

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**SLEDOVÁNÍ ZÁKLADNÍCH PARAMETRŮ
FARMAKOKINETIKY INHIBITORŮ
ACETYLCHOLINESTERASY UŽÍVANÝCH V TERAPII
ALZHEIMEROVY CHOROBY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Školitel specialista: PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Markéta Krejčiová

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

V Hradci Králové dne

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ:

Velké díky patří mjr. PharmDr. Janě Žďárové Karasové, Ph.D. a Prof. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. Rovněž bych ráda poděkovala zaměstnancům Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a všem, kteří přispěli k dokončení této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Studentka: Markéta Krejčiová

Školitel: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Školitel specialista: Mjr. PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Název diplomové práce: Sledování základních parametrů farmakokinetiky inhibitorů acetylcholinesterasy užívaných v terapii Alzheimerovy choroby

Alzheimerova choroba je progresivní a ireversibilní neurodegenerativní onemocnění, které je celosvětově spojováno s nejčastější příčinou demence. Patofyziologie onemocnění není plně pochopena. Léčba této nemoci je prozatím symptomatická a je reprezentována inhibitory acetylcholinesterasy a memantinem. Zvláště inhibitorům acetylcholinesterasy a jejich derivátům je věnována velká pozornost. Mezi základní a obměňované struktury patří takrin a 7-MEOTA. Právě tyto dvě molekuly byly použity jako referenční, se kterými byly porovnávány nově syntetizované deriváty inhibitorů acetylcholinesterasy KB-36 a KB-38.

Sledovány byly změny koncentrací látek v plazmě a mozkové tkáni. *In vivo* studie byla prováděna na potkanech. Zvířatům byly intramuskulárně aplikovány ekvimolární dávky příslušných inhibitorů. Vzorokly plazmy a mozkové tkáně byly hodnoceny pomocí HPLC. Cílem bylo zjistit reálné hladiny inhibitorů acetylcholinesterasy v obou kompartmentech.

Výsledky analýzy ukázaly lepší prostupnost takrinu do mozkové tkáně v porovnání se 7-MEOTOU. Maximální koncentrace takrinu v mozku, 18,86 ng/ml, bylo dosaženo ve 30. minutě. Maximální koncentrace 7-MEOTY v mozku byla 14,17 ng/ml a dosaženo jí bylo v 15. minutě. Nové deriváty KB-36 a KB-38 do mozku prostoupily v pouze zanedbatelném množství, které pravděpodobně nebudou mít vliv na symptomy Alzheimerovy choroby.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Control of Pharmaceuticals

Student: Markéta Krejčiová

Supervisor: Prof. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Supervisor specialist: Mjr. PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Monitoring of basic pharmacokinetic parameters of acetylcholinesterase inhibitors used in the treatment of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease is a progressive irreversible neurodegenerative disorder that is globally associated with the most frequent cause of dementia. The pathophysiology of this illness is not fully understood yet. The commonly used treatment is still symptomatic, based on IChE and memantine. Great attention is paid particularly to IChEs and their derivatives, which arise from the basic structure of tacrine and 7-MEOTA. These two molecules were used as a reference for comparison with newly synthesized IChE derivatives KB-36 and KB-38.

Changes in plasma and brain tissue concentration levels were studied. The *in vivo* study was performed on rats (male, tribe Wistar). Equimolar doses were administered intramuscularly. Samples of plasma and brain tissue were evaluated by using HPLC techniques. The main aim was to determine the real concentration levels of all IChE in both compartments.

Our results showed that tacrine had a better blood-brain barrier permeation than 7-MEOTA. Maximal concentration of tacrine in brain tissue, 18.86 ng/ml, was achieved in the 30th minute. Maximal concentration of 7-MEOTA in brain tissue was 14.17 ng/ml and in was achieved in the 15th minute. New derivatives, KB-36 and KB-38, did not achieved brain tissue in therapeutic concentration order. Therefore it is unlikely that these new molecules could relieve Alzheimer's disease symptoms.

Obsah

ÚVOD	1
CÍL	1
SEZNAM ZKRATEK	2
1. TEORETICKÁ ČÁST	3
1.1 ALZHEIMEROVA CHOROBA	3
1.1.1 Patofyziologie	3
1.1.2 Příznaky a symptomy	4
1.1.3 Diagnostika	5
1.1.4 Epidemiologie a etiologie	7
1.1.5 Léčba	8
1.2 ACETYLCHOLINESTERASA	12
1.3 TESTOVANÉ INHIBITORY ACHE	13
1.3.1 Takrin	13
1.3.2 7-MEOTA	14
1.3.3 KB-36	15
1.3.4 KB-38	16
1.4 VYSOKO ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE	16
1.4.1 Princip	16
1.4.2 HPLC zařízení	17
1.4.3 Detektory	19
2. METODIKA	21
2.1 STUDIE NA ZVÍŘATECH	21
2.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ PLAZMY	23
2.2.1 Takrin	23
2.2.2 7-MEOTA	24
2.2.3 KB-36	24
2.2.4 KB-38	25
2.3 PŘÍPRAVA VZORKŮ MOZKU	26
2.3.1 Takrin	26
2.3.2 7-MEOTA	26
2.3.3 KB-36	27
2.3.4 KB-38	27
2.4 METODA HPLC – PLAZMA	28
2.4.1 Takrin	28
2.4.2 7-MEOTA	30
2.4.3 KB-36	31

2.4.4 KB-38.....	33
2.5 METODA HPLC - MOZEK	35
2.5.1 Takrin.....	35
2.5.2 7-MEOTA.....	36
2.5.3 KB-36.....	37
2.5.4 KB-38.....	38
3. VÝSLEDKY	39
3.1 ZMĚNY V KONCENTRACÍCH SLEDOVANÝCH LÁTEK.....	39
3.1.1 Takrin.....	39
3.1.2 7-MEOTA.....	40
3.1.3 KB-36.....	41
3.1.4 KB-38.....	42
4. DISKUZE	44
5. ZÁVĚR.....	48
6. LITERATURA	50

Úvod

Alzheimerova choroba je nemoc, kdy dochází k degenerativním procesům v mozkové tkáni. Tato neurodegenerace vede postupně k poškození všech psychických funkcí. Onemocnění má dopady nejenom na nemocného a na jeho příbuzné, ale také na zdravotnictví a společnost jako celek. Současná medicína nedokáže léčit příčinu onemocnění, existuje pouze symptomatická léčba. Léčbu tedy tvoří skupina inhibitorů acetylcholinesterasy a inhibitor NMDA receptorů. Tyto látky dokáží prodloužit dobu samostatnosti pacienta a oddálit tak léčbu a péči ve zdravotnických zařízeních. Prvním léčivem na Alzheimerovu chorobu byl takrin. Uveden na trh byl v roce 1993, ale kvůli značné hepatotoxicitě byl z trhu zase stažen. Jeho derivát 7-MEOTA měl také dobré inhibiční vlastnosti, ale na trh se kvůli finančním důvodům nedostal. Nyní se výzkum pokouší nalézt molekuly odvozené od těchto dvou látek, kde je naděje na získání nových molekul s obdobnou silou inhibice ovšem bez vážných nežádoucích účinků.

Cíl

Cílem této studie bylo zjistit reálné hladiny takrinu a 7-MEOTY v plazmě a mozkové tkáni po intramuskulárním podání. Dosažená koncentrace těchto inhibitorů acetylcholinesterasy bude sloužit pro porovnání a následnému zhodnocení s nově připravenými nadějnými inhibitory acetylcholinesterasy.

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidový prekurzorový protein
BACE	β -sekretasa
BZ	3-chinuklidybenzilát
CSF	mozkomíšni mok
CT	počítačová tomografie
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv - USA
GLU	kyselina glutamová
HCl	kyselina chlorovodíková
HIS	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IACHe	inhibitor acetylcholinesterasy
IC ₅₀	koncentrace inhibující 50 % enzymů
IS	vnitřní standard
MAO	monoaminoxidasa
MCI	mírná kognitivní porucha
7-MEOTA	7-methoxytakrin
MMSE	Mini Mental State Exam
MoCA	Montreal Cognitive Assessment
MRI	magnetická resonance
NaOH	hydroxid sodný
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PET	pozitronová emisní tomografie
PFP	pentafluorofenyl
PHE	fenylalanin
<i>PSEN1</i>	gen pro presenilin 1
<i>PSEN2</i>	gen pro presenilin 2
SER	serin
SSRI	inhibitor zpětného vstřebávání serotoninu
TNF- α	tumornekrotizující faktor α
TRP	tryptofan
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření

1. Teoretická část

1.1 Alzheimerova choroba

1.1.1 Patofyziologie

Alzheimerova choroba (AD) je pojmenována po německém psychiatrovi a neuropatologovi Aloisi Alzheimerovi. Jako první totiž v roce 1907 popsal zdravotní stav 51leté ženy, která trpěla poruchami paměti a psychiatrickými obtížemi. Její mozková tkáň byla podrobena biopsii a poslána na analýzu do Mnichova. K identifikaci senilních plaků a neurofibrilárních uzlíků byla použita Bielschowskyho metoda.[1] Tato metoda využívá jako vizualizační médium stříbro. To je použito v roztoku jako stříbrná sůl. Po její redukci v místě postižené tkáně je detekováno stříbro. [2] Spolu s Aloisem Alzheimerem spolupracoval i Emil Kraepelin, taktéž německý psychiatr. Emil Kraepelin je zodpovědný za zařazení Alzheimerovy choroby jako samostatné nosologické jednotky.[3]

Jedná se o demenci, při které dochází k atrofii mozkové tkáně, ztrátě acetylcholinergních neuronů, tvorbě plaků způsobených ukládáním β -amyloidu, dále dochází k degeneraci tau proteinu a vzniku neurofibrilárních uzlíků. Vyskytuje se zde i sterilní zánět a vznik volných kyslíkových radikálů.[4] Toto vše způsobuje typické projevy choroby. Bohužel etiologie Alzheimerovy choroby není dosud známa.

Jeden z hlavních patofyziologických pochodů je tvorba senilních plaků. Tyto plaky vznikají extraneuronálně, kdy dochází k nahromadění a ukládání β -amyloidu. β -amyloid je peptid složený ze 40 nebo 42 aminokyselin a vzniká z amyloidového prekursorového proteinu (APP) [5]. Glykoprotein APP se nachází v membráně nervových buněk. Skládá se z N-konce, C-konce a transmembránové domény. APP je primárně štěpen α a β -sekretasou a sekundárně pak γ -sekretasou. Pokud je APP štěpen kombinací α a γ -sekretasy, vzniká neamyloidogenní produkt. Pokud je ovšem štěpen β v návaznosti s γ -sekretasou, produktem je již výše zmíněný β -amyloid.[6] β -amyloid se hromadí vně buňky a vytváří amyloidní plaky, které poškozují buňky mozku a jejich vzájemnou komunikaci. Dochází taktéž k aktivaci imunitních pochodů, ke vzniku zánětu a oxidačních reakcí. Buňky se tímto procesem nenávratně poškozují a dochází k jejich úmrtí.

Intraneuronálně vzniká tau protein. Jeho funkcí je stabilizovat tubulinové jednotky v mikrotubuly a vytvářet tak mikrotubulární síť. Tato síť je důležitá pro zachování tvaru buňky a slouží rovněž jako prostředník pro axonální přenos. Tau protein také umožňuje propojení

mikrotubulů s cytoskeletem a jinými proteiny. Tento protein má i negativní vlastnost a tou je tvorba lézí poškozující funkci neuronů. Při hyperfosforilaci u AD je tau protein velice náchylný k agregaci a tvorbě neurofibrilárních uzlíků. [7]

Sterilní zánět vznikající v okolí β -amyloidních plaků je způsoben cytokiny např. TNF- α , interleukiny a složkami komplementu. Tyto procesy vedou k aktivaci mikroglíí, které začnou uvolňovat faktory toxické pro neurony. [8] Neaktivované mikroglie jsou umístěny v nervových buňkách a mají funkci makrofágů a mohou být považovány také za gliové buňky - podpůrné buňky neuronů.

Makroskopicky je snadno pozorovatelná atrofie mozku. Jako první dochází k atrofii středního spánkového laloku (zodpovídá za řeč, jejímu porozumění a rovněž porozumění psaného textu), konkrétně entorhinální kůry zodpovědné za paměť a orientaci. V začátečních stádiích se již také objevuje ztráta mozkové tkáně hippocampu (krátkodobá paměť a orientace), amygdaly (pocitová stránka paměti - strach, radost z prožitků), parahippokampu (krátkodobá paměť a prostorová orientace) a dále celého limbického systému (emoce, chování, paměť, čich). Postupně se atrofie rozšiřuje na spánkový neokortex a na celou neokortikální část. [9]

1.1.2 Příznaky a symptomy

Prvním pacientem s příznaky Alzheimerovy choroby byla žena ve věku 51 let. V listopadu roku 1901 byla diagnostikována ve Frankfurtské nemocnici samotným Aloisem Alzheimerem. Její příznaky zahrnovaly značnou ztrátu paměti, objevovaly se u ní bludy a halucinace. Pacientka podlehlá onemocnění v květnu roku 1906.

Naprostá většina pacientů s Alzheimerovou chorobou jsou pacienti v pokročilém věku. Je zde ale důležité odlišit vlastní onemocnění od fyziologického stárnutí. Čím je totiž lidský mozek starší, tím větší část mozku je atrofovaná. Míra atrofie mozkové tkáně je ale u pacienta s Alzheimerovou chorobou 2.4krát větší než u zdravé populace.[10]

AD má několik stádií a existuje několik typů třídění podle stavu pacienta. Tato práce vychází z dělení podle The Alzheimer's Association. Tato asociace používá dělení na 7 stupňů podle toho, jak se mění kognitivní schopnosti během onemocnění. Je nutno upozornit na to, že tato choroba nemá u všech pacientů stejně vyjádřená stádia.

1. stádium - normální funkce. Pacient ani vyšetřující lékař nezaznamenává žádné problémy s pamětí.

2. stádium - velmi slabá kognitivní porucha. Stádium často zaměňované za fyziologické stárnutí. Pacient má vnitřní pocit, že má horší paměť. Okolí ale nezaznamenává žádné příznaky.

3. stádium - slabá kognitivní porucha. Okolí již zaznamenává problémy v podobě sníženého soustředění, zapomínání slov a jmen. Pacient přenáší předměty na místa, kde nepatří nebo je ztrácí. Má problémy s organizováním a plánováním.

4. stádium - intermediální kognitivní porucha. Všechny problémy s pamětí, orientací a organizováním jsou markantnější. Přidávají se i poruchy osobnosti a vlastního chování.

