

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD**



**SROVNÁNÍ DVOU ZPŮSOBŮ PODÁNÍ L-CARNITINU NA  
ANTIACETYLCHOLINESTERÁZOVOU AKTIVITU  
7-METHOXYTACRINU**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

HRADEC KRÁLOVÉ 2009

PETRA NOVOTNÁ

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem použila jen uvedenou literaturu, jejíž seznam je uveden na konci práce.

Hradec Králové 5. 5. 2009

.....

Petra Novotná

Dovoluji si poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. MUDr. J. Herinkovi, DrSc. za odborné vedení, pomoc a cenné rady během diplomové práce.

## Seznam použitých zkratk

7-MEOTA – 7-methoxytacrine

AcCoA – acetylkoenzym A

ACh – acetylcholin

AChE - acetylcholinesteráza

AChR – acetylcholinový receptor

AP – akční potenciál

AV – atrioventrikulární

BChE - butyrylcholinesteráza

CNS – centrální nervový systém

DAG - diacylglycerol

EC – Enzyme Commission

HTML –  $\beta$ -hydroxytrimethyllysin

CHAT - cholinacetyltransferáza

ChE - cholinesteráza

i.m. – intramuskulární podání

i.p. – intraperitoneální podání

IP<sub>3</sub> – inositol trifosfát

Kar - karnitin

M – muskarinové receptory

MuSK – svalová specifická kináza

NCA – nekompetitivní alosterické místo

NCI - nekompetitivní alosterické inhibiční vazebné místo

N<sub>M</sub> – nikotinové muskulární receptory

N<sub>N</sub> – nikotinové neuronální receptory

NS – nervová soustava

OCTN 2 – organic carnitine transporter

OF - organofosfáty

OFI – organofosfátové inhibitory

p.o. – perorální podání

PLC – fosfolipáza C

SA – sino-atriální

SDAT – senilní demence Alzheimerova typu

TMABA –  $\gamma$ -trimethylaminobutyraldehyd

TML –  $\epsilon$ -N-tri-methyllysin

VGCC – vápníkové kanály

VGKC – draselné kanály

$\gamma$ BB –  $\gamma$ -butyrobetain

## Obsah

1	Úvod a cíl práce .....	- 8 -
2	Teoretická část .....	- 9 -
2.1	Neuroanatomie centrálního cholinergního systému .....	- 9 -
2.1.1	Rozdělení cholinotropních (parasymptických) látek .....	- 11 -
2.1.2	Pochody cholinergní transmise .....	- 11 -
2.2	Základní rozdělení a funkce cholinesteráz .....	- 15 -
2.2.1	Úvod .....	- 15 -
2.2.2	Klasifikace, funkce a inhibice cholinesteráz .....	- 15 -
2.2.3	Klinický význam .....	- 21 -
2.2.4	Molekulární formy .....	- 25 -
2.2.5	Inhibice enzymu .....	- 26 -
2.3	Stručný přehled účinků L-karnitinu .....	- 29 -
2.3.1	Chemická charakteristika L-karnitinu .....	- 29 -
2.3.2	Biologický význam L-karnitinu .....	- 30 -
2.3.3	Syntéza a metabolismus L-karnitinu .....	- 30 -
2.3.4	Nedostatek L-karnitinu .....	- 32 -
2.3.5	Účinky L-karnitinu .....	- 33 -
2.3.6	Čtyři paradoxní účinky karnitinu .....	- 40 -
2.3.7	Hlavní faktory podmiňující účinnost Kar .....	- 41 -
2.4	Stručný přehled účinků 7-methoxytacrinu .....	- 42 -
2.4.1	Stručný přehled farmakologie tacrinu a 7-methoxytacrinu (MEOTA) .....	- 43 -
	-	
3	Praktická část .....	- 45 -
3.1	Úvod .....	- 45 -
3.2	Experimentální část .....	- 46 -
3.3	Vlastní pokus .....	- 49 -
3.3.1	Cíl práce .....	- 49 -
3.3.2	Pracovní hypotéza .....	- 49 -
3.3.3	Uspořádání vlastního pokusu .....	- 49 -
3.3.4	Stanovení enzymové aktivity cholinesteras .....	- 50 -
3.4	Výsledky a diskuse .....	- 52 -
4	Závěr .....	- 58 -
	Použitá literatura .....	- 59 -
	Seznam tabulek .....	- 63 -
	Seznam obrázků .....	- 63 -

## Abstrakt

Cílem praktické části bylo zjistit, zda je L-karnitin (KAR) schopen zvýšit průnik nepřímého parasymptomimetika 7-methoxytacrinu (MEOTA) přes hematoencefalickou bariéru. Ukazatelem případného ovlivnění bylo sledování změn aktivity acetylcholinesterázy (AChE) ve vybraných částech mozku laboratorního potkana po systémovém podání obou testovaných látek.

Pro stanovení aktivity cholinesteráz byla použita modifikovaná Ellmanova metoda. Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu.

KAR při současném podání s MEOTA zesílil inhibici AChE a to více ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích, méně v hipokampu. Intraperitoneální podání KAR bylo v tomto směru poněkud výraznější než podání perorální. Dosažené výsledky potvrdily pracovní hypotézu zesílení inhibičního efektu MEOTA předchozím podáním KAR.

The aim of this work was to test the ability of L-carnitine (KAR) to increase the permeation of indirect parasymptomimetic 7-methoxytacrine (MEOTA) through the blood-brain barrier. The monitoring of acetylcholinesterase activity (AChE) in the parts of the brain chosen served as index of changes presumed. All experiments were performed in laboratory rats, drugs tested were given systematically.

The modified Ellman's method was used for the determination of the AChE activity. The principle of this method is based on hydrolysis of thiocholin.

The prior administration KAR to MEOTA augmented the inhibition of AChE more in the frontal cortex, septum and basal ganglias and less in the hippocampus. Intraperitoneal administration of KAR was somewhat stronger in comparison with peroral one. The results obtained confirmed the hypothesis of augmentation of MEOTA AChE activity by means of previous KAR administration.

# 1 Úvod a cíl práce

Centrální cholinergní systém je tvořen několika nevelkými skupinami neuronů produkujících acetylcholin (ACh). Tyto cholinergní neurony komunikují prostřednictvím svých axonů s rozsáhlými částmi mozku a označují se jako klastry Ch1 – Ch8.

Cholinesterasa (ChE), je označení pro dva příbuzné enzymy, které se vzájemně liší svým výskytem a svou biologickou funkcí. Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym nezbytný při přenosu nervového vzruchu. Nachází se na cholinergních synapsích, kde působí hydrolýzu ACh a tím i terminaci nervového vzruchu. Příbuzná butyrylcholinesterasa (BChE) je sekreční enzym jaterního parenchymu, její fyziologická funkce v plazmě není přesně známa.

L-karnitin (Kar) je látka dodnes málo používaná v medicíně, více je známá u sportovců a ve fit centrech. Medicínsky je doporučována u některých svalových, kardiálních a neurologických nemocí. Hlavní funkcí Kar je získání energie pro buněčné pochody uskutečňováním beta-oxidace mastných kyselin.

Tacrin byl zaveden do terapie senilní demence Alzheimerova typu. Je nekompetitivním a reverzibilním inhibitorem AChE a BChE a má i přímý účinek na muskarinové a nikotinové receptory. Analog tacrinu methoxytacrin (MEOTA) slouží jako antidotum při intoxikaci anticholinergními látkami.

Cílem praktické části bylo zjistit, zda je KAR schopen zvýšit průnik nepřímého parasymptomimetika MEOTA přes hematoencefalickou bariéru. Ukazatelem případného ovlivnění bylo sledování změn aktivity AChE ve vybraných částech mozku laboratorního potkana po systémovém podání obou testovaných látek.



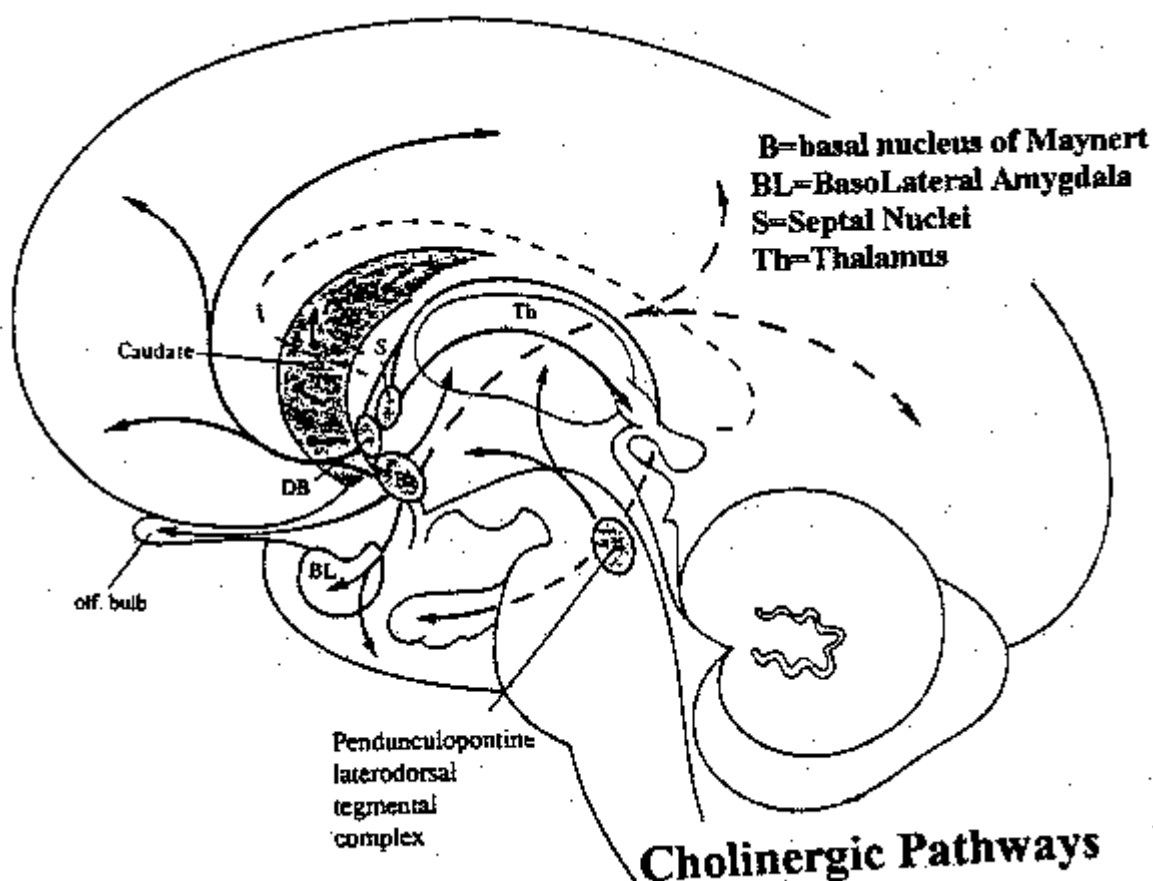
## 2 Teoretická část

### 2.1 Neuroanatomie centrálního cholinergního systému

Cholinergní neuronální populace mozku (centrální cholinergní systém) je tvořena několika nevelkými skupinami („klastry“) neuronů produkujících acetylcholin. Tyto relativně málo početné cholinergní neurony však komunikují prostřednictvím svých axonů s rozsáhlými částmi mozku. Podle obecně přijímané nomenklatury (Mesulam a Geula, 1988) se označují jako klastry Ch1 – Ch8. Skupina Ch1 je představována neurony mediálního septa, jejichž axony představují hlavní cholinergní vstup pro hipokampus a corpus amygdaloideum. Klastr Ch2 představuje nepatrná skupina neuronů vertikálního raménka jádra Brocova diagonálního svazku, která se společně s Ch1 podílí na cholinergní inervaci hipokampu. Skupina Ch3 je reprezentována opět nepatrným shlukem buněk lokalizovaným na horizontálním raménku Brocova diagonálního svazku s projekcí nasměrovanou hlavně do olfaktorické oblasti koncového mozku (bulbus olfactorius a area olfactoria). Nejnápadnějším seskupením je klastr Ch4 jehož anatomickým podkladem je nucleus basalis Meynerti (dříve také označovaný jako substantia innominata). U člověka představuje Meynertovo jádro přibližně 400 000 nervových buněk, které vysílají axony především do frontální a orbitofrontální oblasti kůry mozkové, ale také do přední a basolaterální části amygdaloidního komplexu, malý svazek axonů směřuje k nucleus reticularis thalami. Souhrnně jsou klastry Ch1 – Ch4 zahrnovány do bazálního předního mozku (*basal forebrain*), označovaného také jako bazální magnocelulární komplex, zajišťujícího přibližně 80 % z celkového rozsahu cholinergní inervace mozku, především pak mozkové kůry, hipokampu, amygdaloidního komplexu a tzv. čichového mozku. I když je faktický rozsah popisovaných cholinergních populací v rámci CNS zanedbatelný, je prokázáno, že např. 30 % neuronů mozkové kůry je cholinoceptivních, tzn. je schopno reagovat na přítomnost acetylcholinu. Nejvyšší denzita acetylcholinových receptorů se nachází ve IV. a V. vrstvě mozkové kůry a převládají metabotropní muskarinové (M) receptory (Fibiger, 1982; Stone, 1994; Petrovický et al., 2008).

Zbývajících cca 20 % cholinergní inervace zajišťují klastry Ch5 – Ch8. Na úrovni tegmenta středního mozku se nacházejí shluky Ch5 (pedunkulopontinní jádro) a Ch6 (nucleus tegmenti laterodorsalis), jejichž axony směřují hlavně do přední a střední části thalamu. Na úrovni Varolova mostu se nachází zcela nepatrné klastry Ch7 a Ch8 inervující tectum, thalamus a septo-hipokampový komplex (Stone, 1994; Petrovický et al., 2008).

Mimo to se cholinergní neurony nacházejí zcela rozptýleně ve striatu, kde představují cca 1 % v rámci všech nervových buněk této struktury. S velkou pravděpodobností se jedná o vnitřní cholinergní systém striata. Lokální sítě cholinergních neuronů menšího rozsahu byly identifikovány v area hypothalamica posterolateralis, ncl. paraventricularis a bulbus olfactorius (Smith et al., 1995).



