

577.153.9.014:616.892.3

SOUČASNÉ POZNATKY O GALANTAMINU, REVERZIBILNÍM INHIBITORU ACETYLCHOLINESTERÁZY

Gabriela KREJČOVÁ, Lucie ŠEVELOVÁ

Katedra toxikologie Vojenské lékařské akademie J. E. Purkyně, Hradec Králové

Souhrn

Článek shrnuje současné poznatky o galantaminu, jeho struktuře, farmakodynamických i farmakokinetických vlastnostech, kognitivních, behaviorálních a toxických účincích i metodách jeho stanovení v biologických materiálech.

Tento alkaloid izolovaný z rostlin čeledi Amaryllidaceae působí jako reverzibilní selektivní inhibitor acetylcholinesterázy a alosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů, čímž potencuje cholinergní neurotransmisi zprostředkovanou nikotinovými acetylcholinovými receptory.

V medicíně se používá již od 60. let 20. století, a to převážně ve východní Evropě, k antagonizaci neuromuskulární blokády a pro terapii neurologických poruch. V současné době se využívá především při léčbě Alzheimerovy choroby, neboť významně zlepšuje její kognitivní, funkční i behaviorální symptomy. Jako výhodná se jeví selektivita galantaminu k acetylcholinesteráze vs. butyrylcholinesteráze, která může snižovat riziko nežádoucích účinků v porovnání s neselektivními inhibitory cholinesteráz (typu takrinu či fyzostigminu).

Vzhledem k vlastnostem galantaminu můžeme předpokládat širší uplatnění této látky v civilní i vojenské medicíně.

Klíčová slova: Galantamin; Inhibitor acetylcholinesterázy; Modulátor nikotinových receptorů; Alzheimerova choroba.

Present Knowledge about Galanthamine as a Reversible Acetylcholinesterase Inhibitor

Summary

This article presents recent knowledge about galanthamine, its structure, its pharmacodynamic as well as pharmacokinetic properties, its cognitive, behavioral and toxic effects, and the methods of its determination in biological substances.

This alkaloid isolated from the Amaryllidaceae plant family acts as a reversible selective competitive acetylcholinesterase inhibitor and it also allosterically modulates the nicotinic acetylcholine receptors, thereby potentiates cholinergic, nicotinic neurotransmission.

In medicine it has already been used since the 1960s, mainly in Eastern Europe to stop neuromuscular blockade and in neurological defect therapy. Recently galanthamine has been used predominantly for the treatment of Alzheimer's disease because it significantly improves the cognitive, functional as well as behavioral symptoms of this disease. The selectivity of galanthamine to acetylcholinesterase against butyrylcholinesterase is favourable because this selectivity can decrease the risk of unwanted effects in comparison with the nonselective inhibitors of cholinesterases (tacrine, physostigmine).

We can assume that there will be an increased use of galanthamine in civilian as well as military medicine due to these properties.

Key words: Galanthamine; Acetylcholinesterase inhibitor; Nicotinic receptor modulator; Alzheimer's disease.

Galantamin (GAL) je terciární alkaloid izolovaný původně z cibulí sněženky *Galanthus woronowii* (Proskurnina a Yakovleva, 1952) a později z dalších rostlin čeledi Amaryllidaceae (amaryllkovité) (18). Již od 60. let 20. století se tato látka používala převážně ve východní Evropě pro svůj antikurarový efekt k antagonizování neuromuskulární blokády vyvolané pachykurarovými látkami a pro terapii neurologických poruch, např. paralytické poliomyelitidy nebo myasthenie gravis (5). Působí i jako

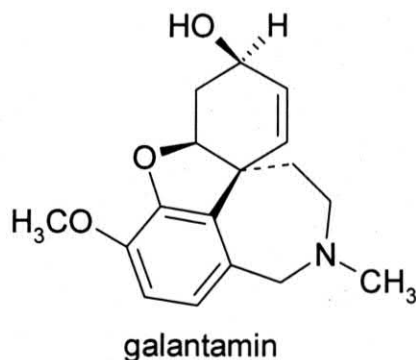
antagonista dechového útlumu navozeného opioidy (morfin, pethidin, dextromoramid) a také antagonizuje centrální anticholinergní syndrom způsobený hyoscinem a některé centrální účinky droperidolu a diazepamem (28). GAL, ačkoli je strukturně velmi podobný kodeinu, nemá analgetický účinek, ale podléhá stejným biotransformačním procesům jako kodein (13). V několika klinických studiích bylo prokázáno signifikantní zlepšení kognitivních i nekognitivních symptomů Alzheimerovy choroby

po podání GAL (viz dále). Na základě toho se předpokládá hlavní uplatnění GAL v terapii Alzheimerovy choroby. Výhoda GAL proti ostatním inhibitorům AChE používaným v terapii Alzheimerovy choroby spočívá v jeho schopnosti alostericky modulovat nikotinové receptory, což zvyšuje produkci ACh (23).

