

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Fakulta farmakologie a toxikologie

Efekt L-carnitinu na centrální a periferní  
antiacetylcholinérazovou aktivitu galantaminu

**RIGORÓZNÍ PRÁCE**

Hradec Králové 2006

Martina Erlebachová

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci vypracovala samostatně, pod odborným vedením doc. MUDr. Josefa Herinka, DrSc. a pouze s použitím literatury uvedené v „Seznamu literatury“.

Děkuji na tomto místě doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za pomoc a odborné vedení v průběhu této práce a za nemalé úsilí věnované jejímu zpracování.

## SEZNAM ZKRATEK

ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AD	Alzheimerova demence
AMPA	alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
APP	amyloid prekurzorový protein
CCS	centrální cholinergní systém
CNS	centrální nervový systém
ChAT	cholinacetyltransferáza
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
HEB	hematoencefalická bariéra
L-CAR	L-carnitin
NMDA	N-methyl-D-aspartát

# OBSAH

<b>1. ÚVOD A CÍL PRÁCE .....</b>	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 CHOLINERGNÍ SYSTÉM V CNS A DEMENCE.....</b>	<b>9</b>
2.1.1 ÚLOHA CHOLINESTERÁZ, ZEJMÉNA AChE, V ORGANISMU .....	9
2.1.2 MECHANISMUS INHIBIČNÍHO ÚČINKU .....	12
2.1.3 CHOLINERGNÍ RECEPTORY A AD .....	12
2.1.4 NIKOTINOVÉ RECEPTORY ACETYLCHOLINU .....	13
<b>2.2 FARMAKOLOGIE GALANTAMINU.....</b>	<b>17</b>
2.2.1 PŮVOD A STRUKTURA GALANTAMINU .....	17
2.2.2 ANTICHOLINESTERÁZOVÁ AKTIVITA GALANTAMINU .....	18
2.2.3 MODULACE NIKOTINOVÝCH RECEPTORŮ GALANTAMINEM .....	18
2.2.4 ÚČINKY GALANTAMINU NA CNS .....	19
2.2.5 DALŠÍ FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY NA ORGÁNY A ORGÁNOVÉ SOUSTAVY .....	20
2.2.6 FARMAKOKINETIKA GALANTAMINU .....	20
2.2.7 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY GALANTAMINU .....	21
2.2.8 GALANTAMIN V LÉČBĚ ALZHEIMEROVI DEMENCE .....	21
<b>2.3 FARMAKOLOGIE L-CARNITINU.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 ENDOGENNÍ A EXOGENNÍ PŮVOD L-CAR V TĚLE .....	22
2.3.2 FARMAKOKINETIKA CARNITINU .....	22
2.3.3 BIOLOGICKÝ VÝZNAM CARNITINU .....	23
2.3.4 VÝZNAM CARNITINU V CNS .....	24
2.3.5 ACETYL-L-CARNITIN .....	24
2.3.6 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY L-CAR .....	25
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>27</b>
3.1 USPOŘÁDÁNÍ POKUSU .....	27
3.2 POSTUP PO UKONČENÍ PODÁVÁNÍ TESTOVANÝCH LÁTEK .....	28
3.3 STANOVENÍ AKTIVITY AChE.....	29
3.3.1 PRINCIP METODY.....	29
3.3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	29
3.3.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	29
3.3.4 PRACOVNÍ POSTUP.....	30
<b>4. VÝSLEDKY.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>35</b>
5.1 VÝHODY POUŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVITY AChE.....	35
5.2 EFEKT L-CAR NA AChE A AKTIVITU GALANTAMINU .....	36
5.3 BuChE vs.AChE .....	36
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>38</b>

<b>7. SOUHRN.....</b>	<b>39</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>39</b>

# 1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Demence je získaná porucha kognitivních funkcí s postupným zhoršováním stavu, kdy v pozdních stádiích onemocnění dochází k úplné ztrátě soběstačnosti. Nejčastější formou demence je senilní demence Alzheimerova typu (AD), která představuje 50-80% všech demencí. Incidence AD prudce stoupá s věkem. V současné době jí na světě trpí 17-25 miliónů lidí, u nás se odhaduje počet nemocných na 70000 osob. Ve věku nad 85 let postihuje téměř každého druhého člověka. S prodlužováním střední délky života ve vyspělých zemích roste i riziko vzniku AD (<sup>12, 29</sup>).

AD je závažné komplexní neurodegenerativní onemocnění s mnohými kognitivními a neuropsychiatrickými projevy, které zahrnují poruchy paměti, řeči, chápání, uvažování a orientace v prostoru a čase. Mění se chování pacientů i jejich výkonné (exekutivní) funkce, např. plánování, abstraktní myšlení, rozhodovací schopnost apod. Typickým rysem je postupná progresse postižení, která se začne promítat do každodenního života. Výrazně snižuje kvalitu života starých lidí. V pokročilém stádiu nemoci je pacient zcela odkázán na péči druhé osoby (<sup>14, 25, 29</sup>).

Etiologie AD je stále ještě nejasná, i když existuje řada hypotéz a nejpravděpodobněji se na jejím vzniku podílí více faktorů současně. Kromě věku jsou prokázanými rizikovými faktory vzniku AD genetická zátěž a nositelství alely ApoE e4. Pravděpodobnými rizikovými faktory jsou ženské pohlaví, nízký stupeň vzdělání, hypertenze, poranění hlavy, pití alkoholu, příjem hliníku. Možnými - diskutovanými - ochrannými faktory jsou příjem nesteroidních antirevmatik, postmenopauzální terapie estrogeny a kouření (jehož rizika ovšem znevažují míru případné ochrany proti AD) (<sup>6, 9, 15</sup>).

Výsledky desítek až stovek experimentálních i klinických studií nasvědčují v současnosti tomu, že klíčovým místem pro pochopení AD je centrální cholinergní systém. Všeobecně je za primární příčinu onemocnění pokládán úbytek cholinergních neuronů v Meynertově jádru předního mozku a v septo-hippokampovém systému. Na tomto zjištění je založena strategie léčby AD cílená na podporu zhoršující se cholinergní neurotransmise. V časném stádiu onemocnění je narušena, v souvislosti s degenerativními

změnami projekčních neuronů Meynertova jádra, především presynaptická část cholinergního spojení při relativním zachování postsynaptických receptorů. Postupně bylo experimentálně a klinicky ověřeno několik možností ovlivnění centrálního cholinergního systému, např. podáváním prekurzorů cholinu či přímých agonistů cholinergních receptorů. Dosud nejefektivnějším terapeutickým přístupem je však použití látek ze skupiny inhibitorů acetylcholinesterázy (AChE), které zamezují odbourávání acetylcholinu (ACh) v mozku a zvyšují tak jeho dostupnost pro postsynaptické – především korové - receptory<sup>(12, 14, 25)</sup>.

Do skupiny látek, které se zdají být nadějně v terapii AD patří i alosterický inhibitor AChE a současně modulátor nikotinových receptorů galantamin. L-carnitin (L-CAR) je látka známá svým vlivem na zvýšení transportu některých substancí přes buněčné membrány, navíc má i slabou cholinergní aktivitu. Z těchto důvodů je L-CAR pokládán za vhodného kandidáta pokusů o cílenou biodistribuci farmak do CNS. V interakci galantaminu s L-CAR by mělo dojít ke zvýšení průniku galantaminu přes hematoencefalickou bariéru a tím k dalšímu zesílení jeho centrálního efektu což by umožnilo i redukci terapeutických dávek a následné snížení nežádoucích účinků<sup>(18, 26, 33)</sup>.

Cílem práce je stanovit acetylcholinesterázovou aktivitu ve vybraných částech mozku a zároveň i butyrylcholinesterázovou aktivitu na periférii (v játrech a v plazmě) a to jednak po podání samotného galantaminu, jednak po premedikaci L-CAR. Porovnání případných změn cholinesterázových aktivit v mozku na jedné straně a v periferních orgánech na straně druhé v interakci galantaminu s L-CAR by dovolovalo usuzovat – mimo jiné - o případném zesílení periferních (a tedy spíše nežádoucích účinků) inhibitorů AChE.



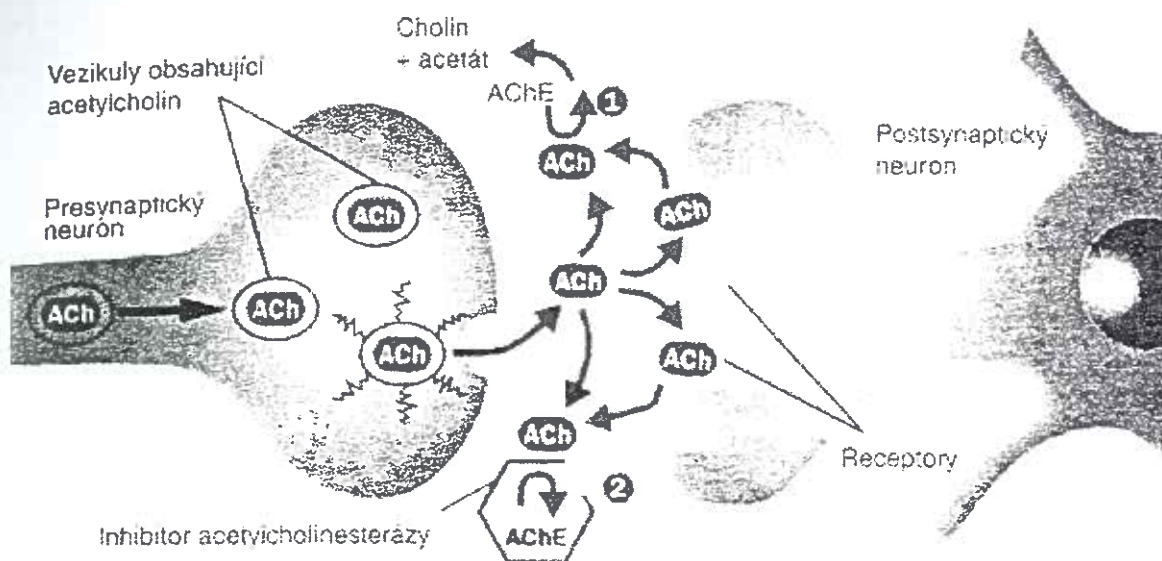
## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 CHOLINERGNÍ SYSTÉM V CNS A DEMENCE**

AD sice postihuje více neurotransmitterových systémů současně, narušení cholinergního systému však časově předchází další neurochemické změny. Bez fyziologického rozmezí neurotransmiteru ACh pak zcela logicky nemohou probíhat ty funkce, které jsou jím zprostředkovány (<sup>9, 12</sup>).