Obrázek 1: Cholinergní systém (podle Smith et al., 1995)

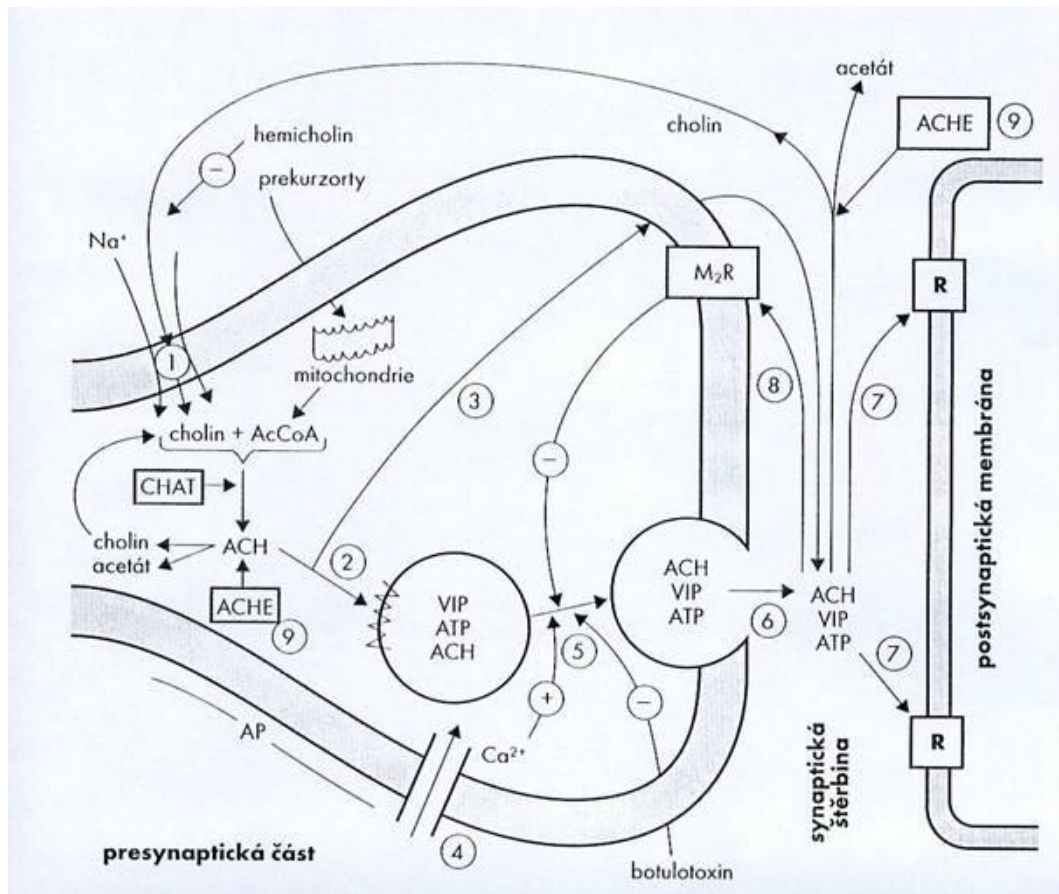
### 2.1.1 Rozdělení cholinotropních (parasymptických) látek

Tabulka 1: Rozdělení cholinotropních látek

<i>Cholinomimetika</i>		<i>cholinolytika</i>	
<b>přímo působící cholinomimetika</b>		<b>přímo působící cholinolytika</b>	
M receptory	N receptory	M receptory	N receptory
(parasymptomimetika)	- ganglia (N <sub>N</sub> )	(parasymptolytika, antimuskarinika)	N <sub>N</sub> blokátory (ganglioplegika)
	- nervosvalové spojení (N <sub>M</sub> )		N <sub>M</sub> blokátory (periferní myorelaxancia)
<b>nepřímo působící cholinomimetika (inhibitory acetylcholinesterázy)</b>		<b>nepřímo působící cholinolytika</b>	
reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy	ireverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy	----	

### 2.1.2 Pochody cholinergní transmise

(syntéza, skladování, uvolňování acetylcholinu, interakce ACh s receptory, ukončení účinku ACh)



Obrázek 2: pochody cholinergní transmise, podrobnější popis viz text (podle <http://farm.lf1.cuni.cz/img/vnsparaobr1.jpg>)

Acetylcholin (ACh) je v cytoplasmě nervového zakončení syntetizován z cholinu + acetyl-CoA (AcCoA) enzymem cholinacetyltransferázou (CHAT). Cholin je aktivně přijímán do nervového zakončení (1) – hemicholin vstup blokuje; Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích. Vzniklý ACh je transportován specifickými transportními proteiny do vezikul (2), kde je skladován spolu s kotransmitery (VIP, ATP), pouze malá část cytoplazmatického ACh zůstává volně v cytoplasmě a může z nervového zakončení difundovat (3) - „nekvantální“ uvolňování ACh. Když akční potenciál (AP) dosáhne nervového zakončení dochází ke vstupu  $Ca^{2+}$  do nervového zakončení napěťově řízenými kalciovými kanály (4) – umožní splynutí membrány vezikul s membránou nervového zakončení (5) a vyliť obsahu určitého počtu – kvanta vezikul do synaptické štěrbiny – „kvantální“ výlev (6) (tento proces blokuje např. botulotoxin). ACh v synaptické štěrbině působí na postsynaptické receptory (7) ↓ vyvolává parasymptomimetické účinky, na presynaptické „autoreceptory“ (8) – jejich ovlivněním moduluje množství

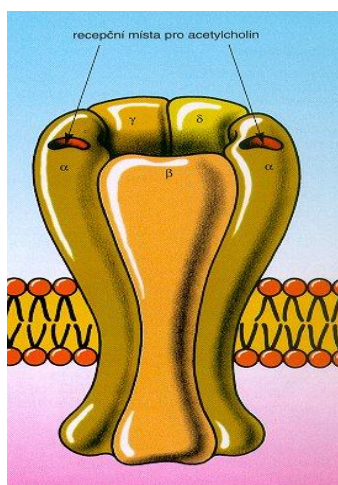
uvolňovaného ACh akčním potenciálem. Na receptory je molekula ACh navázána velmi krátce (cca 2 ms) – po uvolnění ACh okamžitě hydrolyzován acetylcholinesterázou (AChE – hydrolyzuje i volný cytoplazmatický ACh) na cholin + acetát (9).

**Tabulka 2: Receptory pro acetylcholin, mechanismus působení cholinotropních látek**

Subtypy acetylcholinových receptorů					
	nikotinové *		muskarinové**		
Receptory:	Muskulární N <sub>M</sub>	neuronální N <sub>N</sub>	M <sub>1</sub> „neuronální“	M <sub>2</sub> „kardiální“	M <sub>3</sub> „hladké svaly/žlázy“
Hlavní lokalizace:	Nervosvalová ploténka	Ganglia CNS Senzorická nervová zakončení	CNS (mozková kůra, periferní neurony aj.) parietální buňky žaludku	Srdce - předsíň - SA, AV uzel - srdeční komory presynaptická n. zakončení	exokrinní žlázy hladké svaly endotel
účinek na úrovni buňky:	otevření iontového kanálu pro kationty depolarizace buněčné membrány - excitace		stimulace PLC (IP <sub>3</sub> , DAG) ↑Ca <sup>2+</sup> ↓permeability pro K <sup>+</sup> depolarizace excitace	aktivity AC (↑cAMP – ↓Ca <sup>2+</sup> )  resp. aktivace K <sup>+</sup> kanálu  inhibice	aktivace  PLC (IP <sub>3</sub> , DAG)  Ca <sup>2+</sup>  stimulace
funkce:	nervosvalový přenos	Neurotransmise v gangliích;  presynaptická facilitace v CNS	CNS excitace (paměť);  žaludek (sekrece HCl);  zvýšení motility GIT	-srdce- inhibice  - presynaptická inhibice  -neuronální inhibice	sekrece  kontr. hladkých svalů  vazodilace  (NO)
agonista:	acetylcholin  karbachol  fenyltrimetyl-amonium	acetylcholin  nikotin, lobelin  dimetylfenyl-piperazin  epibatidin, cytisin	acetylcholin  oxotremorin	acetylcholin  karbachol	acetylcholin  karbachol

Antagonista:	Myorelaxancia (dekametonium, galamin, tubokurarin, pankuronium, atrakurium, vekuronium), a-bungarotoxin	ganglioplegika  (trimetafan  mekamylamin  hexametonium)	Parasympato- lytika pirenzepin  atropin  dicyklomin	Parasympato- lytika  atropin  AF-DX 116	Parasympa- tolytika  atropin  hexahydro- silidafen
--------------	--	---	---	--	--

\* Nikotinový Receptor – složen ze 4 podjednotek – podjednotky tvoří kanál pro kationty; ACh se váže na  $\alpha$  podjednotku



Obrázek 3: Nikotinový cholinergní receptor (podle [http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni\\_rec.jpg](http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni_rec.jpg))

\*\* Muskarinové receptory – spojení s efektoem pomocí G-regulačního proteinu (možná aktivace nebo inhibice efektoru); receptory  $M_1$ ,  $M_3$  ( a  $M_5$  – funkce není přesně definována) aktivace  $G_{q/11}$  proteinu, stimulace fosfolipázy C (PLC), vznik  $IP_3$  (inositol trisfosfát) + DAG (diacylglycerol), aktivační projevy jako kontrakce hladkých svalů, sekrece aj.

Receptory  $M_2$  ( a  $M_4$ - funkce není přesně definována), G-inhibiční protein, ↓ aktivity adenylcyklázy; inhibiční působení na srdci (negativně chronotropní , negativně inotropní působení, presynaptická inhibice v CNS).

(Lincová,2002)

## **2.2 Základní rozdělení a funkce cholinesteráz**

### **2.2.1 Úvod**

Cholinesterázy byly objeveny na počátku 20. století, kdy H. H. Dale v r. 1914 zjistil, že krev je schopna hydrolyzovat cholinové estery. Ve 20. letech pak Engelhart prokázal, že acetylcholin může být rozštěpen i extraktem ze srdečního svalu a že tento účinek je inhibován alkaloidem fyzostigminem. Ve 30. letech Stedman provedl částečnou purifikaci tohoto enzymu z koňské plazmy a nazval jej cholinesteráza. Později byla prokázána celá řada cholinesteráz a dalších esteráz. V posledních letech se výzkum těchto enzymů dostává z oblasti teoretického zkoumání do studia praktické aplikace. (Navrátil a Bajgar, 1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al., 2007)

### **2.2.2 Klasifikace, funkce a inhibice cholinesteráz**

Klasifikace podle Enzyme Commission (EC)

EC 3.-.-.- Hydrolasa

EC 3.1.-.- Štěpí esterovou vazbu

EC 3.1.1.- Štěpí estery karboxylových kyselin

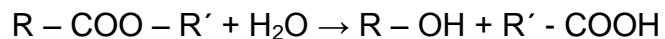
EC 3.1.1.7 Acetylcholinesterasa

EC 3.1.1.8 Butyrylcholinesterasa

(<http://www.brenda-enzymes.info>, <http://www.expasy.org/cgi-bin/search-biochem-index>)

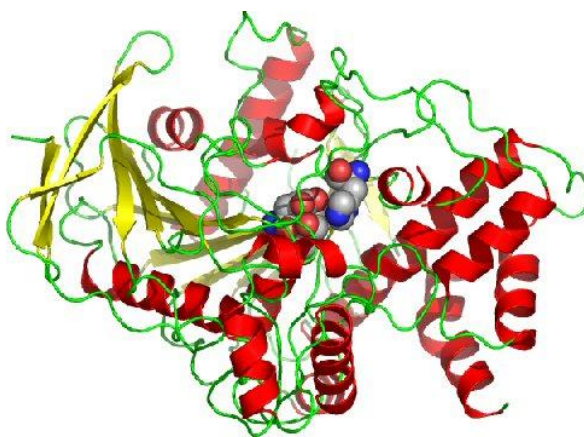
Cholinesterázy patří do skupiny hydroláz ( skupina EC 3.1.) štěpících esterovou vazbu, takže patří do podskupiny esteráz ( podskupina EC 3.1).

Esterázy katalyzují reakci:

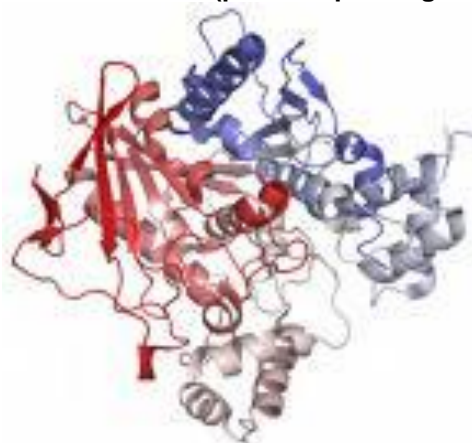


Podle afinity k substrátům se dělí na A-esterázy ( EC 3.1.1.2), B-esterázy ( EC 3.1.1.1) a pro nás důležité C-esterázy , také nazývané cholinesterázy, hydrolyzují estery cholinu větší rychlostí než A a B-esterázy. Jsou citlivé vůči organofosfátovým inhibitorům i fyzostigminu a dělí se podle své afinity k přirozenému substrátu acetylcholinu na dvě skupiny:

- acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7) a
- butyrylcholinesterázu (BChE, EC 3.1.1.8)



Obrázek 4: Molekula AChE (podle <http://images.google.com>)



Obrázek 5: Molekula BChE (podle <http://images.google.com>)



**Tabulka 3: Obecné vlastnosti cholinesteráz**

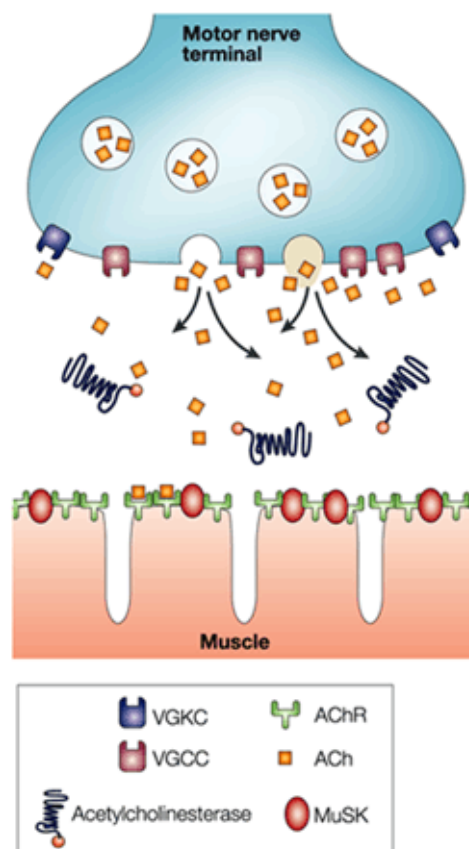
Obvyklý název	Acetylcholinesteráza	Butyrylcholinesteráza
Jiné názvy	Specifická cholinestráza, pravá cholinestráza, „e“ typ cholinestrázy	Cholinesteráza, propionylcholinesteráza, pseudocholinesteráza, „s“ typ cholinesterázy
Číslo z Enzyme Codex	EC 3.1.1.7	EC 3.1.1.8
Zdroj	Elektrický orgán elektrického úhoře, mozek, erytrocyty, jed kobry, neuromuskulární ploténka	Sérum, plazma, pankreas, srdce, játra
Acetyl- $\beta$ -metylcholin	Štěpí	Neštěpí
Druhov $\acute{e}$ rozdíly	Malé	Velké
Inhibice nadbytkem substrátu	Ano	Ne
Vazba	Tvoří komplex s lipoproteinem	glykoprotein s obsahem kyseliny sialové
Molekulární formy	Subjednotky	Geneticky určené
Funkce	Štěpí neuromediátor acetylcholin	naznámá (štěpí některá léčiva, např. succinylcholin)

AChE má vyšší afinitu k acetylcholinu, butyrylcholin štěpí velmi malou rychlostí. BChE má vyšší afinitu k butyrylcholinu, ale acetylcholin hydrolyzuje také. AChE je lokalizována na neuronech, zejména na synapsích, v erytrocytech, srdci, nervosvalové ploténce, v elektrických orgánech některých ryb. BChE je lokalizována v játrech, tam se i syntetizuje, v plazmě, pankreatu, v endotelu kapilár v CNS, atd. AChE je funkčně důležitější než BChE.

Nejdůležitějším enzymem ze skupiny hydroláz a podskupiny esteráz je AChE, Je jedním z klíčových enzymů v organismu živočichů, kde se účastní cholinergního přenosu nervového vzruchu.

Cholinerní přenos nervového vzruchu je na synapsi zprostředkován chemickou látkou (mediátorem), kterou je acetylcholin (ACh). ACh je syntetizován z exogenně dodávaného cholinu (potravou), který je acetylován pomocí acetylkoenzymu A. Tuto reakci katalyzuje enzym cholinacetyltransferáza (ChAT, EC 2.3.1.6). Po syntéze je ACh v buňce skladován v tzv. synaptických váčcích, odkud se při přenosu nervového vzruchu uvolňuje do synaptické štěrbině a ACh reaguje s integrální bílkovinou postsynaptické membrány – acetylcholinovým receptorem (AChR) muskarinového nebo nikotinového typu.