GAL byl detekován v největším množství v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*, rostliny dalších čeledí, např. *Agavaceae*, *Haemodoraceae* a *Hypoxidaceae*, obsahují méně než 0,01 % GAL (19). Dodnes byla přítomnost GAL prokázána v těchto rodech čeledi *Amaryllidaceae*: *Amaryllis*, *Chlidanthus*, *Cooperia*, *Crinum*, *Eucharis*, *Eustephia*, *Galanthus*, *Hippeastrum*, *Haemanthus*, *Hymenocallis*, *Leucojum*, *Lycoris*, *Narcissus*, *Nerine*, *Pancratium*, *Sternbergia*, *Ungernia*, *Vallota* a *Zephyranthes* (24). U druhu *Leucojum aestivum* bylo sledováno, jak je obsah GAL ovlivněn podmínkami pěstování. Rostliny při zemědělském pěstování (na poli, při umělém zavlažování) vykazovaly průměrně nízkou koncentraci GAL (kolem 1 %), zatímco rostliny pěstované za optimálních přírodních podmínek (v lese, v místě jejich přirozeného výskytu) obsahovaly nejčastěji 1,8 % GAL. GAL byl dokonce detekován i v 150 let starém vzorku z rostliny *Haemanthus coccineus*, což prokazuje jeho vysokou stabilitu. Neobyčejně vysoká koncentrace GAL byla stanovena v extraktu *Phaedranassa megistophylla*, který pocházel z roku 1964 z Peru. Koncentrace byla dvakrát vyšší než v *Leucojum aestivum*, což ukazuje na slibný zdroj pro průmyslovou výrobu GAL, stejně tak jako na založení GAL vysokoprodukční rostlinné buněčné kultury (19).

Struktura galantaminu a jeho derivátů

GAL je terciární alkaloid rezistentní vůči hydrolyze. Pro vazebné schopnosti a tedy biologický účinek GAL jsou v jeho molekule důležitá 4 místa: hydroxylová skupina cyklohexenového kruhu, cyklohexenový kruh, terciární aminoskupina a methoxyskupina.



Obměnou methoxyskupiny a terciární aminoskupiny (např. na kvarterní amoniovou sůl nebo hydrofilní sloučeniny) byly připraveny deriváty GAL, které byly polárnější než původní molekula a vykazovaly větší inhibici AChE. Jejich polarita však brání průniku do CNS, což výrazně limituje jejich použití. Jako nadějný derivát GAL se ukazuje jeho ester (acylovaná hydroxylová skupina v poloze 6) n-butylkarbamát galantaminu, který je méně toxický než GAL, jeho nižší polarita mu umožňuje lepší průnik do CNS a inhibice AChE dosáhla *in vitro* 85 % inhibiční aktivity samotného GAL (9).

Další možností modifikace molekuly GAL je příprava bis-interagujících ligandů substitucí terciární aminoskupiny nebo methoxyskupiny. Bylo zjištěno, že délka alkylenového řetězce v těchto derivátech je klíčovým faktorem pro zvyšování inhibiční schopnosti sloučeniny a jako optimální se jeví 8členný methylenový řetězec. Terminální italmidová nebo amoniová skupina na bočním alkylovém řetězci umožňuje interakci sloučeniny jak s katalytickým, tak i periferním místem AChE, přičemž amoniová skupina je vhodnější, protože při vazbě na AChE vytváří těsné Van der Waalsovy vazby s hydrofobní aromatickou kavitou. Z hlediska vazby na AChE jsou N-substituované deriváty účinnější než O-substituované deriváty, což je způsobeno odlišným způsobem vazby na AChE (15).

Vztahy mezi strukturou a aktivitou byly sledovány u bis-galantaminových (homodimerů) a galantamin-galantaminových (heterodimerů) solí. Oba ligandy byly vždy spojeny různě dlouhým alkylenovým řetězcem přes terciární, případně kvarterní aminoskupinu. Sloučeniny heterodimerové série měly vyšší antiacetylcholinesterázovou aktivitu než sloučeniny homodimerové série. Iminiová skupina je tedy klíčovou strukturou pro inhibiční efekt sloučeniny (8).