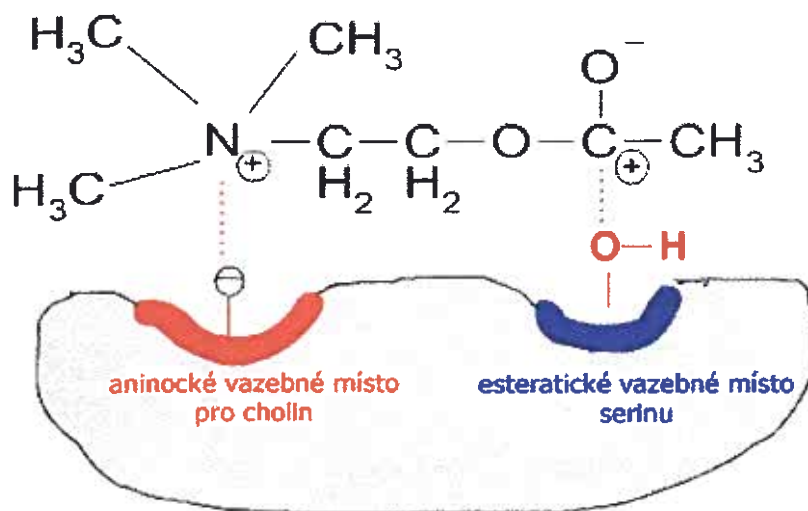
#### **2.1.1 ÚLOHA CHOLINESTERÁZ, ZEJMÉNA AChE, V ORGANISMU**

ACh je vytvářen v neuronech prostřednictvím enzymu cholinacetyltransferázy (ChAT) z cholinu a acetylkoenzymu A – produktu Krebsova cyklu. ACh může stimulovat presynaptické i postsynaptické muskarinové (mAChR) a nikotinové (nAChR) receptory, působit buď jako neurotransmitter nebo jako neuromodulátor uplatňující buď excitační nebo inhibiční účinek na další neurotransmitterové systémy (= kotransmise), anebo může vystupovat v obou těchto rolích současně. Reakce navozené ACh pak opět odeznívají, když je ACh v synaptické štěrbině odbouráván především enzymem AChE, mimo synapse pak převážně periferně účinkující butyrylcholinesterázou (BuChE) na cholin a acetát (<sup>12, 33</sup>).



Obr.1 Schéma hlavních dějů v cholinergní nervové synapsi a funkce inhibitoru AChE (podle Patočky, 1994)

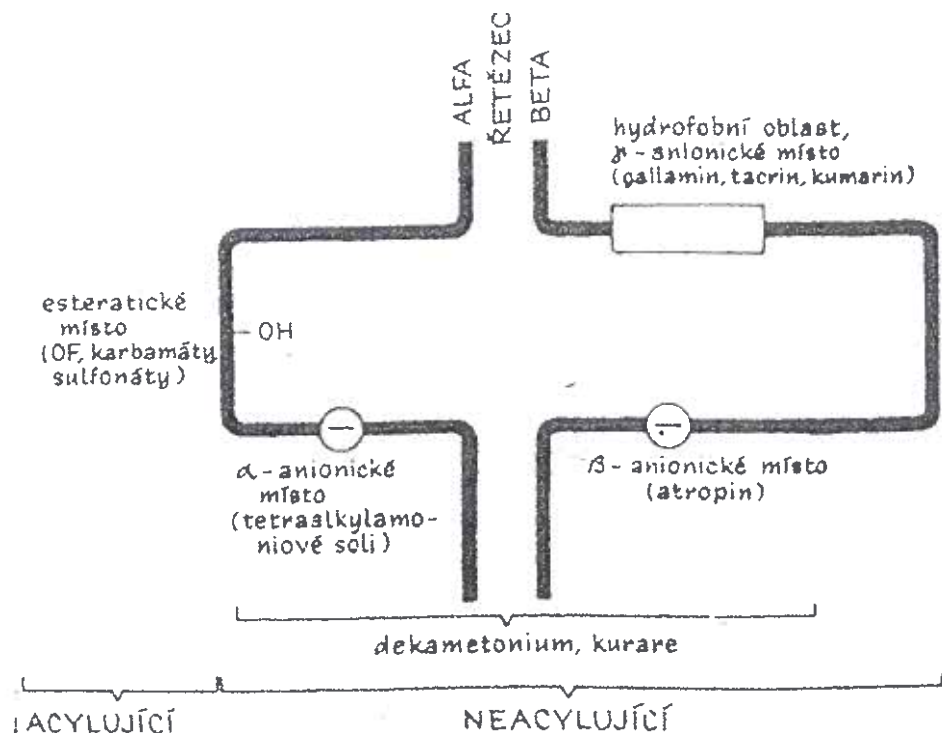
AChE hraje klíčovou roli při přenosu nervového vzruchu v CNS i na periférii. Přírodním substrátem AChE je ACh, který je okamžitě po navázání na receptor rozkládán v těsné blízkosti receptorů. Číslo přeměny AChE je řádově  $10^6 \text{ s}^{-1}$ . Hydrolyza ACh katalytickým působením AChE probíhá ve více stupních. Nejprve je ACh vázán kvartérním dusíkem na alfa anionické místo enzymu a karboxylovou skupinou na esteratické místo. Vzniká komplex enzym-substrát. Odštěpením cholinu vzniká acetylovaný enzym, který reaguje s vodou na komplex kyselina-enzym a ten se spontánně hydrolyzuje na kyselinu a AChE. AChE je pak znovu připravena štěpit další molekulu ACh<sup>(22, 25)</sup>.



Obr.2 Vazebná místa AChE  
(podle Hořejšího, 1998)

V mozku pacientů s AD se zjišťuje snížená aktivita ChAT, enzymu nutného k syntéze ACh, s dysbalancí AChE, enzymu potřebného k degradaci ACh. Zvýšení aktivity všech cholinesteráz bylo obecně zjištěno v depozitech amyloidu (<sup>12, 19</sup>).

Molekula AChE je tetramer složený ze dvou polypeptidových řetězců alfa a dvou beta. Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je tzv. katalytické centrum. To je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu (tzv. esteratické místo) a karboxylovou skupinou kyseliny glutamové (tzv. alfa anionické místo). Na periferním povrchu se nachází také periferní beta anionické místo, tvořené karboxylovou skupinou (tzv. akcelerační místo). V blízkosti esteratického místa leží ještě hydrofobní oblast, tvořená seskupením hydrofobních aminokyselin (tzv. gama anionické místo <sup>22</sup>).



Obr.3 Hypotetická struktura aktivního povrchu AChE  
(podle Navrátila,1989)

## 2.1.2 MECHANISMUS INHIBIČNÍHO ÚČINKU

Inhibitory AChE můžeme rozdělit podle charakteru a místa vazby na aktivní povrch enzymu do dvou skupin: neacylující a acylující inhibitory. Mezi neacylující inhibitory řadíme ty látky, které se vážou na alfa či beta anionické místo nebo na místo hydrofobní. Na toto místo se váže řada sloučenin s hydrofobními vlastnostmi, např. galantamin, takrin. Vazby uplatňující se mezi neacylujícími inhibitory a AChE jsou elektrostatické povahy, mají reverzibilní nebo alosterický charakter. Nejvýznamnější reprezentanty acylujících inhibitorů jsou organofosfáty a karbamáty. Tyto látky reagují s esteratickým místem AChE a acylují je. Vytváří s enzymem kovalentní vazbu <sup>(22)</sup>.

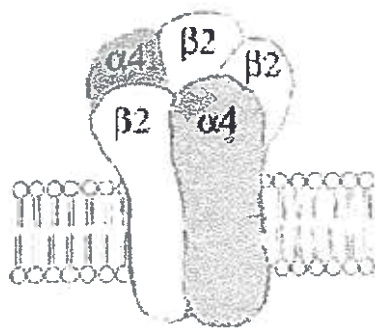
## 2.1.3 CHOLINERGNÍ RECEPTORY A AD

Zřejmá souvislost kognitivních poruch s časnými degenerativními změnami centrálního cholinergního systému (CCS) nastoluje otázku konkrétní participace

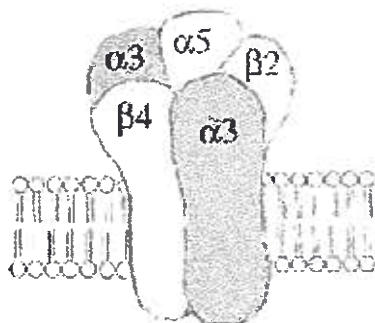
jednotlivých podtypů ACh receptorů a časovou posloupnost jejich případného postižení. Dosavadní poznatky potvrzují preferenční úbytek presynaptických acetylcholinových mAChR typu 2 a nAChR a relativní zachování postsynaptických receptorů, především excitačních mAChR typu 1. Otevřenou terapeutickou otázkou zůstává preference stimulace buď mAChR či nAChR. Úvahy o případném významu nAChR při léčbě AD našly určitou oporu v zjištění protektivního vlivu kouření na výskyt AD ve vysokém věku. Existují také doklady potvrzující relativně časně postižení nAChR cholinergních korových neuronů ve srovnání s mAChR (<sup>6, 16</sup>).