(Navrátil a Bajgar,1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al.,2007)



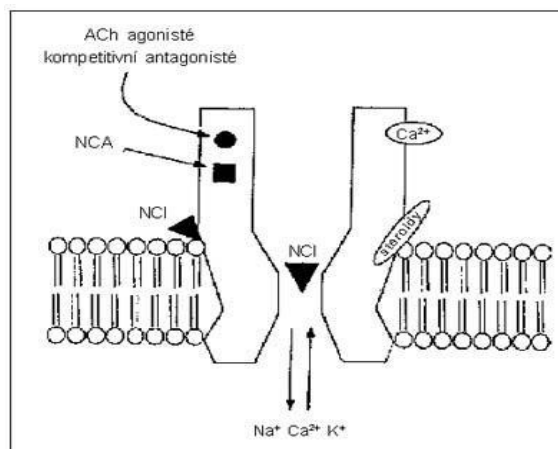
Nature Reviews | Immunology

Obrázek 6: Cholinerní přenos nervového vzruchu (podle <http://images.google.com>)

VGCC...vápníkové kanály, VGKC...draselné kanály, MuSK...svalová specifická kináza

Kromě toho existuje v buňce i rozptýlený ACh, který se může na přenosu vzruchu také podílet. Acetylcholinový receptor je složen z 5 subjednotek. Subjednotky receptoru tvoří stěnu iontového kanálu a za klidového stavu (nepřítomnost ACh) je tento kanálek pro ionty uzavřen. Navázáním ACh na receptor se mění prostorové uspořádání molekuly receptoru a v dosud nepropustné stěně vznikne průchodný pór – ionofor. Tímto pórem začnou podle koncentračního spádu proudit ionty (sodík do buňky a draslík z buňky) a vzniklý elektrický potenciál se dále šíří po nervovém vlákne jako elektrický impuls. Stav otevření ionoforu (aktivovaný stav) však trvá jen velmi krátkou dobu, protože okamžitě po navázání ACh na receptor je ACh rozkládán AChE, která je lokalizována v těsné blízkosti receptoru, avšak není s ním totožná. Po rozložení ACh se receptor vrací do původního stavu (klidový stav), pór se uzavře a pomocí sodno-draselné pumpy se za dodání energie ve formě ATP (aktivní transport) obnoví původní iontové poměry.

(Navrátil a Bajgar, 1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al., 2007)



**Obrázek 7: Schématický průřez ionotropním nikotinovým receptorem (podle [http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32\\_obr2.jpg](http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_obr2.jpg))**

Schématický průřez ionotropním nikotinovým receptorem, znázorňující iontový kanál, vazebné místo pro ACh, kompetitivní agonisty a antagonisty a různá alosterická vazebná místa, rozložená na extracelulární části receptoru. NCA = nekompetitivní alosterická aktivace, NCI = nekompetitivní

alosterické inhibiční vazebné místo.

[http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32\\_ obr2.jpg](http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_ obr2.jpg)

Bezprostřední úloha AChE tkví ve štěpení ACh na cholin a kyselinu octovou. Vlastní hydrolyza ACh katalytickým působením AChE probíhá ve více stupních. Nejprve je ACh vázán svým kvarterním dusíkem na  $\alpha$ -anionické místo enzymu a karboxylovou skupinou na esteratické místo molekuly AChE, vzniká komplex enzym-substrát, odštěpením cholinu vzniká acetylovaný enzym, který reaguje s vodou na komplex kyselina – enzym a tento se spontánně hydrolyzuje na kyselinu a AChE. AChE je pak znovu připravena štěpit další molekuly ACh. Enzymatická hydrolyza ACh se uskutečňuje na aktivním centru AChE.

Nejdůležitějším místem aktivního povrchu AChE je katalytické centrum, to je tvořeno hydroxylovou skupinou serinu a karboxylovou skupinou kyseliny glutamové. Dále je na povrchu ještě jedno anionické místo, označované jako  $\beta$ , které je také tvořeno karboxylovou skupinou a  $\gamma$ -anionické místo, což je oblast hydrofobních interakcí.

Molekula AChE v nativním stavu je složena ze dvou řetězců  $\alpha$  a dvou řetězců  $\beta$  a je tedy tetramerem o složení  $\alpha_2\beta_2$ .

BChE je, na rozdíl od AChE, tvořena jen jedním polypeptidickým řetězcem, její molekula obsahuje asi 25% sacharidů. Katalytické centrum je složeno z esteratického a  $\alpha$ -anionického místa, na aktivním povrchu BChE se však nevyskytuje  $\beta$ -anionické místo. Molekulární hmotnost je mezi 60 000 a 750 000, zatímco u AChE je to mezi 120 000 a 460 000.

Schématicky představuje cholinergní synapse funkční jednotku, obsahující malou molekulu – mediátor ACh a tři bílkovinné makromolekuly – ChAT (cholinacetyltransferáza), AChE a AChR (muskarinový nebo nikotinový). Účinek ACh na synapsi je spojen s dalšími transdukčními ději, zejména s c-GMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , a tyto děje současně se změnami koncentrace iontů tvoří molekulární podstatu přenosu nervového vzruchu či fyziologické odpovědi.

Aktivita AChE reprezentuje důležitou složku cholinergního přenosu nervového vzruchu, která jej ovlivňuje jak kvantitativně, tak kvalitativně.

Změněná aktivita enzymů - a tedy i cholinesteráz - může být způsobena i interakcí enzymů s inhibitory či aktivátory. Inhibitory AChE můžeme rozdělit

podle charakteru a místa vazby na aktivním enzymu do dvou skupin – inhibitory neacylující a inhibitory acylující.

Mezi inhibitory neacylující řadíme ty látky, které se váží na anionická místa či na místo hydrofobní. Patří sem např. tetraalkylamoniové soli, bis-amoniové sloučeniny (kurare) nebo atropin, takrin, gallamin. Nejdůležitější acylující inhibitory jsou organofosfáty (OF) a karbamáty.

Inhibitory mohou mít rozdílnou afinitu k AChE a k BChE, což je možno využít k selektivnímu odlišení jejich molekulárních forem. V tomto smyslu se jeví jako nejselektivnější tacrin a 3-diethylaminofenyl-N-metylkarbamát methojodid.

Aktivitu AChE inhibované organofosfáty je možno v některých případech znovu obnovit (reaktivovat). Může dojít k spontánní reaktivaci defosforylačním účinkem vody nebo je možno reaktivovat AChE pomocí určitých chemických látek. Tyto látky se nazývají reaktivátory cholinesteráz.

(Navrátil a Bajgar, 1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al., 2007)

### 2.2.3 Klinický význam

Aktivita AChE i BChE není jednotná a má své výkyvy. Aktivita erytrocytární AChE u mužů kolísala v rozmezí  $\pm 8 \%$ , u žen pak  $\pm 12 \%$  během jednoho roku. Pro BChE byl rozdíl větší, za rok to bylo  $\pm 25 \%$  u mužů a  $\pm 24 \%$  u žen.

Laboratorní stanovení aktivity cholinesteráz v krvi či v jiných orgánech má význam pro určení či upřesnění diagnózy různých stavů organismu. Aktivitu AChE i BChE totiž ovlivňuje celá řada patologických i fyziologických faktorů.

Pohlaví ovlivňuje aktivitu obou enzymů. U žen je aktivita plazmové BChE i erytrocytární AChE nižší než u mužů. Aktivita je ovlivněna i věkem, do dospělosti aktivita obou cholinesteráz stoupá a po pátém deceniu klesá, po šedesátce většinou nejsou rozdíly mezi aktivitou AChE nebo BChE u mužů či žen. Aktivitu ovlivňuje i výživa. U nízkoenergetické diety a u nedostatku proteinů je aktivita obou enzymů snížena asi o čtvrtinu, u AChE dochází i ke změně enzymatických vlastností.

Aktivita plazmové BChE je z hlediska klinicko-laboratorní diagnostiky propracovanější a v klinice i více používaná.

(Navrátil a Bajgar, 1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al., 2007)

## Patofyziologické mechanismy ovlivňující koncentraci enzymů

V plazmě se stanovuje aktivita celkové cholinesterázy (ChE), která je hlavně jaterního původu. Častější jsou snížené hodnoty aktivity.

### Snížené hodnoty aktivity ChE v plazmě

Příčinou může být porucha proteosyntézy (těžká hepatopatie, proteinová malnutrice), těžké onemocnění spojené s hyperkatabolismem, inhibice enzymu některými léky nebo organofosfáty, případně výskyt atypických genetických variant ChE.

#### *poškození jater*

aktivita odpovídá kapacitě fungujícího parenchymu, určí rozsah akutního difuzního onemocnění; snížení odráží jednak inhibici syntézy jednak pokles počtu produkujících buněk

- jaterní cirhóza - aktivita ChE  $< 40 \mu\text{kat/l}$  = jaterní onemocnění u něhož je nejčastěji nalezen pokles ChE; ne vždy pokles ChE znamená výskyt cirhózy, avšak normální hodnoty ChE cirhózu ve značné míře vylučují; ChE je ukazatelem poklesu počtu fungujících buněk i mírou snížení perfuze; toto snížení přetrvává i při normalizaci hladin ALT a GGT (pokročilá cirhóza); velmi nízké hodnoty (pod 30% celkové aktivity) jsou prognosticky špatným znamením
- chronická aktivní hepatitida - nalézáme hodnoty  $< 40 \mu\text{kat/l}$  (dlouhotrvající perzistující hepatitida a etanolem navozená hepatitida nemívají výraznější pokles); snižující se hodnoty svědčí pro přechod do cirhózy; nekomplikovaná akutní virová hepatitida nevede k poklesu ChE
- tumory v játrech (rozsáhlejší neoplazie) - hodnoty aktivity  $< 50 \mu\text{kat/l}$
- akutní toxické poškození jater může způsobit až aktivity  $< 10 \mu\text{kat/l}$  – otravy organickými rozpouštědly, amanitiny (blokuje proteosyntézu)
- chronické městnání v játrech při srdeční nedostatečnosti

#### *proteinová malnutrice*

- chronické hladovění

*těžká onemocnění spojená se zvýšeným katabolismem - nejčastější příčina poklesu aktivity ChE*

- těžké infekce
- pooperační stavy
- maligní onemocnění lymforetikulárního systému
- karcinomy s i bez jaterních metastáz (nádorová kachexie)

*inhibice enzymu*

- intoxikace léky (např. fyzostigmin, prostigmin, syntostigmin, cyclosin, streptokinasa)
- intoxikace organofosfáty (pesticidy nebo bojové chemické látky; otrava thiofosfátovými insekticidy způsobí snížení pod 30  $\mu\text{kat/l}$ ); po kompletní inhibici se aktivita ChE vrací k původním hodnotám po 30 až 40 dnech

*atypické genetické varianty ChE*

- familiární idiopatická acholinesterázie = dědičný defekt, který je klinicky němý; po podání myorelaxans sukcinylcholinu hrozí apnoická pauza (ChE nedokáže tuto látku dostatečně rychle odbourat)
- Atypická varianta "silent" (SS) má takřka úplné chybění enzymu.

*další výskyt snížené aktivity*

- infarkt myokardu
- těžké anemie (hypochromní anemie, perniciózní anemie)
- dermatomyozitida (60 % případů)
- urtikarie (50 % případů)
- progresivní svalová dystrofie
- ulcerativní kolitida

Zvýšené hodnoty aktivity ChE v plazmě

Jsou méně obvyklé než snížení, nemají větší diagnostický význam.

Vyskytují se u nemocných s vystupňovanou proteosyntézou:

- nefrotický syndrom

- ve fázi úzdravy po hepatitidě
- abúzus alkoholu - v počáteční fázi může navodit zvýšenou syntézu
- alkoholická steatóza jater
- icterus juvenilis intermittens (Gilbertův-Meulengrachtův syndrom) - charakteristické je mírné až střední zvýšení
- diabetes mellitus (otylí pacienti) - nejčastější příčina zvýšené aktivity ChE
- hyperlipoproteinémie
- pacienti přecitlivělí na kurare (při narkóze)
- konstituční atopická neurodermatitida
- psoriáza
- u atypické varianty E Cynthiana je ChE zvýšena až 3x

([http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm))

#### Přímé následky abnormálních koncentrací

U osob s nízkou aktivitou celkové ChE v plazmě (genetické varianty enzymu, snížená syntéza při těžkém poškození jater) se může vyskytnout tzv. léky indukovaná postanestetická apnoe. Jako periferní myorelaxans se při operacích používá sukcinylcholin (= sukcinylidicholin = suxamethonium). Tento analog acetylcholinu se váže na cholinergní receptory na nervosvalové ploténce a způsobí dlouhodobou depolarizaci svalového vlákna. Je tak zabráněno repolarizaci a vzniku nového akčního potenciálu, sval je relaxován. Jelikož je sukcinylcholin za normálních okolností do 10 minut cholinesterázou odbourán, působí zablokování kosterních, a tedy i dýchacích, svalů jen krátkodobě. V případě nepřítomnosti funkční ChE se působení sukcinylcholinu na nervosvalové ploténce značně prodlužuje a apnoe může trvat mnohem déle. Současně dochází ke zvýšenému vyplavení  $K^+$  do krve, hrozí tak hyperkalemie a m.j. stoupá riziko vzniku srdečních arytmií.

U suspektních jedinců je třeba vyšetřit dibukainové nebo fluoridové číslo, které nás informuje o předpokládaném genotypu.

([http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm))



## 2.2.4 Molekulární formy

ChE je homotetramer tvořený dvěma dimery, tyto podjednotky jsou spojeny disulfidickými můstky a nekovalentními hydrofóbními interakcemi. Každá podjednotka obsahuje 574 aminokyselin a devět sacharidových řetězců. Relativní molekulová hmotnost enzymu je 348 000.

Aktivní centrum, které se nachází na každé ze čtyř identických podjednotek, obsahuje aminokyselinu serin.

Plazmatická ChE může být pomocí elektroforézy separována do 7 až 12 frakcí. Tyto frakce se liší relativní molekulovou hmotností, pravděpodobně jde o agregáty složené z různého množství stejné základní jednotky enzymu. Laboratorně se stanovuje aktivita celkové ChE.

Geneticky jsou oba enzymy kódovány podle různých genů. Lokusy pro BChE jsou lokalizovány na delším raménku chromozómu 3 v oblasti označené 3q26.1-q26.2. AChE je kódována podle chromozómu 7, přesněji oblasti 7q22. BChE je kódována pomocí 7 alel, které jsou označeny velkými písmeny, zpravidla naznačujícími o jakou formu aktivity BChE se jedná: U, A, S, F, H, J, K. Tyto alely mohou teoreticky tvořit 45 různých diploidních genotypů, které však odpovídají pouze 11 fenotypům. Normální gen U (usual) řídí syntézu normální (nejrozšířenější) plazmatické ChE; atypický gen A (atypical) řídí syntézu varianty, která způsobuje snížení aktivity ChE v séru, vykazuje však zvýšenou rezistenci k inhibici dibukainem (kompetitivní inhibitor); alela označovaná F řídí syntézu varianty se zvýšenou rezistencí k inhibici fluoridem, která je však stále významně inhibovaná dibukainem; "tichý" gen S (silent) odpovídá za variantu ChE, které chybí struktura nezbytná pro hydrolýzu cholinesterových vazeb, tj. nevykazuje esterázovou aktivitu. Tyto čtyři alelické geny mohou být kombinovány k vytvoření genotypů produkujících jeden normální a 9 atypických variant.

