STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Vývoj metody pro monitorování molekulární podstaty vzniku závislosti na drogách

Eliška Zlámalová

Praha 2011

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor SOČ: 3. Chemie

Vývoj metody pro monitorování molekulární podstaty vzniku závislosti na drogách

Development of the Method for Monitoring of the Molecular Basis of Drug Abuse

Autor: **Eliška Zlámalová**

Škola: **Gymnázium, Praha 7, Nad Štolou 1**

Vedoucí práce: **Doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D.**

Ing. Kamila Syslová

VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE
Fakulta chemické technologie
Ústav organické technologie

Praha 2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Ing. Petra Kačera, Ph.D. a Ing. Kamily Syslové a veškerou použitou literaturu jsem uvedla v seznamu literatury. Postup při zpracování a dalším nakládání s prací je v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V …… dne …… podpis: ……

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli s vypracováním této práce.

V první řadě děkuji Doc. Ing. Petru Kačerovi, Ph.D. a Ing. Kamile Syslové za skvělé vedení práce, obětavou pomoc, spoustu trpělivosti a podnětné připomínky, které mi během práce poskytovali. Bez nich bych nebyla schopna práci v plném rozsahu dokončit.

Nakonec můj dík patří i všem ostatním, kterým jsem pokládala nepřeberné množství otázek a kteří mi na ně byli ochotní odpovídat.

Anotace

Neustálý vývoj v oboru neurověd s sebou přináší jak velké množství poznatků, tak řadu nových otázek, které vyžadují hlubší poznání biochemické podstaty dějů, které se odehrávají v mozku. Studium mozkových procesů se tak přesouvá z úrovně buněčné na hladinu molekulární, na které je dnes nutné podstatu veškerých mozkových funkcí studovat.

Tato práce se věnuje vývoji metody, která by byla vhodná pro monitorování koncentračních hladin důležitých signálních látek přítomných v mozku tzv. neurotransmiterů. Objektem zájmu je dopamin jako molekula zodpovědná za přenos informace v malé oblasti mozku, v limbickém systému, části, která je zodpovědná za emoční prožívání. První fází této metody je odběr vzorků, který díky použití mikrodialýzy probíhá *in vivo*, což umožňuje sledovat koncentrační hladiny transmiterů v určitém mozkovém centru v průběhu času. Následně jsou odebrané vzorky připraveny pro HPLC-MS analýzu, která detekuje množství zkoumaných látek. Dále se tato práce zabývá použitím vyvinuté metody v experimentální studii zkoumající molekulární podstatu drogové závislosti. V animální studii byly srovnávány koncentrační hladiny dopaminu a jeho metabolitů v mozkovém centru *Nucleus accumbens* u potomků matek, které během gravidity požívaly metamfetamin, a matek, které se s drogou nesetkaly. Výsledky studie přináší informace o mechanismu fungování metamfetaminu a o vlivu prenatální expozice drogou.

Klíčová slova: mikrodialýza; kapalinová chromatografie (HPLC); hmotnostní spektrometrie (MS); *Nucleus accumbens*; dopamin; metamfetamin

Anotation

Rapid development in neurosciences brings not only a large amount of knowledge, but also arises many new questions, that require deeper insight into biochemical principles of brain processes. At present studies of brain processes and mechanisms were transformed from cell to a molecular level. The submitted work is devoted to a development of an analytical method, which enables monitoring of concentration levels of important signal substances present in brain. The substance of our interest was dopamine representing molecule responsible for transmission of information in a little area of brain called limbic system responsible for emotional experiences. The first step of the developed method was *in vivo* sample collection by microdialysis, which enables monitoring of dopamine and its metabolites in *Nucleus accumbens*. The biological samples were immediately prepared for HPLC-MS analysis by concentration method and stable-isotope-dilution assay used for its high precision of quantification. The novel developed method using combination of microdialysis with HPLC-ESI-MS/MS was tested on real samples obtained from the *Nucleus accumbens* of rat pups after an acute methamphetamine administration. It was proven that the developed assay could be applied to both a simultaneous analysis of all four substrates (dopamine, homovanillic acid, 3-methoxytyramine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) in microdialysis samples acquired from the rat brain and the monitoring of their slight concentration changes on a picogram level over time following methamphetamine stimulus. In biological part of the work it was proven that rat pups of mothers, who were administrated by methamphetamine during pregnancy (in comparison with pups of mothers with no methamphetamine experience) possess higher basal levels of dopamine in *Nucleus accumbens* as well are more sensitive in dopamine efflux after drug administration. Such a fact could be interpreted as a higher predisposition to drug abuse.

Keywords: microdialysis; high performance liquid chromatography (HPLC); mass spectrometry (MS); *Nucleus accumbens;* dopamine, methamphetamine

Obsah

1 Úvod 8
2 Teoretická část 10
2.1 Neurotransmise 10
2.1.1 Neuron 10
2.1.2 Nervový vzruch 12
2.1.3 Chemická synapse 14
2.2 Neurotransmitery 15
2.2.1 Aminokyseliny 16
2.2.2 Polypeptidy 16
2.2.3 Puriny 16
2.2.4 Aminy 17
2.3 Neurologická onemocnění související s neurotransmitery 19
2.3.1 Parkinsonova choroba 19
2.3.2 Schizofrenie 21
2.3.3 Alzheimerova choroba 22
2.4 Závislost (adikce) 24
2.4.1 Patologická závislost 24
2.5 Metamfetamin 29
2.6 Stanovení neurotransmiterů 29
2.6.1 Metody odběru biologických vzorků z mozku 29
2.6.2 Analytické metody stanovení neurotransmiterů 30
2.7 Pracovní hypotéza 35
3 Experimentální část 35
3.1 Chemikálie 35
3.2 Přístroje a pomůcky 36
3.3 Stabilitní testy 36

3.4 Odběr vzorků 37
3.4.1 Odběr mikrodialyzátu 37
3.5 Přípravy vzorků pro HPLC-ESI-MS/MS analýzu 37
3.5.1 Lyofilizace 37
3.5.2 SPE 38
3.5.3 Stripování dusíkem 38
3.6 HPLC-ESI-MS/MS metoda 38
3.7 Validace metody 39
3.7.1 Příprava standardů a kalibrační přímky 39
3.7.2 Přesnost, správnost, výtěžnost metody 40
3.7.3 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) 40
3.8 Experimentální studie - Zvířata 41
4 Výsledky a diskuse 41
4.1 Stabilita dopaminu 41
4.2 Zpracování vzorků 41
4.3 Optimalizace HPLC-MS metody 42
4.4 Validace 45
4.5 Experimentální studie – průběh koncentračních hladin 46
5 Závěr 50
6 Seznam použitých zkratek 51
7 Citace 52
8 Literatura 52

1 Úvod

Mozek se všemi svými biochemickými pochody je nejsložitější, nejméně prozkoumanou a zároveň nejtajemnější částí lidského těla. Je to orgán, jehož funkci lze popsat jako organizační a řídící. Centrální nervová soustava řídí celé naše tělo a utváří i naší osobnost, emoce a myšlenky. Právě z těchto důvodů se v dnešní době stávají neurovědy velmi populární. Neznalost biochemické podstaty dějů v mozku však jeho studium výrazně komplikuje. Sledování hladin neurotransmiterů by mohlo napomoct k vyřešení tohoto problému. Obzvláště monitorování koncentrací transmiterů *in vivo* v průběhu určitého času nám přináší velmi cenné informace.

Jedním z nejdůležitějších neurotransmiterů je dopamin (DA), který se spolu s adrenalinem a noradrenalinem řadí mezi katecholaminy. Významně se podílí na regulaci nálady, učení, spánku, pozornosti, odměny, vzniku deprese, Parkinsonovy choroby a schizofrenie. Dále hraje klíčovou roli při vzniku adikce, která se projevuje změnami v dopaminergním systému, hlavně v mozkovém centru *Nucleus accumbens*. DA je metabolizován enzymem catechol-O-methyltransferázou (COMT) nebo enzymem monoaminoxidázou (MAO) na kyselinu homovanilovou (HVA), *3*-methoxytyramin (3-MT) a 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu (DOPAC). Koncentrační hladiny DA a jeho metabolitů popisují chování dopaminergního systému a poskytují tak informace o enzymatické aktivitě.

Prostředkem pro monitorování koncentračních profilů látek v mozku *in vivo* v průběhu různých biochemických dějů je mikrodialýza. Vzorky mikrodialyzátu reprezentují zastoupení jednotlivých analytů v extracelulárním prostředí konkrétního mozkového centra, do kterého byla zavedena mikrodialyzační kanyla. Pro stanovení dopaminu a jeho metabolitů v mikrodialyzátu lze použít celou řadu analytických metod. V této práci bylo vybráno jako ideální spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS), protože tato metoda se oproti ostatním osvědčila jako mimořádně senzitivní, selektivní a navíc čas analýz není příliš dlouhý.

Metamfetamin (pervitin) je jedním ze zástupců stimulačních drog. Tato droga se výrazně rozmohla v bývalém Československu a i nyní je u nás velmi běžná. Často se vyrábí z efedrinu a pseudoefedrinu extrahovaného z některých léků i po domácku, což ještě zvyšuje její dostupnost. Velké nebezpečí tkví především ve vysoké návykovosti a dalších vedlejších účincích.

Předkládaná práce se zabývá vývojem nové, vysoce účinné a selektivní metody pro *in vivo* monitorování DA a jeho metabolitů (HVA, 3-MT a DOPAC) ve vzorcích mikrodialyzátů odebraných z mozkového centra *Nucleus accumbens* potkanů po aplikaci metamfetaminu - MA. Dále zkoumá vliv na dopaminergní systém potomků matek, které během gravidity požívaly MA.

2 Teoretická část

2.1 Neurotransmise

Nervová soustava přímo nebo nepřímo ovládá činnost všech orgánů v těle. Zajišťuje nervové řízení, které je rychlejší než hormonální, a tak je vhodnější k přenosu informací, které vyžadují rychlou koordinovanou reakci. Je to právě ona, kdo určuje, jak se chováme, co cítíme a jací jsme. Proto má nervová soustava mezi všemi ostatními orgánovými soustavami zcela zvláštní postavení. Její základní stavební jednotky jsou neurony, jejichž hlavní funkcí je vzájemná komunikace pomocí neurotransmise (= přenos impulsu na synapsi). Tato schopnost umožňuje funkčnost všech ostatních soustav v těle.

2.1.1 Neuron

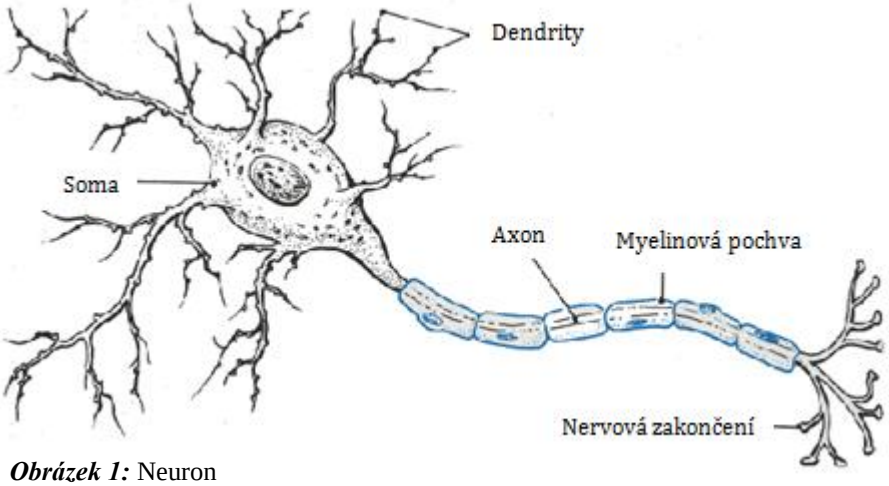
Neuron neboli nervová buňka je základní histologická i funkční jednotka nervové tkáně. Je to vysoce specializovaná buňka, schopná přijmout, vést, zpracovat a odpovědět na speciální signály.

Neuron popsal roku 1835 J. E. Purkyně, někdy je ale objev neuronu jako základní jednotky nervové tkáně připisován až Španělovi Cajalovi.

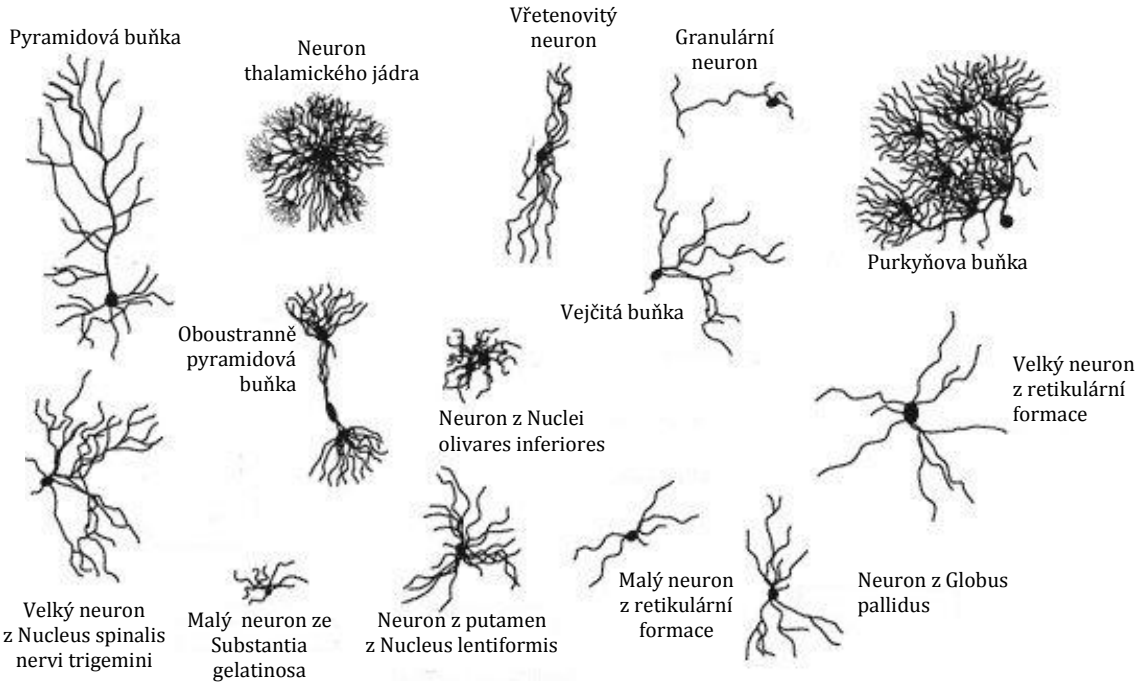
2.1.1.1 Stavba

Existuje více typů neuronů různého tvaru a velikosti, přesto má však většina z nich základní části shodné. Centrální částí je **buněčné tělo** (perikaryon, neurocyt, soma), jehož velikost se pohybuje od 6 μm (malé zrnité buňky kůry mozečku) do 100 μm (velké pyramidové neurony motorických oblastí mozkové kůry). V perikaryonu se nachází jádro neuronu (v něm bývá zpravidla jedno velké jadérko) a cytoplazma (neuroplazma) obsahuje i další organely společné všem somatickým buňkám (granulární endoplasmatické retikulum, Golgiho komplex, mitochondrie, lysozomy, atd.). Z těla buňky vystupuje 5-7 rozsáhle se větvících výběžků zvaných **dendrity**. Dendrity jsou specializované na příjem a zpracovaní signálů z jiných neuronů nebo ze smyslových buněk. V místě zvaném axonový hrbolek (odstupový konus axonu) ze somatu vychází dlouhý vláknitý **axon** (neurit). Axon je dlouhý výběžek, který vede akční potenciál (vzruch) směrem od těla buňky. Jeho první oddíl nazývaný iniciální segment je místem, kde vznikají nervové vzruchy. V cytoplazmě axonu (axoplazma)

jsou podélně probíhající neurofilamenta, která vyztužují axon. Většinou je obalen myelinovou pochvou (v CNS jen asi 40% neuronů – 60% holá vlákna), která je členěna Ranvierovými zářezy. Axon obalený pochvou se nazývá nervové vlákno. Na konci se neurit dělí do terminálních větvení a každé z nich končí početnými synaptickými zakončeními (knoflíky, terminal buttons, telodendria axonu). Tato nervová zakončení mají za úkol zprostředkovat přenos signálu mezi neurony nebo mezi neuronem a cílovou buňkou. Opravdu pozoruhodné jsou rozměry některých neuronů. Například pro neuron vedoucí od páteře (z míchy) až po konečky prstů na nohou bylo spočítáno, že pokud by bylo jeho tělo velké jako tenisový míček, dendrity by vyplnily průměrně velký obývací pokoj a axon by byl dlouhý 1,6 km (ve skutečnosti je 1 m dlouhý), ačkoliv by měl průměr pouhých 13 mm.