Z dalších derivátů GAL byly prověřovány 6-O-acetyl-6-O-demethylgalantamin hydrochlorid (P11012) a 6-O-demethyl-6-O-[(adamantan-1-yl)-carbonyl]galantamin hydrochlorid (P11149). Oba deriváty jsou proléčiva, protože se *in vivo* rychle hydrolyzují (za 5 min po podání jsou v krvi nedetekovatelné) na 6-O-demethylgalantamin (6-DMG). Selektivita P11012 a 6-DMG k AChE vs. BuChE byla v porovnání s GAL výrazně vyšší (150krát a 80krát vs. 40–50krát). 6-DMG je polárnější než GAL, což omezuje průnik 6-DMG hematoencefalickou bariérou (HEB), ale v inhibici AChE je 6-DMG 20krát účinnější než GAL. Z testovaných sloučenin se jako nejvhodnější ukazuje P11149, protože působí déle než P11012, má lepší afinitu k AChE než GAL a vyšší terapeutický index než P11012 a GAL. C_{max} P11149 byla sice nižší, ale vysoké hladiny byly stabilnější a déletrvající ve srovná-

ní s P11012 a GAL (4).

Další dva testované deriváty GAL – epimer galantaminu a keton galantaminu patřící mezi metabolity GAL vykazovaly v podmínkách *in vitro* 130krát nižší inhibiční aktivitu ve srovnání s mateřskou látkou (26).

Farmakodynamika

Cílovými místy účinku GAL v organismu jsou nervosvalové spoje, centrální cholinergní synapse i periferní orgány inervované parasympatickými vegetativními vlákny (5). Na cholinergní synapsi má GAL dvojí roli:

- a) může zvýšit hladinu acetylcholinu dostupného pro aktivitu postsynaptických muskarinových receptorů tím, že inhibuje AChE (při použití animálního modelu GAL zvýšil hladinu acetylcholinu v mozkové kůře o 37 %),
- b) GAL může působit jako alosterický modulátor na nikotinových receptorech, protože v přítomnosti GAL je zvýšená vazebná afinita ACh na acetylcholinový nikotinový receptor nebo i zvýšená propustnost kanálů odpovídající obsazeným receptorům.

Tyto procesy mohou také probíhat současně. Modulaci nikotinových receptorů je tak podporován proces uvolňování ACh cestou nikotinového mechanismu, zvláště za podmínek poškozené cholinergní funkce (2). GAL působí tedy jako reverzibilní selektivní kompetitivní inhibitor AChE a alosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů (nAChR), čímž potencuje cholinergní nikotinovou neurotransmisi (25).

Alosterické modulátory nikotinových receptorů se neúčastní přenosných dějů přímo, takže nevyvolávají na rozdíl od agonistů nebo antagonistů změny citlivosti či počtu receptorů, které jsou typické pro podání neoptimalizované dávky nikotinového cholinergního agonisty nebo antagonisty (31). *In vitro* se GAL tedy váže na místo nAChR, které je odlišné od vazebného místa přirozeného agonisty, acetylcholinu (ACh). Pokud se na nAChR naváže GAL a ACh současně, odpověď těchto receptorů na ACh se násobí (25). Alostericky potencující ligandy tedy samy o sobě nevyvolávají signifikantní odezvu, v přítomnosti s přirozeným mediátorem však zvyšují průchodnost iontových kanálů, a tak i potencují submaximální acetylcholinem indukované odpovědi (30). Aktivace presynaptických nikotinových receptorů způsobuje zvýšené uvolňování ACh (20), ale i glutamátu (zlepšení procesu učení a paměti), serotoninu (omezení emočních poruch, jako je úzkost a deprese), GABA (zajišťuje stabilní chování např. odstraněním agresivity) (14). Dlou-

hodobé podávání GAL navozuje zvýšení denzity nikotinových receptorů v určitých oblastech mozku, které se podílejí na paměti a procesu učení. Jedná se zejména o oblast hipokampu a prefrontální kůry (2, 30).

GAL je selektivní inhibitor erytrocytární AChE vzhledem k inhibici plazmatické butyrylcholinesterázy (BuChE) (EC_{50} pro BuChE 19,1 $\mu\text{mol/l}$, pro AChE 0,36 $\mu\text{mol/l}$). Tato selektivita GAL k AChE může snižovat riziko nežádoucích účinků při srovnání GAL s neselektivními inhibitory cholinesteráz (typu fysostigminu nebo takrinu) (3). U kompetitivního inhibitoru nezávisí stupeň inhibice ani tak na absolutní koncentraci inhibitoru, jako spíše na poměru koncentrace inhibitoru a substrátu, tzn. že nejúčinnější je inhibitor při nízké koncentraci substrátu, jaká je na postsynaptické membráně ve srovnání s mnohem vyšší koncentrací ACh na presynaptické membráně, pokud je ACh uvolňován do štěrbin z zásobních vezikul. Proto je velmi málo ovlivněna funkce negativní zpětné vazby přes presynaptické receptory a tím i eventuální snižování terapeutického efektu, naopak AChE situovaná na postsynaptickém elementu je výrazně inhibována (13).