U bílé populace se nachází homozygotních forem AA nebo FF pouze 0,3 až 0,5 %. Další varianty genů J, K a H kódují ChE s normální katalytickou aktivitou, ale následkem porušené syntézy nebo snížené stability molekuly je v plazmě přítomno méně enzymu; varianta K je spojena s 33 %, varianta J s 66 % a varianta H s 90 % redukcí aktivity. Varianty enzymu jsou klinicky

významné, neboť způsobují daleko větší citlivost na přítomnost inhibitorů, případně mají jen nízkou aktivitu.

([http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm), Navrátil a Bajgar, 1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al., 2007)

### 2.2.5 Inhibice enzymu

Inhibitor enzymu se zpravidla váže na některé z jeho aktivních míst. Katalytické centrum enzymu se skládá z esteratického místa, tvořeného karboxylovou skupinou serinu a  $\alpha$ -anionického místa, tvořeného karboxylovou skupinou kyseliny glutamové. Vyskytuje se tu také  $\beta$ -anionické a  $\gamma$ -anionické místo. Inhibitory se obecně dělí na acylující nebo neacylující. Mezi neacylující patří látky, které se vážou nad  $\alpha$ -,  $\beta$ -, či  $\gamma$ -anionické místo a tyto vazby mají reverzibilní charakter. Inhibitory reagující s esteratickým místem patří mezi acylující, tím že dochází k vytvoření chemické vazby, je tato inhibice ireverzibilní.

Bylo popsáno mnoho inhibitorů cholinesterasy, mohou to být různá léčiva nebo organofosfáty a karbamáty používané jako pesticidy v zemědělství. Inhibice je způsobena také některými přirozeně se vyskytujícími toxiny, např. alkaloidy prostigminem a fyzostigminem (stejně jako acetylcholin obsahují v molekule kvartérní dusík), dále také neurotoxinem cyanobakterií anatoxinem-(s), toxickým peptidem hadího jedu mamby zelené (*Dendroaspis viridis* Hallowell) fasciculinem. Inhibici méně než 15% způsobují nedepolarizující myorelaxanty a antibiotika peniciliny a streptomycin. Z 20 až 100% enzym inhibují estery karbamátu používané jako parasymptomimetika (např. neostigmin), kardiovaskulární léky (např. esmolol), cytotoxické léky (např. cyklofosfamid), hormony (např. kortikosteroidy), hormonální kontraceptiva, psychotropní léky (např. lithium), bronchodilatátory (např. bambuterol), léky používané proti glaukomu (např. ekothiopát).

K nejdůležitějším inhibitorům však patří organofosfáty (OF), které jsou vysoce reaktivní a způsobují ireverzibilní inhibici. OF pronikají do organismu všemi branami vstupu (inhalačně, perkutánně, přes spojivky, perorálně).

Nejvíce diskutovanými OF jsou bezesporu „nervové plyny“, které byly pro svou toxicitu nejednou využity ve válečném konfliktu. Jsou to zejména tabun, sarin, soman a látka VX.

Z patofyziologického hlediska je možno při intoxikaci OF rozlišit několik fází. První zahrnuje vstup OF do organismu, průnik do krevního oběhu, transport noxy na místo biotransformace a toxického efektu a zde pak interakci s příslušnými enzymatickými systémy. Druhá fáze je charakterizována hromaděním ACh v nervových zakončeních a projevy vyvolanými jeho zvýšenou koncentrací v těchto místech. Třetí stadium je charakterizováno řadou biochemických a patofyziologických změn v důsledku protražovaného účinku ACh na buněčných membránách a poslední fáze, která je pozorována jen u některých OF, je charakterizována projevy pozdní neurotoxicity.

Klinickým projevem prvních dvou fází otravy jsou příznaky muskarinového typu, dané akumulací ACh na efektorových synapsích vegetativního systému, příznaky nikotinové, dané hromaděním ACh na neuromuskulárních ploténkách motorických nervů, a centrální dané nerovnováhou mezi cholinergním přenosem nervového vzruchu a ostatními neuromediátorovými systémy v CNS.

Klinické příznaky jednotlivých fází:

- muskarinový efekt: nauzea, zvracení, nadměrné vylučování slin, pocení, bronchokonstrikce, mióza
- nikotinový efekt: tachykardie, svalová fibrilace, později tonicko-klonické křeče
- vliv na centrální nervový systém: bolest hlavy, ospalost, úzkost, napětí

Indikátor možné otravy pesticidy

Stanovení aktivity ChE se používá při podezření na otravu OF. Aktivita plazmatické ChE slouží k detekci akutní otravy, zatímco aktivita AChE přítomné v erytrocytech je vhodná pro stanovení dlouhotrvající, chronické expozice OF.

Mezi OF inhibující ChE patří mnoho organických pesticidů (např. parathion). Pracující v zemědělství nebo v chemickém průmyslu mohou být vystaveni inhalaci nebo kontaktu s těmito látkami. Pesticidy inhibují jak plazmatickou ChE, tak AChE na synapsích - stanovená aktivita ChE v plazmě

koreluje s inhibicí enzymu nezbytného při přenosu nervového vzruchu. Příznaky akutní otravy jsou však dány výhradně inhibicí AChE.

Aktivita plazmatické ChE klesá rychleji než aktivita AChE přítomné v erythrocytech. Dříve než dojde k prvním příznakům otravy dochází k poklesu ChE nejméně o 40%. Teprve redukce aktivity o 80 % je spojena s vážným neuromuskulárním postižením. Pokud aktivita poklesne na hodnoty blízké nule je nutné ošetření enzymovými reaktivátory jako je pyridin-2-aldoxim, které reaktivují AChE. Aby mohl být z poklesu aktivity ChE určen stupeň otravy, je třeba znát aktivitu enzymu před expozicí jedu. Z toho důvodu se u pracovníků, kteří přicházejí do styku s OF, stanovuje ChE preventivně.

([http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm), Navrátil a Bajgar,1989, Bajgar, 2004, Bajgar et.al.,2007)

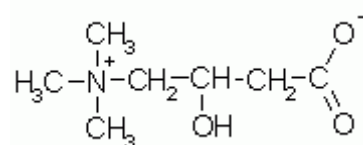
## 2.3 Stručný přehled účinků L-karnitinu

L-karnitin (Kar) je látka dodnes málo používaná v medicíně, o to více je známá u sportovců a ve fit centrech. Medicínsky je doporučován u některých svalových, kardiálních a neurologických nemocí. Jeho případné využití v medicíně pravděpodobně není ještě vyčerpáno. Většímu zájmu o léčebné použití Kar brání zejména dvě překážky, jednak nedostatek kontrolovaných klinických studií, jednak poměrně vysoká cena přípravku a okolnost, že přípravky s Kar jsou nabízeny především jako dietní doplňky a nikoliv jako léky. Kar tedy není hrazen pojišťovnou.

Kar je kvarterní amin, strukturálně blízký aminokyselinám. Dlouhou dobu byl zkoumán jen v laboratořích, aniž by mu byl přisuzován klinický význam. Teprve v 70. letech byl popsán první případ nedostatku karnitinu u člověka, projevující se neschopností odbourávat mastné kyseliny. V 80. letech začala průmyslová výroba Kar. Kar má význam pro srdeční i kosterní sval, některé funkce nervového systému a pro novorozence. (Steidl a Zbránková, 2000, Tomita a Sendju, 1927)

### 2.3.1 Chemická charakteristika L-karnitinu

Jde o kvarterní amin – 3-hydroxy-4-trimethylaminobutyrate – hojně obsažený v mase. Jeho vzorec je  $C_7H_{15}NO_3$ . Je to bílý silně hygroskopický prášek, který se na vzduchu rychle mění na vodný roztok. Tablety nebo kapsle rychle vlhnou a rozpadají se, proto používáme Kar ve vodném roztoku. Kar charakteristicky zapáchá po mase a rybách, v roztoku se zápach ztrácí.



Obrázek 8: Chemický vzorec karnitinu (podle [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/equations/karnitin.01.gif](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/equations/karnitin.01.gif))

V průmyslové výrobě se vyskytuje jako forma D (pravotočivá) a L (levotočivá). Biologicky aktivní je pouze L forma a jen ta se rovněž vyskytuje

v přírodě. Forma D je biologicky neúčinná, škodlivá a do určité míry i toxická, protože kompetitivně inhibuje formu L a může tak vyvolávat příznaky nedostatku L-Kar. Kar jako léčebný prostředek je tedy vždy ve formě L. (Steidl a Zbránková, 2000, Regitz et al. 1987,1988, Subramanian et al. 1987, Arduini et al. 1996)

### **2.3.2 Biologický význam L-karnitinu**

Kar je donorem acetylCoA pro buněčné pochody především cestou beta-oxidace mastných kyselin na membránách mitochondrií. Jeho hlavní funkcí je dodávání energie pro srdeční a kosterní svalstvo, které tak tímto způsobem získává většinu energie pro svou činnost.

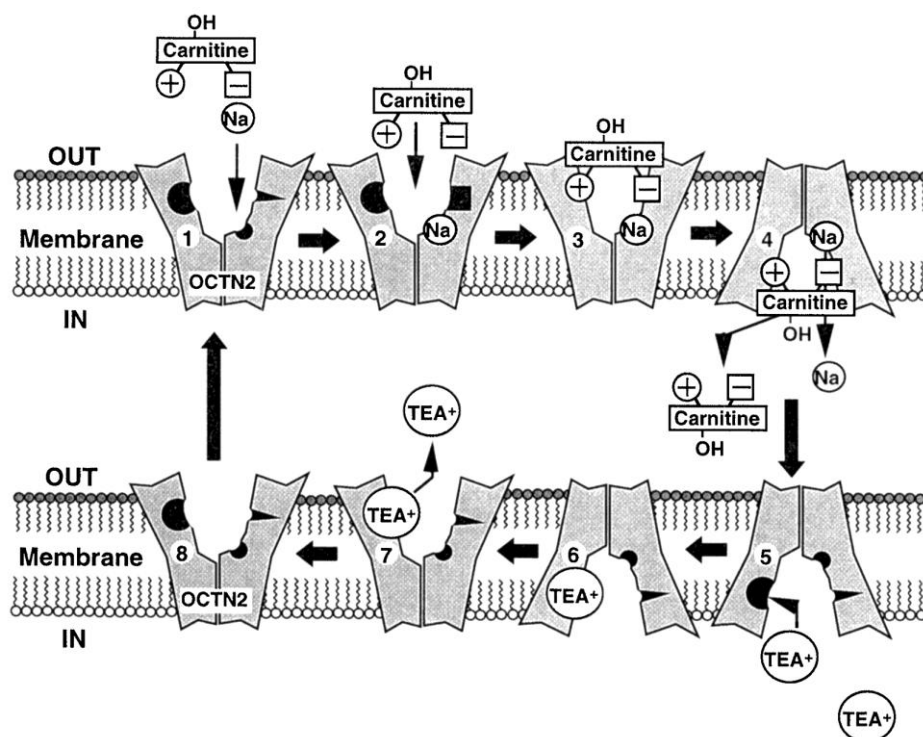
K biologické funkci Kar musí být přítomná jeho volná forma. Záleží na tom, jestli acyl forma obsahuje krátký řetězec mastných kyselin, např. propionyl-Kar, acetyl-Kar, tyto látky jsou kardioprotektivní s předpokládaným vazodilatačním účinkem. Naproti tomu acyl formy obsahující dlouhý řetězec mastných kyselin, např. palmitoyl-Kar, jsou látky kardiotoxické. Kar rovněž plní transportní funkci, protože transportuje mastné kyseliny přes mitochondriální membrány, uvnitř mitochondrií jsou pak mastné kyseliny předány ke „spálení“ v Krebsově cyklu zatímco samotný Kar se vrací do cytosolu. Kar ovlivňuje i metabolismus glukózy a to jak v podmínkách normálního tak i hypoxemického stavu svalových buněk. (Steidl a Zbránková, 2000, Bremmer 1990, Cunningham et al. 1996)

### **2.3.3 Syntéza a metabolismus L-karnitinu**

Endogenní Kar je syntetizován ze dvou esenciálních aminokyselin, lysinu a methioninu. Lysin slouží jako zdroj dusíku a uhlíkatého řetězce, zatímco S-adenosylmethionin poskytuje tři methylové skupiny. K tvorbě Kar je dále zapotřebí vitamin C, vitamin B, niacin a železo. Nejdříve dochází k metylaci lysinu S-adenosylmethioninem za účasti specifické lysinmethyltransferázy a vzniká  $\epsilon$ -N-tri-methyllysin (TML). Ten je dále hydroxylován v pozici beta TML-hydroxylázou na  $\beta$ -hydroxytrimethyllysin (HTML), který je rozštěpen HTML-

aldolázou na  $\gamma$ -trimethylaminobutyraldehyd (TMABA) a glycin. TMABA je postupně oxidován TMABA-dehydrogenázou na  $\gamma$ -butyrobetain ( $\gamma$ -BB). V konečné fázi je  $\gamma$ -BB hydroxylován  $\gamma$ -BB-hydroxylázou v pozici beta a vzniká L-Kar. Přeměna TML na  $\gamma$ -BB probíhá prakticky ve všech tkáních, enzym  $\gamma$ -BB-hydroxyláza, který katalyzuje poslední krok biosyntézy Kar, je u člověka přítomen pouze v játrech, ledvinách a mozku. Předpokládá se, že  $\gamma$ -BB se z větší části tvoří v periferních tkáních a odtud je transportován krví do syntetizujících tkání. Vzniklý Kar je potom opět vyplavován do krve a vychytáván periferními tkáněmi.

Existuje aktivní transportní systém, který přenáší Kar do buňky proti koncentračnímu gradientu (organic cation/carnitine transporter -OCTN2), méně významný je pasivní přenos. Transport Kar závisí na extracelulární koncentraci sodíku, jedná se tedy o mechanismus společného transportu se sodíkem. (Steidl a Zbránková, 2000, Kolář 1994)



Obrázek 9: Transport Kar do buňky (podle

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/vol59/issue2/images/large/mo0210692007.jpeg>)

OCTN2...Organic cation/carnitine transporter No 2

Symport Kar a organického kationu pomocí OCTN2.

1) Vazba  $\text{Na}^+$  na zevním povrchu OCTN2 (1)

- 2) Aktivace vazeb. místa pro Kar (2)
- 3) Transport Kar (3 a 4); Na<sup>+</sup> dependentní
- 4) V důsledku klesajícího Na<sup>+</sup> gradientu se na vnitřní membráně snižuje afinita Kar k OCTN2 a váže se TEA (5-6) a je odstraněn z buňky bez pomoci Na<sup>+</sup> - *trans*-stimulační efekt.

### 2.3.4 Nedostatek L-karnitinu

Při nedostatku Kar dochází k výrazným metabolickým změnám v buňce. V cytosolu se hromadí mastné kyseliny, které nejsou odbourávány, což s dalšími toxickými produkty vede až k nekróze buňky. Dochází k poruše jaterních funkcí, vzniká hypoketonémie, hyperamonémie, hypoglykémie kvůli zvýšené spotřebě glukózy jako alternativního zdroje energie. V důsledku toho může dojít až k encefalopatii (Reye-like syndrom), která zvyšuje vnímavost ke stresu a vede k přemrštěné hormonální reakci na podráždění. V mozku se snižuje tvorba acetylcholinu.