#### **2.1.4 NIKOTINOVÉ RECEPTORY ACETYLCHOLINU**

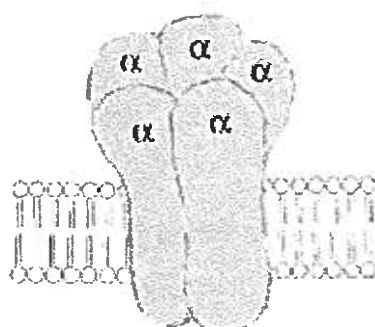
Nikotinový acetylcholinový receptor (nAChR) je ligandem řízený iontový kanál, který umožňuje přenos jak v centrálním, tak v periferním nervovém systému. Je tvořen komplexem pěti podjednotek, které patří podle své odlišné polypeptidové struktury do čtyř skupin, označovaných alfa, beta, gama a delta. U podjednotek prvních dvou typů byly ještě navíc zjištěny různé izoformy, a to 9 $\beta$  u alfa podjednotky a čtyři u beta podjednotky. nAChR jakožto pětičlenné kombinace rozličných podjednotek vykazují velkou diverzitu ve své struktuře, a tudíž i ve funkci (<sup>1, 6</sup>).



$\alpha 4 \beta 2$   
2 ACh vazebná místa



$\alpha 3 \beta 2 \beta 4 \alpha 5$   
2 ACh vazebná místa

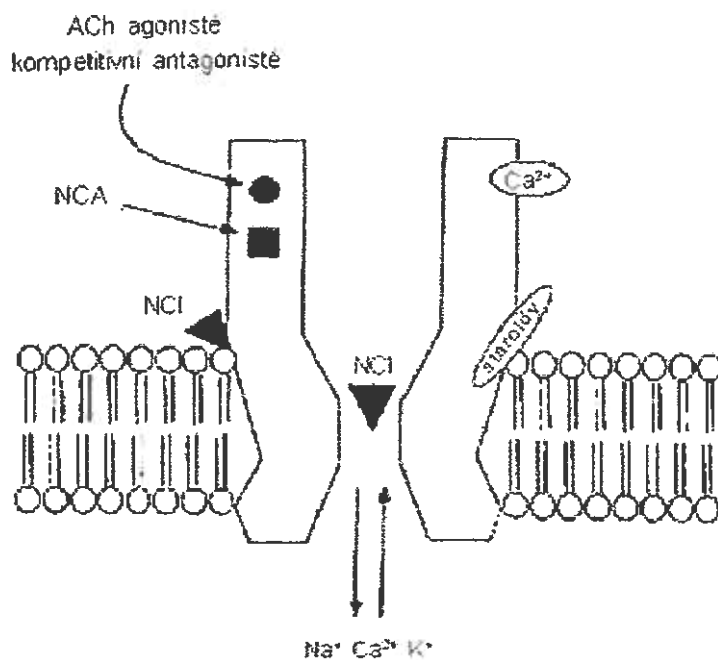


$\alpha 7, \alpha 8, \alpha 9$   
5 ACh vazebných míst

Obr.4 Schéma pentametrické struktury nAChR  
(podle Benešové, 2003)

Periferní nAChR na nervosvalové ploténce kosterních svalů jsou tvořeny podjednotkami  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ , zatímco nAChR na srdci a v gangliích obsahují kombinace podjednotek  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  a  $\beta 4$ . Neuronální nAChR nacházející se v mozku sestávají z různých kombinací podjednotek  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 6$ ) a  $\beta$  ( $\beta 2$  –  $\beta 4$ ). Kromě těchto heterooligomerních nAChR se v CNS nachází homooligomery tvořené z pěti stejných podjednotek ( $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$ ). Podjednotka má na své extracelulární části - kromě

specifického vazebného místa pro ACh - ještě další alosterická vazebná místa pro nekompetitivní aktivátory iontového kanálu (např.: inhibitory cholinesterázy fysostigmin, takrin, galantamin) nebo pro nekompetitivní blokátory (chlorpromazin, fencyklidin), pro  $\text{Ca}^{2+}$  a steroidy (<sup>1, 6, 27</sup>).



Obr.5 Schematický průřez nikotinovým receptorem, znázorňující iontový kanál, vazebné místo pro Ach, kompetitivní agonisty a antagonisty a různá alosterická vazebná místa (podle Benešové, 2003)

Po aktivaci vazebného místa pro ACh dojde k otevření receptorového kanálu pro tok kationtů (Na, K, Ca) na dobu několika milisekund, což vede k depolarizaci membrány a intracelulární signalizaci. Potom se kanál uzavírá buď do stavu klidového nebo stavu desenzitizace, kdy je nAChR refrakterní na dobu několika milisekund až minut. Průběh a dynamická rovnováha mezi těmito třemi konformními stavy nAChR (otevřený kanál, klidové uzavření kanálu, stav desenzitizace) jsou závislé na podjednotkovém složení příslušného nAChR a na druhu i délce působení agonisty (<sup>1, 6</sup>).

Ve srovnání s mAChR je denzita nAChR v lidském mozku nižší. Nacházejí se však nejenom na synapsích vlastního cholinergního systému, ale i na presynaptických terminálách dalších neuronálních systémů v kortexu, hippocampu, thalamu, striatu a

mozečku, kde facilitují nebo modifikují uvolnění jiných transmiterů, především GABA, dopaminu, noradrenalinu, serotoninu a glutamátu (<sup>1,6</sup>).

NACHR přispívají k zajištění optimálního výkonu neuronálních okruhů mozku a k řízení komplexních činností organismu, příkladem může být adaptace na změny prostředí. V experimentálních studiích bylo prokázáno, že prostřednictvím nAChR se realizuje řada fyziologických reakcí, např. udržování vigily, selektivní pozornost, zpracování informací, učení a paměť, stresová reaktivita, spánkové cykly, vývoj závislosti a abstinenčního syndromu (<sup>1,6,27</sup>).

V průběhu ontogenetického vývoje pak dochází ke změnám počtu, funkce a uspořádání nAChR. Vysoká denzita nAChR byla zjištěna již v průběhu fetálního vývoje. Srovnání exprese nAChR na úrovni mozkové kůry a mozečku ukázalo, že v průběhu života dochází k signifikantnímu poklesu podjednotek  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 4$ , zatímco výskyt podjednotky  $\alpha 3$  se nemění a u podjednotky  $\beta 3$  byl v kortexu zaznamenán signifikantní vzestup. Přítomnost nAChR v časném prenatálním vývoji naznačuje jejich význam pro tvorbu a modulaci synaptogenetických procesů (<sup>6,27</sup>).

Studie mozků pacientů s AD ukázaly, že u této choroby dochází k signifikantnímu úbytku nAChR v kortexu, hippocampu i dalších oblastech CNS. Změny mAChR naopak nejsou výrazné a vyskytují se nepravidelně. Deficit nAChR se týká hlavně podjednotky  $\alpha 4$  (30-50%), menší ztráty pro podjednotky  $\alpha 3$  a  $\alpha 7$ . Ubývání denzity nAChR koreluje významně se stupněm demence u AD. Zlepšení kognitivních výkonů po terapii těchto pacientů inhibitory AChE bylo spojeno se zvýšením denzity nAChR. Aktivace neuronálních nAChR se tedy jeví jako racionální cíl terapie AD (<sup>6</sup>).

Samotný nikotin není pro terapii AD vhodný vzhledem k svým NÚ (především kardiovaskulárním). Skupinou vhodnějších kandidátů léčby představují nikotinové agonisté, kteří působí preferenčně jako ligandy na alosterických vazebných místech neuronálních, případně ploténkových nAChR. Takovou látkou je právě galantamin (<sup>6</sup>). Již po týdenním podávání galantaminu starým laboratorním potkanům byla prokázána zvýšená denzita nikotinových acetylcholinových receptorů (<sup>5</sup>).



## 2.2 FARMAKOLOGIE GALANTAMINU

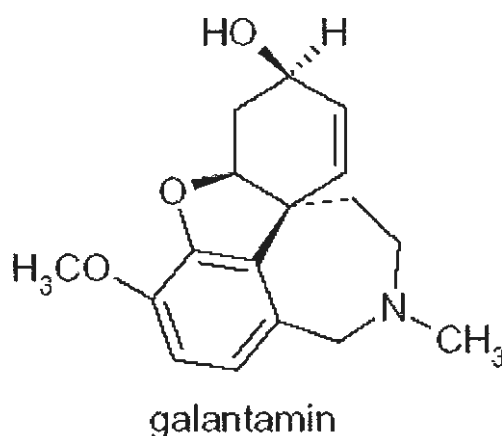
### 2.2.1 PŮVOD A STRUKTURA GALANTAMINU

Galantamin je alkaloid izolovaný z hlíz sněženky *Galanthus woronowii* a *Galanthus nivalis*. Nachází se i v jiných rostlinách čeledi Amaryllidaceae jako jsou bledule, narcisy a amarylky. Pro komerční účely se získává z *Leucojum aestivum*. V lékařství je známý již asi 50 let. Byl používán jako antagonist tubokurarinového účinku na nervosvalové ploténce a v léčbě myasthenia gravis nebo paralýz po dětské obrně (<sup>6,11</sup>).

Galantamin má duální účinek, neboť působí jednak jako inhibitor AChE – tedy podobně jako v současné době užívané léky pro terapii AD – tj. takrin (Cognex), donepezil (Aricept) nebo rivastigmin (Exelon), jednak jako alosterický modulátor nAChR. Galantamin prošel klinickými zkouškami a nyní je na trhu k dispozici jako přípravek Reminyl (<sup>6</sup>).

Má strukturu terciárního aminu fenantrenové řady, tudíž snadno proniká hematoencefalickou bariérou (HEB) a zvyšuje tak centrální cholinergní transmissi.

Vzorec:



## 2.2.2 ANTICHOLINESTERÁZOVÁ AKTIVITA GALANTAMINU

Galantamin je selektivní, kompetitivní a reverzibilní inhibitor AChE, tzn. že soutěží s ACh o vazbu na tento enzym. Váže se na acetylové i cholinové vazebné místo. Tím dochází ke zvýšení synaptické koncentrace ACh a následné stimulaci nAChR a mAChR. Účinnost galantaminu je závislá na koncentraci ACh, čím je tato vyšší, tím je nižší inhibice AChE. Vysoké koncentrace ACh vedou negativní zpětnou vazbou k útlumu aktivity ChAT a k snížení syntézy ACh (<sup>24, 33, 36</sup>).