Komplex GAL s AChE izolované z *Torpedo californica* prokazuje, že GAL se váže ve spodní části kavity AChE a interaguje jak s acyl-vazebnou kapsou (Phe-288, Phe-290), a to prostřednictvím methoxyskupiny, tak s cholin-vazebným místem (Trp-84) – prostřednictvím cyklohexenového kruhu. Vysoká afinita k AChE vyplývá z řady středních až slabých interakcí a nízké entropie této rigidní struktury (7).

Farmakokinetika

Farmakokinetika GAL (tabulka 1) je 1. řádu a lineární v širokém rozmezí dávek (představovaného u člověka 5–35 mg i. v.).

GAL se po p. o. podání snadno absorbuje prakticky nezávisle na lékové formě (tableta, obdukováná tableta, roztok) (13). Při studiu vlivu jídla na absorpci GAL bylo zjištěno, že jídlo sice neovlivňuje celkovou dostupnost GAL, ale zpomaluje absorpci a snižuje maximální dosaženou hladinu GAL v plazmě (C_{max}) (12).

GAL se prakticky neváže na plazmatické proteiny. Distribuce GAL z centrálního kompartmentu do tkání a orgánů probíhá neiontovou pasivní difuzí slabé báze s pK_a 8,32 (13). Pokles koncentrace GAL v plazmě popisuje biexponenciální funkce. V plazmě a mozku myši byl ve sledovaném rozmezí dávek (4–8 mg/kg i. v.) prokázán lineární vztah mezi použitou dávkou a zjištěnou koncentrací (3).

Tabulka 1

Farmakokinetické údaje

Autor studie	Bickel (3)	Bickel (3)	Westra (28)	Mihailova (16)	Mihailova (16)	Jones (12)	Jones (12)
Objekt	dobr	dobr	gynekol	dobr	dobr	hlad	snídaně
Dávka	10 mg	10 mg	0,3 mg/kg	10 mg	10 mg	10 mg	10 mg
Forma aplikace	tbl	sol	inj. i. v.	inj. s. c.	tbl	tbl	tbl
$t_{\max}$	52	45	–	120	120	66	156
$T_{1/2Ka}$	20	21,6	–	13	12	–	–
BD	85	100	–	–	–	–	–
$T_{1/2K\beta}$	5,7	5,7	4,4	5,7	5,26	9,7	9,7
Cl_{plazm}	0,34	0,34	0,32	–	–	–	–

dobr = dobrovolník (věk 21–35 let)

gynekol = pacientky podstupující malou gynekologickou operaci (věk 38–79 let)

hlad = dobrovolníci (věk 66–82 let), kterým byl aplikován galantamin po hladovění

snídaně = dobrovolníci (věk 66–82 let), kterým byl aplikován galantamin 0,5 h po snídani

$t_{\max}$ = čas od aplikace po dosažení maximální koncentrace v plazmě

$T_{1/2Ka}$ = poločas absorpce

BD = biologická dostupnost

$T_{1/2K\beta}$ = poločas eliminace látky z plazmy

Cl_{plazm} = celková plazmatická clearance

Byla zjištěna intracelulární akumulace GAL, protože v buňkách a erytrocytech je sice jen mírně, ale pro kumulaci dostatečně, nižší pH než v plazmě (7,0 a 7,2 vs. 7,4). Akumulační faktory byly zjištěny u myši 1,34 pro erytrocyty, 2,10 pro mozek, 3,13 pro svalové buňky diafragmy, 2,28 pro plíce, téměř 10 pro ledviny a téměř 5 pro játra. Koncentrace GAL v mozku myši kopírovala koncentraci v krvi, ale byla 2,1krát vyšší z důvodu neiontové pasivní difuze GAL přes HEB řízené pH gradientem mezi vnitřním a vnějším prostředím neuronů. Protože HEB nijak nelimituje volnou difuzi GAL, je koncentrace GAL v cerebrospinální tekutině a krevní plazmě téměř stejná a může odpovídat i koncentraci GAL v synaptické šterbině.

Biologická dostupnost GAL po podání tablet a roztoku byla 85%, resp. 100%. Z velmi vysoké biologické dostupnosti lze vyvodit, že „first-pass“ efekt nehraje důležitou roli.

