

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Srovnání centrálního a periferního účinku galantaminu

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. MUDr. Josef Herink, DrSc.

Školitel specialista: PharmDr. Jana Karasová-Žďárová

Hradec Králové 2010

Petra Galusová

Poděkování

Děkuji Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, Dr.Sc. za odborné vedení a ochotnou pomoc při sestavování diplomové práce a PharmDr. Janě Karasové – Žďárové za cenné rady a připomínky.

Prohlášení studenta

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

.....
podpis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK V TEXTU

Ach acetylcholin

AChE acetylcholinesteráza

ATCh acetylthiocholin jodid

AD Alzheimerova demence

α Btx α -bungarotoxin

BTCh butyrylthiocholin jodid

BuChE butyrylcholinesteráza

BDNF mozkový neurotrofíní faktor

CNS centrální nervová soustava

DAG diacylglycerol

DLB demence s Lewyho tělísky

6-DMG 6-O-demethylgalantamin hydrochlorid

DTNB 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina

Gal galantamin

HCl kyselina chlorovodíková

IP₃ inositoltrifosfát

mAChR muskarinový acetylcholinový receptor

nAChR nikotinový acetylcholinový receptor

NGF nervový růstový faktor

P11012 6-O-acetylmethyl-6-O-demethylgalantamin hydrochlorid

P11149 6-O-6-O-[(adamantan-1-yl)-karbonyl]galantamin hydrochlorid

PD Parkinsonova choroba

TNB⁻ 5-merkpto-2-nitrobenzoátový anion

TNF α tumor-nekrotizující faktor α

VTA ventero-tegmentální oblasti

Abstrakt

Galantamin se řadí k reverzibilním inhibitorům acetylcholinesterázy (AChE), které jsou zatím považovány za nejúčinnější prostředek léčby lehké až středně těžké Alzheimerovy demence, vaskulární demence a demence s Lewyho tělísky. Galantamin je charakterizován jako kognitivum s duálním mechanismem účinku (má rovněž přímý modulační efekt na nikotinový cholinergní receptor).

Cílem této práce je stanovení účinné inhibiční dávky galantaminu při zvoleném způsobu podání a srovnání centrálního a periferního efektu galantaminu. Stanovení se odehrávalo na základě zjištění aktivity AChE v centrální nervové soustavě (ve frontální mozkové kůře, hippocampu, septu, bazálních gangliích a hypofýze) a v periferní nervové soustavě byla zjišťována naopak aktivita butyrylcholinesterázy (konkrétně v játrech a plazmě).

Výsledky získané prostřednictvím použité Ellmanovy metody ukázaly, že galantamin je obecně slabým inhibitorem a statisticky významný efekt byl prokázán až při nejvyšší použité dávce. Při této dávce lze však očekávat i nežádoucí účinky periferního typu.

Abstract

Galantamine is a reversible inhibitor of acetylcholinesterase (AChE). It is recommended for the treatment of mild to moderate Alzheimer's dementia, vascular dementia and dementia with Lewy bodies. Galantamine is characterized as cognitive enhancer with dual mechanism of action (it has also shown activity in modulating the nicotinic cholinergic receptor).

The aim of this work is to determine the effective inhibitory dose of galantamine on the selected route of administration and comparing its central and peripheral effects of galantamine. Determination to proceed on the basis of the findings of AChE activity in the central nervous system (in the frontal cortex, hippocampus, septum, basal ganglia and pituitary gland) and on the contrary peripheral nervous system activity of butyrylcholinesterase has been detected (specifically in the liver and plasma).

The results obtained by the Ellman's method showed that galantamine is generally a weak inhibitor and statistically significant effect is found only at the highest dose used. At the highest dose used can be expected adverse effects of peripheral type.

Obsah

1	ÚVOD.....	- 7 -
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	- 9 -
2.1	Rozdělení acetylcholinových receptorů	- 9 -
2.2	Distribuce acetylcholinových receptorů v mozku.....	- 12 -
2.3	Nikotinový acetylcholinový receptor	- 23 -
2.4	Galantamin	- 32 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	- 43 -
3.1	Uspořádání pokusu	- 43 -
3.2	Odběr vzorků mozku	- 43 -
3.3	Použité chemikálie a roztoky	- 43 -
3.4	Použité přístroje.....	- 45 -
3.5	Pracovní postup	- 45 -
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	- 46 -
4.1	Výsledky	- 46 -
4.2	Diskuze	- 49 -
5	ZÁVĚRY	- 51 -
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 52 -

1 Úvod

Jedním z hlavních neuromediátorů v centrální a periferní nervové soustavě je acetylcholin (ACh). Vyskytuje se v celém centrálním nervovém systému s nejvyšší koncentrací v mozkové kůře, hippocampu a v bazální části předního mozku. Stimuluje dva základní typy receptorů, které jsou rozděleny farmakologicky dle afinity agonistů a antagonistů na muskarinové a nikotinové acetylcholinové receptory.

Oba typy receptorů se nachází v centrální i periferní nervové soustavě. V lidském mozku se nikotinové receptory vyskytují v menší míře než muskarinové receptory, navíc jsou na rozdíl od muskarinových receptorů lokalizovány spíše difúzně mimo klasické cholinergní cesty.

U degenerativních onemocnění mozku již v časném stadiu dochází k regionálním nedostatkům cholinergního systému. U pacientů s Alzheimerovou demencí (AD) je pozorován pokles aktivity cholinergních projekcí do hippocampu a mozkové kůry. Pacienti s AD často trpí ztrátou explicitní paměti, jelikož tvorba explicitních stop zahrnuje pracovní paměť ve frontálních lalocích a zpracování v hippocampu. S postupnou progresí nemoci zasahuje cholinergní deficit i další oblasti mozku. Všeobecně se při procesech učení a paměti uplatňují ještě další mozkové struktury jako například corpora mamillaria, septum, bazální ganglia – nucleus caudatus, přední jádra thalamu, nucleus basalis Meynerti, amygdala, atd.

K léčbě těchto neurodegenerativních poruch se doposud přednostně podávají reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy (AChE), jako dosud nejefektivnější terapie, nikoliv ovšem kauzální. Mezi inhibitory AChE patří i terciární alkaloid galantamin (Gal). Je brán jako kognitivum s duálním účinkem, které kompetitivně a reverzibilně inhibuje AChE a současně bylo zjištěno, že dokáže alostericky modulovat nikotinové receptory. Dalo by se tedy říci, že má schopnost ovlivňovat oba typy acetylcholinových receptorů.

Centrální a periferní účinek Gal spočívá v blokaci AChE, není však doposud jisté jakou měrou do výsledného efektu Gal zasahuje jeho vlastnost alostericky modulovat nikotinové receptory. Na úrovni centrální nervové soustavy (CNS) Gal příznivě upravuje kognitivní, funkční a behaviorální vlastnosti kompetitivní a reverzibilní inhibicí příslušné izoformy AChE v odpovídajících částech mozku. Periferní efekt Gal se projevuje v negativních účincích cholinomimetického typu jako u ostatních cholinergik.

Cílem diplomové práce bylo především stanovení účinné inhibiční dávky galantaminu u laboratorních potkanů. Zároveň byl srovnáván centrální a periferní anticholinesterázový efekt jednotlivých zvolených dávek.

2 Teoretická část

2.1 Rozdělení acetylcholinových receptorů

Z pohledu biochemie je receptor proteinová molekula lokalizovaná buď v buněčné membráně (transmembránové receptory) či uložená uvnitř buňky v cytoplazmě (intracelulární – cytosolové - receptory), obsahující vazebné místo či místa pro specifické signální molekuly (endogenní či exogenní ligandy). Po navázání ligandu dochází obvykle ke změně konformace daného receptoru, popřípadě ke změně funkčního stavu receptorového proteinu. Vznik vazby mezi receptorem a ligandem iniciuje buněčnou odpověď (Lüllman et al., 2004).

Acetylcholinové receptory se řadí mezi transmembránové receptory. Farmakologicky byly rozlišeny na základě afinity rozdílných agonistů na dva základní typy. Receptory stimulované účinnou látkou nikotinem se dle něj označují jako nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR). Naopak receptory, které byly aktivovány muskarinem, alkaloidem z muchomůrky (*Amanita muscaria*) a jsou selektivně antagonistovány atropinem, byly pojmenovány muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR).

Svou strukturou a funkcí se podstatně liší (Benešová, 2003).

Nikotinové acetylcholinové receptory

nAChR jsou receptory patřící mezi ligandem řízené iontové kanály, patřící do třídy ionotropních receptorů. V těchto receptorech se po navázání ligandu na vazebné místo - v tomto případě Ach - mění konformace receptorového proteinu a v důsledku toho se otevře vlastní kanál. Dle výskytu je můžeme rozdělit na neuronální (např. na postsynaptické membráně vegetativních ganglií) a muskulární (motorická nervosvalová ploténka kosterního svalu) nAChR. Oba typy nAChR mají podobnou molekulární strukturu, ale liší se lokalizací, farmakologicky i složením svých podjednotek (Lincová, 2007).

Tab. č. 1: Základní charakteristiky nAChR (upraveno dle Lincová, 2007)

Typ nAChR	lokalizace	Účinek na úrovni buňky	funkce
muskulární	nervosvalová ploténka	Otevření iontového kanálu pro kationty, depolarizace buněčné membrány - excitace	nervosvalový přenos
neuronální	ganglia, CNS, senzoryická nervová zakončení		Neurotransmise v gangliích, presynaptická facilitace v CNS

Muskarinové acetylcholinové receptory

MAChR náleží do třídy metabotropních receptorů. Metabotropní receptory neformují iontový kanál jako u ionotropních receptorů, ale transdukce signálu se po navázání ligandu uskutečňuje spojením s efektorovým enzymem pomocí G-regulačního proteinů. Samotný G-regulační protein udává, zda bude příslušný efektorový enzym (např. adenylcykláza) aktivován či inhibován. Jedná se o receptory, jejichž protein sedmkrát prochází membránou (tzv. serpentinové proteiny). MAChR jsou tedy tvořeny sedmi doménami.

Za pomoci klonování a dalších metod bylo identifikováno 5 subtypů mAChR, které se značí M1 až M5. Nejlépe je definována funkce a význam u subtypů M1, M2 a M3. Opět se jednotlivé subtypy mAChR liší svou funkcí a lokalizací (Lincová et al., 2007).

Účinky mAChR na buněčné úrovni

M1, M3 a M5 subtypy mAChR jsou spojeny s $G_{q/11}$ proteiny aktivujícími fosfolipázu C, která stimuluje produkci nitrobuněčných posílů inositoltrifosfátu (IP_3) a diacylglycerolu (DAG). Následně se zvyšuje intracelulární koncentrace Ca^{2+} a dochází

k excitačním dějům, např. ke zvýšení sekrece žlazových buněk aj. U M2 a M4 mAChRs probíhá transdukce signálu prostřednictvím $G_{i/o}$ proteinů, které naopak způsobují inhibici adenylylcyklázy a např. v srdci otevřením draslíkových kanálů prodlužují diastolickou depolarizaci a vedou k bradykardii. Tyto subtypy se dále vyskytují presynapticky v úloze autoreceptorů (Benešová, 2003, Lincová et al. 2007, Langmead et al., 2008).

Lokalizace a funkce

MAChR se nachází v srdečním a hladkém svalstvu, postsynaptických gangliích parasymptiku, žlázách a v centrálním nervovém systému (CNS) (Trojan et al., 2003, Benešová, 2003, Langmead et al., 2008).

M1 receptory můžeme též označit jako „neuronální“, jelikož se jak v CNS, tak v periferních neuronech. Dále se vyskytuje tento subtyp v parietálních buňkách žaludku. Navázáním Ach na M1 subtyp mAChR dochází k excitačním reakcím (např. ke stimulaci v CNS, zvýšení sekrece kyseliny solné v žaludku aj.).

M2 subtyp mAChR se nachází především v srdci a v neuronálních tkáních. Jejich prostřednictvím dochází naopak k inhibičním reakcím (např. vagová inhibice srdeční frekvence, presynaptická inhibice v centrálním i periferním nervovém systému).

M3 receptory byly objeveny v hladkých svalech a žlázách. M3 subtyp zprostředkovává excitační účinky Ach (zvýšení sekrece slinných žláz, bronchiálních a jiných, kontrakce hladkých svalů vnitřních orgánů), v hladkých svalech způsobují naopak jejich relaxaci.

M4 receptory jsou lokalizovány pravděpodobně v CNS a žlázách a u M5 receptorů není lokalizace přesně známa (Lincová, 2007).

Tab. č. 2 : Základní charakteristiky mAChR (upraveno dle Lincové et al., 2007, str. 115)

subtyp mAChR/ G-protein	lokalizace	Účinek na úrovni buňky	funkce (reakce na Ach)
M1/G _{q/11}	<ul style="list-style-type: none"> postsynaptická ganglia parasymptatiku CNS Parietální buňky žaludku 	aktivace fosfolipázy C, následně zvýšení koncentrace IP ₃ , který zvýší konc Ca ²⁺ snížení permeability pro K ⁺ , depolarizace excitace	<ul style="list-style-type: none"> sekrece HCl CNS excitace – paměť Zvýšení motility GIT
M2/G _{i/o}	<ul style="list-style-type: none"> Srdce (síně, SA, AV uzel) Presynaptická nervová zakončení 	otevření K ⁺ kanálu, inhibice adenylátcyklázy	<ul style="list-style-type: none"> negativně chromotropně, dromotropně, ionotropně na srdeční síně presynaptická inhibice
M3/G _{q/11}	<ul style="list-style-type: none"> hladké svalstvo exokrinní, endokrinní žlázy CNS 	aktivace fosfolipázy, následně zvýšení koncentrace IP ₃ , který zvýší konc Ca ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> bronchokonstrikce sekrece slinných žláz, žaludečních šťav kontrakce hladkých svalů vnitřních orgánů
M4/G _{i/o}	<ul style="list-style-type: none"> CNS žlázy 	inhibice adenylátcyklázy	inhibiční efekty
M5/G _{q/11}	<ul style="list-style-type: none"> CNS? 	aktivace fosfolipázy	

2.2 Distribuce acetylcholinových receptorů v mozku

Denzita mAChR a nAChR se v lidském mozku liší. nAChR se v lidském mozku vyskytují mnohem sporadičtěji než mAChR. Navíc jsou nAChR více rozptýleny a ne vždy jsou v souladu s klasickými cholinergními cestami (Paterson a Nordberg, 2000, Benešová, 2003).