Galantamin je 50-60x silnější inhibitor AChE než BChE a 10x více inhibuje AChE v lidských erytrocytech ve srovnání s CNS (<sup>11, 36</sup>).

Inhibice AChE zřejmě brání vzniku toxického komplexu AChE+  $\beta$ -amyloidu a ukládání beta amyloidu (APP), což je degenerativní bílkovina přítomná v mozku nemocných AD tvořící základ tzv. senilních plaků. (<sup>12, 33</sup>)

## 2.2.3 MODULACE NIKOTINOVÝCH RECEPTORŮ GALANTAMINEM

Galantamin působí na nAChR jako alosterický modulátor, nikoli agonista. Proto spíše senzitivizuje nAChR v CNS, svalech a gangliích ke klasickým agonistům a to jen tehdy, je-li podán v určitém časovém předstihu před nimi (<sup>24, 33, 36</sup>).

Presynaptická aktivace nAChR zvyšuje uvolňování ACh. Protože dochází k aktivaci nAChR i na jiných neuronech než čistě cholinergních, uvolňují se i další neurotransmitery jako jsou GABA, glutamát, noradrenalin, dopamin, serotonin. Aktivací nAChR na glutamátových neuronech např. dochází k uvolňování glutamátu a ten prostřednictvím AMPA a NMDA receptorů stimuluje tvorbu neurotrofního růstového hormonu (NGF) v buňkách hippocampu (<sup>33</sup>).

Aktivací postsynaptických nAChR galantamin zesiluje cholinergní neurotransmisi (uvolnění ACh). Nikotinová agonisté a galantamin zvyšují uvolňování solubilního non-amyloidogenního prekurzoru APP, který chrání neurony před neurotoxicitou nerozpustného beta amyloidu (pravděpodobně expresí antiapoptických proteinů Bcl-2 a

Bcl-x).5 Zvýšené uvolňování APP vyvolávají i další inhibitory cholinesteráz jako fysostigmin, eptastigmin či metrifonát. Stimulace ionotropních nAChR galantaminem může vést k neuroprotektivnímu efektu a to zřejmě úpravou dysbalance cytosolového kalcia (<sup>33</sup>).

## 2.2.4 ÚČINKY GALANTAMINU NA CNS

- a) Galantamin jakožto terciární amin snadno prochází HEB a ovlivňuje různé funkce mozku. Ve studiích s dobrovolníky byl základě elektroencefalogramového (EEG) záznamu prokázán jeho mírný analeptický efekt a především centrálně stimulační účinky. U spících zkracuje REM fázi spánku a blokuje hluboká („delta“) stadia nonREM spánku. Ve srovnání s neostigminem galantamin rychleji obnovuje návrat vědomí v postanestetickém stádiu. Galantamin sice antagonizuje účinek analgetik morfinového typu (dochází např. ke zkrácení útlumu navozeného morfinem), na druhé straně má však vlastní analgetickou aktivitu podobnou morfinu (opioidní analgezie), protože ji lze antagonistovat naloxonem (<sup>11</sup>).
- b) Galantamin nemá přesně definovaný účinek na chování. Vyšší dávky galantaminu byly spojeny s fibrilací kosterního svalstva a samovolnými pohyby. U pokusných zvířat zesiluje retenci naučeného chování. Klinické studie prokázaly účinnost a prospěšnost galantaminu na paměť u nemocných s AD, která ovšem není statisticky výrazná. Pro potvrzení tohoto efektu je zapotřebí více kontrolovaných studií s většími soubory pacientů. Galantamin přispívá ke zlepšení kognitivních, funkčních a behaviorálních symptomů u pacientů s AD (<sup>11</sup>).
- c) Byl také testován vliv galantaminu na různé cholinergní mechanismy po experimentálním narušení oblasti motorické kůry. Galantamin prodlužoval negativní účinky antagonistů mAChR a nAChR. Korová neuronální plasticita, řídicí funkční obnovu, může – mimo jiné faktory - rovněž záviset na cholinergní transmissi zahrnující mAChR (<sup>11</sup>).
- d) Některé psychické poruchy jsou způsobeny nepoměrem hladin mezi monoaminy a ostatními transmittery v mozku. Mánie je např. spojena s nízkými koncentracemi

monoaminů v mozku a také s nízkou aktivitou cholinergní transmise. Existují důkazy o tom, že galantamin rychle zlepšoval symptomy u pacientů s manickými a schizofrenními poruchami (<sup>11</sup>).

## 2.2.5 DALŠÍ FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY NA ORGÁNY A ORGÁNOVÉ SOUSTAVY

- a) Galantamin, jakožto parasymptomimetikum, může mít vagotonický účinek na srdeční frekvenci projevující se bradykardií. Rizikovými jsou v tomto případě pacienti se „sick sinus“ syndromem nebo se supraventrikulárními poruchami rytmu (<sup>11, 24</sup>).
- b) Dalším účinkem galantaminu je vyplavení ACTH (adrenokortikotropinu) díky aktivaci hypothalamo-hypofyzární osy, které má za následek zvýšení plazmatické hladiny kortizolu (<sup>11</sup>).
- c) Galantamin ve formě očních kapek výrazně snižuje nitroční tlak. Pro tyto farmakokinetické vlastnosti by mohl být využit v terapii glaukomu (<sup>11</sup>).

## 2.2.6 FARMAKOKINETIKA GALANTAMINU

Po perorálním podání se galantamin rychle a dobře vstřebává. Maximální koncentrace v krvi je dosaženo za 0,5-2 h po požití. Biologická dostupnost je 88,5%, tedy velmi vysoká. Podání galantaminu zároveň s jídlem sice poněkud snižuje rychlost absorpce, aniž by ovlivnilo její rozsah. Vazebnost na plazmatické proteiny je nízká – okolo 18% - a tedy bezvýznamná. Plazmatické koncentrace galantaminu u nemocných s AD jsou o 30-40% vyšší než u zdravých jedinců. Jak již bylo řečeno galantamin snadno prochází HEB a jeho hladina v CNS je 3x vyšší než v krvi. Střední distribuční objem činí 175 l. Přibližně 75% podaného galantaminu je substrátem jaterních cytochromů CYP2D6 a CYP3A4. Některé z jeho metabolitů jsou sice účinné v podmínkách in vitro, avšak jejich klinický efekt je nevýznamný. Eliminuje se hlavně močí a okolo 20% z podané dávky se

vylučuje nezměněno. Clearance u cílové populace je přibližně 200ml/min. Poločas eliminace je 7-8 hod (<sup>7, 11, 17, 20, 24, 36</sup>).

## 2.2.7 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY GALANTAMINU

Hlavní nežádoucí účinky jsou obecně spojeny s cholinergními vlastnostmi galantaminu. Mezi nejčastější patří nauzea, zvracení, průjem, bolesti břicha, bolesti hlavy, únava. V první fázi léčby se objevují závratě, zvýšené slinění, zvracení, střevní obtíže a střední stupeň bradykardie. Poměrně významným nežádoucím efektem je pokles hmotnosti a ztráta chuti k jídlu u pacientů s AD, kteří sami o sobě ztrácejí zájem o jídlo. S tím může souviset již zmiňovaná stimulace ACTH a přechodně zvýšená hladina kortizolu v plazmě. Nežádoucí účinky mohou být tlumeny periferními anticholinergiky (N-methylskopolamin), většinou jsou mírné, přechodné a závislé na dávce. Žádná z dostupných studií neprokázala mutagenní či teratogenní potenciál galantaminu. Opravdu závažné nežádoucí účinky galantaminu jsou mimořádně vzácné. Pouze po i.v. podání byly zaznamenány ojedinělé případy kontrolovatelné pooperační apnoe (<sup>11, 24, 28, 36</sup>).

## 2.2.8 GALANTAMIN V LÉČBĚ ALZHEIMEROVY DEMENCE

Galantamin představuje poměrně nadějnou alternativu léčby mírné a střední AD díky své výhodné kombinaci farmakologického efektu a účinnosti jak bylo uvedeno výše.

Oproti farmakologickému profilu takrinu se galantamin vyznačuje řadou příznivých vlastností:

- velmi vysokou biologickou dostupností po p.o. podání,
- biologickým poločasem umožňujícím podání dvakrát či třikrát denně, což zajišťuje dobrou compliance,
- kompetitivní a vysoce specifickou inhibicí AChE

Návrh na využití galantaminu v léčbě AD pochází z r. 1986, první klinická studie u lidí byla publikována v roce 1989.

Léčebně je využíván několik desetiletí bez známek jakékoliv kumulativní toxicity. Proto se jeví velice slibnou alternativou v rámci druhé generace látek určených k léčbě AD<sup>(28, 34)</sup>.

## **2.3 FARMAKOLOGIE L-CARNITINU**

### **2.3.1 ENDOGENNÍ A EXOGENNÍ PŮVOD L-CAR V TĚLE**

L-CAR (kvarterní amin-3-hydroxy-4-N-aminobutyát), dříve označovaný jako vitamín B<sub>7</sub>, je ze 30% syntetizován v těle ze dvou esenciálních aminokyselin – lysinu a methioninu, zbytek je dodáván potravou. Všechny tkáně v těle mohou produkovat deoxycarnitin, ale enzym, který v pátém stupni přeměny konvertuje deoxycarnitin na konečný produkt carnitin, se nachází jen v játrech, mozku a ledvinách. K jeho tvorbě je zapotřebí vitamín C, pyridoxin (vitamín B<sub>6</sub>), niacin a železo.