5. stádium - pokročilá kognitivní porucha. Pacienti zařazení v tomto stádiu už mají problémy s denními činnostmi ale stravování a vykonávání potřeby stále zvládají sami. Častěji bývají zmateni ohledně polohy a času. Zapomínají důležité informace jako adresu, telefonní číslo nebo kde studovali.

6. stádium - závažná kognitivní porucha. V tomto stádiu je už potřebná denní péče se všemi denními činnostmi. Nemocný si sice stále pamatuje své jméno, ale již zapomíná, co všechno prožil. Rozpoznává známé lidi kolem sebe, ale má problémy si vzpomenout na jejich jména. Mívá problémy se spánkem, udržením stolice a moči, povahově je spíše podezřívavý, impulzivní, netečný a nevrlý.

7. stádium - terminální fáze. Pacient v této konečné fázi potřebuje péči 24 hodin denně. Přestává reagovat na své okolí, nezúčastňuje se konverzace, opakuje spíše jen fráze nebo slova. Objevuje se ztuhlost svalů, kdy má nemocný problémy se smíchem, polykáním nebo s koordinací paží. Objevují se také mimovolní pohyby. [11] Toto stádium končí smrtí.

1.1.3 Diagnostika

Jelikož je AD nejčastější demencí a jedná se tedy o závažný celosvětový problém, na její diagnostiku je kladen značný důraz. Nejjednodušším a pouze orientačním testem je tzv. MMSE (Mini Mental State Examination test). Používá se spíše k monitoraci průběhu onemocnění. Dokáže odlišit středně těžkou poruchu od stavu bez symptomů a je ukazatelem zhoršování stavu nemocného. Selhává při diagnostice raných stádií a v odlišení od jiných typů

demence než je AD. Za demenci se považuje bodové skóre menší než 24 bodů z 30 možných. Test se složen z několika částí a to: orientace, zapamatování, pozornost a počítání, vybavování, pojmenování předmětu, opakování, stupňovaný příkaz, čtení a plnění příkazu a nakonec obkreslování. Jako alternativa pro přesnější zjištění raných stádií demence slouží MoCA test (Montreal Cognitive Assessment). Je citlivější při poruchách funkce čelního laloku. Test se skládá z prostorové orientace a zručnosti, pojmenování zvířete, testu na paměť, pozornost, řeč, abstrakci, pozdější vybavení slov a orientaci. Maximální počet bodů je 30. Pro MCI (Mild Cognitive Impairment) je bodový výsledek mezi 25 a 19 body. Při získání méně jak devatenácti bodů se jedná o AD.

V ordinaci lékaře se také většinou provádí jednoduchý test, kdy má pacient nakreslit hodiny s očíslovaným ciferníkem a znázornit 11 hodin a 10 minut. Tento test se kombinuje spolu s MMSE nebo MoCA testy a zhodnocením dohromady se určuje přibližná diagnóza.

Jelikož je u AD postižena primárně paměť nemocného, existuje spousta testů na zapamatování si slov a věcí. V Duboisově testu pěti slov si má pacient zapamatovat slova: muzeum, limonáda, mravenec, cedník, kamion, která jsou napsána velkými tiskacími písmeny na papíře. Poté následuje souhrn otázek týkajících se těchto slov typu: Jaký je to nápoj? Co je to za dopravní prostředek? atd. Po několika minutách se doktor pacienta ptá na slova, která si měl zapamatovat.[12]

Tyto neurologické testy prokazují již symptomatickou AD. Ovšem neurodegenerativní procesy v mozku jsou v chodu již několik let před objevením se symptomů. V symptomatickém stádiu je již na léčbu většinou pozdě. Díky pozitronové emisní tomografii (PET) a analýze mozkomíšního moku (CSF) lze dnes AD diagnostikovat o mnoho dříve.

CSF je považována za ideální zdroj biomarkerů, protože je v přímém kontaktu s extracelulárním prostorem a může tak odrážet změny v biochemických pochodech v mozku. Mezi biomarkery patří β -amyloid 42, total-tau a fosforylovaný tau protein. Touto metodou lze odlišit AD, prodromální fáze AD a může také odlišit AD od ostatních typů demence. Odběr CSF je velice senzitivní a specifická analýza.[13]

PET používá pro vizualizaci zobrazovací látky. Ty mohou ukázat změny v metabolismu glukózy v mozku, rozdíly na úrovni neurotransmiterů, probíhající zánětlivé změny nebo agregaci proteinů jako je ukládání β -amyloidu. Vyšetření pomocí PET neumožňuje pouze

kvalitativní zobrazení dat pomocí barevné škály, ale rovněž umožňuje získat kvantitativní data.[14]

Jedním z diagnostických postupů jsou také zobrazovací metody mozku. Mezi ně se řadí magnetická resonance (MRI) a počítačová tomografie (CT). MRI funguje na principu měření indukovaného napětí, které vzniká působením magnetického pole na protony v lidském těle. Díky složitým procesům a algoritmům je indukované napětí převedeno na obraz v různých odstínech šedé. Takto se dá pozorovat atrofie mozku. [15] CT je založeno na emisi záření z rentgenky, toto záření prochází přes objekt, který sníží intenzitu tohoto záření. Detektor zachytí intenzitu dopadajícího záření a zobrazí ho jako obraz v odstínech šedi.

1.1.4 Epidemiologie a etiologie

Na celém světě je diagnostikováno zhruba 26 milionů pacientů, kteří trpí AD. Přibližně 5,4 % z nich tvoří pacienti starší věku 65. Rychlost vzrůstu výskytu onemocnění je kolem 5 milionů nově diagnostikovaných za jeden rok. Existuje zde předpoklad, že v roce 2040 již bude diagnostikováno 10 milionů pacientů jen na území Evropy. Rozložení nemocných podle věkových kategorií je znázorněno v tabulce 1.

Tab. 1 Prevalence demence v Evropě dle European Collaboration on Dementia [16]

Věk	Muži	Ženy
60 - 64	0.2 %	0.9 %
65 - 69	1.8 %	1.4 %
70 - 74	3.2 %	3.8 %
75 - 79	7.0 %	7.6 %
80 - 84	14.5 %	16.4 %
85 - 89	20.9 %	28.5 %
90 - 94	29.2 %	44.4 %
95 +	32.4 %	48.8 %

AD tvoří asi dvě třetiny všech zjištěných demencí. V České republice se celkem odhaduje, že demencí trpí 120-130 tisíc nemocných. Je to tedy přibližně 1 % celkové populace

České republiky. Incidence s věkem rychle stoupá. U skupiny pacientů nad 85 let se vyskytuje o 80 nových případů na 1000 lidí více než u nemocných s věkem mezi 65 a 85 lety. Ve skupině nad 65 let tedy demencí trpí 5% lidí, ale ve skupině nad 85 let dochází k nárůstu až na 30-50 % lidí. Pomocí nynějších diagnostických postupů jsou lékaři schopni rozpoznat až 600 tisíc nových případů. Tento počet převyšuje dokonce i počty nových případů cukrovky nebo rakoviny prsu. [17]

Jak již bylo zmíněno výše, AD má neznámé příčiny vzniku. Je ale známo několik faktorů, které mohou být spojovány s demencí nebo Alzheimerovou chorobou. Mezi rizikové faktory patří vaskulární onemocnění, jako je srdeční ischemie nebo mrtvice. Mezi další riziková onemocnění pro AD se řadí diabetes, vysoký krevní tlak, kouření i obezita. Některé studie také našly vyšší riziko incidence AD u pacientů s výskytem prodělané deprese nebo psychickým stresem v minulosti. Lidé, kteří prodělali traumatické poškození mozku, jsou také ve větším ohrožení.

V patofyziologii AD může mít vliv i genetický faktor. Tento faktor se liší u AD, která vzniká na konci čtyřicáté nebo na začátku padesáté dekády věku a AD vznikající u starších 65 let. Tento typ AD se označuje jako Early-onset AD. Zde hrají roli 3 geny: *APP*, *PSEN1* a *PSEN2*. Tyto geny kódují proteiny hrající roli v APP defektu a v tvorbě β -amyloidu. Mutace v těchto třech genech může být použita jako diagnostický faktor, protože jistota agregace β -amyloidu a vznik early-onset AD je vyšší než 85 %. U late-onset AD genů se riziko dědičnosti zvyšuje, ovšem není to podle Mendelovské teorie. Potomkům nemocného totiž vzniká riziko dvakrát tak vyšší než u osob s rodiči bez AD. Jediný gen, který je podezřelý za late-onset AD je gen pro apolipoprotein E nacházející se na 19. chromozomu. [18]

1.1.5 Léčba

AD je léčitelná, ale nevléčitelná nemoc. Léčba je pouze symptomatická, dokáže zpomalit nastupující ztrátu paměti a zmatenost po určitou dobu (6-12 měsíců) a tím prodloužit fázi samostatnosti a lepšího sociálního postavení pacienta. Léčba bohužel nedokáže oddálit smrt způsobenou touto nemocí, která nastupuje individuálně, obvykle mezi 7. - 10. rokem od začátku choroby. Zahájení léčby by mělo být co nejčasnější, aby mohl pacient z medikace profitovat co nejvíce. Často se ale choroba pozná až 2-3 roky po začátku onemocnění, kdy se příznaky stávají markantnější. [12]

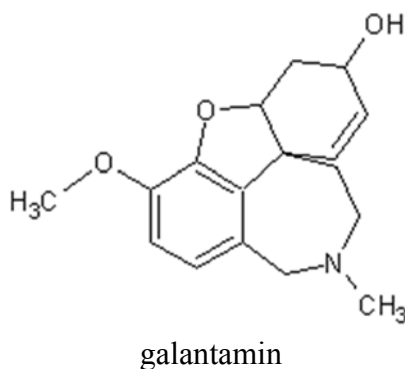
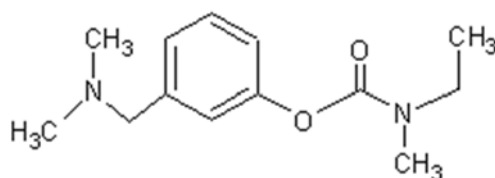
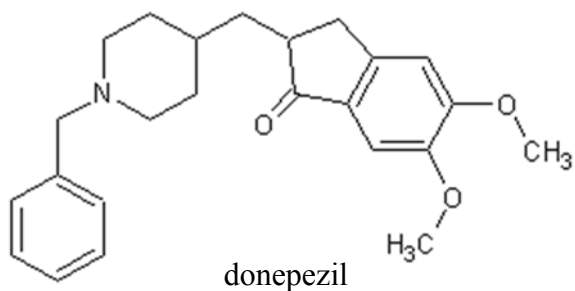
V České republice jsou nyní schváleny pouze 4 léčivé látky s prokazatelným účinkem (evidence based medicine) na kognitivní funkce. Jedná se o skupinu inhibitorů acetylcholinesterasy: donepezil, rivastigmin, galantamin. Poslední látkou je memantin, což je parciální inhibitor NMDA receptorů. Další látky, které se používají, ale nemají prokazatelné účinky, jsou např. extrakt z *Ginkgo Biloby* EGb 716 a nitrendipin. Bez evidence based medicine dat se používají také piracetam, pyritinol nebo pentoxifylin. Ve stádiu testování se nyní nachází vakcinace β -amyloidem nebo použití monoklonálních protilátek působících na β -amyloid. Jako pomocná léčiva se podávají též antipsychotika, anxiolytika a antidepresiva. [19]

Inhibitory acetylcholinesterasy (AChE) se používají symptomaticky ke snížení příznaků jako je ztráta paměti a kognitivních potíží. Inhibovaná AChE nemůže plnit svou fyziologickou funkci, což je rozklad neurotransmiteru acetylcholinu. Tímto mechanismem se zvyšuje nabídka acetylcholinu v nervových spojích. V důsledku jeho nedostatku vznikají hlavní příznaky AD.

Donepezil je piperidinový reversibilní inhibitor vysoce selektivní k AChE. Podává se ve formě potahovaných nebo dispergovatelných tablet v dávce 5 nebo 10 mg denně. Mezi časté nežádoucí účinky patří hlavně gastrointestinální projevy jako průjem, nevolnost, zvracení. Dále se objevují svalové křeče, únava a nespavost.

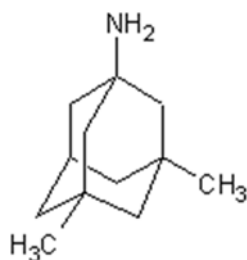
Rivastigmin je inhibitor karbamátového typu, který inhibuje acetyl- i butyrylcholinesterasu. Používá se ve formě tvrdých tobolek, transdermálních náplastí a tablet dispergovatelných v ústech. Na začátku léčby se podává 1,5 mg 2x denně a dávka se titruje až na 6 mg 2x denně. Rivastigmin má nejčastější nežádoucí účinky projevující se na gastrointestinálním traktu. Patří mezi ně hlavně nauzea a zvracení, které jsou velmi výrazné především při titraci dávky.

Poslední látkou ze skupiny inhibitorů AChE je galantamin. Galantamin je terciální alkaloid s duální funkcí. Je to kompetitivní reversibilní inhibitor AChE a zároveň i modulátor nikotinových receptorů. Podává se ve formě tvrdé tobolky v úvodní dávce 8mg denně s titrací do 24 mg za den. Nežádoucí účinky jsou obdobné těm, které se vyskytují u donepezilu a rivastigminu. [20, 21]



Obr. 1 Chemické struktury používaných IACHÉ. Vzorce byly dle [22] nakresleny v programu Chems sketch.

Memantin je antagonistou na *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorech. Tyto receptory jsou aktivovány glutamátem, který se vyskytuje ve větší koncentraci v okolí neuronů. Při aktivaci NMDA receptorů glutamátem se dostává Ca²⁺ do buňky. Jeho zvýšená hladina způsobuje změnu funkce neuronů. Memantin se podává v lékové formě jako roztok a nebo jako potahované tablety. Počáteční dávka je 5 mg denně, dávkování se postupně navyšuje až na 10 mg dvakrát za den. Nejčastějšími nežádoucími účinky jsou závratě, bolesti hlavy, zácpa, somnolence a hypertenze. [21, 23]



Obr. 2 Chemická struktura antagonisty NMDA receptorů memantinu. Vzorec byl nakreslen dle [22] programem Chems sketch.

