

**Bronisław K. GŁÓD¹, Paweł PISZCZ¹, Tomasz ZIELIŃSKI¹,
Paweł ZARZYCKI²**

¹⁾ Zakład Chemii Analitycznej, Instytut Chemii, Akademia Podlaska
ul. 3 Maja 54, 08-110 Siedlce

e-mail: bkq@onet.eu; URL: <http://dach.ich.ap.siedlce.pl>

²⁾ Zakład Toksykologii Bioanalityki, Wydział Budownictwa i Inżynierii Środowiska,
Politechnika Koszalińska, ul. Sniadeckich 2, 75-453 Koszalin

ZASTOSOWANIE HPLC W BADANIACH CHOROBY PARKINSONA

W pracy przedstawiono podstawowe informacje o chorobie Parkinsona. Omówiono zastosowanie HPLC w oznaczaniu profilu dziennego leków stosowanych w jej leczeniu, oznaczaniu całkowitego potencjału antyoksydacyjnego oraz ich korelacje z testem Webstera i natężeniem tremoru.

PODSTAWOWE INFORMACJE O CHOROBIE PARKINSONA

Pierwszy opis klinicznych objawów choroby Parkinsona (ChP) pochodzi z egipskich papirusów z XIII wieku p.n.e. W czasach nowożytnych chorobę ponownie opisał w 1817 roku brytyjski lekarz Johna Parkinsona w artykule *An Essay on the Shaking Palsy*.

ChP spowodowana jest niewydolnością pozapiramidowego układu ruchowego. Głównym procesem patologicznym jest postępujące zwyrodnienie neuronów dopaminergicznych w warstwie zbitej istoty czarnej [1]. Podobnie do choroby Alzheimera należy do grupy chorób zwyrodnieniowych układu nerwowego. Ma charakter przewlekły, a jej objawy pogłębiają się wraz z rozwojem choroby. Na ChP choruje prawie 1,5% populacji powyżej 65 roku życia. Jest więc bardzo ważnym problemem nie tylko medycznym, ale i społecznym [1]. Dotyka ona w podobnym stopniu różnych ludzi, bez względu na ich płeć, zamożność, pochodzenie społeczne i geograficzne. Klinicznie objawia się ona spowolnieniem ruchowym, sztywnością mięśni i drżeniem spoczynkowym.

Udział wolnych rodników w ChP nie jest całkowicie wyjaśniony. Istota czarna ma duże tempo metabolizmu, dlatego też charakteryzuje się wysoką zawartością utleniaczy przy jednoczesnym niskim stężeniem antyoksydantów. Nawet niewielki stres oksydacyjny może z łatwością zniszczyć jej naturalną obronę powodując powstanie wolnych rodników tlenowych, które ze względu na przeważające stężenie utleniaczy utrzymują powstający stres, a także zapoczątkowują apoptozę neuronów dopaminergicznych przejawiającą się obniżoną zawartością cytochromu c w mitochondriach komórek nerwowych zaatakowanych chorobą. Zmniejsza to aktywność mitochondrialne-

go kompleksu I. Powoduje to zmniejszenie ilości wytwarzanej energii, obniżenie ilości stężenia antyutleniaczy oraz wzrost tempa powstawania wolnych rodników i nasilenie procesów utlenienia. O tym, że w istocie czarnej w ogóle dochodzi do stresu oksydacyjnego świadczą zwiększone ilości dialdehydu malonowego będącego końcowym produktem peroksydacji lipidów, a także zmniejszenie ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych [2].

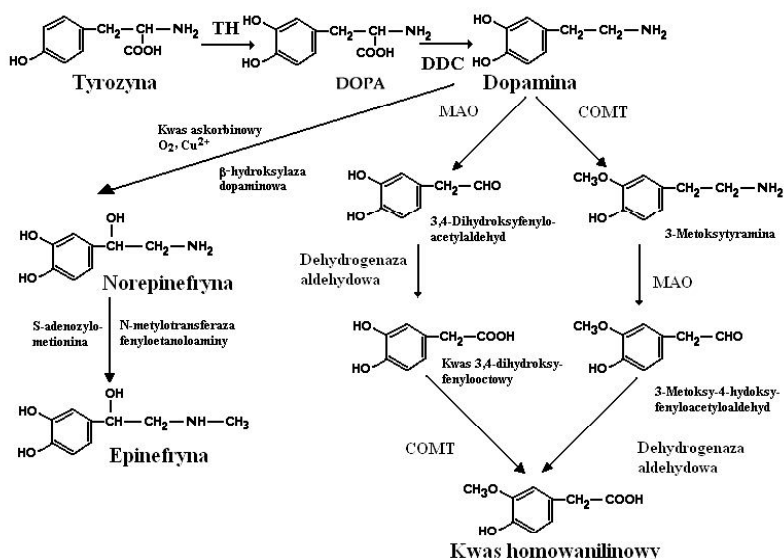
Osobnym zagadnieniem są zmiany stężenia zarówno rodników jak i antyoksydantów we krwi chorego. Spowodowane są one z jednej strony zwiększonym metabolizmem, spowodowanym m.in. charakterystycznym drżeniem kończyn, przyczyniającym się do produkcji rodników. Z drugiej zaś podawane pacjentom jako leki aminy katecholowe są antyoksydantami.

Zniszczenie komórek nerwowych istoty czarnej zmniejsza wydzielanie dopaminy, neuroprzebieżnika chemicznego odpowiedzialnego za transmisję sygnałów pomiędzy istotą czarną, a ciałem prążkowanym w kresomózgowiu. Sygnały przekazywane z istoty czarnej są odpowiedzialne za zależne od naszej woli ruchy, które dzięki prawidłowemu przekazywaniu są płynne i przebiegają bez zakłóceń. Jeśli zniszczeniu ulegnie ponad 80% komórek produkujących dopaminę, zostaje utracona zdolność kontroli nad takim typem ruchów. Przyczyna zwyrodnienia komórek istoty czarnej nie jest dokładnie znana. Jedną z hipotez jest mechanizm wolnorodnikowy. Inne mówią o toksynach, czynnikach genetycznych (szczególnie mitochondrialnych) czy eksytotoksyczności (nadprodukcji dopaminy).

Dominującym, chociaż nie jedynym zaburzeniem w chorobie Parkinsona jest przedwczesne, postępujące zwyrodnienie neuronów dopaminoergicznych. Wynikiem tego jest obniżenie stężenia dopaminy i jej metabolitów, a także spadek aktywności enzymów związanych z jej syntezą. Opracowane zostały trzy główne strategie w walce z tą chorobą (i) uzupełnić niedobór dopaminy, (ii) zahamować proces jej rozkładu w mózgu oraz (iii) dostarczyć organizmowi substancje, które działają podobnie do dopaminy.

Najprostszym sposobem leczenia tego schorzenia byłoby zastosowanie pierwszej z wymienionych strategii, czyli podanie dopaminy. Dopamina jednakże nie przekracza bariery krew – mózg. Z tego względu najprostszym obecnie sposobem leczenia tej choroby jest podawanie bezpośredniego jej prekursora – L-dopy (lewodopy), zdolnej przechodzić przez barierę krew – mózg.