Při průmyslové výrobě vzniká L- i D- forma carnitinu. V přírodě se však vyskytuje jen L-forma, která je biologicky aktivní. D-CAR, pravotočivá neúčinná a toxická forma, kompetitivně inhibuje L-CAR a může vyvolat jeho nedostatek.<sup>(31, 35)</sup>

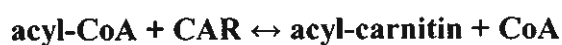
### **2.3.2 FARMAKOKINETIKA CARNITINU**

Absorpce L-CAR z duodena a jejunu do systémové cirkulace je odhadována asi na 5-15%. Probíhá aktivním procesem pomocí speciálního bílkovinného přenašeče, méně významný je pak pasivní přenos. Vstřebávání negativně ovlivňuje nedostatek Na<sup>+</sup> iontů, přítomnost D-CAR a acetylcarnitinu. Většina p.o. podaného carnitinu nedosáhne krevního řečiště. I přesto je možné zvýšení jeho plazmatické hladiny po p.o. podání o 50%. Velký nárůst plazmatické koncentrace carnitinu souvisí s relativně vysokým ledvinovým prahem.

Volný carnitin je filtrován v glomerulech a z 90% v tubulech ledvin reabsorbován. Tubulární reabsorbce acyl carnitinu je silně omezena. Tento mechanismus zajišťuje až 8x vyšší clearance carnitinu (<sup>31, 32, 35</sup>).

### 2.3.3 BIOLOGICKÝ VÝZNAM CARNITINU

L-CAR hraje důležitou roli v buněčném metabolismu. Jeho úkolem je zajistit adekvátní zásobení Krebsova cyklu acetyl-CoA a to jak z pyruvátdehydrogenázového systému, tak především z  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. L-CAR zajišťuje přenos mastných kyselin do mitochondriální matrix, kde podstupují beta-oxidaci. Tento proces je sdružen s tvorbou acyl-carnitinu. Z cytosolu je L-CAR transportován kyvadlovým mechanismem přes mitochondriální membránu na její vnitřní stranu. Navazuje na sebe acyl skupiny mastných kyselin, které přebírá od acyl-CoA podle rovnice:



Tato rovnice probíhá oběma směry. Na vnější mitochondriální membráně pomocí carnitinpalmitoyltransferázy se přenesou acyl skupina z acyl-CoA na L-CAR, ten projde přes zevní membránu mitochondrie a přenesou acyl skupinu na CoA a tak uvolněný L-CAR se opět vrací na zevní stranu membrány. Tento děj se opakuje. Návrat L-CAR a acyl-carnitinu přes vnitřní mitochondriální membránu umožňuje carnitintranslokáza (<sup>13, 31, 35</sup>).

Další funkcí L-CAR je odstraňování toxických acylových skupin z mitochondriální matrix do cytosolu a dále do krevního řečiště prostřednictvím acyl-carnitinu. Moduluje poměr acyl-CoA/CoA.

L-CAR ovlivňuje také oxidaci glukózy. Ta je primárně závislá na intramitochondriálním poměru mezi acyl-CoA a CoA. Právě tento poměr je regulován L-CAR, který tak rozhoduje, bude-li přednostně stimulována beta-oxidace tuků nebo oxidace glukózy. Snížením intramitochondriálního poměru acyl-CoA/CoA je zvýšena aktivita pyruvátdehydrogenázového systému a energie se pak získává alternativním pochodem z glykogenu nebo z glukózy.



Nejsou-li při nedostatku L-CAR mastné kyseliny odbourávány, zvyšuje se v cytosolu jejich koncentrace, což působí toxicky. Snižuje se hladina  $K^+$  iontů, zvyšuje se hladina intracelulárních  $Na^+$  a  $Ca^{2+}$  iontů. Buněčné membrány trpí edémem, dochází k poruše poměru ATP/ADP, vznikají produkty oxidace a peroxidace lipidů, což vede k nekróze buňky (<sup>31, 35</sup>).

#### 2.3.4 VÝZNAM CARNITINU V CNS

L-CAR – přirozená součást savčí tkáně - je známý tím, že zvyšuje průnik některých látek nebo chemických skupin biologickými bariérami a buněčnými membránami. Z tohoto důvodu je pokládán za vhodného kandidáta pokusů o cílenou biodistribuci farmak do CNS. I když chybí jistý důkaz o tom, že by L-CAR byl přímým neurotransmiterem, byla pozorována jeho slabá cholinomimetická aktivita. Tato aktivita zřejmě souvisí se stimulačním působením L-CAR na aktivitu ChAT. Sám L-CAR nemá vliv na AChE aktivitu. Mozek je energeticky závislý především na glukóze, zatímco mitochondriální oxidace mastných kyselin o dlouhých řetězcích má menší význam. Centrální metabolická funkce L-CAR se proto více uplatňuje ve stimulaci glykolýzy a následném ovlivnění excitačních funkcí.

Transport L-CAR do mozku nastává komplexním, doposud ne zcela objasněným, mechanismem. Předpokládá se, že zčásti probíhá Na/Cl kotransportem, možnou obdobou GABA-transportu, a je tedy závislý na rovnováze  $Na^+$  a  $Cl^-$  iontů. Proto může zřejmě probíhat i přes GABA transportér. Tento příjem je kompetitivně inhibován acetyl-carnitinem a GABA. Příjem L-CAR může být rovněž potlačen některými aniony např. glukonátovými a iziothionátovými (<sup>13, 31, 35</sup>).

#### 2.3.5 ACETYL-L-CARNITIN

Acetyl-L-carnitin je acetylovaná forma L-CAR. Je rovněž přirozenou komponentou savčí tkáně, syntetizovaný v ledvinách, mozku a játrech enzymem LAC transferázou. Usnadňuje přenos acetyl-CoA do mitochondrií během oxidace mastných kyselin. Zvyšuje tvorbu ACh a stimuluje syntézu membránových fosfolipidů. (<sup>8</sup>)



Snadno proniká HEB a ovlivňuje hypothalamo – hypofyzární – adrenokortikální osu. Vlastní farmakologické ovlivnění mozku není přesně objasněno, obecně je však hodnoceno jako protektivní. V mitochondriích syntetizovaný acetyl-L-CAR poskytuje acetyl skupinu pro syntézu ACh. Jako látka chemicky blízká ACh se může malou měrou podílet na cholinergním přenosu. Je pravděpodobné, že acetyl-L-CAR facilituje odpověď neuronů na ACh.

Podávání acetyl-L-CAR synchronizuje neuronové populace, modifikuje EEG záznam a evokované potenciály. Má schopnost optimalizovat mozkové funkce, působí preventivně proti poškození CNS stresem a hypoxií.

U pacientů s AD byl prokázán příznivý efekt acetyl-L-CAR na klinický obraz i na biochemické parametry (hladiny vysokoenergetických fosfátů – fosfomonoesterů). U pacientů, kteří po jeden rok užívali denně 3g acetyl-L-CAR, bylo pozorováno menší zhoršení mentálních funkcí. Acetyl-L-CAR zlepšuje paměť a mírní depresi, je bezpečný, bez nežádoucích účinků. Zdá se, že časně a rychle progredující formy AD reagují příznivěji na podávání acetyl-L-CAR než formy s pozdním začátkem, dosavadní výsledky kontrolovaných klinických studií však rozhodně nedovolují jednoznačné závěry o prokázaném terapeutickém efektu samotného L-CAR či acetyl-L-CAR u AD<sup>(31, 35)</sup>.

### **2.3.6 ANTIOXIDAČNÍ ÚČINKY L-CAR**

Jelikož věk je hlavní rizikový faktor neurodegenerativních nemocí, byl stárnoucí mozek podroben rozsáhlému výzkumu. Primární příčinou, ve smyslu teorie volných radikálů, která vede k procesu stárnutí organismu a následné smrti, je nekontrolovatelná produkce právě volných radikálů. Ty jsou schopné zničit součásti buněk (proteiny, lipidy a DNA).

Mozek je citlivější k oxidačnímu poškození díky různým faktorům jako je vysoké využití kyslíku, větší množství oxidovatelných polynenasycených mastných kyselin náchylných k lipidové peroxidaci, relativní nedostatek antioxidačního ochranného systému.

Ve studii zveřejněné roku 2006 byla starým krysám současně podávána kyselina alfa-lipoová a L-CAR v určených dávkách. Po třiceti dnech poklesl stupeň oxidačního stresu. Podání samotného L-CAR nemělo tak výrazný efekt (<sup>21</sup>).

K poklesu hladin lipidových peroxidů dochází díky příznivým vlastnostem L-CAR - chelataci a ochraně před lipoperoxidací. (<sup>13,21</sup>)

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 USPOŘÁDÁNÍ POKUSU

K pokusům bylo použito celkem 42 samců laboratorního potkana kmen Wistar albino, konvenčního chovu, krmených peletovanou standardní Larsenovou dietou a s přísunem vody ad libitum. Hmotnostní rozpětí zvířat se v době pokusu pohybovalo v rozmezí 220-260 gramů (<sup>26</sup>).

Zvířata byla rozdělena do sedmi skupin po šesti jedincích.

**Kontrola:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. podáván fyziologický roztok, a to v dávce 0,1ml/100g váhy.

**2,5mg/kg Galantamin:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. galantamin, a to v dávce 2,5mg/kg váhy, bez předchozí premedikace L-CAR.

**5mg/kg Galantamin:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. galantamin, a to v dávce 5mg/kg váhy, bez předchozí premedikace L-CAR.

**10mg/kg Galantamin:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. galantamin, a to v dávce 10mg/kg váhy, bez předchozí premedikace L-CAR.