Extrakt z Ginkgo biloby EGb 761 má indikace jako antidementivum, nootropikum a adjuvantní vazodilatans. V porovnání s placebem má tento extrakt jistou statisticky významnou výhodu u pacientů s AD. Ukázalo se ale, že při problémech s běžnými denními aktivitami tato léčba význam nemá. Kombinace s IChE se zdá být relativně efektivní a tudíž je zde podání opodstatněné. [24]

Nitrendipin je antihypertenzivum, jehož mechanismus účinku je blokáce kanálů pro vápenaté ionty. Ukázalo se ovšem také, že pacienti léčení nitrendipinem jsou nejenom v nižším riziku mozkové mrtvice, ale také mají o 55 % nižší šanci onemocnět demencí. [25, 26]

Piracetam, z chemické skupiny racetamů, je odvozen od laktamu kyseliny γ -aminomáselné. Byl považován za účinnou látku zlepšující mozkovou činnost a nervovou aktivitu. V klinických studiích však nebyl nalezen celkově žádný benefit v kognitivních funkcích u pacientů s AD. V některých případech by mohly dokonce vysoké dávky zpomalovat zhoršování kognitivních funkcí, výsledky však nejsou přesvědčivé. [27] Pyritinol patří do skupiny nootropik stejně jako piracetam. Při dávce 200 mg 3x denně se zlepšila jak fyzická aktivita, ostražitost, pozornost tak i mentální schopnosti. Ovšem u pacientů s AD se účinnost neprokázala. [28, 29] Pentoxifylin je vazodilatans odvozen od xantinu, zlepšuje prokrvení tkání a jejich oksyličení. [30]

U Alzheimerovy choroby se kromě hlavních příznaků mohou vyskytovat i příznaky vedlejší. Mezi ně se řadí deprese, úzkost nebo agitace. Při depresivních stavech a úzkosti se mohou podat antidepresiva většinou ze skupiny SSRI. Mezi tyto moderní antidepresiva patří fluoxetin, citalopram nebo sertralin. Úzkostné stavy u pacientů s AD není rozumné léčit benzodiazepiny, vedlejší účinky jako zmatenost a paměťové obtíže se totiž stupňují.

Nebenzodiazepinová anxiolytika jsou vhodnější. Patří mezi ně např. buspiron. Mezi vedlejší příznaky se řadí také agitovanost, která se vyskytuje u pokročilých stádií AD. Pro tyto příznaky se používají antipsychotika jak ty novější, atypická, tak i klasická. [31]

1.2 Acetylcholinesterasa

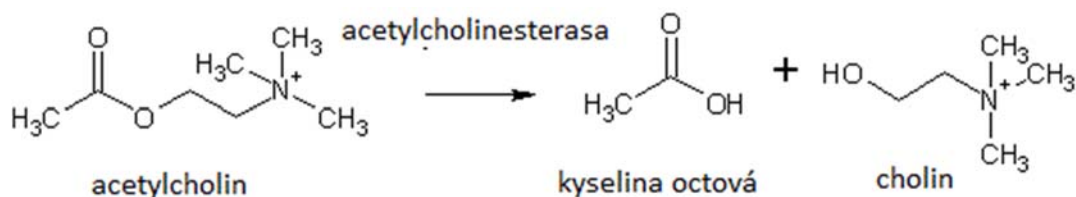


Schéma 1 Rozklad Ach pomocí AChE na kyselinu octovou a cholin.

Acetylcholinesterasa (EC 3.1.1.7) je enzym, který se řadí mezi serinové hydrolasy. Jeho asi nejdůležitější funkcí je štěpit neurotransmitter acetylcholin (Schéma 1). Dokáže rozštěpit přibližně 5000 molekul acetylcholinu za zhruba 150 μ s. Tento enzym je místem mechanismu účinku nepřímých cholinomimetických léčiv užívaných při AD. Bylo prokázáno, že AChE se také spolupodílí na tvorbě synapsí, na růstu, vývoji a diferenciaci buněk nervového systému. Tento enzym by mohl být také proteinovým stavebním článkem v kostní dřeni, kde interaguje s lamininem. Embryogenese je také z části ovlivňována AChE [32, 33]. V poslední době bohužel studie prokázaly, že urychluje ukládání β -amyloidu do senilních plaků, což vede k poškození nervových vláken a vzniku Alzheimerovy choroby [34].

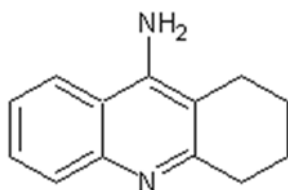
AChE se může vyskytovat v 6 isoformách. Jedná se o monomer, dimer spojený sulfidovým můstkem, tetramer, asymetrický tetramer s jedním, s dvěma a třemi postranními řetězci. Jeden monomer se skládá z dvanácti vláken v konformaci beta skládaného listu a je obklopen čtrnácti α -helixy. Na molekule se vyznačuje jednotkou esterovou a anionickou. Obě dohromady tvoří aktivní místo enzymu s katalytickou aktivitou. Esterová jednotka má dané pořadí aminokyselin a to: Ser-His-Glu. Anionická jednotka je představována aminokyselinami v tomto pořadí: Trp-Phe-Phe. Celé aktivní místo se nachází v dutině složené ze čtrnácti aromatických jader, které jsou seskupeny z rozdílných částí řetězců aminokyselin [32].

Anionická jednotka v dutině enzymu je místem, kde se váže takrin a MEOTA. Touto vazbou zde dochází k inhibici funkce enzymu. Látky jako jsou nervově paralytické agens nebo pesticidy se díky kvarternímu dusíku váží také na toto místo.

V souvislosti s AD je důležité zmínit místo na acetylcholinesterase, které se nazývá periferní anionická neboli β -anionická jednotka. Lze ji nalézt na povrchu enzymu blízko vstupu do dutiny aktivního místa enzymu. Toto místo je důležité, protože se zde váže velká část toxinů, ale i léčiv používaných v terapii Alzheimerovy choroby. Periferní anionická jednotka hraje roli i v patofyziologii vzniku AD. β -amyloid totiž reaguje s tímto místem na enzymu za vzniku amyloidových plaků, což vede k degeneraci cholinergních neuronů. [35]

1.3 Testované inhibitory AChE

1.3.1 Takrin



Obr. 3 Chemická struktura takrinu.

Takrin, chemicky 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin, byl první účinnou látkou k léčbě AD. K užívání ho schválila roku 1993 Food and Drug Administration (FDA). Takrin zvyšuje hladinu acetylcholinu, což je hlavní neurotransmiter, jehož nedostatek se podílí na příznacích AD. Hlavní nevýhodou tohoto léčiva jsou jeho závažné nežádoucí účinky. [36]

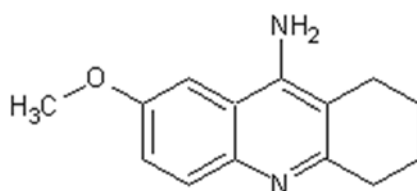
Mechanismem účinku takrinu je nekompetitivní, reversibilní inhibice enzymu AChE. Jedná se o neselektivní inhibici, znamená to, že je inhibovaná i esterasa podobná AChE a to butyrylcholinesterasa. Takrin se váže do α -anionického vazebného místa AChE a již koncentrace $0.5 \pm 0,10 \mu\text{M}$ inhibuje polovinu celkového množství AChE. [35, 37]

Takrin se z gastrointestinálního traktu vstřebává rychle, v plazmě dosahuje maximální koncentrace již za 1-2 hodiny. Vstřebávání může klesnout až na 30 % při současném podání s potravou. Takrin se poměrně rychle metabolizuje a eliminuje, je tedy potřeba časté dávkování v intervalu šesti hodin.

Obvyklé dávkování takrinu je na začátku léčby 10 mg čtyřikrát denně a každých 6 týdnů se dávka navyšuje až do dávky maximální, která je 40 mg čtyřikrát denně. Compliance pacienta se může zhoršit právě kvůli nežádoucím účinkům, které jsou u takrinu výrazné a často terminují léčbu. Objevuje se zde zvýšení aktivity hepatálních enzymů (ALT, AST) a hepatotoxicita. Hepatální funkce musí být při léčbě takrinem kontrolovány. Pokud dojde k navýšení transaminázy na trojnásobek od normální hodnoty, musí být podávání takrinu přerušeno. Časté je také zvracení, nauzea, anorexie, myalgie, dyspepsie, bolesti břicha nebo vyrážka. Takrin bohužel není zázračný lék, nevyléčí pacienta ani nezastaví progresi onemocnění. Může neurodegeneraci pouze zpomalit. V České republice není žádný registrovaný přípravek s obsahem takrinu právě kvůli jeho relativně vysokému vlivu na játra. [38]

Takrin použitý pro tuto studii byl zakoupen od společnosti Sigma Aldrich.

1.3.2 7-MEOTA

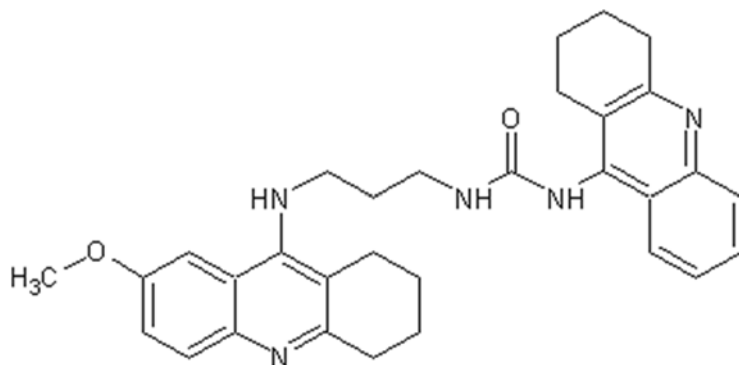


Obr. 4 Chemická struktura 7-MEOTA.

7-MEOTA, chemicky 7-methoxy-9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin, je látkou, která byla syntetizována a vyvinuta v Československu v 80. letech 20. století. Jedná se o velice blízký derivát takrinu, přesněji o jeho 7-methoxy derivát. 7-MEOTA byla vyvinuta v naději, že bude mít minimálně stejné inhibiční vlastnosti ($IC_{50} = 15.0 \pm 2.4 \mu M$) na AChE jako takrin a vedlejší účinky, hlavně ty hepatotoxické, se zredukuje nebo zmizí úplně. 7-MEOTA se delší dobu zdála být opravdu méně toxická. Dokonce i zjištění, že metabolické cesty jsou odlišné, by tomuto nasvědčovalo. 7-MEOTA byla podrobena jen malé části klinické studie. Ta musela být zastavena kvůli nedostatku finančních prostředků. Díky těmto problémům se nikdy nedostala před registrační komisi a tudíž ani do užívání. Tento derivát může být kromě centrálního anticholinergního účinku užíván také jako antidotum proti psychicky zneschopňující látce BZ příslušníky Armády České republiky. [37]

7-MEOTA použitá pro tuto studii byla připravena pracovníky Katedry toxikologie v Hradci Králové.

1.3.3 KB-36

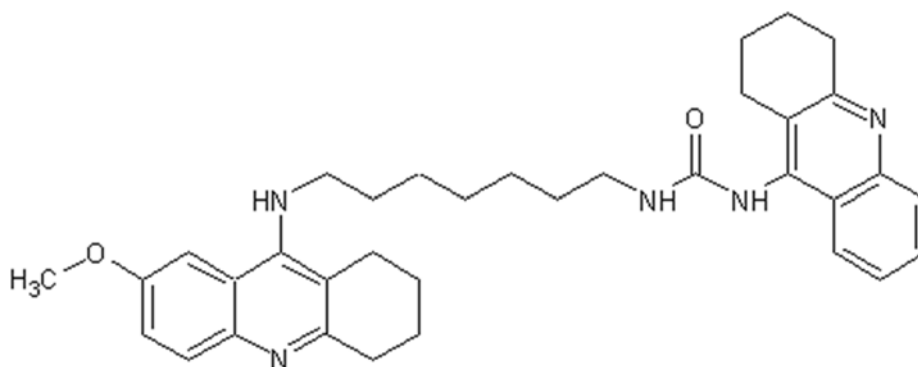


Obr. 5 Chemická struktura KB-36.

KB-36 je pracovní označení pro strukturu 1-(3-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl-amino)propyl)-3-(1,2,3,4-terahydroakridin-9-yl)ureu. Tato molekula se skládá z jedné části z takrinu a z části druhé z MEOTY. Spojovacím můstkem obou částí je močovina s uhlíkatým řetězcem. Spojením těchto dvou IChE do jedné molekuly by mohlo znamenat zlepšení inhibičního potenciálu této sloučeniny. KB-36 je schopno inhibovat AChE již v řádu μM . U této molekuly byla sledována i schopnost inhibovat MAO. Tento enzym je totiž u nemocných AD zodpovědný za tvorbu hydrogenperoxidu, který způsobuje oxidační stres zhoršující neurodegeneraci. Kombinace 2 mechanismů, inhibice AChE i MAO, ukazuje pozitivní efekt v kognitivních funkcích a napomáhá zmírnit depresivní a úzkostné stavy, které AD provází. IC_{50} pro inhibici MAO byla změřena na $51.6 \pm 18.6 \mu\text{M}$. Ve výzkumu byla zjištěna i inhibice agregace β -amyloidu *in vitro*. IC_{50} zde měla hodnotu $0.25 \mu\text{M}$. [39]

KB-36 použitá pro tuto studii byla připravena pracovníky Katedry toxikologie v Hradci Králové.

1.3.4 KB-38



Obr. 6 Chemická struktura KB-38.

Pod označením KB-38 se skrývá struktura s chemickým názvem 1-(7-(7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl-amino)heptyl)-3-(1,2,3,4-terahydroakridin-9-yl)urea. Strukturně si jsou obě KB velice podobné. Odlišuje je pouze délka uhlíkatého řetězce. Zde se skládá ze 7 uhlíků. Tato molekula má o něco lepší parametry než KB-36. KB-38 inhibuje AChE již v nM množství a hodnota IC_{50} je $0,057 \mu\text{M}$. Jeho afinita k AChE je dokonce větší než u takrinu. Ve studii zabránění agregace β -amyloidu se hodnota IC_{50} dostala na hodnotu $2.6 \mu\text{M}$.

Obě KB sloučeniny jsou syntetizované teprve v nedávné době. Na jejich tvorbě má zásluhu Katedra toxikologie FVZ. Studie s nimi byly pouze v podmínkách *in vitro* nebo *ex vivo* prvotních pokusech. [39]

KB-38 použitá pro tuto studii byla připravena pracovníky Katedry toxikologie v Hradci Králové.