Hlavní cholinergní subsystemy:

Magnoceulární bazální komplex (incl. basalis magnocellularis Meynerti), projekující do mozkové kůry včetně čelního laloku,

Mediální a dorsální septální jádro (hlavní projekce do hippocampu),

Pedunclopontinní-laterodorsální komplex,

Striatum („vnitřní“ striátový okruh, neprojikující mimo striatum),

Habenulo-interpedunkulární systém,

Parasympatické komponenty hlavových nervů III., VII., IX. a X. (Gotti a Clementi, 2004).

Muskarinové acetylcholinové receptory

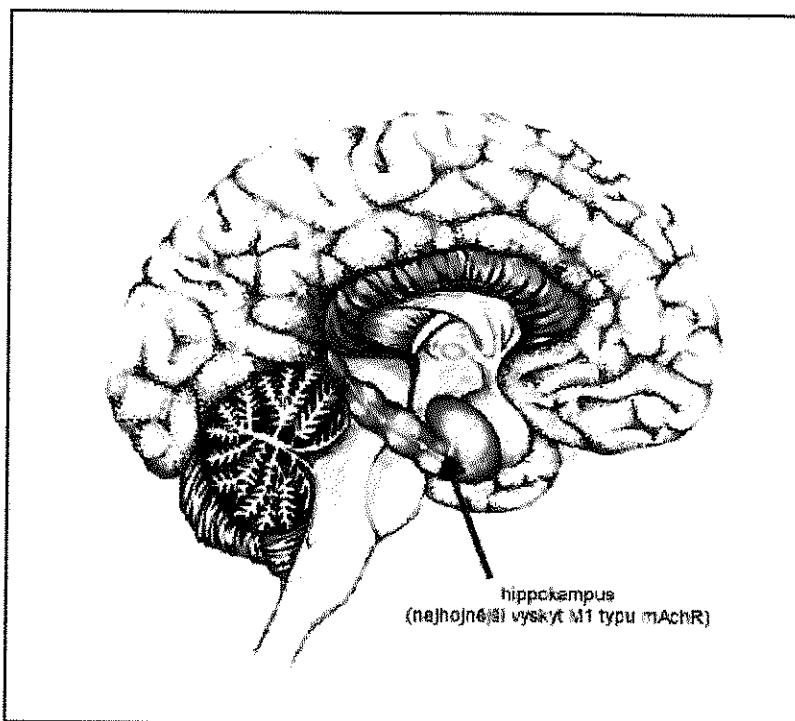
MAchR se vyskytuje, jak již bylo uvedeno, mimo jiné i v CNS. Jednotlivé subtypy dominují v různých částech mozku. Hrají nezastupitelnou roli při kontrole různých neuronálních funkcí v CNS. Nevyhnuly se proto pozornosti farmaceutického průmyslu jako možnost přípravy léčiv na onemocnění jako AD a Parkinsonova choroba, léčbu schizofrenie a drogové závislosti (Langmead et al., 2008).

Nejhojněji se v CNS vyskytují mAchR subtypu M1, které jsou lokalizovány postsynapticky na neuronech v mozkové kůře, hippocampu, striatu a thalamu. M1 subtyp se nejhojněji objevuje v mozkové kůře a hippocampu. Hippokampus a mozková kůra jsou oblasti známé svojí úlohou sehrávající při procesech učení a paměti, přičemž značný význam při těchto procesech mají i mAchR, jelikož se podílí na modulaci dlouhodobé potenciace (jeden z mechanismů ukládání informace) v oblasti CA1 hippocampu a gyrus dentatus (Shiozaki et al., 2001, Langmead et al., 2008).

Byly prováděny studie s užitím protilátek proti M1 subtypu za účelem prozkoumání jejich distribuce v lidském hippocampu u pacientů trpících AD, demenci s Lewyho tělísky (DLB). Imunochemická studie probíhala ve srovnání s kontrolní skupinou. Jejím výsledkem byl nález imunoreaktivity M1 protilátek u kontrolní skupiny v granulárních neuronech v stratum granulosum v dentate gyrus, dále se byla

pozorována imunoreaktivita u pyramidálních neuronů v CA oblastech (převážně v CA2-3 oblastech), subiculu a parahippokampální kůře. Naopak v mozku pacientů s AD a DLB byl pozorován výrazný pokles intenzity M1 imunoreaktivity v oblasti hippocampu (Shiozaki et al., 2001).

Obr. č.:1 Lokalizace hippocampu na průřezu lidským mozkiem



M2 subtypy jsou umístěny převážně v mozkovém kmeni, thalamu, ale také v mozkové kůře, hippocampu a striatu, s převážně presynaptickou lokalizací a kontrolující uvolňování Ach (autoreceptory).

Naopak subtypy M3 a M5 mAChR se v mozku vyskytují mnohem méně. M3 subtypy mAChR se sporadicky vyskytují v mozkové kůře a hippocampu, subtypy M5 byly nalezeny v menším množství v substantia nigra.

M4 mAChR se nachází v mnoha oblastech mozku včetně mozkové kůry a hippocampu, nejvýraznější výskyt je ve striatu, kde pravděpodobně kontroluje uvolňování dopaminu a lokomoční aktivitu (Langmead et al., 2008).

Tab. č.: 3 Podtypy mAChR a jejich lokalizace v mozku (upraveno dle Langmead et al., 2008)

Subtypy mAChR	Lokalizace mAChR v mozku
M₁	Mozková kůra Hippokampus Thalamus Striatum
M₂	Mozkový kmen Thalamus Mozková kůra Hippokampus Striatum
M₃	<i>Mozková kůra</i> <i>Hippokampus</i>
M₄	Striatum Mozková kůra Hippokampus
M₅	<i>Substantia nigra</i>

Tučně jsou vyznačeny oblasti, v kterých jsou dané receptory více rozšířeny, *kurzívou* naopak oblasti se sporadickým výskytem receptorů v mozku.

Nikotinové acetylcholinové receptory

Existují nejméně dva typy nAChR odlišující se svojí lokalizací. Muskulární typ nAChR nalezneme na nervosvalové ploténce, druhým typem je neuronální, který jak sám název napovídá, se vyskytuje v nervové soustavě. Neuronální nAChR se nacházejí ve vegetativních gangliích a v některých oblastech mozku. Jejich prostřednictvím jsou ovlivněny různé mozkové funkce. Efekt nAChR je závislý na podtypu a lokalizaci daného podtypu nAChR v nervovém systému. nAChR se vyskytují nejen na postsynaptických membránách cholinergního systému, ale i na presynaptických axonových zakončeních (Gotti a Clementi, 2004, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2007).

Pentamerní struktura nAChR je výsledkem homomerní či heteromerní kombinace 12 podjednotek pouze typu α (α 2-10) a β (β 2-4) na rozdíl od muskulárního typu nAChR, kde se na skladbě vlastního receptoru podílí ještě další druhy podjednotek. Různorodost v podjednotkovém složení určuje charakteristické vlastnosti jednotlivých podtypů nAChR.

Heteropentamerní receptory jsou tvořeny kombinací podjednotek α 2-6 a β 2-4. Naopak homomerní podjednotky jsou formovány pouze z podjednotek α (α 7, 8 nebo 9). Existují ale i podjednotky, které samy o sobě nebo ve vzájemné kombinaci nemohou tvořit funkční receptorový kanál. Jedná se o α 5 a β 3 podjednotky, které se díky své funkci mohou označovat jako „pomocné“ (Gotti a Clementi, 2004, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2007).

Homo-oligomerní receptory nesou pět identických vazebných míst pro Ach, s tím že každá podjednotka zahrnuje jedno vazebné místo, které je vždy umístěno na rozhraní mezi dvěma sousedícími podjednotkami. Naopak hetero-oligomerní receptory vlastní jen dvě vazebná místa pro Ach, nacházející se na rozhraní mezi α a β podjednotkami. Vazebné místo pro Ach má hlavní a doplňkovou komponentu. U heteromerního receptoru je hlavní komponenta nesena α 2-4 a α 6 podjednotkami a doplňková komponenta je uložena na β 2 nebo β 4 podjednotkách. Naopak každá podjednotka v homomerním receptoru vlastní hlavní i doplňkovou komponentu vazebného místa pro Ach. Zde se nachází i vysvětlení proč jsou α 5 a β 3 podjednotky

považovány za pomocné. Nenesou totiž ani hlavní ani doplňkovou komponentu pro vazebné místo Ach (Gotti a Clementi, 2004, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2009).

Metody zjišťující distribuci nAChR

- 1) Metody používající radioaktivních ligandů ke studiu distribuce nAChR v homogenátu izolované mozkové tkáně nebo histologických částech mozku. Metoda je velmi citlivá ale ne příliš specifická, jelikož nejsou k dispozici podtypově specifické ligandy. 3H-nikotin značí společně s 3H-epibadinem například všechny nAChR.
- 2) Imunohistochemie nebo imunopurifikace z určitých částí mozku značených podjednotkově specifickými protilátkami.
- 3) Mapování in vivo s pomocí pozitronové emisní tomografie (PET), která využívá připravené specifické nikotinové ligandy a její výhodou je neinvazivnost a použití i u člověka například u diagnostiky AD.
- 4) In situ hybridizace při identifikaci podjednotkové mRNA za pomocí selektivní podjednotkově specifické sondy. Je nejvíce citlivá oproti ostatním uvedeným (Gotti a Clementi, 2004).

Rozdělení nAChR dle vazebnosti radioligandů v mozku

Na základě odlišných fylogenetických, funkčních a farmakologických vlastností se nAChR podtypy rozdělují do dvou hlavních tříd. Toto rozlišení vzniklo na podkladě dřívějších studií, které se prostřednictvím radioligandů a jejich vazebnosti v různých částech mozku snažily charakterizovat nAChR. Tyto studie byly později potvrzeny a upřesněny pomocí molekulárního klonování rodiny genu kódujících 12 podjednotek různě distribuovaných v CNS. Jedna třída se skládá z α i β podjednotek a vytváří jejich vzájemnou kombinací jen heteromerní receptor, který je schopen vázat s vysokou afinitou ^3H -agonisty ale ne α -bungarotoxin (αBtx). Do druhé třídy spadají jak heteromerní tak i homomerní receptory, které oplývají nízkou afinitou k ^3H -agonistům a naopak vyšší afinitou vůči αBtx (Gotti a Clementi, 2004, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2007).

1) Receptory třídy senzitivní vůči α Btx

Do této skupiny patří receptory, jejichž kanál je utvářen podjednotkami α ($\alpha 7-9$). Vznikají homomerní receptory aktivované Ach, blokové nanomolárními koncentracemi α Btx, s vysokou permeabilitou pro Ca^{2+} a rychlou mírou desenzitizace.

Receptory obsahující podjednotku $\alpha 8$ byly dosud nalezeny pouze v nervovém systému kuřete, kde mohou vytvářet kromě obvyklých homomerních i heteromerní receptory. $\alpha 9$ podjednotka je obsažena v receptorech uložených extraneuronálně. V mnoha oblastech lidského mozku byly nalezeny receptory složené z podjednotky $\alpha 7$ a to zejména v hippocampu. Receptory obsahující tuto podjednotku byly objeveny na presynaptických membránách, ale také s mimosynaptickou lokalizací, mohou se však přímo podílet na postsynaptickém přenosu signálu. Na presynaptických membránách usnadňují uvolňování transmiterů jako například glutamát a GABA. (Gotti a Clementi, 2004)

Homomerní receptory obsahující $\alpha 7$ podjednotky jsou na základě vazebných studií s použitím α Btx nejvíce rozšířeny v savčím mozku zejména: v mozkové kůře, hippocampu a subkortikálních limbických oblastem a v nižších hladinách také v talamických oblastech a bazálních gangliích. Mohou být uloženy jak presynapticky, kde se podílí na přímém uvolňování glutamátu v hippocampu a ventero-tegmentální oblasti (VTA) a jejich přičiněním se uvolňují i excitační aminokyseliny v prefrontálním kortexu, tak postsynapticky. Nepřímo zprostředkovávají uvolňování dopaminu v bazálních gangliích a prefrontálním kortexu, a noradrenalinu z hippocampu. Postsynaptické receptory mohou dlouhodobě prostřednictvím stimulace Ca^{2+} influxu působit na metabolické dráhy a genovou expresi. (Gotti et al., 2009)

Receptory složené z podjednotek $\alpha 7$ byly nalezeny u laboratorních potkanů zejména v oblastech hippocampu, hypothalamu, mozkové kůry a v motorickém jádru nervus vagus. Těchto nálezů bylo dosaženo na základě studií využívajících radioaktivního ligandu, hybridizace in situ a imunohistochemie. Také bylo užito specifických podjednotkových protilátek. (Gotti a Clementi, 2004)

Distribuce v mozku primátů

V mozku primátů, kde se řadí i člověk, se vyskytují $\alpha 7$ receptory především v autonomních gangliích, hippocampu a thalamických jádrech (retikulárním a

geniculate), v menší hustotě pak v mozečku, šišince a mozkové kůře (Gotti a Clementi, 2004).