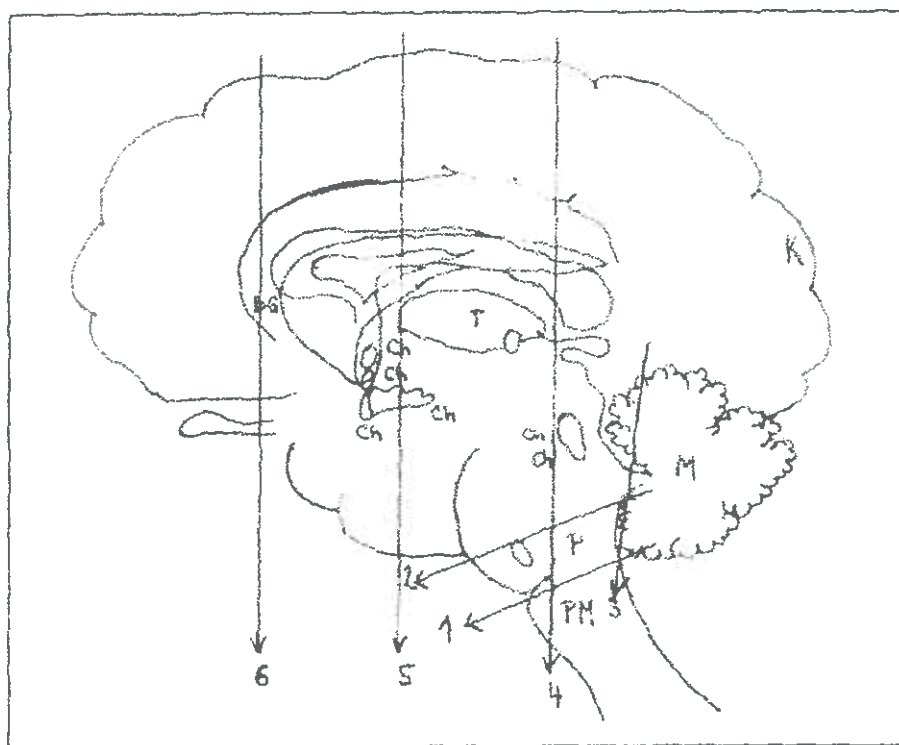
**20mg/kg Galantamin:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. galantamin, a to v dávce 20mg/kg váhy, bez předchozí premedikace L-CAR.

**2,5mg/kg Galantamin + 200 L-CAR:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. podáván L-CAR, a to v dávce 200mg/kg váhy. Třetí den pak 30 minut po poslední dávce L-CAR podán i.m. galantamin v dávce 2,5mg/kg váhy.

**10mg/kg Galantamin + 200 L-CAR:** Skupině šesti zvířat byl po tři následující dny p.o. podáván L-CAR, a to v dávce 200mg/kg váhy. Třetí den pak 30 minut po poslední dávce L-CAR podán i.m. galantamin v dávce 10mg/kg váhy.

### 3.2 POSTUP PO UKONČENÍ PODÁVÁNÍ TESTOVANÝCH LÁTEK

Hodinu po ukončení pokusu byly odebrány vzorky vybraných částí mozku, jater a plazmy, solubilizérem zhomogenizovány a změřeny. Byla stanovena aktivita AChE metodou podle Ellmana a spol. (<sup>10</sup>), a to v homogenátech frontální kůry, hippocampu, septa, bazálních ganglií a hypofýzy. Periferní orgány pro stanovení aktivity cholinesterázy (BuChE) byly homogenizovány celé. Aktivita vyšetřovaných enzymů byla vyjádřena v nmol/min/100mg vlhké tkáně.



Obr.6 Lokalizace řezů mozkovou tkání

### 3.3 STANOVENÍ AKTIVITY AChE

#### 3.3.1 PRINCIP METODY

Aktivitu AChE jsme stanovovali spektrofotometrickou metodou využívající jako substrát acetylthiocholin jodid, který je AChE štěpen na thiocholin a kyselinu octovou. Stanovuje se SH-skupina thiocholinu, která se naváže na 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinu (DTNB). Její zbytek - 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina - je fotometrován při vlnové délce  $\lambda=412\text{nm}$  (metoda je modifikací klasické Ellmanovy metody pro stanovení aktivity cholinesteráz<sup>(3)</sup>). V případě BuChE byl jako substrát použit butyrylthiocholin jodid<sup>(2)</sup>.

#### Metodika statistického hodnocení

Hodnoty jsou udávány se směrodatnou odchylkou,  $\pm$  SD. Statistická signifikace byla spočítána Studentovým testem na 5% hladině statistické významnosti.

#### 3.3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY

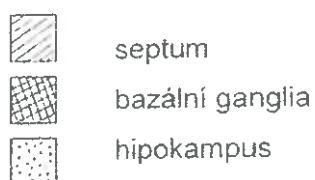
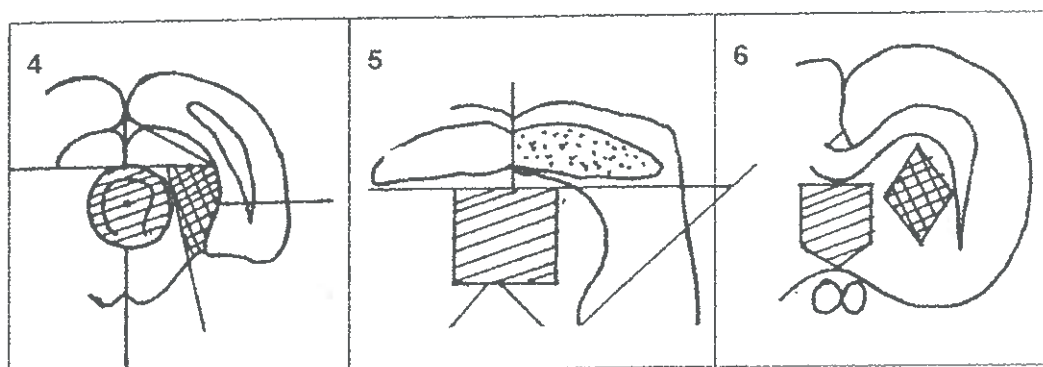
- 0,2 M TRIS-HCl pufr:  
24,2 g 1,1,1-tris-(hydroxymethyl) aminomethan (Lachema Brno, ČR) se rozpustí v 1000 ml destilované vody. 50 ml tohoto roztoku se smíchá s 38,4 ml 0,2 M HCl, doplní se destilovanou vodou na 200 ml a pH se upraví na 7,6.
- DNTB – činidlo na SH-skupiny:  
0,1g DNTB (Serva Heidelberg, SRN) se rozpustí v 50 ml 0,2 M TRIS pufru.
- Substrát: 0,029 g acetylthiocholin jodidu, nebo butyrylthiocholin jodidu (Lachema Brno) se rozpustí v 10,1 ml destilované vody.
- Kalibrační roztok: vodný roztok cystein – HCl (Koch – Light Lab., GB) v koncentracích od  $1 \cdot 10^{-5}$  do  $5 \cdot 10^{-5}$  M.
- Vzorek pro měření: 1 mg homogenátu mozkové tkáně/ 1 ml destilované vody.

#### 3.3.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Spektrofotometr UVIKON 942 (firmy Kontron Instrum.), skleněné kyvety
- Torzní váhy (Meopta Praha)
- Homogenizátor Ultra Turrax (firmy Janke Kunkel, Švýcarsko)

### 3.3.4 PRACOVNÍ POSTUP

Z řezů mozkové tkáně laboratorního potkana se připraví homogenát (1 mg mozkové tkáně/ 1 ml destilované vody)



Obr.7 Řezy mozkovou tkán

Do kyvety se k 1 ml homogenátu přidá 0,4 ml DNTB a 0,4 ml TRIS pufru. Reakce je zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Fotometruje se při 412 nm a registruje se změna ( $\Delta$ ) absorbance. Pro kalibraci se místo homogenátu do kyvety pipetuje roztok různých

koncentrací cysteinu. Fotometruje se proti slepému vzorku, který je zpracován stejně, jen je místo cysteinu přidána destilovaná voda.

Z hodnot absorbance bylo odečítáno a zaznamenáváno odpovídající množství SH-skupin v nmolech v reakční směsi (<sup>26</sup>).

## 4. VÝSLEDKY

Změny aktivity AChE byly určovány v homogenátech (1:10) následujících částí mozku potkana: frontální kůra (FC), hippokampus (H), septum (S), bazální ganglia (BG) a hypofýza. Změny aktivity BuChE byly stanovovány v homogenátech plazmy a jater potkana. Aktivity byly vyjádřeny v ncat/mg vlhké tkáně. Směrodatné odchylky nebyly větší než 14,5%.

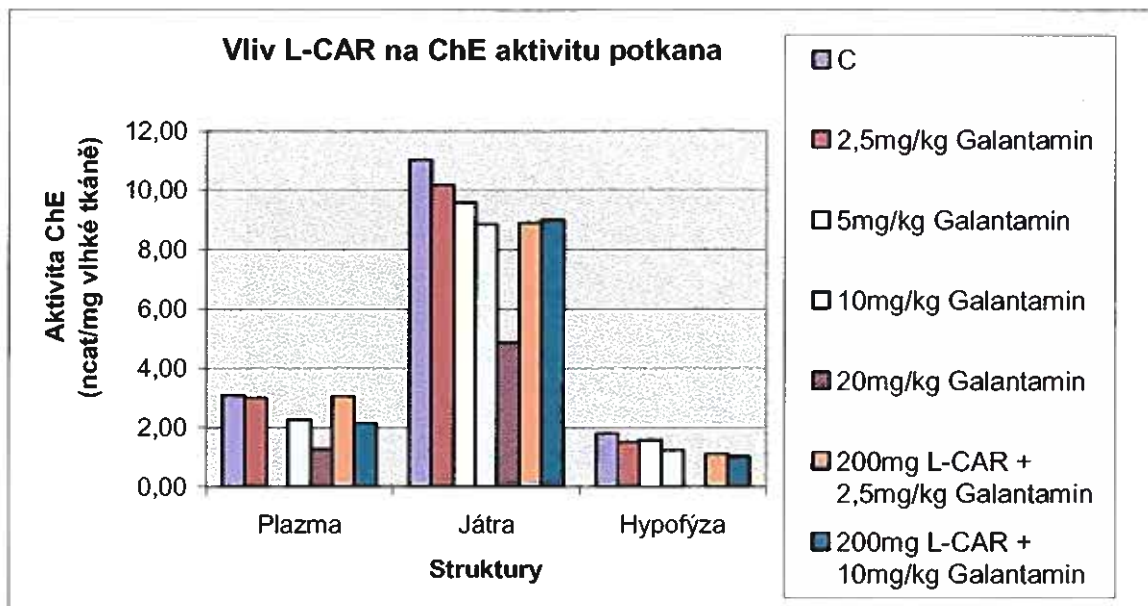
Skupina	Plazma	Játra	Hypofýza
C	3,10	11,04	1,80
2,5mg/kg Galantamin	3,00	10,19	1,50
5mg/kg Galantamin	-	9,60	1,59
10mg/kg Galantamin	2,27	8,86	1,22
20mg/kg Galantamin	1,26*	4,86*	-
200mg L-CAR + 2,5mg/kg Galantamin	3,06	8,91	1,12
200mg L-CAR + 10mg/kg Galantamin	2,14	9,03	1,02