1.4 Vysoko účinná kapalinová chromatografie

1.4.1 Princip

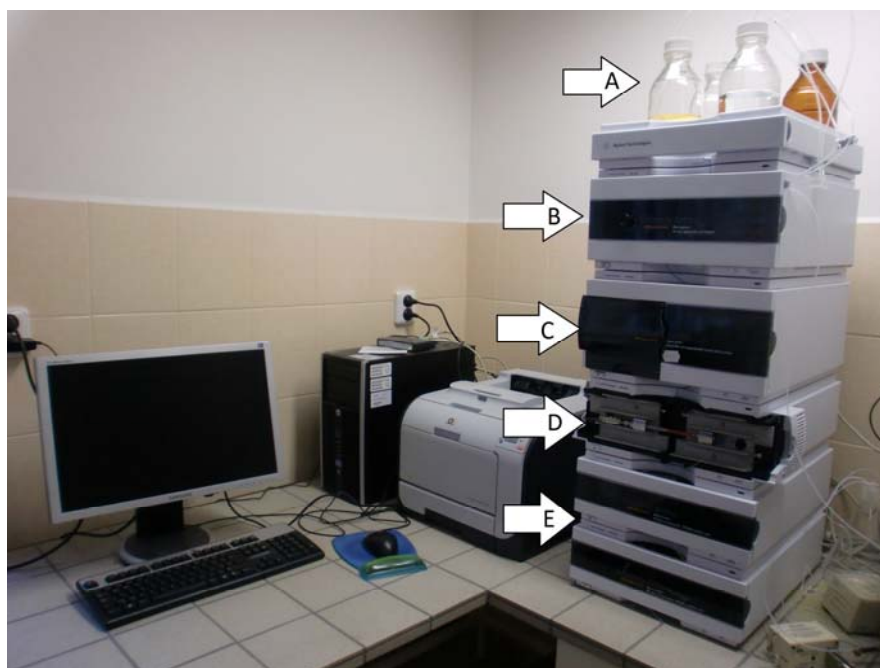
Vysokoučinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC) je analytická metoda, která je založená na principu separace dvou a více látek. Objev chromatografie je připisován ruskému botanikovi Tswettovi, který v roce 1903 separoval pomocí této techniky rostlinné pigmenty. Nyní se chromatografie řadí mezi metody, kde dochází k velmi rychlému pokroku. [40]

HPLC patří mezi separační metody. Je založena na rozdílné distribuci látek, které se podle jejich vlastností dělí mezi dvě rozdílné fáze. HPLC umožňuje jak kvalitativní tak kvantitativní analýzu. Tuto metodu lze tedy použít k důkazu látky, její identifikaci tak i ke stanovení koncentrace. Mezi další výhody se řadí rychlost analýzy, citlivost (dle detektoru), malé množství vzorku, automatizace a velké spektrum látek, pro které se dá HPLC využít.

Dělení dvou látek probíhá v separační koloně. Na ní je navázána nepohyblivá, tzv. stacionární fáze ve formě sorbetu. Kolonou při analýze protéká pohyblivá, tzv. mobilní fáze, která je přiváděna pod vysokým tlakem čerpadlem. Analyzované látky mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi a dochází zde k distribuci mezi mobilní a stacionární fází. Výsledkem toho procesu je rozdílné zadržování látek v koloně a tak detekce použitým detektorem probíhá v různém retenčním čase. [41]

1.4.2 HPLC zařízení

Kapalinový chromatograf (Obr. 7) je složen z několika částí: zásobníky mobilní fáze, zařízení transportující mobilní fázi, automatického dávkovače, místa separace, detektoru a počítače se softwarem. Toto jsou základní části, které v nynější době má každý HPLC systém. Podle typu separované látky a metody je zde možnost řady obměn.



Obr. 7 HPLC systém složený ze zásobníků pro mobilní fáze (A), vysokotlakého čerpadla (B), autosampleru (C), termostatu a chromatografické kolony (D), detektoru (E).

Mobilní fáze je vedena z uzavřených zásobníků do čerpadla. Mezi nimi může být zařazen odplyňovač, směšovač a/nebo tlumič tlakových pulzů. Odplyňovače fungují na principu probublávání heliem nebo pomocí vakua. Plyn v mobilní fázi zneumožňuje přesnou a správnou detekci zkoušené látky. Směšovač slouží k mísení mobilní fáze v poměru, který je pro příslušnou analýzu nejvýhodnější. Tlumič tlakových pulsů se používá u jednohlavých čerpadel, kde tlumí sinusové tlakové pulzy vznikající sáním a vytlačováním mobilní fáze.

V dalším kroku je mobilní fáze vháněna pomocí vysokotlakého čerpadla do kolony s výstupním tlakem 1 – 100 MPa. Čerpadlo musí zajišťovat stabilní průtok s přesností a správností do 1 %. Musí být zhotoveno z velice odolných materiálů a vnitřní objem mobilní fáze by měl být, kvůli možnosti rychlé výměny, co nejmenší. Škála čerpadel zahrnuje čerpadla pneumatická, injekčního typu, pístová, membránová nebo sériová dvoupístová.

Na kolonu je pomocí čerpadla spolu s mobilní fází vháněn i vzorek zkoušené látky. Jeho přesné množství je zajišťováno buďto vysokotlakým dávkovacím ventilem nebo autosamplrem.

Chromatografická kolona má dvě části – tělo a koncovku. Tělo kolony má tvar trubice o vnitřním průměru 2.1 – 5 mm a délce 10 – 300 mm. Kvůli odolnosti proti chemikáliím a tlakům je většinou vyrobena z nerezové oceli. Při tlacích do 20 MPa se používá i kolona skleněná s kovovým pouzdem nebo kolona z polyetheretherketonu. Koncovka zajišťuje těsnost, rovnoměrné rozložení mobilní fáze s analyzovanou látkou při průchodu průřezem a zadržování náplně v koloně. Vnitřní stěna kolony je povlečena stacionární fází. Tato fáze může být tvořena pevnou látkou nebo kapalinou vázanou na pevný nosič. Stacionární fáze se dělí na polární (silikagel, oxid hlinitý), nepolární a amfoterní (oxid zirkoničitý).

Za kolonou je umístěn detektor, který rozlišuje rozdíly mezi samotnou mobilní fází a mobilní fází s analytem. Podle toho, který detektor se k analýze použije, se dá ovlivnit citlivost a selektivita celé analýzy. [42]

1.4.3 Detektory

Detektor UV/VIS

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce ultrafialového nebo viditelného záření v rozmezí vlnových délek 190 – 800 nm. Detektor vzorek vyhodnocuje na základě Lambert-Beerova zákona, kde je matematicky vyjádřen vztah mezi tloušťkou vrstvy absorbující záření, koncentrací analyzované složky v dané vrstvě a mezi vlastní velikostí absorpce.

UV/VIS detektory lze rozdělit na 4 typy podle možnosti či nemožnosti měnit libovolně vlnovou délku. Bez možnosti změny vlnové délky existuje detektor s fixní vlnovou délkou, která bývá nejčastěji 253.7 nm. Detektor s měnitelnou vlnovou délkou je již využitelnější, ale vlnovou délku nelze měnit zcela libovolně. Má totiž předem dané nastavené vlnové délky, mezi kterými si lze vybrat. Zato detektor s programovatelnou vlnovou délkou lze využít pro rozmezí vlnových délek 190 – 700 nm zcela libovolně. Posledním typem je detektor diodového pole, kdy bez přerušení analýzy tento detektor dokáže snímat celé spektrum.

Fluorescenční detektor

Fluorescenční detektor je založen na principu fluorescence. Měřená látka absorbuje primární elektromagnetické záření, tzv. excitační. Po excitaci molekul ze základního do excitovaného stavu dochází k emisi sekundárního záření, tzv. emisního. Tento děj se nazývá

fluorescence. Každá látka bohužel nefluoreskuje, lze ji ale pomocí derivatizace převést na derivát, který již fluorescenci vykazuje. Tento detektor je nejen selektivnější, ale také citlivější. Dokáže kvantitativně zhodnotit látky v koncentraci 10^{-9} - 10^{-12} g/ml.

Elektrochemický detektor

Elektrochemický detektor zaznamenává látky, které elektrochemicky reagují na rozhraní elektrody a eluovaného roztoku. Tento detektor pak zaznamenává elektrochemickou veličinu, jako je elektrodový potenciál, elektrický proud nebo kapacita. Tyto veličiny jsou závislé na koncentraci analyzované látky. Nejčastěji se k detekci využívají oxidační a redukční schopnosti látek, které procházejí měrnou celou.

Tento detektor může pracovat na dvou principech a podle toho se dělí. Amperometrický typ měří proud při konstantním elektrodovém potenciálu. Coulometrický typ zcela elektrolyzuje stanovovanou látku.

Vodivostní detektor

Vodivostní detektor se skládá z průtokové cely ve tvaru válce a ze dvou elektrod. Mezi elektrodami se střídavým napětím je měřena vodivost protékající mobilní fáze s analytem. Je důležité, aby mobilní fáze byla nevodivá.

Refraktometrický detektor

Refraktometrický detektor zaznamenává změny indexu lomu mezi eluátem a samotnou mobilní fází. Analýza je závislá na teplotě a konstantnosti průtoku. Nevýhodou je nízká citlivost, která je 10^{-6} g/ml.

MS detektor

Hmotnostní spektrometr je nejvyžívanějším detektorem při použití HPLC systému. Funguje na principu ionizace neutrálních molekul analytu, jejich rozdělení podle poměru hmotnost/náboj a následnému urychlení v analyzátoru. Velkou výhodou je možnost získání spektrálních údajů o identitě analytu.

Chemiluminiscenční detektor

Chemiluminiscenční detektor pracuje na principu fluorescence, která je výsledkem chemické reakce. Pokud dochází při přechodu z excitovaného do základního stavu k vyzáření světla, jedná se o luminiscenci. [40–42]






























2. Metodika

2.1 Studie na zvířatech

Pro tuto studii farmakokinetických parametrů bylo vybráno jako modelové zvíře samec laboratorního potkana kmene Wistar o průměrné váze 240 ± 20 g. Zvířata byla ustájena za standardních podmínek při 22 ± 2 °C a relativní vzdušné vlhkosti 55 ± 6 % při střídavém rytmu den/noc po dvanácti hodinách. Standardní strava a voda byly dostupné dle potřeby zvířat. Experiment proběhl pod dohledem Etické komise Lékařské fakulty (Hradec Králové, Česká republika).

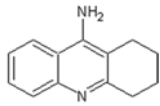
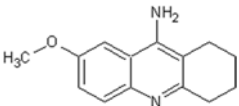
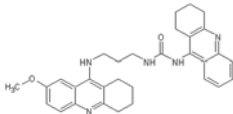
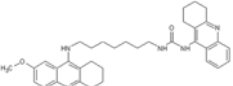
Zvířatům byla aplikována dávka IChE intramuskulárně. Zvířata byla rozdělena do čtyř základních skupin po čtyřiceti podle toho, který z IChE (takrin, 7-MEOTA, KB-36, KB-38) jim byl aplikován. Pět zvířat sloužilo jako kontrola, byl jim aplikován fyziologický roztok. V každé ze základních skupin byla zvířata dále rozdělena do 9 podskupin po pěti zvířatech podle toho, kdy došlo k odběru krve a mozku. Odběr byl proveden v osmi časových intervalech: 0 (kontrola), 5, 15, 30, 45, 60, 120, 240 minut po aplikaci. Rozdělení zvířat je názorně uvedeno v následující tabulce.

Tab. 2 Rozdělení potkanů do skupin.

	Počet minut od aplikace po odběr	Hlavní skupina							
		takrin		7-MEOTA		KB-36		KB-38	
v e d l e j š í s k u p i n a	0	5x 							
	5	5x		5x		5x		5x	
	15	5x		5x		5x		5x	
	30	5x		5x		5x		5x	
	45	5x		5x		5x		5x	
	60	5x		5x		5x		5x	
	120	5x		5x		5x		5x	
	240	5x		5x		5x		5x	

Jednotlivé dávky IChE pro intramuskulární aplikaci byly ekvimolárně přepočteny z jednotlivé terapeutické dávky takrinu pro člověka (20 mg). [43] Jednotlivé molekulové hmotnosti a aplikované dávky IChE jsou souhrnně uvedeny v následující tabulce.

Tab. 3 Struktury, molekulové hmotnosti a aplikované dávky aplikovaných IACHe.

IACHe	Struktura	Molekulová hmotnost g/mol	Aplikovaná dávka µg/kg
Takrin		237.72	200
7-MEOTA		318.37	271
KB-36		659.73	567
KB-38		715.84	610

Zvířata byla hluboce narkotizována v atmosféře CO₂. Po otevření dutiny hrudní byla transkardiálně z levé komory odebrána krev. Po následném vykrvení tkání fyziologickým roztokem s přídavkem heparinu byl odebrán mozek.

Vyjmuté mozky byly ihned uloženy v mrazicím boxu při -80°C až do doby analýzy. Odebraná krev byla heparinizována přidáním 10 µl heparinu 1666 m.j./ml. Z krve byla separována plasma centrifugací (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R) při 3000 otáčkách za minutu, při 10°C po dobu 10 minut. Vzorky plazmy byly ihned uloženy do mrazicího boxu a uchovávány při -80 °C až do analýzy.

2.2 Příprava vzorků plazmy

2.2.1 Takrin

Vzorky plazmy zmražené na -80° byly rozmrazeny při 37°C ve tmě po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). Z každého rozmraženého vzorku bylo

odebráno 800 µl a smícháno se 40 µl roztoku vnitřního standardu (IS). Pro vzorky takrinu byl jako IS použit roztok 7-MEOTY.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 40:60 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně promíchávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) po dobu 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkuřavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C. Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 µl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.2.2 7-MEOTA

Vzorky plazmy zmražené na -80° byly rozmrazeny při 37°C ve tmě po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). Z každého rozmraženého vzorku bylo odebráno 800 µl a smícháno se 40 µl roztoku vnitřního standardu (IS). Pro vzorky 7-MEOTY byl jako IS použit roztok takrinu.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 40:60 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně promíchávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) po dobu 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkuřavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C. Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 µl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.2.3 KB-36

Vzorky plazmy zmražené na -80° byly rozmrazeny při 37°C ve tmě po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). Z každého rozmraženého vzorku byl

odebrán 1.0 ml a smíchán se 40 μ l roztoku vnitřního standardu (IS). Pro vzorky KB-36 byl jako IS použit roztok KB-38.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 30:70 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně promíchávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) po dobu 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C . Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 μ l 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Termo Scientific IEC CL31R).

2.2.4 KB-38

Vzorky plazmy zmrazené na -80° byly rozmrazeny při 37°C ve tmě po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). Z každého rozmraženého vzorku byl odebrán 1.0 ml a smíchán se 40 μ l roztoku vnitřního standardu (IS). Pro vzorky KB-38 byl jako IS použit roztok KB-36.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 30:70 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně promíchávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) po dobu 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C . Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 μ l 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Termo Scientific IEC CL31R).