Rozeznáváme tři typy deficitu karnitinu:

1. Asymptomatický deficit Kar
2. Primární deficit Kar, který je podmíněn geneticky a dělí se na systémový a myopatický. Systémový typ je charakterizován defektem v biosyntéze Kar. Myopatický typ je charakterizován akumulací lipidů v kosterním svalstvu.
3. Sekundární deficit Kar se dále dělí na:
  - a) deficit Kar u geneticky podmíněných defektů metabolismu aminokyselin
  - b) choroby jiných orgánů, které vyvolají deficit Kar, např. choroby ledvin, chronická hemodialýza, jaterní cirhóza nebo AIDS
  - c) Nutriční deficitní stavy: hladovění, skorbut, cystická fibróza, atd.
  - d) Iatrogenní příčiny, např. při podávání valproátu při léčbě epilepsie

Při nedostatečném přísunu lyzinu a vitamínu C v potravě dochází k endogennímu poklesu tvorby Kar. (Steidl a Zbránková, 2000, Scholte et al. 1990, Ferrari et al. 1992)



## 2.3.5 Účinky L-karnitinu

Kar můžeme v medicíně použít v různých oborech:

### 2.3.5.1 Kardiologie

Srdeční a kosterní sval je převážně závislý na dodávce energie získávané z lipidů, ze kterých se hradí 60-80 % celkové energie, potřebné pro práci svalové buňky. Proto je Kar deponován v tak vysokých koncentracích převážně v cytosolu myocytů. Srdce spaluje v klidu především mastné kyseliny, při těžkém pracovním zatížení se zvyšuje spotřeba glukózy, která je získávána ze zásob glykogenu.

Potlačení oxidace, vyvolané ischemizací buňky, má v myokardu nedozírné následky. Zastavuje se aerobní metabolismus, který nahrazován anaerobním získáváním energie. Dochází k intracelulární acidóze s poklesem pH, umožňující vtok Ca do buňky. Ca z cytosolu není odstraňováno, zhoršuje se relaxace svalu. Mastné kyseliny se hromadí ve svalových mitochondriích. Je inhibován účinek volného Kar. Klesá množství ATP a aktivita kreatinfosfokinázy. Kontraktilní funkce srdce nemůže být udržována, je z glykolýzy a z oxidace glukózy. Edém mitochondrií vyvolává v konečné fázi nekrózu buněk.

Tyto procesy lze ovlivnit podáváním Kar. Ten redukuje dlouhé řetězce mastných kyselin a odstraňuje tak jejich toxické metabolity, které se kumulují v cytosolu a v mitochondriích. Kar tak umožňuje ve formě acyl a acetyl-Kar zpracování těchto látek v mitochondriích, zde jsou začleněny a spáleny v Krebsově cyklu. Část acylKar přechází z cytosolu do vnějšího extracelulárního prostředí, ze kterého jsou vylučovány jako acyl a acetyl skupiny močí. Acyl skupiny obsahují dlouhé řetězce mastných kyselin, acetyl skupiny obsahují aktivní kyselinu octovou. Kar je tedy u ischemické choroby srdeční s následnými projevy srdeční slabosti lékem, který může ovlivnit další osud nemocných.

Vzniká-li v srdci větší množství laktátu, např. při zatížení, je jeho přítomnost výrazným inhibitorem oxidace tuků. Za podmínek srdeční ischemie se podstatně mění metabolismus kardimyocytů. Zásobení srdce, včetně

mastných kyselin a kyslíku, je sníženo. Zvyšuje se podíl acyl-Kar v sarkolemě, což vede k poruchám nejen elektrických vlastností membrány, ale také ke změně její permeability.

Ischémie má za následek neschopnost glykolýzy a tím snížení hladiny ATP, vyžadované pro udržení normální kontrakční funkce. Koncentrace mastných kyselin se zvyšuje, vede k ventrikulárním arytmiím a mnohonásobně se zvyšuje acyl-Kar. Zvýšený obsah acyl-CoA a acyl-Kar v mitochondriích je patologickou odpovědí na ischémii, během které je beta-oxidace zpomalena a zároveň potlačena.

V této souvislosti se uvádí paradoxní účinek mastných kyselin. Fyziologicky daná koncentrace mastných kyselin je nutná ke správné funkci srdce, zatímco zvýšené hodnoty mastných kyselin jsou škodlivé. Podávání Kar se jeví jako možnost ochrany ischemického srdce.

Není sice prokázáno, že acyl-Kar zhoršuje kontraktální funkci, nicméně existuje riziko arytmogenního působení.

Při reoxygenaci ischemického myokardu může dojít k dalšímu, a to již ireverzibilnímu poškození myocytů, zvýšením cytosolové koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů s následným snížením ATP a těžkou dysfunkcí sarkolemy, vedoucí k tzv. kyslíkovému paradoxu: obnovení oxidativní fosforylace při obnoveném zásobení  $O_2$  a patologicky zvýšené hladině Ca vyvolává nekontrolovatelnou kontrakci s následným poškozením cytoskeletonu, potrháním kardiomyocytů a následným fatálním influxem Ca. To vede k ireverzibilnímu strukturálnímu poškození ve větším rozsahu než původní ischemické ložisko.

Výsledky antiischemického významu Kar v experimentu jsou nejednotné díky odlišným metodikám. Ischémie vede vždy ke ztrátě intracelulárního Kar jak u experimentálních zvířat, tak u lidí. Ukázalo se, že propionylKar má kardioprotektivní účinek, protože zabraňuje tvorbě hydroxylových radikálů.

V klinických studiích se podáním Kar zvýšila tolerance na zátěž, snížil počet ventrikulárních extrasystol již po dvou dnech léčby, omezil se rozsah infarktu myokardu, snížil pulz, stupeň edému a dušnosti.

Antiischemické působení Kar bylo potvrzeno četnými studiemi. Nejlepších klinických výsledků bylo dosaženo tehdy, byl-li Kar podáván před ischemickou příhodou, kdy už došlo k zvýšení intracelulárního Kar.

V akutní fázi infarktu myokardu je Kar vyplavován ze svalů a zvýšeně vylučován močí. V pozdější fázi podávání Kar zvyšuje toleranci na zátěž, snižuje výskyt arytmií a snižuje hyperlipidémii.

Kar oddaluje a snižuje pravděpodobnost srdečního selhávání. Také je popisováno snížení frekvence záchvatů bolestí u anginy pectoris, kde jde s velkou pravděpodobností o následek zlepšeného svalového metabolismu.

Kardiomyopatie po kardiotoxických cytostaticích, u chronické srdeční městnavé slabosti, u hereditární hypertrofické kardiomyopatie se zlepšily klinicky i echokardiograficky díky kardioprotektivnímu účinku Kar. (Steidl a Zbránková, 2000, Voet 1995, Suzuki et al. 1979, Kobayashi 1992, McMillin 1995, Piper et al. 1995, Paulson et. al 1995, Kobayashi 1992)

**Tabulka 4: Přehled účinků karnitinu na kardiovaskulární aparát**

Mechanismus účinku	Výsledný klinický efekt
1. zvýšení beta-oxidace tuků a hladiny ATP	1. ochrana ischemického myokardu
2. pokles sérových a tkáňových triacylglycerolů, pokles hladiny volných mastných kyselin, zvýšení HDL cholesterolu v plazmě	2. antiarytmický účinek, pokles četnosti fibrilací
3. zvýšené odstraňování krátkých acylových řetězců z mitochondrií	3. zmenšení srdeční velikosti, zmenšení rozsahu nekrózy při infarktu myokardu
4. zlepšení funkce membrány kardiomyocytů, sarkoplazmatického retikula a mitochondrií	4. zvýšení tělesné výkonnosti, redukce paroxysmů u anginy pectoris, snížení spotřeby nitroglycerinu
	5. metabolické zlepšení svalů

#### 2.3.5.2 Angiologie

Pozitivní efekty u periferních cévních lézí byly připisovány vazodilatačnímu účinku Kar, který však nebyl potvrzen všemi studiemi. Jde o metabolické zlepšení v zásobování svalů. Vazodilatační efekt je slabý a

nevysvětluje klinické zlepšení, spočívající v prodloužení chůze, v hojení trofických změn i ve snížení počtu hrožících amputací. V experimentu byl prokázán příznivý vliv na arteriosklerotické pláty při léčbě propionylKar. Účinná je však jen dlouhodobá několikaměsíční léčba. (Steidl a Zbránková, 2000, Spagnoli et al. 1995, Brevetti et al. 1988)

#### 2.3.5.3 Hematologie

Kar příznivě ovlivňuje anémii rezistentní na přívod železa, pokud byl zjištěn deficit Kar. Jde pravděpodobně o ovlivnění erytrocytární membrány, která je při deficitu Kar fragilnější. Kar také pozitivně ovlivňuje imunitní systém aktivací fagocytární aktivity granulocytů, T-lymfocytů, méně pak i B-lymfocytů a NK-buněk, a to právě přes mechanismus ovlivnění buněčných membrán. (Steidl a Zbránková, 2000, Matsumura et al. 1996)

#### 2.3.5.4 Hepatologie

Kar příznivě ovlivňuje funkci jater zvláště u nemocných s cirhózou a při parenterální výživě. (Rudman et al. 1977)

#### 2.3.5.5 Diabetologie

Kar příznivě ovlivňuje činnost diabetického srdce, trpícího ischemií, což bylo opakovaně experimentálně demonstrováno. Přesný mechanismus tohoto účinku není znám. Snad je to zvýšení stimulace při oxidaci myokardiální glukózy a vysoká produkce myokardiálního ATP. V experimentu se také ukazuje příznivý efekt Kar na vodivost periferního nervu u diabetické neuropatie. Možný vztah Kar k tvorbě a funkci myelinu není dosud objasněn. Ne zcela jasná je také otázka vztahu Kar u experimentálního diabetu k oční kataraktě. (Steidl a Zbránková, 2000, Ferrari et al. 1992)

#### 2.3.5.6 Obezitologie

Kar může u obézních přispět hlavně tím, že ovlivňuje lipidový profil v krvi i v jiných tkáních. Kar redukuje akumulaci krevních a tkáňových lipidů za

normálních i patologických podmínek, např. při kardiovaskulárních chorobách, při chronickém etylismu, při dietním deficitu Kar, při hyperkalorických infuzích.

Vysoký obsah tuku v dietě snižuje plazmatické hladiny Kar a zvyšuje jeho močovou exkreci, a to jak u lidí, tak i u zvířat. Ženy s viscerální obezitou hůře využívají volné mastné kyseliny ve svalové tkáni. Mají také vyšší obsah Kar v játrech ( v případě steatotických změn) a ve svalech, jejichž Kar pool je zvýšen, dochází k tomu zpravidla při současně zvýšené rezistenci na inzulin.

Kar je doporučován některými výrobci jako antiobézní prostředek. Někteří dokonce doporučují aplikaci karnitinového gelu na místa s nechtěným tukovým polštářem, např. na stehnech. (Steidl a Zbránková, 2000, Pepine 1990, Colberg et al. 1995)

#### 2.3.5.7 Nefrologie

Dialýza je hluboký zásah do metabolických dějů v organismu. Malá molekula Kar je snadno odfiltrována ledvinami. Dialýza vede k deficitu Kar s průvodními projevy hlavně kardiálního a svalového deficitu. U dialyzovaných je proto na místě substituční terapie Kar. (Steidl a Zbránková, 2000, Ferrari et al 1992)

#### 2.3.5.8 Mužská fertilita

Experimentálně bylo prokázáno, že Kar podporuje pohyblivost spermií, čehož lze využít u mužské infertility vyvolané nepohyblivostí spermií. (Deana et al. 1989)

#### 2.3.5.9 Neurologie

##### - Centrální nervový systém

Význam Kar pro činnost mozku podporuje zjištění, že v CNS dochází k jeho finální syntéze. Zvláště v případě acetyl-Kar se uvažuje o jeho vlivu na demenci, hypoxickou encefalopatii i další poruchy. Snad se podílí i na cholinergním přenosu. Zvláště významné je jeho protektivní působení u hepatocerebrálního Reye-like syndrom u dětí, vyvolaného např. dlouhodobým

užíváním solí kyseliny valproové při léčbě epilepsie. Deficit Kar může obecně u dětí vyvolat příznaky poškození mozku s psychickými i tělesnými příznaky. (Steidl a Zbránková, 2000, Ferrari et al. 1992, Murakami et al. 1996, Ishicura et al. 1996)

#### - Periferní nervový systém

O samotném vlivu Kar na periferní NS je velmi málo známo. Pro jeho afinitu k tukové tkáni by mohl Kar příznivě ovlivňovat tvorbu myelinové pochvy vzhledem k histopatologickým nálezům u nemocných s deficitem Kar. Některé klinické studie navíc ukazují na pozitivní efekt podávání Kar u neuropatií různé etiologie. (Steidl a Zbránková, 2000, Arduini et al. 1996, Degrandis 1998)

#### 2.3.5.10 Myologie (kosterní sval)

Nedostatek Kar vede ke karnitinové myopatii, která se z hlediska symptomů neliší od myopatií jiného typu. Může být vzácně primární, častěji však sekundární při stavech Kar deficiencie. Postihuje zejména pletencové svaly dolních a horních končetin, bývá spojena často s hypoglykemií a poruchami srdečního rytmu. Je možné, že Kar může posílit funkci svalu postiženého neurogenní afekcí. Může se osvědčit i u chronického únavového syndromu, u nadměrné svalové únavy, u bolestí svalu po velké námaze. Také u ischemické choroby srdeční může být vedle srdečního svalu postiženo kosterní svalstvo. Exogenní přívod Kar může tak přispět k rekondici těchto nemocných. (Steidl a Zbránková, 2000, Ferrari et al. 1992, Scholte et al. 1990)

#### 2.3.5.11 Sportovní lékařství

Sportovní lékařství je vedle kardiologie nejčastější oblastí, kde je Kar podáván. Užití Kar u sportovců má mnohá úskalí, protože nabízíme lék zdravým osobám. Je třeba posuzovat krátkodobé používání Kar, které má samo o sobě pouze malý význam pro výkonnost svalu. Kar je sice vstřebán, takže se zvýší jeho sérové hladiny, ale do vlastního svalu se v efektivním množství nedostane. Teprve dlouhodobé, tzn. alespoň 4 – 6-týdenní podávání,

vede ke zvýšení hladin Kar ve svalu a může tak zvýšit svalový metabolismus. Kar má také příznivý vliv na ponámahovou svalovou bolest. (Steidl a Zbránková, 2000, Platen et al. 1993, Vukovich et al. 1994)

### 2.3.5.12 Perinatologie

Kar je důležitou součástí výživy u novorozenců, zvláště pak u předčasně narozených. Není jisté, zda si novorozenec dovede vytvořit endogenní Kar. V průběhu těhotenství je jeho přívod zajištěn mateřským mlékem a vytváří se tak i jeho určitá zásoba. Má také příznivý význam při prevenci intrauterinní růstové retardace. U syndromu respirační insuficience podávání Kar významně snižuje terapeutické dávky kortikoidů. Jeho význam je také uváděn ve vztahu k náhlé smrti u kojenců. Sérový Kar je snížen u status epilepticus. (Steidl a Zbránková, 2000, Zamora et al. 1995, Bernardini 1991, Kurz et al. 1993)

**Tabulka 5: Přehled účinků karnitinu, které jsou jisté, možné a diskutabilní pro nedostatek literárních údajů**

<b>Jisté účinky Kar:</b>	<b>Možný vliv Kar na:</b>	<b>Diskutabilní vliv Kar pro nedostatek údajů:</b>
dodává energii pro srdce a svaly	vliv na oční čočku	antiobézní působení, vliv na podkožní tuk, lokální transdermální působení
přijímán potravou, částečně se tvoří v těle	příznivý vliv na rehabilitační léčbu nemocných	působení na systémová svalová hereditární onemocnění
ovlivňuje metabolismus tuků	vliv na hereditární myopatie, myozitidy, neurogení atrofie, na atrofie ex inactivitate	interakce s jinými léky, které by mohly ovlivnit jeho účinky
jeho nedostatek není vzácný a je vyvolán řadou onemocnění	vliv na periferní nervový systém	nejsou zcela jasné všechny enzymatické mechanismy účinku Kar v buňce
ovlivňuje činnost srdce a kosterního svalstva, zvláště za ischémie		nejasný význam Kar při dlouhodobém užívání u zdravých
vliv na vytrvalostní sportovní aktivity		ne zcela upřesněné mechanismy účinku cytoprotektivního léku trimetazidinu *
ovlivňuje činnost mozku		

ovlivňuje pohyblivost spermií		
ovlivňuje příznivě výživu novorozenců, zvláště předčasně narozených a při respirační insuficienci		
potlačuje komplikace spojené s užíváním kyseliny valproové		
zanedbatelné vedlejší účinky		

\* Účinek cytoprotektivního léku trimetazidinu při ischemii srdečního svalu, snižujícího edém mitochondrií. Někteří vysvětlují jeho účinek inhibiční funkcí na beta-oxidaci tuků, čímž se snižuje množství toxických metabolitů acylskupin, jiní vidí problém ischemického poškození myocytů hlavně v toxickém přetížení buňky ionty Ca a metabolismus mastných kyselin nepovažují za primární poruchu. I přesto tento lék působí velmi příznivě na ischemickou poruchu myokardu.