Wprawdzie wprowadzenie L-dopy było przełomem w walce z chorobą Parkinsona jednakże, niestety nie zapobiega ona obumieraniu komórek produkujących dopaminę. Z tego względu próbuje się zastosować drugą z wymienionych wcześniej strategii – zahamować procesy przemiany dopaminy w inne substancje, stosując np. inhibitor enzymu MAO-B (monoaminooksydazy B) odpowiedzialnego za rozkład dopaminy (rys. 1). Stymulację układu dopaminoergicznego można uzyskać poprzez zwiększenie produkcji endogennej dopaminy w układzie nigro-strialnym przez zablokowanie jej metabolizmu lub przez bezpośrednią stymulację receptora dopaminoergicznego [3].



Rys. 1. Metabolizm dopaminy

L-dopa po raz pierwszy została zastosowana w leczeniu choroby Parkinsona na początku lat 60. Dziś L-dopa jest uznawana jako „złoty standard” leczenia [4]. Jest najsilniejszym lekiem przeciwparkinsonowskim, jedynym, który jest skuteczny w każdym stadium zaawansowania choroby. Pod względem chemicznym jest to lewoskrętna 3,4-dihydroksy-L-fenylalanina, bezpośredni prekursor dopaminy przechodzący przez barierę krew-mózg. Powstaje ona w ustroju z egzogennej tyrozyny (przy udziale hydroksylazy tyrozynowej) i ulega przemianie do dopaminy przy pomocy dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów (rys. 1).

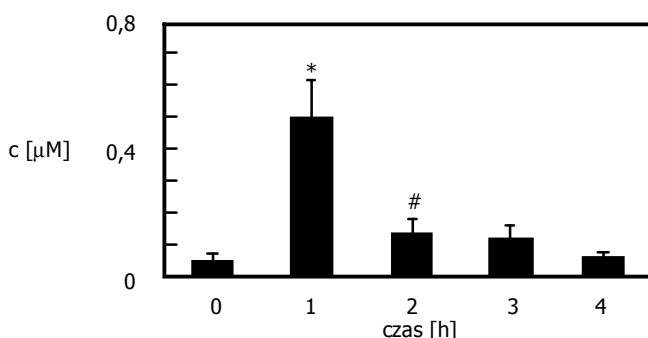
Pod wpływem katecholo-O-metylotransferazy (COMT) L-dopa metabolizowana jest do 3-metoksy-DOPA (3-OMD) (na rys. 1 etap ten został pominięty). Dopamina natomiast może być metabolizowana zgodnie z trzema szlakami (rys. 1). Pierwszy przebiega przez kwas dihydroksyfenylooctowy (DOPAC), katalizowany przez monoaminooksydazę (MAO), do kwasu homowanilinowego (HVA) katalizowanego przez COMT. W drugim natomiast pod wpływem COMT dopamina jest metabolizowana do 3-metoksytyraminy (3-MT), a następnie również do HVA pod wpływem MAO. Z wyjątkiem dopaminy, pozostałe metabolity L-dopy są farmakologicznie nieaktywne. Oba szlaki metabolizmu występują zarówno w narządach obwodowych, jak i w mózgu. Trzeci szlak prowadzi do powstania hormonów i dlatego nie będzie szerzej omawiany.

Mimo wieloletniego już stosowania L-dopy mechanizm jej działania budzi wiele niejasności. Według klasycznej hipotezy egzogenna L-dopa podana doustnie zostaje wchłonięta w jelicie cienkim i poprzez system transportu dużych aminokwasów (LNAA) szybko trafia do innych tkanek i przekracza barierę krew – mózg, gdzie jest wychwytywana przez neurony

dopaminoergiczne i tam poddawana działaniu dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów i dopiero jako dopamina uwalniana do synapsy. Na obwodzie, a także w śluzówce przewodu pokarmowego L-dopa ulega także szybkiej dekarboksylacji. Dlatego też w narządach obwodowych powstają duże ilości dopaminy nieprzechodzącej do mózgu, a tylko niewielka ilość L-dopy (ok. 1-3%) przedostaje się przez barierę wykazując działanie terapeutyczne. Zależy to od wielu czynników m.in. od zawartości białka w diecie i czasu przejścia przez żołądek. Aby wyeliminować szybką zmianę L-dopa w dopaminę już w błonie śluzowej żołądka, a tym samym zwiększyć jej możliwość dotarcia do mózgu, doustne preparaty zawierają inhibitory obwodowej dekarboksylazy, karbidopę lub benserazyd. Pośrednio zwiększa to przenikanie L-dopy do mózgu i pozwala na znaczną redukcję dawki leku i jego obwodowe działanie niepożądane takie jak nudności, wymioty i spadki ciśnienia [3].

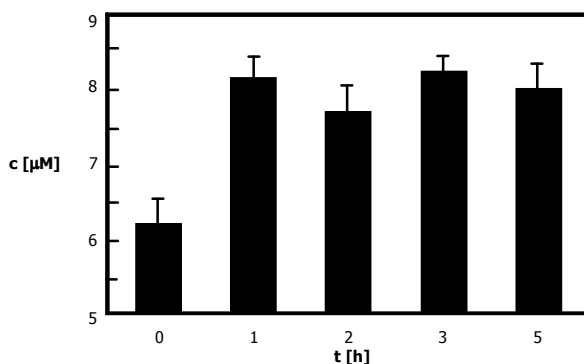
Wprowadzenie L-dopy do leczenia spowodowało wyraźny spadek śmiertelności chorych. Dane epidemiologiczne sugerują, że chorzy z dobrze leczoną chorobą Parkinsona mają szansę żyć równie długo jak ich zdrowi rówieśnicy. Tłumaczy się ono zarówno zmniejszeniem śmiertelnych powikłań z unieruchomienia, jak i neuroprotektynym działaniem L-dopy [5]. W ostatnich latach badania eksperymentalne zaczęły dostarczać jednak coraz więcej danych na to, że L-dopa może być toksyczna dla neuronów dopaminoergicznych. W skojarzeniu z wolnorodnikową hipotezą etiopatogenezy choroby Parkinsona oraz z faktem występowania ruchowych objawów niepożądanych po długotrwałym podaniu L-dopa problem jej toksycznego działania wzbudza duży niepokój. Mimo intensywnie prowadzonych badań nadal nie udało się ostatecznie ustalić ani uzyskać jednoznacznych dowodów na to, że L-dopa w dawkach terapeutycznych powoduje śmierć komórek nerwowych. U chorych słabo reagujących na leczenie farmakologiczne stosuje się leczenie chirurgiczne. Czynione są także próby wszczepienia stymulatorów, które pozwolą modelować aktywność upośledzonych struktur mózgu.