2.3 Příprava vzorků mozku

2.3.1 Takrin

Mozky zmražené na -80°C byly rozmrazeny při 37°C po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). K jednomu dílu mozku byly přidány 4 díly fosfátového homogenizačního pufru o $\text{pH}=6.3$. Homogenizace byla provedena čepelovým homogenizátorem (DI 25 Basic IKA-WERKE, Německo) po dobu 20 sekund při 13 500 otáčkách za minutu a ultrazvukovým jehlovým homogenizátorem (UP 50 H Hielscher, Německo) po dobu jedné minuty (amplituda 1.0, cyklus 100%). Homogenát byl odstředěn při 7°C a 10 000 otáček za minutu po dobu 15 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R). Bylo odebráno 800 μl homogenátu a smícháno se 40 μl roztoku vnitřního standardu (IS). Pro vzorky takrinu byl jako IS použit roztok 7-MEOTY.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 40:60 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně protřepávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C . Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 μl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.3.2 7-MEOTA

Mozky zmražené na -80°C byly rozmrazeny při 37°C po dobu 5 minut v termobloku (Major Science - Dry Bath Incubator). K jednomu dílu mozku byly přidány 4 díly fosfátového homogenizačního pufru o $\text{pH}=6.3$. Homogenizace byla provedena čepelovým homogenizátorem (DI 25 Basic IKA-WERKE, Německo) po dobu 20 sekund při 13 500 otáčkách za minutu a ultrazvukovým jehlovým homogenizátorem (UP 50 H Hielscher, Německo) po dobu jedné minuty (amplituda 1.0, cyklus 100%). Homogenát byl odstředěn při 7°C a 10 000 otáček za minutu po dobu 15 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R). Bylo odebráno 800 μl homogenátu a smícháno se 40 μl roztoku IS. Pro vzorky 7-MEOTY byl jako IS použit roztok takrinu.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. Ke vzorku bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 40:60 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně protřepávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena při -80°C a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C . Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 200 μl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.3.3 KB-36

Mozky zmrazené na -80°C byly jednotlivě přemístěny do tekutým dusíkem předem vychlazené hladké třecí misky, kde byly přelity tekutým dusíkem a rozdrčeny na jemný prášek. Prášek byl smísen s 1 ml roztoku pufru o $\text{pH}=5.6$ (100 ml 0.1M roztoku hydrogenftalátu draselného, 77.6 ml 0.1M roztoku NaOH, doplněno ultračistou vodou na 200 ml).

Homogenizace byla provedena pomocí ultrazvukové homogenizační jehly (UP 50 H Hielscher, Německo) po dobu 60 sekund při chlazení ledem. Homogenát byl odstředěn po dobu 15 minut při 10°C a 14 000 otáčkách za minutu (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R). Byl odebrán 1 ml supernatantu a smísen se 40 μl roztoku IS. Pro vzorky KB-36 byl jako IS použit roztok KB-38.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. K supernatantu bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 30:70 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně protřepávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkušavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C . Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 150 μl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.3.4 KB-38

Mozky zmrazené na -80°C byly jednotlivě přemístěny do tekutým dusíkem předem vychlazené hladké třecí misky, kde byly přelity tekutým dusíkem a rozdrčeny na jemný prášek.

Prášek byl smísen s 1 ml roztoku pufru o pH=5.6 (100 ml 0.1M roztoku hydrogenftalátu draselného, 77.6 ml 0.1M roztoku NaOH, doplněno ultračistou vodou na 200 ml).

Homogenizace byla provedena pomocí ultrazvukové homogenizační jehly (UP 50 H Hielscher, Německo) po dobu 60 sekund při chlazení ledem. Homogenát byl odstředěn po dobu 15 minut při 10°C a 14 000 otáčkách za minutu (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R). Byl odebrán 1 ml supernatantu a smísen se 40 µl roztoku IS. Pro vzorky KB-38 byl jako IS použit roztok KB-36.

Vzorek byl upraven pomocí liquid-liquid extrakce. K supernatantu bylo připipetováno 7 ml směsi dichlormethan-diethylether v poměru 30:70 a 0.5 ml 0.5M roztoku NaOH. Směs byla intenzivně protřepávána (Lab Dancer, IKA-WERKE, Německo) 30 sekund. Dále probíhala extrakce po dobu 15 minut na překlopné třepačce (Heidolph REAX 2) při rychlosti 9. Po extrakci byla vodná fáze vymrazena a oddělena. Zbylá organická fáze byla postupně přenesena do mikrozkuhavky Eppendorf a odpařena pod proudem dusíku do sucha při 45°C. Odparek byl těsně před samotným měřením rekonstituován ve 150 µl 10mM HCl a odstředěn při 10 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut (centrifuga Thermo Scientific IEC CL31R).

2.4 Metoda HPLC – plazma

2.4.1 Takrin

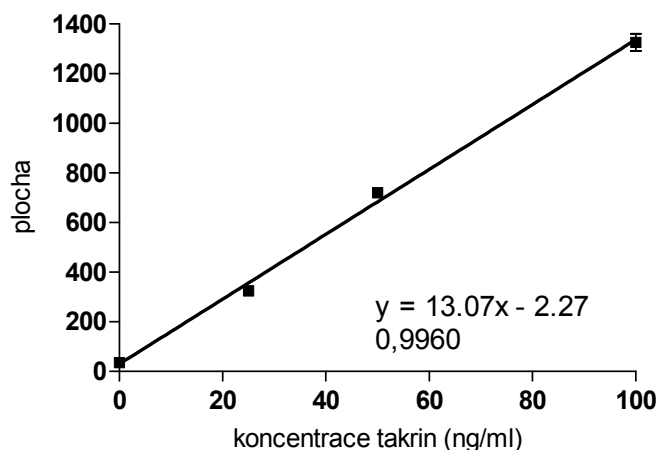
Ke stanovení takrinu byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřeného takrinu byl použit fluorescenční detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 4 Parametry metody při stanovení takrinu v potkaní plazmě.

System	Agilent 1200 Series
Kolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (150 x 4.6 mm, 5µm)
Předkolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2)
Mobilní fáze	Octan amonný (100 mM, pH=5.5) + acetonitril (80:20)
Teplota sampleru	10°C
Teplota na koloně	35°C
Průtok	0.7 ml/min
Nástřik	50 µl
Detektor	fluorescenční λEX=240 nm λEM=360 nm
Retenční čas	5.4 minut
Doba analýzy	10 minut

Separace takrinu byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 0.7 ml/min.

Pro přesné zjištění koncentrace takrinu ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přídavek takrinu do blankové plazmy. Finální koncentrace takrinu pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny třikrát a průměrné hodnoty změřených ploch píků s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu.



Obr. 8 Kalibrační křivka takrinu.

2.4.2 7-MEOTA

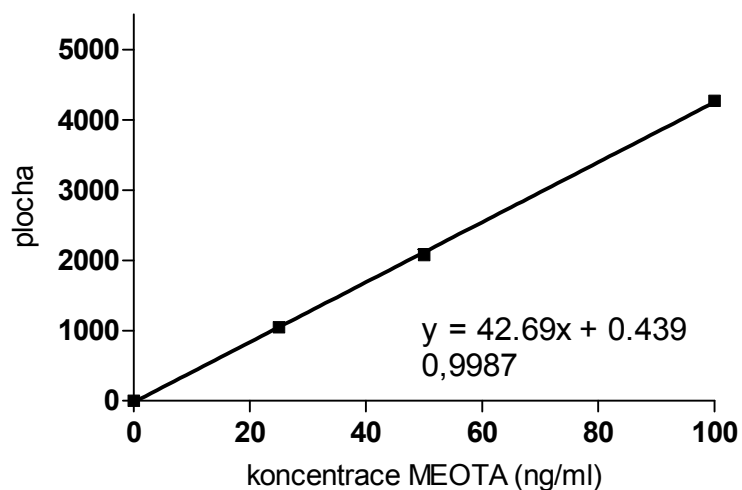
Ke stanovení 7-MEOTY byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřeného takrinu byl použit fluorescenční detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 5 Parametry metody při stanovení 7-MEOTY v potkaní plazmě.

System	Agilent 1200 Series
Kolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (150 x 4.6 mm, 5 μ m)
Předkolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2)
Mobilní fáze	Octan amonný (100 mM, pH=5.5) + methanol (1:1)
Teplota sampleru	10°C
Teplota na koloně	40°C
Průtok	1.0 ml/min
Nástřik	50 μ l
Detektor	fluorescenční $\lambda_{EX}=246$ nm $\lambda_{EM}=390$ nm
Retenční čas	6.8 minut
Doba analýzy	8 minut

Separace 7-MEOTY byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 1.0 ml/min.

Pro přesné zjištění koncentrace 7-MEOTY ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přidavků 7-MEOTY do blankové plazmy. Finální koncentrace 7-MEOTY pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny třikrát a průměrné hodnoty změřených ploch píků s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu.



Obr. 9 Kalibrační křivka 7-MEOTY.

2.4.3 KB-36

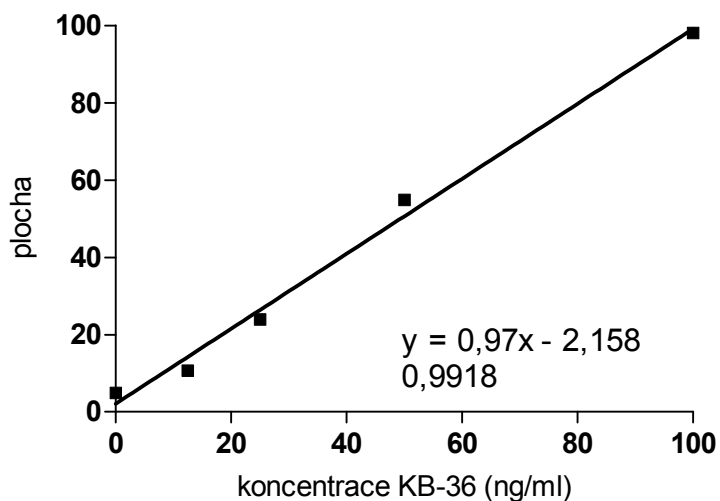
Ke stanovení KB-36 byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřené KB-36 byl použit hmotnostní detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 6 Parametry metody při stanovení KB-36 v potkaní plazmě.

System	Thermo Scientific Finnigan SURVEYOR MS Pump Plus
Kolona	C18 Kinetex 2.1 x 150 mm 2.6µm 100A
Předkolona	SecuritzGuard ULTRA cartridges UHPLC c18 for 2.1 mm ID columns
Teplota sampleru	8°C
Teplota na koloně	30°C
Průtok	200 µl/min
Nástřik	20 µL
Detektor	Finnigan SURVEYOR PDA Plus Detector Thermo Scientific
Doba analýzy	10 minut
Retenční čas	2.51 minut
Nastavení iontového zdroje:	
Typ ionizace	HESI
Teplota kapiláry	275 °C
Teplota ve zdroji	50 °C
Sheath gas flow	20
Aux gas flow	10
Sweep gas flow	0
Napětí zdroje	4.5 kV
Source current	100 µA
Napětí na kapiláře	49 V
Tube lens	125 V

Separace KB-36 byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 20 µl/min.

Pro přesné zjištění koncentrace KB-36 ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přidavků roztoku KB-36 do blankové plazmy. Finální koncentrace KB-36 pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny třikrát a průměrné hodnoty změřených ploch pík s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu.



Obr. 10 Kalibrační křivka KB-36.

2.4.4 KB-38

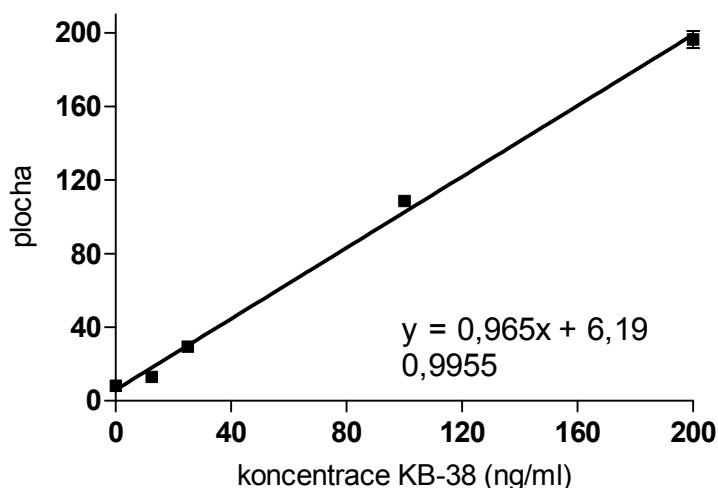
Ke stanovení KB-38 byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřené KB-38 byl použit hmotnostní detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 7 Parametry metody při stanovení KB-38 v potkaní plazmě.

System	Thermo Scientific Finnigan SURVEYOR MS Pump Plus
Kolona	C18 Kinetex 2.1 x 150 mm 2.6µm 100A
Předkolona	SecuritzGuard ULTRA cartridges UHPLC c18 for 2.1 mm ID columns
Teplota sampleru	8°C
Teplota na koloně	30°C
Průtok	200 µl/min
Nástřik	20 µL
Detektor	Finnigan SURVEYOR PDA Plus Detector Thermo Scientific
Doba analýzy	10 minut
Retenční čas	3.72 minut
Nastavení iontového zdroje:	
Typ ionizace	HESI
Teplota kapiláry	275 °C
Teplota ve zdroji	50 °C
Sheath gas flow	20
Aux gas flow	10
Sweep gas flow	0
Napětí zdroje	4.5 kV
Source current	100 µA
Napětí na kapiláře	49 V
Tube lens	125 V

Separace KB-38 byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 20 µl/min.

Pro přesné zjištění koncentrace KB-38 ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přidavků roztoku KB-38 do blankové plazmy. Finální koncentrace KB-38 pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml a 200 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny třikrát a průměrné hodnoty změřených ploch pík s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu.



Obr. 11 Kalibrační křivka KB-38.

2.5 Metoda HPLC - mozek

2.5.1 Takrin

Ke stanovení takrinu v mozkové tkáni byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřeného takrinu byl použit fluorescenční detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 8 Parametry metody při stanovení takrinu v mozkové tkáni potkana.

System	Agilent 1200 Series
Kolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (2 x 150mm, 3 µm)
Předkolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (3 µm)
Mobilní fáze	Octan amonný (100 mM, pH=5.5) + acetonitril (80:20)
Teplota sampleru	10°C
Teplota na koloně	35°C
Průtok	0.25 ml/min
Nástřík	5 µl
Detektor	fluorescenční 0-7 minut $\lambda_{EX}=240$ nm $\lambda_{EM}=360$ nm 7-11 minut $\lambda_{EX}=246$ nm $\lambda_{EM}=390$ nm
Retenční čas	5.3 minut
Doba analýzy	11.5 minut

Separace takrinu byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 0.7 ml/min.

Pro přesné zjištění koncentrace takrinu ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přídavek takrinu do blankové plazmy. Finální koncentrace takrinu pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny dvakrát a průměrné hodnoty změřených ploch píků s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu. Graf kalibrační křivky je uveden u stanovení takrinu ve vzorku plazmy.