Tab. č.: 4 Distribuce nAChR citlivých vůči α Btx v lidském mozku (upraveno dle Paterson a Nordberg, 2000)

Hustota výskytu receptorů	Oblast výskytu receptorů
Vysoká	Nucleus reticularis, laterální a mediální geniculate nucleus, Meynertovo bazální jádro
Středně vysoká	Hippokampus, hypotalamus
Nízká	Mozková kůra, mozeček

2) Receptory třídy necitlivé vůči α Btx

Receptory s vysokou afinitou k ^3H -agonistům se skládají z α ($\alpha 2-6$) podjednotek v kombinaci s β ($\beta 2-4$) podjednotkami a formují tak pouze receptory heteromerního charakteru. (Gotti a Clementi, 2004)

Provedenými studiemi bylo zjištěno, že nejrozšířenější nAChR podtypy v nervovém systému jsou kromě homomerních receptorů $\alpha 7$, heteromerní receptory obsahující pouze typ α a β podjednotky.

Stechiometrie

Jelikož nAChR mají pentamerní strukturu, mohou nAChR vykazovat značnou molekulární diverzitu. Receptorové podtypy mohou mít stejné podjednotkové složení, ale mohou vykazovat různou stechiometrii. Získanými výsledky byla potvrzena hypotéza, že různá stechiometrie může propůjčovat podtypům nAChR o shodné podjednotkové skladbě odlišné a pro ně charakteristické fyziologické a farmakologické vlastnosti (např. permeabilita pro Ca^{2+}). Různá receptorová stechiometrie může hrát roli i u patofyziologických stavů (Gotti et al., 2009).

Přesná stechiometrie nativních heteromerních nAChR je dosud nejasná (Gotti et al., 2007).

Distribuce v mozku potkana

Nejvíce rozšířeným podtypem v mozku je $\alpha 4\beta 2$, součástí podtypu může být i $\alpha 5$ podjednotka. Stejně tak podtyp receptoru o složení $\alpha 3\beta 4$ může být zároveň spojen s podjednotkou $\alpha 5$ ale i bez ní. Přednostně se tento podtyp nachází v autonomních gangliích a dření nadledvin, lokalizován je i v mozku a to v oblasti mediální habenuly, nucleus interpeduncularis, hřbetní míchy, šišinky, dále pak v sítnici. Spojení podjednotek $\alpha 6$ a $\beta 3$ bylo nalezeno v optické dráze, locus coeruleus a mezostriatální dráze. Mezostriatální dráha má dvě složky: ventrální mezo limbickou dráhu (těla neuronů ve VTA a zakončení v nucleus accumbens) a dorsální nigrostriátovou dráhu (těla neuronů v substantia nigra a zakončení v caudate-putamen). nAChR mezostriatální dráhy v dopaminergních neuronech hrají důležitou roli v kontrole lokomoce a rozvoji nikotinové závislosti. Společně s podtypem $\alpha 4\beta 2$ presynapticky zprostředkovávají vyplavení dopaminu z dopaminergních buněk (Gotti a Clementi, 2004, Gotti et al., 2009).

Distribuce v mozku primátů

Většina provedených studií zmapovala distribuci za použití radioligandů a jejich vazebnosti (3H-nikotin, 3H-epibatidin) a selektivních protilátek proti jednotlivým podjednotkám. Výsledky studií prezentovaly distribuci nAChR v různých strukturách mozku a to zejména v thalamu, mozkové kůře a striatu. Pro zjištění distribuce nAChR byla použita i neinvazivní metoda PET 2000 (Gotti a Clementi, 2004).

Na nejdůležitější podtyp $\alpha 4\beta 2$ nAChR v lidském mozku poukázaly výsledky studií in situ hybridizace. Tato kombinace podjednotek byla prokázána v následujících oblastech: striatum, hippocampus, habenula a mozková kůra a to v kombinaci s podjednotkou $\beta 4$. Důležitou součástí mesencefalických jader jsou podtypy nAChR obsahující $\alpha 6\beta 3$ podjednotky (Gotti a Clementi, 2004).

Tab. č.: 5 Distribuce nAChR necitlivé vůči α Btx v lidském mozku (upraveno dle Paterson a Nordberg, 2000)

Radioaktivní ligandy	Hustota výskytu receptorů	Oblast výskytu receptorů
^3H -nikotin	Vysoká	Thalamus, caudate nucleus
	Středně vysoká	Frontální a parietální mozková kůra
	nízká	Temporální mozková kůra, hippocampus, mozeček
^3H -epibatidin	Vysoká	Thalamus
	Středně vysoká	Caudate-putamen, parietální mozková kůra, mozeček
	nízká	Frontální a temporální mozková kůra, hippocampus

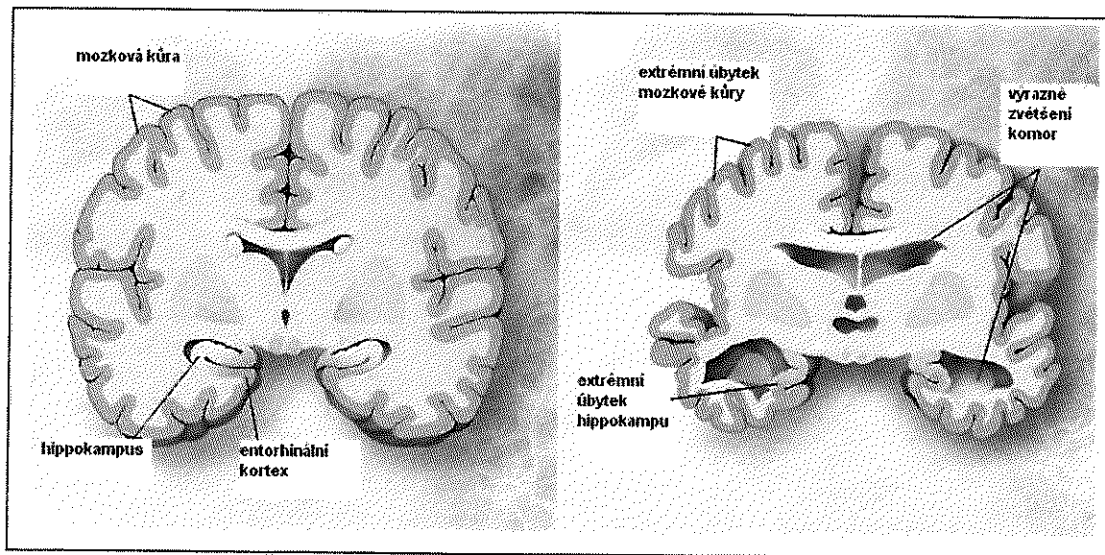
Distribuce nAChR u pacientů s AD

Pro průběh AD je charakteristické narušení cholinergní transmise, které souvisí s nedostatkem mozkového Ach, který zajišťuje přenos informací mezi mozkovými buňkami. Postupný úbytek neuronů a porucha přenosu informací mezi nimi vede k narušení mozkových funkcí. Časné změny jsou patrné zejména v oblasti hippocampu a v entorhinální kůře. Primárně se snižuje počet cholinergních neuronů v nucleus basalis Meynerti a přilehlých jádrech, projekujících do hippocampu, amygdaly a celého neokortexu. Nejdříve se tedy snižuje počet axonových terminál v uvedených strukturách mozku při relativním uchování postsynaptických receptorů (Ganong a kol., 2005).

Změny v distribuci nAChR ve smyslu jejich úbytku byly zaznamenány v kortikálních oblastech a také jsou patrné v subkortikálních oblastech. Za použití radioligandů byly pozorovány změny v počtu nAChR v neokortikálních oblastech a hippocampu v tkáni pacientů, kteří trpěli AD. Autoradiografická analýza v lidském hippocampu a přídatné mozkové kůře poukázaly na největší hustotu v subikulárním komplexu, stratum lacunosum moleculare, gyrus dentatus a entorhinální kůře. Imunochemické studie prokázaly deficit především u podtypů nAChR obsahující $\alpha 4$

podjednotku v neokortexu a hippocampu. Určitý prokazatelný deficit byl zaznamenán i u podtypů nAChR senzitivních vůči α Btx v temporální mozkové kůře. Některé předchozí studie zjistily redukcí radioligand-vázajících míst v oblasti striata u pacientů s AD (zejména v nucleus caudatus) (Court et al., 2001).

Obr. č. 2: Srovnání průřezu mozku zdravého a nemocného jedince s AD (upraveno dle internetového zdroje: www.wikipedia.org)



Nalevo: Mozek člověka, který není postižen žádnou neurodegenerativní chorobou.
Napravo: Mozek pacienta trpící AD, kde je patrný úbytek v oblasti mozkové kůry a hippocampu.

2.3 Nikotinový acetylcholinový receptor

nAChR jsou integrální membránové proteiny aktivované mediátorem acetylcholinem. Náleží společně s GABA_A, glycinem a glutamátovými receptory do nadrodiny iontových kanálů řízených ligandem (Karlin, 1993, Gotti a Clementi, 2004).

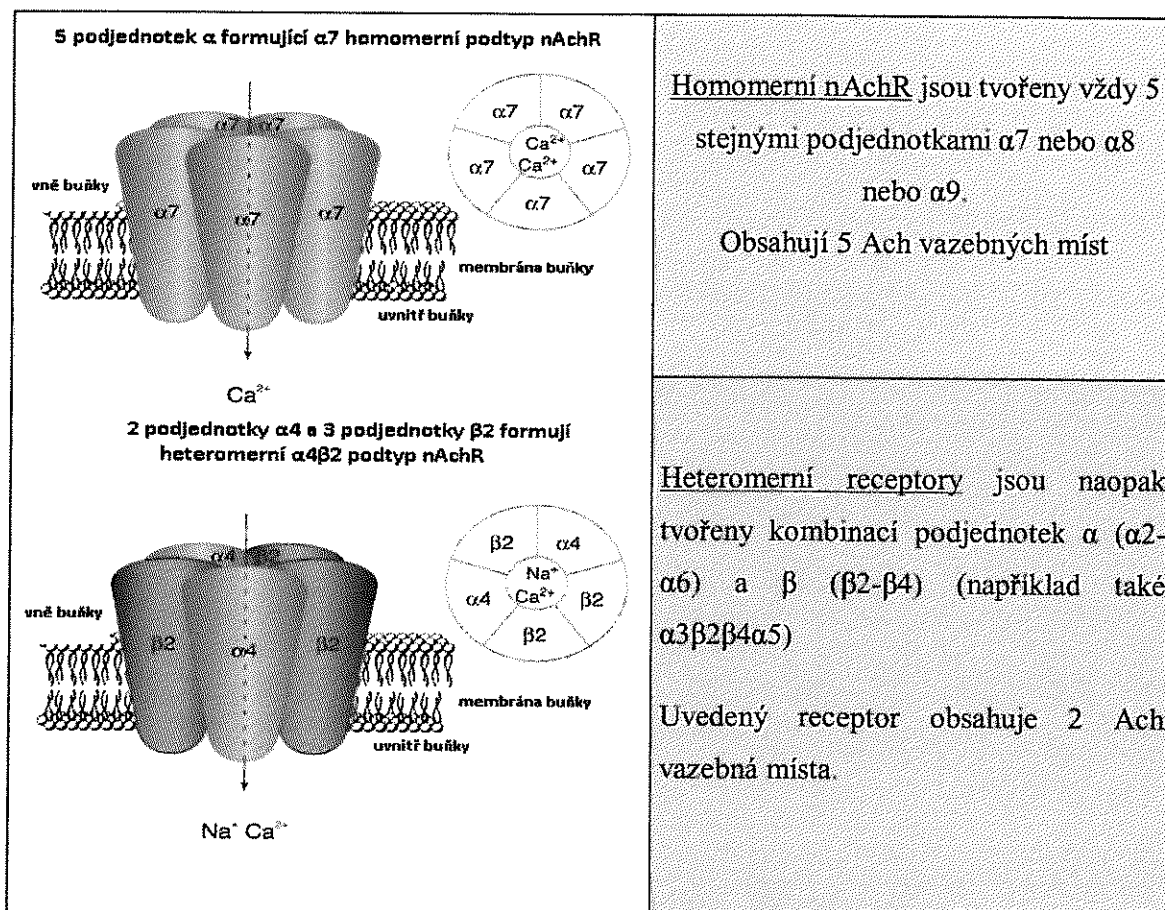
Struktura

nAChR je tvořen spojením 5 transmembránových podjednotek uspořádaných kolem centrálního póru iontového kanálu a formujících v membráně pentamerní komplex mající podobu „soudku“.

Transmembránové podjednotky jsou kombinovány ze 17 druhů homologních polypeptidů řadících se do 4 hlavních skupin, které jsou pojmenovány dle písmen řecké abecedy a vzestupně seřazeny podle své molekulové hmotnosti (α , β , γ , δ a popřípadě ϵ). U α a β podjednotek byly zjištěny ještě další izoformy, které se značí číslicemi ($\alpha 1-10$, $\beta 2-4$). Podjednotky α mají ve své extracelulární části kromě vazebného místa pro acetylcholin ještě další alosterická vazebná místa pro nekompetitivní aktivátory iontového kanálu, např. modulátory iontového kanálu typu galantaminu či pro nekompetitivní blokátory (např. fencyklidin, chlorpromazin), steroidy a Ca^{2+} , které způsobují desenzitizaci nAChR.

Existuje více podtypů nAChR daných určitou kombinací transmembránových podjednotek, které určují různé fyziologické a farmakologické vlastnosti jednotlivých podtypů. nAChR mohou být buď to heteromerního charakteru, kdy jsou např. tvořeny kombinací podjednotek $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ či se může jednat o homomerní podtypy nAChR tvořeny pouze z pěti $\alpha 7$ podjednotek (Benešová, 2003, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2009).

