykoprotein	35
Farmakodynamika a farmakokinetika CSA	36
Kinetické parametry CSA	37
Toxicita a nežádoucí účinky CSA	37
Monitorování hladiny CSA	38
Metody pro stanovení CSA	38
Biochemické parametry	39
Interakce CSA	40
7-methoxytakrin	40
Chemická struktura	40
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
Uspořádání pokusu	42
Stanovení aktivity AChE	42
Ellmanova metoda	42
Chemická reakce Ellmanovy metody	43
Použité chemikálie a roztoky	44

Použité přístroje	44
Pracovní postup	44
Odběr vzorků mozku	44
Postup stanovení aktivity AChE ve vybraných částech mozku	45
5. VÝSLEDKY	46
6. DISKUZE	49
7. ZÁVĚR	51
8. Seznam použité literatury	52

# ÚVOD

Senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) je neurodegenerativní postižení mozku. V současné době není známa příčina vzniku, z neuropatologických nálezů již ale víme, jak nemoc probíhá. V mozku probíhají změny, které postupně mění látkovou činnost mozku.

V současnosti trpí ¼ lidí starších 85 let demencí. SDAT se na tomto čísle podílí asi z 50-60%. Současná medicína tuto chorobu nedovede účinně léčit, pouze poněkud zpomalit její postup. Je to choroba zejména pokročilého stáří a proto jsou jí nejvíce ohroženy vyspělé společnosti s prodlužující se délkou života.

Jak vyplývá z dosavadních znalostí patogeneze SDAT, ze všech neuromediátorových systémů je nejvíce postižen systém cholinerní. Právě postižení cholinerního systému vyvolává poruchy paměti a kognitivních funkcí v přímé souvislosti s degenerativními změnami v cholinerních neuronech zejména v nucleus basalis Meynerti. Původně se předpokládalo, že primární je právě atrofie cholinerních vláken v Meynertově jádře, nyní je jasné, že prvotní je korová atrofie. Dalším krokem je ověřené poškození presynaptické části cholinerního neuronu (tj. části uvolňující neuromediátor). Postsynaptická část však zůstává intaktní. Není tedy porušena schopnost muskarinových a nikotinových receptorů navázat acetylcholin (ACh). Proto posílení výkonnosti tohoto systému zatím zůstává v léčbě SDAT nejúčinnějším farmakologickým přístupem. Na základě těchto předpokladů byly zkoušeny různé léčebné strategie pokoušející se zlepšit funkci cholinerního systému. Jednou z nich bylo podání prekurzorů ACh (např. velkých dávek lecithinu). To se však ukázalo jako nedostatečné. Následovalo proto zavedení dalších přístupů, z nichž nejúčinnější se zatím ukázalo podávání látek, které se označují jako inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), enzymu odbourávajícího ACh. Jeho zablokováním dojde ke zvýšení nabídky molekul ACh na synapsích.

Prvním lékem s prokazatelným klinickým efektem u mírných forem SDAT byl takrin, uvedený počátkem devadesátých let minulého století do širšího klinického použití, byl účinný, ale byl stažen pro svou velkou hepatotoxicitu. V České republice byl vyvinut a nyní je ve stádiu testů derivát takrinu - 7-methoxytakrin (7-MEOTA), zatím není léčebně dostupný.

Léčivo cyklosporin A (CSA) má mimo svého imunosupresivního účinku také prospěšný účinek na buňky vystavené toxinům. U CSA byl nalezen protektivní účinek proti dopaminergní depleci a také redukce buněčné smrti u mozkové mrtvice, srdeční zástavy a traumatického poranění mozku u zvířecích modelů.

V této práci se pokusíme zjistit schopnost CSA ovlivnit anticholinesterázovou aktivitu 7-MEOTA a srovnáme jejich účinek na aktivitu AChE.

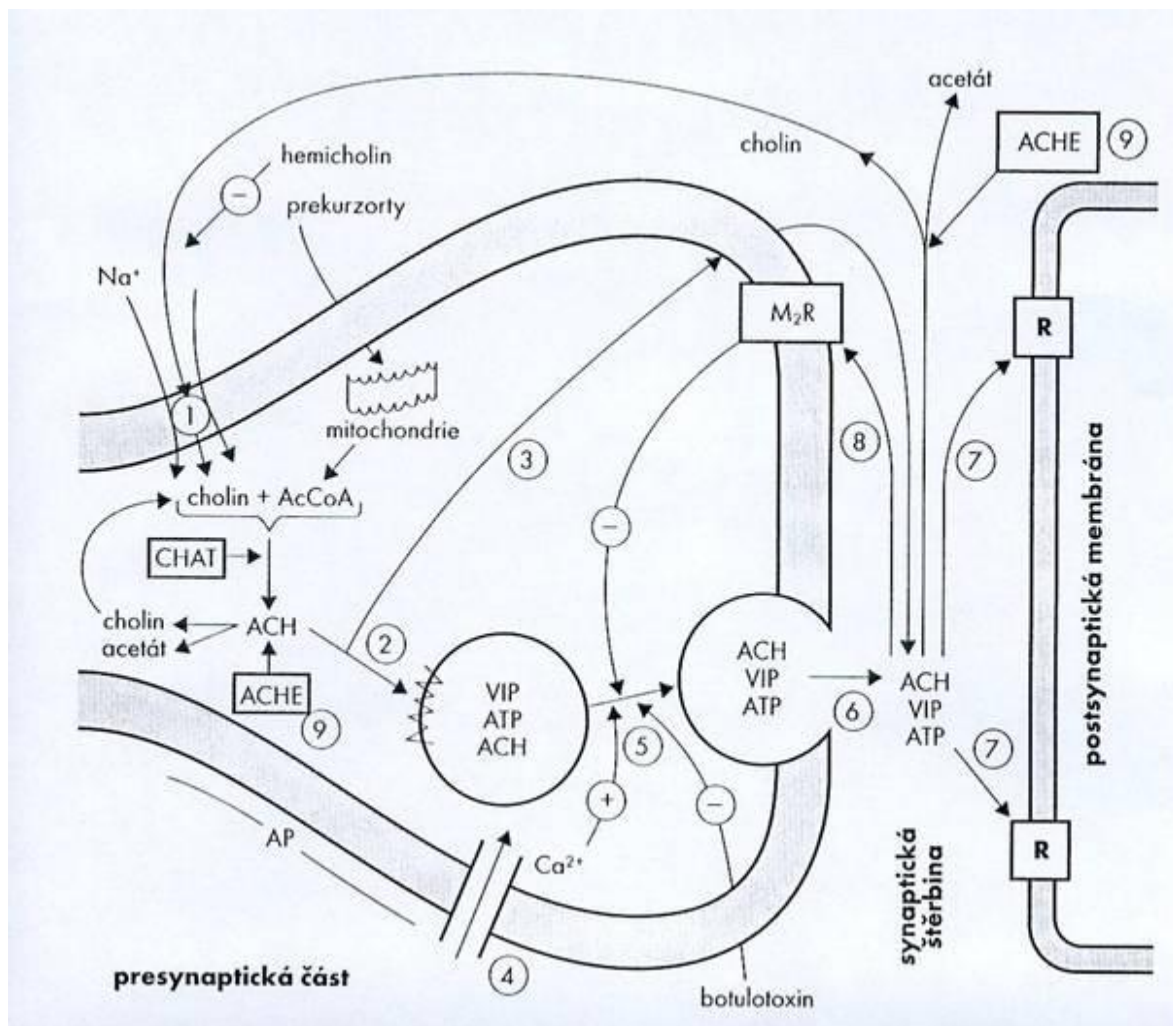


# TEORETICKÁ ČÁST

## Cholinergní systém

### Základní principy cholinergního přenosu

Neurony uvolňující acetylcholin (ACh) jsou známy jako cholinergní neurony. ACh se vyskytuje v celém CNS s nejvyššími koncentracemi v mozkové kůře, hipokampu a některých jádrech bazální části předního mozku. Právě z Meynertova jádra bazální části předního mozku vysílají cholinergní neurony své axony do mozkové kůry, hipokampu a přilehlých oblastí. Pro SDAT je charakteristický velký úbytek neuronů právě v tomto systému (Černochová, 2006).

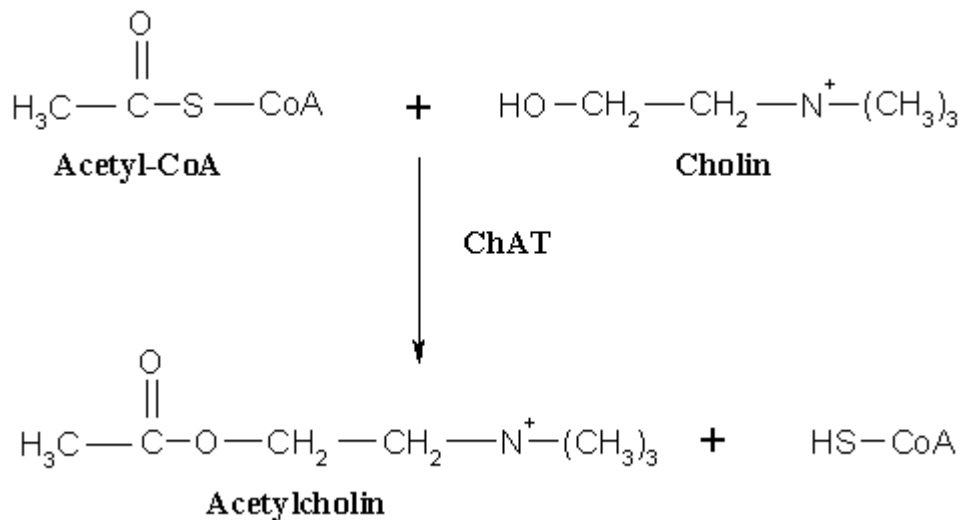


Obr 1. Cholinergní transmise (Lincová a spol., 2002).

ACh je mediátorem cholinergních neuronů. Uvolňuje se na všech pregangliových zakončeních, na postgangliových zakončeních parasymptiku a některých efektorových vláknech anatomického sympatiku, např. v potních žlázách. ACh je v cytoplasmě nervového zakončení syntetizován z cholinu + acetyl-CoA enzymem cholinacetyltransferázou (ChAT). Cholin je aktivně přijímán do nervového zakončení **(1)** – hemicholin vstup blokuje; Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích. Vzniklý ACh je transportován specifickými transportními proteiny do vezikul axonových terminál, **(2)** kde je skladován spolu s kotransmitery ((vazoaktivní intestinální protein (VIP), adenosintrifosfát (ATP)), pouze malá část cytoplazmatického ACh zůstává volně v cytoplasmě a může z nervového zakončení difundovat **(3)** - „nekvantové“ uvolňování ACh. Na podnět akčního potenciálu dochází ke vstupu  $Ca^{2+}$  do nervového zakončení napěťově řízenými kalciovými kanály **(4)** – umožní splynutí membrány vezikul s membránou nervového zakončení **(5)** a uvolnění exocytózou do synaptické štěrbině – „kvantový“ výlev **(6)** (tento proces blokuje např. botulotoxin). ACh v synaptické štěrbině vazbou na postsynaptické cholinergní receptory **(7)** vyvolává parasymptomimetické účinky, a působí i na presynaptické „autoreceptory“ **(8)** – jejich ovlivněním moduluje množství uvolňovaného ACh akčním potenciálem. Vazba ACh na receptory je velmi krátká (cca 2 ms) – po uvolnění ACh je okamžitě hydrolyzován AChE (ta hydrolyzuje i volný cytoplazmatický ACh) na cholin + acetát **(9)**. Vzniklý cholin je v terminálním vlákne znovu použit k syntéze ACh (Silbernagl, 2001; Trojan, 2003; Patočka a spol., 2004).

## Syntéza acetylcholinu

ACh je syntetizován v cytoplasmě neuronů z acetyl-CoA a cholinu pomocí enzymu ChAT. Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích axonálních zakončení z pyruvátu a ostatních prekurzorů. Cholin není syntetizován v mozku a velmi obtížně přechází hematoencefalickou bariérou. Je do cytoplazmy neuronů přijímán aktivně z extracelulárního prostoru dvěma způsoby: vysokoafinitní transport Na dependentní – dodává cholin vzniklý rozkladem ACh, zatímco nízkoafinitní transport přináší do nervového zakončení cholin z plazmy. Dodávka cholinu je dostatečná, proto toto není limitujícím faktorem syntézy ACh (Lincová a spol., 2002; Jiráček, 2006a).



**Obr. 2 Syntéza acetylcholinu**

## Receptory pro Ach

Acetylcholinové receptory (AChR) jsou dvojího typu: nikotinový (nAChR) a muskarinový (mAChR), podle schopnosti přírodních alkaloidů nikotinu a muskarinu napodobit účinky Ach. AChR spojený s iontovým kanálem, který zprostředkovává rychlé excitační působení Ach, se nazývá nikotinový acetylcholinový receptor.

AChR, který není spojen s iontovým kanálem a zprostředkovává pomalé působení Ach, které může být excitační nebo inhibiční, je nazýván muskarinový receptor (mAChR). (Silbernagl, 2001; Trojan, 2003; Patočka a spol., 2004).

## Nikotinové receptory

nAChR jsou uspořádány do homopentamerní nebo pseudopentamerní struktury, závislé na typu skladebných proteinů.

Malá molekula Ach, aktivační ligand, se váže na dvě místa v receptoru a indukuje konformační změny otevírající vnitřní kanálek. Následuje vstup sodíkového kationtu přes povrchovou membránu dovnitř.

Mozkové nAChR jsou složeny z podjednotky se specifickými strukturálními, funkčními a farmakologickými vlastnostmi. Účastní se fyziologických účinků Ach a zprostředkovávají odpovědi CNS na nikotin. Jsou také spojeny s dalšími přenašečovými

systemy a jejich exprese se mění během vývoje a stárnutí a během nemocí jako autismus, schizofrenie, Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba (Patočka a spol., 2004).

### **Mechanismus působení cholinergních látek na nAChR**

nAChR obsahují dvě velmi dobře rozlišitelné domény pro vázání ligandů, které vysvětlují různé cholinergní vlastnosti. V hydrofilní extracelulární oblasti obou  $\alpha$  podjednotek existují vazebná místa jak pro agonisty, jako je Ach, tak pro kompetitivní antagonisty jako je d-tubokurarin.