FARMAKOKINETYKA AMIN KATECHOLOWYCH



Rys. 2. Zmiany stężenia L-dopy w surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona przed podaniem leku, po godzinie, dwóch, trzech i pięciu po podaniu preparatu. * $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0, # $p < 0,05$ w stosunku do czasu 1

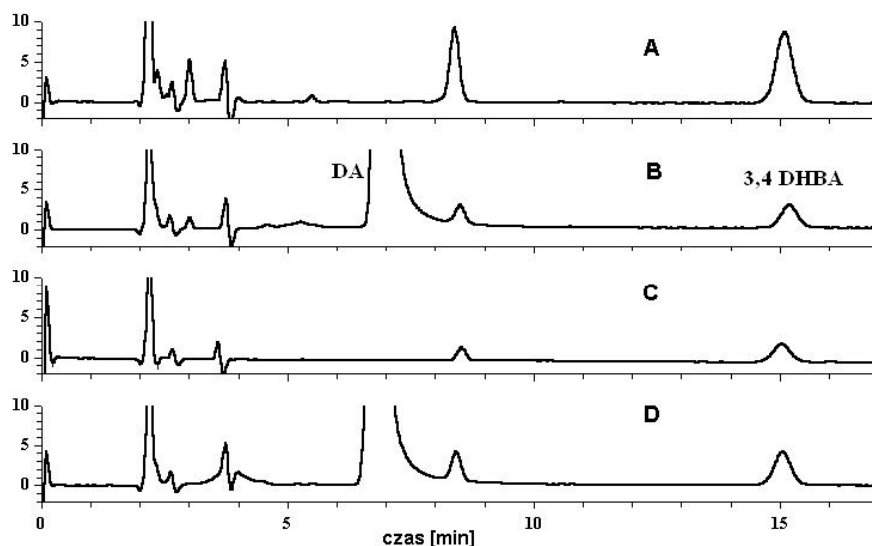
Dopamina, której niedobór w części zbitej istoty czarnej jest czynnikiem wyzwalającym objawy choroby Parkinsona, należy do amin katecholowych. Ponieważ jednak nie przedostaje się przez barierę krew-mózg, dlatego też wprowadzona do krążenia obwodowego nie daje efektu terapeutycznego. Uzyskuje się go jednak poprzez podanie bezpośredniego prekursora dopaminy – L-dopy, która należy także do amin katecholowych. Przedostający się do mózgu tylko niewielki procent (1-3%) jest często niewystarczającą dawką do uzyskania efektów terapeutycznych. Z kolei zwiększenie podawanej dawki powoduje szereg niepożądanych objawów. Okazało się, że równoczesne podawanie L-dopy z inhibitorami dekarboksylazy aromatycznych aminokwasów, zwiększa jej biodostępność poprzez zmniejszenie jej obwodowego metabolizmu. L-dopę, jak i inne aminy katecholowe, można w surowicy oznaczać stosując HPLC z detekcją amperometryczną. Maksymalne stężenie L-dopy w surowicy występuje po ok. godzinie od chwili zażycia leku (rys. 2 [6]) [6-8]. Po 90 min. stężenie L-dopy w surowicy jest śladowe. W leczeniu niezwykle istotna jest więc optymalizacja dawki. Zarówno zbyt niskie jak i zbyt wysokie stężenia leku skazują pacjenta na niepowodzenie w trakcie terapii. Niskie stężenia mogą być następstwem zaburzeń wchłaniania L-dopy z przewodu pokarmowego, wysokie natomiast mogą osiągać wartości dawki toksycznej. Przeprowadzone badania potwierdzają, że maksymalne L-dopy stężenie występuje po około godzinie od zażycia preparatu. Zmiany stężenia L-dopy po godzinie, dwóch, trzech i pięciu w stosunku do godziny zerowej są statystycznie znamienne. Zmiany stężenia L-dopy powinny mieć odzwierciedlenie w zmniejszeniu drżenia, głównego objawu parkinsonizmu, a także na poprawę parametrów fizjologicznych określanych za pomocą testu Webstera. Maksymalne stężenie karbidopy (rys. 3 [6]) występuje także po godzinie od podania preparatu, po czym zmniejsza się, ale po trzeciej godzinie ponownie wzrasta. Pomimo podobnej dynamiki współczynnik korelacji pomiędzy karbidopą, a grupą nierozdzielonych reduktorów jest bardzo niski.



Rys. 3. Farmakodynamika karbidopy. Zmiany stężenia karbidopy w surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona. Pozostałe warunki jak na rys. 2. * $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0

WŁASNOŚCI ANTYOKSYDACYJNE AMIN KATECHOLOWYCH

W literaturze można znaleźć sprzeczne informacje na temat dopaminy. Z jednej strony dopamina przyczynia się do stresu oksydacyjnego, z drugiej zaś ma właściwości antyoksydacyjne. Zarówno enzymatyczne utlenianie dopaminy przy udziale MAO B jak i jej samoutlenianie prowadzą do powstania nadtlenu wodoru, będącego źródłem najbardziej reaktywnego wolnego rodnika – hydroksywowego. Tak więc, metabolizm dopaminy prowadzi do powstania uszkodzeń w komórkach nerwowych oraz ich śmierci w procesie apoptozy. System dopaminowy broni się przed skutkami deficytu neuromediatora zwiększając jego metabolizm. Przeprowadzone pośmiertnie badania w mózгах parkinsoników wykazały specyficzne, wielokrotne nasilenie metabolizmu w strukturach układu pozapiramidowego. Zwiększony metabolizm dopaminy, powoduje zwiększoną produkcję nadtlenu wodoru i rodnika hydroksywowego. Zwiększone uwalnianie, wychwyt i presynaptyczny metabolizm dopaminy może przyczyniać się do postępującej destrukcji neuronów obserwowanej w chorobie Parkinsona. Powstający nadmiar rodników jest przyczyną wzmożonej peroksydacji lipidów, co w konsekwencji prowadzi do indukcji procesu apoptozy. Podobną rolę pełnią produkty metabolizmu dopaminy (np.: 6-hydroksydopamina).

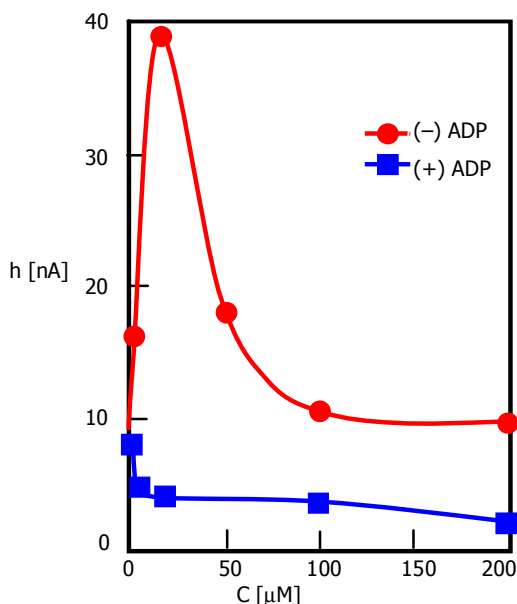


Rys. 4. Anty- i prooksydacyjne właściwości dopaminy w stosunku do rodników hydroksywowych

Istnieje kilka mechanizmów, które z jednej strony nadają dopaminie właściwości prooksydacyjne: zdolność redukcji żelaza (III) do żelaza (II) i samoutlenianie dopaminy do pochodnej chinonowej. Z drugiej zaś strony dopamina wykazuje właściwości antyoksydacyjne dzięki obecności grupy