Při studiu biotransformace GAL u zdravých mužů dobrovolníků bylo zjištěno, že 25 % dávky se vylučuje nezměněno močí, téměř 20 % dávky bylo vyloučeno ve formě O-de-methylgalantamin glukuronidu, 5 % jako N-demethylgalantamin a méně než 2 % jako epigalantamin, který vzniká redukcí intermediátu galantaminonu. V moči ani plazmě nebyl detekován neglukuronidovaný O-demethylgalantamin, což naznačuje, že glukuronid je tvořen přímo

v cytozolu buněk, v jejichž endoplazmatickém retikulu probíhá demethylace. O-demethylace GAL je katalyzována cytochromem P4502D6, který podléhá genetickému polymorfismu (5–10 % pomalých metabolizátorů v kavkazské populaci a 1 % v asijské populaci). O-demethylgalantamin je 3–10krát účinnější než GAL, ale glukuronidace nebo epimerizace snižuje jeho farmakologickou aktivitu více než 100krát. N-demethylgalantamin si zachovává 50 % inhibičního efektu ve srovnání s GAL. Další metabolity by mohly vznikat N-oxidací (13).

Kognitivní účinky galantaminu

Studie humánní

Obvyklá denní terapeutická dávka GAL pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD) činí 24 mg. Studie prokázaly, že dávky vyšší již nezlepšují kognitivní funkce pacientů (23).

Skopolamin a jemu podobné anticholinergní látky, které prostupují HEB, mohou způsobit centrální anticholinergní syndrom provázený ospalostí, dezorientací a halucinacemi. GAL zlepšuje symptomy skopolaminem navozeného anticholinergního syndromu (1).

V současnosti je GAL nejčastěji zmiňován v souvislosti s AD. V jedné ze studií byla testována

účinnost GAL u pacientů se slabým a středním postižením AD na základě jedenáctipoložkového testu kognitivních funkcí (ADAS-cog) a dále podle sedmistupňové metodiky založené na ústních rozhovorech s pacienty a ošetřovateli (CIBIC-plus). Bylo prokázáno, že ve srovnání s placebem GAL signifikantně zlepšil kognitivní funkce pacientů, což se pozitivně odrazilo v jejich každodenních aktivitách (20). I další studie potvrzují, že GAL přispívá ke zlepšení kognitivních, funkčních a behaviorálních symptomů u pacientů s AD (22).

GAL hydrobromid zvyšoval v závislosti na dávce stav bdělosti na úkor spánku a také zvýšil počet probuzení během spánku. Zkracoval dobu mezi usnutím a nástupem první REM fáze. První REM periodu byla prodloužena a také se zvýšila REM hustota této periody (REM hustota byla vyjádřena poměrem počtu třisekundových epoch, které zahrnovaly rychlé pohyby očí, a celkového počtu třisekundových epoch v REM periodě násobený 100) (21).

Studie animální

Ve studii Chopina a Brileyho byl porovnáván účinek GAL a tzv. kognitivních enhancerů: piracetamu (Nootropil), nicergolinu (Sermion), standardizovaného extraktu z *Ginkgo biloby* (Tanakan) a kombinace dihydroergokristinu a raubasinu (Iskedy) na zlepšení skopolaminem navozeného kognitivního postižení o potkanů. GAL prokázal větší maximální efekt než „kognitivní enhancery“ bez zřetelné dávkové závislosti (10).

GAL byl podáván v dávce 3 mg/kg s. c. skupině mladých a starých králíků. Výsledky mimo jiné ukázaly, že výkony starých králíků při klasickém podmiňování, kterým byl podáván GAL, se natolik zlepšily, že dosahovaly úrovně králíků mladých, kterým GAL podán nebyl (31).

Ve studii Yonkova a Georgieva (32) se uvádí, že po podání 1,0 µg/kg GAL intracerebroventrikulárně se signifikantně snížil počet nutných tréninkových sérií pro osvojení aktivního i pasivního vyhýbání se averzivnímu podnětu u potkanů. Tuto nabytou dovednost si GAL ovlivněná zvířata pak udržela delší dobu než zvířata kontrolní. Prokazatelně zde bylo ovlivněné paměťové upevnění. Dávka 0,5 µg/kg GAL tento efekt neměla.

GAL inhibuje skopolaminem navozený deficit pasivního vyhýbání se u potkanů, zmírňuje deficit navozený skopolaminem v učení a paměti v T-bludišti a ve vodním Morrisově bludišti, zmírňuje deficit v pasivním vyhýbání se u myši s lézí v nucleus basalis magnocellularis (5).

Behaviorální účinky galantaminu

Bylo prokázáno, že GAL ovlivňuje sociální cho-

vání zvířat. Při dávkách 0,625 a 1,25 mg/kg intraperitoneálně se zkracovala doba olfaktorických kontrol u myši a naopak se zvyšovala vzájemná agresivita zvířat. Dávka 2,5 mg/kg GAL agresivitu myši nezvyšovala (30).

Behaviorální projevy akutního toxického účinku GAL byly sledovány u žab, myši, králíků a koček: nejčastěji docházelo ke zvýšené reflexní aktivitě, klonicko-tonickým křečím, svalovým záškubům, hypersalivaci a tachypnoi. Tyto symptomy sílily se zvyšující se dávkou. Zvířata umírala v křečích a na nedostatek kyslíku při téměř nepostižené srdeční činnosti (22). Kontrakce periferních svalů mohou pokračovat ještě dlouho po smrti (17).