Agonisté po navázání způsobí otevření kanálu, zatímco kompetitivní antagonisté soutěží o tyto vazebná místa a jejich obsazením inhibují účinek agonisty.

Alfa podjednotky nesou také alosterické vazebné místo pro inhibitory acetylcholinesteráz jako je fyzostigmin (Patočka a spol., 2004).

nAChR je pentamer, který se skládá ze čtyř typů podjednotek (2 podjednotky  $\alpha$  a dále podjednotky  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  nebo 2 podjednotky  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\epsilon$ ). Každá podjednotka čtyřikrát prochází membránou a podjednotky svým uspořádáním vytvářejí iontový kanál pro kationty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Dvě podjednotky ACh se navážou na dvě podjednotky  $\alpha$  (jen ty mají vazebná místa pro ACh), tím dochází ke změnám konformace, otevření kanálu a vstupu  $\text{Na}^+$  do buněk, excitační působení je důsledkem změny polarity, depolarizace membrány (Lincová a spol., 2002).

### **Muskarinové receptory**

mAChR jsou přítomny v neuronech centrálního a periferního nervového systému, srdeční a hladké svalovině a různých exokrinních žlázách. 5 typů receptorů (M1-M5) má specifické tkáňové schéma exprese. Acetylcholinový receptorový kanál je umístěn v mezeře mezi neuronální synapsí a svalovým vláknem. Jestliže se synapse excituje, vezikuly exkretují Ach do synaptického spojení. Tento neurotransmitter otevře AChR kanály, následuje proudění iontů. Ionty postupně excitují svalové vlákno, které kontrahuje. V CNS zprostředkovávají mAChR kontrolu motoriky, regulaci teploty, kardiovaskulární regulaci a paměť (Trojan, 2003; Patočka a spol., 2004).

Funkční význam je nejlépe definován u receptorů M1, M2 a M3. M1 receptory (neuronální) se nacházejí hlavně v CNS, periferních neuronech a parietálních buňkách žaludku. M2 receptory (kardiální) se vyskytují především v srdci a v neuronálních tkáních a zprostředkují převážně inhibiční reakce. M3 receptory (žlázy/hladké svaly) jsou odpovědné především za excitační účinky ACh a cholinergní stimulace (zvýšení sekrece slinných, bronchiálních a jiných žláz), v hladkých svalech cév však zprostředkují relaxaci. Funkční význam receptorů M4 a M5 nebyl zatím přesně definován (Lincová a spol., 2002).

### Mechanismus působení cholinergních látek na mAChR

mAChR jsou receptory spojené s efektem pomocí G-proteinu. Podle typu G-proteinu dochází buď k aktivaci nebo k inhibici efektoru. Tyto receptory sedmkrát procházejí membránou, receptory M1, M3 a M5 aktivují protein  $G_{q/11}$  a stimulací fosfolipázy C (PLC) vedou ke vzniku nitrobuněčných posílů inositol trifosfátu ( $IP_3$ ) a diacylglycerolu (DAG). Zvyšuje se nitrobuněčná koncentrace kalcia a dochází k excitačním projevům, např. ke kontrakci hladkých svalů vnitřních orgánů, zvýšení sekrece aj. Receptory M2 a M4 prostřednictvím  $G_{i/o}$  proteinu působí inhibičně, snižují aktivitu adenylátcyklázy (AC), inhibují kalciový kanál a tímto mechanismem dochází při jejich ovlivnění k inhibičním účinkům ACh na srdci a k presynaptické inhibici v CNS (Lincová a spol., 2002).

### Subtypy acetylcholinových receptorů v přehledu

	nikotinové		muskarinové <sup>1)</sup>		
rcp	muskulární $N_M$	neuronální $N_N$	$M_1$ „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 - predsíně <sup>3)</sup> - AV uzel presynaptická zakončení	-exokrinní žlázy -hladké svaly -endotel

účinek na úrovni buňky:	otevření iontového kanálu pro kationty depolarizace buněčné membrány - excitace	stimulace PLC <sup>2)</sup> (IP <sub>3</sub> , DAG) ↑Ca <sup>2+</sup> ↓permeab. pro K <sup>+</sup> <b>depolarizace excitace</b>	↓aktivity AC <sup>3)</sup> (↑cAMP → ↓Ca <sup>2+</sup> ) resp. aktivace K <sup>+</sup> kanálu inhibice	aktivace PLC (IP <sub>3</sub> , DAG) <sup>2)</sup> Ca <sup>2+</sup> stimulace	
funkce:	nervosvalový přenos	neurotransmise v gangliích; presynaptická facilitace v CNS	<u>CNS excitace</u> (paměť); žaludek (sekrece HCl); zvýšení motility GIT	<u>-srdce- inhibice</u>  -presynaptická inhibice  -neuronální inhibice	Sekrece  kontr. hladkých svalů  vazodilace (NO)
agonista:	acetylcholin karbachol	acetylcholin nikotin	acetylcholin oxotremorin	acetylcholin karbachol	acetylcholin karbachol

### Tab. 1 Subtypy acetylcholinových receptorů

<sup>1)</sup> Funkce muskarinových receptorů M4 a M5 není přesně definována.

<sup>2)</sup> Stimulace PLC (fosfolipázy C) → vznik IP<sub>3</sub> (inositol trifosfát) + DAG (diacylglycerol) → aktivační projevy jako kontrakce hladkých svalů, sekrece aj.

<sup>3)</sup> AC – adenylátcykláza

AV uzel – atrioventrikulární uzel (Lincová a spol., 2002).

### Postižení cholinergního systému u SDAT

Cholinergní mozkový systém je velmi významný pro paměť. V časných stádiích Alzheimerovy choroby je nejprve postižen tento systém. Bývá zjišťován nedostatek neuronové ChAT, syntetizující ACh z cholinu a acetyl-CoA.

Bývá také snížen vstup prekursoru ACh – cholinu – do neuronů mechanismem tzv. vysokoafinitního cholinergního uptake (Jiráček, 2007).

Již v ranných fázích vývoje SDAT dochází také k funkční dyskonexi mezi prefrontální kůrou a hipokampem a k redukci aktivity lokální neuronové sítě, do níž obě oblasti patří (Koukolík, 2002).

Při senilní demenci Alzheimerova typu (SDAT) bylo v hipokampu a mozkové kůře post mortem zjištěno výrazné snížení množství ChAT, dochází tedy k výraznému snížení syntézy Ach, což se projeví poklesem koncentrace Ach v synaptických vezikulech a cholinergní neuron je tak vyřazen z činnosti.

U SDAT je porušena především presynaptická část cholinergního neuronu, zatímco postsynaptické oddíly (receptory) zůstávají po delší dobu zachovány (Patočka a spol., 2004).

Dochází ke snížení počtu nikotinových cholinergních receptorů, zatímco počet muskarinových cholinergních receptorů se – alespoň v raném stadiu nemoci - podstatně nemění (Jiráček, 2007).

Histopatologický obraz SDAT post mortem je charakterizován třemi hlavními znaky :nahromadění patologického proteinu  $\beta$ -amyloidu extracelulárně (akumulace ve formě plak), intracelulárně degenerovaný – hyperfosforylovaný -  $\tau$ -protein (hlavní biochemický substrát neurofibrilárních klubíček) a úbytek synapsí. Převládá názor, že tvorba  $\beta$ -amyloidu je primární děj, který pak navozuje degeneraci neuronového  $\tau$ -proteinu a další neurodegenerativní děje, vedoucí až k buněčné smrti (Jiráček, 2006b).

Detekci  $\tau$ -proteinu lze provádět novou metodikou pomocí senzorů s povrchovými plazmony. Díky možnosti sledování vazby  $\tau$ -proteinu ve více kanálech senzoru s povrchovými plazmony najednou je možné rozlišit více forem  $\tau$ -proteinu v mozkomíšním moku. To dává naději do budoucna k urychlení a zpřesnění diagnostiky SDAT, která se dosud převážně opírá o anamnestická data a vyšetření poklesu kognitivních funkcí (Bartoš a spol., 2007).

Tvorba těchto netypických cytoskeletárních elementů obvykle předchází zániku neuronů. Zánik buněk postihuje zvláště cholinergní neurony v nucleus basalis Meynerti, v hipokampu a v entorinální mozkové kůře (Patočka a spol., 2004)

Deficit cholinergní transmise je spojen s postupným poklesem aktivity ChAT, enzymu syntetizujícího Ach z cholinu a z acetylkoenzymu A. Acetylkoenzym A je vytvářen v Krebsově cyklu a kromě tvorby Ach tvoří substrát pro tvorbu adenosintrifosfátu (ATP), hlavního přenašeče energie.

Dochází ke sníženému až úplně přerušnému uvolňování Ach z presynaptických zakončení. V synaptické štěrbině jsou molekuly Ach odbourávány enzymy cholinesterázami. Za normálních podmínek se uplatňuje AChE, ale u SDAT také BuChE, která je za normálních podmínek minoritní. Dochází k situaci, kdy klesá počet molekul AChE a stoupá počet molekul BuChE (Jiráček, 2002).

Acetylcholinesterázy mají několik různých forem. V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1. U SDAT roste výrazně podíl formy G1 a klesá podíl G4 o 40% u SDAT (Bajgar, 1991).

Amyloidní plaky mají zpočátku svého vývoje difuzní charakter a jsou benigní, protože mohou existovat v tomto stavu celá léta, aniž by došlo k propuknutí choroby. V těchto placích se však ve zvýšené míře ukládá AChE i BuChE. Je pravděpodobné, že oba enzymy by mohly působit jako patologický chaperon, který indukuje konformační změny -amyloidového proteinu. Inhibice cholinesteráz tedy působí u SDAT komplexněji, než jen pouhým zlepšením cholinergní transmise (Patočka, 1998; Patočka a spol., 2001; Silbernagl, 2001; Jiráček, 2002).

## **Mechanismus účinku Ach**

Neurotransmitter ACh působí neselektivně, ovlivňuje všechny cholinergní receptory přítomné v tkáních, má muskarinové i nikotinové účinky. Účinky ACh se projevují především jako stimulační mACHR, účinky na nACHR se projeví až při podání velkých dávek ACh. Vysoký náboj molekuly brání absorpci z GIT a také prostupu hematoencefalickou bariérou do CNS (Lincová a spol., 2002).

Mechanismus účinku Ach zdůrazňuje jak veliký dopad může mít nekovalentní vazba malého molekulárního substrátu (hosta) na biologický systém. Ach je klíčovým neurotransmiterem. Nervové impulsy jsou přenášeny z jednoho nervového vlákna na druhé přes synapse (synaptické štěrbině jsou přibližně 30-40 nm velké). Rolí Ach je



navázat se a tím otevřít sodíkový iontový kanál, který je vytvořen uspořádáním podjednotek nikotinového acetylcholinového receptoru (nAChR). Tento velký transmembránový protein je složen z pěti podjednotek (dvě se nazývají  $\alpha$ , další  $\beta$ ,  $\delta$  a  $\gamma$ ) majících podobné aminokyselinové sekvence, které obklopují centrální kanál. Ach se váže na dvě  $\alpha$ -podjednotky, čímž způsobí konformační změnu vnější oblasti kanálu. To umožní rychlý vtok iontů  $\text{Na}^+$  nacházejících se v oblasti synapse směrem do buňky v souladu s fyziologickým koncentračním gradientem. Vazba agonisty Ach na jeho receptor je vysoce selektivní a zahrnuje kationtové  $\pi$ -interakce mezi kvartérní amoniovou skupinou a specifickým tryptofanovým zbytkem. Zajímavé je, že aktivita Ach může být ovlivněna nikotinem, který také obsahuje kvartérní amoniovou skupinu. Je pravděpodobné, že toto je vlastně podstatou vzniku závislosti na nikotinu u kuřáků (Patočka a spol., 2001; <http://www.uochb.cas.cz>).

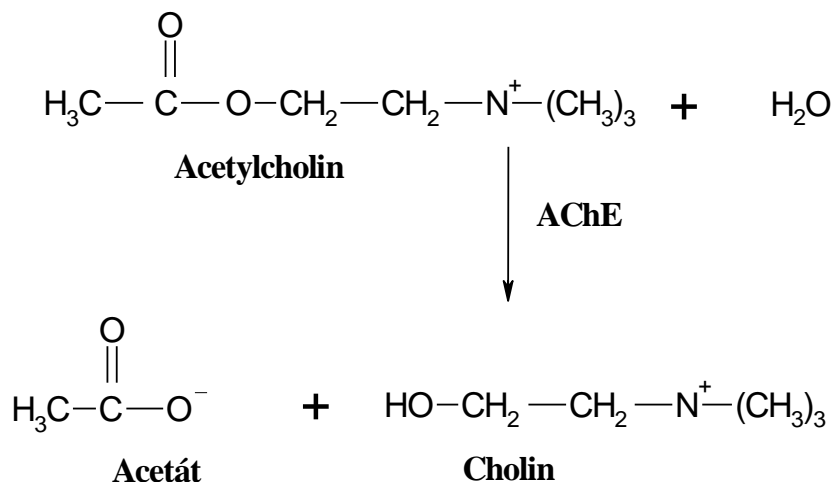
## Hydrolýza Ach

K hydrolýze Ach pomocí AChE dojde tak, že molekula substrátu – acetylcholinu - se spojí s aktivním místem enzymu - acetylcholinesterázou.

Důležité místo představuje hydroxylová skupina serinu, která uskutečňuje nukleofilní atak na elektrofilní uhlíkový atom substrátu, v tomto případě esterové spojení mezi cholinem a acylovou skupinou. Dochází k dočasné kovalentní vazbě mezi enzymem (s OH skupinou serinu) a substrátem. Tak se stává enzym neaktivním.

Poté dojde k hydrolýze této vazby za vzniku cholinu a zbytku kyseliny octové (tj. acetylu) za současného „odkrytí“ esterového místa a tedy i k obnovení aktivity enzymu.

Optimální pH enzymu je 7.0 s izoionickým bodem blízko 5,35. Typický aktivátor AChE je  $0,02 \text{ M Mg}^{2+}$ , který je stimulatorem v čištěných preparátech (Patočka a spol., 2001; Patočka a spol., 2004).