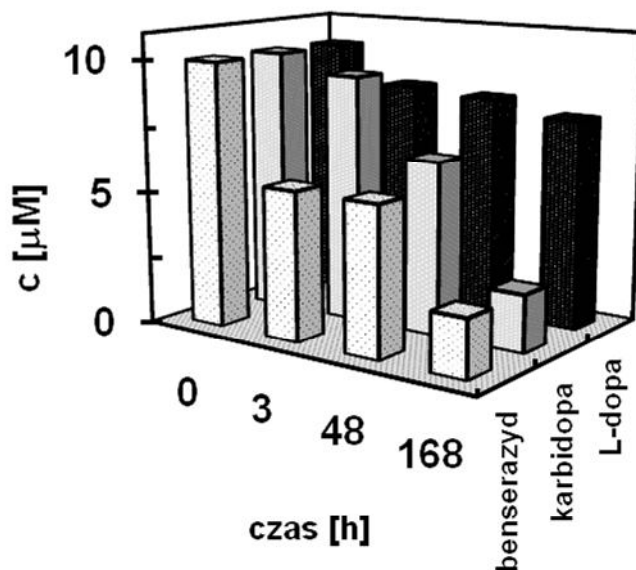
katecholowej oraz kompleksowaniu żelaza (II), uniemożliwiającemu zajście reakcji Fentona.

Stosując chromatograficzną metodę oznaczania całkowitego potencjału antyoksydacyjnego (CPA) przebadano własności dopaminy w stosunku do rodników hydroksylowych [6]. Rodniki hydroksylowe, które generowano w reakcji analogicznej do Fentona, pułapkowano kwasem *p*-hydroksybenzoesowym. Gdy do układu, zawierającego dopaminę, dodawano ADP (rys. 4B), który katalizuje reakcję redukując żelazo z +3 stopnia utlenienia na +2 pik kwasu 3,4-DHBA (którego wysokość świadczyła o właściwościach prooksydacyjnych dopaminy) był niższy w stosunku do kontroli (rys. 4A), która zawierała wodę zamiast dopaminy. Wynik ten był spowodowany tym, że gdy w układzie reakcyjnym znajdowała się, dopamina wygenerowane rodniki hydroksylowe reagowały zarówno z pHBA jak i dopaminą. Otrzymane wyniki sugerują, że dopamina jest słabym zmiataczem rodników hydroksylowych. Brak ADP w układzie powodował, że pik chromatograficzny pochodzący od 3,4-DHBA był znacznie niższy niż w obecności ADP (rys. 4C). Oznacza to, że reduktor w mieszaninie jest niezbędny, aby stałe zapewniona była obecność żelaza (II). W końcu, gdy do układu zawierającego dopaminę nie dodano ADP wielkość pik 3,4-DHBA była większa niż w układzie bez ADP i bez dopaminy (rys. 4D). Oznacza to, że dopamina przejęła rolę reduktora Fe^{3+} do Fe^{2+} . Doświadczenie to potwierdziło sugestie, że w zależności od warunków dopamina może z antyoksydanta stać się oksydantem (rys. 5). Ponadto metoda ta pozwoliła ustalić jeden z prawdopodobnie kilku istniejących mechanizmów prooksydacyjnego działania dopaminy.



Rys. 5. Wpływ stężenia dopaminy na zmiany wysokości pików chromatograficznych 3,4-DHBA. Zmniejszenie wysokości oznacza antyoksydacyjne działanie badanego związku

Autooksydacja amin katecholowych może zachodzić nie tylko pod wpływem enzymów czy jonów metali, ale także pod wpływem tlenu w powietrzu. Okazało się, że z amin katecholowych obecnych w lekach antyparkinsonowskich najszybciej samoutlenianiu ulegał benserazyd, najwolniej zaś L-dopa (rys. 6). Oznacza to, że za zmianę barwy rozpuszczonego w wodzie leku odpowiada samoutlenianie benserazydu (inhibitora), zaś spadek stężenia substancji czynnej w postaci L-dopy jest nieznaczny.



Rys. 6. Zmiany stężenia amin katecholowych w zależności od czasu ich przechowywania w temp. 25°C

HIPERMETABOLIZM W CHOROBY PARKINSONA, TREMOR I JEGO POMIAR

Drżenia są najbardziej istotnym elementem symptomatologii i diagnostyki wielu chorób układu pozapiramidowego (w tym również parkinsonizmu i choroby Parkinsona). Wykorzystywane są zarówno w rozpoznawaniu wielu chorób, dla których drżenie jest objawem typowym, jak i w diagnostyce różnicowej, w której badane są charakterystyki różnych rodzajów drgań. Warunkiem szerszego ich wykorzystania jest udoskonalenie metod pomiaru odpowiednich charakterystyk, powiązanie wyników ich pomiaru z konkretnymi jednostkami chorobowymi, na podstawie uzyskanych rozkładów prawdopodobieństwa, a następnie przypisanie im odpowiednich procedur terapeutycznych. Ze względu na coraz częstsze występowanie schorzeń układu pozapiramidowego wydaje się to bardzo istotne. Oryginalne urządzenie tego

typu skonstruowano w Instytucie Elektroniki WAT we współpracy z Kliniką Neurologii CSK WAM. Pozwala ono na podniesienie efektywności diagnozy schorzenia, przyspieszenie rozpoznania, a więc i wcześniejsze rozpoczęcie leczenia. Podnosi to standard życia jednostek i zmniejsza całościowe koszty leczenia populacji.

Przy nadmiernych wydatkach energetycznych w organizmie następuje szereg zmian metabolicznych, wśród nich niedostateczna podaż glukozy w mięśniach i konieczność glukoneogenezy. Zjawiska te prowadzą do utleniania aminokwasów i nasilenia zużycia tlenu [9]. Objawy wyniszczenia i wychudzenia ciała – typowe dla parkinsoników, są bezpośrednimi dowodami długotrwałego występowania u chorych hipermetabolizmu prowadzącego do ujemnego bilansu energetycznego. Wartość energetyczna spożywanej diety nie pokrywa wówczas w pełni wydatków energetycznych, w wyniku, czego początkowo spalany jest tłuszcz zapasowy, a następnie białka mięśniowe. Zwiększony wydatek energetyczny powoduje również uszkodzenie układu dopaminoergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) powodujące uogólnione zaburzenia metabolizmu energetycznego ustroju. Parkinsonicy często wykazują hipertermię i znaczną potliwość. Przyczyną tego może być zablokowanie ośrodkowych receptorów dopaminoergicznych, a konsekwencją dodatkowy wydatek energetyczny [10]. Drżenie (tremor) może mieć charakter fizjologiczny, stanowiąc przejaw działania układu pozapiramidowego, który jest najlepiej wykształconym układem generowania ruchów mimowolnych w okresie noworodkowym i niemowlęcym, a także odruchów bardziej złożonych. Mogą być także przejawem patologicznym i być skutkiem nieprawidłowych impulsów z jądra czerwienego i wzgórzomózgowia, jak w chorobie Parkinsona [11-13].