### 2.3.6 Čtyři paradoxní účinky karnitinu

- Kyslíkový paradox: v postischemické fázi reoxygenace dochází k závažnému poškození membrán, zvl. sarkolemy, což ohrožuje životaschopnost buňky, přestože buňka je již zásobována kyslíkem
- Lipidový paradox: mastné kyseliny jsou převážně zdrojem energie, přesto jejich přemíra je škodlivá
- Terapeutický paradox trimetazidinu: snížení beta-oxidace je vyvoláno deficitem Kar s řadou následných nepříznivých příznaků. Trimetazidin (cytoprotektivní antiischemikum) vyvolává blokádu beta-oxidace s pozitivním klinickým působením. Snížení až zástava beta-oxidace je hlavním příznakem deficitu Kar, což nepochybně navozuje patologický stav.
- Expoziční paradox: přestože Kar je v séru zvýšen, nedochází k jeho přechodu do svalové buňky bezprostředně, je třeba určité expozice nebo latentního období, kdy přejde z extracelulárního prostoru krve do intracelulárního prostoru myocytu a uplatní se vlastní efekt.



### **2.3.7 Hlavní faktory podmiňující účinnost Kar**

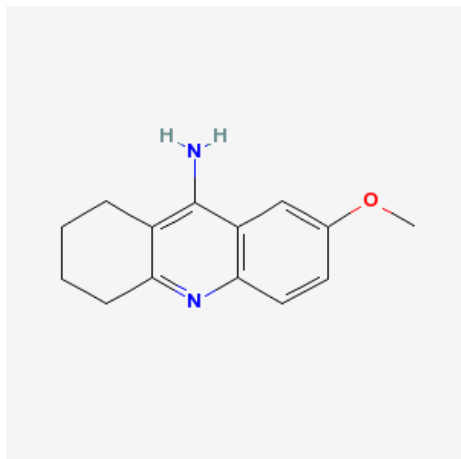
- délka doby podávání
- denní dávka
- typ fyzického zatížení
- metodika vyhodnocování

(Steidl a Zbránková, 2000)

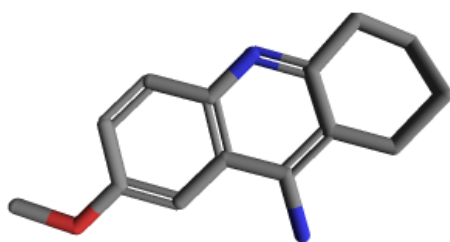
## 2.4 Stručný přehled účinků 7-methoxytacrinu

Molekulová hmotnost: 228.29 g/mol

Vzorec: C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O



Obrázek 10: Chemický vzorec 7-methoxytacrinu (podle <http://images.google.com>)



Obrázek 11: Chemický vzorec 7-methoxytacrinu (<http://images.google.com>)

Synonymní názvy:

1,2,3,4-Tetrahydro-7-methoxy-9-acridinamine

9-Amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine

9-Acridinamine, 1,2,3,4-tetrahydro-7-methoxy- (9CI)

7-MEOTA

(<http://www.nextbio.com/b/home/home.nb?q=7-methoxytacrine>)

### 2.4.1 Stručný přehled farmakologie tacrinu a 7-methoxytacrinu (MEOTA)

Tacrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) byl pod názvem Cognex<sup>®</sup> zaveden v USA a později i v některých zemích Evropské unie do terapie senilní demence Alzheimerova typu (SDAT). Představoval vlastně první léčivo SDAT s objektivně prokazatelným klinickým efektem navzdory tomu, že následné klinické studie zcela nepotvrdily původní nadějně výsledky klinického testování dosažené Summersem a spol.(1989). Případná úspěšnost či naopak nezdar léčby tacrinem je do značné míry podmíněna nezbytností individuální titrace k dosažení dostatečně vysoké dávky, kterou je však schopna tolerovat jen část léčených. Tacrin je nekompetitivním (alosterickým) a reverzibilním inhibitorem AChE a BChE. Vedle obecné anticholinesterázové aktivity vykazuje ještě řadu dalších farmakodynamických účinků, zejména přímý účinek na muskarinové a nikotinové receptory. Při opakovaném podání tacrinu dochází k „up“ regulaci nikotinových receptorů a naopak k „down“ regulaci muskarinových receptorů. Blokáda K<sup>+</sup>-kanálů synaptické membrány vede k prodloužení depolarizace, protože Na<sup>+</sup>-kanály zůstávají otevřené. Ve vyšších dávkách inhibuje tacrin monoaminoxidázu a to více isoformu A než B, obecně je tudíž bližší efektu moclobemidu než selegilinu, v určitém rozsahu je rovněž blokován reuptake monoaminů do presynaptického elementu. Nevýhodou tacrinu je nízká a navíc vysoce variabilní biologická dostupnost, v průměru dosahující necelých 20%, způsobená vysokou preliminární eliminací. U žen jsou však uváděny až dvojnásobně vyšší plazmatické koncentrace ve srovnání s muži. Tacrin je biotransformován převážně isoenzymem P450 1A2. Mezi jeho typické nežádoucí účinky patří nauzea, zvýšené pocení, průjem, případně i zvracení. Nejzávažnější komplikací dlouhodobé léčby tacrinem pak představuje hepatotoxicita, častá zejména u žen. Z tohoto důvodu byly hledány jeho méně toxické deriváty, poměrně nejznámější z nich je aktivní metabolit velnacrin (hydroxyderivát tacrinu), dále suronacrin, SM-10888 a amiridin. Žádný z uvedených inhibitorů cholinesterázy však nebyl zaveden do běžné klinické praxe. (Patočka, 1998, Patočka a kol., 2004, Pidrman a Bouček, 2002)

Na pracovišti v Hradci Králové byl syntetizován MEOTA, v současnosti povolený v České republice ke krátkodobému podání jako antidotum intoxikace anticholinergními látkami. Ve srovnání s tacrinem se MEOTA vyznačuje

především delším biologickým poločasem, nižší incidencí nežádoucích účinků, nízkou toxicitou, včetně hepatotoxicity. Pro srovnání i.m. LD<sub>50</sub> u laboratorního potkana se v případě tacrinu pohybuje okolo 34 mg/kg, u velnacrinu 200 mg/kg, u MEOTA 260 mg/kg. Absence hepatotoxicity může souviset s podstatně nižší periferní anticholinesterázovou aktivitou MEOTA ve srovnání s mateřskou látkou. Podání tacrinu v dávce odpovídající 1 x LD<sub>50</sub> vede u laboratorního potkana ke snížení aktivity AChE v krvi a játrech přibližně o 50%, zatímco u MEOTA pouze o 11%, je tedy asi 5 x nižší. Na úrovni mozku je tato diference méně výrazná, např. ve frontální kůře dochází po tacrinu opět ke snížení aktivity AChE o 50%, po MEOTA o 35%. U lidí bylo zjištěno 35% snížení aktivity plazmatické BChE po třech měsících léčby tacrinem v denní dávce 80 mg. (Patočka a spol., 1997, Patočka a kol., 2004)

Zatímco tacrin inhibuje G<sub>1</sub> a G<sub>4</sub> formy AChE přibližně ve stejném rozsahu, MEOTA inhibuje převážně „presynaptickou“ G<sub>4</sub> formu. Jak hydroxylované metabolity tacrinu, tak MEOTA jsou schopny vytvářet rozpustné komplexy s hliníkem a usnadňovat tak jeho odstraňování z organismu. Nadměrné ukládání hliníku v mozku lidí trpících SDAT je známo již delší dobu. Protektivní efekt MEOTA u pentamethylentetrazolem navozené křečové aktivity, která je pokládána za experimentální model myoklonické epilepsie, naznačuje existenci necholinergní složky nebo farmakodynamického účinku. Pentamethylentetrazol blokuje GABA<sub>A</sub> receptorový komplex a zvyšuje hladinu cytosolového Ca<sup>2+</sup>. MEOTA také potlačoval abnormální EEG aktivitu indukovanou u laboratorního potkana intracerebrálním podáním atropinu. Na druhé straně MEOTA zesiloval účinek 3-chinuklidinyl benzilátu na následné výboje vyvolané elektrickou stimulací a také indukoval u pavíánů neepileptický myoklonus, tato indukce byla blokována fyzostigminem. (Bajgar a spol., 1995, Herink a spol., 1996, Rektor a spol., 1991)

V I. fázi klinického zkoušení byla prokázána dobrá snášenlivost MEOTA, v otevřené studii pak jeho léčebný efekt u tardivních dyskinéz. (Hanuš a spol., 1991)

## 3 Praktická část

### UŽITÍ ELLMANOVY METODY PRO STANOVENÍ AKTIVIT CHOLINESTERAS

#### 3.1 Úvod

Inhibice enzymu acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasy (BChE, EC 3.1.1.8) je v současnosti považována za hlavní mechanismus toxického účinku organofosfátových a karbamátových inhibitorů. Inhibice těchto enzymů má za následek změny v mnoha důležitých tělesných funkcích. Znalost aktuálního stavu aktivity cholinesteras v organismu je klíčová pro včasnou diagnózu intoxikace organofosforovými inhibitory (OFI) a také pro sledování účinnosti podané terapie, hlavně pak reaktivátorů AChE (podrobněji viz. kapitola 5 - inhibice enzymu)

Nejčastěji je pro toto stanovení využívána erytrocytární AChE, protože metody jejího stanovení jsou propracované a navíc míra její inhibice velmi dobře koresponduje se závažností otravy. (Bajgar et al., 2007)

Existuje mnoho metodik jež byly pro stanovení aktivity cholinesteras vyvinuty, mezi nejčastěji používané jsou řazeny metody elektrometrické, titrační, kolorimetrické, měření změny pH s využitím indikátorů, spektrofotometrické, fluorimetrické, radiometrické, polarografické a enzymové. Výše uvedené metody však nemohou být zavedeny do rutinní praxe z různých důvodů, zvláště pak náročné úpravy vzorku, dlouhé doby měření nebo nedostatečné specifity enzymu k použitému substrátu.

Velmi citlivá a pro běžné využití vhodná metoda byla popsána Ellmanem (Ellman, 1961). Tato kolorimetrická metoda se dnes běžně využívá při hodnocení zdravotního stavu lidí, kteří přichází do styku s organofosforovými inhibitory (pracovníci v průmyslu, toxikologických laboratořích a zemědělství).

Princip této metody je založen na hydrolýze thiocholinu (acetylthiocholinu pro AChE, butyrylthiocholinu pro BChE). Po enzymové hydrolýze, je uvolněna příslušná kyselina a thiocholin. Thiocholin, obsahující ve své molekule SH-skupinu, je detekován pomocí 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DNTB) tím, že po reakci s thiocholinem dochází k uvolnění 5-merkaptu-2-

nitrobenzoátového anionu (TNB<sup>-</sup>). Tento anion je pak detekován spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. Tato metoda je v dobré korelaci s ostatními výše uvedenými postupy.

Ačkoliv je Ellmanova metoda rychlá, jednoduchá a levná, má také své nevýhody. Velmi zásadní při měření aktivit cholinesteras v krvi je interference s hemoglobinem. Absorpční maximum barevného indikátoru TNB<sup>-</sup> (5-merkapt-2-nitrobenzoátového aniontu) je 412 nm. Při této vlnové délce však absorbuje záření také v krvi přítomný hemoglobin. Pokud chceme vyloučit takto vzniklou chybu je potřeba krevní vzorek hodně ředit. Dalším problémem je pak reakce Ellmanova činidla (DNTB) s pomalu reagujícími sulfhydrylovými skupinami v roztoku, jež mohou ovlivnit výsledky měření.

Tyto nedostatky vedly k mnoha modifikacím původní Ellmanovy metody. Ve snaze o snížení interference s hemoglobinem byly na některých světových pracovištích použity k měření odlišné vlnové délky, dvoupaprskové spektrofotometry nebo jiné chromogenní bisulfidy, např. 4,4'-dithiopyridin. Jinou možností jak zlepšit stanovení AChE v krvi je použití selektivních inhibitorů BChE jako jsou quinidin ((2-ethenyl-4-azabicyklo(2,2,2)oct-5-yl)-(6-methoxyquinolin-4-yl)-methanol nebo fenothiazinové deriváty.

Další možností je sledování změny aktivity BChE, které se používá v běžné medicíně a klinické toxikologii. Tato možnost určení intoxikace OFI pomocí BChE je používána v praxi při automatickém stanovování aktivity cholinesteras v klinické chemii. Stále se však objevují námitky, zda změna aktivity BChE přesně odráží změnu aktivity synaptické AChE.

## **3.2 Experimentální část**

### Chemikálie

### Roztoky pro biochemické stanovení

0,1M Tris pufr – zásobní roztok pro přípravu Tris pufru byl připraven rozpuštěním 24,2 g 1,1,1-tris-(dihydroxymethyl)-aminometanu v 1000 ml destilované vody, z toho roztoku bylo odebráno 250 ml a doplněno na objem 950ml destilovanou vodou, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 pomocí kyseliny chlorovodíkové (HCl) a doplněna destilovaná voda na konečný objem 1000 ml.

Zásobní roztok Tritonu X-100 byl připraven tak, že k 1000 g destilované vody bylo přidáno 0,12 g Tritonu X-100.

0,02M Tris pufr – k 100 ml 0,1M Tris pufru bylo přidáno 370 ml zásobního roztoku Tritonu X-100, v tomto objemu bylo ustáleno pH na 7,6 přidáním příslušného množství zásobního roztoku pro přípravu Tris pufru, poté byl doplněn zásobní roztok Tritonu X-100 na konečný objem 500 ml. Tímto postupem byl získán 0,02M Tris pufr, který je zároveň přibližně 0,01% roztokem Tritonu X-100.

Zásobní roztok DNTB byl připraven tak, že 0,1 g DNTB bylo rozpuštěno za stálého míchání v 100 ml 0,1M Tris pufru o pH 7,6. Tento roztok lze ke stanovení používat jen 3 dny, pokud je uchováván v lednici při teplotě +4 °C a je chráněn před světlem. V době potřeby je připravena směs zásobního roztoku DNTB a 0,1M Tris pufru v poměru 135 : 40 (DNTB : Tris pufr). Takto připravený roztok může být používán pouze v den přípravy, během stanovení jej chráníme před slunečními paprsky (jejich vlivem dochází ke štěpení DNTB a vzniku barevného TNB<sup>-</sup>, což zanáší chybu do následného spektrofotometrického stanovení).

### Substráty

Pro stanovení aktivity AChE je používán specifický substrát, acetylthiocholin jodid (ATCh). Zásobní roztok ATCh je připraven rozpuštěním 0,029 g ATCh v 10 ml destilované vody. Takto připravený zásobní roztok je uchováván v dávkách 1 ml při teplotě -12 °C. V době potřeby je obsah jedné

mikrozkumavky roztaven a zásobní roztok je zředěn v poměru 1:10 (roztok ATCh : destilovaná voda).