Obr. 3 Hydrolyza acetylcholinu

## Úloha cholinesteráz, zejména AChE v organismu

Serinové hydrolázy a proteázy jsou ubikvotní skupina enzymů, které jsou základem pro mnoho rozhodujících životních funkcí. Jejich společným rysem je to, že hydrolyzují estery cholinu a jsou inhibovány organofosfáty a karbamáty. Lidské tkáně mají dvě základní aktivity cholinesteráz:

Acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7) bývá nazývána jako pravá, specifická, také jako typ 1. Nachází se v erythrocytech, nervosvalové ploténce, plicích, slezině a ve všech částech mozku. Přírodním substrátem AChE je Ach, který je jejím účinkem hydrolyzován na cholin a acetát.

Butyrylcholinesteráza ( BuChE, EC 3.1.1.8) je nazývána jako nespecifická pseudocholinesteráza, nebo sérová cholinesteráza, vzhledem k její vysoké aktivitě v plazmě. Dále se vyskytuje v játrech, slinivce břišní, srdci a v bílé hmotě mozku. Funkce BuChE byla dlouhou dobu nejasná, až v poslední době byla částečně objasněna. Působí jako scavanger toxických molekul a patrně se podílí na formování amyloidového prekurzorového proteinu.

Depozita  $\beta$ -amyloidu a neurofibrilární klubka vykazují hromadění jak BuChE, tak i AChE. BuChE také hydrolyzuje Ach, ale výrazně pomaleji, zato však hydrolyzuje celou

řadu vesměs exogenních substrátů, např. heroin, kokain, tetrakain, aspirin apod. (Patočka a spol., 2001; Patočka a spol., 2004; Gannong, 1995).

## **Molekulární formy cholinesteráz**

AChE a BuChE mají z 65% společnou sekvenční homologii aminokyselin a jsou kódovány různými geny na lidských chromozomech 7 (AChE) a 3 (BuChE). O vzniku odlišných, avšak příbuzných molekulárních forem AChE a BuChE rozhoduje vždy jediný gen a to v důsledku alternativního sestřihu kódovací oblasti původního transkriptu. To má za následek sérii AChE a BuChE, které mají podobné katalytické vlastnosti, ale odlišnou buněčnou a mimobuněčnou distribuci a nekatalytické aktivity. Strukturní vlastnosti těchto dvou cholinesteráz určují rozdíly v jejich substrátové specifitě.

Rozdíly mezi kinetickými vlastnostmi enzymu a výskytem AChE a BuChE v mozku vedly k závěru, že v normálním mozku je AChE hlavním enzymem zodpovědným za hydrolýzu AChE, zatímco BuChE má funkci podpůrnou.

AChE existuje v několika molekulárních formách, které je možno rozdělit na globulární (G) a asymetrické (A). Globulární formy obsahují jednu (G1), dvě (G2), nebo čtyři (G4) identické katalytické podjednotky. Subjednotky mají hmotnost 77 kDa a do dimeru se spojují disulfidovými můstky. G formy existují v solubilní a membránově vázané formě. Membránově vázané formy mají malou nekatalytickou subjednotku, tzv. kotvu, která fixuje enzym v membráně. Asymetrické formy AChE se skládají z jednoho (A4), dvou (A8) nebo tří tetrametrů (A12), které jsou spojené pomocí peptidických, kolagenu podobných řetězců.

V lidském mozku se AChE vyskytuje v G1 a G4 formě, jejich poměr se v různých oblastech mozku liší. Zatímco v lidském mozku je z 80% zastoupena G4 forma AChE, v erytrocytech převládá forma G2.

Zastoupení molekulárních forem AChE se liší i na synapsích. G4 formy jsou přítomny především v presynaptické oblasti, zatímco G1 formy v postsynaptické. V krevní plazmě a v mozkomíšním moku byly identifikovány především G4 formy AChE. I přes tuto multiplicitu mají všechny molekulární formy AChE ekvivalentní katalytickou aktivitu (Patočka a spol., 2001; Brunovský, 2007).

## **Charakteristika lidské AChE**

Lidská AChE je glykoprotein, jehož základní molekula má jediný peptidický řetězec, je složena z 523 aminokyselin uspořádaných do globulárního tvaru. Aktivní centrum enzymu je umístěno v kavitě pronikající hluboko do středu globule a na samém dně této kavity se nachází katalytické centrum tvořené hydroxylovou skupinou serinu.

Enzym je syntetizován v tělech neuronů a do distální části jejich axonů je aktivně transportován. Úlohou lidské AChE je ukončení přenosu v cholinergních synapsích nervového systému rychlou hydrolýzou neurotransmiteru Ach. Aktivní místo molekuly AChE je tvořeno dvěma peptidovými řetězci  $\alpha$  a  $\beta$ . B řetězec obsahuje tzv.  $\beta$ - anionické místo a oblast hydrofobních interakcí,  $\beta$ - anionické místo je definováno Trp 84, Phe 300 a Phe331. Jejich role je orientovat substrát nabitou částí ke vstupu k aktivnímu centru. Aktivní katalytické centrum enzymu, na němž dochází k rozkladu Ach, je lokalizováno na  $\alpha$ -řetězci, které obsahuje tzv. katalytickou triádu serinu, histidinu a glutaminu.

Pohled do struktury pomocí RTG záření odhalil, že enzym obsahuje také aromatická rezidua. Ty hrají důležitou roli ve stabilizaci komplexu. Periferní anionické místo AChE, lokalizované v aktivním centru zahrnuje překrývání vazných míst pro alosterické aktivátory a inhibitory. Periferní anionické místo je zahrnuto v „přeslechovém“ mechanismu s aktivním centrem. Citlivost všech reziduí enzymu a plasticita aktivního centra jsou pravděpodobně výsledkem evolučního pochodu zaměřeného k tomu, aby udělil optimální katalytickou

aktivitu v široké rozmanitosti podmínek , za nichž může probíhat činnost AChE v synaptické mezeře (Patočka a spol., 2001; Patočka a spol., 2004).

## **Metody verifikace AChE**

Existují tři hlavní dostupné možnosti, které usnadňují představu působení AChE a BuChE v mozku. Jsou to: enzymová histochemie, imunocytochemie a hybridizace *in situ*.

- Enzymová histochemie – je založená na precipitaci neviditelné reakce produktu v místě enzymové aktivity. Je to zdaleka nejvíce flexibilní metoda a poskytuje nejlepší mikroskopický detail.
- Imunocytochemie – je založená na reakci protilátek specificky se vázících na epitopy AChE nebo BuChE. Tato metoda slouží k určení lokalizace enzymových proteinů. Specifita je dána tím, že imunologicky bezvýznamný Ig nemá stejnou imunoreaktivitu kolidující s enzymovou aktivitou a potvrzuje, že katalytická aktivita je spojena s příslušným proteinem.
- *In situ* hybridizace – tato metoda lokalizace cholinesteráz předpokládá identifikaci cholinesterázové mRNA metodou *in situ* hybridizace. Identifikace mRNA v enzymaticky cholinesterázově pozitivních perikariích např. potvrdila, že enzym je spíše syntetizován lokálně, nikoliv tedy přímo v presynaptickém elementu. *In situ* metoda neoznačuje samotné axony. Obecně platí, že perikaria, které obsahují cholinesterázovou enzymovou aktivitu nebo imunopozitivitu, také exprimují odpovídající cholinesterázovou mRNA. (Giacobini,2000).

## **Charakteristika lidské BuChE**

BuChE je glykoprotein složený ze čtyř identických podjednotek. Každá z podjednotek je tvořena peptidickým řetězcem složeným z 574 aminokyselin a 9 cukerných zbytků. Sérová BuChE je syntetizována v játrech a její poločas je 12 dní. Až dosud bylo identifikováno 39 genetických variant lidské BuChE, 30 z nich však má nulovou nebo jen nepatrnou enzymovou aktivitu.

Koncentrace BuChE v séru je 5 mg/l séra a je významným detoxikačním enzymem pro karbamátová a organofosfátová insekticida, také biotransformuje lokální anestetika prokain, kokain a také některé další látky jako aspirin. Tento

enzym se nachází v krevní plazmě, játrech, pankreatu, střevní mukoze a bílé hmotě centrálního nervového systému. Hydrolyzuje butyrylcholin čtyřikrát rychleji než Ach (Patočka a spol., 2001; Patočka a spol., 2004).

## **Důvod a způsoby stanovení aktivity cholinesteráz**

Aktivita cholinesteráz v krvi má zásadní význam pro stanovení diagnózy při otravě organofosfáty a karbamáty, ale může být použita i u jiných stavů, než u zmíněné intoxikace.

Snížení aktivity BuChE v plazmě indikuje pokles syntézy enzymu nebo pokles počtu produkujících buněk. Stanovení je vhodné pro monitorování chronického poškození jater. Aktivita BuChE je také snížena u neoplazií jater, při popáleninách, diabetu a proteinurii.

Naopak zvýšení aktivity BuChE není tak časté a může se vyskytnout hlavně v počáteční fázi intoxikace organickými rozpouštědly včetně alkoholu.

Praktické využití stanovení AChE nedosáhlo takového stupně. Snížení aktivity erytrocytární AChE je často u anemických stavů, zejména u perniciózní anémie. Aktivita erytrocytární AChE se považuje za marker integrity membrány erytrocytů ( Bajgar, 1991).

Při stanovení aktivit cholinesteráz lze využít více možností. Obecně se vychází z toho, že do reakční směsi je dán enzym získaný z různých zdrojů a vlastní reakce je zahájena přidáním specifického substrátu. Po určité době je sledován buď úbytek nerozloženého substrátu nebo přírůstek reakčních produktů, obojí buď přímo nebo nepřímo.

Pro přesnější diagnostiku je nejlepší měřit v krvi aktivitu obou cholinesteráz, AChE v erytrocytech a BuChE v plazmě, což předpokládá u krve její centrifugaci a tím i časové ztráty. Je-li měřena aktivita cholinesteráz v plné krvi, výsledky nejsou přesné, protože jde o společný účinek obou enzymů, AChE a BuChE (80% : 20%). Přesto je tento způsob výhodný, umožňuje zpracování materiálu bez předchozí centrifugace.

Metod pro stanovení cholinesteráz bylo popsáno mnoho. Metody pro měření kinetiky enzymové hydrolýzy Ach a acetylthiocholinu v AChE in vivo, jako je metoda s využitím hydroxylaminu a HPLC metoda.

Pro testování enzymatické hydrolýzy Ach probíhající in vitro je používán acetylthiocholin, protože mechanismus hydrolýzy acetylthiocholinu kvantitativně

odpovídá mechanismu hydrolýzy Ach. Průběh reakce může být tedy kvantitativně měřen dvěma nezávislými metodami:

- spektrofotometricky- stanovení thiocholinu metodou podle Ellmana
- elektrochemicky – stanovení kyseliny octové.

V současné době je aktivita cholinesteráz vyjadřována v kataltech na litr (kat/l), což odpovídá přeměně jednoho molu substrátu za sekundu na litr, např. séra či plazmy (Bajgar, 1972).

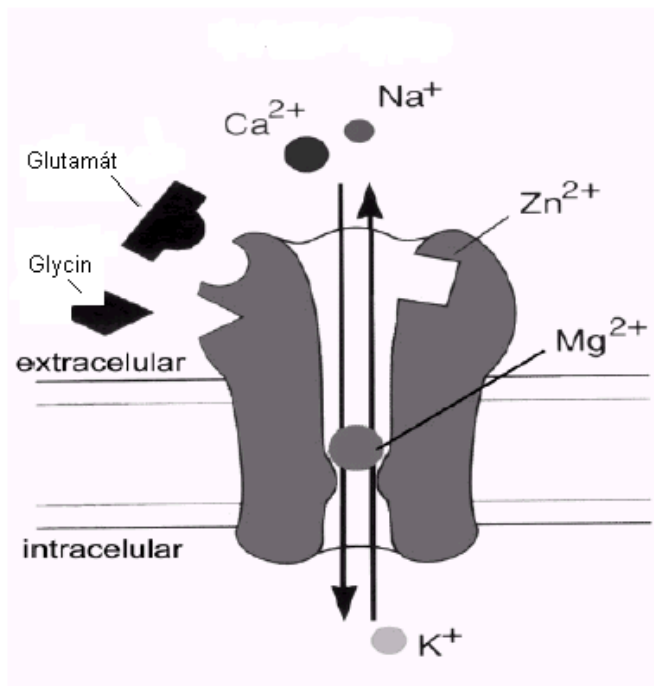
## **Známé možnosti léčby SDAT**

### **Farmakologická léčba**

Předpokladem pro úspěšnou dlouhodobou léčbu je včasná diagnóza a včasná léčba. Cílem je zlepšení stavu, či alespoň zábránění progresu stavu, výsledkem by mělo být udržení kvality života. Prostředkem k tomuto užívaný je zásah do metabolismu mozkových mediátorů (Pidrman a Bouček, 2002).

Na základě důkazů lze použít dva farmakoterapeutické přístupy, které jsou indikovány u Alzheimerovy nemoci:

- podávání inhibitorů cholinesteráz
- podávání neselektivních antagonistů tzv. N-metyl-D-aspartátových (NMDA) ionotropních receptorů excitačních AMK, které otevírají iontové kanály pro  $Ca^{2+}$ . Jedinou klinicky používanou látkou je memantin. Svým působením brání excitotoxicitě – nadměrnému působení excitačních AMK, ke kterému u SDAT dochází (Jirák a Laňková, 2007).



**Obr. 4 Receptor NMDA** (<http://www.monografias.com>).

Na těchto receptorech za fyziologických poměrů probíhá děj nezbytný pro paměť – dlouhodobá potenciace (opakované působení stejného podnětu působí vyšší následné postsynaptické potenciály). U SDAT, vaskulárních i posttraumatických změn CNS však dochází k nadměrnému uvolnění excitačních AMK (glutamát, aspartát aj.) a nadměrné excitaci NMDA receptorů. Tím dojde k nadměrnému influxu kalcia do neuronů. To pak způsobí aktivaci řady enzymů – především proteinkináz a fosfatáz, v důsledku čehož dochází k změnám neuronálních proteinů včetně jejich prostorového uspořádání. Nakonec dochází k odkrytí genu pro apoptózu

– programovanou buněčnou smrt – a neurony ve zvýšené míře zanikají.

Kombinace memantinu a inhibitorů cholinesteráz je racionální, používá se u středně těžkých SDAT, avšak je finančně velmi náročná . Jinou léčebnou variantou je použití inhibitorů cholinesteráz jako léků I. volby, při rekurenci pak přejít na memantin (Jiráček,2006a).