Toxicita galantaminu

GAL je jen mírně toxický. LD₅₀ pro potkana p. o. je 83,6 mg/kg.

Byla provedena subchronická toxicitní studie u králíků, ve které se srovnával přírodní a syntetický GAL: dávka 1 mg/kg/den orálně nevyvolávala v žádném z obou případů nežádoucí účinky. Při vyšších dávkách vykazovala přírodní (nikoli syntetická) látka zvětšení buněčných jader v játrech, vakuolizaci jaterních buněk a slabé překrvení sleziny (17).

Dále byla sledována chronická toxicita u dospělých potkanů. Při podávání dávek, které jsou ekvivalentní terapeutickým denním dávkám u lidí, orálně a subkutánně po dobu 6 měsíců, nebyly zaznamenány žádné odchylky od biometrických, hematologických a morfologických parametrů. Sledovaná gravidita i porod probíhaly normálně. Žádné statisticky signifikantní odchylky od kontroly nebyly s výjimkou zvýšené motorické aktivity po dobu 2 hodin po podání dávek zaznamenány (22). Podle Muckeho (17) byl sice zaznamenán snížený dechový objem a desynchronizace EEG u králíků při chronickém orálním podávání 0,5 mg/kg/den GAL, u jiných druhů zvířat však žádné nežádoucí účinky při této dávce patrné nebyly.

Nežádoucí účinky galantaminu

Hlavní nežádoucí účinky GAL souvisí s jeho cholinergními vlastnostmi. Mezi nejčastější patří: nevolnost (19 % pacientů), zvracení (16 %), závrať (4 %), bolest břicha, průjem, neklid, porucha spánku a lehká bolest hlavy. Fulton ve své práci uvádí, že pouze jeden pacient vydržel dávku 45 mg/den bez vedlejších příznaků, ostatní byli neklidní a nespaví (5).

Významný nežádoucí efekt je ztráta hmotnosti a chuti k jídlu u 8 % pacientů s AD, kteří sami o sobě ztrácejí zájem o jídlo (23).

Nežádoucí účinky GAL mohou být tlumeny antidoty. Po profylaktickém podání periferního antidota N-methylskopolamin hydrobromidu byly nežádoucí účinky zřetelně sníženy (21).

Podle Ilieva a spol. jsou vedlejší účinky GAL mírné, přechodné a závislé na dávce, bez projevů ukazujících na hepatotoxicitu (11).

Žádná z dostupných studií neprokázala mutagenní či teratogenní potenciál GAL (17).

Metody stanovení galantaminu

Pro stanovení GAL v biologických materiálech lze využít různé metody: např. vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií, kapilární zónovou elektroforézu, průtokovou injekční analýzu, radioimunoanalýzu nebo enzymoimunoanalýzu.

HPLC

Před samotnou analýzou byly vzorky upraveny extrakcí, a to zpravidla kapalina–kapalina. Pro vlastní stanovení byly použity kolony s převážně reverzní fází. Jako mobilní fáze byly použity směsi různých rozpouštědel (např. acetonitril, tetrahydrofuran, voda, di-N-butylamin). Detekce byla fluorescenční nebo UV při 235 nm. Detekční limit byl 5000 pg galantaminu/ml séra (3, 28).

Možné je i stanovení GAL kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (4).

Kapilární zónová elektroforéza

Kvůli komigraci objemných proteinů při analýze séra je nutné sérum nejprve deproteinizovat. Přidání chloridu hořečnatého vedlo k uvolnění GAL od komponent plazmy, a tak dosažení detekčního limitu 35 000 pg/ml. Pro snížení detekčního limitu byla použita extrakce na pevné fázi s methanolem, čímž bylo dosaženo sedminásobné prekoncentrace a tím detekčního limitu 5200 pg/ml. Čas analýzy jednoho vzorku séra včetně extrakce na pevné fázi byl 20 min (18).

Průtoková injekční analýza

Na koloně průtokové cely je imobilizovaná AChE. Inhibitor (GAL) a substrát (acetylthiocholin) se míchá po průtoku přes kolonu s chromogenem (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) a měří se absorbance při 405 nm. Rychlost stanovení byla 40 vzorků za hodinu a detekční limit 144 000 pg galantaminu/ml séra (6).

RIA

Antisérum získané imunizací králíků podáním konjugátu galantamin-2-O-hemisukcinát-albuminu

bovinního séra je pro GAL vysoce specifické a neprokuje žádnou zkříženou reaktivitu s různými zástupci nejčastěji se vyskytujícími alkaloidů v rostlinách čeledi *Amaryllidaceae*. Detekční limity stanovení se pohybují od 0,5–100 ng GAL a i množství 0,1 ng může být detekováno. Radioaktivita ³H značeného GAL byla stanovena kapalným scintilačním detektorem (24).