Obrázek 1: Neuron



Obrázek 2: Typy neuronů

2.1.2 Nervový vzruch

Vzruch (impuls) je fyziologický chemickofyzikální děj vyvolaný podmětem. Působení podmětu se označuje jako dráždění (stimulace) a je způsobeno buď přímým působením energie, nebo vznikem a šířením budícího potenciálu, který byl vyvolán synaptickým přenosem a aktivitou postsynaptického receptoru. Pokud je dráždění účinné (tj. má dostatečnou intenzitu – alespoň prahovou intenzitu), neuron reaguje vzruchem. Jeho membrána se řídí pravidlem „Všechno nebo nic“, buď reaguje stále stejně velkým vzruchem, nebo nereaguje. Po každém proběhnutí vzruchu je potřeba nějaký čas k obnově podmínek pro další vzruch (refrakterní doba). Impulsy se šíří bez dekrementu, tzn. jejich intenzita neubývá se vzdáleností.

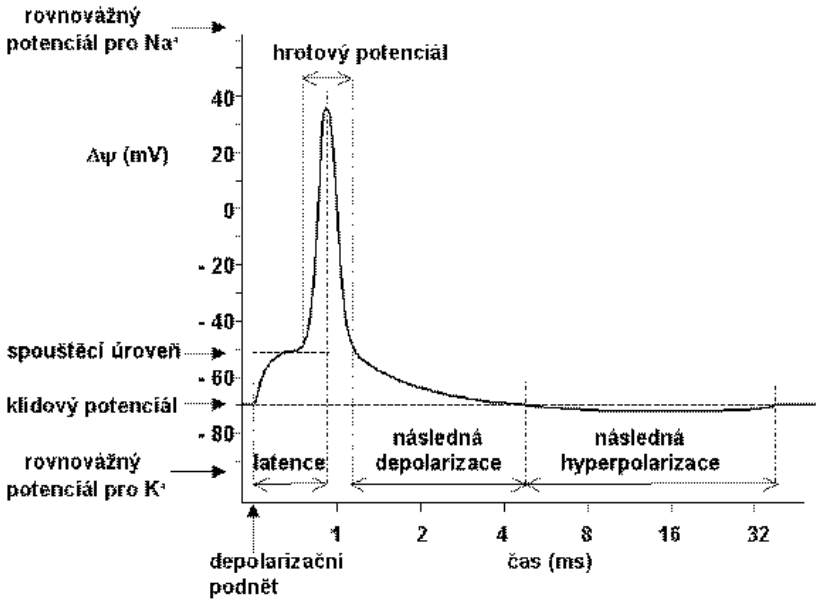
2.1.2.1 Princip šíření nervového vzruchu

2.1.2.1.1 Klidový potenciál

Díky specifické propustnosti semipermeabilní buněčné membrány pro různé druhy iontů (Na^+, K^+, Cl^- a aniontů bílkovin) a jejich rozdílným koncentracím uvnitř a vně nervového vlákna nese vnitřní povrch této membrány záporný náboj a vnější povrch náboj kladný. Na membráně tedy existuje potenciálový rozdíl (membránový potenciál), mluvíme o tom, že je polarizována.

2.1.2.1.2 Akční potenciál

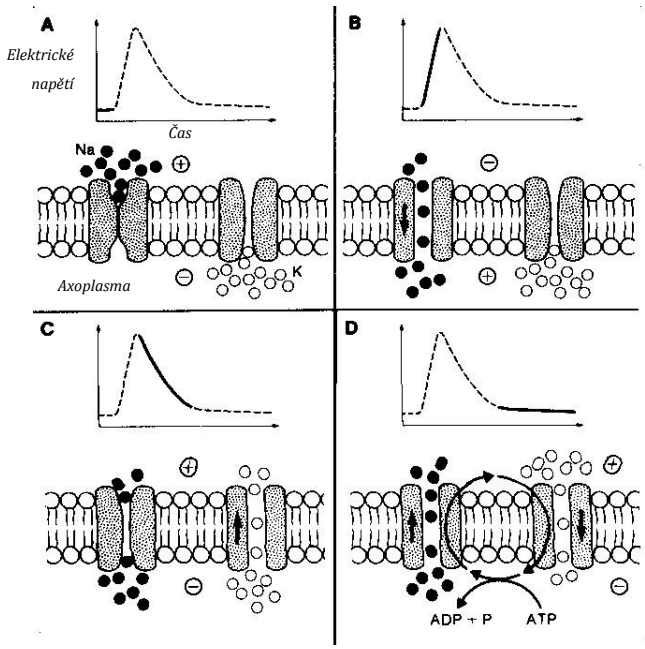
V okamžiku průchodu proudu se mění polarita membrány, začíná se depolarizovat. Po nějaké době se rychlost depolarizace zvýší a dojde až k obrácení polarity membrány (transpolarizace). Následuje rychlá zpětná repolarizace. Po dosažení asi 70% repolarizace se její rychlost sníží (negativní následný potenciál = následná depolarizace). Je dosaženo klidové hodnoty, ale dochází ještě k mírné hyperpolarizaci (pozitivní následný potenciál).



Obrázek 3: Akční potenciál

2.1.2.1.3 Iontové změny během akčního potenciálu

Na počátku je většina Na^+ iontů vně buňky (elektrický gradient směřuje dovnitř). Permeabilita membrány pro Na^+ začne stoupat a při spouštěcí úrovni se otevřou napěťově řízené sodíkové kanály. Výsledkem je rychlá depolarizace. Sodíkové kanály se posléze aktivně uzavírají a navíc se při transpolarizaci obrátí elektrický gradient pro Na^+. Oba tyto faktory omezují vstup Na^+ do buňky, což zahajuje repolarizaci. Otevření napěťově řízených draslíkových kanálů repolarizaci dokončuje (přesun K^+ ven z buňky). K obnovení původního rozložení iontů následně dochází působením sodíkodraslíkových pump (k aktivnímu přenosu využita energie z ATP).



Obrázek 4: Přesuny iontů během akčního potenciálu

2.1.2.1.4 Vedení vzruchu

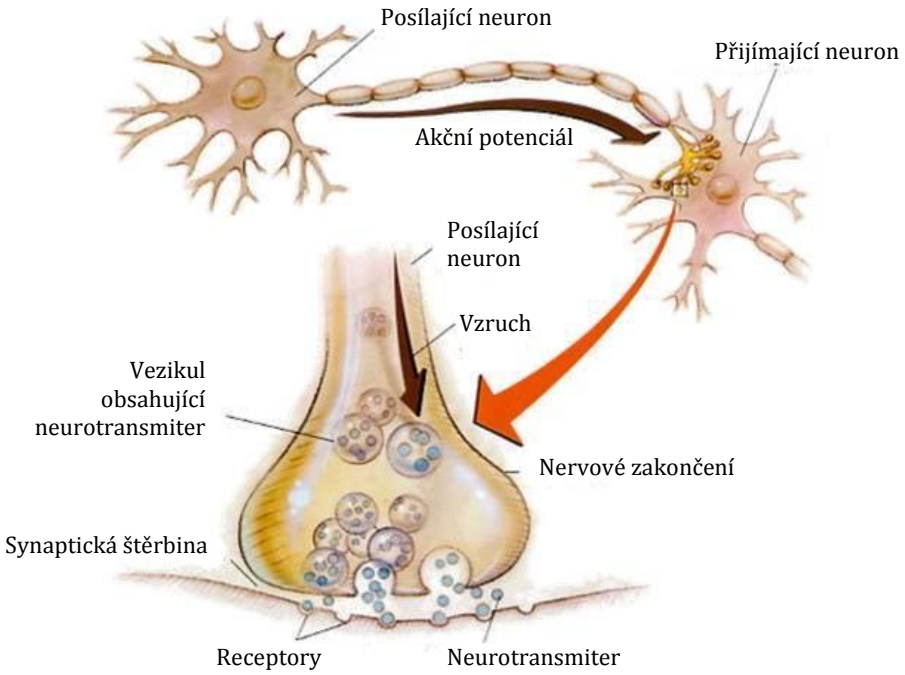
V okamžiku depolarizace vzniká místní elektrický proud, který dráždí sousední úsek axonu, což aktivuje napěťově řízené iontové kanály. Tímto způsobem se vzruch šíří až k synapsi.

2.1.3 Chemická synapse

Synapse je funkční spojení sloužící ke komunikaci dvou buněk, z nichž alespoň jedna je neuronálního původu. Prostřednictvím těchto kontaktů je zprostředkován přenos vzruchu (synaptická transmise) z jedné buňky na druhou. U člověka je tento přenos zprostředkován převážně chemickou cestou.

Synapse je tvořena dvěma základními útvary – presynaptickým, který je vlastně zakončením axonu (synaptické zakončení - terminal buttons) a obsahuje synaptické váčky, a postsynaptickým, který se nachází na dendritech, somatu nebo axonu. Tyto úseky se navzájem nedotýkají a jsou oddělené synaptickou štěrbinou.

Přenos vzruchu je zahájen poté, co akční potenciál dojde až k nesynaptickému úseku. V této oblasti se otevřou Ca^{2+} kanály a kalcium začne vtékat do buňky a aktivovat přesun synaptických váčků k synaptické štěrbině. Membrány váčků splynou s presynaptickou membránou a do štěrbiny se z nich exocytózou uvolní mediátor (neurotransmiter, transmiter). Neurotransmiter difunduje synaptickou štěrbinou a váže se k receptoru lokalizovanému na postsynaptické membráně. Receptor je bílkovina, která je specifickým vazebným místem jen pro určité molekuly (ligandy) – v tomto případě specifické mediátory. Pokud mezi nimi k vazbě dojde, receptor spustí buněčnou odezvu. Aktivuje adenylátcyklázu v postsynaptické membráně, ta katalyzuje syntézu enzymu cAMP a prostřednictvím cAMP dependentní proteinkinázy se změní prostupnost jednotlivých iontových kanálů. Podle typu mediátoru a synapse dochází ke dvěma různým případům. K depolarizaci otevřením Na^+ kanálů a po dosažení prahové potenciálu k přenosu impulsu. Nebo v druhém případě k hyperpolarizaci otevřením K^+ a Cl^- kanálů. Hyperpolarizací se vzdaluje spouštěcí úroveň, které musí depolarizace dosáhnout, aby vznikla vzruchová aktivita. Tento děj je podstatou synaptického útlumu (inhibice).



Obrázek 5: Synapse

2.1.3.1 Blokování synaptického přenosu

K blokování synaptického přenosu může docházet mnoha různými pochody. Prvním příkladem je inaktivace kationtových kanálů. Dále mohou být mnoha způsoby regulovány receptory. Velmi významné jsou také procesy týkající se neurotransmiterů. Transmitery jsou v synaptické štěrbině enzymaticky odbourávány (inaktivovány - metabolizace), zpětně přijímány do presynaptického zakončení (reuptake) nebo mohou být přebírány extraneuronálními buňkami (např. glie). Pokud se neurotransmiter naváže na receptor presynaptiké membrány (autoreceptor), může být inhibováno další uvolňování mediátoru.

2.2 Neurotransmitery

Neurotransmiter nebo také neuropřenašeč je specifická látka, která umožňuje přenos nervového vzruchu. Její nerovnoměrné rozprostření v nervovém systému přímo odpovídá rozmístění receptorů, které jsou na daný transmiter citlivé, a enzymů, které neurotransmiter syntetizují nebo katabolizují (inaktivují).

Podle chemické struktury se neurotransmitery dají rozdělit do několika skupin:

- **Aminy** (dopamin, noradrenalin, adrenalin, serotonin, histamin atd.)

- **Aminokyseliny** (kyselina glutamová, GABA - kyselina gama-aminomáselná, glycin a kyselina aspartová)
- **Puriny** (ATP, adenosin)
- **Polypeptidy** (vasopresin, oxytocin, substance P, somatostatin, glukagon, gastrin, neurotensin, sekretin atd.)
- **Ostatní** (acetylcholin, oxid dusnatý – NO, atd.)

2.2.1 Aminokyseliny

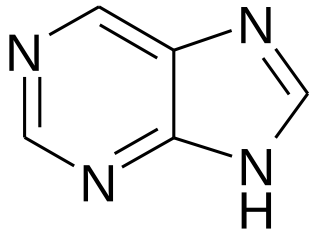
Mezi aminokyseliny se v chemii řadí veškeré molekuly, které obsahují karboxylovou (COOH-) a aminovou (NH_2-) funkční skupinu zároveň, v biochemii se většinou tímto termínem označují pouze alfa- aminokyseliny, tj. takové, které mají obě tyto skupiny navázané na stejný uhlíkový atom. V ještě užším smyslu se termín používá pouze pro biogenní alfa-L-aminokyseliny. Ty jsou základním kamenem pro tvorbu peptidů a bílkovin. Některé aminokyseliny v těle působí i samostatně jako neurotransmitery.

2.2.2 Polypeptidy

Peptidy jsou organické sloučeniny vzniklé spojením několika aminokyselin tzv. peptidovou vazbou. U polypeptidů se projevuje polymerní charakter. Kromě jiných biochemických funkcí v těle, bylo u některých polypeptidů ověřeno, že slouží jako transmitery.

2.2.3 Puriny

Purin je dusíkatá heterocyklická sloučenina, jejíž molekulu tvoří kondenzovaný pyrimidinový a imidazolový kruh.



Obrázek 6: Purin

Adenosin má navíc -NH_2 skupinu a je svázán s cukrem ribózou. ATP (adenosintrifosfát) se skládá z adenosinu a trojice fosfátů.

2.2.4 Aminy

Biogenní aminy jsou biogenní látky obsahující minimálně jednu aminoskupinu.

2.2.4.1 Monoaminy

Monoaminy jsou přirozeně se vyskytující neurotransmitery, které obsahují jednu aminoskupinu vázanou na aromatický kruh přes dvouuhlíkatý řetězec. Dělí se podle strukturních jednotek na katecholaminy, které lze považovat za jednoduché deriváty benzen-1,2-diolu. Mezi ně řadíme dopamin, adrenalin a noradrenalin. Druhou skupinou jsou indolaminy, mezi které patří serotonin, neboť má aminoskupinu místo na benzenové jádro navázánou na indolový kruh.