Je používáno i dalších farmak, která však v současnosti slouží jako potenciálně aditivní. Jsou to např. nootropní farmaka, extrakty z ginkgo biloba, tzv. scavengery (vychytávače) volných kyslíkových radikálů nebo inhibitory monoaminoxidázy B (Jiráček a Laňková, 2007).



K ovlivnění cholinergního systému je užíváno několik terapeutických strategií:

1. **Podávání prekurzorů syntézy acetylcholinu:** Jsou používány především různé druhy lecitinu, především sojový lecitin. Je nutno užít vysoké dávky, řádově v desítkách gramů denně. Z lecitinu se pomalu uvolňuje cholin jako prekurzor pro tvorbu acetylcholinu. Je používán spíše jako doplňková léčba.
2. **Podávání inhibitorů acetylcholinesteráz:** První použitá látka byl fysostigmin. Nyní jsou používány perorální inhibitory acetylcholinesteráz s dlouhým poločasem a dobrou tolerancí.
3. **Podávání přímých muskarinových a nikotinových agonistů:** Nadějný muskarinový agonista je např. xanomelin; je zkoušeno také několik nikotinových agonistů.
4. **Látky příznivě ovlivňující cholinergní systém prostřednictvím ovlivnění jiných neuromediátorových systémů:** Jsou zkoušeny např. některé beta-karboliny, které parciálně inhibují GABA-systém. GABA tonicky inhibuje cholinergní systém, a tato částečná inhibice GABA pak vede k deliberaci cholinergního systému.
5. **Další látky působící zlepšení cholinergních funkcí různými mechanismy:** Např. acetyl-L-karnitin zlepšuje neuronální influx prekurzorů acetylcholinu. Některé aminopyridinové deriváty blokují zpětný příjem ACh (Jirák a Koukolík, 2004).

Z uvedených možností jedině zpomalení odbourávání ACh cestou inhibitorů cholinesteráz lze považovat za způsob, u něž je dnes dostatečně prokázán terapeutický účinek (Pidrman a Bouček, 2002).

Tato léčiva zpomalují rozpad synaptického ACh, prodlužují jeho schopnost stimulovat postsynaptické receptory a zesilují přirozené uvolňování ACh v mozku (Brunovský, 2006).

## **Behaviorální léčba demence**

Cílem je udržení nemocného po co nejdelší dobu v domácím prostředí spolu s udržením kvality života.

Prostředky používané v této léčbě jsou kognitivní trénink, aktivace, motivace, tvůrčí zaměstnání a péče o fyzickou aktivitu včetně výživy (Pidrman a Bouček, 2002).

## **Inhibitory cholinesteráz**

### **Organofosfáty a karbamáty**

Vysoká afinita některých organofosfátů k AChE, spolu se skutečností, že tohoto neobyčejně výkonného enzymu je v organismu jen zcela nepatrné množství (např. v mozku člověka jen necelý 1mg), je příčinou neobyčejně vysoké toxicity těchto látek. Inhibiční účinek organofosfátů na AChE spočívá v jejich chemické vazbě na hydroxylovou skupinu serinu, která tvoří jednu část katalytického centra AChE. Takto fosforylovaný enzym je inaktivní a jeho spontánní defosforylace nukleofilním účinkem vody je u organofosfátů velmi pomalá.

Některé silně nukleofilní látky s vhodnou strukturou kompatibilní s aktivním povrchem AChE jsou schopny enzym defosforylovat a tak mu vrátit jeho biologickou účinnost. Podobně jako organofosfáty, inhibují AChE také některé karbamáty tím, že karbamylují hydroxylovou skupinu serinu. Organofosfáty i karbamáty jsou tzv. izosterickými inhibitory, neboť místem jejich vazby je stejná funkční skupina enzymu jako pro substrát. V molekule AChE existují i další místa, jejichž obsazení některými ligandy vede rovněž k inhibici enzymové aktivity. Takovým místem je periferní nebo-li  $\beta$ -anionické místo či oblast tzv. hydrofobních interakcí. Vazba na tato místa je uskutečněna elektrostatickými či hydrofobními interakcemi, je reverzibilní a takovéto inhibitory se nazývají allosterické (Patočka, 1998).

### **Léčebné využití inhibitorů AChE**

Nový zájem o inhibitory AChE podnítila zjištění, že cholinergní nervový systém se významně podílí na procesech paměti a učení. Cholinergní

hypofunkce, způsobená nedostatkem Ach v mozku, vede ke ztrátě intelektuálních a kognitivních funkcí. Senilní demence Alzheimerova typu (SDAT) je nejznámější neurologickou poruchou tohoto druhu. Jednou z cest, jak zvýšit množství Ach v mozku na úroveň nezbytnou pro fungování kognitivních funkcí, je umělé snížení aktivity AChE podáváním vhodných inhibitorů.

Tyto látky musí procházet přes hematoencefalickou bariéru, musí umožňovat kontrolované snížení aktivity mozkové AChE a musí mít co nejvyšší terapeutickou šíři. Již z tohoto je zřejmé, že nervově paralytické organofosfáty tyto podmínky nemohou splnit, tudíž se hledaly další typy méně toxických a proto i méně nebezpečných typů inhibitorů (Patočka, 1998).

AChE patří mezi tzv. serinové hydrolázy. Nukleofilem, atakujícím esterovou funkci Ach je deprotonizovaný hydroxyl serinu (tzv. esteratické centrum enzymu). Vysokou afinitu Ach k enzymu zajišťuje elektrostatická interakce mezi kvartérním dusíkem substrátu a karboxylátovým aniontem asparágové kyseliny.

V současné době je nejdůležitějším terapeutickým přístupem podávání reverzibilních inhibitorů acetylcholinesteráz. Inhibicí cholinesteráz je dosaženo toho, že je větší nabídka molekul Ach k vazbě na jejich nikotinové i muskarinové receptory. Navíc je snižována tvorba i toxicita  $\beta$ -amyloidu (Hampel a Paleček, 2002).

### 3 způsoby inhibice AChE:

- reverzibilní inhibice - inhibitor vytvoří s molekulou AChE reverzibilní komplex, který trvá po dobu, po kterou je inhibitor přítomen v plazmě.
- ireverzibilní inhibice - inhibitor tvoří s molekulou cholinesterázy ireverzibilní komplex. Tohoto způsobu se užívá u chemických bojových látek.
- pseudoireverzibilní inhibice - při této inhibici dojde v molekule cholinesterázy ke kompetitivnímu vytěsnění acetylcholinu inhibitorem, který je pak sám odbouráván cholinesterázami. Jeho vlastní působení je pak delší než samotná přítomnost v plazmě. Po jeho odbourání se molekula AChE funkčně obnoví (Jiráček, 2002).

## **Léčiva ze skupiny inhibitorů acetylcholinesteráz**

Tyto léčiva jsou chemicky nejednotná, jsou z několika rozdílných chemických skupin:

### **Akridinové deriváty**

Tyto látky se v současnosti klinicky nepoužívají, ale jsou účinné, některé další deriváty jsou v klinickém zkoušení. Typickým zástupcem je takrin, který byla stažen z klinického používání pro svou hepatotoxicitu, přestože je klinicky účinný.

### **Karbamátové deriváty**

Mají pseudoireverzibilní způsob inhibice. Inhibují AChE tak, že dochází ke karbamoylaci esteratického místa aktivního centra tohoto enzymu, které je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu. Rychlost dekarbamoylace a s ní spojená obnova enzymové aktivity je závislá na charakteru alkylů vázaných se na dusík karbamoylové skupiny.

### **Piperidinové deriváty**

Principem je reverzibilní způsob inhibice. Masově klinicky používaný lék je Donepezil, účinnost byla podpořena mnoha klinickými studiemi. Jeho dlouhý poločas odbourávání, více než 70 hod., umožňuje dávkování 1x denně. Je to čistý inhibitor AChE, bez ovlivnění BuChE.

### **Alkaloidy**

Široce klinicky užívaná látka galantamin, původně získávána z některých druhů sněženek a narcisů, je dnes vyráběna synteticky. Je to cholinergní dualista, má jak reverzibilní inhibiční účinek, tak také je alosterický modulátor nikotinových pre- i postsynaptických receptorů (Jiráček a Koukolík, 2004).

## **Cyklosporin A**

Objev cyklosporinu A (CSA) v roce 1971 odstartoval novou etapu v imunofarmakologii. CSA je cyklický peptid, tvořený jedenácti aminokyselinami (AMK). Jean Francois Borel objevil v roce 1976 jeho imunosupresivní účinek.

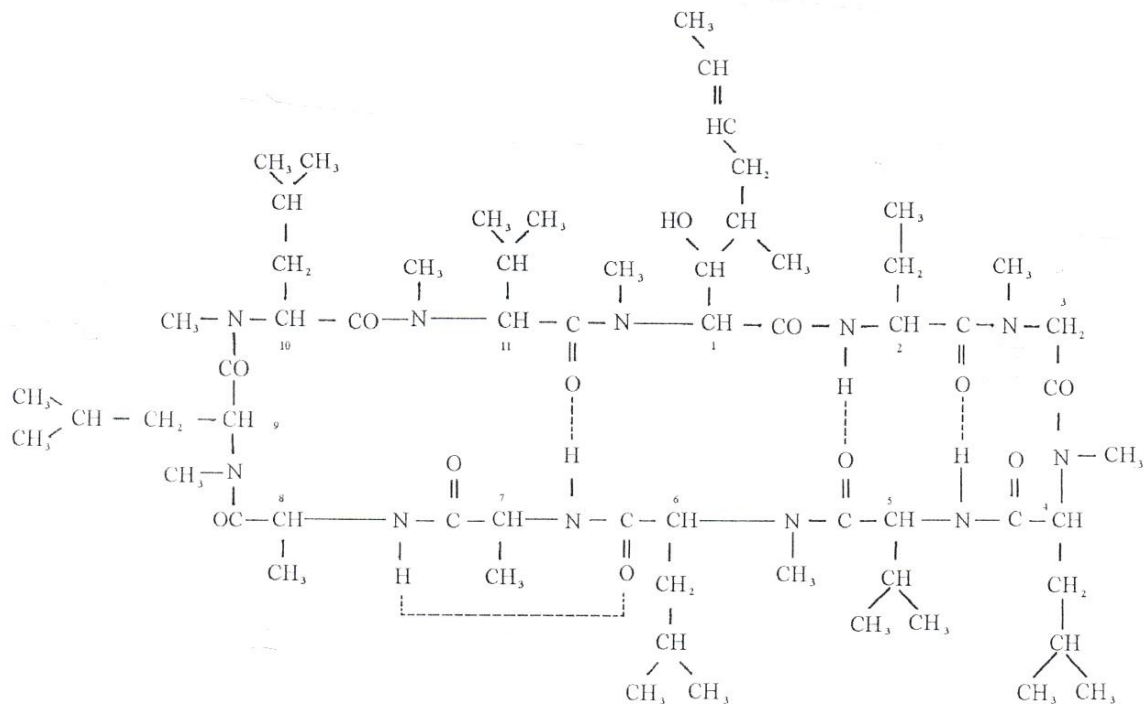
Mimo cyklosporinu A byly izolovány ještě jiné typy přírodních cyklosporinů, a to cyklosporin C, D, G a M, které zatím nejsou běžně léčebně využívány.

První producenti CSA byli v roce 1970 izolováni z půdních vzorků. Jednalo se o vláknité houby *Tolypocladium inflatum* a *Cylindrocarpon lucidum*.

CSA byl nejdříve studován jako možné antimykotické antibiotikum, ale jeho spektrum bylo příliš úzké pro klinické použití. Teprve objev imunosupresivního efektu CSA dal transplantacím novou tvář. V roce 1983 byl CSA schválen ke klinickému použití při prevenci rejekce transplantovaného štěpu. Se zavedením CSA do klinické praxe klesla morbidita transplantovaných pacientů a stoupla úspěšnost transplantací orgánů přibližně o 20%. Zejména transplantace srdce, jater a plic, do té doby pouze experimentální, byly úspěšné. Stejně jako u transplantací se CSA nabízí k léčbě autoimunních onemocnění. Např. v roce 1980 se pomocí CSA experimentálně léčil inzulin dependentní diabetes mellitus, chronické astma, atopická dermatitida a aplastická anémie. CSA také inhibuje P-glykoprotein, který je zodpovědný za multilékovou rezistenci (Demeule a spol., 1999; Krejčová a Herink, 2002).

## **Chemická struktura**

Aktivní metabolit byl určen jako cyklický undekapeptid, který byl následně nazván cyklosporin. Struktura a konformace cyklosporinu byly zjištěny pomocí chemické degradace společně s metodou strukturní krystalografie a dvourozměrnou NMR. Bylo zjištěno, že cyklosporin je neutrální látka, je složen z jedenácti AMK, nerozpustný ve vodě, ale velmi dobře rozpustný v tucích a organických rozpouštědlech (Pavelka a spol., 2000).



**Obr.5 Struktura CSA (převzato dle Mařha, 1994).**

## Producenti a biosyntéza

Stejně jako většina sekundárních metabolitů mikrobiálního původu je CSA syntetizován extraribozomálně. Tato syntéza má výrazně nižší energetickou spotřebu na syntézu jedné peptidické vazby ve srovnání s typickou ribozomální proteosyntézou. Extraribozomální syntéza je obecně zajišťována multifunkčním enzymem. U syntézy CSA je to enzym cyklosporin syntetáza. Biosyntézu sekundárních metabolitů pomocí tohoto enzymu lze obecně rozdělit na tři základní kroky:

1. Aktivace AMK - sekundární metabolity nemohou vznikat z volných AMK, ty musí být nejprve aktivovány, tj. vyzvednuty na vyšší energetickou hladinu. Chemickou energii dodává ATP, ten reaguje s karboxylem AMK na aminoacyladenylát za současného vzniku difosfátu.

2. Tvorba peptidické vazby – v procesu elektrofilní adice reaguje jako donor aktivovaný karboxyl s akceptorovou aminoskupinou.

3. Reakce podílející se na modifikaci metabolitu – patří sem: epimerizace, metylace, cyklizace a modifikace koncového karboxylu (Mařha, 1994).