Drżenia możemy charakteryzować za pomocą rozmaitych parametrów: lokalizacji, regularności występowania, stopnia nasilenia, wpływu czynników wewnętrznych, wpływu czynników środowiskowych, częstotliwości, amplitudy, energii całkowitej czy widma. Ostatnie cztery parametry są mierzalne w sposób obiektywny. Ich wartości są powiązane z wymienionymi wcześniej czynnikami. Lokalizacja drżenia ma oczywisty wpływ na amplitudę. Części ciała odleglejsze od jego osi mają większą amplitudę niż części ciała bliskie osi. Z kolei podparcie (a więc, fizycznie rzecz biorąc, przesunięcie osi ruchu w kierunku obwodowym) zmniejsza amplitudę drżenia, o ile nie wiąże się z powstaniem dodatkowych napięć spowodowanych wymuszonym (czyli nie fizjologicznym) ułożeniem. Regularność i częstość występowania wiążą się z amplitudą i energią drżenia. Włókno mięśniowe po wykonaniu ok. 80 drgań traci większość lub nawet całość ATP i wskutek tego nie może przez pewien czas wykonywać ruchów. Tak więc regularność i duża częstotliwość drżeń powoduje, przynajmniej okresowo, spadek amplitudy i energii sygnału. Nasilenie drżenia jest niespecyficznym wskaźnikiem obejmującym takie jego składowe jak lokalizacja, regularność, częstotliwość i charakterystyka widmowa. Jego stosowanie jest związane z brakiem możliwości dokładnego pomiaru pewnych charakterystyk obiektywnych; wydaje się, że średnia energia na ustaloną jednostkę czasu (być może wraz z charaktery-

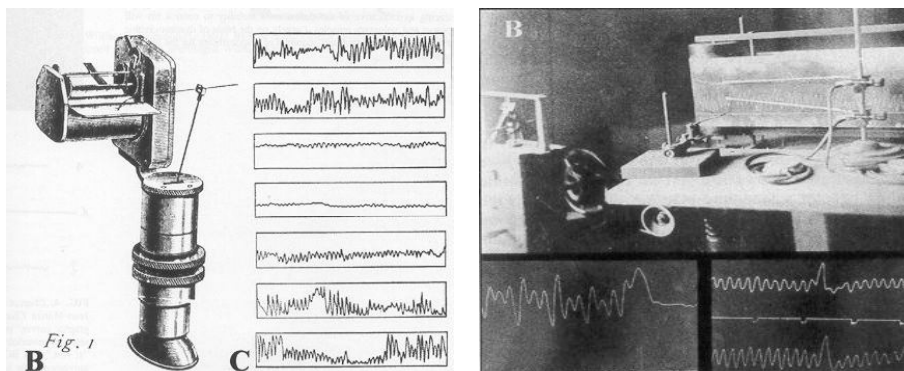
styką amplitudową) byłaby rzetelnym i wystarczającym miernikiem tego wskaźnika. Czynniki wewnętrzne i zewnętrzne mogą w rozmaity sposób wpływać na mierzalne parametry drżenia. Mogą je także wywoływać (drżenie spowodowane chłodem, tzw. dreszcze) lub znosić (ustępowanie u alkoholika drżenia po wypisu alkoholu). Mogą także modyfikować jego charakterystyki. Z kolei oczywisty jest wpływ czynników wewnętrznych na występowanie i intensywność drzeń. Łączny wpływ tych czynników na obraz drzeń jest złożony i niejednoznaczny. W zakresie mierzalnych charakterystyk drżenia najczęściej stosowaną jest częstotliwość. W zależności od niej dzielimy je na następujące pasma:

- 1,5 – 3 Hz: pasmo drzeń ataktycznych, dotyczących głównie głowy i tułowia, spotykanych w chorobach demielizacyjnych;
- 4 – 5 Hz: pasmo najbardziej nieokreślone, drżenia postawne o częstotliwości 4 Hz występują w przypadkach uszkodzenia mózdzku lub jądra czerwienego, w przypadku drżenia spoczynkowego jest identyfikowane jako symptom choroby Parkinsona (drżenie postawne i spoczynkowe różni się amplitudą);
- 6 Hz: pasmo drzeń głównie kończyn; a także drzeń zamiarowych i klonicznych (np. klonus typowy dla uszkodzeń drogi pozapiramidowej ma częstotliwość 6 Hz);
- 8 – 12 Hz: pasmo drzeń o rozmaitej etiologii, tak fizjologicznej jak i patologicznej, np. z powodu udarów mózgu, zwyrodnienia oraz neuropatii obwodowych.

Inną mierzalną charakterystyką drżenia jest amplituda. Jej pomiar, ze względu na jej niewielką wartość, zazwyczaj wymaga specjalnej aparatury pomiarowej i wobec tego nie jest ona dokładnie opisana w funkcji rodzaju schorzenia. Wykazuje się wyraźną zmiennością w zależności od pory dnia, wpływu stosowanych leków, pozycji ciała badanego, a także rozmaitych czynników wewnętrznych i zewnętrznych, w związku z czym jej opisowe określenie jest trudne.

Drżenia samoistne (ET) są uważane za łagodną, skąpo-objawową chorobę układu nerwowego. Charakteryzują się częstotliwością 6 – 11 Hz i amplitudą 25 – 600 μ V. Najczęściej spotykanym wyrazem tej choroby jest drżenie głosu. Mogą także występować równoległe inne objawy, jak drżenie rąk czy głowy, sporadycznie także innych części ciała. W zakresie drzeń patologicznych dzieli się je przede wszystkim w zależności od funkcji piramidowego układu ruchowego, odpowiedzialnego za ruchy dowolne. Funkcje te to spoczynek, pozycja wyjściowa do ruchu zamierzonego oraz ruch zamierzony (dowolny) odpowiednio do tego wyróżnia się (i) drżenie spoczynkowe, (ii) drżenie pozycyjne i (iii) drżenie zamiarowe. Drżenie spoczynkowe stało się podstawą definicji przez Jamesa Parkinsona choroby, nazywanej dzisiaj jego nazwiskiem. Polega na występowaniu w pozycji spoczynku drzeń, ustępujących po rozpoczęciu ruchów czynnych. Drżenia te występują wyłącznie w trakcie czuwania i pojawiają się po przebudzeniu przy próbie wykonania pierwszych ruchów dowolnych. Ich amplituda zależy od stopnia zaawansowania choroby, a także od czynników zewnętrznych i wewnętrznych

takich jak zmęczenie czy stres. Drżenie pozycyjne jest wywoływane ustawieniem kończyn, powodującym napinanie się pewnych grup mięśniowych. Może mieć charakter fizjologiczny, zwłaszcza u ludzi starszych lub w przypadku niewygodnej pozycji – głównie kończyn – występować jako tzw. drżenie pozycyjne fizjologiczne (u sportowców bywa obiektem odrębnych badań). Jest także typowe dla choroby Parkinsona i innych chorób zwyrodnieniowych. Występuje jednak również w przypadku zaburzeń o zupełnie odmiennej etiologii, jak alkoholowe zaburzenie pracy wątroby czy nadczynność tarczycy. Drżenie zamiarowe jest związane z wykonywaniem ruchów dowolnych. Odznacza się niską częstotliwością (3 – 5 Hz) oraz narastającą w czasie amplitudą. Jest wyraźniejsze w bliskości osi ciała. Oprócz choroby Parkinsona może wskazywać na wrodzone procesy zwyrodnieniowe, zatrucia metaboliczne, zaburzenia funkcji wątroby i nerek, stwardnienie rozsiane.