2.2.4.1.1 Dopamin

Dopamin je důležitým modulačním neuropřenašečem, který se podílí na regulaci nálady, učení, spánku, pozornosti, pocitu odměny, má vliv na motoriku atd. Změny v jeho koncentračních hladinách jsou spojovány s příčinou mnoha psychiatrických poruch (deprese, Parkinsonova choroba, schizofrenie). Dopamin je také považován za klíčový neurotransmiter při vzniku adikce, která je způsobena zvýšením koncentrační hladiny dopaminu a jeho metabolitů v mozkovém centru *Nucleus accumbens.*

2.2.4.1.1.1 Syntéza dopaminu

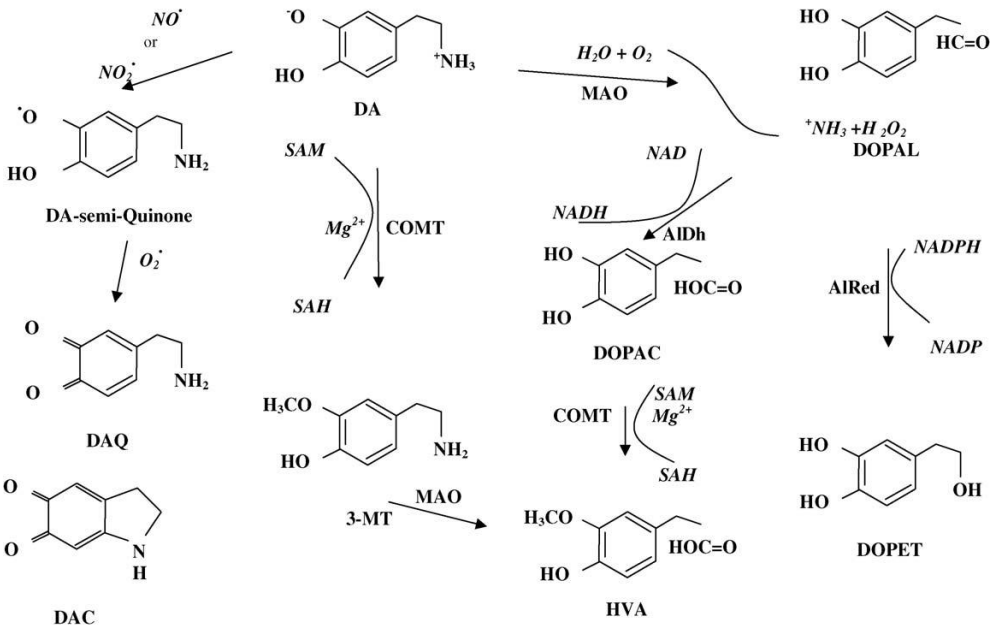
Dopamin je syntetizován v oblasti zvané *Substantia nigra* a ventrální tegmentální oblasti. Jeho biosyntéza začíná od aminokyseliny tyrosinu, kterou enzym tyrosin-3-monooxygenáza metabolizuje na L-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Ten je poté přeměněn na dopamin enzymem DOPA-dekarboxylázou. V některých neuronech je dopamin dále metabolizován na noradrenalin enzymem dopamin-β-hydroxylázou. Enzym fenylethanolamin-N-methyltransferáza (PNMT) může noradrenalin dále přeměnit na adrenalin.

2.2.4.1.1.2 Metabolismus a reuptake

Akční potenciál dopaminu v synapsi je modifikován dvěma cestami:

1. DA podléhá metabolismu první a druhé fáze. V první fázi procesu biotransformace je dopamin degradován mnoha způsoby, včetně neenzymatického, kdy NO- nebo NO_2- degraduje dopamin na semiquinone a jeho oxidací vzniká dopamin-o-quinone (DAQ). Intramolekulární cyklizací DAQ vzniká DAC. Enzymaticky je DA metabolizován monoaminoxidázou

(MAO) na 3,4-dihyroxyfenylacetaldehyd (DOPAL), který se buď enzymem aldehydreduktázou mění na 3,4-dihydroxyfenylethanol (DOPET) a nebo aldehydodehydrogenázou na 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu (DOPAC). Enzym catechol-o-methyltransferáza (COMT) pak DOPAC přeměňuje na kyselinu homovanilovou (HVA). COMT však může přímo degradovat dopamin na 3-methoxy-4-hydroxyfenylethylamin (3-MT) a enzym MAO jej následně metabolizuje na HVA (viz obrázek č. 7). Hladiny dopaminu a jeho metabolitů, vznikající v první fázi metabolismu přesně vystihují chování dopaminergního systému a poskytují tak informace o enzymatické aktivitě. V druhé fázi metabolismu je dopamin metabolizován na hydrofilnější látky (glukuronidy a sulfáty).



***Obrázek 7*:** Metabolismus dopaminu

2. Volný dopamin ze synapse je vychytáván zpět do presynaptické části neuronu (reuptake) prostřednictvím transmembránového proteinu - dopaminového transportéru (DAT). Ten je energeticky spřažen s elektrogenním Na^+ a Cl^- transportním mechanismem. Stimulancia tento protein blokují a zvyšují tak specificky akutní množství dopaminu v synapsi.

2.2.4.1.2 Serotonin

Serotonin (5-hydroxytryptamin; 5-HT) je jedním z nejdůležitějších neurotransmiterů. Řídí emoce, paměť, bolest, spánek a příjem potravy (neboť ovlivňuje

receptory chuti). Jeho nedostatek vede ke snížení přenosu nervových vzruchů, což je příčinou změn nálad, poruch spánku a depresí. Serotonin je dále spojován i s psychickými poruchami jako schizofrenie, maniodepresivní psychóza a chorobná úzkost.

2.2.4.1.3 Noradrenalin

Noradrenalin - NA (4-[(1R)-2-amin-1-hydroxyethyl]benzen-1,2-diol, též norepinefrin) stimuluje alfa- i beta-adrenergní receptory. Je to významný neurotransmiter působící jak v CNS, tak na periferiích. Spolu s adrenalinem je mediátorem sympatiku, takže mezi jeho účinky patří zvýšení pozornosti, ostražitosti, činnosti srdce, glykogenolýzy v játrech, příjmu kyslíku atd. Má také důležitý vliv na systém odměn (reward system) a paměť. Dále hraje významnou roli u vzniku některých onemocnění jako například deprese, hyperaktivity, poruch pozornosti nebo schizofrenie.

2.3 Neurologická onemocnění související s neurotransmitery

Jak už bylo výše uvedeno, neurotransmitery jsou neobyčejně důležité pro funkci celého našeho těla. Pokud ovšem dojde k nějakému narušení nebo poškození jejich metabolismu nebo receptorů, které jsou zodpovědné za jejich vnímání, mohou u pacienta propuknout velmi nepříjemné choroby. Tyto choroby jsou hodně různorodé a jejich léčba je často problematická. Navíc nejsou vůbec výjimečné a o některých z nich slyšel asi každý z nás. Proto se studiu těchto onemocnění a výrobě nových účinnějších léčiv věnuje odborná společnost po celém světě.

Několik nejznámějších nemocí způsobených poruchou funkce neurotransmiterů bych v této práci ráda popsala, protože díky nim je zcela zřejmé, jak citlivý je systém funkce neuropřenašečů v těle.

2.3.1 Parkinsonova choroba

„Když bylo Judith 69, všimla si, že se jí lehce třese levá ruka. Zprvu tomu nevěnovala velkou pozornost. Během dalšího roku se třes stále zhoršoval a přešel i na druhou ruku. Třes (tremor) byl hrubý a vyznačoval se rychlými ohyby zápěstí s frekvencí 4-5 pohybů za sekundu. Při klidném sezení se zhoršoval, ale zlepšoval se při spánku, nebo když rukama něco dělala.

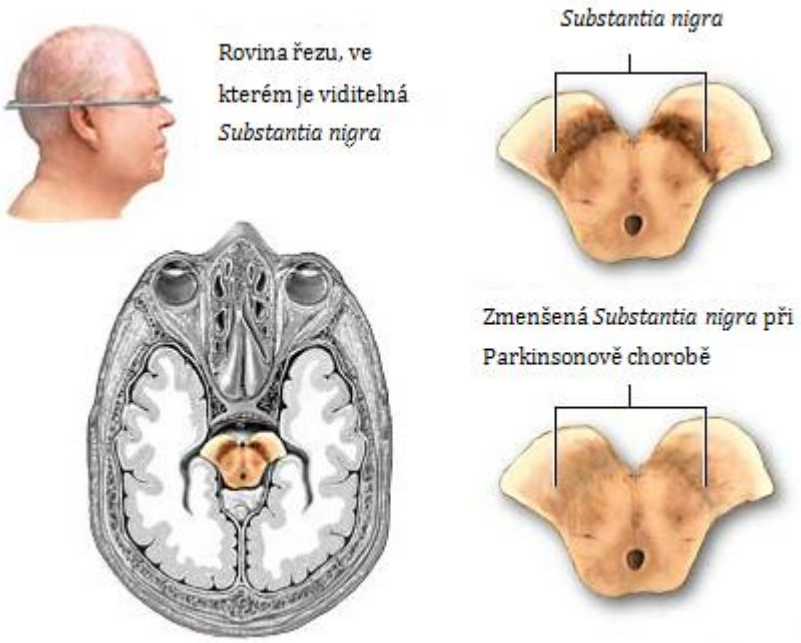
Judith si brzy všimla i dalších změn. Při nakupování nebyla schopná sama vyhledat v peněžence drobné, když psala, její rukopis přestal být po pár větách čitelný, začala chodit nápadně pomalu a téměř nezvedala nohy (spíše se šourala, než chodila). Objevily se i potíže, když se chtěla pohnout. Rozhodla se například, že půjde do kuchyně, ale trvalo jí mnoho sekund, než soustředěným úsilím přiměla nohy k chůzi. Jakmile už šla, nemohla se zastavit, a tak musela dojít až ke skříni nebo ke stolu, o které se zarazila. Kromě potíží při pohybech začala trpět i poruchou řeči. Mluvila tiše a nezřetelně, často se zastavila uprostřed věty a říkala, že zapomněla, co chtěla říci." [1)]

Uvedený popis nám ukazuje některé ze symptomů Parkinsonovy choroby. Navíc mají pacienti často shrbené držení těla, strnulou mimiku a nakonec se může dostavit i slintání, deprese a demence.

Nemoc se většinou objevuje po 65. roce života. Je způsobena odumřením nervových buněk v oblasti mozku zvané *Substantia nigra* (aby došlo k projevu symptomů, musí nastat výpadek více než 70% neuronů této oblasti). Nervové dráhy ze *Substantia nigra* vedou do jiné oblasti mozku zvané striatum, kde tvoří synapse, ve kterých se uvolňuje dopamin. V důsledku degenerace těchto neuronů, je v mozcích nemocných méně dopaminu než v mozcích zdravých lidí. *Substantia nigra* a striatum ovlivňují i další části mozku. Společně se účastní například řízení pohybů, včetně schopnosti s pohybem začít, takže pacienti s poškozenou nigrostriatální dráhou musí jednoduchým pohybům věnovat veškerou pozornost.

Příčin vzniku Parkinsonovy nemoci je několik. Může se jednat o dědičnou zátěž, zánět (encefalitidu), poruchu krevního zásobení, nádor nebo například otravu drogou MPTP (dříve používaná jako náhrada heroinu, jejím přínosem je, že se díky ní dá Parkinsonova choroba snadno vyvolat u pokusných zvířat).

K **léčbě** Parkinsonovy choroby se využívá hned několik odlišně působících medikamentů. Asi nejznámější je L-dopa, což je vlastně prekurzor dopaminu (na rozdíl od dopaminu je schopna přejít přes hematoencefalickou bariéru do mozku). Pomocí amfetaminů lze také zvýšit množství dopaminu v mozku (stimulací jeho uvolňování a také utlumením jeho zpětnovazebného vychytávání). Pomocí inhibitorů MAO (IMAO) lze zpomalit rozklad dopaminu. Zkouší se také transplantace buněk produkujících dopamin přímo do striata nebo inhibování cholinergních neuronů ve striatu, protože stimulují ty neurony striata, které jsou normálně utlumovány dopaminem.



Obrázek 8: *Substantia nigra* zdravého člověka a nemocného Parkinsonovou chorobou

2.3.2 Schizofrenie

„Předměty někdy vyskakují z podlahy. Prostorové vidění je často zmatené a chaotické. Když se někdy podívám dolů na své nohy, zdají se mi být nesmírně daleko. Nebo moje kolena se jeví jako nesmírně velká, ale zase se zmenší. Byly doby, kdy jsem vnímal, že místnost dýchá – její stěny se přibližovaly a vzdalovaly. Lampa nebyla prostou lampou: měla svou osobnost a pokoušela se se mnou komunikovat. Židle nebyla prostou židlí: zdála se mi skutečnější než skutečnost sama. To mě děsilo.“ [2)]

Schizofrenií trpí asi pět lidí z tisíce. Dělí se na mnoho typů a projevuje se celou řadou symptomů. Projevy nemoci se často dělí na dva typy: **pozitivní symptomy** jako jsou halucinace, bludné představy, zmatené myšlení, poruchy sociálního chování nebo neadekvátní asociace a **negativní symptomy** jako například ztráta emocí či motivace, neschopnost racionálně uvažovat, zaujímání zvláštních poloh na neobvykle dlouhou dobou či bizarní pohyby. U různých pacientů může jedem typ projevů nemoci výrazně převládat, takže by se mohlo na první pohled zdát, že ani nemohou trpět stejnou nemocí.

Schizofrenie je stále z velké části zahalena tajemstvím. Jistě ji ovlivňuje způsob rodinné výchovy a sociální okolnosti. Je také známo, že určitou roli u jejího propuknutí hraje dědičnost (onemocní-li jednovaječné dvojče, až v 50% případů onemocní i druhé jednovaječné dvojče, i když vyrůstá v naprosto odlišném prostředí), dále také podání

některých látek může u někoho vyvolat její vznik. Přesný mechanismus, který vyvolá změny v mozku vedoucí k rozvinutí schizofrenie, však zatím není objasněn.

Pitevní zprávy většinou svědčí o tom, že pacienti trpící schizofrenií mají vyšší hladinu dopaminu, což je považováno za hlavní příčinu onemocnění. V mozku zjišťujeme řadu hyperaktivních oblastí odpovídajících myšlení, vnímání, paměti i emocí. Významným viníkem je však prefrontální kůra (centrum vyšších koordinačně intelektuálních funkcí, včetně asociací), která aktivitu jednotlivých oblastí špatně koordinuje, a možná právě tím i zbytečně zvyšuje aktivitu různých oblastí mozkové kůry. U normálních lidí, kteří opakovaně požívají amfetaminy, propuká tzv. amfetaminová psychóza, při které je uvolněno velké množství dopaminu. Tento stav se svými projevy velmi podobá schizofrenii, což dopaminovou teorii potvrzuje. Na druhou stranu u pacientů s pokročilou fází schizofrenie nastává pokles dopaminových receptorů D_1 ve frontální (čelní) kůře mozku. To je zřejmě příčinou vzniku negativních symptomů. Schizofrenie by tedy mohla být způsobena celkovou nerovnováhou dopaminu v mozku. Podíl na vzniku symptomů má pravděpodobně i serotonin, jehož nadměrný účinek může vyvolat halucinace.

Léčba schizofrenie se neustále vyvíjí. Většina protischizofrenických léků (též zvaných antipsychotika nebo neuroleptika) blokuje receptory pro dopamin v mozku. Tato blokáda probíhá v celém mozku, takže u některých pacientů se mohou objevit příznaky Parkinsonovy choroby. V poslední době se vyrábí léky, které zároveň s dopaminergními receptory blokují i receptory pro acetylcholin, protože tímto způsobem je možné potlačit parkinsonismus. Jiná léčba, působící i proti negativním symptomům, vyrovnává hladiny dopaminu v mozku (popřípadě působí na dopaminové receptory selektivně). Některé léky blokují též receptory 5-HT_2, protože nadměrný účinek serotoninu na tyto receptory vyvolává halucinace.