EIA

Tato metoda stanovení je založena na využití enzymaticky značeného antigenu. Pro stanovení GAL bylo použito stejné antisérum jako při RIA. Rozsah stanovení je 2–100 pg GAL a detekovatelné je množství i 1 pg. Enzymatická reakce je měřena fotometricky při 410 nm. Optimální podmínky stanovení závisí na množství protilátek navázaných na povrch destičky a na vhodném ředění enzymaticky značeného antigenu (19).

Stanovení aktivity acetylcholinesterázy inhibované galantaminem

Pokud se ředí vzorky krve nebo homogenáty tkáně, ve kterých jsou inhibovány cholinesterázy, působením reverzibilních inhibitorů, dochází k reaktivaci inhibovaného enzymu, což vede k nadhodnocení enzymové aktivity. Ředění by tedy mělo být omezeno, aby nedošlo ke snížení koncentrace inhibitoru (např. při použití inhibitoru takrinu v koncentraci 2,5 μmol/l vedlo 100násobné zředění k 100% obnově aktivity AChE a 50% obnově aktivity BuChE) (27).

Ellmanova metoda

Spektrofotometrická metoda využívající jako substrát butyrylthiocholin jodid, který je AChE štěpen na thiocholin a kyselinu máselnou. Stanovuje se –SH skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina) a jeho zbytek 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina je fotometrován při 412 nm (4, 9, 15).

Radiometrická metoda

Acetylcholin jodid, radioznačený ¹⁴C v acetylové skupině se enzymatickou reakcí štěpí za podmínek 25 °C, pH 7,4 a nasycené koncentrace substrátu (10 mmol/l pro BuChE a 4 mmol/l pro AChE). Zbývá radioaktivita odpovídá značenému acetylcholinu, který nebyl hydrolyzován. Zjištěná radioaktivita je úměrná katalytické aktivitě, pokud kinetika reakce byla 0. řádu. Výhoda radiometrického stanovení spočívá v možnosti libovolné koncentrace substrátu, teploty a pH a také je zapotřebí jen velmi malého objemu vzorku. Závislost katalytické

aktivity na čase je lineární, než poklesne koncentrace substrátu pod 50 % původní hodnoty. Enzymatická aktivita ($\mu\text{mol/min} \times \text{l}$) se počítá ze specifické radioaktivity (Bq/mmol) přidaného substrátu, inkubační doby, objemu použité plazmy a erytrocytů (27).