## **Mechanismus účinku**

Současný model je založen na obecně přijímaném názoru, že imunosupresivní účinek spočívá ve schopnosti CSA inhibovat metabolické dráhy zapojené do přenosu signálu z receptorů T lymfocytů do jádra a takto blokovat aktivaci genů pro syntézu lymfokinů na úrovni transkripce (Mařha, 1994).

CSA také blokuje indukci HLA antigenů II. třídy na antigen prezentujících buňkách. V důsledku působení CSA také dochází nepřímo k inhibici adhezivních molekul, induktorových a efektorových funkcí buněk imunitního systému (Pavelka a spol., 2000).

## **Interakce CSA s buněčným povrchem**

CSA neinteraguje s cílovou buňkou přes specifické receptory, ale váže se na jejím povrchu nescificky, pravděpodobně fyzikálně-chemickou interakcí s lipidy plazmatické membrány.

Na druhé straně CSA ovlivňuje specificky např. funkci T lymfocytů, potvrdilo se, že za jeho imunosupresivní účinek jsou - mimo jiné - zodpovědné intracelulární vazebné proteiny. U CSA byl tento protein izolován a díky své afinitě k CSA nazván cyklofilin (Mařha, 1994).

Imunosuprese cyklosporinem A se děje přes vazbu na cyklofilin, tento komplex se následně váže na kalcium dependentní fosfatázu kalcineurin. Tato formace působí supresi genové exprese cytokinů a inhibuje činnost T lymfocytů (Borlongan a spol., 2000).

Úloha kalcineurinu a jeho inhibice komplexem cyklosporin-cyklofilin byla studována na modelu jaderného faktoru aktivovaných T lymfocytů (NFAT). Ten je tvořen dvěma podjednotkami, z nichž jedna je v cytoplazmě. V průběhu aktivace T lymfocytů proběhne aktivace cytoplazmatické podjednotky NFAT a její transport do jádra, kde se spojí s jadernou podjednotkou a tak se aktivuje exprese genu. Kalcineurin defosforylací řídí vstup cytoplazmatické podjednotky NFAT do jádra.

CSA specificky interaguje s cytoplazmatickým proteinem cyklofilinem. Komplex cyklosporin-cyklofilin pak inhibuje fosfatázovou aktivitu kalcineurinu a tím blokuje aktivaci a transport cytoplazmatické podjednotky NFAT do jádra (Mařha, 1994).

Takto je znemožněna tvorba cytokinů, zejména syntéza interleukinu 2, pomocnými T buňkami, které jsou nezbytné pro aktivaci cytotoxických T lymfocytů a jejich diferenciaci (Suchý a spol., 2004; Steiner a spol., 1996).

Fosfatáza kalcineurin je také lokalizována v mozku, včetně hipokampu. CSA inhibuje kalcineurin v neuronech, který je důležitý pro metabolismus oxidu dusnatého (NO) a jaderný import transkripčních faktorů. Potenciální prospěch cyklosporinu A by spočíval v jeho imunosupresivním efektu, protože u SDAT jsou zaznamenávány známky zvýšené aktivity „zánětlivých“ cytokinů

(Lu a spol., 1996; Borlongan a spol., 2000).

Chemotaktická, ani fagocytární aktivita neutrofilů není CSA ovlivněna (Suchý a spol., 2004).

Při pokusu s dospělými krysami kmene Wistar, které byly léčeny CSA (10mg/kg denně po dobu 9 dní) bylo zjištěno signifikantní snížení exprese kalcineurinu v septu v kombinaci se zvýšenými hodnotami ChAT v septu ve srovnání s kontrolou. ChAT je enzym působící při syntéze ACh z acetylCoA a cholinu. Pozorované zvýšení ChAT vybízí k potenciálnímu léčebnému využití CSA při mozkových poruchách, způsobených změnami v cholinergním systému, hlavně při SDAT (Borlongan a spol., 2000).

## **Hematoencefalická bariéra a P-glykoprotein**

Hematoencefalická bariéra udržuje mozkovou homeostázu a vykonává protektivní funkci kontrolou vstupujících rozpuštěných toxických látek do centrálního nervového systému (CNS).

Efluxní transportér P-glykoprotein (P-gp) je klíčovým prvkem v molekulárním mechanismu udržování speciálních permeačních vlastností hematoencefalické bariéry. Předchází nadměrnému hromadění hydrofobních molekul nebo léčiv v CNS.

P-gp (170 kDA) je uspořádán do 12 transmembránových domén a má dvě vazebná místa pro ATP. P-gp patří mezi transmembránové proteiny a může být příčinou multirezistence tkání, včetně tkáně mozkové, k lékům. Ta je spojena s nadměrnou expresí P-gp, ten je zřejmě v úzkém vztahu k zonulae occludentae (→ těsné spoje). Nachází se ve velkém množství v mnohých tkáních, mj. v endotelových buňkách kapilár hematoencefalické bariéry.



P-gp je u lidí kódován dvěma geny (MDR1 a MDR3, také nazývaný MDR2), tři geny byly identifikovány v hlodavcích (mdr 1a, mdr 1b a mdr 2). Lidský MDR1 a oba mdr1a a mdr1b v hlodavcích prokazují fenotypovou rezistenci, kdežto lidský MDR3 a mdr2 v hlodavcích nikoliv. MDR3 a mdr2 jsou zřejmě zapojeny do transportu fosfatidylcholinu přes membránu hepatocytů.

(Demeule a spol.,1999; Demeule a Régina, 2002; Krejčová a Herink, 2002 ).

### **Substráty P-glykoproteinu a reverzní činitelé**

První molekuly identifikované jako P-gp substráty pocházely z přírodních zdrojů, rostlin či mikroorganismů. Jejich struktura zahrnovala především planární aromatické domény, hydrofobní oblasti, terciální aromatické aminoskupiny nebo měla kladné náboje při fyziologickém pH. Mezi transportované látky pomocí P-gp patří protinádorová léčiva jako anthracykliny, ale i „klasická“ antibiotika např.erytromycin a tetracyklin, dále digoxin, dexamethazon, opioidy a cyklické a lineární peptidy.

Reverzní činitelé jsou molekuly, které obnovují citlivost rakovinných buněk původně lékově rezistentních na antitumorové činitele tím, že brzdí transportní aktivitu P-gp. Mezi první generaci patří blokátory kalciových kanálů, antagonisté kalmodulinu, chinolin, steroidy, imunosupresivní látky, antibiotika a detergenty. Většina těchto látek produkuje toxiny při užívání dávky dostatečné k inhibici P-gp. Vývoj se proto nezastavil, ale nastoupila druhá a třetí generace, jako je valsopodar (Demeule a Régina, 2002).

### **Role P-glykoproteinu v mozkových kapilárách**

S přibývajícimi důkazy narůstá fyziologická role P-g , původně vymezená jeho efluxní funkcí u některých xenobiotik.. P-gp např. hraje důležitou roli v zabraňování vstupu hydrofobních látek do CNS přes hematoencefalickou bariéru.

Obecně má P-gp má tyto zjištěné funkce:

## **-Eflux léčiv**

Jak dokládají četné důkazy, P-gp zprostředkovává eflux léčiv v hematoencefalické bariéře. Toto bylo demonstrováno fotoafinitním značením pomocí <sup>125</sup>I.

Ke studiu fyziologické funkce P-gp byla použita generace transgenních myší s poruchou genu *mdr1a*. Substráty P-gp se hromadí v mozcích těchto myší v mnohem větším rozsahu než ve standardních druzích, také jsou mnohem citlivější k neurotoxickým vlivům. Akumulace testovaného léčiva v mozku těchto myší vzrostla oproti kontrolní skupině 80-100krát.

Novodobé použití mozkového promytí *in situ* u standardního typu a P-gp deficientních myší umožnilo vyhodnotit vliv P-gp na mozkovou absorpci substrátů s vyloučením matoucích rozdílů v systémové farmakokinetice na distribuci P-gp.

P-gp se zdá být hlavním efluxním transportérem hematoencefalické bariéry, vystupuje jako ochrana CNS před nadměrnou kumulací xenobiotik.

## **- Sekrece nebo exkrece**

K roli hlídače organismu je také P-gp zapojen do exkrece toxických sloučenin ledvinovými tubuly a do žluče a také v sekreci endogenních látek z nadledvin. Rovněž bylo prokázáno, že  $\beta$ -amyloid je transportován přes plazmatickou membránu mechanismem ATP-dependentní exocytózy za účasti P-gp .Lze oprávněně předpokládat, že  $\beta$ -amyloid mohl být endogenním substrátem pro P-gp i v mozku.

## **- Další funkce P-glykoproteinu**

Bylo zjištěno, že P-gp je zapojen do sekrece cytokinů z lymfocytů, funkce chloridových kanálů, migrace buněk a sekrece steroidů z nadledvin. Nedávné studie přinesly nové pohledy na P-gp v regulaci buněčné smrti stejně jako na jeho spoluodpovědnost za diferenciaci buněk. Některé nálezy prokazují účast P-gp v transportu lipidů přes buněčné membrány. Např. cholesterol interaguje přímo s vazebným místem P-gp, proto se předpokládá, že může být transportován pomocí MDR1 P-gp. Tyto hypotézy musí být ještě ověřeny (Demeule a Régina,2002).

## Účinek CSA na P-glykoprotein

Substrátem pro P-gp je nejen široká škála cytostatik, ale i blokátory kalciových kanálů (např. verapamil), kalmodulinové inhibitory (trifluorperazin), steroidní receptorové ligandy (tamoxifen) a imunosupresivní léčivo CSA, které může působit jako chemosenzibilizátor v rakovinových buňkách (Krejčová a Herink, 2002).

Blokátory kalciových kanálů a také CSA vykazují supresivní účinek na funkci P-gp. Verapamil byl použit k inhibici P-gp transportu CSA v monomolekulární vrstvě mozkových buněk. To vedlo k následnému zvýšení koncentrace CSA na bazální straně. CSA byl v podobném duchu také testován a bylo zjištěno, že se jedná o jeden z nejefektivnějších inhibitorů funkce P-gp. Tato blokáda P-gp funkce může být teoreticky možným mechanismem neurotoxicity CSA (Jeruss a spol., 1998).

U pacientů, kteří těžko dosahují terapeutické úrovně CSA mohou být k upevnění žádané hladiny CSA použita léčiva, která s ním soutěží o metabolismus cytochromu P450. Blokátory kalciových kanálů jsou tak často používány ve spojení s CSA u pacientů, kteří těžko dosahují terapeutické koncentrace jen se samotným CSA (Jeruss a spol., 1998).

Molekulární mechanismus interakce CSA s P-gp zůstává nejasný, ale jednoduchá substituce serinu za fenylalanin v jedenácté transmembránové doméně modifikovala jeho specifitu pro CSA u myší. Předpokládalo se, že zvýšení citlivosti buněk na cytostatika je možné inhibicí P-gp a to i bez toho, aby byly P-gp aktivně přepravovány. (Demeule a spol., 1999).

P-gp zvyšuje rezistenci endotelové tkáně kapilár vůči lékům a tím blokuje jejich vstup do mozkové tkáně. CSA inhibuje tento proces. Na druhou stranu bylo prokázáno, že samotný P-gp transportuje CSA. Princip účinku CSA na P-gp spočívá v inhibici ATPázové aktivity. Tato interakce s ATPázou má za následek inhibici funkce P-gp.

Schopnost inhibice P-gp byla sledována i u dalších analogů CSA. Bylo zjištěno, že některé metabolity si mohou zachovat část inhibiční aktivity mateřské látky, což závisí na pozici ve struktuře, ve které jsou modifikovány. Oxidace hydroxylové skupiny cyklosporinu A, G nebo D v pozici 1 zvýšila schopnost inhibice P-gpu. Rovněž analogy CSA modifikované v pozici 11 si

schopnost inhibice zachovaly, zatímco analogy modifikované v pozici 2 (cyklosporin C a D) tuto možnost inhibice ztratily. Bylo zjištěno, že modifikace analogů CSA v pozicích 1 a 2 jsou rozhodující pro jejich interakci s P- gp a tak si udržují část své inhibiční aktivity jako jejich mateřská látka (Krejčová a Herink, 2002).

P- gp snižuje absorpci léků z gastrointestinálního traktu a zvyšuje eliminaci léků močí a žlučí (Krejčová a Herink, 2002).

## **Farmakodynamika a farmakokinetika CSA**

Farmakokinetické parametry nejsou optimální. Biologická dostupnost CSA po perorálním podání je velmi variabilní, kolísá v rozmezí 5-90% (průměrně 30%), je to způsobeno zejména nestandardní absorpcí léčiva. Vstřebávání je ovlivněno řadou faktorů, jako je délka horní části tenkého střeva – zde probíhá maximum absorpce, střevní motilita, náplň žaludku, činnost jater, žlučových kyselin a ledvin (Krejčová a Herink, 2002).

Profil hladin CSA v krvi odpovídá absorpci nultého řádu a exponenciální distribuci a eliminaci. V terapeutických koncentracích je zhruba polovina CSA v krvi obsažena v erytrocytech, ale distribuován je především mimo krevní řečiště - jeho zdánlivý distribuční objem je 4-8 l/kg. Tkáňové koncentrace CSA korelují s hladinami vazebného proteinu cyklofilinu v cytosolu a obsahem lipidů. CSA se hlavně metabolizuje v játrech systémem jaterních monooxidáz, které jsou katalyzovány zejména jaterním cytochromem P-450.

Hladiny některých metabolitů CSA se slabou imunosupresivní aktivitou mohou při dlouhodobé terapii převyšovat koncentrace mateřské látky.

Clearance CSA kolísá od 0.4 do 3 L/h/kg, po p.o. aplikaci se cca 90% dávky eliminuje močí a jen 6 % žlučí s poločasem kolísajícím od 6 h u zdravých dobrovolníků až k 20 h u nemocných s jaterním poškozením.

Doba, za kterou dosáhne CSA maximální koncentrace v krvi, je také variabilní a kolísá od 1,5 do 8 hodin. Někdy dokonce může dojít k druhému, poměrně vysokému vrcholu koncentrace CSA. Důsledkem této nestability je zvýšení rizika projevů toxicity a to i při relativní denní nízké dávce léčiva.

Navíc existují kinetické interakce mezi CSA a četnými, současně podávanými, léky (zejména některá antibiotika a antimykotika, kortikoidy, kalciové blokátory, antagonisté H<sub>2</sub> receptorů aj.,(Pavelka a spol., 2000).