2.3.3 Alzheimerova choroba

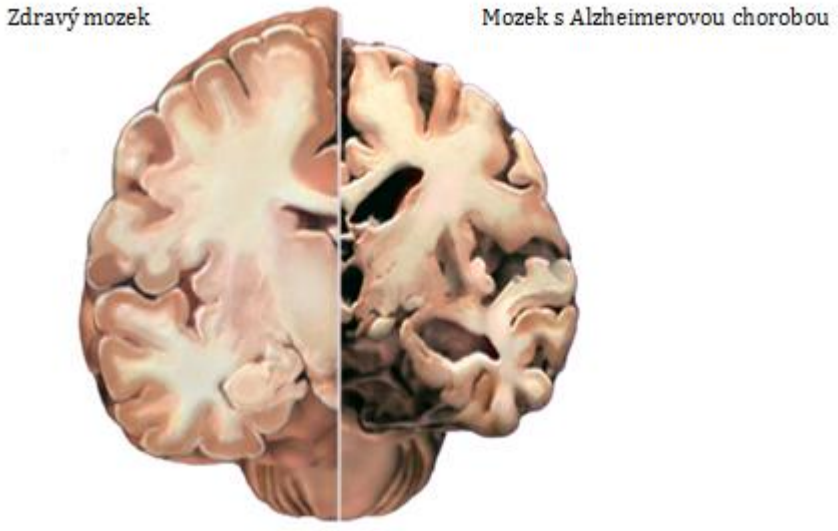
„George vyděsil svou ženu, když přitáhl sekačku trávy do koupelny. Žádala ho totiž, aby přinesl štafle. Dříve byl George managerem velkého strojírenského závodu, ale nyní pozoroval, že jeho znalosti běžných předmětů denní potřeby se začínají rozpadat. To ho stále více zbavovalo chápání světa kolem něj. Věděl však dobře, kdo je a kde je, a dovedl si vzpomenout na události z posledních dnů nebo týdnů.“ [3)]

Alzheimerova choroba je nejčastější příčinou vzniku demence (asi 70%) a čtvrtou nejčastější příčinou smrti v průmyslových zemích. Onemocnění většinou začíná ojedinělými výpadky paměti. Postupem času se zapomnětlivost zhoršuje, nemocný je zmatený a neschopný řešit i banální situace. Relativně pozdě se začnou objevovat i motorické výpadky (poruchy řeči, anomálie svalového tonu atd.).

K propuknutí Alzheimerovy nemoci často dochází až ve vysokém věku a je prokázáno, že se vyskytuje častěji u žen než u mužů. Při vzniku choroby se uplatňují genetické faktory. Další spouštěcí faktory zatím nejsou zcela známy.

V mozku nemocných dochází k masivnímu odumírání nervových buněk. V místech s největší ztrátou buněk se také nachází tmavé hutné usazeniny – tzv. plaky nebo smotky. Plaky jsou složeny z β-amiloidu, který se nerozpouští jako u zdravých lidí, ale usazuje se do plaků. Smotky tvoří propletená vlákna proteinů, která normálně udržují tvar a strukturu buněk. Poškozeny jsou zejména oblasti mozku, které se podílejí na paměti a učení (bazální část předního mozku, amygdala, hippocampus, Meynertovo bazální jádro, mozková kůra). V mozcích nemocných Alzheimerovou chorobou je výrazně menší množství některých neurotransmiterů, především acetylcholinu.

Léčba Alzheimerovy nemoci většinou spočívá v aktivaci acetylcholinových receptorů. Toho je dosaženo buď inhibicí rozpadu acetylcholinu, nebo přímým působením na receptory. Dále se zkouší podněcovat růst nervových buněk, omezuje se tvorba β-amiloidu, blokuje se vstup vápníku do buněk (ten způsobuje jejich poškození) atd.



Obrázek 9: Mozek zdravého člověka a nemocného Alzheimerovou chorobou

Nemocí, jejichž vznik má alespoň částečně na svědomí nerovnováha neurotransmiterů, je samozřejmě ještě celá řada, například deprese, epilepsie, úzkostné poruchy atd. Mohla bych pokračovat stále dál a každá z nich by byla samostatné téma pro obsáhlou studii. Já se však nyní blíže zaměřím na patologickou závislost, která také patří k těmto onemocněním a která se bezprostředně týká této práce.

2.4 Závislost (adikce)

Obecně řečeno je závislost stav, při kterém jedinec ke svému životu něco potřebuje nebo si myslí, že to potřebuje. V tomto smyslu tedy závislostí trpí každý z nás, protože ke své existenci nutně potřebujeme mnoho faktorů a okolností, jako například jídlo, pití, vhodné podmínky prostředí jako je přijatelná teplota nebo správné složení atmosféry a tak dále. Ve všech těchto případech se jedná o zcela normální a přirozenou závislost, tzv. **fyziologickou závislost**. Problém však nastává při vzniku nezdravé chorobné závislosti, tzv. **patologické závislosti**, kterou se budu dále zabývat. *(pozn. Pojmem závislost je mimo tento odstavec vždy myšlena závislost patologická.)*

2.4.1 Patologická závislost

Přestože jsou onemocnění závislostí velmi častá, dříve jim nebyla věnována dostatečná pozornost. Zprvu nebyly akceptovány jako samostatné onemocnění a i nadále je status závislostí jako nemoci pro mnoho lidí velmi diskutabilní, protože závislost považují spíše za slabost nebo dobrovolnou volbu než za nemoc. Jejich výzkum je každopádně velmi prospěšný, protože ač se to na první pohled třeba nezdá, závislosti jsou velmi nebezpečné, svým způsobem nakažlivé a sklony pro ně jsou dědičné. Léčba nemocných je většinou velmi obtížná, dlouhodobá a také dost nákladná. Postižený člověk často trpí psychickou, tělesnou i sociální bídou. Adikce mnohostranně ničí důstojnost a sebeúctu člověka, narušuje jeho morálku a způsobuje, že se od něj většina společnosti odvrátí. Navíc následky závislosti postižených ohromě trpí i jejich nejbližší okolí, jejich přátelé a rodina.

2.4.1.1 Charakteristika patologické závislosti

Patologická závislost je fyzický i psychický stav charakterizovaný změnami chování a dalšími reakcemi, při kterém je jedinec opakovaně nucen nekontrolovatelným nutkáním opakovat své chování bez ohledu na jeho dlouhodobé důsledky. Toto rizikové chování má u daného jedince mnohem větší přednost, než jiné jednání, kterého si kdysi cenil více.

Příklad z praxe: „Jasně jsem si uvědomil, že jsem závislý, když jsem slíbil synovi, že přijdu domů za dvě hodiny, a místo toho jsem přišel za 14 dní." (Ze skupinové terapie) [4)]

Pod pojmem závislost se skrývá velké množství různých typů rizikového chování. Svým způsobem můžeme jistě mluvit o závislosti na internetu, práci, nakupování nebo na patologickém hráčství, protože biologické mechanizmy těchto náruživostí jsou v mnoha ohledech srovnatelné s mechanizmy drogových adikcí. Nicméně definice syndromu závislosti podle Světové zdravotnické organizace (WHO), podle 10. revize Mezinárodní klasifikace nemocí a podle dalších uznávaných organizací hovoří o závislosti spíše jen jako o užívání návykové látky nebo třídy látek.

Definitivní diagnóza závislosti je většinou stanovena, až pokud jsou během jednoho roku splněny minimálně tři z následujících podmínek:

a) Silná touha nebo pocit puzení užívat látku
b) Potíže v kontrole užívání látky (hlavně v ukončení užívání látky nebo v kontrole jejího množství)
c) Užívání látky k odstranění tělesných příznaků odvykání (k mírnění odvykacího stavu se občas užívá i příbuzná látka s podobnými účinky)
d) Průkaz tolerance - potřeba vyšších dávek drogy k dosažení žádoucího stavu (v důsledku toho uživatel může brát i takové množství drogy, jaké by uživatele bez tolerance usmrtilo)
e) Zanedbávání jiných zájmů a potěšení ve prospěch užívání drogy
f) Pokračování v užívání i přes jasný důkaz škodlivých následků užívání (depresivní stavy, nákaza virovou žloutenkou při injekční aplikaci, cirhóza jater u alkoholiků nebo toxické poškození myšlení)

2.4.1.2 Drogová závislost

Drogová závislost je nejpoužívanější označení pro stav, kterému se také říká toxikomanie nebo závislost na návykových látkách, abúzus atp. Droga je návyková psychotropně aktivní látka, která je schopna navodit stav náruživosti (tj. velmi těžce zvladatelnou potřebu opakovaně užívat tuto látku).

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) lze drogovou závislost definovat jako psychický i fyzický stav charakterizovaný změnami chování a dalšími reakcemi, které vždy zahrnují nutkání užívat drogu opakovaně pro její psychické účinky a také

proto, aby se zabránilo vzniku nepříjemných stavů vznikajících při nepřítomnosti drogy v organismu.

2.4.1.2.1 Historie

Přestože se drogové závislosti v moderní době stávají častějšími než dřív, rozhodně nejde o žádnou novinku. Závislosti na návykových látkách jsou starší než lidstvo samo. Objevují se nejen u lidí, ale dokonce i u zvířat a lidský druh provází už od jeho zrození.

Vlastnosti makové šťávy byly na území starověké Mezopotámie známy už v neolitu (8000 - 5000 let př.n.l.). V Egyptě z máku připravovali božský lék proti bolesti – opium ve 14. století př.n.l. a na Krétě se našly sošky bohyní máku a makovic s výrazem opiového opojení z 13. století př.n.l.. Alkohol (ethanol) má tradici od nepaměti. Jednou z nejstarších kulturních rostlin lidstva je konopí. „Božský list“ - list keře koky (*Eruthroxylon coca* - obsahující kokain) znají v Jižní Americe pravděpodobně už 5000 let. Stimulačních účinků keře Kath (*Catha edulis*) využívali běžci - poslové ve staré Habeši. Halucinogenní drogy mají svou roli v dějinách náboženství (houbový kult indiánů střední Ameriky je zhruba 4000 let starý, „božské maso“ - lysohlávky (*Psylocibe mexicana)* byly nejpopulárnější u Aztéckých kněží). Námel paličkovice nachové (*Claviceps purpurea*) obsahující LSD způsoboval poměrně časté hromadné otravy žitem (popřípadě z něho vyrobenými produkty) v Evropě v době středověku (epidemie popisované jako „svatý oheň“). Známé byly i mandragory (tzv. drogy nočních stínů), bobule rulíku zlomocného, semena blínu či durmanu a mnoho dalších.

Obrázek 10-12

V 19. století došlo díky rozvoji farmaceutického průmyslu k masovému rozšiřování drog. Státy celého světa na tento fenomén zareagovaly vydáváním protidrogových zákonů. Ve 20. století začaly být závislosti na omamných látkách (včetně závislosti na alkoholu a nikotinismus) posuzovány jako chronická onemocnění centrální nervové soustavy. Výzkum mechanizmů závislosti a snahy o léčení a prevenci závislostí byly stále výrazněji podporovány. Přesto se ve světě stále zvyšuje počet lidí závislých na drogách a obohacuje se spektrum užívaných drog.

2.4.1.2.2 Mechanismus vzniku závislosti na droze

Klíčovou roli pro vznik závislostí hraje mozek, konkrétně jeho oblasti známé jako **centra slasti (pleasure centers)**.

Centrum slasti je termín, kterým se označují oblasti mozku, které se podílí na pocitu potěšení, slasti a získání odměny. V lidském mozku se nenachází na jednom určitém místě, ale spíše tvoří propojený systém oblastí, které vzájemně komunikují pomocí neurotransmiterů. Hlavní nervové dráhy tohoto systému používají jako přenašeč vzruchů dopamin.

Význam těchto center byl objeven v padesátých letech minulého století skupinou amerických psychologů – James Olds, Peter Milner a Burrhus Frederic Skinner. Ti při studiu různých částí mozku zkoušeli krysám v narkóze voperovat do mozku elektrody a posléze pozorovali, jak krysy reagují na dráždění způsobené vysílanými elektrickými impulsy. Krysy, které měly elektrodu umístěnou v některé z oblastí *Nucleus accumbens* (NcA) nebo ve ventrální tegmentální oblasti (VTA) vypadaly překvapivě spokojeně. Dokonce když měly možnost stisknutím páčky vysílat elektrické impulsy z elektrody, většina zvířat ztratila zájem o všechno ostatní a mačkala páčku, dokud nezemřela žízní, hladem a vyčerpáním. Vědci brzy zjistili, že hlavní nervové dráhy z NcA a VTA jsou závislé na dopaminu a zvířata, kterým byly podány dopaminové blokátory, na impulsy přestanou reagovat.

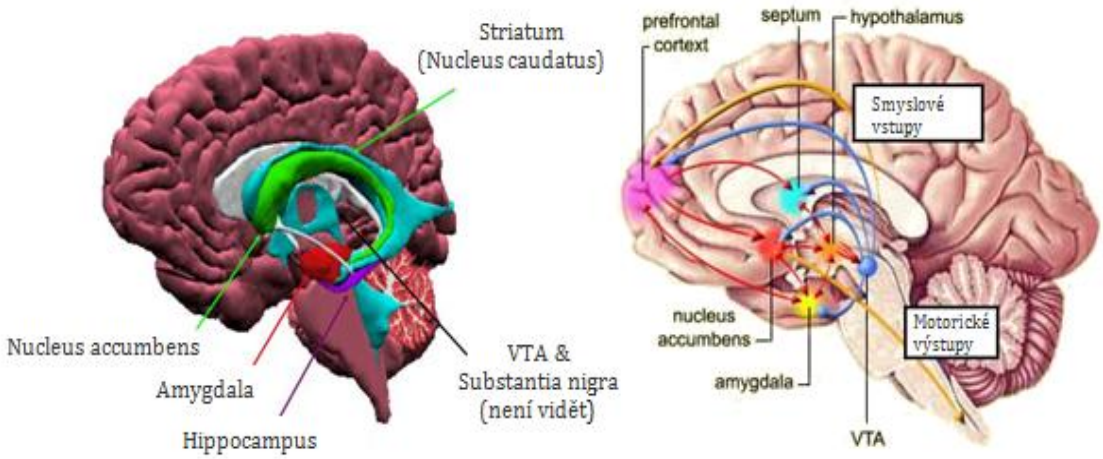
Dnes je známo, že stejně jako elektrody působí i mnoho návykových (adiktivních) látek na zvýšení hladiny dopaminu v mozku. Aktivací dopaminergních neuronů vzniká příjemný pocit (tzv. reward system). Pro vznik drogových závislostí je tento mechanizmus probíhající v kortikolimbickém dopaminergním systému (základní interakce se odehrává mezi ventrální tegmentální oblastí, *Nucleus accumbens* a prefrontálním kortexem) zcela zásadní.

Při užívání některých drog je po nějaké době nutné začít zvyšovat podávanou dávku, aby bylo dosaženo stejného pocitu jako na začátku. Taková potřeba zvyšování dávky se nazývá **tolerance**.

Při dlouhodobém užívání drogy dochází v mozku k neuroadaptačním změnám. Poklesne aktivita dopaminergního systému a cílové buňky se stanou na dopamin méně citlivé (tzv. down-regulation –„buňky se přizpůsobí novým podmínkám“). Tím pádem se při vysazení drogy dostaví **abstinenční příznaky.** Po určité době se kvůli nim abstinence stává nesnesitelnou a droga je jediný prostředek, který dokáže drogově závislého vrátit do normálu. To je také hlavní důvod, proč se okruh jeho zájmů zúží výhradně na drogu.

2.4.1.2.2.1 Nucleus accumbens (NcA)

Nucleus accumbens je mozková struktura patřící do limbického systému („emoční mozek“). Společně s čichovým hrbolkem tvoří ventrální striatum, které je součástí bazálních ganglií. Je možné ho rozdělit do dvou struktur, které se liší jak morfologií, tak funkcí. Tyto části se nazývají *core* a *shell*. *Nucleus accumbens* hraje klíčovou roli v procesech odměny, potěšení, radosti, slasti, závislostí, strachu a placebo efektu. Dále je také místem účinku adiktivních psychostimulancií, a proto má význam sledovat koncentrační změny dopaminu a jeho metabolitů v NcA, neboť příčina vzniku adikce byla neurobiologicky popsána jako zvýšení hladiny dopaminu a jeho metabolitů v tomto mozkovém centru.



Obrázek 13, 14: Mozek s *Nucleus accumbens*

2.5 Metamfetamin

Metamfetamin - MA (též *methamphetamin* nebo pervitin) je syntetická stimulační droga. Chemicky se jedná o (S)-N-methyl-1-fenylpropan-2-amin. Vyrábí se z jiné stimulační látky efedrinu (systematický název (R*,S*)-2-(methylamin)-1-fenylpropan-1-ol), která je původně alkaloid z tropických keřů čeledě chvojníkovitých (*Ephedraceae*) rodu *Ephedra*.

Okamžitým **projevem podání MA** je příval energie, celkové zbystření a zlepšení nálady. Po vyšších dávkách se dostavuje až pocit euforie. Při dlouhodobém užívání vzniká jak fyzická, tak psychická závislost a objevuje se i řada negativních vedlejších účinků (např. nervozita, paranoia atd.).