Tabulka 1: Změny v aktivitě – efekt L-CAR na BuChE (játra, plazma) a AChE (hypofýza) aktivitu i.m. podaného galantaminu ve vybraných strukturách periferie a hypofýzy

C -kontrola : podání pouze fyziologického roztoku

\* -statisticky významné změny aktivity cholinesteráz u pokusných skupin proti kontrole C

\*\* -statisticky významné změny aktivity cholinesteráz po premedikaci L-CAR+galantamin (10 mg/kg) proti samotnému galantaminu (10 mg/kg)



Graf 1: Vliv L-CAR na BuChE/AChE aktivitu u potkana ve vybraných strukturách

Skupina	FC	H	S	BG
<b>C</b>	425,26	252,74	749,36	1519,87
<b>2,5mg/kg Galantamin</b>	406,93	256,00	744,71	1542,21
<b>5mg/kg Galantamin</b>	422,86	268,50	755,36	1667,50
<b>10mg/kg Galantamin</b>	353,00*	231,79	730,43	1579,14
<b>20mg/kg Galantamin</b>	198,86*	131,71*	391,80*	1059,43*
<b>200mg L-CAR + 2,5mg/kg Galantamin</b>	390,57*	247,71	722,29*	1433,29
<b>200mg L-CAR + 10mg/kg Galantamin</b>	289,57**	205,71*	668,86**	1425,14

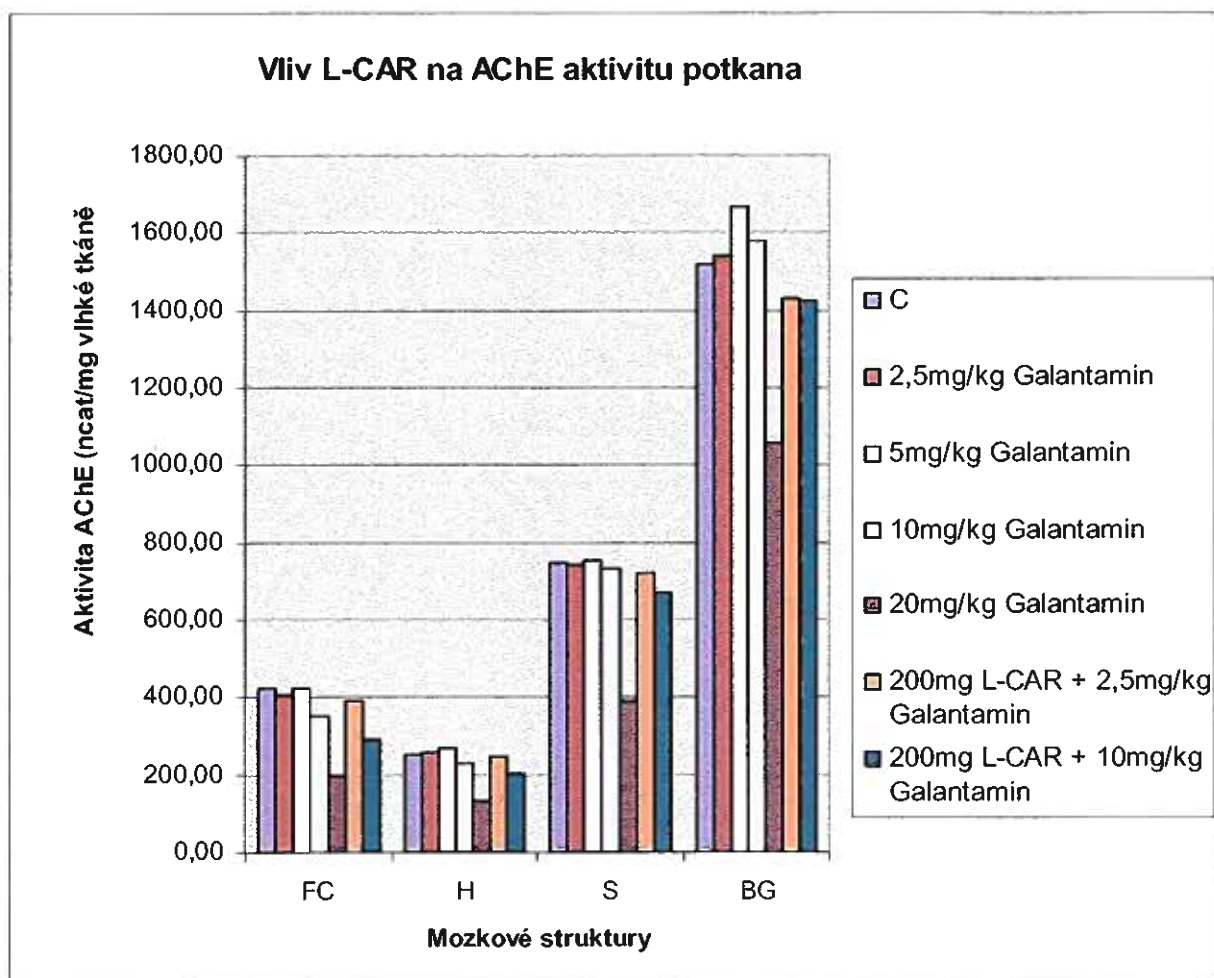
Tabulka 2: Změny v aktivitě – efekt L-CAR na AChE aktivitu i.m. podaného galantaminu v mozkových strukturách



C -kontrola : podání pouze fyziologického roztoku

\* -statisticky významné změny aktivity cholinesteráz u galantaminu proti kontrole

\*\* -statisticky významné změny aktivity cholinesteráz po premedikaci L-CAR+galantamin (10 mg/kg) proti samotnému galantaminu (10 mg/kg)



Graf 2: Vliv L-CAR na AChE aktivitu u potkana ve vybraných mozkových strukturách

Při třídním podávání L-CAR v dávce 200 mg/kg p.o. došlo po následném podání galantaminu ke zvýšení inhibice AChE v některých částech mozku. Nejvýrazněji v oblasti frontální kůry a septa, méně pak v hippocampu a bazálních gangliích. Svědčí to pro to, že třídní podávání L-CAR nějakým způsobem buď usnadnilo průnik galantaminu do některých vyšetřovaných částí mozku, nebo přímo ovlivnilo efekt inhibitoru v místě jeho účinku.

Na periférii se podávání samotného galantaminu v dávkách 2,5; 5; 10mg/kg neprojevilo žádným výraznějším snížením aktivity cholinesterázy. Ke změně aktivity těchto enzymů nedošlo ani při premedikaci L-CAR v dávce 200 mg/kg p.o. K statisticky významnému poklesu enzymové aktivity v plazmě a játrech došlo pouze po podání nejvyšší dávky galantaminu - 20mg/kg.

## 5. DISKUSE

### 5.1 VÝHODY POUŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVITY AChE

Aktivitu AChE lze stanovit řadou metod. V předložené práci byla použita modifikace klasické Ellmanovy metody, jejíž výhodou je rychlost provedení samotného měření, specifika a zejména vysoká citlivost (<sup>10</sup>).

Uvádí se, že citlivostí tato metoda předčí všechny v současnosti používané metody pro stanovení aktivity cholinesteráz. Např. kolorimetrická metoda na automatickém kolorimetru (Auto-Analyzer), kdy je detekována změna pH fenolčervení jako indikátorem podle Wintera je asi 160x méně citlivá a klasická pH metrická metoda podle Michela asi 40x méně citlivá. Na druhé straně není dosud tato metoda standardizována, tudíž existují nejrůznější modifikace (<sup>2</sup>).

Vysoká citlivost této metody skutečně dovoluje zaznamenat i minimální změnu aktivity enzymu ve studovaných částech mozku, což je materiál s velmi nízkou aktivitou AChE (u lidí je normální aktivita AChE řádově v jednotkách  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  krve, to je asi 100-150  $\mu\text{kat}/\text{l}$ , zatímco námi naměřené hodnoty jsou přibližně ve stovkách  $\text{nkat}/\text{mg}$  mozkové tkáně).

Při stanovení aktivity AChE velmi záleží na odběru, způsobu skladování a zpracování biologického materiálu (v našem případě mozku laboratorního potkana). Tento biologický materiál musí být skladován při nízkých teplotách, tj. okolo  $-20^{\circ}\text{C}$  a ihned po vyjmutí z mrazícího boxu zpracován. V neposlední řadě záleží na způsobu zhotovení řezu mozku, přesné provedení řezu je nezbytným předpokladem úspěchu experimentu a hlavně získání přesných a správných výsledků. Nevýhodou je možnost interference s vlnovou délkou hemoglobinu.

## **5.2 EFEKT L-CAR NA AChE A AKTIVITU GALANTAMINU**

Přestože galantamin prochází HEB poměrně dobře, další zvýšení jeho průniku a tím následné zvýšení jeho dostupnosti pro nervovou tkáň není bez užitku. Umožnilo by snížit obvyklé terapeutické dávky a tak současně omezit nebo alespoň snížit výskyt komplikací plynoucích především z periferního parasymptomimetického účinku.