## Kinetické parametry CSA

Biologická dostupnost -  $\varnothing$  30%

Exkrece močí - <1%

Vazba na plazmatické proteiny -  $93 \pm 2\%$

Clearance (na 70kg osobu) -  $410 \pm 70$  ml/min

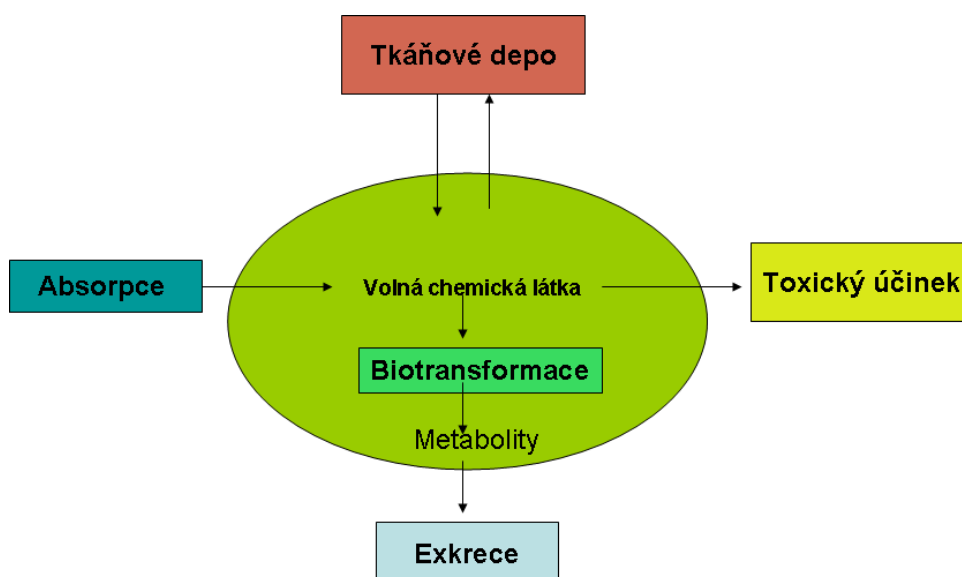
Zdánlivý distribuční objem – 4-8 l/kg

Biologický poločas –  $5,6 \pm 2$  hr

Účinná koncentrace – 100-400 ng/ml

Toxická koncentrace - > 400 ng/ml

(Krejčová a Herink, 2002).



Obr. 6 Toxikokinetika a biotransformace toxických látek obecně (Patočka,2007)

## Toxicita a nežádoucí účinky CSA

- nefrotoxicita je nejdůležitějším nežádoucím účinkem, vyskytuje se asi u 1/3 nemocných léčených CSA. Projevy jsou závislé na  $C_{max}$  CSA a ustupují po snížení dávky.

- poruchy funkce GIT – anorexie, zácpa, nauzea a zvracení patří mezi časté nežádoucí účinky

- hepatotoxicita – u nemocných s transplantovanou ledvinou se popisuje až dvojnásobně vyšší incidence cholestázy a hyperbilirubinemií a zvýšení sérových hladin aminotransferáz a to hlavně ALT.

- kožní a slizniční projevy - hirsutismus, hypertrichóza, zvýšené ochlupení na obličejích, ramenech, pažích a zádech se vyskytuje až u 50% nemocných s transplantovanou ledvinou.

- hypertrofie bukální sliznice – CSA zvyšuje jak počet fibroblastů, tak tvorbu kolagenu.

- neurotoxicita – a to od mírných projevů jako je lehký klidový třes končetin, ataxie, zmatenost, bolesti hlavy, poruchy spánku až po vzácně se vyskytující smrtelné leukoencefalopatie. Tyto neurologické účinky se vysvětlují snížením plazmatické hladiny hořčíku, která sama může být projevem nefrotoxicity CSA nebo hypocholesterolémií (Krejčová a Herink,2002; Mařha,1994).

Neurotoxicita CSA může mít rozmanitou etiologii. Je nezbytná diagnóza, aby se vyloučilo infekční či lymfoproliferativní onemocnění. Prevence je obtížná, rizikové faktory jsou u většiny transplantovaných pacientů (Jeruss a spol.,1998).

Z pohledu nežádoucích účinků je důležitá schopnost CSA indukovat produkci TGF- $\beta$  stimulujícího fibroblasty (Suchý a spol., 2004).

## **Monitorování hladiny CSA**

### **Metody pro stanovení CSA**

Vzhledem k úzké terapeutické šíři se hladina CSA musí monitorovat. Kvantifikace CSA vyžaduje metody imunoanalytické s použitím nespecifických protilátek nebo HPLC, která jako jediná dokáže kvantifikovat i metabolity CSA. Tuto metodu je vhodné použít v případě neadekvátní odpovědi na léčbu CSA, tak aby se mohl analyzovat podíl parentní látky a metabolitů na výskytu hypertenze a dalších toxických jevů.

Při porovnání výsledků studie, kde byly hladiny CSA měřeny specifickou a nespecifickou radioimunoanalýzou (RIA) byly výsledky nespecifické RIA vyšší a zhruba odpovídaly součtu CSA a primárních metabolitů.

U stanovení pomocí HPLC byly koncentrace CSA a jeho primárních metabolitů (AM1-M17, AM9-M1 a AM4N-M21) při porovnání se specifickou RIA metodou o 8% nižší. Poměr AM1/CSA je pro jednotlivé pacienty konstantní. Koncentrace CSA a jeho metabolitů v lymfocytech byla závislá na čase odběru a zpracování vzorku.

Na stanovení CSA a jeho dvou primárních metabolitů AM1- M17 a AM4N-M21 byla vyvinuta mikrometoda, která používá 200  $\mu$ l plné krve a cyklosporin D jako vnitřní standard. Linearita tří látek se testovala v rozmezí 1 – 1 000  $\mu$ g/l, recovery se pohybuje od 99 – 144 % a variační koeficient od 3,6 do 7,3% v závislosti na látce a testované hladině. CSA, měřený u 19 renálně transplantovaných pacientů (celkem 458) vzorků, se koreloval se specifickou RIA metodou CYCLO Trac dia Sorin s korelačním koeficientem 0,981. Poměr M17/CSA se u jednotlivých pacientů statisticky významně lišil, poměr M21/CSA byl u všech pacientů nízký a stabilní.

Tyto nálezy, a také výskyt dalšího metabolitu AM9-M1, který byl identifikován na základě svého retenčního času asi u jedné třetiny pacientů, svědčí o značných individuálních rozdílech v aktivitě systémů metabolizujících CSA (Brozmanová, 2003).

### **Biochemické parametry**

Cílem další studie, kterou prováděli Christians a spol (1995) bylo určit biochemické parametry, které by byly paralelní s eliminací CSA, a tak signalizovaly zhoršenou eliminaci CSA vyžadující kvantifikaci metabolitů CSA.

Bylo zjištěno, že koncentrace konjugovaného a celkového bilirubinu v séru významně korelovala s koncentrací metabolitů druhé generace CSA, což jsou metabolity AM19 a AM1A, zatímco se žlučovými kyselinami nekorelovaly.

To naznačuje, že iontově spojený transportní systém není kvantitativně zapojený do exkrece CSA a že metabolity CSA a bilirubin jsou eliminovány stejným transportním systémem přes biliární membránu hepatocytů.

Koncentrace konjugovaného a celkového bilirubinu s koncentrací CSA a jeho metabolity první generace nekoreluje.

Tato studie byla uzavřena s tím, že bilirubin a koncentrace metabolitů druhé generace CSA jsou striktně paralelní, a tudíž celková koncentrace

bilirubinu v séru může být použita jako indikátor zhoršené eliminace CSA (Christians a spol.,1995).

## Interakce CSA

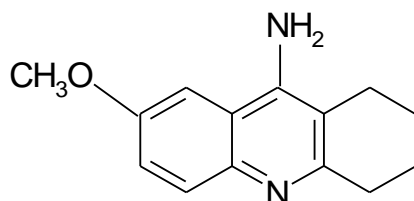
Jelikož je jaterní biotransformace CSA závislá převážně na cytochromu 3A4, je zde nebezpečí lékových interakcí s dalšími látkami, které jsou substráty, induktory nebo inhibitory cytochromu 3A4 či P-gp. Běžně používané léky, jako erythromycin, ketokonazol, diltiazem mohou výrazně zvýšit plazmatické hladiny CSA. Obdobný efekt má i konzumace grapefruitového džusu.

Naopak induktory rifampicin, fenytoin nebo fenobarbital hladiny CSA snižují.

Při současném podání CSA a aminoglykosidů, amfotericinu B a nesteroidních antirevmatik se může uplatnit aditivní nefrotoxický účinek (Suchý a spol., 2004).

## 7-methoxytakrin

### Chemická struktura



**Obr 7. Chemická struktura 7-methoxytakrinu (Patočka,1998).**

7-methoxytakrin (9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin, 7-MEOTA) je méně toxickým derivátem takrinu, vyvinutým v laboratořích Vojenské lékařské akademie v Hradci Králové a to původně jako antidotní prostředek otrav anticholinergními halucinogeny.

Ve srovnání s takrinem se vyznačuje delším biologickým poločasem, nižší incidencí nežádoucích účinků a především pak nízkou hepatotoxicitou. Byly to právě toxické účinky na játra, které vedly k omezenému použití takrinu (preparát Cognex<sup>®</sup>) jako léčiva SDAT. Pro srovnání i.m. LD<sub>50</sub> u laboratorního potkana se v případě takrinu pohybuje okolo 34 mg/kg, zatímco u 7-MEOTA 260 mg/kg (Dejmek, 1990, Patočka, 1998).



7-MEOTA je v játrech biotransformován za vzniku 1- a 2-hydroxyderivátů, současně dochází rovněž k demetylaci a jedním z hlavních metabolitů je 7-hydroxytakrin, který zčásti vykazuje biologické účinky mateřské látky a navíc ještě nižší toxicitu (Patočka a Fusek, 1992).

7-MEOTA je ve srovnání s jinými nepřímými parasymptomimetiky poměrně slabým inhibitorem cholinesteráz. Zatímco takrin inhibuje obě hlavní izoformy AChE přibližně ve stejném rozsahu, 7-MEOTA inhibuje převážně presynaptickou  $G_4$  formu.

Jak 7-MEOTA, tak 7-hydroxytakrin jsou schopny vytvářet rozpustné komplexy s hliníkem a usnadňovat tak jeho odstraňování z organismu. Nadměrné ukládání hliníku v mozku lidí trpících SDAT je známo již delší dobu (Patočka a spol., 2001; Kuneš a spol., 2005).

Protektivní efekt 7-MEOTA u pentamethylentetrazolem navozené křečové aktivity dokládá existenci necholinergní složky jeho farmakodynamického účinku. Pentamethylentetrazol blokuje  $GABA_A$  receptorový komplex a zvyšuje hladinu cytosolového  $Ca^{2+}$  (Herink a spol., 1989).

7-MEOTA prošel I. fází klinického zkoušení a potvrdila se jeho dobrá snášenlivost u zdravých dobrovolníků. V otevřené studii byla zaznamenána jeho účinnost u tardivní dyskinezy po dlouhodobém podávání některých antipsychotik (Hanuš a spol., 1991; Patočka a Fusek, 1992).

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## Uspořádání pokusu

K pokusům bylo použito celkem 30 samců laboratorního potkana kmene *Wistar albino*, konvenčního chovu, krmených peletovanou standardní Larsenovou dietou a s přísunem vody *ad libitum*. Hmotnostní rozpětí zvířat v době pokusu se pohybovalo v rozmezí 220-260 gramů.

Zvířata byla rozdělena do pěti skupin po 6 jedincích.

1. kontrolní skupině byl podán pouze fyziologický roztok a to v dávce 0,1 ml/100g hmotnosti.

2. kontrolní skupině byl podán 7-MEOTA v dávce 100 mg/kg i.m.

1. pokusné skupině (= cyklosporin jednotlivě) byl podán cyklosporin A v dávce 45 mg/kg p.o.

2. pokusné skupině (= cyklosporin opakovaně) byl podáván cyklosporin A ve stejné dávce 45 mg/kg po 3 po sobě následující dny.

3. pokusné skupině (=cyklosporin opakovaně + 7-MEOTA) byl opět podáván cyklosporin A opakovaně v dávce 45 mg/kg p.o., třetí den byl pak za 30 minut po podání cyklosporinu A injikován i.m. 7-MEOTA v dávce 100 mg/kg.