Obr. č. 3: Schéma pentamerní struktury homomerního a heteromerního podtypu nAChR (upraveno dle internetového zdroje www.niaaa.nih.gov)



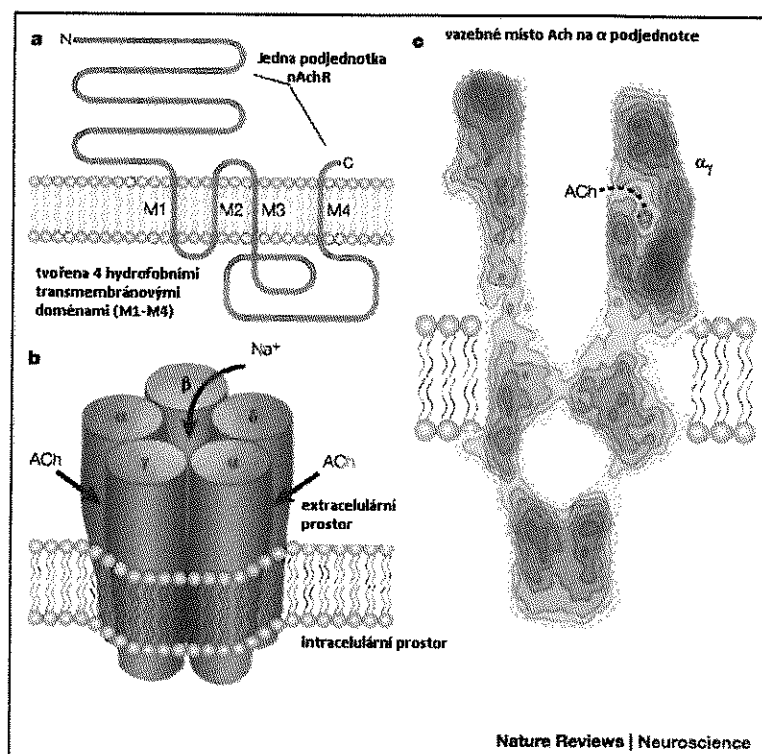
nAChR konstantně obsahuje vždy 2 podjednotky α , neboť pouze ty nesou vazebné místo pro Ach.

Struktura podjednotek

Vzhledem k N-terminální extracelulární doméně každého ligandem řízeného iontového kanálu, kde je zachována sekvence třinácti zbytků kovalentně vázaných cysteinů, se nAChR řadí k rodině Cys-loop receptorů. V tomto typu receptorů kovalentně vázané cysteiny formují smyčku mezi vazebným místem ligandu a doménou iontového kanálu, extracelulární amino-terminální část podjednotek nAChR je hydrofilního charakteru a nese vazebné místo pro acetylcholin a je stočena do synaptické štěrby. Dále následují 3 hydrofobní transmembránové domény značené M1-M3, velká intracelulární smyčka a čtvrtá též hydrofobní transmembránová doména M4. Hydrofobní transmembránové domény M1-M4 jsou soustředěny v jednotlivých

vrstvách kolem centrálního „vodního“ póru. M2 je doména kolem membránového póru a je chráněna prostřednictvím domén M1 a M3 od okolní lipidové dvojvrstvy. Doména M4 je naopak nejvíce vystavena lipidové dvojvrstvě (Benešová, 2003, Kalamida et al., 2007, Gotti et al., 2009).

Obr. č. 4: Schéma muskulárního typu nAChR (upraveno dle internetového zdroje www.nature.com)



Role podjednotek

Ukázalo se, že některé podjednotky slouží jako přídatné či druhotné a nemohou samy o sobě, tedy bez přítomnosti hlavních α podjednotek, formovat vazebné místo pro příslušný ligand. (Gotti et al., 2009)

Lokalizace nikotinových receptorů

Na základě lokalizace rozlišujeme dvě základní podtřídy nAChR. Neuronální typ nAChR, které se jednak hojně vyskytují v CNS, jednak v periferní nervové soustavě ve vegetativních gangliích. Druhou podtřídou nAChR je muskulární typ, které se nachází na periférii v neuromuskulární ploténce. NACHR mohou být exprimovány i

v non-neuronálních a nemuskulárních buňkách (keratinocyty, makrofágy, epiteliální buňky, atd).

Periferně uložené nAChR v nervosvalové ploténce kosterního svalstva, neboli tedy nAChR muskulárního typu, jsou složeny z podjednotek $\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta$, nebo ϵ podjednotky. Výsledná stechiometrie podjednotek nAChR je také odlišná u svalu plodu (obecně: $\alpha_2\beta\gamma\delta$) od stechiometrie svalu dospělého jedince ($\alpha_2\beta\epsilon\delta$). Rozdíl spočívá v náhradě γ podjednotky za ϵ podjednotku u nAChR dospělého jedince. Dochází následně i ke změně vodivosti kanálu a tím i kanálové kinetiky.

Neuronální typy nAChR v mozku obsahují pouze α a β podjednotky. Ty však existují v několika izoformách. Podjednotky $\alpha 2-6$ a podjednotky $\beta 2-4$ formují hetero-oligomerní nikotinové receptory, zatímco $\alpha 7-9$ homo-oligomerní nikotinové receptory.

V srdci a gangliích nalezneme kombinaci podjednotek $\alpha 3$ a $\alpha 5$, které jsou spojovány s $\beta 2$ nebo $\beta 4$ podjednotkami (Karlin, 1993, Benešová, 2003, Buccafusco, 2004, Kalamida et al., 2007).

Tab. č. 6: Podtypy nAChR a jejich prezentace a úloha v mozku, autonomních gangliích a kosterní svalovině (upraveno dle Buccafusco, 2004)

	Podjednotky	Umístění	Úloha
Mozek	$\alpha 4\beta 2$	<ul style="list-style-type: none"> • Mozková kůra • Thalamus • Hippokampus 	Kognice Paměť analgesie
	$\alpha 7$	<ul style="list-style-type: none"> • Mozková kůra • Hippokampus 	Učení/paměť
	$\alpha 3\beta 4$	<ul style="list-style-type: none"> • Interpedunkulární nucleus • habenula 	Odměna analgesie
	$\alpha 6\alpha 3\beta'$ $\alpha 4\beta 4''$ γ'''	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleus accumbens' • Hippokampus'' • Chemorecepční spouštěcí zóna''' 	Odměna' Záchvaty'' Zvracení'''
Autonomní ganglia	$\alpha 3\beta 2$ $\alpha 3\beta 4$ $\alpha 3\beta 4\alpha 5$	<ul style="list-style-type: none"> • Ganglia 	Přenos signálu z presynaptického na postsynaptický neuron
Kosterní svalovina	$\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$	Neuromuskulární ploténka	stah

Non-neuronální lokalizace nAChRů

Lymfatická tkáň

Vazebná místa pro nikotin se vyskytují v B-lymfocytech a T-lymfocytech brzlíku. Jejich počet se stárnutím zvyšuje. Receptory mají vliv na proliferaci cirkulujících T buněk, dále působí na diferenciací a selekční procesy brzlíku a na B buňkách dochází ke stimulaci růstu a poklesu produkce protilátek. Lymfocyty obsahují cholinoacetyltransferázu, acetylcholinesterázu a vezikulární acetylcholinový transportér, což umožňuje aktivaci nAChRs patrně prostřednictvím autokrinní dráhy.

Makrofágy

Cirkulující buňky, které jsou schopny fagocytózy, obsahují též nAChRs, jejichž aktivací se snižuje uvolňování tumor-nekrotizujícího faktoru α (TNF α) a interleukinu 1 a 6.

Kůže

Lidské epidermální keratinocyty exprimují nAChR. nAChR zprostředkovávají běžné funkce kůže, především proliferaci, apoptózu, diferenciaci, adhezi a motilitu keratinocytů regulováním influxu Ca^{2+} iontů.

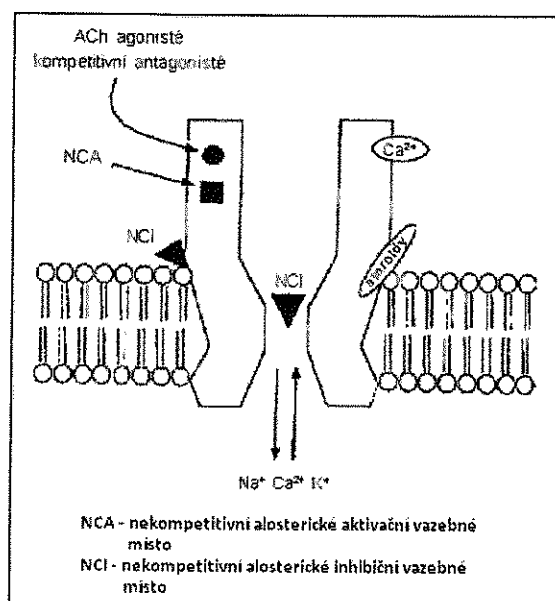
Dalšími místy, kde byly nalezeny nAChR, jsou *plicní buňky, vakulární tkáň a astrocyty* (Gotti a Clementi, 2004).

Funkce

Po navázání ligandu (acetylcholinu, specifického agonisty či antagonisty) na pentamerní nAChR dochází ke konformaci podjednotek receptoru za účelem otevření iontového kanálu. Otevřeným kanálem proudí skrze kanál ionty (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) řádově po dobu milisekund, dochází k depolarizaci membrány a následně k přenosu signálu. Jakmile se kanál uzavře, přechází buď to do klidového stavu nebo do stavu desenzitizace, kdy je nAChR refrakterní na několik milisekund až minut. Podjednotkové složení nAChR rozhoduje o průběhu a rovnováze mezi jednotlivými konformačními stavy.

Chronické vystavení nAChR relativně nízkým hladinám nikotinu (jako se děje prostřednictvím krve kuřáků) vede, na rozdíl od většiny agonistů, k počáteční rychlé desenzitizaci, kdy se receptor stabilizuje uzavřením kanálu a stává se necitlivým vůči agonistovi a následně pak probíhá „up-regulace“. Zvýšení počtu membránových receptorů, tzv. up-regulace, tak představuje do značné míry výjimku, jelikož běžně způsobuje agonista po dlouhodobém působení na příslušný membránový receptor naopak snížení počtu, neboli „down-regulaci“ (Benešová, 2003, Gotti et al., 2009).

Obr. č. 5: Schematický průřez nAChR znázorňující iontový kanál, vazebné místo pro Ach, kompetitivní agonisty a antagonisty a různé alosterická vazebná místa, rozložená v extracelulární části receptoru (upraveno dle Benešová, 2003)



Neuronální funkce

V experimentálních studiích se prokázalo, že díky nAChR se realizuje řada fyziologických reakcí jako například udržování vigility, selektivní pozornosti, zpracování informací, učení a paměť, stresová reaktivita, probouzecké reakce, spánkové cykly, vývoj závislosti a abstinčního syndromu (Paterson a Nordberg, 2000).

Vývoj a stárnutí

V průběhu lidského vývoje a stárnutí dochází k podstatným změnám v počtu, typech nAChR. Bylo prokázáno, že v průběhu těhotenství (od 17-27 týdne) se stabilně zvyšuje jejich počet, a že hladiny vysoce afinitních vazebných míst pro nikotin dosahují vyšší úrovně než v jakémkoliv jiné době lidského života. Byly vymezeny oblasti s nejvyšší koncentrací nAChR. Jedná se o Meynertovo bazální jádro a tegmentální jádro, dále globus pallidus, putamen, veškerá cerebelární jádra, parietální a cerebelární kůru, dále pak thalamus. Naopak nejnižší koncentrace byly zjištěny v prodloužené míše.

Od narození a hlavně pak v průběhu stárnutí v rozmezí 60-90 let života významně klesá koncentrace nAChR, i když v různých oblastech mozku odlišným tempem a v různorodém rozsahu. Spíše ojediněle, může dojít i k navýšení počtu nAChR. Panuje všeobecná shoda, že pokles nAChR se odehrává téměř ve všech sledovaných oblastech mozku.

S přibývajícím věkem se snižuje počet $\beta 2$ podjednotek ve všech strukturách mozku, k prokazatelnému poklesu dochází i u podjednotek $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ a $\beta 4$ v oblastech mozkové kůry a mozečku, naopak $\alpha 4$ a $\alpha 3$ podjednotky se nesnižují v putamen a hippocampu. U podjednotky $\beta 3$ byl dokonce v mozkové kůře prokázán vzestup.

Uvedené změny nAChR v průběhu vývoje a stárnutí jsou do značné míry specifické, jelikož se tak neděje například u muskarinových ani u glutamatergických receptorů. Zvýšená koncentrace AchR ve stadiu utváření synapsí při vývoji mozku hraje významnou roli v kontrole rozvoje struktury neuronů, ve stabilizaci utváření synapsí a orientaci a kontrole růstu neuritů (zvláště $\alpha 7$). Experimentálně bylo prokázáno i trofické působení nAChRs, jejichž stimulace vedla ke zvýšené produkci nervového růstového faktoru, mozkového neutrofinního faktoru a fibroblastového růstového faktoru.

Uvedený příklad prokazuje důležitost nAChR v období pre- a perinatálním při utváření nervové soustavy a jak v průběhu stárnutí ovlivňují degeneraci buněk. Na rozvoj nervové soustavy u plodu může působit aktivní i pasivní kouření matky i kojení pokud matka kouří. V dospělosti pak užívání léků stimujících podjednotky nAChR může vést ke zpomalení degenerativních procesů v mozku a tím i k udržení kognitivních funkcí (Benešová, 2003, Gotti a Clementi, 2004).