Pro stanovení aktivity BChE je jako substrát používán butyrylthiocholin jodid (BTCh). Zásobní roztok tohoto substrátu je připraven rozpuštěním 0,032 g BTCh v 10 ml destilované vody. Zásobní roztok je skladován v dávkách po 1 ml při teplotě -12 °C. V době potřeby je připraven roztok zředěním v poměru 1:10 (roztok BTCh : destilovaná voda).

### Kalibrační roztok

Biochemické stanovení aktivit cholinesteras je kalibrováno pomocí cystein chloridu. Zásobní roztok cysteinu je připraven rozpuštěním přesného množství této látky (0,03152 g ) v 200 ml destilované vody. Zásobní roztok je rozdělen na dávky 1 ml do mikrozkumavek a je skladován při teplotě -12 °C až do doby, kdy je použit ke kalibraci.

### Zvířata

Samci potkanů kmene Wistar o váze 180 – 200 g (BioTest, Konarovice, Česká republika). Zvířata byla udržována v klimatizované místnosti (stálá teplota  $22 \pm 2$  °C, vlhkost  $50 \pm 10\%$ , světelný cyklus 12 hod světlo/tma), krmena byla standardní peletovou dietou a vodou *ad libitum*. Experiment byl pod dohledem společné etické komise lékařské fakulty UK a Fakulty vojenského zdravotnictví, Hradec Králové.



### **3.3 Vlastní pokus**

#### **3.3.1 Cíl práce**

L-karnitin (KAR) usnadňuje transport některých látek přes buněčnou membránu. Cílem praktické části bylo zjistit, zda je KAR schopen zvýšit průnik nepřímého parasymptomimetika 7-methoxytakrinu (MEOTA) přes hematoencefalickou bariéru. Ukazatelem případného ovlivnění bylo sledování změn aktivity acetylcholinesterázy (AChE) ve vybraných částech mozku laboratorního potkana po systémovém podání obou testovaných látek.

#### **3.3.2 Pracovní hypotéza**

MEOTA je reverzibilním inhibitorem AChE nejen v periferních orgánech, ale i v centrálním nervovém systému (CNS). Pokud tedy KAR při současném podání s MEOTA zvýší průnik MEOTA k cílovým místům účinku v CNS, musí dojít i k výraznější inhibici AChE.

#### **3.3.3 Uspořádání vlastního pokusu**

K pokusům bylo použito celkem 36 samců laboratorního potkana Wistar albino konvenčního chovu, hmotnostního rozpětí 220 - 240 g. Zvířata byla krmena standardní Larsenovou dietou, s přísunem vody ad libitum. Zvířata byla rozdělena do 4 kontrolních a 2 pokusných skupin vždy po 6 v každé skupině.

- Skupině K1 byl podán KAR a to celkem ve třech dávkách 250 mg/kg p.o. vzájemně oddělených intervalem 24 hod
- Skupině K2 byl podán pouze MEOTA v jednorázové dávce 100 mg/kg i.m.
- Skupině P1 byl opět podán KAR a to ve třech po sobě následujících dávkách 250 mg/kg p.o. v intervalu 24 hodin, 30 minut po třetí dávce následovalo i.m. podání MEOTA v dávce 100 mg/kg i.m.

- Skupině K3 byl podán KAR ve třech dávkách 250 mg/kg i.p. v intervalu 24 hod
- Skupině K4 byl podán pouze MEOTA 100 mg/kg jednorázově
- Skupině P2 byl podán KAR ve třech po sobě následujících dávkách 250 mg/kg i.p. v intervalu 24 hodin, 30 minut po třetí dávce následovalo i.m. podání 100mg/kg MEOTA

Z řezů příslušných vzorků tkáně laboratorního potkana (frontální kůra, hipokampus, septum a bazální ganglia) se připravil homogenát v poměru 1 mg mozkové tkáně na 1 ml destilované vody. Do kyvety se k 1 ml homogenátu přidávalo 0,4 ml DNTB a 0,4 ml ml TRIS pufru. Vlastní reakce byla zahájena přidáním 0,2 ml acetylthiocholinu. Fotometruje se při 412 mikrometrech a registruje se změna absorbance. Z těchto hodnot se pak odečítá odpovídající množství SH skupin v reakční směsi.

### **3.3.4 Stanovení enzymové aktivity cholinesteras**

Část nesrážlivé plné krve byla v den odběru odstředěna za stálé teploty 15 °C a při 3000 otáčkách/min po dobu 10 min. Plasma byla odebrána do mikrozkmavek a uchována při teplotě -80 °C (při této teplotě je zaručeno zachování stálé aktivity enzymů po dobu několika měsíců) až do dne, kdy byla ve vzorcích stanovována aktivita BChE. Před stanovováním BChE v plasmě je vhodné ustálit aktivitu enzymu přes noc při teplotě +4 °C (lednice) a 2 hodiny při teplotě laboratorní.

Do kyvety byl pipetován roztok DNTB v 0,1M Tris-pufu o pH 7,6 (1,7 ml), pak byla přidána hemolyzovaná krev (0,1 ml) / plasma (0,1 ml) a reakce byla odstartována přidáním substrátu specifického pro AChE, ATCh (0,2 ml) v plné krvi nebo při stanovení BChE v plasmě BTCh (0,2 ml). Aktivita enzymu byla měřena při laboratorní teplotě.

Pro stanovení aktivity AChE byla využita standardní spektrofotometrická metoda dle Ellmana, byla modifikována vlnová délka na 436 nm, tak aby nedocházelo k výrazným interferencím s hemoglobinem. Pro stanovení absorbance byl použit Spektrofotometr Hélios Sloha (Elektron Corporation, Oxford, Velká Británie). Výsledky byly hodnoceny v jednotkách  $\mu\text{kat/ml}$ .

### Kalibrace

Před vlastní kalibrací je připravena cysteinová kalibrační řada. Základní roztok cysteinu je ředěn vždy v poměru 1 : 1 (koncentrovanější roztok cysteinu : destilovaná voda). Takto vznikne řada o čtyřech různých koncentracích, přičemž základní roztok je  $0,2 \mu\text{M}$ .

Kalibrační řada:

$$0,2 \mu\text{M} \rightarrow 0,1 \mu\text{M} \rightarrow 0,05 \mu\text{M} \rightarrow 0,025\mu\text{M}$$

Pro kalibraci se do kyvety místo hemolyzátu krve nebo plasmy pipetuje stejný objem ( $0,1 \text{ ml}$ ) roztoku cysteinu z připravené kalibrační řady. Přidá se roztok DNTB ( $1,7 \text{ ml}$ ) v pufru a reakce se odstartuje přidáním  $0,2 \text{ ml}$  příslušného substrátu (ATCh, BTCh). Absorbance vzorku se měří při  $436 \text{ nm}$ . Kalibrace se měří proti slepému vzorku, v něm je hemolyzát nebo plasma (cystein) nahrazena destilovanou vodou.

### Statistické hodnocení

Počet zvířat ve skupině byl 6. Aktivity enzymu v krevním hemolyzátu byly vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka, pro zjištění statisticky významné změny mezi jednotlivými skupinami byl použit *t-test*.

### 3.4 Výsledky a diskuse

Tabulka 6: Naměřené hodnoty aktivit AChE (bližší popis této a následujících tabulek je uveden v textu)

Skupina	Frontální kůra	Hipokampus	Septum	Bazální ganglia
K 1	425±25	222±20	766±30	1484±45
K2	270±20*	190±15	580±30*	1346±35*
P1	184±15**	174±15*	360±25**	642±35**

\* signifikantní proti K1 na 5% hladině významnosti

\*\* signifikantní proti K2 na 5% hladině významnosti

Tabulka 7: Naměřené hodnoty aktivit AChE

Skupina	Frontální kůra	Hipokampus	Septum	Bazální ganglia
K3	421±25	220±20	746±30	1480±40
K4	270±20*	168±15*	586±30*	1346±35*
P2	143±15**	153±15*	298±25**	625±35**

\* signifikantní proti K3 na 5% hladině významnosti

\*\* signifikantní proti K4 na 5% hladině významnosti

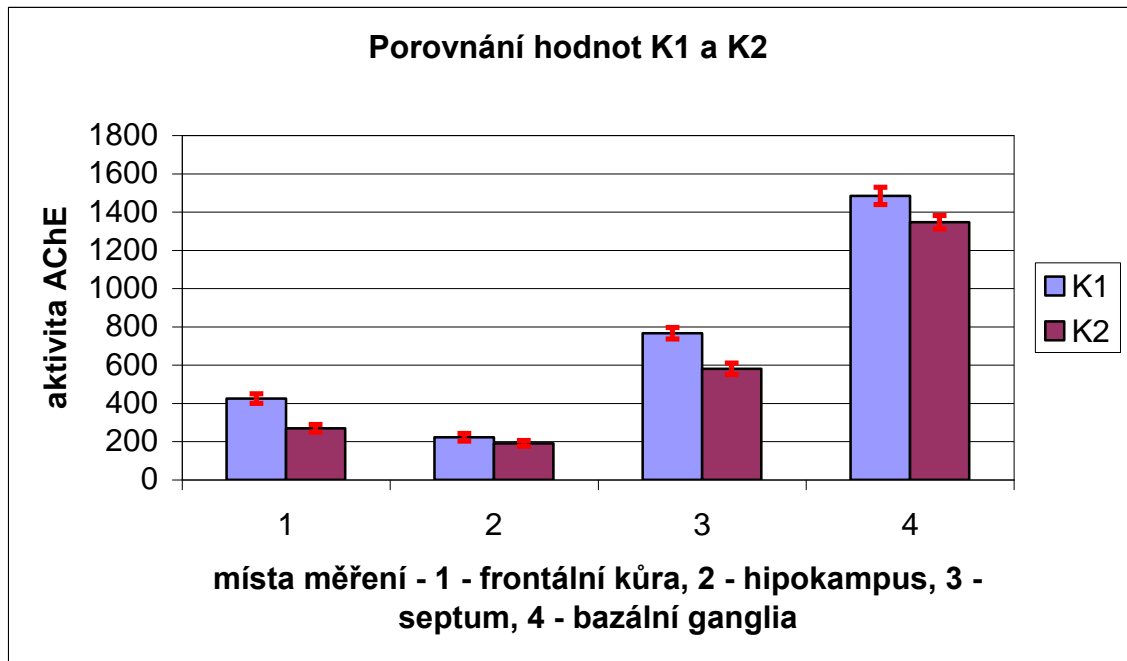
V tab. 6 jsou vzájemně srovnány aktivity AChE naměřené ve vybraných strukturách mozku laboratorního potkana a to po samotném Kar po opakovaném perorálním podání (K 1), po MEOTA (K2) a po kombinaci Kar + MEOTA. Po podání MEOTA došlo ve srovnání se samotným Kar ke statisticky významně vyšší inhibici aktivity AChE ve všech sledovaných strukturách s výjimkou hipokampu, zde K2 nevýznamné proti K1 (viz obr.12). Současné podání obou testovaných látek dále zesílilo inhibiční efekt MEOTA ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích (P1 významné proti K2), v hipokampu byl

efekt méně výrazný (P1 nevýznamné proti K2 ale významné proti K1, tab. 6, obr. 13 ).

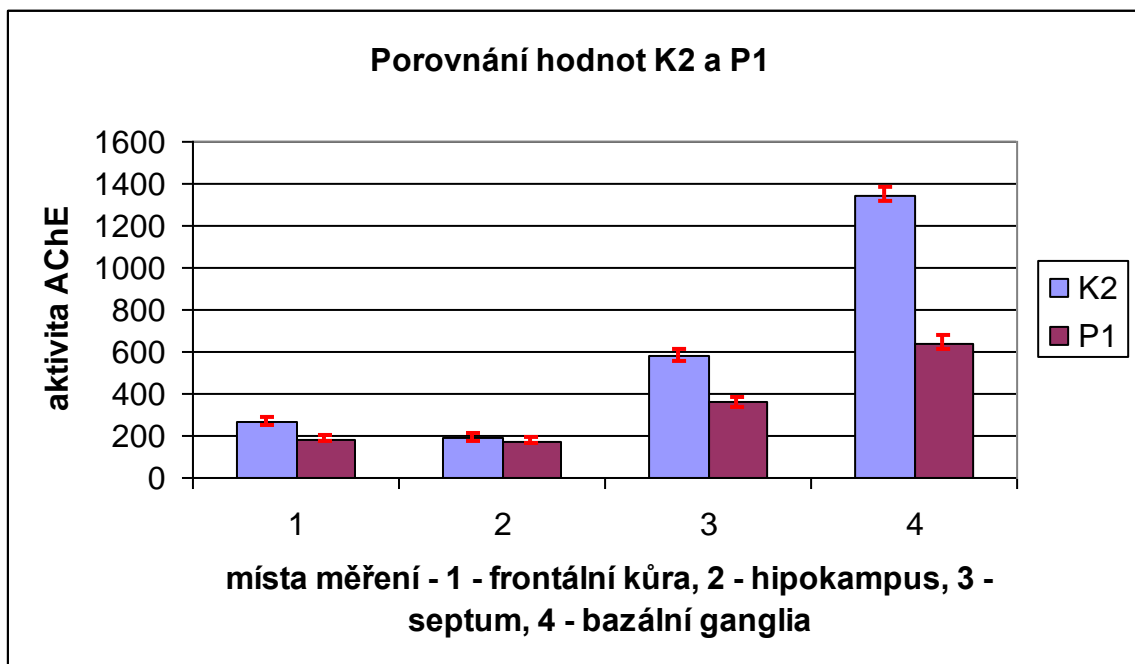
Tab. 7 srovnává naměřené aktivity AChE po intraperitoneálním podání samotného Kar (K3), po jednorázové i.m. injekci MEOTA (K4) a opět po současném podání obou testovaných látek (P2). MEOTA ve srovnání s Kar statisticky významně snižoval aktivitu AChE ve všech sledovaných strukturách (K4 významné proti K3). Kombinace testovaných látek vedla k dalšímu zesílení inhibice ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích (P2 statisticky signifikantní proti K4, obr.15).

Způsob podání samotného Kar neměl statisticky významný efekt na hodnoty aktivity AChE ve sledovaných strukturách (K1 nevýznamné proti K3). I.p. podání Kar však v porovnání s p.o. podáním Kar výrazněji zesílilo inhibiční efekt MEOTA ve frontální kůře a septu (obr.16).