Mechanismus účinku MA je přičítán hlavně zvýšení koncentrace noradrenalinu, dopaminu a serotoninu na příslušných nervových synapsích a to jak v CNS, tak na periferiích. Tohoto zvýšení hladiny neurotransmiterů je dosaženo díky nadměrnému uvolňování mediátorů z nervových zakončení, blokádou jejich zpětnovazebného vychytávání a také je blokována jedna cesta metabolizace, která normálně funguje díky enzymu monoaminooxidáza (MAO), který inaktivuje katecholaminy.

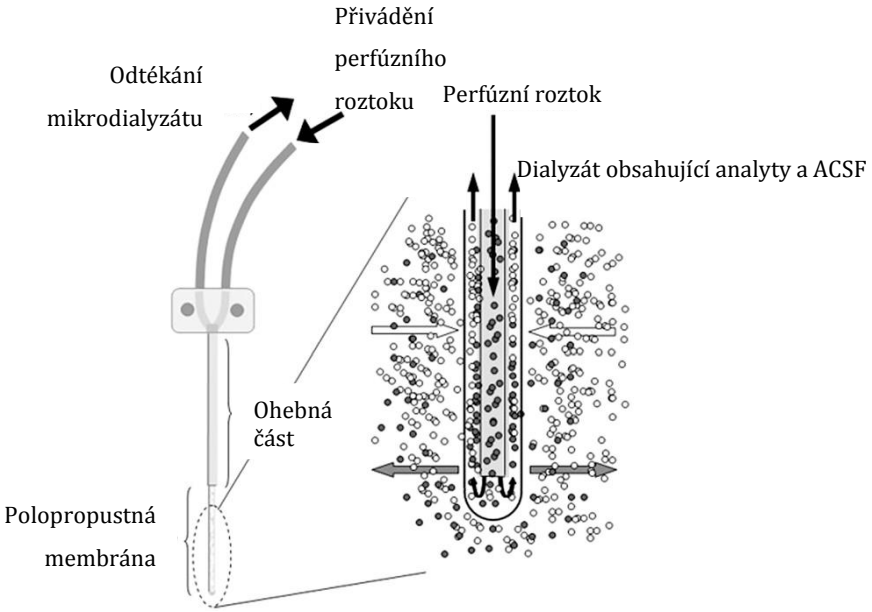
2.6 Stanovení neurotransmiterů

2.6.1 Metody odběru biologických vzorků z mozku

2.6.1.1 Mikrodialýza

Velmi užitečným nástrojem pro studium biochemické podstaty dějů v mozku se stal mikrodialyzační odběr, který umožňuje monitorování zastoupení analytů v extracelulárním prostředí v konkrétním mozkovém centru nezávisle na procesech probíhajících v celém organismu. Při mikrodialýze je potkanům na přesně definované místo v mozku voperována kanyla (katetr) s polopropustnou membránou, která je při odběru soustavně promývána perfuzním roztokem (artificiální cerebrospinální tekutina – ACSF), který má podobné složení jako extracelulární prostředí mozku. Mikrodialyzační katetr funguje na podobném principu jako krevní kapilára v těle. Díky pasivní difúzi po směru koncentračního gradientu pronikají do dialyzátu molekuly jen do hmotnosti 5 – 40 kDa (podle velikosti pórů membrány). V mikrodialyzátu

nezískáváme přesné koncentrace, ale jen jejich určitý známý zlomek podle rychlosti pomývání kanyly.



Obrázek 15: Schéma mikrodialýzy

2.6.1.2 Mozek

Jednou z dalších možností, jak sledovat zastoupení neurotransmiterů v mozku, je sledovat celý mozek, který byl vyjmut, a preanalytickou metodou jej upravit pro analýzu HPLC-ESI-MS/MS. Nedostatkem této metody je však nemožnost monitorovat koncentrační změny v čase, na druhou stranu nespornou výhodou je možnost sledovat hladiny analytů v jednotlivých částech mozku a dojít tak k představě o mapě koncentrací v celém mozku.

2.6.2 Analytické metody stanovení neurotransmiterů

Sledování koncentrací DA a jeho metabolitů, případně jiných neuropřenašečů, se v neurovědách stalo velice důležitým úkolem, proto mu bylo věnováno již mnoho prací a byla vyvinuta spousta analytických metod, například plynová chromatografie, plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem, kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, amperometrickou detekcí, biamperometrickou detekcí, fluorometrickou a oxidativní amperometrickou detekcí. Dále pak elektroforéza s UV detekcí, elektrochemickou detekcí a elektroforéza spojená s hmotnostním spektrometrem. Ovšem nejpopulárnější technikou v oblasti neurověd se stalo spojení kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD), při kterém bylo ovšem nutné nejrůzněji předpřipravit vzorky pro analýzy. Proto je tato metoda velice

často zdlouhavá, náročná a v případě elektrochemické detekce jsou látky identifikovány jen na základě porovnání retenčních časů (doba, která proběhne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky) se standardy. Poměrně nová technika ve studiu neurotransmiterů je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí, při které se limit detekce dopaminu pohybuje okolo 0.1 pg/mg. Tato chromatografie spojená s MS bývá často vysokorychlostní.

2.6.2.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních (dělících) metod. Hlavní části kapalinového chromatografu jsou většinou zásobníky s mobilní fází, vysokotlaká pumpa, dávkovač, kolona a detektor. Částí, ve které dochází k dělení, je chromatografická kolona, což je zpravidla skleněná, plastová nebo ocelová trubice naplněná drobnými částicemi vhodného sorbentu, které tvoří stacionární fázi. Často používanou stacionární fází jsou mikročástice silikagelu, na kterých jsou navázány uhlovodíkové řetězce. Mezi částicemi stacionární fáze kolonou protéká kapalina (mobilní fáze, eluent). Separace začne probíhat, když je vzorek nastříknut a posléze vstoupí do kolony. Při kontaktu se sorbentem každá složka vzorku částečně přechází do stacionární fáze ve snaze dosáhnout koncentrační rovnováhy. Zbylé molekuly vzorku, které se nenachází ve stacionární fázi, jsou mobilní fází unášeny dál kolonou. Díky stálému přísunu mobilní fáze je však rovnováha koncentrací mezi mobilní a stacionární fází neustále narušována a celý vzorek tak postupuje kolonou. Jelikož je retence (zadržení) ve stacionární fázi odlišná pro různé složky, dochází po průchodu kolonou k jejich oddělení.

Obrázek 16: HPLC kolona

2.6.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda, která se vyznačuje vysokou senzitivitou a selektivitou. Vlastní třídění a identifikace iontů se provádí podle

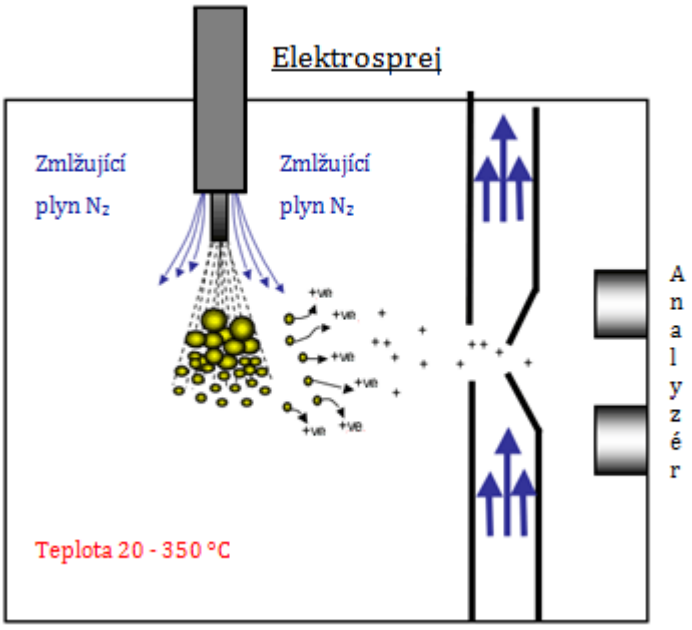
jejich efektivní hmotnosti – *m/z (mass-to-change)*, a proto má výbornou vypovídající schopnost o struktuře analyzovaných látek. MS technika je v dnešní době běžně využívána v základním i klinickém výzkumu, farmacii, biochemii a potravinářství. Děje probíhající v hmotnostním spektrometru jsou postupně tyto:

1) převedení látky do plynného stavu
2) ionizace molekul
3) separace ionizovaných molekul v analyzátoru

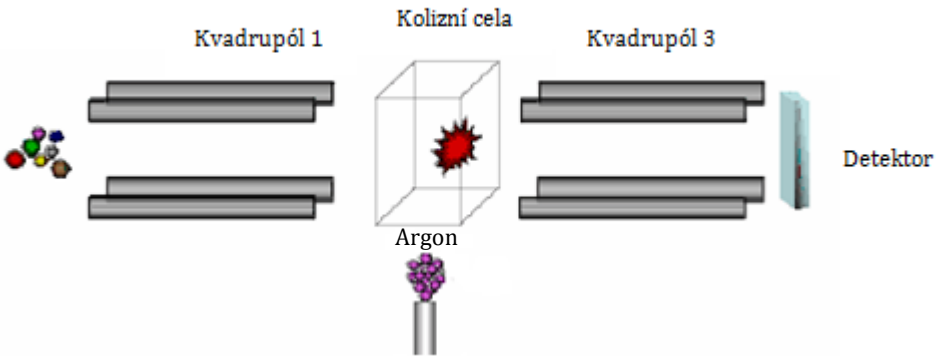
Pro různé typy látek jsou používány různé typy ionizačních zdrojů. Historicky byly využívány tzv. tvrdé ionizační techniky, k nimž patří elektronová ionizace (EI). V dalším vývoji MS se objevily nové metody ionizace - tzv. měkké ionizační techniky, které probíhají za atmosférického tlaku (tzv. API – atmospheric pressure ionization), mezi něž řadíme ionizaci elektrosprejem (ESI - electrospray ionization), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI – atmospheric pressure chemical ionization) a fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI – atmospheric pressure photoionization). Díky měkkým ionizačním technikám se systém HPLC/MS stal rutinní a spolehlivou analytickou technikou s obrovským potenciálem využití v celé řadě oborů (chemie, biochemie, medicína, farmacie atd.).

Ionizace elektrosprejem (ESI) je velice šetrná technika ionizace, která je vhodná k analýze biomolekul a látek v kapalném stavu (např. po výstupu z kapalinové chromatografie). Analyt, který je rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, je přiveden kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 – 5 kV). Po výstupu z kapiláry jsou vznikající kapičky za pomoci zmlžujícího plynu rozprášeny a nesou na povrchu velké množství nábojů. Odpaření rozpouštědla vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až při kritické hodnotě dojde k tzv. Coulombické explozi, tj. rozpadu jednotlivých kapiček na ještě menší kapičky s rozdělenými původními náboji elektroforetickým mechanismem. Tento proces se opakuje až do doby, kdy se ionty analytu uvolní do plynné fáze a vznikají kvazimolekulární ionty. Vzniklé ionty prostupují vakuovými clonami a štěrbinovými elektrodami, takže dojde k vytvoření svazku iontů, který posléze vstupuje do hmotnostního analyzátoru. Celý proces funkce elektrospreje lze tedy shrnout a rozdělit na 3 základní kroky: 1) zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabité kapičky; 2) uvolnění iontů z kapiček; 3) transport iontů do hmotnostního analyzátoru (obrázek 17).

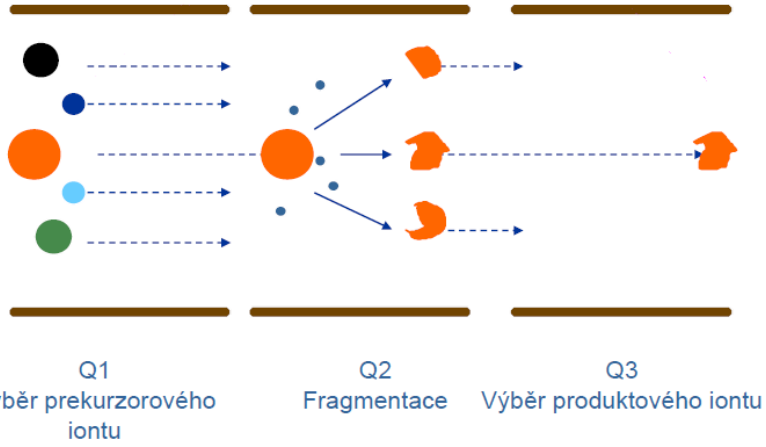
Hmotnostních analyzátorů existuje několik typů pracujících na různých fyzikálních principech. Jsou to například kvadrupólové TOF - analyzátory doby letu a iontové pasti. Kvadrupólový analyzátor, používaný v této práci, se skládá ze 4 paralelních kovových elektrod, které jsou uspořádány ve vrcholech čtverce. Analyt je přiváděn do středu čtverce a na protější páry elektrod je vkládán opačný potenciál, který se skládá ze stejnosměrné a střídavé složky, čímž je produkováno elektromagnetické pole. Pole způsobuje oscilaci iontů, která vede k selektivnímu stabilizování nebo destabilizovaní jejich cesty mezi elektrodami. Napětí vložená na tyče (elektrody) jsou zvolena v daném časovém okamžiku tak, aby mezi tyčemi v určitém časovém intervalu proletěly jen ionty s danou hodnotou m/z (popřípadě za celou dobu proletěly jen ionty s jedinou hodnotou m/z) a dostaly se k detektoru. Ostatní ionty jsou zachyceny na elektrodách kvadrupólu. Kombinací více kvadrupólů lze získat tandemový hmotnostní analyzátor (MS/MS), který dokáže pracovat v SRM (Selected Reaction Monitoring) módu. V této práci byl použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem v parabolickém uspořádání (viz obrázek 20). Na prvním kvadrupólu Q1 dochází k izolaci prekurzorového iontu, který je v kolizní cele Q2 fragmentován kolizním plynem (nejčastěji argonem) na produktové ionty, ze kterých je na třetím kvadrupólu Q3 izolován nejstabilnější ion. Prekurzorový i produktový ion jsou pro každou látku charakteristické, a tak lze analyzovat i látky se stejnou molekulovou hmotností.



Obrázek 17: ESI ionizace



Obrázek 18: Schéma tříkvadrupólového analyzátoru



Obrázek 19: Děje v tříkvadrupólovém analyzátoru

Obrázek 20: MS spektrometr Varian 1200L

2.7 Pracovní hypotéza

Cílem práce je vyvinout rychlou, vysoce senzitivní a selektivní analytickou metodu pro sledování dopaminu a jeho metabolitů (3-MT, HVA a DOPAC) v mozkových mikrodialyzátech. Tato metoda by měla být následně použita v experimentální studii, která má za cíl nalézt vztah množství DA a jeho receptorů u potomků matek závislých na metamfetaminu v průběhu gravidity ve srovnání s potomky matek, které drogu nepřijímaly. Hladiny DA a jeho metabolitů budou monitorovány v mikrodialyzátech z mozkového centra *Nucleus accumbens*, které je zodpovědné za tvorbu závislosti, která by měla korelovat s množstvím dopaminergních receptorů a s citlivostí k vyplavování dopaminu po podání návykové látky.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Tabulka číslo 1: Standardy

Název	Čistota	Výrobce
Dopamin hydrochlorid	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
Dopamin hydrochlorid d_4	≥ 99 %	CDN Isotopes, USA
DOPAC	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA
3-MT.HCl	≥ 99 %	Fluka, Švýcarsko
HVA	≥ 99 %	Sigma Aldrich, USA

Tabulka číslo 2: Rozpouštědla, experimentální látky

Název	Čistota	Výrobce
Methanol	LC/MS	Fluka, Švýcarsko
Voda	LC/MS	Fluka, Švýcarsko
Kyselina octová	99,9 %	Fluka, Švýcarsko
Kyselina chlorovodíková	p.a.	Sigma Aldrich, USA
D-Methamphetamine hydrochloride	99,8%	*
ACSF		**
Ketamin HCl (Narkamon)	5 %	Vétoquinol, Francie
Xylazin (Rometar)	2 %	Bioveta, Czech Republic
Formaldehyd	4 %	Sigma Aldrich, Německo
Halotan (Narcotan)	0.01 %	Zentiva, Czech Republic

* Látka byla syntetizována na Fakultě Farmakologie, Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Česká Republika
**147 mM NaCl, 1.3 mM $CaCl_2$, 0.9 mM $MgCl_2$, 4.0 mM KCl, pH 6.5-7.0)

Tabulka číslo 3: Plyny

Název	Čistota	Výrobce
Argon	5.0	SIAD, Česká republika
Vzduch	technický	SIAD, Česká republika
Dusík	technický 4.0	SIAD, Česká republika

3.2 Přístroje a pomůcky

HPLC-ESI-MS/MS

Metoda byla vyvíjena na HPLC systému Varian ProStar vybaveném dvěma pumpami ProStar 210, degaserem, autosamplerem Varian ProStar 410, chromatografickou kolonou Gemini 5 μm C18 110 Å 15 x 2 mm s předkolonkou Gemini (Phenomenex, USA). HPLC systém byl přímo spojen s tříkvadrupólovým hmotnostním spektrometrem Varian 1200L (Varian, USA) vybaveným ESI (electrospray ion source) ionizačním zdrojem.