Patologie

Lze předpokládat možné využití nAChR jako důležitého terapeutického cíle pro léčbu některých onemocnění počínaje Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou, schizofrenií, myasthenia gravis až po odvykání kouření:

A) Onemocnění spojené s muskulárním typem nAChR

Myasthenia gravis

Jedná se o autoimunitní onemocnění, což se vyvozuje ze zvýšeného titru protilátek proti nAChRs u většiny pacientů trpících touto chorobou. Protilátky pak snižují počet nAChR na nervosvalovém spojení (Kalamida et al., 2007, Lincová a kol, Základní a aplikovaná farmakologie, 2007, str. 121).

B) Onemocnění spojené s neuronálním typem nAChR

U těchto typů onemocnění, které mají spojitost s neuronálním typem nAChR, není příliš jasně definovaná příčina jako u myasthenia gravis.

Epilepsie

Byla zjištěna forma epilepsie frontálního laloku, která je autozomálně dědičná. Gen pro tuto formu epilepsie je lokalizován na chromozomu v oblasti, která mimo jiné obsahuje také gen exprimující podjednotku $\alpha 4$ nAChR. Tato podjednotka se hojně vyskytuje – jak již bylo zmíněno - v lidském mozku. Na základě této skutečnosti byly provedeny studie, které prokázaly změnu ve funkčnosti $\alpha 4\beta 2$ podtypu nAChR, pokud tento podtyp obsahoval podjednotku $\alpha 4$, která byla exprimována prostřednictvím zmutovaného genu. Vystává tak možnost jisté spojitosti mezi mutací genu pro $\alpha 4$ podjednotku a tímto geneticky podmíněným onemocněním (Gotti et al., 1997, Paterson a Nordberg, 2000).

Alzheimerova choroba

AD je neurodegenerativní onemocnění charakteristické progresivním poklesem kognitivních funkcí a to zejména paměti, pozornosti a orientačních schopností. K dalším příznakům patří ztráta sociálních dovedností s emocionální labilitou projevující se agitovaností, úzkostí, depresí nebo agresivitou, je také narušen cyklus spánků-bdění.

Symptomy AD jsou odrazem postupné ztráty cholinergní transmise, a to nejen zprostředkované Ach ale i uvažovanými modulátory tohoto přenosu. Patrné je to především v cholinergní dráze směřující z předního mozku (Meynertovo bazální jádro) do mozkové kůry a hippocampu. V mozku pacientů s AD dochází ke změně denzity nAChR na rozdíl od nAChR v mozku běžně stárnoucích lidí. Imunochemické analýzy prokázaly, že předně dochází ke ztrátě $\alpha 4$ podjednotek nAChR. Menší ztráty byly objeveny u $\alpha 3$ a $\alpha 7$ podjednotek nAChR. Většina ztracených nAChR v případě AD se týká $\alpha 4\beta 2$ podtypu. U AD je porušena především presynaptická část spojů mezi neurony (Paterson a Nordberg, 2000, Cour et al., 2001, Benešová, 2003, Lincová a kol, Základní a aplikovaná farmakologie, 2007, str. 144).

Parkinsonova choroba (PD)

PD je neurodegenerativní onemocnění spojeno s úbytkem dopaminergních neuronů v substantia nigra, které prostřednictvím produkce dopaminu regulují činnost v bazálních gangliích (nucleus caudatus, putamen, pallidum). Ztráta dopaminergních neuronů je patrná i u dopaminergních zakončení v corpus striatum.

V mozcích pacientů s PD byl objeven pokles i nAChR v oblasti substantia nigra. Předpokládá se, že v této oblasti probíhá současně s úbytkem dopaminergních neuronů. Stejně tak jako u pacientů s AD poukázaly epidemiologické studie na nižší výskyt PD u kuřáků než u nekuřáků. Důvodem je zřejmě zvýšené uvolňování dopaminu ve striatu způsobené aktivací nAChR, které se nacházejí na nigrostriálních a mezolimbických dopaminergních neuronech. Jedná se předně o podtypy $\alpha 4\beta 2$ a $\alpha 3\beta 2$ nAChR.

Hlavní příznaky parkinsonismu jsou způsobeny i změnou aktivity v dalších neurotransmiterových systémech (Ach, noradrenalin, serotonin, GABA). Tyto změny v neurotransmiterových systémech se odráží v průběhu postupujícího onemocnění (Paterson a Nordberg, 2000, Benešová, 2003, Lincová, Základní a aplikovaná farmakologie, 2007, str. 146).

Schizofrenie

Na určitou souvislost mezi schizofrenií a nAChR poukázala vysoká prevalence kuřáků mezi pacienty trpícími tímto onemocněním. U těchto pacientů byly zjištěny i vysoké hladiny nAChR protilátek, které mohou být možnou příčinou snížení počtu nAChR v oblasti hippocampu. Při srovnání kontrolní skupiny s pacienty se schizofrenií

se ukázalo, že u schizofreniků je značně redukován protein podjednotky $\alpha 7$ ve frontální mozkové kůře, což by mohlo naznačovat jistou spojitost mezi nAChR a schizofrenií (Gotti et al., 1997, Paterson a Nordberg, 2000).

Deprese

Byla vyslovena hypotéza, která vysvětluje příčinu deprese jako nerovnovážný stav mezi cholinergním a adrenergním nervovým systémem, kdy dochází pravděpodobně k zvýšené aktivaci nAChR. Vše se zřejmě odvíjí od dysfunkce hypotalamo-hypofyzární osy, kterou zřejmě podněcuje nerovnovážná aktivace nAChR, majících regulační vliv na tento systém. Na možnou spojitost mezi příčinou deprese a nAChR poukázaly studie s antidepresivy (tricyklická antidepresiva, novější serotoninové inhibitory typu SSRI), když se objevila jejich schopnost inhibovat nAChR. Doposud není však role nAChR v souvislosti s depresí prokazatelně vyřešena (Paterson a Nordberg, 2000, Benešová, 2003).

Kuřáctví, závislost

Chronický přívod nikotinu aktivuje nAChR lokalizovaných na dopaminergních neuronech nebo na glutamatergních aferentních vláknech dopaminergních neuronů, což vyvolává uvolňování dopaminu v oblastech tzv. „centrech odměny“ (nukleus accumbens, ventrální tegmentum). Zastavení tohoto přívodu vyvolá abstinenci příznaky. Úspěšnost při léčbě závislosti vykazuje kombinace substituční terapie společně a užitím antagonisty nAChR (bupropionu) (Benešová, 2003).

2.4 Galantamin

Úvod

Gal je terciální alkaloid fenantrenové řady. Původně byl izolován v 60. letech z cibulí sněženky *Gallanthus woronovi* bulharskými vědci Proskurninem a Yakovlevem. Později se získával z rostlin čeledi Amaryllidaceae (amarylkovité), nyní (od roku 2000) je možno jej připravit synteticky.

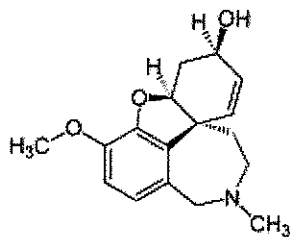
Ve východní Evropě se původně využíval pro svůj antikurarový efekt k antagonizování neuromuskulární blokády navozené periferními myorelaxancii. Pod označením Nivalin proto našel využití v anesteziologii a v neurologii (léčba paréz a paralýz různého původu, např. u myasthenia gravis).

Po provedení různých klinických studií byl Gal zaregistrován v roce 2000 v řadě evropských zemí pro léčbu lehké až středně těžké Alzheimerovy demence (AD). Rok na to byl farmaceutickou společností Janssen-Cilag uveden i na český trh pod firemním názvem Reminyl (Švestka, 2001, Krejčová a Ševelová, 2003, Cibičková a Palička, 2005).

Struktura

Gal se svou strukturou podobá kodeinu. Podléhá stejné biotransformaci, avšak postrádá jeho analgetické vlastnosti. Je rezistentní vůči hydrolýze. V molekule Gal jsou důležitá 4 vazebná místa. Konkrétně se jedná o hydroxylovou skupinu cyklohexanového kruhu, cyklohexanový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina (Krejčová a Ševelová, 2003).

Obr. č. 6: Struktura Gal



Modifikace molekulové struktury (analoga)

Ukázalo se, že analoga Gal by mohla být účinnější v terapii AD. V porovnání se samotným Gal jsou jeho analoga několikanásobně selektivnější k AchE než vůči butylcholinesteráze (BuChE). Příkladem mohou být 6-O-acetylmethyl-6-O-demethylgalantamin hydrochlorid (P11012) a 6-O-6-O[(adamantan-1-yl)-karbonyl]galantamin hydrochlorid (P11149). Jedná se o proléčiva, která se rychle hydrolyzují na 6-O-demethylgalantamin (6-DMG). Jejich nevýhodou je však obtížnější průchod přes hematoencefalickou bariéru, důvodem je vyšší polarita 6-DMG ve srovnání s jeho mateřskou látkou. Polarita vůbec je limitujícím prvkem použití derivátů

Gal, jako např. ukázala modifikace molekuly v místech methoxyskupiny či terciární aminoskupiny, kdy vznikla kvartérní amoniová sůl. Nižší polaritu vykazoval pouze ester Gal., jehož kladem je také nižší toxicita než u samotného Gal (Krejčová a Ševelová, 2003, Cibičková a Palička, 2005).

Farmakodynamika

Gal je obecně charakterizován jako kognitivum s duálním účinkem. Řadí se k reverzibilním inhibitorům AchE, které jsou dosud neúčinnějšími léčivy pro terapii lehké až středně těžké AD a DLB. U Gal však byla navíc v 90. letech objevena vlastnost alostericky modulovat nikotinové receptory, což jej činí odlišnějším vůči ostatním klinicky využívaným

inhibitorům AchE (Švestka, 2001, Jiráček, 2004, Cibičková a Palička, 2005).

Gal se jako inhibitor AchE váže na spodní část kavity AchE a interaguje s acyl-vazebnou kapsou prostřednictvím své methoxyskupiny a současně s cholin-vazebným místem prostřednictvím cyklohexanového kruhu (Krejčová a Ševelová, 2003).

Gal funguje jako reverzibilní a kompetitivní inhibitor AchE, což znamená, že soutěží s Ach o vazbu na tento enzym. U kompetitivní inhibice nezávisí její vlastní úroveň ani tak na absolutní koncentraci inhibitoru jako spíše na poměru koncentrace inhibitoru a substrátu (Ach). Z toho vyplývá, že účinnost inhibitoru se zvyšuje při nižší koncentraci endogenního substrátu, ke které dochází právě na postsynaptické membráně nemocných. AchE je na postsynaptické membráně poměrně silně inhibována a díky tomu je biodegradace Ach slabší a jeho koncentrace v synaptické štěrbině se zvyšuje. Zlepšuje se tím synaptický přenos v centrálních i periferních cholinergních synapsích. Mimo inhibice AchE reverzibilními inhibitory AchE dochází i k inhibici BuchE. BuchE je běžně ve zdravém mozku minoritní složkou, avšak u AD dochází k jejímu zvýšenému výskytu. Samotný Gal je 50x-60x silnějším inhibitorem AchE než BuchE. V lidských erythrocytech dochází díky Gal k 10x vyšší inhibici AchE než v CNS (Švestka, 2001, Krejčová a Ševelová, 2003, Cibičková a Palička, 2005, Jiráček, 2007).

Vztah mezi stupněm inhibice AchE a klinickým účinkem Gal vyjadřuje křivka ve tvaru obráceného „U“, jelikož excesivní množství Ach snižuje aktivitu

cholinacetyltransferázy zajišťující syntézu Ach z cholinu a acetyl-koenzymu A (Švestka J., 2001, Jiráček, 2007).

Galantamin jako alosterický modulátor

Jak již bylo řečeno, Gal působí navíc jako alosterický modulátor nAChR v CNS, gangliích a svalech. Při alosterické modulaci dochází k vazbě modulátoru na jiné vazebné místo než to, které je určeno pro navázání Ach a častým výsledkem bývá senzitivace příslušných receptorů vůči agonistovi. Pouze současný kontakt exogenního ligandu (Gal) a Ach s receptorem vede k jeho senzitivaci, u nAChR tedy k otevření iontového kanálu, nikoliv jen tedy pouhá přítomnost exogenního ligandu (Gal). Experimentálně bylo dokázáno, že vazebnost Gal je vyšší vůči $\alpha 4$ a $\alpha 7$ podjednotkám než k $\alpha 3$ podjednotkám nAChR (Švestka, 2001, Cibičková a Palička, 2005, Krejčová a Ševelová, 2003).

Gal moduluje nAChR a způsobuje uvolňování Ach z presynaptického elementu, vytváří tak podmínky pro aktivaci postsynaptických elementů a upravuje tak cholinergní přenos.

Stimulací nAChR nedochází jen k uvolnění Ach do synaptické štěrbině, ale patrně i dalších neurotransmiterů jako dopaminu, serotoninu (snižování emočních poruch, zejména deprese). Gal dlouhodobě zvyšuje syntézu NGF (nervový růstový faktor), krátkodobě pak tvorbu přirozeně se vyskytujícího mozkového neurotrofického faktoru (BDNF) (Švestka, 2001, Benešová, 2003).

Působením Gal na nAChR (přednostně na $\alpha 2\beta 4$ a $\alpha 7$ podtypy) se uvolňuje solubilní non-amyloidní prekurzor β -amyloidu. Tento prekurzor ochraňuje neurony ($\alpha 2\beta 4$ a $\alpha 7$ podtypy nAChR) před neurotoxicitou nerozpustného β -amyloidu. Obecně se soudí, že jak AchE, tak BuChE akcelerují v mozku tvorbu depozit β -amyloidu, o vlastních mechanismech tohoto ovlivnění není známo nic bližšího (Švestka, 2001).