## Stanovení aktivity AChE

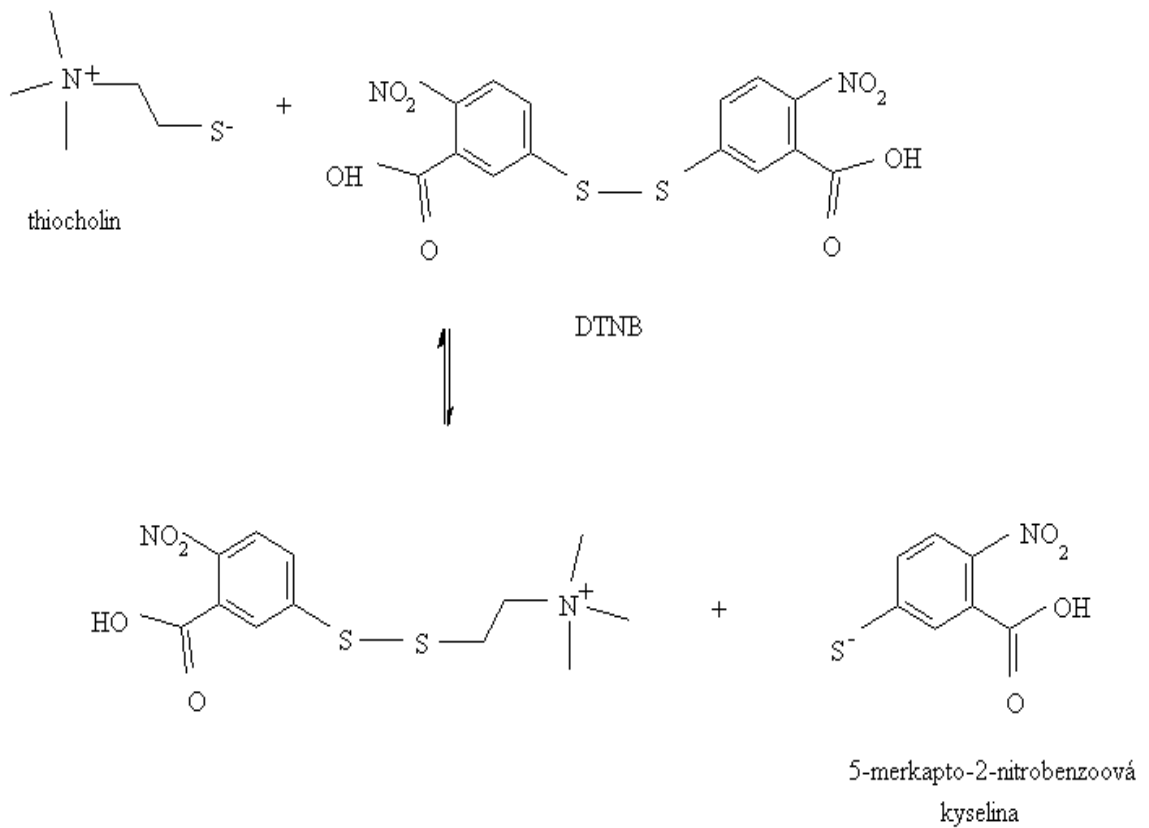
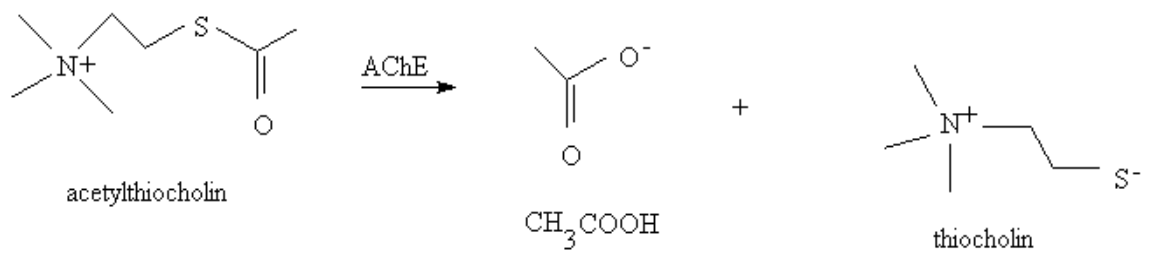
### Ellmanova metoda

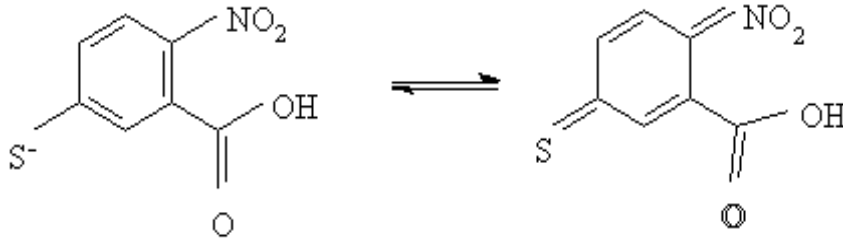
Pro tuto práci byla použita Ellmanova metoda, jako jedna z nejcitlivějších a nejpoužívanějších metod. Jde o modifikaci kolorimetrické metody za použití 5,5'- dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB, Ellmanovo činidlo).

Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH-skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, a jeho zbytek – 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina – je fotometrován. Výhodou této metody je specifita reakce, dále pak jednoduchost provedení a vysoká citlivost.

Hydrolyza substrátu, jak spontánní, tak enzymatická je závislá na pH. Při pH 7,6-7,8 je dosaženo optima pro enzymatické štěpení acetylthiocholinu. Se zvyšujícím se pH však roste i neenzymatická hydrolyza acetylthiocholinu. Proto hodnota pH 7,6 je optimální hodnotou, kdy je zanedbatelná spontánní hydrolyza substrátu (Bajgar,1972).

### Chemická reakce Ellmanovy metody





**Obr.8 Schéma reakce** (Bajgar, 1972)

## Použité chemikálie a roztoky

-0,2 M TRIS-HCl pufr:

24,2 g 1,1,1-tris-(hydroxymethyl)aminomethan se rozpustí v 1000 ml destilované vody. 50 ml tohoto roztoku se smíchá s 38,4 ml 0,2 M HCl, doplní se destilovanou vodou na 200 ml a pH se upraví na 7,6.

- činidlo na SH skupiny - DTNB

0,1 g DTNB se rozpustí v 50 ml 0,2 M TRIS pufru.

- substrát

0,029 g acetylthiocholin-jodidu (či butyrylthiocholin-jodidu- ke stanovení BuChE) se rozpustí v 10 ml destilované vody.

- kalibrační roztok

Vodný roztok cystein – HCl v koncentracích od  $1 \cdot 10^{-4}$  do  $5 \cdot 10^{-6}$  M.

- vzorek pro měření

Mozek potkana se po rozmražení zváží, přidá se k němu příslušné množství destilované vody a zhomogenizuje. Takto připravený vzorek je použit pro stanovení aktivity AChE.

## Použité přístroje

- Univerzální spektrofotometr a skleněné kyvety

## Pracovní postup

### Odběr vzorků mozku

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

## **Postup stanovení aktivity AChE ve vybraných částech mozku**

Z řezů příslušných vzorků mozkové tkáně laboratorního potkana (frontální korová oblast, hipokampus, septum a bazální ganglia) se připraví homogenát (1 mg mozkové tkáně/1ml destilované vody). Do kyvety se k 1 ml homogenitu přidá 0,4 ml DNTB a 0,4 ml TRIS pufru. Reakce je zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Fotometruje se při 412  $\mu\text{m}$  a registruje se změna absorbance.

Pro kalibraci se místo homogenitu do kyvety pipetuje roztok různých koncentrací cysteinu. Fotometruje se proti slepému vzorku, který je zpracován stejně, jen místo cysteinu je přidána destilovaná voda. Z hodnot absorbance bylo odečítáno a zaznamenáváno odpovídající množství SH skupin nmol v reakční směsi (Kubant, 2000).

## VÝSLEDKY

Jednorázové podání 7-MEOTA (100mg/kg) nemělo statisticky významný efekt v bazálních gangliích proti 1.kontrolní skupině zvířat, které byl podáván fyziologický roztok (0,1ml/100g). Naproti tomu statistická významnost se projevila ve frontální kůře, došlo ke snížení aktivity AChE o 35,7% (270 nmol/min/100mg vlhké tkáně) oproti kontrolní skupině (420 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V hipokampu statisticky významný pokles AChE činil 25% (168 nmol/min/100mg vlhké tkáně) oproti kontrole (224 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V septu klesla aktivita AChE o 19,6% (586 nmol/min/100mg vlhké tkáně) oproti kontrolní skupině (729 nmol/min/100mg vlhké tkáně).

Po jednorázovém podání CSA (45 mg/kg) bylo snížení aktivity AChE statisticky významné ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích. Ve frontální kůře byla aktivita AChE o 41,4% (246 nmol/min/100mg vlhké tkáně) snížena proti aktivitě AChE u zvířat kontrolní skupiny (420 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V septu byla aktivita AChE snížena o 48,1% (378 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (729 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V bazálních gangliích byla AChE aktivita snížena o 40,8% (865 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (1460 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V hipokampu se statisticky významně neprojevilo snížení aktivity AChE při jednorázovém podání CSA.

2 pokusné skupině byl po tři po sobě následující dny podáván CSA vždy v dávce 45 mg/kg. Statisticky významné snížení aktivity AChE se projevilo u frontální kůry, hipokampu a v septu. U frontální kůry činil pokles aktivity AChE 43,8% (236 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (420 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V hipokampu to bylo snížení o 20,5% (178 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (224 nmol/min/100mg vlhké tkáně) a v septu byla aktivita AChE snížena o 46,5% (390 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrole (729 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V bazálních gangliích byl pokles nevýznamný.

Kombinace CSA a 7-MEOTA u 3.pokusné skupiny vedla ke statisticky významnému zesílení inhibičního efektu ve všech sledovaných mozkových oblastech. Ve frontální kůře poklesla aktivita AChE o 46,2% (225

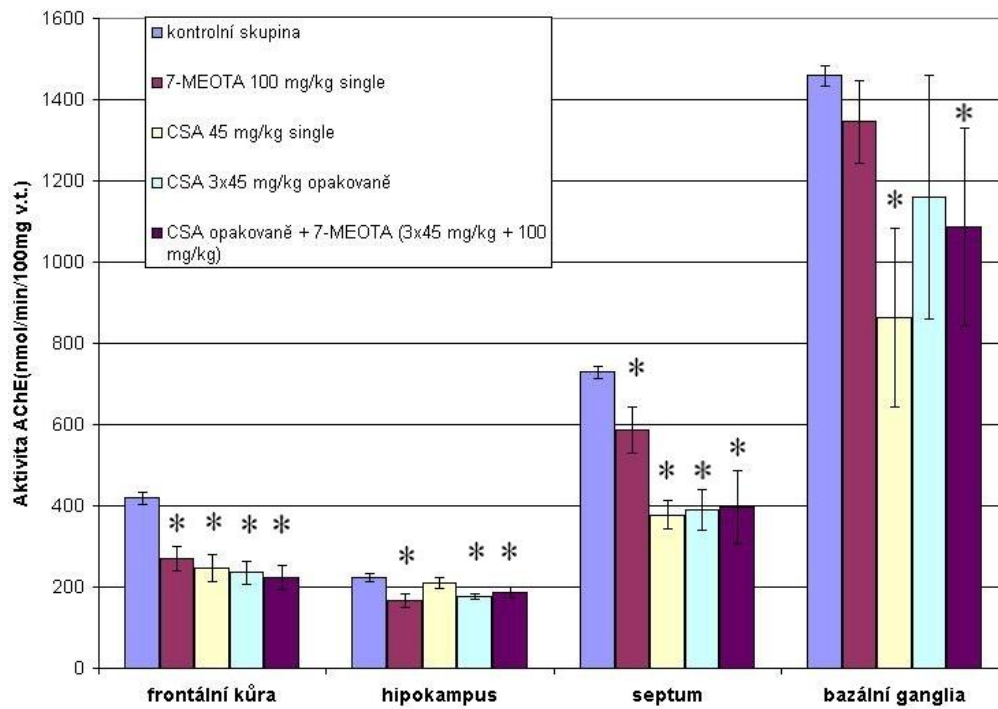
nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (420 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V hipokampu bylo snížení o 16,5% (187nmol/min/100mg vlhké tkáně). V septu byla aktivita AChE snížena o 45,4% (398 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině (729 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V bazálních gangliích byla aktivita AChE snížena o 25,6% (1086 nmol/min/100mg vlhké tkáně ) proti kontrolní skupině (1460 nmol/min/100mg vlhké tkáně).

Při srovnání s 2.kontrolní skupinou, které byl podán 7-MEOTA (100mg/kg) a 1.pokusnou skupinou, které byl podán samotný CSA (45 mg/kg) byla statisticky nevýznamná změna pouze u frontální kůry. V septu byla aktivita AChE snížena o 35,5% (378 nmol/min/100mg vlhké tkáně ) proti 2 kontrolní skupině (586 nmol/min/100mg vlhké tkáně). V bazálních gangliích byla AChE aktivita také snížena o 35,7% (865 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti 2. kontrole (1346 nmol/min/100mg vlhké tkáně). Oproti tomu v hipokampu byla aktivita AChE zvýšena o 25,6% ( 211 nmol/min/100mg vlhké tkáně) ve srovnání s 2. kontrolní skupinou (168 nmol/min/100mg vlhké tkáně).

Při opakovaném podávání CSA (3-45 mg/kg) bylo pouze v septu statisticky významné snížení aktivity AChE o 33,4% (390 nmol/min/100mg vlhké tkáně) oproti 2.kontrolní skupině (586 nmol/min/100mg vlhké tkáně). Stejně tak pouze v septu se statisticky významně projevila kombinace CSA (3-45 mg/kg) + 7-MEOTA (100 mg/kg), kdy se aktivita AChE snížila o 19,3% (1086 nmol/min/100mg vlhké tkáně) proti kontrolní skupině s podáním samotného 7-MEOTA (1346 nmol/min/100mg vlhké tkáně).

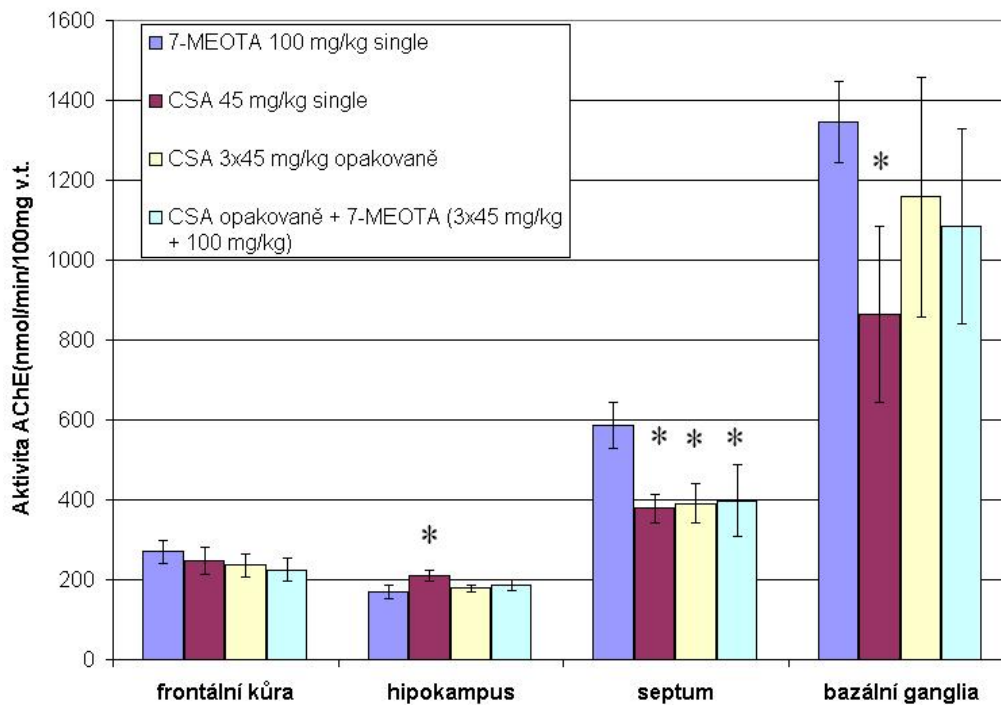
Graf č.1

**Aktivita AChE při podávání 7-MEOTA a CSA**



Graf č.2

**Aktivita AChE při podávání 7-MEOTA a CSA**





## DISKUZE

CSA je látka, která je používána v transplantační medicíně a při léčbě autoimunních chorob. CSA dále zvyšuje transport léčiv přes hematoencefalickou bariéru pozměněním funkce P-gp, a to zřejmě bez ovlivnění jejich regionální distribuce v mozku. V minulosti prokázané zvýšení fluidizačního efektu CSA na buněčné membrány umožňuje spekulovat o možnostech zvýšení propustnosti buněčné membrány a orgánových bariér pro některé sloučeniny zásluhou CSA. Vyznačuje se také inhibičním účinkem na aktivitu AChE, stejně jako 7-MEOTA.