Další přístroje

- Minishaker IKA MS 2 (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Německo)
- Lyofilizátor (Labconco Free Zone, USA)
- Mikrodialyzační pumpa Univentor 864 (AgnToho´s AB, Švédsko)
- Mikrodialyzační kanyly (MAB 4.15.1.Cu; Agn Tho´s AB, Švédsko; cuprophane 2 mm membrane; Cut off 6 kD)
- Stereotaktický aparát (Stoelting, Stoelting Co., Illinois, USA)
- Mikroton Leyca, USA
- Mikroskop Leyca, USA
- Bruker AVANCE III 600 MHz (600.23 MHz for ^1H, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo)

3.3 Stabilitní testy

Stabilita DA, DA.HCl, HVA, 3-MT, 3-MT.HCl a DOPAC byla měřena při laboratorní teplotě (25°C) v matrici ACSF a v použité mobilní fázi, tj. za podmínek

jejich zpracování. Stabilita látek byla stanovena NMR analýzou, která byla realizována na přístroji Bruker AVANCE III 600 MHz (600.23 MHz for ^{1}H, Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Německo).

3.4 Odběr vzorků

3.4.1 Odběr mikrodialyzátu

Nejdříve byla potkanům voperována mikrodialyzační kanyla do *Nucleus accumbens*. Před provedením zákroku byl potkan uspán anestetickou injekcí ketamin/xylazin (Narkamon® 5%; 2 mg/kg; Rometar® 2%; 0.5 mg/kg) a zafixován do stereotaktického aparátu. Předozadním řezem mu byla otevřena hlava až k lebce, zaměřena bregma a stereotakticky odvrtán otvor do lebky (předozadně -1,6 mm, mediolaterárně – 1,5 mm). Poté byla do mozku pomalu zanořena kanyla MAB 4.15 IC (Agn Tho`s AB, Švédsko) do hloubky 7,3 mm. Po 7 dnech od operace byl potkan uveden do halotanové anestesie. Do kanyly byla zavedena mikrodialyzační sonda MAB 4.15.2.Cu [Agn Tho`s AB, Švédsko], která byla promývána artificiální cerebrospinální tekutinou - ACSF o průtoku 2 µl/min do ustanovení rovnováhy (60 minut). Poté byly vzorky vždy odebírány po dobu 20 minut do připravených plastových mikrozkumavek obsahujících 15 µl 0,1 M HCl a 10 pg vnitřního standardu (deuterovaný standard - DA.HCl-d_4). Před aplikací drogy byly vždy nejprve odebrány 3 vzorky pro stanovení základní hladiny DA a jeho metabolitů. Po aplikaci drogy (MA 1mg/kg) byly změny hladin analytů monitorovány po dobu 220 minut. Po odběru byly vzorky zamraženy při teplotě – 80 ºC. Po ukončení pokusu byl potkan pod anestézií ketamin/xylazin perfundován roztokem 4% formaldehydu. Následně byl potkan dekapitován a mozek byl vyjmut, aby mohlo být histologicky zkontrolováno, že byla kanyla správně umístěna do *Nucleus accumbens*.

3.5 Přípravy vzorků pro HPLC-ESI-MS/MS analýzu

Příprava vzorků byla prováděna třemi různými způsoby.

3.5.1 Lyofilizace

Zakoncentrování vzorku probíhalo s využitím mrazového sušení (lyofilizace) na přístroji Labconco Free Zone po dobu 12 hodin. Kondenzační spirála lyofilizátoru byla chlazena na teplotu -47 °C a tlak se v zařízení po hodině ustálil na 9 kPa. Vzorek

byl během lyofilizace udržován v temnu a po lyofilizaci byl rozpuštěn v 10 µl methanolu a analyzován pomocí HPLC-ESI-MS/MS metody.

3.5.2 SPE

Nepolární kolona SPE PerfectPure C19 tip (Eppendorf, Německo) byla aktivována methanolem (250 µl) a vodným roztokem kyseliny trifluoroctové (2,5 % TFA ve vodě, 40 µl). Vzorek s vnitřním standardem (DA.HCl-d_4, 10 pg) byl nanesen na kolonku a následně eluován vodou (40 µl) a methanolem (40 µl). Vzorek byl pak ihned analyzován pomocí HPLC-ESI-MS/MS metody.

3.5.3 Stripování dusíkem

Stripovací nástavec s proudícím dusíkem byl vložen do vzorku mikrodialyzátu (40 µl dialyzátu, 15 µl HCl a vnitřní standart DA.HCl-d_4 10 pg) po dobu potřebnou k úspěšnému vysušení vzorku. Zbytek po sušení byl rozpuštěn v 10 µl methanolu a ihned změřen HPLC-ESI-MS/MS analýzou.

3.6 HPLC-ESI-MS/MS metoda

Pro vlastní analýzu bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Varian 1200 L, USA). Chromatografické dělení látek bylo realizováno pomocí kolony Gemini 5 µm C18 110 Å 150 x 2 mm s předkolonkou Gemini (Phenomenex, USA) a mobilní fáze složené z vodného roztoku kyseliny octové (pH 2) (A) a methanolu (B) při gradientovém uspořádání (viz tab. č. 4) o průtoku 150 µl/min. Nastřikovaný objem vzorku na kolonu byl 5 µl.

Tabulka číslo 4: Gradientová eluce mobilní fáze

Čas [min]	**Rozpouštědlo A [%]**	**Rozpouštědlo B [%]**
0:00	95	5
3:00	95	5
5:00	70	30
15:00	70	30
16:00	95	5
20:00	95	5

Trojitý kvadrupól, kterým byl vybaven hmotnostní spektrometr, umožnil použití vysoce citlivého a selektivního „Selective Reaction Monitoring“ módu (SRM). Jeho principem je izolace specifického iontu analytu na prvním kvadrupólu. Následně je tento ion podroben kolizně indukované disociaci (CID) na druhém kvadrupólu a získaný charakteristický produktový ion je pak detekován na kvadrupólu třetím. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly zoptimalizovány z hlediska dosažení maximální citlivosti stanovení na následující hodnoty: napětí na kapiláře: 65 V (ESI+) a -70 V (ESI-), tlak kolizního plynu (argon) využívaného pro kolizně indukovanou disociaci (CID) 0,2 Pa. Kolizní energie jako výsledek série optimalizačních experimentů jsou uvedeny v tabulce číslo 5 pro každý jednotlivý analyt. Měření na hmotnostním spektrometru bylo rozděleno do dvou segmentů; první pracoval v ESI^+ módu (0,0 – 6,0 min), druhý v ESI^- módu (6.1 – 20 min).

Tabulka číslo 5: Monitorovací reakce analytů a kolizní energie

Analyt	**CID kolize [m/z → m/z]**			**Kolizní energie [eV]**
DA.HCl	137	→	120	-17.5
DA.HCl-d4	141	→	123	-17.5
HVA	181	→	122	17.0
3-MT.HCl	168	→	151	-11.5
DOPAC	167	→	122	8.5

3.7 Validace metody

3.7.1 Příprava standardů a kalibrační přímky

Zásobní roztok standardů o koncentraci 1 mg/ml byl vždy čerstvě připraven rozpuštěním DA.HCl, HVA, 3-MT.HCl a DOPAC v methanolu. Tento roztok byl dále použit k přípravě kalibračních roztoků o koncentracích: 0.5; 1; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 a 500 pg/10 μl a do každého roztoku byl přidán vnitřní standard DA-d_4 (10 pg/10 μl). Kalibrační přímka je chápána jako přímková závislost, tj. závislost plochy píků analytů (DA.HCl, HVA, 3-MT.HCl nebo DOPAC) podělená plochou odpovídajícího vnitřního standardu na koncentraci. Vzájemnou těsnost libovolných po sobě následujících hodnot z kalibrační přímky vyjadřuje tzv. Pearsonův korelační koeficient r, častěji se používá r^2. Pokud je závislost lineární, koeficient r se blíží 1, a r se počítá z rovnice (1):

$$r = \frac{\sum (x_i - x)(y_i - y)}{\sqrt{(\sum (x_i - x)^2)(\sum (y_i - y)^2)}} \quad (1)$$

3.7.2 Přesnost, správnost, výtěžnost metody

Přesnost metody je definována jako těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky a její hodnota se vyjadřuje relativní směrodatnou odchylkou (RSD), která se počítá podle vztahu RSD = $100s_x$ / x, kde s_x znamená směrodatnou odchylku (SD) a x průměrnou hodnotu stanovené koncentrace.

Správnost metody je těsnost souhlasu mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou měřené veličiny a vyjadřuje se pomocí relativní chyby (RE), pro kterou platí: RE = 100(x–μ)/ μ, kde x je průměrná hodnota stanovené koncentrace a μ je skutečné přidané množství standardu.

Výtěžnost metody se stanoví jako procento analyzovaného množství ku známému přidanému množství.

Přesnost, správnost a výtěžnost vyvinuté metody byly stanoveny z pěti koncentračních hladin látek DA.HCl, HVA, 3-MT.HCl a DOPAC (0.5; 10; 50; 100 a 250 pg/40 μl) v ACSF s konstantním přídavkem vnitřního standardu DA.HCl–d_4 (10 pg/40 μl). Každá koncentrace byla připravena 5x a vzorky byly podrobeny jedné z metod zakoncentrování (lyofilizace, SPE, stripování dusíkem) a následně změřeny metodou HPLC-ESI-MS/MS.

3.7.3 Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ)

Limit detekce je definován jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, **limit kvantifikace** (mez stanovitelnosti) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s předem známou nejistotou. Pro výpočet limitu detekce a limitu kvantifikace bylo použito měření slepého roztoku ACSF obsahující 10 pg DA.HCl-d_4 a 15 μl kyseliny chlorovodíkové, který byl analyzován HPLC-ESI- MS/MS metodou celkem desetkrát (n = 10). Hodnota LOD byla vypočítána jako průměrná hodnota signálu slepého vzorku zvětšená o trojnásobek směrodatné odchylky slepého vzorku. LOQ byl stanoven jako průměrná odezva slepého vzorku zvětšená o desetinásobek jeho směrodatné odchylky.

3.8 Experimentální studie - Zvířata

Všechny manipulace se zvířaty byly prováděny s ohledem na směrnice Evropské unie (86/609/EU) a Národní komise pro chov laboratorních zvířat. Všechny experimenty schválila etická komise a každý potkan byl před experimentem naivní a byl použit pouze jednou.

Dospělé samice potkanů Wistar (250-300 g) byly rozděleny do dvou skupin (kontrolní a exponované metamfetaminu - MA) a na počátku estrogenního cyklu byly připuštěny. MA exponované skupině byla po celou dobu gestace podávána látka MA (5 mg/kg/den). Z potomků všech samic byli vybráni pouze samci, kteří byli rozděleni do skupin podle toho, jestli v prenatálním období byli nebo nebyli exponováni MA. V 90. den po narození jim byla voperována mikrodialyzační kanyla do *Nucleus accumbens* a byl proveden odběr vzorků. Poté byl dokončen celý pokus, který byl nakonec vyhodnocen.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Stabilita dopaminu

Dopamin a jeho metabolity jsou známy jako málo stabilní látky, proto bylo nezbytné zjistit jejich chování při laboratorní teplotě (25°C) v matrici ACSF a v použité mobilní fázi, tj. za podmínek jejich zpracování. Stabilita látek byla stanovena NMR analýzou. V průběhu stabilitní studie (doba jednoho experimentu – 48 hodin) nebyla pozorována degradace HVA a DOPAC. Pro DA a 3-MT byla stanovena rychlost poklesu koncentrace 0,10 - 0,15 % za hodinu. DA a 3-MT lze stabilizovat jejich převedením na příslušné hydrochloridy, které se po přidání kyseliny chlorovodíkové tvoří okamžitě. Z tohoto důvodu byl roztok ACSF s analyty v průběhu experimentální studie jímán do mikrozkumavky obsahující 15 µl 0,1 M kyseliny chlorovodíkové.

4.2 Zpracování vzorků

Analýza mikrodialyzátu klade značné nároky na použité analytické metody z několika důvodů:

1. velice nízká koncentrace (femto-, pikogramy na mililitr) analytů v ACSF roztoku

2. malý objem analyzovaných vzorků (40 µl)
3. přítomnost velkého množství solí v ACSF

Z těchto důvodů byly před samotnou HPLC/MS analýzou sledované látky separovány a zakoncentrovány. Jako koncentrační metody byly testovány lyofilizace, SPE (extrakce na pevné fázi) s využitím SPE PerfectPure C18 tip (Eppendorf, Německo) a stripování dusíkem. Se všemi těmito koncentračními kroky byla provedena validační studie (viz 4.4 – validace, tabulka číslo 6).

4.3 Optimalizace HPLC-MS metody

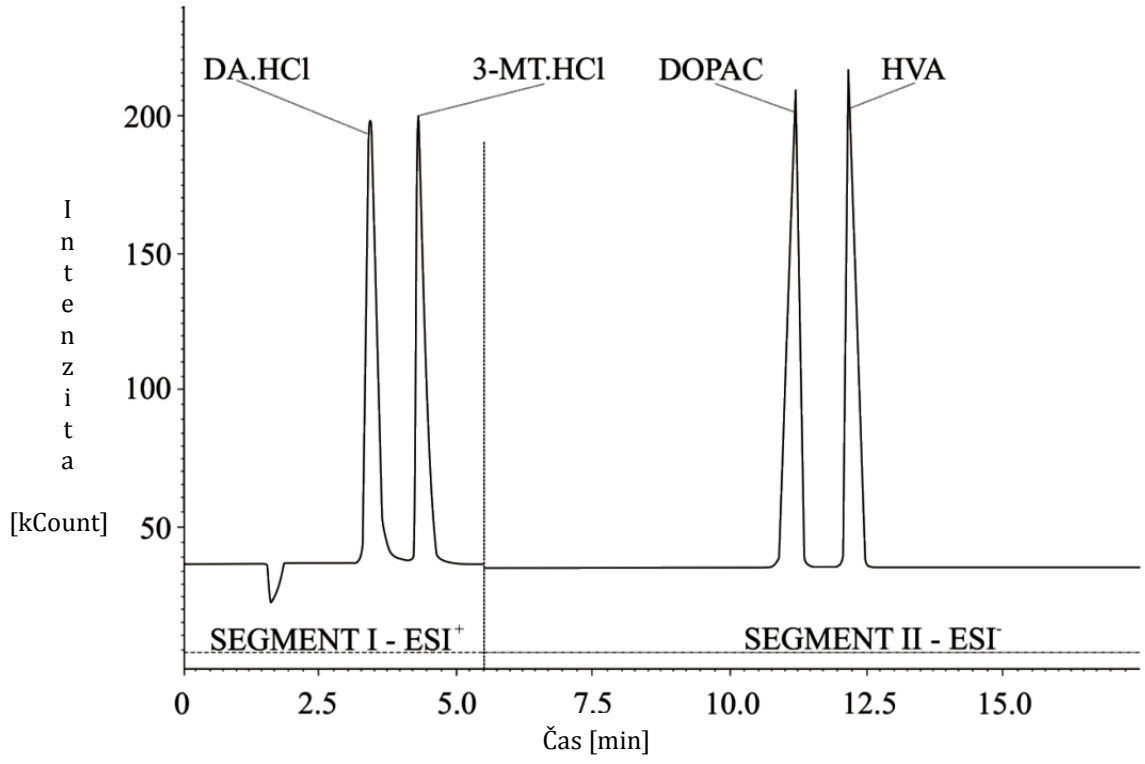
Pro vlastní analýzu bylo použito spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (Varian 1200 L, USA). Chromatografické dělení látek bylo realizováno pomocí kolony Gemini a mobilní fáze o složení methanol (A) a vodný roztok kyseliny octové (pH 2) (B) při gradientovém uspořádání o průtoku 150 µl/min. Nastřikovaný objem vzorku na kolonu byl 5 µl. Na obrázku č. 21 je chromatogram, který byl získán za optimálních podmínek HPLC-ESI-MS/MS analýzy a demonstruje úspěšnou separaci všech analytů (DA.HCl, HVA, 3-MT.HCl, DOPAC). Podmínky na HPLC však nebyly optimalizovány pouze k získání optimálního oddělení látek, ale také k získání maximální senzitivity pro MS analýzu.