Na základě toho se vyvozuje pravděpodobnost, že Gal omezuje tvorbu amyloidních plaků a to díky již zmíněnému dvojímu mechanismu účinku.

Samotný modulační účinek Gal není závislý na antiAChE aktivitě, což ukázal stejný potencující efekt Gal i u buněk neobsahujících AchE.

Senzitizací nAChR dochází k up-regulaci a následné genomické expresi proteinů, což vede k navýšení množství funkčních nAChR. Dlouhodobé potencionování nAChR a zvýšení jejich density může mít pozitivní efekt na kognitivní funkce u AD (Švestka, 2001, Krejčová a Ševelová, 2003, Cibičková a Palička, 2005).

Další účinky Gal

U Gal byly vyzkoušeny i antiapoptotické účinky, které chrání buňku před zánikem vyvolaným β -amyloidem. Tento efekt je přičítán zvýšené expresi antiapoptotického proteinu Bcl-2 v důsledku mírného zvýšení cytosolového Ca^{2+} .

Gal má též neuroprotektivní charakter (Cibičková a Palička, 2005).

Farmakokinetika

Farmakokinetika Gal je prvního řádu a je lineární v dávkovacím rozmezí 5-35mg.

Absorbce Gal probíhá po p. o. podání rychle a téměř nezávisle na lékové formě (tableta, obduková tableta, roztok). Čas dosažení maximální plazmatické koncentrace se uvádí kolem 0,5-2h po požití (t_{max}). Rychlost absorpce je ovlivněna požitým jídlem. Žaludeční náplň způsobuje pomalejší dosažení maximální koncentrace Gal v plazmě (c_{max}), ale samotný objem absorpce však ovlivněn není.

Distribuce Gal z centrálního kompartmentu do tkání a orgánů se děje pasivní difuzí slabé báze s pKa 8,32. Vazba na plazmatické bílkoviny je nízká (18%). Gal se kumuluje intracelulárně díky nepatrnému rozdílu v hladinách pH uvnitř buněk, erytrocytech a v plazmě, přičemž jeho plazmatická hladina je zanedbatelně vyšší. Prochází dobře hematoencefalickou bariérou a jeho koncentrace je v CNS trojnásobně vyšší než v plazmě. Biologická dostupnost po užití tablet byla téměř 100% a po podání roztoku 83%. Vysoká biologická dostupnost vypovídá i o nízkém „first-pass“ efektu.

Biotransformace Gal probíhá v játrech. V cytosolu jaterních buněk dochází buď ke glukuronidizaci, N-oxidaci, O-demethylizaci, N-demethylizaci nebo epimerizaci, za účasti cytochromu P450. Na biotransformaci se podílí izoenzymy CYP2D6 a CYP3A4. Ze vzniklých metabolitů si pouze nor-galantamin zachovává částečnou biologickou aktivitu mateřské látky, ostatní metabolity, jako např. o-demethylgalantamin,

epigalantamin či galantaminon, jsou inaktivní. Při středně těžké dysfunkci jater se biotransformace Gal zpomaluje přibližně o 30-60%.

Eliminace Gal končí vyloučením močí, z toho 18-22% odchází v nezměněné podobě. Klesající clearance kreatininu způsobuje pokles eliminace, terapeutické dávkování je poté třeba upravovat. Hodnota biologického poločasu se pohybuje mezi 5 až 6 hodinami (Švestka, 2001, Krejčová a Ševelová, 2003, Pidrman et al., 2003, Cibičková a Palička, 2005).

Tab. č. 7: Vybrané farmakokinetické parametry Gal (upraveno podle Cibičková a Palička, 2005)

T max (h)	Vazba na plazmatické bílkoviny (%)	Biologická dostupnost	Biologický poločas	Eliminace močí
0,5-2h	18%	85-100%	5-7h	97%

Indikace

Gal zlepšuje narušené kognitivní funkce, dále i denní a sociální aktivity (behaviorální a psychologické příznaky) AD. V dnešní době se inhibitory AchE řadí ke zlatým standardům léčby lehké až středně těžké formy AD a Gal náleží – vedle donepezilu a rivastigminu - do této skupiny. Klinické studie prokázaly pozitivní výsledky i u jiných typů demencí, a to například u demence komplikující Parkinsonovu nemoc, DLB a také u vaskulárních demencí. (Švestka, 2001, Jiráček, 2007, Pidrman et al, 2003)

Kontraindikace

Obvyklé kontraindikace zahrnují známou přecitlivělost na přípravek. Zároveň není doporučeno užívat Gal pacienty s gastrointestinální nebo močovou obstrukcí nebo po chirurgickém zákroku v těchto oblastech. Je třeba dbát opatrnosti u pacientů trpících bronchiálním astmatem, obstrukčními plicními onemocněními, gastroduodenálními vředy a epilepsií. Se zvýšeným rizikem je nutno počítat i při poruchách síňokomorového převodu, zejména spojených s bradykardií (Švestka J., 2001, SPC LP Reminyl).

Dávkování

Podávání Gal v klinické praxi probíhá ve dvou fázích. V počáteční fázi, neboli „titrační“ (také akutní), se dosáhne postupným zvyšováním dávky požadovaného klinického účinku. Následnou fází podávání Gal je dlouhodobá „udržovací“ fáze. (Pidrman et al., 2003, Brunovský, 2006)

Gal se používá p. o. ve formě klasických tablet s okamžitým uvolňováním a vzhledem k délce jeho biologickému poločasů se doporučuje jeho podávání ve 2 denních dávkách. Od roku 2006 je k dispozici i tableta s prolongovaným účinkem, což umožňuje podávat 1x denně (Pidrman, 2007).

Tab. č. 8: Průběh titrační fáze při podávání Gal (upraveno dle Jiráka, 2007)

	1. měsíc	2. měsíc	3. měsíc
Tbl s okamžitým uvolňováním	2x denně 4mg	2x denně 8mg	2x denně 12mg
Tbl s prolongovaným účinkem	1x denně 8mg	1x denně 16mg	1x denně 24mg

Legenda k tab. č. 8: Doporučené schéma podávání Gal. Od 3. měsíce se podává plná konečná dávka 24mg, která se dále nemění. (Jiráka, 2007)

Nežádoucí účinky

Gal se podobně jako ostatní léčiva této skupiny vyznačuje nežádoucími účinky cholinomimetického charakteru. Existuje však i rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků daný délkou podávání a dávkováním Gal. V počáteční fázi užívání Gal jsou nežádoucí účinky způsobeny zvýšenou centrální cholinergní aktivitou v oblasti area postrema hypotalamu. Nejčastěji a nejvýrazněji se objevují gastrointestinální obtíže (nauzea, vomitus, průjem, zvracení, flatulence, nechutenství, bolesti břicha), které jsou pouze přechodným jevem v úvodu terapie. Nutností v tomto období je pomalé navyšování dávek, se zajištěním dostatečného přívodu tekutin a podle potřeby i s podáním vhodného antiemetika.

U pacientů se mohou vyskytnout poruchy spánku, neklid nebo většinou lehčí bolesti hlavy. Delší nechutenství bývá spojeno s úbytkem váhy.

Gal se vyznačuje vagotonickým působením a proto může vyvolat bradykardii a bronchospasmus.

Podstata výskytu nežádoucích účinků spočívá v působení na centrální a periferní cholinergní mechanismy, kdy dochází k blokaci AchE a především v inhibici jejich jednotlivých izoform. Tyto izoformy G1, G4 a G2 AchE se liší vzájemně chemickou stavbou a topografickým rozmístěním v CNS či periférii. V lidském mozku se vyskytují izoformy G1 a G4. G1 izoforma se nachází preferenčně v oblastech mozkové kůry, hipokampu a amygdale. Z pohledu terapeutického se jedná o nejvhodnější cíl efektu Gal, jelikož je lokalizovaná právě v oblastech nejvíce zasažených AD. Nevýhodou je ale vyšší četnost gastrointestinálních nežádoucích účinků. Avšak s ohledem na dlouhodobou léčbu je tato inhibice izoformy G1 nejbezpečnější. Izoforma G4 je nejvíce zastoupena v mozkovém kmeni a nucleus caudatus. Následkem této blokady jsou kardiiovaskulární nežádoucí účinky a mohou se objevovat i extrapyramidové efekty. Periferně je uložena izoforma G2.

Gal přednostně inhibuje G2 a G4 izoformu. (Švestka, 2001, Pidrman et al., 2003, Krejčová a Ševelová, 2003, Jiráček, 2004, Cibičková a Palička, 2005, Brunovský, 2006)

Tab. č. 9: Izoformy AchE, lokalizace a předpokládaný význam (upraveno podle Pidrmána et al., 2003)

Izoformy AchE	lokalizace	Výsledný efekt
G1	Kortex	Terapeutické účinky
	Hippokampus	Gastrointestinální obtíže
	amygdala	
G4	Medula oblongata	Kardiiovaskulární NÚ
	Mozkový kmen	spánek
	Nucleus caudatus	Extrapyramidová symptomatologie
G2	periferie	Muskulární NÚ

Interakce

Jako cholinomimetikum by neměl být Gal podáván s jinými cholinomimetiky a s léky, které zpomalují srdeční frekvenci (beta blokátory). Gal stejně jako ostatní inhibitory AchE zvyšuje produkci žaludeční sekrece, nedoporučuje se proto jeho podáním společně s nesteroidními antiflogistiky a kortikoidy.

Vzhledem k hlavním metabolickým cestám probíhajících v játrech za účasti cytochromu P450, přesněji izoenzymů CYP2D6 a CYP3A4, je třeba dbát opatrnosti při kombinaci s léčivy, které mohou indukovat či inhibovat tyto izoenzymy.

Induktory cytochromů snižují hladinu Gal v plazmě, riziko vyvstává při vysazení induktoru, kdy dochází k náhlému nárůstu plazmatických hladin, které může vést k projevení nežádoucích účinků až k toxicitě. Při současném podávání Gal s inhibitory může být nutné snížit jeho dávku. (Švestka, 2001, Cibičková a Palička, 2005, Pidrman et al., 2003, Brunovský, 2006)

Tab. č. 10: Látky rizikové pro výskyt farmakokinetických interakcí při léčbě Gal
(upraveno podle Pidrmana et al, 2003)

Inhibitory CYP450		Induktory CYP450
Izoenzymu 2D6	Izoenzymu 3A4	Barbituráty, dexamethazon, fenytoin, karbamazepin, rifampicin
Amitriptylin, fluoxetin, paroxetin, amiodaron, cimetidin, kodein, metoprolol, propafenon	Amitriptylin, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, amiodaron, cimetidin, diltiazem, erytromycin, grapefruitová šťáva, chinidin, itraconazol, ketokonazol, klaritromycin, kodein, metoprolol, metronidazol, propafenon, verapamil	

Toxicita

Gal je pouze mírně toxický. P.o. LD₅₀ pro potkana je 83,6mg/kg. (Krejčová a Ševelová, 2003)

Intoxikace Gal se podobně jako u jiných cholinomimetik projeví nauzeou, zvracením, břišními spazmy. Může se vyskytnout průjem, slinění, pocení, tracheální hypersekrece, bronchospasmus, svalová slabost, epileptický záchvat, respirační útlum, hypotenze či bradykardie (Švestka, 2001).

2.5. Stanovení aktivity acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy

Princip metody

Existuje mnoho metodik jež byly pro stanovení aktivity cholinesteráz vyvinuty, mezi nejčastěji používané jsou řazeny metody elektrometrické, titrační, kolorimetrické, měření změny pH s použitím indikátoru, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické a enzymové. Výše uvedené metody však nemohou být zavedeny do rutinní praxe z mnoha důvodů, zvláště pak náročné úpravy vzorku, dlouhé doby měření nebo nedostatečné specifické enzymu k substrátu.

Velmi citlivá a pro běžné využití vhodná metoda byla popsána Ellmanem. Tato kolorimetrická metoda je dnes zavedena do praxe k hodnocení zdravotního stavu lidí, kteří běžně přichází do styku s organofosforovými inhibitory.

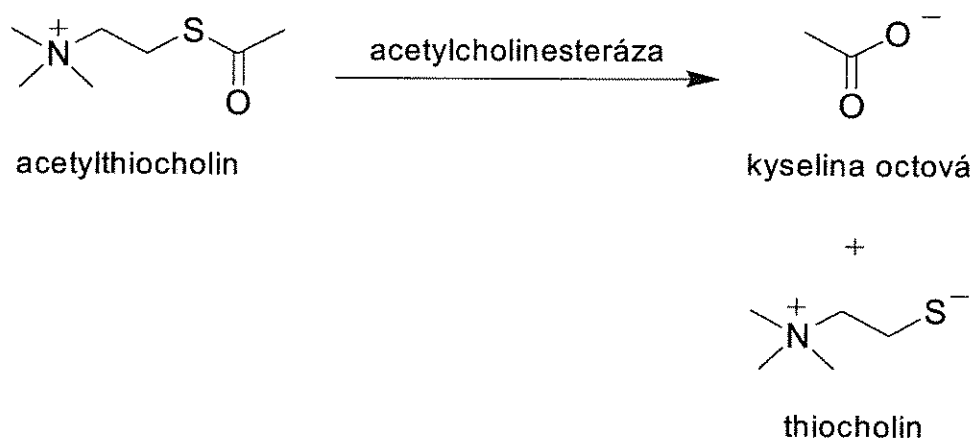
Princip této metody je založen na hydrolyze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BChE). Po enzymové hydrolyze, je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin obsahující ve své molekule SH-skupinu je detekován pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzové kyseliny (DTNB) tím, že po reakci s thiocholinem dochází k uvolnění 5-merkaptu-2-nitrobenového aniontu (TNB⁻). Tento anion je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm.