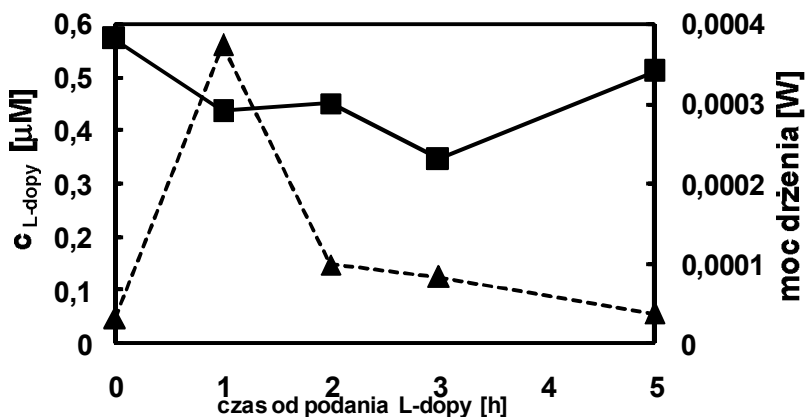
Rys. 7. Sfygmograf Petersena oraz tambur Eschnera

Ze względu na obiektywny, tj. mierzalny, charakter drżeń próby ich pomiaru miały miejsce już w XIX wieku [15]. Mimo niezbyt wyszukanej techniki prace takich uczonych jak Charcot i Vulpian we Francji czy Petersen, Dana i Eschner w Stanach Zjednoczonych pozwoliły na realizację pierwszych badań mierzalnych charakterystyk drżeń. Aparatami, stosowanymi pierwotnie w innych badaniach, a następnie do celu pomiarów drżeń były sfygmograf oraz tambur (rys. 7). Pierwszy z nich działał na zasadzie mechanicznej, drugi – pneumatycznej. Rozwój techniki spowodował, że obecnie zostały one zastąpione przez nowocześniejsze systemy elektroniczne, w pełni skomputeryzowane.

Równoległe z pomiarami drżenia przeprowadza się także badania fizjologiczne chorych za pomocą testu Webstera. Składa się on z oceny 10 parametrów fizjologicznych, np. trudności z poruszaniem się czy z mówieniem. Stosuje się przy tym czterostopniową całkowitoliczbową skalę porządkową, od 0 (brak objawów negatywnych) do 3 (bardzo duże ich nasilenie). Wynik testu jest sumą tych dziesięciu ocen. Ponieważ drżenie powiązane jest z wynikiem testu Webstera (im większe drżenia tym gorsze

samopoczucie badanego, a więc wyższy wynik testu), dlatego też test ten wykonuje się kilka minut po pomiarze drżenia [16].

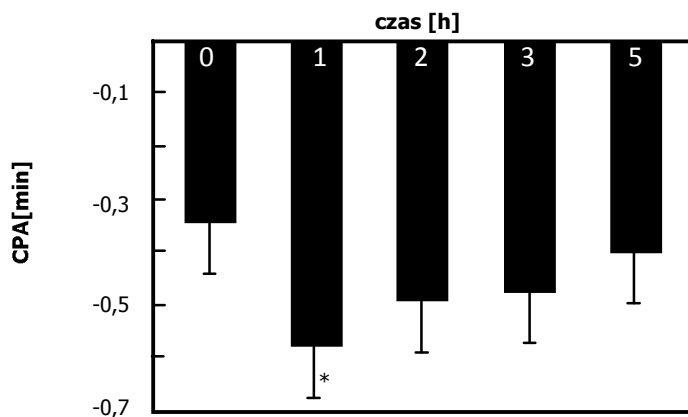
Poprawa stanu pacjentów powinna się zatem wyrażać zarówno w poprawie parametrów fizjologicznych mierzonych testem Webstera jak i zmniejszoną mocą drżenia. W trakcie badań, prowadzonych w ramach wielośrodkowego zespołu badawczego podjęliśmy próbę powiązania wymienionych wyżej płaszczyzn. Wykonywano równocześnie ilościowe badania stanu fizycznego pacjenta: klinicznie oceny drżenia, parametrów chemicznych: stężenie L-dopy w surowicy i pomiaru CPA oraz parametrów fizjologicznych (trudności w wykonywaniu podstawowych czynności, objawy patologiczne funkcjonowania organizmu itp.). Pomiary w zakresie wymienionych wskaźników były wykonywane równoległe (rys. 8). Pozwoliło to określić korelacje między nimi. Wyniki eksperymentalnych badań dowodzą, że występuje efekt przesunięcia w czasie maksymalnego zmniejszenia mocy drżenia w odniesieniu do czasu uzyskania maksymalnego stężenia L-dopy w surowicy. Przesunięcie to wynika z faktu metabolizmu (absorbacji w układzie trawiennym, przekraczanie bariery krew- mózg i jej konwersji do dopaminy) L-dopy i upływu czasu, po którym L-dopa wywiera swój terapeutyczny efekt (rys. 2). W przypadku korelacji między testem Webstera, mocą drżenia i CPA badania wykazały, że podobnie jak w przypadku L-dopy występuje efekt przesunięcia między osiąganym maksymalnym CPA a poprawą parametrów fizjologicznych i mocą drżenia. Przesunięcie to spowodowane jest także metabolizmem L-dopy. Uzyskanie efektu terapeutycznego w postaci uzupełnienia deficytu dopaminy, poprawy samopoczucia pacjentów i zmniejszenie mocy drżenia jest wynikiem działania farmakologicznego L-dopy i wymaga upływu czasu. Nie stwierdzono natomiast korelacji pomiędzy CPA, a pozostałymi parametrami. Brak korelacji wynika z braku zależności pomiędzy zmianami CPA, a stężeniem L-dopy w surowicy.