Dle výsledků předchozí diplomové práce (<sup>26</sup>), kde byl zjišťován vliv L-CAR v různých dávkách, se ukázalo, že interakce nižších dávek L-CAR (200, 250mg/kg) s galantaminem způsobují další snížení AChE aktivity. Vyšší dávky v premedikaci L-CAR (300, 400 mg) nepřinesly prohloubení inhibičního efektu. Vyšší stupeň inhibiční aktivity systémově podaného galantaminu po premedikaci L-CAR může být způsoben buď zvýšenou propustností HEB nebo i jeho přímým vlivem na inhibiční účinnost galantaminu na aktivních místech enzymu.

Samotný p.o. podaný L-CAR podle dřívějších měření statisticky významně nezměnil AChE aktivitu ve sledovaných strukturách. Otázka, zda snížení aktivity AChE je způsobeno zvýšením hladiny galantaminu v cílových mozkových strukturách nebo přímou interakcí galantaminu a L-CAR na aktivních místech AChE, bude vyžadovat další šetření (<sup>4</sup>).

## **5.3 BuChE vs.AChE**

Cholinesterázy reprezentují důležitou skupinu enzymů s několikanásobnou biologickou funkcí. Lidské tkáně mají dvě odlišné cholinesterázy: BuChE a AChE. AChE sehrává klíčovou roli v cholinergní neurotransmisí v přenosu nervových vzruchů. Je syntetizována v neuronech a do synapsí je aktivně transportována. BuChE se syntetizuje v játrech, je významným detoxikačním enzymem pro karbamátová a organofosfátová insekticida a transformačním enzymem pro řadu léčiv. Význam molekulárních forem BuChE a jejich fyziologické funkce nebyly dosud zcela objasněny. Porozumění chemii enzymů je základ pro předcházení i terapii otravy karbamáty a organofosfáty a také hledání léčby nemocí spojených s cholinergním systémem př.AD(<sup>23, 30</sup>).

V krvi, respektive v krevním séru se BuChE stanovuje přednostně z důvodu jednoduchosti. Protože AChE je vázána na erythrocyty, při hemolýze se uvolní masivní množství hemoglobinu, který ruší stanovení pomocí fotometru ve viditelné a blízké UV oblasti (<sup>23,30</sup>).

## 6. ZÁVĚR

Galantamin statisticky významně inhibuje aktivitu AChE ve frontální kůře a v septu, přitom stupeň inhibiční aktivity je výraznější ve frontální kůře. Galantamin mírně inhibuje aktivitu AChE v hippocampu (není statisticky významné), aktivita AChE v bazálních gangliích zůstala neovlivněna.

Předchozí podání L-CAR vedlo k dalšímu zvýšení inhibiční aktivity galantaminu především ve frontální kůře.

V studovaných strukturách na periférii jak podání samotného galantaminu, tak třídní premedikace L-CAR v dávce 200 mg-kg p.o. nijak významně nezměnily aktivitu cholinesterázy v plazmě a játrech. Periferní nežádoucí účinky léčby AD galantaminem by tedy měly být minimální a premedikace L-CAR tyto periferní účinky nezesiluje. Pouze podání vyšší dávky galantaminu (20 mg/kg p.o.) snížilo aktivitu cholinesterázy na periférii. Tato dávka však není terapeuticky využívána.

Změny hladin AChE a BuChE po podání galantaminu jsou ve shodě s předešlou literaturou. Dosažené výsledky potvrdily pracovní hypotézu o zvýšení inhibičního efektu galantaminu premedikací L-CAR.

## 7. SOUHRN

Cílem práce bylo stanovit acetylcholinesterázovou aktivitu ve vybraných částech mozku a zároveň i butyrylcholinesterázovou aktivitu na periférii (v játrech a v plazmě) a to jednak po podání samotného galantaminu, jednak po premedikaci L-CAR.

Výsledky získané pomocí spektrofotometrické metody v této práci ukázaly, že zesílení periferních účinků (tedy spíše nežádoucích) studovaného inhibitoru AChE – galantaminu, je minimální. A to i po premedikaci L-CAR. Galantamin tedy působí hlavně v místě požadovaného účinku (v mozku) a je tak vhodnou látkou k terapii AD.

## 8. SEZNAM LITERATURY

1. Albuquerque E.X., Santos M.D., Alkondon M., Pereira E.F., Maelicke A.: Modulation of nicotinic receptor activity in the central nervous system: a novel approach to the treatment of Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 15 (suppl. 1), 2001, 19 -25
2. Bajgar J., Fusek J., Skopec F.: Changes of cholinesterase in the blood and some tissues following administration of tacrine to rats, *Neurochem. Int.*, 24 (9), 1994, 555-558
3. Bajgar J., Herink J.: Molecular forms of hippocampal acetylcholinesterase and their changes following septal lesions in the rat, *Physiol. Res.*, 40 (6), 1991, 513-518
4. Bajgar J., Skopec F., Herink J., Patočka J., Květina J.: Efekt of 7- metoxytacrine and L-carnitine on the activity of choline acetyltransferase, *Gen. Physiol. Biophys.*, 18 (1), 1999, 3-6
5. Barnes C.A., Meltzer J., Houston F., Orr G., McGann K., Wenk G.L.: Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors, *Neuroscience*, 99 (1), 2000, 17-23
6. Benešová O.: Nikotinové receptory acetylcholinu: struktura, funkce a význam pro terapii v psychiatrii, *Psychiatrie*, 7 (1), 2003, 31-37
7. Bickel U., Thomsen T., Fisher J.P., Weber W., Kewitz H.: Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice, *Neuropharmacology*, 30 (5), 1991, 447-454
8. Calabrese V., Stella A.M.G., Calvani M., Butterfield D.A.: Acetylcarnitine and cellular stress response, *J. Nutr. Biochemistry*, 17 (2), 2006, 73-88
9. DeKosky S.T.: Pathology and pathways of Alzheimer's disease with an update on new developments in treatment, *J. Am. Geriatr. Society*, 51(4), 2003, 314-320
10. Ellman G. L., Courtney D. K., Andres V., Featherstone R. M. X.: A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmac.*, 7(1), 1961, 88-95
11. Harvey A.L.: The pharmacology of galanthamine and its analogues, *Pharmac. Ther.*, 68 (1), 1995, 113-128

12. Hořejší J.: Alzheimerova demence-závod s časem, *Remedia populi*, 2 (1), 1998, 72-76
13. Jacob C.,Belleville F.:L-Carnitine metabolism, Function and Role in Human Disease, *Pathologie Biologie*, 40(9), 1992, 910-919
14. Jiráček R., Alzheimerova choroba-terapie, *Causa subita*, 4(3), 2001, 259-261
15. Koukolík F., Alzheimerova nemoc a další demence, Grada publishing, Praha 2002, 34 a násl.
16. Koukolík F., Jiráček R.: Alzheimerova nemoc a další demence, Grada Publishing Praha, 1998, 19-39
17. Maelicke A.: Pharmacokinetic rationale for switching from donepezil to galantamine, *Clin. Ther.*, 23 (suppl. A), 2001, 8-12
18. Mayeux R., Sano M.: Drug therapy:Treatment of Alzheimer's disease, *N.E.J. Medicine*, 341(22), 1999, 1670-1679
19. Melo J.A., Agostinho P., Resende-Oliveira C.: Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. *Neuroscience Res.*, 45 (1), 2003, 117-127
20. Mihailova D, Yamboliev I.: Pharmacokinetics of galanthamine hydrobromide (Nivalin) following single intravenous and oral administration in rats, *Pharmacology*, 32 (6), 1986, 301-306
21. Muthuswamy A.D.,Vedagiri K.,Ganesan M.,Chinnakannu P.: Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions, *Clinica Chimica Acta*, 2006 (v tisku)
22. Navrátil L., Bajgar J.: Cholinesterázy a jejich klinický význam, Nakladatelství UK Praha, 1989, 29-55
23. Patočka J.,Kuča K.,Jun D.: Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase-important enzymes of human body, *Acta Medica.*, 47(4) 2004, 163-169
24. Patočka J., Fusek J.: Význam cholinergních mechanismů v patofyziologii demencí Alzheimerova typu, *Remedia*, 4 (2), 1994, 231-336
25. Patočka J., Strunecká A., Řípová D.:Cholinesterázy a jejich význam v etiologii, diagnostice a terapii Alzheimerovy nemoci, *Čs. fyziol.*, 50 (1), 2001, 4-10
26. Prokopová D.: Diplomová práce, UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK, 2002
27. Radic Z., Manetsch R., Krasinski A., Raushel J.: Molecular basis of interactions of cholinesterases with tight binding inhibitors. *Chem-biol. Interactions*, 157-158 (4), 2005, 133-141



28. Rainer M.: Galantamine in Alzheimer's Disease A new alternative to tacrine?, *CNS Drugs* 7 (1), 1997, 89-97
29. Rusina R., Bartoš A.: Léčebné ovlivnění demencí, *Causa subita*, 5 (6), 2002, 428
30. Shih T-M., Kan R.K., McDonough J.H.: In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents, *Chem-biol. Interactions*, 157-158 (4), 2005, 293-303
31. Steidl L., Zbránková B.: Význam karnitinu a jeho použití v medicíně, Triton, Praha 2000, 9-36, 64-69
32. Šurel S.: Přínos L-carnitinu u renálních onemocnění a únavového syndromu, *Příloha ZdN*, 1998, 34
33. Švestka J.: Galantamin-kognitivum s duálním účinkem, *Symposium společnosti Janssen-Cilag*, 4.-8.1.2003
34. Tariot P.: Current status and new developments with galantamine in the treatment of Alzheimer's disease, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2(12), 2001, 2027-2049
35. Virmani M.A., Rossi S., Conti R., Spadoni A., Arrigoni Martelli E., Calvani M.: Structural, metabolic and ionic requirements for the uptake of L-carnitine by primary rat cortical cells, *Pharmacol. Res.*, 33 (9), 1999, 935-940
36. *Vojenské zdravotnické listy*, 2003, [www.pmfhk.cz/VZL/VZL%201\\_2003/Vz11-9.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL%201_2003/Vz11-9.pdf)