Trojitý kvadrupól, kterým byl vybaven hmotnostní spektrometr, umožnil použití vysoce citlivého a selektivního „Selective Reaction Monitoring“ módu (SRM), ve kterém byly změřeny všechny analyty. Pro každý analyt bylo nejprve nutné zjistit jejich prekurzorový ion, což ukazuje obrázek č. 22, kde jsou MS spektra DA a jeho metabolitů po průchodu kvadrupólem Q1. Tento specifický ion každého analytu byl na kvadrupólu Q2 podroben kolizně indukované disociaci (MS/MS spektra jsou na obrázku č. 23) a na kvadrupólu Q3 byl pak detekován charakteristický produktový ion pro každý analyt. Produktový ion byl vybrán na základě největší intenzity ve spektru. Jednotlivé monitorovací reakce analytů pro SRM mód jsou uvedeny v tabulce č. 5 v kapitole 3.6.

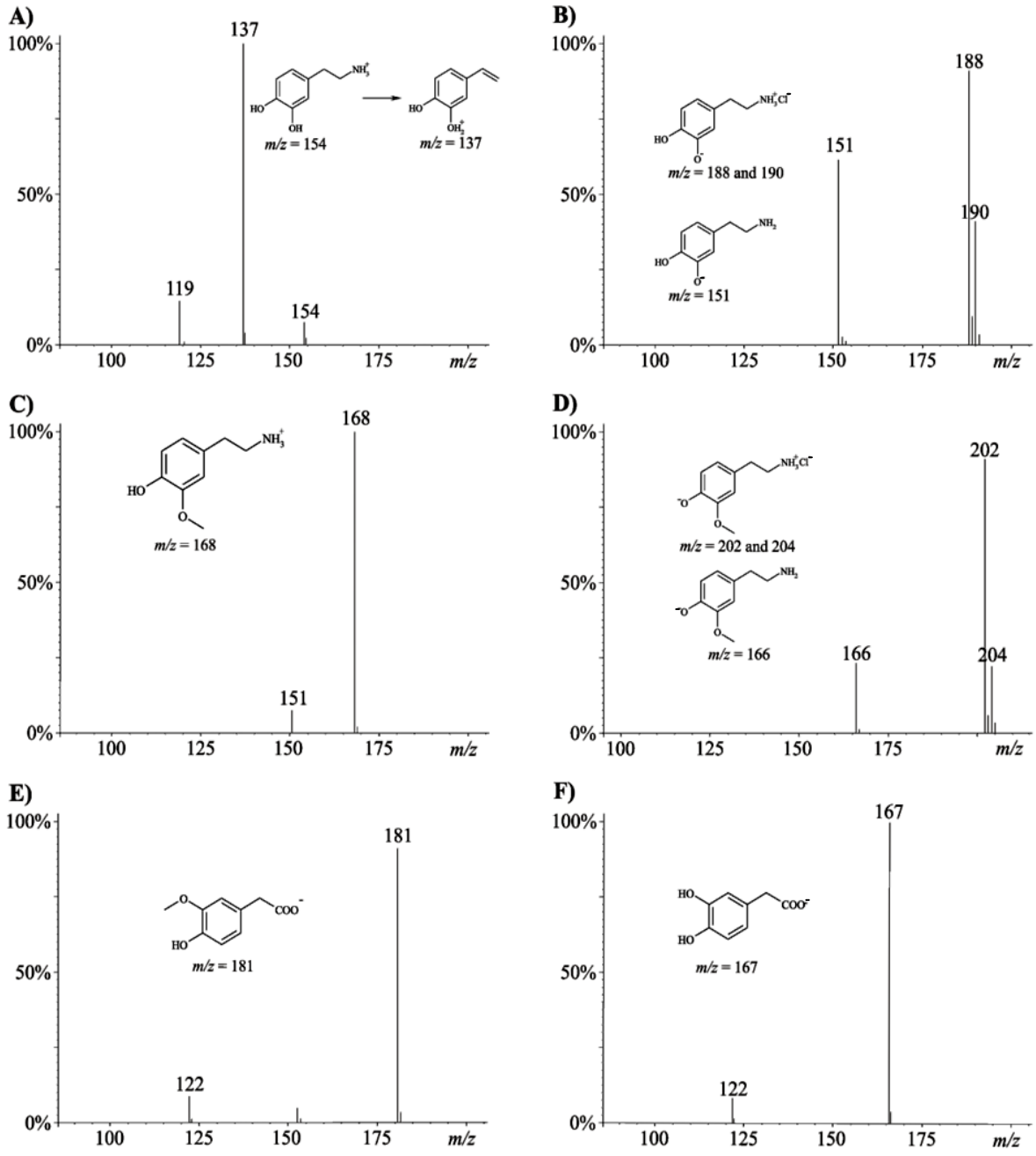
Látky HVA a DOPAC bylo možné změřit pouze v negativním módu ionizace, neboť se jedná o kyseliny. Avšak DA.HCl a 3-MT.HCl bylo možné detekovat v pozitivním i v negativním módu (viz obrázek č. 22 A, B a C, D). Při měření v negativním módu však docházelo částečně jak k detekci chloridů látek, tak k detekci

iontu $[M-H]^-$ (viz obrázek č. 22) a tak by byla velmi nepříznivě ovlivněna citlivost metody pro tyto látky. Proto byly měřeny v pozitivním módu ionizace. Jako prekurzorový ion dopaminu byl tedy vybrán ion $[M-NH_3]^+$, jelikož dosahoval nejlepších výsledů pro LOD a LOQ. Pro 3-MT.HCl byl prekurzorový ion $[M+H]^+$ a v případě HVA a DOPAC pak ionty $[M-H]^-$.

Celá LC-MS metoda byla rozdělena do dvou segmentů (jak ukazuje obrázek č. 21), které se liší ve způsobu ionizace, čímž se dosáhlo ještě větší senzitivity metody. DA.HCl a 3-MT byly měřeny v pozitivním módu v segmentu I (0 – 6,0 min), HVA a DOPAC v negativním módu v segmentu II (6 – 25 min).



Obrázek číslo 21: Výsledný chromatogram



Obrázek číslo 22:

(A) MS spektrum DA.HCl v ESI^+ módu

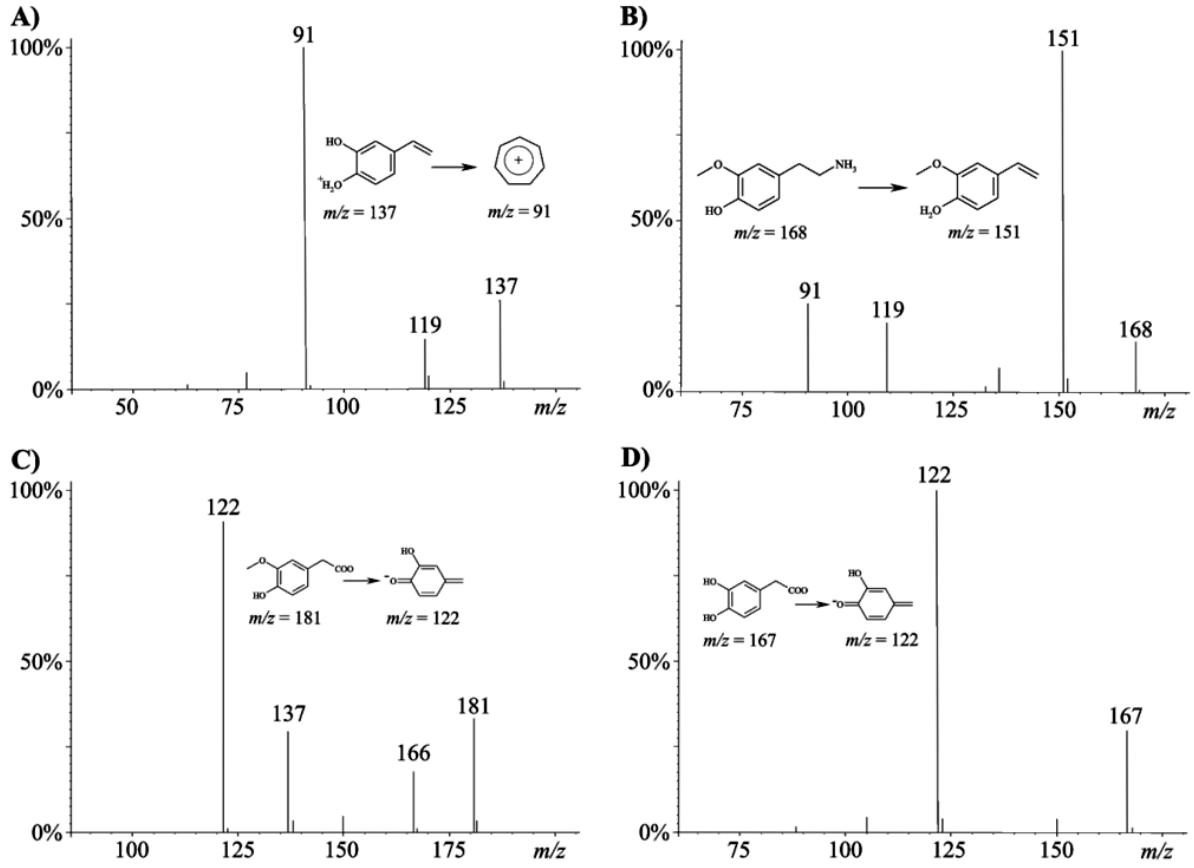
(B) MS spektrum DA.HCl v ESI^- módu

(C) MS spektrum 3-MT.HCl v ESI^+ módu

(D) MS spektrum 3-MT.HCl v ESI^- módu

(E) MS spektrum HVA v ESI^- módu

(F) MS spektrum DOPAC v ESI^- módu



Obrázek číslo23: MS/MS spektra (A) DA.HCl, (B) 3-MT.HCl, (C) HVA a (D) DOPAC

4.4 Validace

Přesnost a správnost vyvinuté metody byly stanoveny z pěti hladin koncentračních hladin látek DA.HCl, HVA, 3-MT.HCl a DOPAC (0.5; 10; 50; 100 a 250 pg/40 μl) v ACSF s konstantním přídavkem vnitřního standardu DA.HCl–d_4 (10 pg/40 μl). Každá koncentrace byla připravena 5x, vzorky byly podrobeny jedné z metod zakoncentrování (lyofilizace, SPE, stripování dusíkem) a následně změřeny metodou HPLC-ESI-MS/MS. Přesnost (RSD) se pohybovala v intervalu 8,0 – 11 % pro DA.HCl, 7,6 – 10,1% pro HVA, 8,5 – 13,9 % pro 3-MT.HCl a 8,7 – 11,9 % pro DOPAC. Správnost (RE) se nacházela v rozmezí -4.4 až -11.8 % pro DA.HCl, -4.8 až -11.7 % pro HVA, -5.7 až -14.1 % pro 3-MT.HCl a -7.1 až -11.4 % pro DOPAC. Výsledky statistického zpracování (přesnost, správnost, výtěžnost, LOD a LOQ) pro každý postup zakoncentrování vzorků jsou uvedeny v tabulce č. 6. Na základě výsledků validace metody byla jako nejoptimálnější vybrána metoda lyofilizace, která byla použita k zakoncentrování vzorků v experimentální studii.

Tabulka číslo 6: Validační parametry pro DA.HCl a jeho metabolity - HVA, 3-MT.HCl a DOPAC

Látka	Přesnost RSD [%]	Správnost RE [%]	Výtěžnost [%]	LOD [pg/40 ml]	LOQ [pg/40 ml]
Lyofilizace - HPLC-ESI-MS/MS					
DA.HCl	11.4	-11.8	88.2	0.07	0.08
HVA	10.1	-11.7	88.5	0.08	0.09
3-MT.HCl	13.9	-14.1	86.1	0.09	0.11
DOPAC	11.9	-11.4	88.6	0.08	0.09
SPE - HPLC-ESI-MS/MS					
DA.HCl	13.6	-18.3	80.6	0.1	0.12
HVA	13.5	-20.6	79.2	0.16	0.17
3-MT.HCl	15.3	-16.8	82.5	0.11	0.13
DOPAC	14.6	-21.3	77.7	0.18	0.19
Stripování dusíkem – HPLC-ESI-MS/MS					
DA.HCl	17.6	-13.4	85.3	0.08	0.09
HVA	15.5	-13.0	87.8	0.09	0.1
3-MT.HCl	18.3	-16.9	83.7	0.11	0.13
DOPAC	19.4	-12.4	88	0.09	0.1

4.5 Experimentální studie – průběh koncentračních hladin

Vyvinutá analytická metoda skládající se z koncentrační metody - lyofilizace a HPLC-MS/MS analýzy byla použita pro experimentální studii při sledování změn koncentrací DA, HVA, 3-MT a DOPAC v mozku potkanů po akutní aplikaci metamfetaminu. Vzorky byly získány z *Nucleus accumbens* potkanů prenatálně exponovaných látkou MA (5 mg/kg, s.c.) a potkanů, kteří se dříve s látkou nesetkali. První 3 vzorky byly odebrány pro ustanovení bazální hladiny dopaminu a jeho metabolitů a poté byly vzorky sbírány 220 min po akutním podání MA (1 mg/kg, s.c.). Typický průběh závislostí koncentrace DA a jeho metabolitů na čase po podání MA je znázorněn na obrázcích č. 24 - 27.

U skupiny potkanů, kteří byli prenatálně exponovaní MA, byly nalezeny vyšší bazální koncentrace DA, HVA, 3-MT a DOPAC. Z toho vyplývá, že je možné, že u těchto jedinců existuje větší nebezpečí vzniku některých chorob, které jsou spojené s nadbytkem dopaminu. Velice pravděpodobně také došlo i k vytvoření většího počtu receptorů.