Rys. 8. Dynamika zmian stężenia L-dopy i mocy drżenia u pacjentów z chorobą Parkinsona

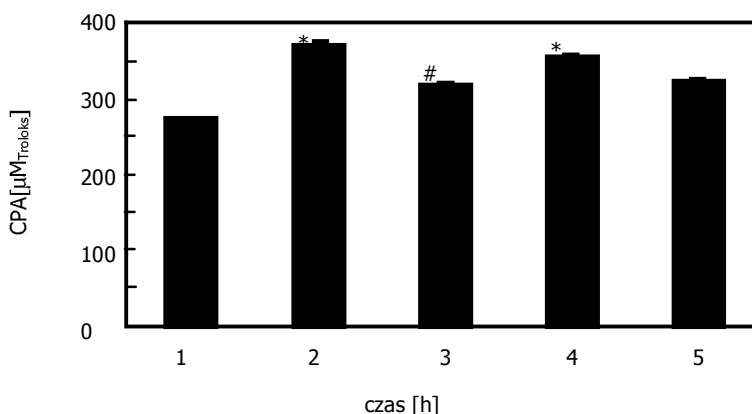
CPA SUROWICY KRWI PACJENTÓW Z CHOROBA PAKINSONA

Całkowity Potencjał Antyoksydacyjny (CPA) jest miarą zdolności antyoksydacyjnych próbek biologicznych, w szczególności krwi. W literaturze [17] można znaleźć opisy oznaczania rodników hydroksylowych metodą pułapki spinowej polegającej na wprowadzeniu do materiału biologicznego względnie nietoksycznych związków aromatycznych i oznaczania produktów ich reakcji z rodnikiem. Wygenerowane, w reakcji Fentona, rodniki hydroksylowe reagują zarówno ze związkami obecnymi we krwi jak i detektorem. Wysokość piku chromatograficznego produktu reakcji detektora z rodnikiem zależy od ilości antyoksydantów obecnych w badanym materiale i ich reaktywności. Miarą CPA jest zmniejszenie się wysokości tego piku pod wpływem próbki. W przypadku surowicy krwi parkinsoników obserwowano efekt odwrotny, wzrost wysokości tego piku (rys. 9). Uzyskane wyniki sugerują, że surowica posiada właściwości prooksydacyjne w stosunku do rodników hydroksylowych, czyli generuje rodniki. Największym CPP (Całkowity Potencjał Prooksydacyjny) cechowała się surowica pobrana od pacjentów po godzinie od podania L-dopy czyli w czasie gdy stężenie L-dopy w surowicy u pacjentów było największe (rys. 2). Prawdopodobnie istnieje kilka mechanizmów w wyniku których powstaje zwiększona ilość wolnych rodników. W surowicy występuje szereg niskocząsteczkowych antyoksydantów (np. kwas askorbinowy), które z jednej strony zmiatają wolne rodniki, z drugiej zaś mogą redukować żelazo z +3 na +2 stopień utlenienia, dzięki czemu zapewniony jest stały dopływ żelaza(II) (reakcja Fentona) i wzrost stężenia rodników. Powstałe w reakcji Fentona Fe(III) jest utleniaczem, mogącym zwiększać CPP. Podobnie zachowują się obecne w surowicy aminy katecholowe. Utlenianie ich prowadzi do powstania semichinonów, rodników peroksydowych i anionrodnika ponadtlenkowego.



Rys. 9. CPA surowicy parkinsoników, leczonych substytucyjnie L-dopą, w stosunku do rodników hydroksylowych. Wykres przedstawia wartości średnie z pięciu pomiarów w trzech powtórzeniach \pm błąd standardowy (SEM), * $p < 0,05$ w stosunku do czasu zerowego

W warunkach fizjologicznych żelazo i miedź występujące w surowicy związane są z białkami takimi jak celulozoplazmina czy transferyna. W wyniku przebiegu procesów patologicznych jony tych metali zostają oddzielone od białek [17] i tym samym w wyniku reakcji Fentona i Habera – Weissa generować rodniki hydroksylowe. Istnieją sugestie, że stężenie rodników hydroksylowych w surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona jest znacznie wyższe niż u zdrowych ludzi. Prooksydacyjne właściwości surowicy pacjentów z chorobą Parkinsona mogą mieć także inne podłoże. Sugeruje się [18], że obniżone stężenia ubichinonu, α -tokoferolu, askorbinianu i glutationu przyczynia się do pogłębienia istniejącego już stresu oksydacyjnego u chorych w wyniku zaburzeń równowagi pro- i antyoksydacyjnej. Dodatkowo sam metabolizm L-dopy przez enzym MAO-B prowadzi także do zwiększonej generacji reaktywnych form tlenu. Zwiększoną jej autooksydację w surowicy zaobserwowano u pacjentów u których stosowano monoterapię L-dopą, w stosunku do zdrowych ludzi i pacjentów u których L-dopa nie była zastosowana. Prawdopodobnie zwiększone stężenie L-dopy w surowicy było przyczyną wzmożonej jej autooksydacji, podczas której generowane są wolne rodniki. Prooksydacyjne właściwości mogą wynikać także z obecności w surowicy niezidentyfikowanych jeszcze prooksydantów generujących w pośredni sposób rodniki hydroksylowe [18-20]. Rolę nadmienionego, niezidentyfikowanego oksydanta może pełnić żelazo lub miedź.

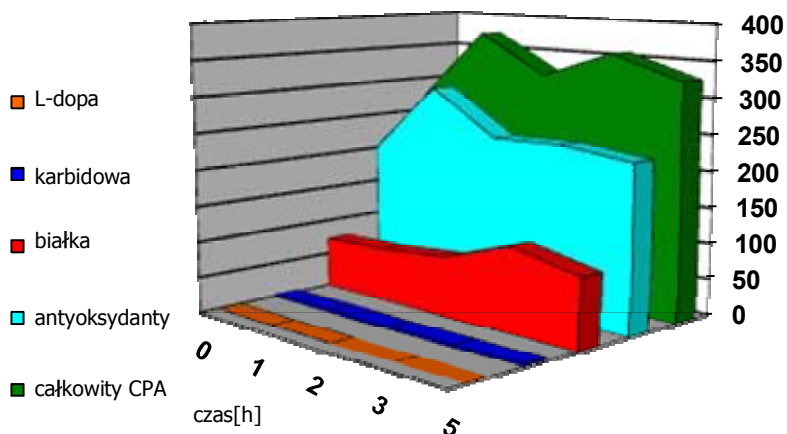


Rys. 10. CPA surowicy parkinsoników, leczonych substytucyjnie L-dopą, w stosunku do rodników peroksydowych. * $p < 0,05$ w stosunku do czasu 0, # $p < 0,05$ w stosunku do czasu 1

Koncepcja stresu oksydacyjnego jako jednego z głównych czynników patogenezы choroby Parkinsona zakłada, że w wyniku szeregu różnorodnych procesów dochodzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników niszczących komórki istoty czarnej. Założenia tej koncepcji opierają się m.in. na badaniach CPA zarówno w odniesieniu do rodników hydroksylowych jak i peroksydowych. Istnieje wiele doniesień wskazujących, że u pacjentów z chorobą Parkinsona CPA (odniesiony do słabych rodników, np. peroksydowych) jest nawet kilkakrotnie niższy, aniżeli u zdrowych rówieśników. Pomi-

mo wyższych stężeń w surowicy enzymów antyoksydacyjnych (SOD, katalaza) zaobserwowano wzrost stężenia produktów reakcji wolnorodnikowych, MDA/TBARS, i spadek wartości CPA. Potwierdza to hipotezę, że u pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi deficyt enzymów zmiatających wolne rodniki w mózgu jest kompensowany zwiększonymi ich stężeniami w surowicy. Oznacza to, że u chorych system antyoksydacyjny nie działa tak sprawnie jak u zdrowych ludzi, a zwiększone stężenia enzymów w surowicy są jednym z etapów obrony organizmu przed powstającym stresem oksydacyjnym w mózgu. W wyniku wzmożonego stresu oksydacyjnego u chorych po pewnym czasie powstają mechanizmy adaptacyjne przeciwdziałające nadmiernemu powstawaniu rodników.