2.5.2 7-MEOTA

Ke stanovení 7-MEOTY v mozkové tkáni byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřené 7-MEOTY byl použit fluorescenční detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 9 Parametry metody při stanovení 7-MEOTY v mozkové tkáni potkana.

Systém	Agilent 1200 Series
Kolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (2 x 150mm, 3 µm)
Předkolona	reverzní fáze Phenomenex Luna PFP(2) (3 µm)
Mobilní fáze	octan amonný (100 mM, pH=5.5) + acetonitril (80:20)
Teplota sampleru	10°C
Teplota na koloně	35°C
Průtok	0.25 ml/min
Nástřik	5 µl
Detektor	fluorescenční 0-7 minut $\lambda_{EX}=240$ nm $\lambda_{EM}=360$ nm 7-11 minut $\lambda_{EX}=246$ nm $\lambda_{EM}=390$ nm
Retenční čas	10.0 minut
Doba analýzy	11.5 minut

Separace 7-MEOTY byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 0.7 ml/min.

Pro přesné zjištění koncentrace 7-MEOTY ve vzorku potkaní plazmy bylo potřeba připravit kalibraci. Kalibrace byla připravena metodou standardních přidavků 7-MEOTY do blankové plazmy. Finální koncentrace 7-MEOTY pak odpovídaly hodnotám: 0 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml a 100 ng/ml. Všechny body kalibrační křivky byly měřeny dvakrát a průměrné hodnoty změřených ploch píků s odpovídajícími koncentracemi byly vyneseny do grafu. Graf kalibrační křivky je uveden u stanovení 7-MEOTY ve vzorku plazmy.

2.5.3 KB-36

Ke stanovení KB-36 byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřené KB-36 byl použit hmotnostní detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 10 Parametry metody při stanovení KB-36 v homogenátu mozkové tkáně.

Systém	Thermo Scientific Finnigan SURVEYOR MS Pump Plus
Kolona	C18 Kinetex 2.1 x 150 mm 2.6µm 100A
Předkolona	SecuritzGuard ULTRA cartridges UHPLC c18 for 2.1 mm ID columns
Teplota sampleru	8°C
Teplota na koloně	30°C
Průtok	200 µl/min
Nástřík	20 µL
Detektor	Finnigan SURVEYOR PDA Plus Detector Thermo Scientific
Doba analýzy	10 minut
Retenční čas	2.51 minut
Nastavení iontového zdroje:	
Typ ionizace	HESI
Teplota kapiláry	275 °C
Teplota ve zdroji	50 °C
Sheath gas flow	20
Aux gas flow	10
Sweep gas flow	0
Napětí zdroje	4.5 kV
Source current	100 µA
Napětí na kapiláře	49 V
Tube lens	125 V

Separace KB-36 byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Graf kalibrační křivky je uveden u stanovení KB-36 ve vzorku plazmy.

2.5.4 KB-38

Ke stanovení KB-38 byla jako nejvhodnější metoda zvolena HPLC. Vzhledem k hladině měřené KB-38 byl použit hmotnostní detektor. Přesné parametry metody jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 11 Parametry metody při stanovení KB-38 v homogenátu mozkové tkáně.

System	Thermo Scientific Finnigan SURVEYOR MS Pump Plus
Kolona	C18 Kinetex 2.1 x 150 mm 2.6 μm 100A
Předkolona	SecuritzGuard ULTRA cartridges UHPLC c18 for 2.1 mm ID columns
Teplota sampleru	8 $^{\circ}\text{C}$
Teplota na koloně	30 $^{\circ}\text{C}$
Průtok	200 $\mu\text{l}/\text{min}$
Nástřik	20 μL
Detektor	Finnigan SURVEYOR PDA Plus Detector Thermo Scientific
Doba analýzy	10 minut
Retenční čas	3.72 minut
Nastavení iontového zdroje:	
Typ ionizace	HESI
Teplota kapiláry	275 $^{\circ}\text{C}$
Teplota ve zdroji	50 $^{\circ}\text{C}$
Sheath gas flow	20
Aux gas flow	10
Sweep gas flow	0
Napětí zdroje	4.5 kV
Source current	100 μA
Napětí na kapiláře	49 V
Tube lens	125 V

Separace KB-38 byla prováděna v izokratickém režimu s rychlostí průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$. Graf kalibrační křivky je uveden u stanovení KB-38 ve vzorku plazmy.

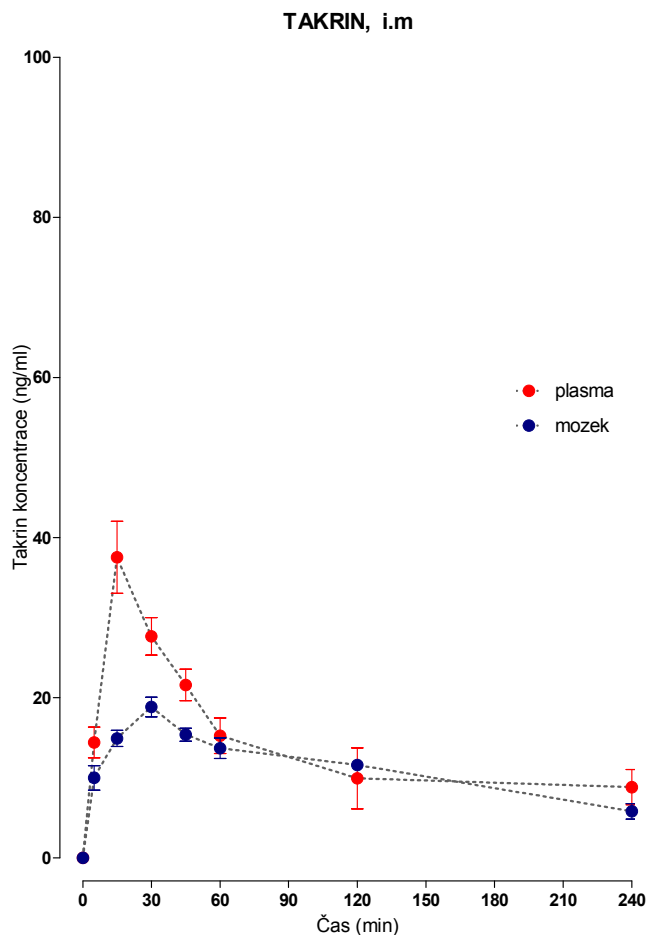
3. Výsledky

Analyzované inhibitory AChE byly v plazmě a mozkové tkáni stanovovány pomocí HPLC. Aplikované dávky inhibitorů byly podány intramuskulárně v ekvimolárních dávkách tak, aby se mezi sebou mohly hodnotit rozdíly ve farmakokinetice. Nalezené rozdíly by mohly pomoci k porozumění závislosti mezi chemickou strukturou a farmakokinetickými vlastnostmi.

3.1 Změny v koncentracích sledovaných látek

3.1.1 Takrin

Takrin byl aplikován v dávce 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Na následujícím grafu je znázorněna závislost koncentrace takrinu v plazmě a mozku v závislosti na čase. Každý bod grafu je vyjádřen průměrnými hodnotami naměřených koncentrací u pěti zvířat.



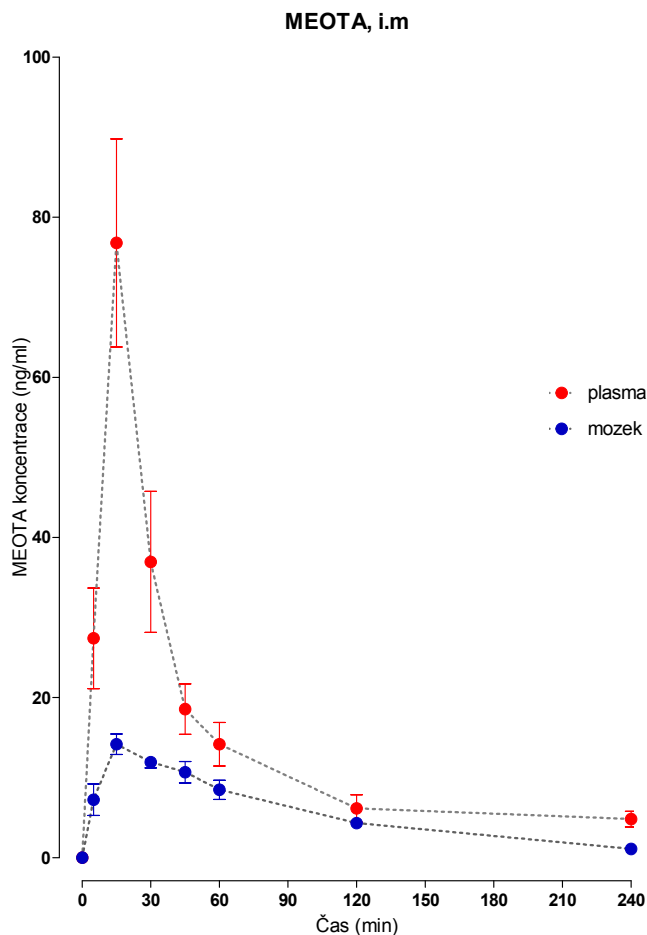
Obr.10 Distribuce takrinu v plazmě a mozku.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v plazmě odpovídala hodnotě 37.56 ± 9.01 ng/ml a bylo jí dosaženo v 15. minutě po intramuskulárním podání.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v mozku odpovídala hodnotě 18.86 ± 2.45 ng/ml a bylo jí dosaženo ve 30. minutě po intramuskulárním podání.

3.1.2 7-MEOTA

7-MEOTA byla aplikována v dávce 271 μ g/kg. Na následujícím grafu je znázorněna závislost koncentrace 7-MEOTY v plazmě a mozku v závislosti na čase. Každý bod grafu je vyjádřen průměrnými hodnotami naměřených koncentrací u pěti zvířat.



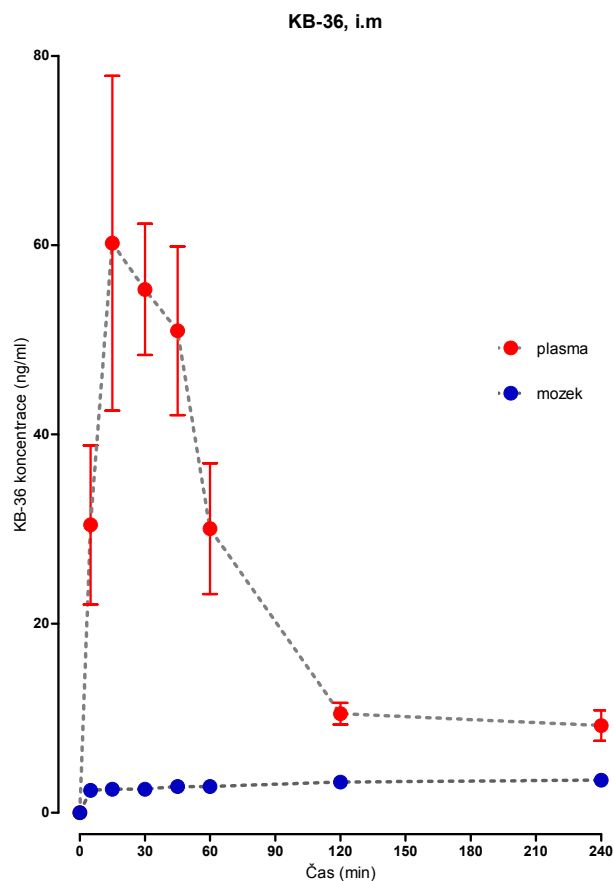
Obr. 11 Distribuce 7-MEOTY v plazmě a mozku.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v plazmě odpovídala hodnotě 84.80 ± 36.66 ng/ml a bylo jí dosaženo v 15. minutě po intramuskulárním podání.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v mozku odpovídala hodnotě 14.17 ± 2.56 ng/ml a bylo jí dosaženo v 15. minutě po intramuskulárním podání.

3.1.3 KB-36

KB-36 byl aplikován v dávce 567 μ g/kg. Na následujícím grafu je znázorněna závislost koncentrace KB-36 v plazmě a mozku v závislosti na čase. Každý bod grafu je vyjádřen průměrnými hodnotami naměřených koncentrací u pěti zvířat.



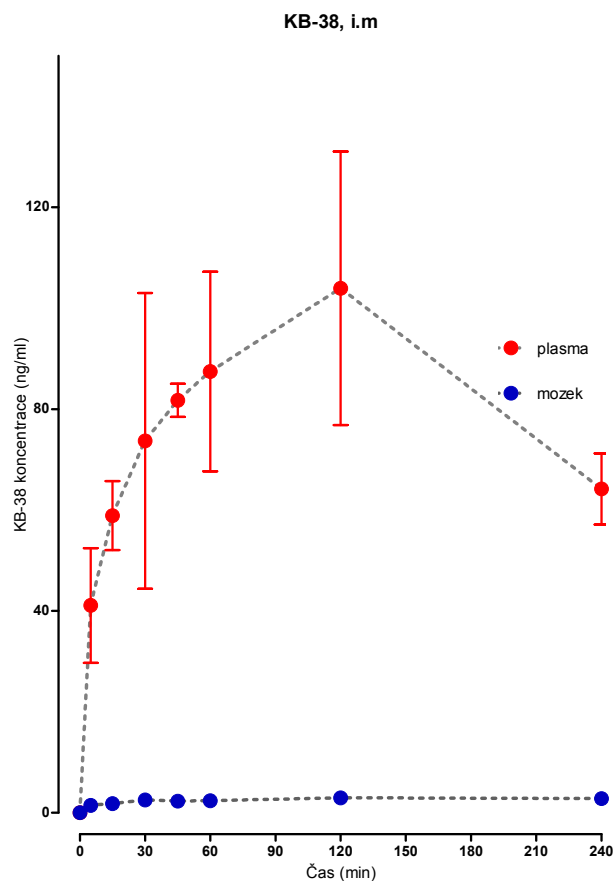
Obr. 12 Distribuce KB-36 v plazmě a mozku.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v plazmě odpovídala hodnotě 60.20 ± 39.59 ng/ml a bylo jí dosaženo v 15. minutě po intramuskulárním podání.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v mozku odpovídala hodnotě 3.44 ± 0.49 ng/ml a bylo jí dosaženo ve 240. minutě po intramuskulárním podání.

3.1.4 KB-38

KB-38 byl aplikován v dávce 610 μ g/kg. Na následujícím grafu je znázorněna závislost koncentrace KB-38 v plazmě a mozku v závislosti na čase. Každý bod grafu je vyjádřen průměrnými hodnotami naměřených koncentrací u pěti zvířat.



Obr. 13 Distribuce KB-38 v plazmě a mozku.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v plazmě odpovídala hodnotě 103.95 ± 60.62 ng/ml a bylo jí dosaženo ve 120. minutě po intramuskulárním podání.