Ačkoliv je Ellmanova metoda rychlá, jednoduchá a levná, má také své nevýhody. Velmi zásadní při měření aktivit cholinesteráz v krvi je interference s hemoglobinem. Absorpční maximum barevného indikátoru TNB⁻ (5-merkaptu-2-nitrobenzoátového aniontu) 412 nm. Při této vlnové délce však absorbuje záření také v krvi přítomný hemoglobin. Pokud chceme vyloučit takto vzniklou chybu, je potřeba krevní vzorek hodně zředit. Dalším problémem je pak reakce Ellmanova činidla (DTNB) s pomalu reagujícími sulfhydrylovými skupinami v roztoku, jež mohou ovlivnit výsledky měření.

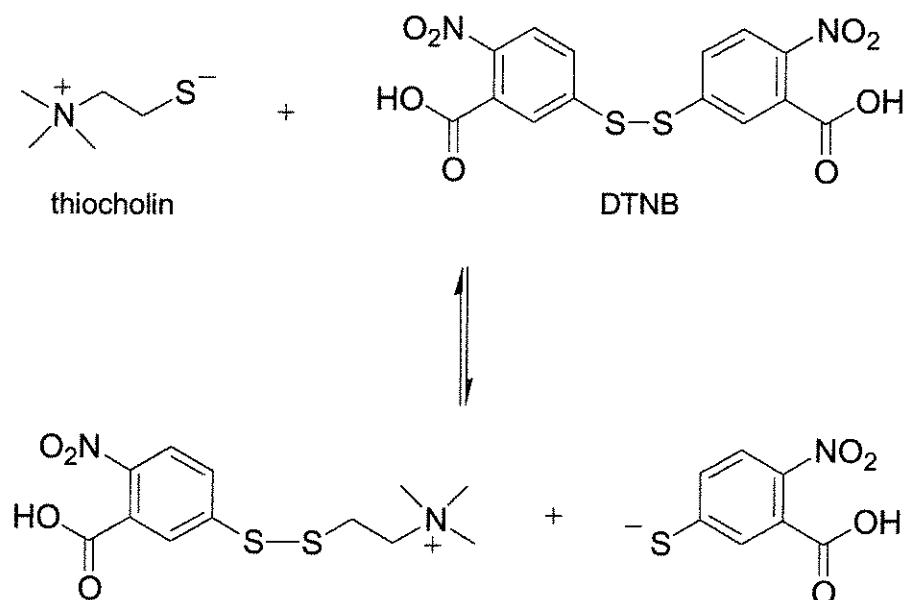
Tyto nedostatky vedly k mnoha modifikacím původní Ellmanovy metody (in press Chemické listy).

Reakční schéma stanovení aktivity acetylcholinesterázy:

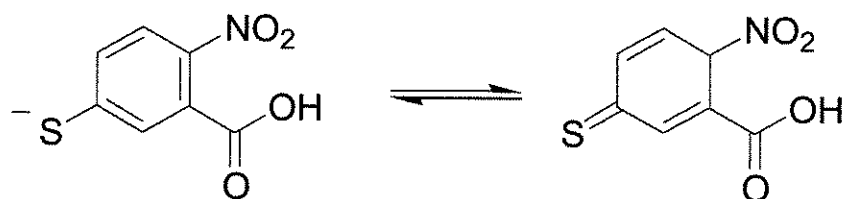
Obr. č. 7: Štěpení acetylthiocholinu na kyselinu octovou a thiocholinu



Obr. č. 8: Štěpení DTNB a vznik chromoforu



Obr. č. 9: Přechod chromoforu na formu, která je fotometrována



3 Experimentální část

3.1 Uspořádání pokusu

K pokusům bylo použito celkem 24 samců laboratorního potkana kmene *Wistar albino*, konvenčního chovu, krmených peletovanou standardní Larsenovou dietou a s přísunem vody *ad libitum*. Hmotnostní rozpětí zvířat se pohybovalo v rozmezí 195-230 gramů. Zvířata byla rozdělena do 1 kontrolní a 3 pokusných skupin pro jednotlivé dávky galantaminu. V každé skupině bylo po 6 zvířatech.

Všechny experimenty byly schváleny společnou etickou komisí LF UK a FVZ UNOB.

1. kontrolní skupině byl i.m. podán pouze fyziologický roztok,
1. pokusné skupině byl podán galantamin v dávce 2,5 mg/kg i.m.,
2. pokusné skupině galantamin v dávce 5,0 mg/kg i.m.,
3. pokusné skupině galantamin v dávce 10,0 mg/kg.

3.2 Odběr vzorků mozku

Zvířata byla usmrcena dekapitací 30 minut po podání testované látky. Následovalo vyjmutí mozku a jeho bezprostřední zmrazení při nízké teplotě (-30 °C) pro pozdější odběr částí mozku (čelní korová oblast, hipokampus, septum, bazální ganglia a hypofýza), jaterní tkáň a krev.

3.3 Použité chemikálie a roztoky

Roztoky pro biochemické stanovení

0,1M Tris pufr – zásobní roztok pro přípravu Tris pufru byl připraven rozpuštěním 24,2g 1,1,1-tris-(dihydroxymetyl)-aminometanu ve 1000ml destilované vody, z tohoto roztoku bylo odebráno 250 ml a doplněno na objem 950 ml destilovanou vodou, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) a doplněna destilovaná voda na konečný objem 1000 ml.

Zásobní roztok Tritonu X-100 byl připraven tak, že k 1000g destilované vody bylo přidáno 0,12 g Tritonu X-100.

0,2M Tris pufr – k 100ml 0,1M Tris pufru bylo přidáno 370 ml zásobního roztoku Tritonu X-100, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 přidáním příslušného množství zásobního roztoku pro přípravu Tris pufru, poté byl doplněn zásobní roztok

Tritonu X-100 na konečný objem 500 ml. Tímto postupem byl získán 0,02M Tris pufr, který je zároveň přibližně 0,01% roztokem Tritonu X-100.

Zásobní roztok DTNB byl připraven tak, že 0,1 g DTNB bylo rozpuštěno za stálého míchání v 100 ml 0,1M Tris pufru o pH 7,6. Tento roztok lze ke stanovení používat jen 3 dny, pokud je uchováván v lednici při teplotě +4 °C a je chráněn před světlem. V době potřeby je připravena směs zásobního roztoku DTNB a 0,1M Tris pufru v poměru 135 : 40 (DTNB : Tris pufr). Takto připravený roztok může být používán pouze v den přípravy, během stanovení je třeba jej chránit před slunečními paprsky (jejich vlivem dochází ke štěpení DTNB a vzniku barevného TNB⁻, což zanáší chybu do následného spektrofotometrického stanovení).

Substráty

Pro stanovení aktivity AChE je používán specifický substrát, acetylthiocholin jodid (ATCh). Zásobní roztok ATCh je připraven rozpuštěním 0,029 g ATCh v 10 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok je uchováván v dávkách 1 ml při teplotě -12 °C. V době potřeby je obsah jedné mikrozkušavky roztaven a zásobní roztok je zředěn v poměru 1 : 10 (roztok ATCh : destilovaná voda).

Pro stanovení aktivity BuChE je jako substrát používán butyrylthiocholin jodid (BTCh). Zásobní roztok tohoto substrátu je připraven rozpuštěním 0,032 g BTCh v 10 ml destilované vody. Zásobní roztok je skladován v dávkách po 1 ml při teplotě -12 °C. V době potřeby je připraven roztok zředěním v poměru 1 : 10 (roztok BTCh : destilovaná voda).

Kalibrační roztok

Biochemické stanovení aktivit cholinesteráz je kalibrováno pomocí cystein chloridu. Zásobní roztok cystein je připraven rozpuštěním přesného množství této látky (0,03152 g) v 200 ml destilované vody. Zásobní roztok je rozdělen na dávky 1 ml do mikrozkušavek a je skladován při teplotě -12 °C až do doby, kdy je použit ke kalibraci.

3.4 Použité přístroje

Pro stanovení absorbance byl použit Spektrofotometr Helios Alpha (Electron Corporation, Oxford, Velká Británie).

3.5 Pracovní postup

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

Kalibrace

Pro vlastní kalibraci je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1 : 1 (koncentrovanější roztok cysteinu : destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž základní roztok je 0,2 μM.

Kalibrační řada:

$$0,2 \mu\text{M} \rightarrow 0,1 \mu\text{M} \rightarrow 0,05 \mu\text{M} \rightarrow 0,025 \mu\text{M}$$

Pro kalibraci se do kyvety místo homogenátu vybrané mozkové tkáně pipetuje stejný objem (0,1 ml) roztok cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DTNB (1,7 ml) v pufru a reakce se odstartuje přidáním 0,2 ml příslušného substrátu (ATCh, BTCh). Absorbance vzorku se měří při 412 nm. Kalibrace se měří proti slepému vzorku, v němž je destilovaná voda.

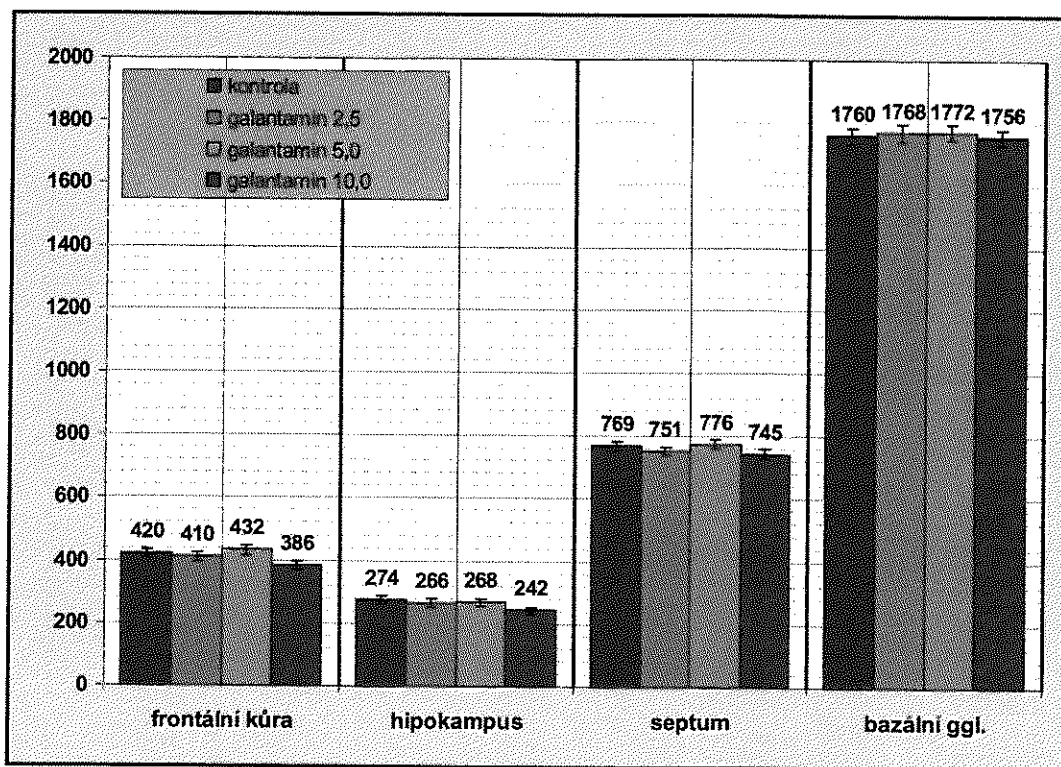
4 Výsledky a diskuze

4.1 Výsledky

Tab. č. 11: Hodnoty aktivity AChE (nmol/min/100 mg tkáně)

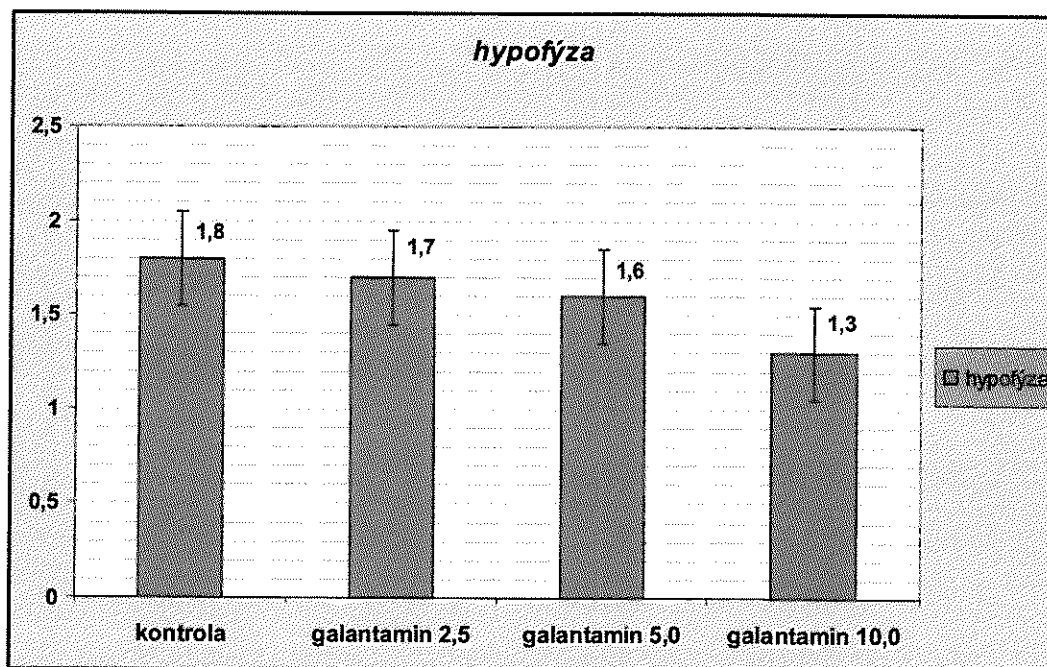
Skupina	frontální kůra	hipokampus	septum	bazální ggl.	hypofyza
<i>kontrola</i>	420±15	274±13	769±15	1760±25	1,8±0,25
<i>galantamin 2,5</i>	410±14	266±12	751±14	1768±28	1,7±0,25
<i>galantamin 5,0</i>	432±16	268±11	776±15	1772±26	1,6±0,25
<i>galantamin 10,0</i>	386±14 *	242±10 *	745±15*	1756±24	1,3±0,25*

Graf č. 1: Hodnoty aktivity AchE ve vybraných mozkových strukturách (frontální kůra, hipokampus, septum, bazální ganglia)



Výsledky stanovení aktivit AchE v mozkových strukturách (frontální kůra, hippocampus, septum, bazální ganglia) vypovídají o schopnosti Gal inhibovat tento enzym v mozku, kdy je nutný průnik skrze hematoencefalickou bariéru.