V této práci jsme srovnávali účinky CSA a 7-MEOTA na antiacetylcholinesterázovou aktivitu. AChE aktivitu jsme zjišťovali použitím Ellmanovy metody. Sledovali jsme účinek obou látek na aktivitu AChE ve frontální kůře, septu, hipokampu a bazálních gangliích. Tyto struktury byly vybrány z důvodu, že právě ty jsou nejvíc postiženy u SDAT. K terapii SDAT jsou používány nejčastěji inhibitory AChE, mezi které by v budoucnu mohl patřit i 7-MEOTA, který zatím úspěšně prošel první fází klinického výzkumu. 7-MEOTA má ve srovnání s jeho mateřským léčivem takrinem méně nežádoucích účinků, hlavně nižší hepatotoxicitu. Může být charakterizován jako reverzibilní inhibitor cholinesteráz in vitro a in vivo (Palička a Živný, 2003).

Tuček a Doležal (1991) zkoumali účinek 7-MEOTA na metabolismus mozkového ACh. V jejich práci bylo uvolnění ACh stimulováno tkáňovou depolarizací nebo pomocí 4-aminopyridinu. Potkanní cerebrokortikální části byly inkubovány v přítomnosti 7-MEOTA, který snížil množství depolarizací uvolněného ACh a množství ACh, syntetizovaného během inkubace. Pokud byl v inkubačním médiu současně se 7-MEOTA přítomen i cholin, léčivo snížilo vychytávání cholinu a také množství syntetizovaného ACh a jeho uvolnění do média. Bylo zjištěno, že 7-MEOTA mimo snížení syntetizovaného ACh, také brání uvolňování ACh, působením přímo na proces uvolňování neurotransmiteru. V experimentu nebylo rozlišeno, zda inhibiční účinky 7-MEOTA se uplatnily primárně v procesu syntézy ACh (obzvláště při vychytávání cholinu), nebo jestli působil přímo na proces uvolňování neurotransmiteru.

Výsledky této diplomové práce vedly k závěrům, že CSA obvykle využívá svůj inhibiční účinek na AChE ve srovnání s kontrolní skupinou č.1. Navíc nebyly pozorovány žádné větší rozdíly mezi jednoduchým a opakovaným podáním ve frontálním kortexu a septu. Zatímco enzymová aktivita v hipokampu byla snížena jen v případě opakování (skupina 4) a kombinací CSA a 7-MEOTA (skupina 5). Naopak, jednoduchá dávka CSA byla efektivnější ve srovnání s opakovanou a kombinovanou v bazálních gangliích bez ohledu na statistickou významnost skupin 3-5 s kontrolní skupinou 1.

Ve své práci Herink a spol (2002) uvádí, že podle většiny přijatých názorů CSA v komplexu CSA/cyklofilin inhibuje kalcineurin, o němž bylo dokázáno, že je lokalizovaný v celém mozku a je důležitý v metabolismu NO a v importu transkripčních faktorů do jádra. To je také důkaz, že kalcineurin je zahrnut do syntézy AChE. Tvrzení existence linie CSA-kalcineurin-AChE syntéza, vysvětluje výše popsané změny v AChE aktivitě po podání CSA.

Palička a spol (2001) ve své studii zjišťoval vliv L-karnitinu na anticholinesterázovou aktivitu 7-MEOTA. Po třídní premedikaci L-karnitinem byl podán 7-MEOTA a došlo ke zvýšení inhibice AChE ve všech sledovaných mozkových částech.

Když sečteme všechny předchozí informace o 7-MEOTA, dospějeme k přesvědčení, že má zatím všechny potřebné vlastnosti k tomu, aby se v budoucnu mohl stát úspěšným léčivem v terapii SDAT.

## ZÁVĚR

Samotný i.m. podaný 7-MEOTA (100 mg/kg) způsobil statisticky významné snížení AChE aktivity ve frontální kůře, hipokampu a septu. Ve frontální kůře se jako statisticky nejvýznamnější projevila kombinace CSA + 7-MEOTA (3.45 mg/kg + 100 mg/kg), v septu a bazálních gangliích jednorázově podaný CSA (45 mg/kg) a pouze v hipokampu byl nejúčinnější jednorázově podaný samotný 7-MEOTA.

## SOUHRN

Cílem této práce je porovnat účinky jednorázového a opakovaného podání cyklosporinu A a interakci CSA a 7-methoxytakrinu na aktivitu acetylcholinesterázy ve vybraných částech mozku (frontální kůra, hipokampus, septum a bazální ganglia) laboratorního potkana. Z metod pro stanovení cholinesteráz byla zvolena kalorimetrická metoda podle Ellmana. Podle demonstrovaných výsledků má CSA ve srovnání s 7-MEOTA přinejmenším stejnou (v případě frontální kůry) nebo vyšší inhibiční účinnost na aktivitu AChE (v případě septa a bazálních ganglií). Naopak pouze v hipokampu má vyšší inhibiční účinek 7-MEOTA.

## SUMMARY

The aim of this work is comparison of effect of single and repeated administration of cyclosporine A and the interaction of CSA and 7-MEOTA on the activity of acetylcholinesterase in selected parts of brain (the frontal cortex, hippocampus, septum and basal ganglia) of laboratory rat. Calorimetric method according to Ellman for determination of cholinesterases was chosen. CSA has at least the same (in the case frontal cortex) or higher inhibition efficacy on the activity AChE (in the case of septum and basal ganglia) in comparison with 7-MEOTA in compliance with demonstrated results. On the contrary only in hippocampus 7-MEOTA has higher inhibition efficacy.

## Seznam použité literatury

1. Bajgar, J. : Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití. Vojenské zdravotnické listy, XLI, 1972, s.78-80.
2. Bajgar, J. : Aktivita cholinesteráz a její ovlivnění. Vojenské zdravotnické listy, 2, 1991, s.88-91.
3. Bartoš, A.; Vaisocherová, V.; Řípková, D.: Detekce tau proteinu v mozkomíšním moku u Alzheimerovy choroby a potenciální využití optických biosenzorů. Psychiatrie, Suppl.11 (1), 2007, s.16.
4. Borlongan C.V. a spol. Cyclosporine A enhances Choline acetyltransferase immunoreactivity in the septal region of adult rats. Neurosci Lett, 279(2), 2000, s.73-76.
5. Brozmanová H. : Zpráva z konferencí v Rožnově 17-19.10. 2002. Klin farmakol farm, 1, 2003, s.48-51.
6. Brunovský, M. : Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. Neurologie pro praxi, 2, 2007, s.112-117.
7. Brunovský, M. : Účinnost a bezpečnost podávání inhibitorů cholinesteráz. Farmakoterapie, roč. 2 (3), 2006, s.343-349.
8. Černochová, J. : Protektivní a škodlivé účinky mediátorů stresu. Bakalářská práce, katedra biologických a lékařských věd, FaF Hradec Králové, 2006, s.27-28.
9. Dejmek L. : 7-MEOTA. Drugs Fut., 15, 1990, s.126-129.
10. Demeule M., Laplante, A.; Sepehr-Araé, A.; Beaulieu É. : Inhibition of P-glycoprotein by cyclosporin A analogues and metabolites, Biochem. Cell Biol., 77, 1999, s.47-58.
11. Demeule, M., Régina, A. : Drug transport to the brain: Key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood–brain barrier. Vascular pharmacology, 38, 2002, s.339-348.
12. Ganong F. W: Přehled lékařské fyziologie. H+H, Jinočany, 1995, s. 77-80.
13. Giacobini E. : Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. Martin Dunitz, London, 2000, 270 s.

14. Hampl F., Paleček J. : Farmakologie. VŠCHT Praha, 2002, s.165-195.
15. Hanuš H.; Tůma I.; Zapletálek M.; Fusek J.; Hrdina V. : Treatment of tardive dyskinesia by single and repeated application of 7-methoxytacrin. Homeostasis, 33, 1991, s.301.
16. Herink J.; Koupilová M.; Hrdina V. : Effects of tetrahydroaminoacridine (tacrine) derivatives and physostigmine in convulsions induced by pentylenetetrazol. Activ. Nerv. Sup., 31, 1989, s.303-305.
17. Herink, J.; Krejčová, G.; Bajgar, J. : Antiacetylcholinesterase activity of cyclosporine – a comparison of single and repeated administration and effect of 7-methoxytacrine, Acta Medica, 45(4), 2002, s.145-147.
18. [http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/2\\_Kral.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/2_Kral.pdf), autor Vladimír Král.
19. <http://www.monografias.com/trabajos30/receptor-nmda/receptor-nmda.shtml>.
20. Christians, U.; Kohlhaw, K.; Sürig, T. : Parallel Blood Concentrations of Second-generation Cyclosporine Metabolites and Bilirubin in Liver Graft Recipients, Therapeutic Drug Monitoring, 17, 1995, s.487- 498.
21. Jeruss, J.; Braun, S.V.; Reese, J.C.; Guillot A. : Cyclosporine-induced white and grey matter central nervous system lesions in a pediatric renal transplant patient, Pediatr Transplantation, 2, 1998, s.45-50.
22. Jiráček R.; Koukolík F. : Demence (Neurobiologie, klinický obraz, terapie), Galén, Praha, 2004, s.90-99, 142-158.
23. Jiráček, J.; Laňková, J. : Demence - Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, 9s.
24. Jiráček, R. : Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby, Neurologie pro praxi 2, 2002, s.101-105.
25. Jiráček, R. : Aktuální pohled na léčbu Alzheimerovy nemoci. Farmakoterapie, 3(6), 2007, s.593-597.
26. Jiráček, R. : Doporučení italské psychogeriatrické asociace pro léčbu Alzheimerovy choroby. Farmakoterapie, 2(3), 2006b, s.301-304.
27. Jiráček, R. : Současné trendy v biologické terapii Alzheimerovy choroby. Psychiatrie pro praxi, 1, 2006a, s.8-11.
28. Koukolík, F. : Lidský mozek, Portál, Praha, 2002, s.147.

29. Krejčová, G.; Herink, J. : Současné poznatky o cyklosporinu A. *Vojenské zdravotnické listy*, 71, 2002, s.115-120.
30. Kubant P. : Diplomová práce, Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2000, s.37-41.
31. Kuneš, M.; Svoboda, Z.; Květina, J. : Intestinal single-pass in situ perfusion technique in rat: The influence of L-carnitine on absorption of 7-methoxytacrine, *Biomed Pap Med Faculty University Palacky Olomouc Czech Republic*, 149(2), 2005, s.433-435.
32. Lincová, D.; Farghali H.; Čepelík, J. a spol.: Základní a aplikovaná farmakologie. Grada, Praha 2002, s.98-102.
33. Lu, Y.F.; Tomizawa, K.; Moriwaki, A.; Hayashi, Y.; Tokuda, M. : Calcineurin inhibitors, FK506 and cyclosporin A, suppress the NMDA receptor-mediated potentials and LTP, but not depotentiation in the rat hippocampus. *Brain Research*, 729, 1996, s.142-146.
34. Patočka J.; Fusek J. : Současné trendy ve vývoji látek ze skupiny inhibitorů cholinesterázy jako léčiv Alzheimerovy choroby. *Čs. Psychiat.*, 88, 1992, s.258-269.
35. Palička, V.; Živný P. : Antiacetylcholinesterase activity of Cyclosporine A in selected parts of the rat brain – a comparison of single and repeated administration and effect of 7-methoxytacrine, *Acta Medica*, 46(2), 2003, s.55.
36. Patočka, J. : Inhibitory acetylcholinesterázy – od nervových plynů k léčivům Alzheimerovy choroby. *Chemické listy*, 92, 1998, s.1016-1019.
37. Patočka, J., Strunecká A., Řípová, D. : Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy nemoci, *Čs.Fyziologie*, 50, 2001, s.4-10.
38. Patočka, J.; Kuča, K., Jun D. : Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica*, 47(4), 2004, s.215-228.
39. Patočka, J. : *Toxikologie I – Obecná toxikologie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích – Zdravotně sociální fakulta, České Budějovice, 2007, s.25.

40. Pavelka, K., Dostál, C., Tegzová D. : Současný pohled na uplatnění ciclosporinu v léčbě některých zánětlivých revmatických onemocnění. *Remedia*, 10, 2000, s.39- 52.
41. Pidrman V.; Bouček J. : Dlouhodobá léčba demence. *Psychiatrie pro praxi*, 4, 2002, s.168 - 170.
42. Silbernagl S. : Atlas patofyziologie člověka, Grada, Praha 2001, s.300, 304, 348.
43. Steiner, J.P.; Dawson, T.M.; Fotuhi, M.; Snyder S.H. : Immunophilin regulation of neurotransmitter release. *Molecular medicine*, 2(3), 1996, s.325-333.
44. Suchý D.; Komzáková I.; Grundmann M. : Základní charakteristiky vybraných imunosupresiv. *Klin farmakol. farm*, 18, 2004, s.90-95.
45. Trojan, S. : Lékařská fyziologie, Grada, Praha 2003, s.46, 654-655.
46. Tuček, S.; Doležal, V. : Negative Effects of Tacrine (Tetrahydroaminoacridine) and Methoxytacrine on the Metabolism of Acetylcholine in Brain Slices Incubated Under Conditions Stimulating Neurotransmitter Release. *Journal of Neurochemistry*, 56 (4), 1991, s. 1216-1221.