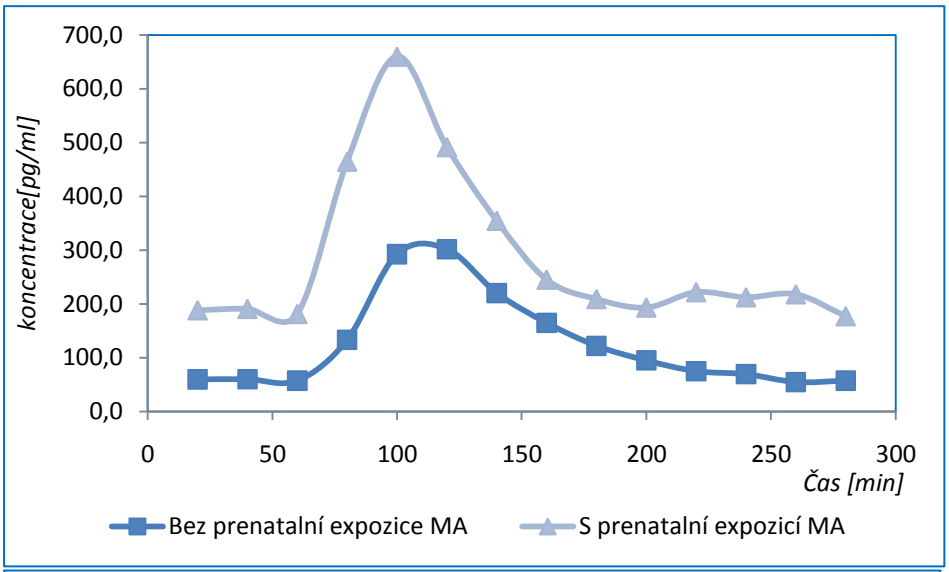
Po podání MA se u obou skupin potkanů začala koncentrace DA, HVA, 3-MT a DOPAC měnit ve stejný čas, což naznačuje účinkovaní MA. Koncentrační hladina dopaminu v *Nucleus accumbens* se zvýšila, což je důkazem adiktivního charakteru látky. Dále po akutní aplikaci MA vzrostla hladina metabolitů HVA a 3-MT. U potkanů prenatálně vystavených MA dochází k vylití většího množství dopaminu a zároveň je větší rozdíl mezi normální a maximální hladinou (tj. větší citlivost k droze). Zároveň po podání drogy trvají všechny děje s dopaminem na synapsi déle. To znamená, že tito jedinci cítí intenzivněji pocit slasti a kromě jiných potíží spojených s prenatální expozicí MA mají větší tendenci k rozvinutí závislosti. Hladina DOPAC naopak u obou skupin klesla. To nám napovídá mnohé o mechanismu působení MA. Tato látka zvyšuje koncentraci mediátoru dopaminu, zabraňuje jeho zpětnému vychytávání ze synapse a také blokuje enzym MAO, který degraduje dopamin na DOPAC (proto nastal pokles jeho koncentrace), ovšem na aktivitu enzymu COMT nemá vliv.

Tabulka číslo 7: Hodnoty koncentrací dopaminu a jeho metabolitů u skupiny potkanů **bez prenatální expozice MA**

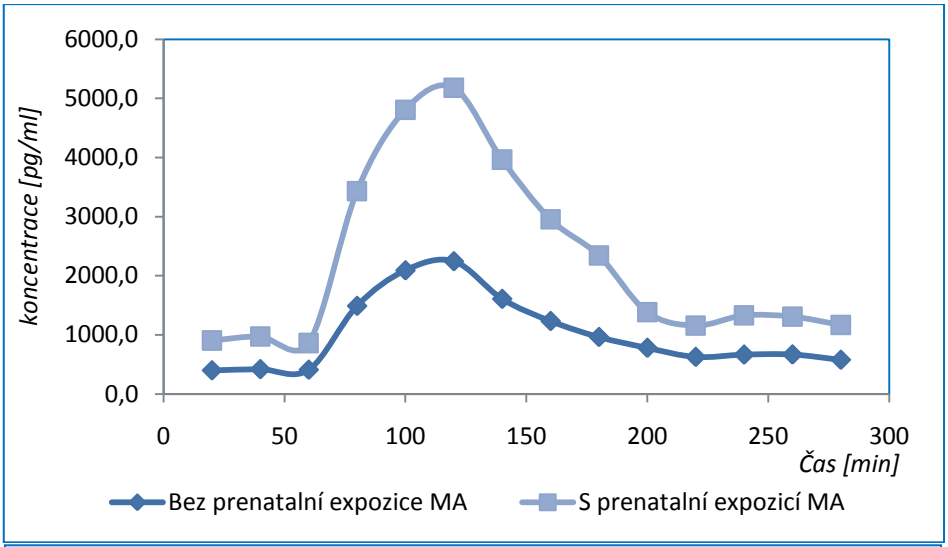
Odběr	Čas [min]	DA [pg/ml]	3-MT [pg/ml]	DOPAC [ng/ml]	HVA [ng/ml]
1	20	59,7	398,4	7,3	7,3
2	40	60,0	418,4	7,0	6,5
3	60	57,4	408,9	7,2	6,6
4	80	133,3	1489,0	4,2	6,4
5	100	292,4	2091,0	3,5	6,4
6	120	301,8	2244,5	3,5	10,9
7	140	220,2	1607,7	3,2	19,5
8	160	164,8	1232,9	3,5	25,4
9	180	122,1	962,7	2,9	19,6
10	200	94,9	779,6	3,4	9,3
11	220	75,0	625,9	7,1	6,7
12	240	69,4	665,0	7,2	7,7
13	260	54,8	667,2	7,2	7,9
14	280	57,4	577,2	7,0	7,0

Tabulka číslo 8: Hodnoty koncentrací dopaminu a jeho metabolitů u skupiny potkanů **s prenatální expozicí MA**

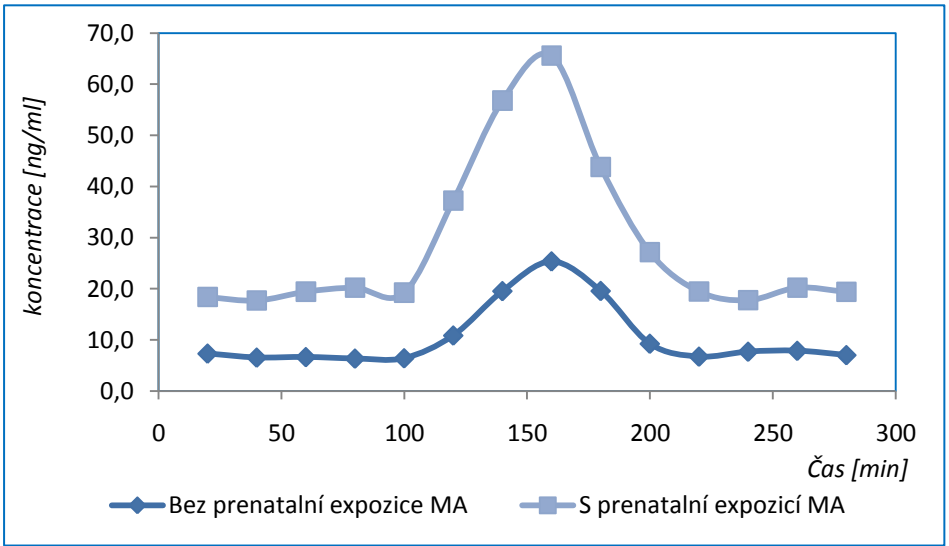
Odběr	Čas [min]	DA [pg/ml]	3-MT [pg/ml]	DOPAC [ng/ml]	HVA [ng/ml]
1	20	188,2	905,6	21,9	18,4
2	40	190,8	973,3	21,7	17,7
3	60	181,3	862,1	21,2	19,4
4	80	464,8	3432,3	4,9	20,2
5	100	660,2	4808,5	3,5	19,2
6	120	491,8	5180,2	3,3	37,2
7	140	354,7	3964,2	2,3	56,8
8	160	245,2	2954,9	3,1	65,6
9	180	209,0	2343,0	3,4	43,8
10	200	193,2	1385,9	10,5	27,2
11	220	221,9	1158,3	20,5	19,5
12	240	212,3	1329,4	20,2	17,8
13	260	217,9	1308,8	21,7	20,2
14	280	177,2	1168,7	21,2	19,4



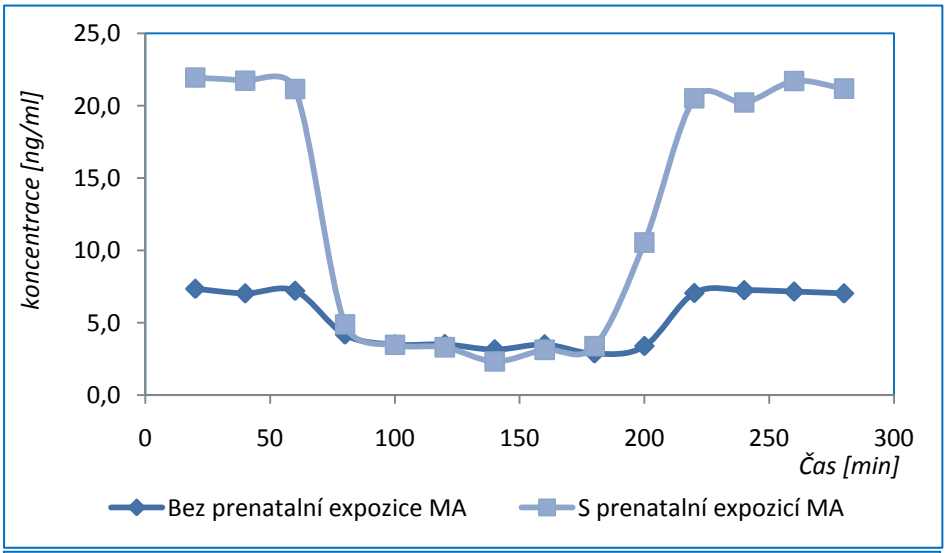
Obrázek číslo 24: Graf koncentrace dopaminu



Obrázek číslo 25: Graf koncentrace 3-MT



Obrázek číslo 26: Graf koncentrace HVA



Obrázek číslo 27: Graf koncentrace DOPAC

5 Závěr

Předkládaná práce se zabývá vývojem nové senzitivní a selektivní metody pro *in vivo* stanovení koncentrace DA a jeho metabolitů v mozku. Navržená metoda se skládá z mikrodialyzačního odběru vzorku z *Nucleus accumbens* a analytické metody, která kombinuje lyofilizační zakoncentrování vzorku s kapalinovou chromatografií a hmotnostně spektrometrickým stanovením neurotransmiterů. Tato metoda byla optimalizována ve snaze postihnout co největší množství parametrů, jak na straně odběru vzorku a zacházení s ním, tak na straně jeho zpracování a následného analytického stanovení.

Vyvinutá metoda byla použita v animální studii, jejímž úkolem bylo prozkoumat vliv prenatální expozice metamfetaminu. Realizovaná studie umožnila vyslovit domněnku, že aplikace drog ze skupiny budivých aminů v průběhu prenatálního vývoje vede k ovlivnění dopaminergního sytému v mozku potomků. Byly u nich zjištěny vyšší bazální koncentrace dopaminu, které by mohly způsobovat sklony k některým chorobám. Po akutním podání drogy se u potomků matek, které během gravidity požívaly metamfetamin, objevily větší rozdíly mezi bazální a maximální hladinou dopaminu, HVA a 3-MT v *Nucleus accumbens* než u potkanů, kteří se s drogou nikdy před tím nesetkali. To by mohlo na molekulární úrovni potvrzovat, že vystavení dítěte návykové látce uvedeného typu ještě před narozením zvýší jeho predispozice k vytvoření adikce. Koncentrace metabolitu DOPAC u obou skupin potkanů klesla, což potvrzuje, že metamfetamin blokuje enzym MAO, který degraduje dopamin na DOPAC. Koncentrační hladina dopaminu, HVA a 3-MT naopak stoupla, čímž se potvrdilo, že na enzym COMT nemá metamfetamin vliv.

Vyvinutá metoda, umožňující monitorování vzniku a průběhu závislosti, může být dále použita i k výzkumu ostatních onemocnění souvisejícími s koncentrací dopaminu v mozku.

6 Seznam použitých zkratek

3-MT	3-methoxytyramin
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
ACSF	artificiální cerebrospinální tekutina
API	atmospehric pressure ionisation
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
APPI	atmospheric pressure photo ionization
ATP	adenosintrifosfát
COMT	katechol-O-methyl-transferáza
CID	kolizně indukovaná disociace - Collision Induced Dissociation
CNS	centrální nervový systém
DA	dopamin
DA.HCl	dopamin hydrochlorid
DA.HCl-d_4	dopamin hydrochlorid-d_4 [1,1´,2,2´ - 4 ^{2}H]
DAC	dopamine-stimulated adenylate cyclase
DAQ	dopamin-o-quinone
DAT	dopaminový transportér
DOPAC	3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina
DOPAL	3,4-dihyroxyfenylacetaldehyd
DOPET	3,4-dihydroxyfenylethanol
ECD	elektrochemická detekce – electrochemical detection
ESI	ionizace elektrosprejem – electrospray ionization
GABA	kyselina gama-aminomáselná
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HVA	kyselina homovanilová
L – DOPA	L - dihydroxyfenylalanin
LOD	limit detekce – limit of detection
LOQ	limit kvantifikace – limit of quantification
MA	metamfetamin
MAO	monoaminooxidáza
MS	hmotnostní spektrometrie – mass spectrometry
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NA	noradrenalin
NcA	Nucleus accumbens
PNMT	enzym fenylethanolamin-N-methyltransferáza
RSD	relativní směrodatná odchylka - relative standard deviation
SPE	extrakce na pevné fázi - solid phase extraction
SD	směrodatná odchylka - standard deviation
SRM	Selected Reaction Monitoring
TFA	kyselina trifluoroctová
VTA	ventrální tegmentální oblast - ventral tegmental area

7 Citace

1) STONE, T.; DARLINGTONOVÁ, G. *Léky, drogy, jedy*. 1. vydání. Praha : Academia, 2003. S. 122.
2) STONE, T.; DARLINGTONOVÁ, G. *Léky, drogy, jedy*. 1. vydání. Praha : Academia, 2003. S. 131.
3) STONE, T.; DARLINGTONOVÁ, G. *Léky, drogy, jedy*. 1. vydání. Praha : Academia, 2003. S. 143.
4) NEŠPOR, K. *Návykové chování a závislost: Současné poznatky z perspektivy léčby*. Vyd. 2. Praha : Portál, 2003. S. 14.

8 Literatura

1. STONE, T.; DARLINGTONOVÁ, G. Léky, drogy, jedy. 1. vydání. Praha : Academia, 2003. 440 s. ISBN 80-200-1065-3.

2. NEŠPOR, K. *Návykové chování a závislost: Současné poznatky z perspektivy léčby*. Vyd. 2. Praha : Portál, 2003. 152 s. ISBN 80-7178-831-7.

3. BEČKOVÁ, I; VIŠŇOVSKÝ, P. *Farmakologie drogových závislostí*. Vyd. 1. Praha : Karolinum, 1999. 111 s. ISBN 80-7184-864-6.

4. JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., KELLEY, R. O. *Základy histologie*. překlad Richard Jelínek. 7. vydání. Jinočany : H&H, 1997. 502 stran. přeloženo z : Basic Histology. ISBN 80-85787-37-7

5. SILBERNAGL, S., LANG, F. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vydání. Praha : Grada Publishing, 2001. 404 stran. přeloženo z : Taschenatlas der Pathophysiologie. ISBN 80-7169-968-3

6. SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A. *Atlas fyziologie člověka*. 6. vydání. Praha : Grada Publishing, 2003. 448 stran. přeloženo z : Taschenatlas der Physiologie. ISBN 80-247-0630-X

7. GANONG, W. F. *Přehled lékařské fyziologie*. 16. vydání. Jinočany : H&H, 1997. 681 stran, přeloženo z : Review of Medical Physiology. ISBN 80-85787-36-9
8. TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. 3. vydání. Praha : Grada Publishing, 1999. s. 616. ISBN 80-7169-788-5.
9. BRAENDEN J. U., STENDAL T. L., FAGERNAES C. B., CLIN J. Pharm. Therap. 28 (2003) 471.
10. Ying Shen, Ming Y. YE. J. Liquid Chrom. 17 (1994) 1557.
11. BARANYIA, M.; MILUSHEVA, E.; VIZI, E. S.; SPERLAGH, B. Chromatographic analysis of dopamine metabolism in a Parkinsonian model. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1120* (1-2), 13–20.
12. STORCH, A.; LUDOLPH, A.C.; SCHWARZ, J. *J Neural Transm* **2004,** *111*(10-11), 1267-86.

Z data 20. 3. 2011:

13. http://old.lf3.cuni.cz/drogy/articles/zavislost_ol.htm
14. http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf
15. http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_exper_vyzkum_cast1.pdf