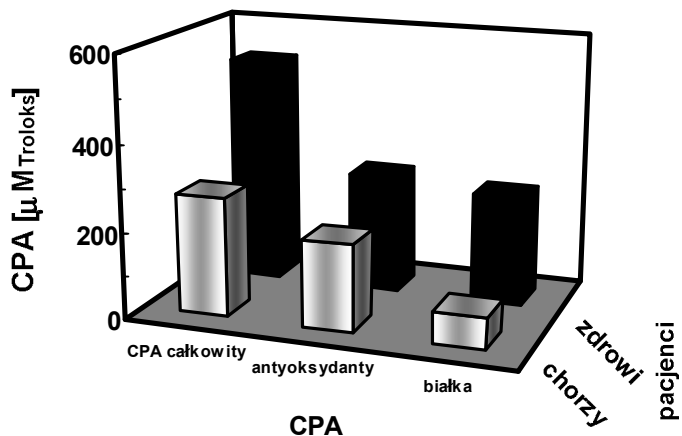
Reasumując, CPA, odniesione do rodników peroksydowych (wyznaczony tradycyjną metodą fotometryczną), pacjentów z chorobą Parkinsona jest mniejszy niż u osób zdrowych. Z drugiej strony wyznaczony chromatograficznie CPA odniesiony do rodników hydroksylowych jest większy od grupy kontrolnej (podobny efekt zaobserwowano w stosunku do tlenku azotu). Oznacza to, że pomiary chromatograficzne dostarczają dodatkowych, istotnych informacji, pozwalających lepiej zrozumieć stres oksydacyjny, tym bardziej, że odnoszą się one do najbardziej reaktywnego rodnika hydroksylowego. CPA odniesione do rodników peroksydowych zmieniało się (rys. 10) wprost proporcjonalnie do zmian karbidopy w surowicy (rys. 3). CPA odniesione do rodników hydroksylowych zmieniało się (rys. 9) odwrotnie proporcjonalnie do zmian L-dopy w surowicy (rys. 2).



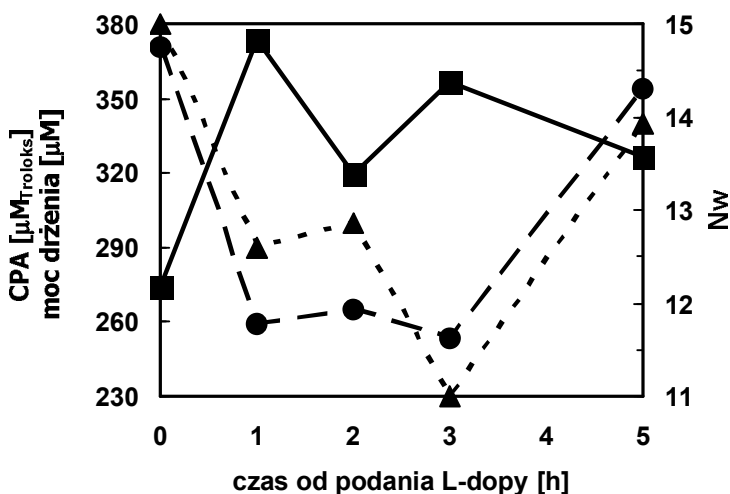
Rys. 11. CPA surowicy, obrazujące wpływ poszczególnych składników

Pomiary chromatograficzne przydatne były również w interpretacji zmian wyznaczanego fotometrycznie CPA odniesionego do rodników peroksydowych (rys. 11). Pozwoliły one na wyznaczenie stężeń leków we krwi pacjentów. Po przemnożeniu tych stężeń przez odpowiadające im CPA można

było wyznaczyć udział składników surowicy w jej CPA (rys. 11). Okazało się, że maksymalne stężenie L-dopy w surowicy było zbyt niskie, aby mogło znacząco wpływać na zmiany CPA. Prawdopodobnie L-dopa wykazuje tylko efekt farmakologiczny, natomiast wpływ jej na zmiany CPA jest nieznaczny. Największy udział w CPA mają antyoksydanty niskocząsteczkowe (w tym kwas moczowy). CPA chorych był niższy od ludzi zdrowych głównie z powodu niższego CPA białek (rys. 12). Zmiany CPA skorelowane są ze zmianami stężeń L-dopy i tremoru (rys. 13).



Rys. 12. Porównanie udziału antyoksydantów i białek w całkowitym CPA, odniesionym do rodników peroksylowych, u ludzi zdrowych i parkinsoników leczonych substytucyjnie L-dopą, przed podaniem leku



Rys. 13. Dynamika zmian CPA (■), wartości punktów w skali Webstera (●), mocy drżenia (▲)

LITERATURA

1. C. Courderot-masuyer, F. Dallozo, V. Maupoil, L. Rochette, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **13**(1999)535.
2. F. Visioli, C. Galli, *Anal. Biochem.*, **249**(1997)244.
3. B.K. Głód, P. Grieb, *Chem. Anal. (Warszawa)*, **47**(2002)399.
4. D.R. Dufield, G.S. Wilson, R.S. Glass, C. Schoneich, *J. Pharm. Sci.*, **93**(2004)1122.
5. T.W. Yu, C.N. Ong, *Anal. Biochem.*, **275**(1999)217.
6. B.K. Głód, K. Stańczyk, *Acta Chromatogr.*, **15**(2005)276.
7. T. Yakabe, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Anal. Sci.*, **18**(2002)1375.
8. K. Stańczyk, praca mag., SGGW 2004.
9. G. Bartosz, M. Bartosz, *Acta Biochim. Pol.*, **46**(1999)23.
10. I.N. Popov, G. Lewin, *Free Radic. Biol. Med.*, **17**(1991)267.
11. B.A. Collingham, M.A. Barrand, *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**(1976)356.
12. U.S von Euler, *Pharmacol. Rev.*, **6**(1954)15.
13. G.R. Kelman *Applied Cardiovascular Physiology*, Butterworths, London 1971.
14. M. Jouvet, *Science*, **163**(1969)32.
15. A.M. Krustulovic, *The current state of the art. in the analysis of catecholamines*, Chemistry Department Manhattanville College Purchase, New York 1999.
16. Y. Kondo, M. Ohnishi, M. Kawaguchi, *J. Agr. Food. Chem.*, **47**(1999)1781.
17. M.A. Raggi, V. Pucci, C. Sabbioni, S. Furlanetto, G. Gerra, *J. Sep. Sci.*, **24**(2001)275.
18. B.K. Głód, P.R. Haddad, Czapski G.A., *Trends Anal. Chem.*, **19**(2000)492-497.
19. P. Kumarathasan, R. Vincent, *J. Chromatogr. A*, **987**(2003)349.
20. P.T. Kissinger, C.S. Bruntlett, R.E. Shoup, *Life Sci.*, **28**(1981)455.
21. H. Wang, J.A. Joseph, *Free Rad. Biol. Med.*, **27**(1999)612.