Maximální koncentrace tohoto inhibitoru AChE v mozku odpovídala hodnotě 2.95 ± 0.18 ng/ml a bylo jí dosaženo ve 120. minutě po intramuskulárním podání.

Limit detekce v mozkové tkáni u KB-36 a KB-38 byly 3 ng/ml. Dosažené výsledky byly tedy na hranici měřitelnosti u zvolené analytické metody.

4. Diskuze

Mechanismus vzniku neurodegenerativních procesů u AD není stále zcela objasněn. Patofyziologii onemocnění může vysvětlovat řada hypotéz. Mezi často zkoumané patří hypotéza cholinergní, amyloidní, oxidační nebo vaskulární. Žádná z nich ale zatím nevede k úplnému objasnění neznámé etiologie tohoto onemocnění. Proto je velmi obtížné najít léčbu, která by byla kauzální. Vědecké cíle v oblasti vývoje léčiv na AD jsou různé. Mezi často zkoumané přístupy patří redukce zánětlivého procesu v mozkové tkáni, zamezení tvorby β -amyloidu nebo podpora regenerace neuronů. Mezi první léčiva, která jsou relativně úspěšně užívána při AD, jsou řazeny IChE. I přestože, se jedná o léčiva, která pouze oddalují pozdní fáze nemoci, jsou zatím jednou z mála skupin léčiv zavedených do klinické praxe. I zde se vědci pokouší najít nové účinnější molekuly.

Novým trendem v hledání nadějných IChE jsou molekuly ovlivňující více cílových míst. Vzhledem ke složité patogenezi AD nejsou standartní molekuly s jedním cílem dostatečně účinné. Duální až multireceptorová analoga by mohla dosáhnout lepší účinnosti v působení na více cílových míst v komplexních nervových kaskádách. Tyto inhibitory s přidaným efektem jsou s velkým zájmem zkoumány v preklinických studiích. Z pohledu struktury se nejčastěji jedná o molekulu složenou ze dvou látek, které jsou nebo byly v praxi používány samostatně. Nejčastěji se jedná o spojení dvou molekul IChE, IChE s inhibitorem MAO, IChE s inhibitorem transportu serotoninu, BACE nebo molekulou inhibující agregaci β -amyloidu a s antioxidačním efektem.

Česká republika je jednou ze zemí, kde se výzkumy zaměřují na léčbu AD. Na Katedře toxikologie FVZ v Hradci Králové byly vyvinuty nové série látek s duálním efektem. Jedná se o skupiny látek označované jako KB (takrin + 7-MEOTA), PC (donepezil + 7-MEOTA) a KS (7-MEOTA + amantadin) látky. Základem pro tyto duální inhibitory bývá molekula takrinu nebo 7-MEOTY. Obě molekuly vykazují dobrý farmakologický profil, kdy průchod přes biologické bariéry těla a hematoencefalickou bariéru je relativně vysoký a inhibice vůči lidské AChE (IC_{50}) se pohybuje v řádu nM. U takrinu však byly v průběhu klinického užívání popsány závažné nežádoucí účinky, mezi nejzávažnější, které vedly k vyřazení léku z klinické praxe je řazeno cholinergní a hepatotoxické působení. Novější derivát takrinu, 7-MEOTA, měla mít tyto nežádoucí účinky potlačeny. Pokusy provedené se 7-MEOTOU tomu nasvědčovaly. Existuje zde ale hypotéza, že se toxicita neprojeví při perorálním podání. Její průchod přes biologické bariéry je totiž nižší než u takrinu, toto se výrazněji projevuje při perorální aplikaci. Nižší

hepatotoxické účinky mohou být vysvětleny rozdílností v metabolismu obou látek, kdy u 7-MEOTY nevzniká toxický metabolit jako u takrinu. [37]

Obecně je u nově syntetizovaných látek kladen veliký důraz na jejich schopnost překonat hematoencefalickou bariéru a dosáhnout tak místa cílového účinku. Vnitřní prostředí CNS je přísně kontrolováno, základním předpokladem této kontroly je zamezení přímého přístupu krve se všemi působky z periferních oblastí organismu. Základ bariéry tvoří endotelové buňky kapilár mozku s jejich těsnými spoji, tzv. tight junctions. Dále je tvořena výběžky neurogliových buněk, které kryjí mozkové kapiláry. Těsné spoje, typické pro mozkové krevní kapiláry, neumožňují žádný prostup látek, ty musejí procházet přímo přes endotelové buňky, jejichž stěny jsou tvořeny lipidovou dvojvrstvou. [44]

U molekul je pak v první řadě hodnocena jejich schopnost pasivního prostupu přes biologické bariéry, která může být hodnocena již na základě znalostí chemické struktury a jejich chemicko-fyzikálních parametrů. Christopher Lipinski analyzoval s kolegy fyzikálně-chemické vlastnosti celé řady léků. Na tomto základě stanovil 4 pravidla, tzv. Lipinského pravidlo pěti, na jejichž základě bude látka pravděpodobně schopná projít buněčnou membránou. Mezi tyto pravidla patří velikost molekuly menší než 500 Daltonů, logaritmus rozdělovacího koeficientu mezi vodu a 1-oktanol menší než 5, méně než 5 donorů vodíkových vazeb a počet skupin přijímajících vodíkové atomy má být menší než 2 x 5. [44]

Pro mozek jsou ale také velmi důležité molekuly zásobující mozek energií a živinami, které se pomocí pasivního prostupu do mozku nedostanou. Tyto molekuly mohou prostupovat přes biologické membrány pomocí aktivního transportu. Aktivní transport je dávno dobře prostudován pro molekuly esenciální pro mozek, jako je glukóza nebo aminokyseliny. Jejich přenos je zprostředkován speciálními typy transportérů, které nejsou plně specifické pro danou molekulu. Tato forma transportu je daleko komplexnější a detailně neprobádaná pro chemické sloučeniny, které nejsou tělu vlastní. Pro každou novou molekulu je proto třeba provést i *in vivo* studie, aby se prokázalo, zda dokáže prostoupit přes hematoencefalickou bariéru pomocí transportních systémů aktivního přenosu. [44]

Takrin byl v 90. letech minulého století schválen FDA jako první léčivo na AD. Tato molekula má však nízkou biologickou dostupnost po perorálním podání. Pro dostatečnou účinnost jej bylo potřeba dávkovat čtyřikrát denně. Nejzávažnějším důvodem, který vedl ke stažení léku z trhu, jsou jeho vedlejší účinky. Mezi ně se řadí nauzea, průjemy, inkontinence a závažná hepatotoxicita. Takrin se rovněž řadí mezi potenciální karcinogeny. Metabolismus

probíhá pomocí cytochromu P450, kdy se takrin mění na hydroxyderiváty, kde některé z nich mají toxickou aktivitu. Některé se mohou měnit až na chinonovou formu, která reaguje s thiolovými skupinami proteinů buněk, a tímto způsobem vyvolává jejich destrukci. [37]

Takrin by podroben klinické studii, kde bylo zjištěno, že dávka 20 mg čtyřikrát denně je dostatečná pro inhibici AChE v CNS, aby došlo klinicky ke zlepšení kognitivních funkcí. [43] Z této studie se vycházelo při určování dávky pro aplikaci potkanům, kdy byla jednotlivá dávka pro člověka přepočítána na jednotku hmotnosti pro potkany. Bránou vstupu takrinu do organismu potkanů byla zvolena intramuskulární aplikace. Důvodem je jednoduchost podání a snadnější reprodukovatelnost výsledků v případě podání nových látek.

V této pilotní studii byla zjišťována hladina IChE po jedné intramuskulární aplikaci. Byla sledována hladina v plazmě a v mozkové tkáni. Takrin díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a velikosti molekuly dosáhl maximální koncentrace 37.56 ± 9.01 ng/ml v plazmě v 15. minutě. Z Obr. 10 lze vidět, že velmi rychle po aplikaci takrin prostupoval i do mozkové tkáně. Díky dobrému průchodu přes hematoencefalickou bariéru byla jeho maximální koncentrace v tomto kompartmentu 18.86 ± 2.45 ng/ml a dosaženo jí bylo ve 30. minutě po aplikaci.

7-MEOTA, derivát takrinu, se ukazuje být v několika ohledech lepší molekulou. Díky methoxy skupině je více lipofilní, má nižší *in vivo* toxicitu, interaguje s receptory pro ACh, její metabolické cesty jsou pro organismus bezpečnější. Nevýhodami vzhledem k takrinu jsou horší farmakokinetické parametry a mírně nižší schopnost inhibovat lidskou AChE. Její dávkování pro člověka by muselo být zřejmě stejně časté jako je tomu u takrinu, nicméně benefitem by byla možnost podávat vyšší dávku, protože se jedná o látku méně toxickou, než je takrin. [37]

Při určení vhodné dávky pro aplikaci se vycházelo z terapeutické dávky takrinu pro člověka s přepočtem na kilogram živé váhy. [43] Aby bylo možno molekuly snadno porovnávat ve farmakokinetických parametrech, byly dávky ostatních IChE v této studii zvoleny a spočítány tzv. ekvimolárně k původně určené dávce takrinu. Po jednorázové intramuskulární aplikaci potkanům maximální hladina 7-MEOTY v plazmě dosáhla hodnoty 84.80 ± 36.66 ng/ml taktéž v 15. minutě po aplikaci. Maximální hodnota byla dosažena u takrinu ve stejném čase ale je zde vidět, že koncentrace 7-MEOTY je v tomto časovém intervalu skoro dvojnásobná. Vzhledem k malé změně v molekule léčiva může být tento rozdíl vysvětlen více způsoby. Prvním může být fakt, že se 7-MEOTA rychleji absorbuje ze svalového depa do plasmy, nicméně pravděpodobnějším je vysvětlení, že hůře prostupuje přes biologické bariéry

do tělních kompartmentů než takrin. Tuto hypotézu také podporuje fakt, že maximální dosažená koncentrace této látky v mozku byla nižší než v případě takrinu. Lze tedy předpokládat, že i prostup do periferních kompartmentů bude nižší a pomalejší, což vede ke zvýšené kumulaci 7-MEOTY v plasmě.

Významným cílem při vývoji nových IAChE jsou taková léčiva, která budou mít dobré farmakokinetické i farmakodynamické vlastnosti a s absencí výrazných a omezujících nežádoucích účinků. V první sérii látek, označených jako KB, byla připravena série látek označovaných jako tzv. duální heterodimery kombinující strukturu 7-MEOTY a takrinu do jedné molekuly. Základním předpokladem bylo zlepšení inhibiční účinnosti vůči AChE a zároveň zde existuje domněnka, že by mohlo dojít ke zpomalení tvorby senilních plaků. Z této série byly na základě výsledků z *in vitro* a *ex vivo* testů vybrány dvě nejperspektivnější molekuly s kódovým označením KB-36 a KB-38, ty byly zařazeny do této *in vivo* studie. V *in vitro* testech byly hodnoceny parametry: inhibiční účinnost vůči AChE a BChE, interakce s MAO-A i MAO-B, efekt na agregaci β -amyloidu a jako poslední byla zkoumána chelatační aktivita pro ionty mědi. [39]

KB-36 se ukázala být nadějným inhibitorem BChE, kdy IC_{50} se pohybuje v řádu μM konkrétně $0.111 \pm 0.005 \mu M$. Za to KB-38 v *in vitro* studiích inhiboval AChE v řádu nM, kde IC_{50} byla $0.0575 \pm 0.0052 \mu M$. Interakce s MAO by mohla být aditivní vlastností, kdy by inhibice MAO-A vedla k antidepressivním účinkům, zatím co inhibice MAO-B by mohla poskytnout neuroprotektivní vlastnosti. Dalším zkoumaným parametrem je schopnost depolymerizovat β -amyloid. Depolymerizační aktivita pro KB-36 byla $62.5 \pm 1.3 \%$ a pro KB-38 $82.1 \pm 2.9 \%$. AD je mimo jiné charakterizována tvorbou volných radikálů a oxidačním stresem. Dochází ke zvýšení hladiny iontů mědi, z tohoto důvodu se studovala chelatační schopnost. KB-36 a KB-38 se ukázaly jako lepší chelatační látky než takrin a 7-MEOTA, kdy největším chelátorem byla KB-36. [39]

Jako pokusná zvířata v *in vivo* farmakokinetických studiích byli opět použiti samci potkanů. Dávka byla vypočtena obdobným způsobem jako v případě 7-MEOTY, tedy ekvimolárně na původně určenou dávku takrinu. Cílem studie bylo vyhodnotit nejen absorpci látek z místa podání (sval) do plasmy, ale také prostup do cílového kompartmentu, tedy CNS.

Stěžejním je vzhledem k potencionálnímu využití nových IAChE prostup v dostatečné koncentraci do mozkové tkáně, kde se očekává plnění daného mechanismu účinku. Po podrobení nových KB-látek farmakokinetické studii bylo zjištěno, jak lze vidět na obr. 12 a

obr. 13, že ani jedna z nadějných molekul neprostoupila do mozkové tkáně v takové koncentraci, kdy by se mohl očekávat účinek. Je to pravděpodobně způsobené velkou molekulovou hmotností, která se u obou molekul pohybuje nad 500 g/mol. Tímto je porušeno minimálně jedno z Lipinského pravidel. Z dosažených výsledků koncentrace v mozkové tkáni lze také usuzovat, že molekuly nejsou schopny využít aktivního transportu. Dalším problémem, který může ovlivnit základní toxicitní a farmakokinetické parametry u nově připravených látek, je jejich zhoršená rozpustnost ve vodném prostředí.

Toto je pouze pilotní studie. Navržena byla metoda zkoumání a porovnávání farmakokinetických parametrů známých IChE a těch nově syntetizovaných. Dále se nabízí možnosti pro navazující studie, kdy může být prozkoumán farmakokinetický profil po podání více než jedné dávky. Jak by vypadala případná ustálená hladina při dlouhodobém podání a odlišnosti při změně cesty podání. V budoucnu budou probíhat také studie s dalšími novými IChE a to s PC-látkami a s KS-látkami. Rovněž se budou tyto molekuly porovnávat s takrinem a 7-MEOTOU, jelikož se jedná o molekuly s dobrým, i když ne úplně ideálním farmakologickým profilem. I když se rovněž jedná o skládané molekuly s velkou molekulovou hmotností, je možné, že obměna v chemické struktuře může být příčinou toho, že molekula bude schopná využít aktivního transportu. Zlepšení tohoto farmakokinetického parametru bychom mohli očekávat například u molekul ze série PC-látek, kde je součástí chemické struktury donepezil, u něhož byla zjištěna vynikající schopnost prostupnosti přes hematoencefalickou bariéru a zvýšená kumulace v mozkové tkáni.