Literatura

1. BARAKA, A. – HARIK, S. Reversal of central anticholinergic syndrome by galanthamine. *JAMA*, 1977, vol. 238, no. 21, p. 2293–2294.
2. BARNES, CA., et al. Chronic treatment of old rats with donepezil or GAL. Effect on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*, 2000, vol. 99, no. 1, p. 17–23.
3. BICKEL, U. – THOMSEN, T. – FISCHER, JP., et al. Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice. *Neuropharmacology*, 1991, vol. 30, no. 5, p. 447–454.
4. BORES, GM. – HUGER, FP. – PETKO, W., et al. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, vol. 277, no. 2, p. 728–738.
5. FULTON, B. – BENFIELD, P. Galanthamine. *Drugs Aging*, 1996, vol. 9, no. 1, p. 60–65.
6. GHOU, T. – TOWNSHEND, A. Flow injection determination of neostigmine and galanthamine by immobilised acetylcholinesterase inhibition. *Anal. Chim. Acta*, 1998, vol. 372, p. 379–386.
7. GREENBLATT, HM. – KRYGER, G. – LEWIS, T., et al. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.*, 1999, vol. 463, no. 3, p. 321–326.
8. GUILLOU, C. – MARY, A. – RENKO, DZ., et al. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis and structure-activity relationships of alkylene linked bis-galanthamine and galanthamine-galanthaminium salts. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, vol. 10, p. 637–639.
9. HAN, SY. – SWEENEY, JE. – BACHMAN, ES., et al. Chemical and pharmacological characterization of galanthamine, an acetylcholinesterase inhibitor, and its derivatives. A potential application in Alzheimer's disease? *Eur. J. Med. Chem.*, 1992, vol. 27, p. 673–687.
10. CHOPIN P. – BRILEY M. Effects of four non-cholinergic cognitive enhancers in comparison with tacrine and galanthamine on scopolamine-induced amnesia in rat. *Psychopharmacology*, 1992, vol. 106, p. 26–30.
11. ILIEV, A., et al. Effect of acetylcholinesterase inhibitor galanthamine on learning and memory in prolonged alcohol intake rat model of acetylcholine deficit. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1999, vol. 21, no. 4, p. 297–301.
12. JONES, RW. – COOPER, DM. – HAWORTH, J., et al. The effect of food on the absorption of galanthamine in healthy elderly patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1996, vol. 42, p. 671.
13. KEWITZ, H. Pharmacokinetics and metabolism of galanthamine. *Drugs of Today*, 1997, vol. 33, no. 4, p. 265–272.
14. MAELICKE, A. – ALBUQUERQUE, EX. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, vol. 393, no. 1/3, p. 165–170.
15. MARY, A. – RENKO, DZ. – GUILLOU, C., et al. Potent acetylcholinesterase inhibitors: design, synthesis, and structure-activity relationships of bis-interacting ligands in the galanthamine series. *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, vol. 6, no. 10, p. 1835–1850.
16. MIHAILOVA, D. – YAMBOLIEV, I. – ZHIVKOVA Z., et al. Pharmacokinetics of galanthamine hydrobromide after single subcutaneous and oral dosage in humans. *Pharmacology*, 1989, vol. 39, no. 1, p. 50–58.
17. MUCKE, HAM. Preclinical studies with galanthamine. *Drugs of Today*, 1997, vol. 33, no. 4, p. 259–264.
18. POKORNA, L. – REVILLA, A. – HAVEL, J., et al. Capillary zone electrophoresis determination of galanthamine in biological fluids and pharmaceutical preparations: experimental design and artificial neural network optimization. *Electrophoresis*, 1999, vol. 20, no. 10, p. 1993–1997.
19. POULEV, A. – DEUS-NEUMANN, B. – ZENK, MH. Enzyme immunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.*, 1993, vol. 59, p. 442–446.
20. RASKIND, MA. – PESKIND, ER. – WESSEL, T., et al. Galanthamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. *Neurology*, 2000, vol. 54, no. 12, p. 2261–2268.
21. RIEMANN, D. – GANN, H. – DRESSING, H., et al. Influence of the cholinesterase inhibitor galanthamine hydrobromide on normal sleep. *Psychiatry Res.*, 1994, vol. 51, p. 253–267.
22. Sopharma Bulgaria. Nivalin. [online]. [2001-04-06; 13:34 SEČ]. Dostupné z: <http://www.nivalin.com>
23. SRAMEK, JJ. – FRACKIEWICZ, JE. – CUTLER, RN. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2000, vol. 9, no. 10, p. 2393–2402.
24. TANAHASHI, T. – POULEV, A. – ZENK, M. Radioimmunoassay for the quantitative determination of galanthamine. *Planta Med.*, 1990, vol. 56, no. 1, p. 77–81.
25. TARIOT, PN. – SOLOMON, PR. – MORRIS, JC., et al. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galanthamine in AD. *Neurology*, 2000, vol. 54, no. 12, p. 2269–2276.
26. THOMSEN, T. – BICKEL, U. – FISCHER, JP., et al. Stereoselectivity of cholinesterase inhibition by galanthamine and tolerance in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1990, vol. 39, no. 6, p. 603–605.
27. THOMSEN, T. – KEWITZ, H. – PLEUL, O. Estimation of Cholinesterase Activity (EC 3.1.1.7; 3.1.1.8) in Undiluted Plasma and Erythrocytes as a Tool for Measuring In Vivo Effects of Reversible Inhibitors. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1988, vol. 26, p. 469–475.
28. WESTRA, P. – VAN THIEL, MJ. – VERMEER, GA., et al. Pharmacokinetics of galanthamine (a long-acting anticholinesterase drug) in anaesthetized patients. *Br. J. Anaesth.*, 1986, vol. 58, no. 11, p. 1303–1307.
29. WILCOCK, GK. – LILIENFELD, S. – GAENS, E. Efficacy and safety of galanthamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomised controlled trial. *BMJ*, 2000, vol. 321, p. 1–7.
30. WINSLOW, JT. – CAMACHO, F. Cholinergic modulation of a decrement in social investigation following repeated contacts between mice. *Psychopharmacology*, 1995, vol. 121, p. 164–172.
31. WOODRUFF-PAK, DS. – VOGEL, RW. – WENK, GL. Galanthamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, vol. 98, no. 4, p. 2089–2094.
32. YONKOV, DI. – GEORGIEV, VP. Cholinergic influence on memory facilitation iduced by angiotenzin II in rats. *Neuropeptides*, 1990, vol. 16, p. 157–162.

Korespondence: Mgr. Gabriela Krejčová
Vojenská lékařská akademie J. E. Purkyně
Třebešská 1575
500 01 Hradec Králové
e-mail: krejcova@pmfhk.cz

Do redakce došlo 3. 1. 2002