Graf č. 2: Hodnocení aktivity AchE v hypofýze



Výsledky stanovení aktivity AchE v hypofýze napovídají, že i když není nutný průnik Gal přes hematoencefalickou bariéru v mozku, dochází ke srovnatelnému efektu jako v testovaných mozkových strukturách.

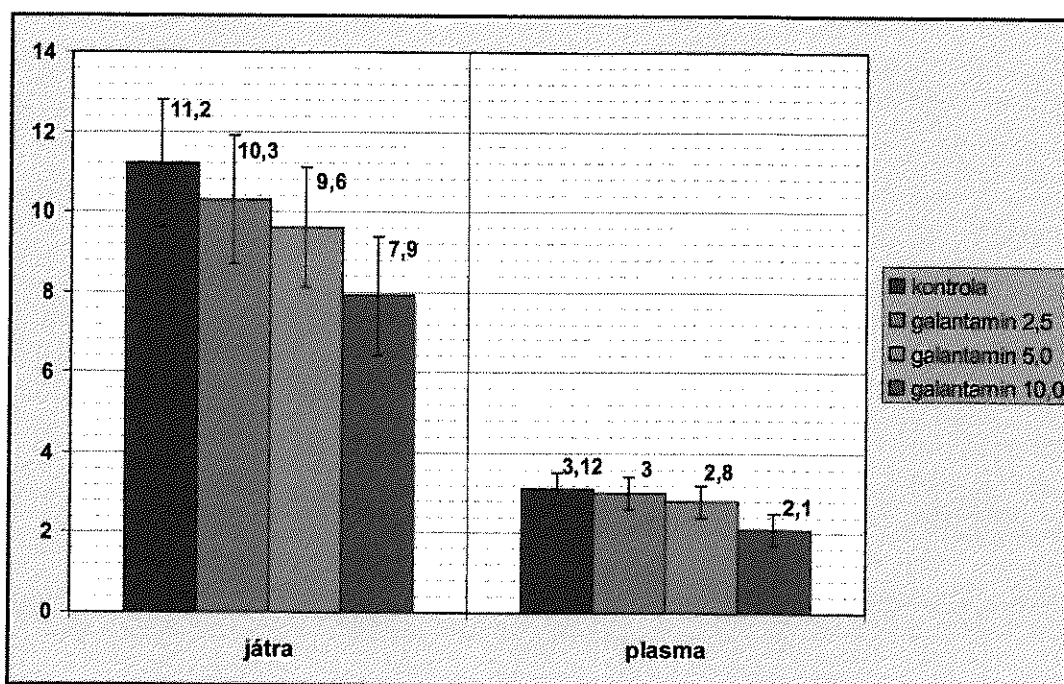
Výsledky poukazují na to, že ani v jedné z mozkových struktur nedochází k výrazné inhibici AchE prostřednictvím Gal.

Tab. č. 12: Hodnoty aktivity BuChE (nmol/min/100 mg tkáně)

Skupina	<i>játra</i>	<i>plasma</i>
<i>kontrola</i>	11,2±1,6	3,12±0,4
<i>galantamin 2,5</i>	10,3±1,6	3,0±0,4
<i>galantamin 5,0</i>	9,6±1,5	2,8±0,4
<i>galantamin 10,0</i>	7,9±1,5*	2,1±0,4*

* Signifikantní na 5% hladině významnosti

Graf č. 3: Hodnocení aktivity BuChE v jaterní tkáni a krevní plazmě



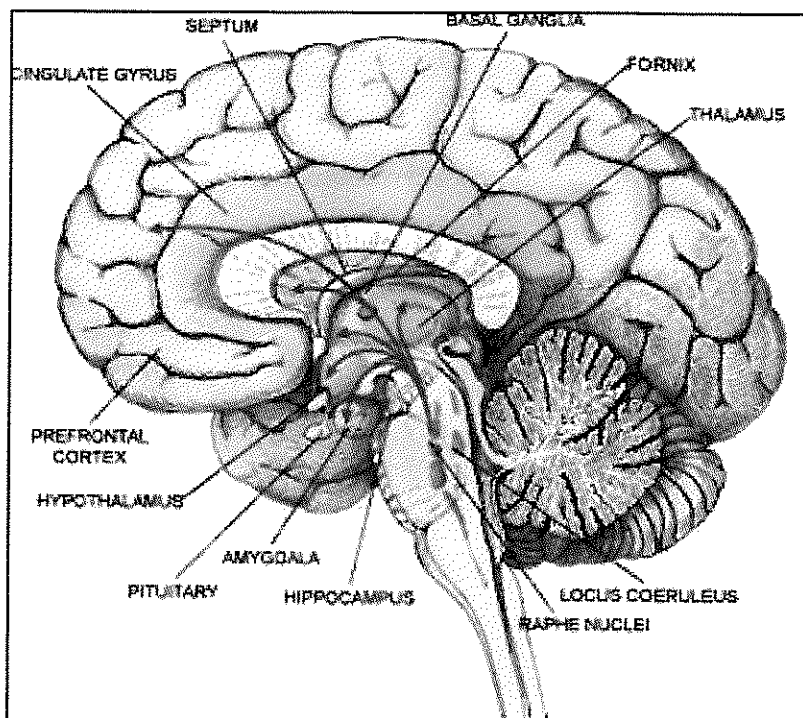
Výsledky stanovení aktivity BuchE v játrech a plazmě jsou ukazatelem periferního efektu Gal. Se zvyšující se dávkou Gal dochází tedy i na periférii k vyšší inhibici AchE.

4.2 Diskuze

Pro stanovení aktivity AchE bylo vyvinuto mnoho metodik. Ke stanovení AchE byla v tomto experimentu zvolena běžně v praxi využívaná Ellmanova metoda pro svou jednoduchost, dostatečně velkou citlivost a možnost poměrně rychle získat výsledek. Substrátem v této kolorimetrické metodě je thiocholin obsahující SH-skupinu. Po enzymové hydrolyze AchE je detekován pomocí DTNB, která se naváže na SH-skupinu thiocholinu a uvolněný anion (TNB⁻) z této reakce je fotometrován při 412 nm.

Mozkové struktury laboratorního potkana vybrané k tomuto experimentu náležejí k cholinergnímu systému. Jedná se o struktury sehrávající roli při ukládání, uchovávání a vybavování informací (při mechanismech učení a paměti, viz rovněž obr. 10). Při poškození frontální kůry byla pozorována - mimo jiné - zhoršená fixace a vybavování paměťových stop, dále také byly u člověka pozorovány poruchy chování ve společenském prostředí a změny v intelektuálním chování. Zničením hippocampu je znemožněna konsolidace vjemů (přenos informace z krátkodobé paměti do dlouhodobé paměti). Septum je přepojovací stanicí mezi hippocampální formací a diencephalem (thalamem a hypothalamem). Při jeho poškození byly též zaznamenány poruchy učení a paměti. Bazální ganglia se podílí na plánování a programování pohybů, kdy se abstraktní myšlení mění na volní pohyby. Mají úlohu v některých kognitivních dějích, která je zčásti v působnosti nucleus caudatus. Hypofýza byla zvolena, z důvodu, že postrádá ochranu hematoencefalické bariéry (HEB). Výsledky inhibice však ukázaly, že samotná HEB nehraje podstatnější roli (Ganong, 2005).

Obr. č. 10: Průřez mozkem s vyznačenými mozkovými strukturami důležitými pro mechanismy učení a paměti užitými i v experimentální části této práce (upraveno dle internetového zdroje www.memorylossonline.com)



Periferní účinek Gal byl stanovován v **jaterní tkáni** a krevní **plazmě**.

Při srovnání centrálního a periferního efektu Gal se ukázalo, že Gal je obecně slabým inhibátorem. Statisticky významný efekt se projevil až při nejvyšší použité dávce. Avšak v případě použití nejvyšší dávky lze očekávat i nežádoucí účinky periferního typu.

5 Závěry

Prostřednictvím Ellmanovy metody bylo provedeno srovnání centrálního a periferního účinku Gal. Vybrané mozkové struktury (frontální kůra, hippocampus, septum, bazální ganglia), v nichž byl prověřován centrální efekt Gal, byly zvoleny jednak jako součásti centrálního cholinergního systému, jednak pro svou důležitou roli v procesech učení a paměti. Navíc mozková kůra a hippocampus představují mozkové struktury, kde je zaznamenána degenerace v časných stádiích AD. Hypofýza byla vybrána pro snazší dostupnost Gal, jelikož postrádá ochranu hematoencefalické bariéry. Což bylo svým způsobem na základě získaných výsledků vyvráceno. V případě fungování hematoencefalické bariéry jsem předpokládala statisticky významný efekt již u nižších použitých dávek. Naopak BuChE sloužila jako ukazatel periferního efektu Gal v plazmě a jaterní tkáni.

Gal se ukázal jako obecně slabý inhibitor. Významnějšího efektu bylo dosaženo až při nejvyšší použité dávce. Periferní efekt Gal by se projevil ve výskytu nežádoucích účinků, které by se objevily v souvislosti s nejvyšší použitou dávkou.

Pokud srovnáme tedy centrální a periferní efekt Gal na základě jeho inhibice AchE a BuChE, dojdeme dle získaných výsledků k závěru, že se nikterak výrazně navzájem od sebe neliší. Navzdory tomu, že Gal je prezentován jako selektivní inhibitor AchE s 50x-60x silnějším inhibičním efektem proti BuChE, jak uvádí literatura.

6 Seznam použité literatury

- Benešová O. Nikotinové receptory acetylcholinu: Struktura, funkce a význam pro terapii v psychiatrii. *Psychiatrie* 2003, 7(1):31-37.
- Brunovský M. Účinnost a bezpečnost podávání inhibitorů cholinesteráz. *Farmakoterapie* 2006, 2(3):343-349.
- Buccafusco Jerry J. Neuronal nicotinic receptor subtypes: Defining therapeutic targets. *Molecular interventions* 2004, 4(5):285-295.
- Cibičková E., Palička V. Galantamin v terapii Alzheimerovy demence. *ČES GER REV* 2005; 3(2):29-34.
- Court J., Martin-Ruiz C., Piggott M., Spurden D., Griffiths M., Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 2001, 49:175-184.
- Ganong William F. Přehled lékařské fyziologie: Galén, Praha 2005
- Gotti C., Fornasari D. and Clementi F. Human neuronal nicotinic receptor. *Progress in Neurology* 1997, 53:199-237.
- Gotti C., Moretti M., Gaimarri A., Zanardi A., Clementi F., Zoli M. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical pharmacology* 2007, 74:1102-1111.
- Gotti C., Clementi F. Neuronal nicotinic receptor: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology* 2004, 74:363-396.
- Gotti C., Clementi F., Fornari A., Gaimarri A., Guiducci S., Manfredi I., Moretti M., Pedrazzi P., Pucci L., Zoli M. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* 2009, 78:703-711.
- Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Klin Farmakol Farm* 2004; 18: 212–214.
- Jiráček R. Aktuální pohled na léčbu Alzheimerovy nemoci. *Farmakoterapie* 2007; 3(6):593-597.
- Kalamida D., Poulas K., Avramopoulou V., Fostieri E., Lagoumintzis G., Lazaridis K., Sideri A., Zouridakis M., Tzartos S.J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity. *FEBS Journal* 2007, 274:3799–3845.
- Karlin A. Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiology* 1993, 3:299-309.

Krejčová G., Ševelová L. Současné poznatky o galantaminu, reverzibilním inhibitoru acetylcholinesterázy. *Vojenské zdravotnické listy* 2003, 72:37-44.

Langmead Ch.J., Watson J., Reavill Ch. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacology and Therapeutics* 2008, 117:232-243.

Lincová D., Farghali H. et al., Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Praha 2007

Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, Praha 2004

Paterson D., Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology* 2000, 61:75-111

Pidrman V., Bouček J., Látalová K. Léčba demence inhibitory cholinesteráz – bezpečnost a snášenlivost v praxi. *Neurologie pro praxi* 2003, 5:258-262

Shiozaki K., Iseki E., Hino H., Kosaka K. Distribution of m1 muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies – an immunohistochemical study. *Journal of the Neurological Sciences* 2001, 193:23-28

Švestka J. Galantamin – dualistické kognitivum. *Psychiatrie* 2001, 5(4):265-274

Trojan S. a kol. Lékařská fyziologie. Grada Publishing, Praha 2003

Použité internetové zdroje

www.wikipedia.org (4. 1. 2010)

www.niaaa.nih.gov (4. 1. 2010)

www.nature.com (4. 1. 2010)

www.memorylossonline.com (7. 1. 2010)