5. Závěr

Tato práce byla vytvořena z důvodu porovnání farmakokinetických parametrů dvou známých IChE, takrinu a 7-MEOTY, a dvou nově syntetizovaných zástupců KB-řady, KB-36 a KB-38. Po intramuskulární aplikaci ekvimolárních dávek byla zjišťována koncentrace všech IChE v mozku a v plazmě potkanů. Takrin a 7-MEOTA jsou molekuly, které vykazují dobré inhibiční vlastnosti vůči AChE. Přesné hladiny v dvou zkoumaných kompartmentech ale nebyly v minulosti zjišťovány. Díky této studii již existuje určitá představa o hladinách těchto molekul. Po intramuskulárním podání byla hladina takrinu v plazmě v 15. minutě na svém maximu 37.56 ± 9.01 ng/ml. V mozku byla maximální hladina ve 30. minutě 18.86 ± 2.45

ng/ml. 7-MEOTA vykazovala vyšší hladinu v plazmě, v 15. minutě byla hladina 84.80 ± 36.66 ng/ml. Tyto dva inhibitory byly vybrány jako základní molekuly, se kterými se budou porovnávat nově syntetizované IChE. Důvodem zvolení těchto dvou standardů je hlavně to, že nové molekuly ve své struktuře obsahují jak takrin, 7-MEOTU nebo obě látky dohromady.

Nově syntetizované duální IChE z řady KB-látek jsou KB-36 a KB-38. Jejich molekulu tvoří jak takrin tak i 7-MEOTA. V této studii byla zjišťována hladina v plazmě a krvi a porovnána se se základními molekulami. KB-36 dosáhla v plazmě v 15. minutě maxima 60.20 ± 39.59 ng/ml. KB-38 dosahovala v plazmě maxima 103.95 ± 60.62 ng/ml v 120. minutě. Hladiny v mozku u obou KB-látek byly na hranici měřitelnosti.

6. Literatura

- [1] GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G. A Century of Alzheimer's Disease. *Sci.* [online]. 2006, vol. 314, no. 5800, p. 777–781. [ISSN 0036-8075, 1095-9203]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1132814
- [2] UCHIHARA, T. Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol.* [online]. 2007, vol. 113, no. 5, p. 483–499. [ISSN 0001-6322]. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-007-0200-2
- [3] CASTELLANI, R. J.; ROLSTON, R. K.; SMITH, M. A. Alzheimer Disease. *Dis. a month : DM* [online]. 2010, vol. 56, no. 9, p. 484–546. [ISSN 0011-5029]. Dostupné z: doi:10.1016/j.disamonth.2010.06.001
- [4] WIDER, Ch.; WSZOLEK, Z. K. Etiology and Pathophysiology of Frontotemporal Dementia, Parkinson Disease and Alzheimer Disease: Lessons from Genetic Studies. *Neuro-Degener. Dis.*, 2008, vol. 5, no. 3-4, p. 122–125. [ISSN 1660-2854]. Dostupné z: doi:10.1159/000113680
- [5] SERRANO-POZO, A.; FROSCHE, M. P.; MASLIAH, E.; HYMAN, B. T. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Persp. Med.*, 2011, vol. 1, no. 1. [ISSN 2157-1422]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006189
- [6] MATSUSHIMA, T.; SAITO, Y.; ELLIOTT, J. I.; IJIMA-ANDO, K.; NISHIMURA, M.; KIMURA, N.; HATA, S.; YAMAMOTO, T.; NAKAYA, T.; SUZUKI, T. Membrane-Microdomain Localization of Amyloid β -Precursor Protein (APP) C-terminal Fragments Is Regulated by Phosphorylation of the Cytoplasmic Thr668 Residue. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 23, p. 19715–19724. [ISSN 0021-9258]. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.334847
- [7] LEE, G.; LEUGERS, Ch. J. Tau and Tauopathies. *Progr. Mol. Biol. Translat. Sci.*, 2012, vol. 107, p. 263–293. [ISSN 1877-1173]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385883-2.00004-7
- [8] WYSS-CORAY, T.; ROGERS, J. Inflammation in Alzheimer Disease - A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harbor Persp. Med.*, 2012, vol. 2, no. 1. [ISSN 2157-1422]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006346
- [9] JOHNSON, K. A.; FOX, N. C.; SPERLING, R. A.; KLUNK, W. E. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Persp. Med.*, 2012, vol. 2, no. 4. [ISSN 2157-1422]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006213
- [10] LEUNG, K. K.; BARTLETT, J. W.; BARNES, J.; MANNING, E. N.; OURSELIN, S.; FOX, N. C. Cerebral atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Neurol.*, 2013, vol. 80, no. 7, p. 648–654. [ISSN 0028-3878]. Dostupné z: doi:10.1212/WNL.0b013e318281ccd3
- [11] *7 Stages of Alzheimer's & Symptoms* | *Alzheimer's Association* [online]. Přistoupeno dne 2. listopadu 2013. Dostupné z: http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp

- [12] *Alzheimer Nadační fond* [online]. Přístupeno dne 8. prosince 2013. Dostupné z: <http://www.alzheimernf.cz/pro-pecujici-a-pacienty/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby>
- [13] ANOOP, A.; SINGH, P. K.; JACOB, R. S.; MAJÍ, S. K. CSF Biomarkers for Alzheimer's Disease Diagnosis. *Int. J. Alzheimer Dis.*, 2010, vol. 2010. [ISSN 2090-0252]. Dostupné z: doi:10.4061/2010/606802
- [14] NORDBERG, A.; O RINNE, J.; KADIR, A.; LÅNGSTRÖM, B. The use of PET in Alzheimer disease. *Nat. Rev.: Neurol.*, 2010, vol. 6, no. 2, p. 78–87. [ISSN 1759-4766]. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2009.217
- [15] JOHNSON, K. A.; FOX, N. C.; SPERLING, R. A.; KLUNK, W. E. Brain Imaging in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Persp. Med.*, 2012, vol. 2, no. 4. [ISSN 2157-1422]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006213
- [16] *Výskyt demence: Česká alzheimerovská společnost* [online]. Přístupeno dne 6. ledna 2014. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/vyskyt-demence/>
- [17] *Alzheimer Nadační fond* [online]. Přístupeno dne 6. ledna 2014. Dostupné z: <http://www.alzheimernf.cz/pro-pecujici-a-pacienty/situace-v-cr-a-ve-svete>
- [18] REITZ, Ch.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev.: Neurol.*, 2011, vol. 7, no. 3, p. 137–152. [ISSN 1759-4758]. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2011.2
- [19] TILŠLER, I. *Léčba demencí*. 2013
- [20] RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacol. Res.: Offic. J. Ital. Pharmacol. Soc.*, 2004, vol. 50, no. 4, p. 441–451. [ISSN 1043-6618]. Dostupné z: doi:10.1016/j.phrs.2003.12.027
- [21] *Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Přístupeno dne 8. prosince 2013. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>
- [22] *The PubChem Project* [online]. Přístupeno dne 15. ledna 2014. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [23] MOLINO, I.; COLUCCI, L.; FASANARO, A. M.; TRAINI, E.; AMENTA, F. Efficacy of Memantine, Donepezil, or Their Association in Moderate-Severe Alzheimer's Disease: A Review of Clinical Trials. *Sci. World J.*, 2013, vol. 2013. [ISSN 1537-744X]. Dostupné z: doi:10.1155/2013/925702
- [24] WEINMANN, S.; ROLL, S.; SCHWARZBACH, Ch.; VAUTH, Ch.; N WILLICH, S. Effects of Ginkgo biloba in dementia: systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics* [online]. 2010, vol. 10, no. 14. [ISSN 1471-2318]. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2318-10-14

- [25] FORETTE, F.; SEUX, M.-L.; A STAESSEN, J.; THIJS, L.; BABARSKIENE, M.-R.; BABEANU, S.; BOSSINI, A.; FAGARD, R.; GIL-EXTREMERA, B.; LAKS, T.; KOBALAVA, Z.; SARTI, C.; TUOMILEHTO, J.; VANHANEN, H.; WEBSTER, J.; YODFAT, Y.; HIRKENHÄGER, W. Systolic hypertension in europe investigators. The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Arch. Intern. Med.*, 2002, vol. 162, no. 18, p. 2046–2052. [ISSN 0003-9926].
- [26] GORELICK, P. B.; SCUTERI, A.; BLACK, S. E.; DECARLI, Ch.; GREENBERG, S. M.; IADECOLA, C.; LAUNER, L. J.; LAURENT, S.; LOPEZ, O. L.; NYENHUIS, D.; PETERSEN, R. C.; SCHNEIDER, J. A.; TZOURIO, Ch.; ARNETT, D. K.; BENNETT, D. A.; CHUI, H. C.; HIGASHIDA, R. T.; LINDQUIST, R.; NILSSON, P. M.; ROMAN, G. C.; SELLKE, F. W.; SESHADRI, S. Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia. *Stroke; J. Cerebral Circ.*, 2011, vol. 42, no. 9, p. 2672–271. [ISSN 0039-2499]. Dostupné z: doi:10.1161/STR.0b013e3182299496
- [27] KELLEY, B. J.; KNOPMAN, D. S. Alternative Medicine and Alzheimer's Disease. *Neurolog.*, 2008, vol. 14, no. 5, p. 299–306. [ISSN 1074-7931]. Dostupné z: doi:10.1097/NRL.0b013e318172cf4d
- [28] COOPER, A. J.; MAGNUS, R. V. A placebo-controlled study of pyritinol ('Encephabol') in dementia. *Pharmather.*, 1980, vol. 2, no. 5, p. 317–322. [ISSN 0308-051X].
- [29] FISCHHOF, P. K.; SALETU, B.; RÜTHER, E.; LITSCHAUER, G.; MÖSLINGER-GEHMAYR, R.; HERRMANN, W. M. Therapeutic efficacy of pyritinol in patients with senile dementia of the Alzheimer type (SDAT) and multi-infarct dementia (MID). *Neuropsychobiol.*, 1992, vol. 26, no. 1-2, p. 65–70. [ISSN 0302-282X]. Dostupné z: doi:118898
- [30] *AGAPURIN SR 400, POR TBL PRO 100X400 MG, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online]. Přistoupeno dne 4. ledna 2014. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?kod=0020028>
- [31] *Léčba psychiatrických symptomů – Alzheimerova nemoc* [online]. Přistoupeno dne 4. leden 2014. Dostupné z: <http://www.medicinepg.com/cs/364.html>
- [32] TRIPATHI, A.; SRIVASTAVA, U. C. Acetylcholinesterase: A Versatile Enzyme of Nervous System. *Ann. Neurosci.*, 2010, vol. 15, no. 4, p. 106–111. [ISSN 0972-7531]. Dostupné z: doi:10.5214/95
- [33] SILMAN, I.; SUSSMAN, J. L. Acetylcholinesterase: „classical” and „non-classical” functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2005, vol. 5, no. 3, p. 293–302. [ISSN 1471-4892]. Dostupné z: doi:10.1016/j.coph.2005.01.014
- [34] JEAN, L.; THOMAS, B.; TAHIRI-ALAOUI, A.; SHAW, M.; VAUX, D. J. Heterologous Amyloid Seeding: Revisiting the Role of Acetylcholinesterase in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 2007, vol. 2, no. 7. [ISSN 1932-6203]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0000652
- [35] POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomed. Pap.*, 2011, vol. 155, no. 3, p. 219–223. [ISSN 12138118, 18047521]. Dostupné z: doi:10.5507/bp.2011.036

- [36] DAVIS, K. L.; POWCHICK, P. Tacrine. *Lancet*, 1995, vol. 345, no. 8950, p. 625–630. [ISSN 0140-6736]. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(95)90526-X
- [37] SOUKUP, O.; JUN, D.; ZDAROVA-KARASOVA, J.; PATOCKA, J.; MUSILEK, K.; KORABECNY, J.; KRUSEK, J.; KANIAKOVA, M.; SEP SOVA, V.; MANDIKOVA, J.; TREJTNAR, F.; POHANKA, M.; DRTINOVA, L.; PAVLIK, M.; TOBIN, G.; KUCA, K. A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine. *Curr. Alzheimer Res.*, 2013, vol. 10, no. 8, p. 893–906. [ISSN 1875-5828].
- [38] TEAM, Australian Prescriber Web. *Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease* [online]. Přistoupeno dne 30. listopadu 2013. Dostupné z: <http://www.australianprescriber.com/magazine/19/1/14/7>
- [39] KORABECNY, J.; HAMULAKOVA, S.; JANOVEC, L.; HROUDOVA, J.; FISAR, Z.; GALA, L.; VALKO, M.; GAZOVA, Z.; SIPOSOVA, K.; BABKOVA, K.; NOPOVIMOVA, E.; HOROVA, A.; JUN, D.; HRABINOVA, M.; MUSILEK, K.; SOUKUP, O.; KASSA, J.; SPILOVSKA, K.; DOLEZAL, R.; SEP SOVA, V.; ZEMEK, F.; OPLETALOVA, V.; KUCA, K. *7-Methoxytacrine-Tacrine Heterodimers: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Modeling Studies and Toxicity Assessment of Novel Agents Targeted to Alzheimer's Disease*. Unpublished.
- [40] PRYDE, A.; GILBERT, M. T. *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. B.m.: Springer, 1979. [ISBN 9780412142208].
- [41] KLIMEŠ, J.; SOCHOR, J.; MOKRÝ, M.; KASTNER, P.; PILAŘOVÁ, P. Vysokoučinná kapalinová chromatografie. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Nucleus HK, 2011, s. 36–43. [ISBN 978-80-87009-29-1].
- [42] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M.; BLATNÝ, P.; JANDERA, P.; PLANETA, J.; MAIER, V.; ZNALEZIONA, J. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Lucie Nováková (Hradec Králové), Michal Douša (Klatovy), 2013, s. 12-100. [ISBN 978-80-260-4243-3]
- [43] DAVIS, K. L.; THAL, L. J.; GAMZU, E. R.; DAVIS, C. S.; WOOLSON, R. F.; GRACON, S. I.; DRACHMAN, D. A.; SCHNEIDER, L. S.; WHITEHOUSE, P. J.; HOOVER, T. M. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of tacrine for Alzheimer's disease. The Tacrine Collaborative Study Group. *New Engl. J. Med.*, 1992, vol. 327, no. 18, p. 1253–1259. [ISSN 0028-4793]. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199210293271801
- [44] WONG, A. D.; YE, M.; LEVY, A. F.; ROTHSTEIN, J. D.; BERGLES, D. E.; SEARSON, P. C. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front. Neuroengineer.*, 2013, vol. 6. [ISSN 1662-6443]. Dostupné z: doi:10.3389/fneng.2013.00007