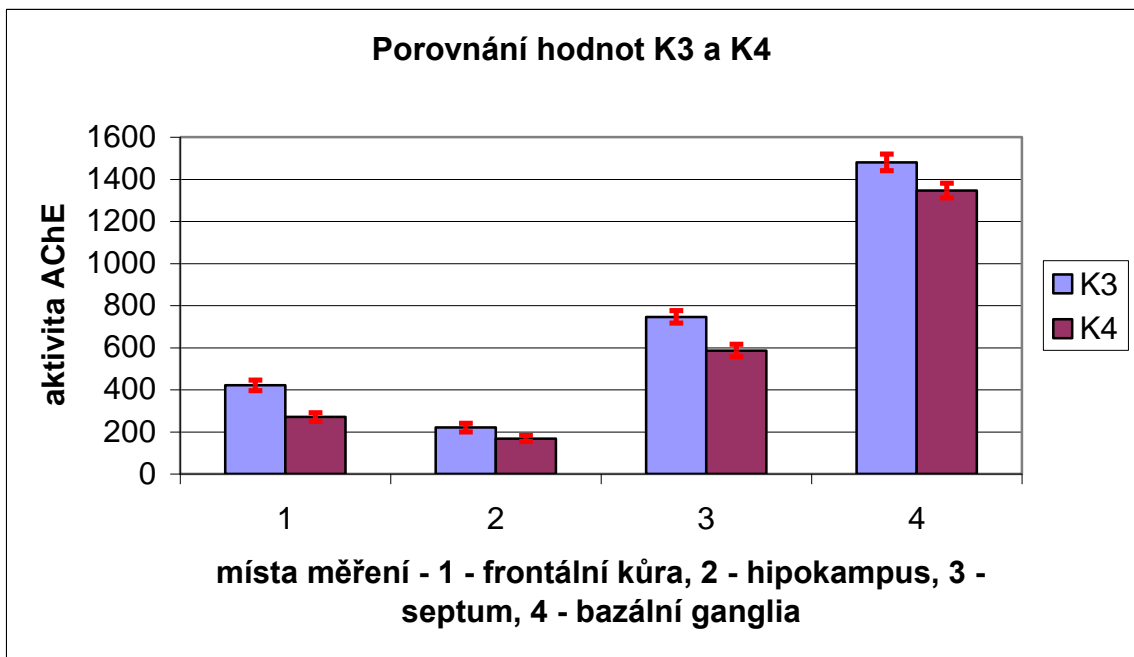
Grafické znázornění – porovnání jednotlivých hodnot



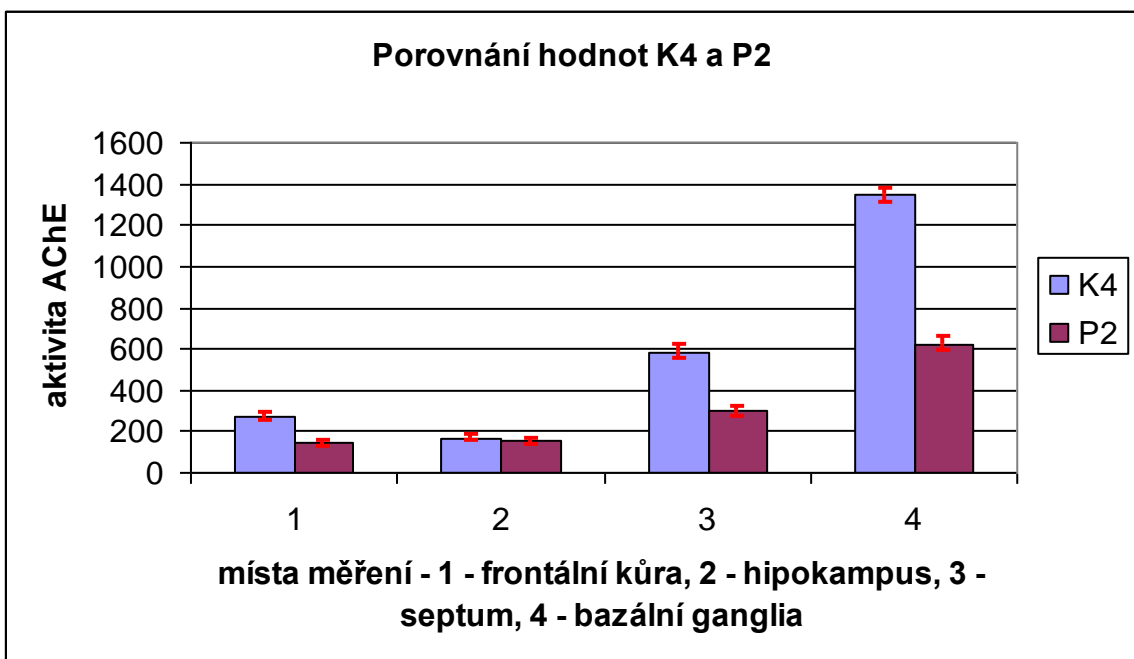
Obrázek 12: Porovnání hodnot K1 a K2



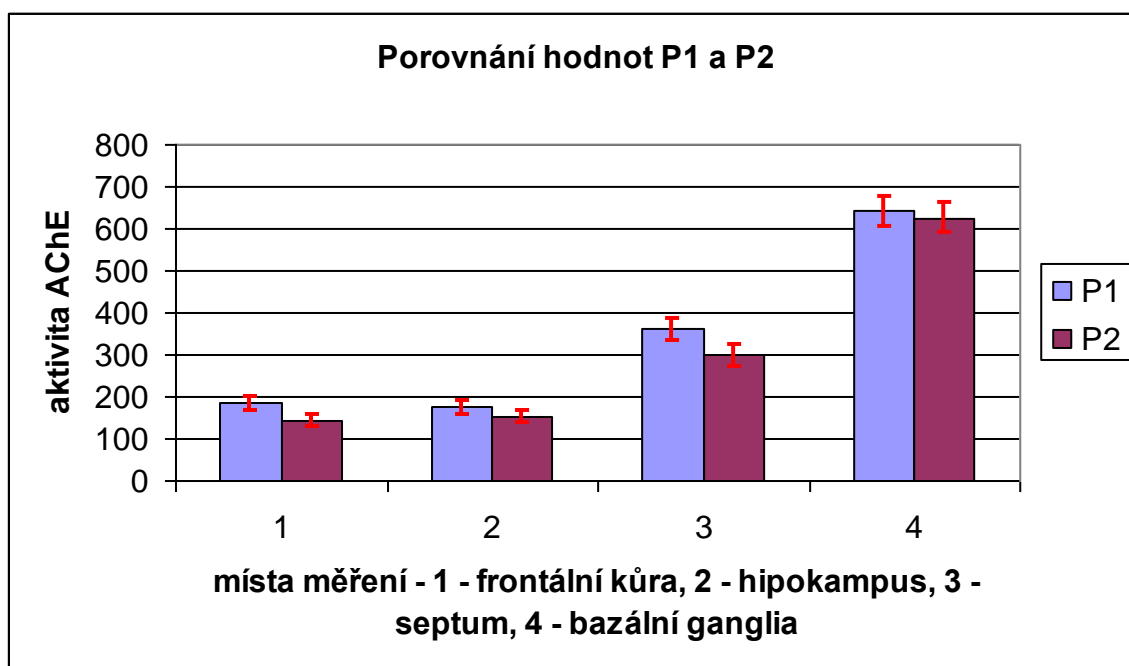
Obrázek 13: Porovnání hodnot K2 a P1



Obrázek 14: Porovnání hodnot K3 a K4



Obrázek 15: Porovnání hodnot K4 a P2



Obrázek 16: Porovnání hodnot P1 a P2

#### Diskuse:

Ke zjištění, zda je KAR schopen zvýšit průnik nepřímého parasympatomimetika MEOTA přes hematoencefalickou bariéru byly sledovány změny aktivity AChE ve čtyřech částech mozku, a to ve frontální kůře, hipokampu, septu a v bazálních gangliích. Tyto struktury byly vybrány proto, že buď přímo patří k centrálnímu cholinergnímu systému (septum) nebo jsou cholinergně inervovány skupinami (klastry) neuronů, které produkují acetylcholin.

Obecně nízké hodnoty aktivit AChE jsou ve frontální kůře a v hipokampu, nejvyšší hodnoty jsou v bazálních gangliích. V tomto směru byly potvrzeny výsledky jiných autorů (Bajgar et al., 1995; 2007).



Hodnoty aktivit AChE u pokusných skupin, kterým byl nejdříve podán Kar a následně MEOTA, byly vždy výrazně nižší než u skupin kontrolních, kterým byl podán buď samotný Kar nebo samotný MEOTA.

Výsledky měření ukazují, že v pokusné skupině P2, kde byl Kar podán i.p., došlo k výraznější inhibici aktivity AChE než ve skupině P1, kde byl Kar podán p.o.

Platí tedy, že Kar při současném podání s MEOTA zvyšuje průnik MEOTA do CNS a tím dochází k výraznější inhibici AChE.

Dosažené výsledky naznačují vhodnost klinického využití KAR jako doplňkového léčiva při podávání inhibitorů AChE.

## 4 Závěr

V této práci byly vzájemně srovnány aktivity AChE naměřené ve frontální kůře, hipokampu, septu a v bazálních gangliích laboratorního potkana a to po opakovaném perorálním podání samotného Kar, po MEOTA a po kombinaci Kar + MEOTA.

Dále byly srovnávány naměřené aktivity AChE po intraperitoneálním podání samotného Kar, po jednorázové i.m. injekci MEOTA a opět po současném podání obou testovaných látek.

Intramuskulární jednorázové podání MEOTA vedlo ve srovnání se samotným Kar k významně vyšší inhibici aktivity AChE ve všech sledovaných strukturách s výjimkou hipokampu. Současné podání Kar a MEOTA zesílilo inhibiční efekt MEOTA ve frontální kůře, septu a bazálních gangliích, v hipokampu byl efekt méně výrazný. Předchozí intraperitoneální podání KAR však v porovnání s jeho perorálním podáním výrazněji zesílilo inhibiční efekt MEOTA ve frontální kůře a septu.

Způsob podání samotného Kar neměl významný efekt na hodnoty aktivity AChE ve sledovaných strukturách. Samotný KAR jak po perorálním, tak po intraperitoneálním opakovaném podání statisticky významně neovlivňoval aktivitu AChE.

## Použitá literatura

- Arduini, A. et al.: Abnormality of nerve conduction in diabetic neuropathy. *Neurology* 46,1996, s. 851-853.
- Bajgar J. et al.: Changes of cholinesterase activities in the rat blood and brain after sarin intoxication pretreated with butyrylcholinesterase. *Toxicology*, 30 , 2007, s. 351-359.
- Bajgar J. et al. : Differential inhibition of rat brain acetylcholinesterase molecular forms by 7-methoxytacrine in vitro. *Toxicol. Lett.*, 80, 1995, s. 109-114.
- Bajgar J.: Organophosphates/nerve agent poisoning mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chemistry*, 38, 2004, s.151-216.
- Bajgar, J. et al.: *Mini Rev. Med. Chem.* 7, 2007, s. 172-183.
- Bernardini, I.: The fatal concentrating index as a gestational age dependent measure of placental dysfunction in uterine growth retardation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 114, 1991, s. 1481-1490.
- Bremmer, J.: The role of carnitine in intracellular metabolism. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 1990, s. 297-301.
- Brevetti, G. et al.: Increasing in walking distance in patients with peripheral vascular disease treated with carnitine: a double blind, cross-over study. *Circulation* 77, 1988, s. 767-773.
- Colberg, S.R. et al.: Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J. Clin. Invest.* 95, 1995, s. 1846-1853.
- Cunningham, V.J. et al.: Uptake of N-methyl-11-C-propionyl-L-carnitine in human myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1996, s. 511-517.
- Deana, R. et al.: Effects of carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport, mobility and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 41, 1989, s. 949-955.
- Degrandis, D.: Tolerability and efficacy of L-acetylcarnitine in patients with peripheral neuropathies a short term, open multicentre study. *Clin. Drug Investig.* 15, 1998, s. 73-79.
- Ferrari, R. et al.: L-carnitine and its role in medicine. Academia press. London 1992.

Fibiger H.C.: The organization and some projection of cholinergic neurons of the mammalian forebrain. *Brain Res. Rev.*, 4, 1982, s. 327-388.

Hanuš H. et al.: Treatment of tardive dyskinesia by single and repeated application of 7-methoxytacrin. *Homeostasis*, 33, 1991, s. 301.

Herink J. et al.: Protective effects of 7-methoxytacrine in experimental model of epileptic activity. *Homeostasis*, 37, 1996, s. 132-133.

Ishicura, H. et al.: Valproic acid overdose and L-carnitine therapy. *J. Anal. Toxicol.* 20, 1996, s. 56-58

Kobayashi, A.: L-carnitine treatment for congestive heart failure. *Jpn. Circ. J.* 56, 1992, 86-94

Kolář, F.: Carnitine and cardiac diseases. *Cor Vasa* 36, 1994, s. 190-198

Lincová, D.: Vegetativní nervový systém, Praha 2002

Matsumura, M. et al.: Correlation between serum carnitine levels and erythrocyte osmotic fragility in hemodialysis patients. *Nephron (CH)* 72, 1996, s. 574-578

McMillin, J.: Carnitine acylcarnitine translocase in ischemia, 1995, s. 69-82

Mesulam M.M., Geula Ch.: Nucleus basalis and cortical cholinergic innervation in the human brain: Observation based on the distribution of AChE and ChAT. *J. comp. Neurol.*, 275, 1988, s. 216-240.

Murakami, K. et al.: Effect of L-carnitine supplementation on acute valproate intoxication. *Epilepsia* 37, 1996, s. 687-689

Navrátil, L., Bajgar, J.: Prostaglandiny v klinické medicíně, Cholinesterázy a jejich klinický význam, 1989, s. 29-54

Patočka J. a kol.: Vojenská toxikologie, Grada, Praha 2004, s. 67-69.

Patočka J. et al.: Preclinical comparison of tacrine and 7-methoxytacrine. *Homeostasis*, 38, 1997, s. 24-25.

Patočka J.: Inhibitory acetylcholinesterasy - od nervových plynů k léčivům Alzheimerovy choroby. *Chem. Listy*, 92, 1998, s. 1016-1019.

Paulson, D.J. et al: Experimental evidence of the antiischemic effect of L-carnitine, In: DeJong, J.W., Ferrari, R. (eds.) 1995, s. 182-197

Pepine, C.: The therapeutic potential of carnitine in cardiovascular disorders. *Clin. Therapeutics* 13, 1990, s. 2-20.

Petrovický P. a kol.: Klinická neuroanatomie CNS. Triton, Praha, 2008, s. 592-596

Pidrman V., Bouček J.: Dlouhodobá léčba demence. *Psychiat. pro praxi*, 4, 2002, s. 168-170.

Piper, H.M. et al.: Mitochondrial injury in the ischemic reoxygenated cardiomyocytes: the role of lipids and other pathogenetic factors, In: DeJong, J.W., Ferrari, R. 1995, s. 101-121

Platen, P. et al.: Wirksamkeit einer L-carnitine substitution auf die Leistungsfähigkeit sowie auf verschiedene metabolische und hormonelle Parameter bei Triathleten, Hamburg, 1993, s. 101-114.

Regitz, V. et al.: Protection of the ischemic myocardium by propionyl carnitine taurine amid. *Z. Kardiol.* 76, 1987, s. 53-58.

Rudman, D. et al.: Deficiency of cachectic and cirrhotic patients. *J. Clin. Investig.* 60, 1977, s.716-723.

Scholte, H.R. et al.: Primary carnitine deficiency, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 1990, s. 351-357.

Smith T.D., Gallagher M., Leslie F.M.: Cholinergic binding sites in the rat brain. Analysis by age and cognitive status. *Neurobiol. Aging*, 16, 1995, s. 161-173.

Spagnoli, L.G. et al.: Propionyl-L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in aged hyperlipemic rabbits. *Atherosclerosis* 114, 1995, s. 29-44.

Steidl, L., Zbránková, B.: Význam karnitinu a jeho použití v medicíně, 2000, s. 9-105

Stone T.W.: CNS neurotransmitters and modulators. Acetylcholine. CRC Press, New York, 1994, s. 1-29.

Subramanian, R. et al.: Free radical mediated damage during myocardial ischemia and reperfusion and protection by carnitine esters. *Z. Kardiol.* 76,1987, s. 41-45.

Summers W.K. et al. : Tacrine in the treatment of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, 29, 1989, s. 28-32.

Suzuki, Y. et al.: Protective effect of carnitine on ischemic heart. Academic Press, New York, 1979

Tomita, M., Sendju, Y.: Ueber die Oxyaminverbindungen welche die Biuretreaktion zeigen. *Z. psychol.Chem.* 196,1927, s.263-267

Voet, D.: Biochemie. Victoria-Publishing, Praha, 1995

Vukovich, M.D. et al.: Carnitine supplementation : effect on muscle carnitine and glycogen content during exercise. Med. Sci. Sports Exerc. 26, 1994, s. 1122-1129.

Zamora, S. et al.: Renal handling of carnitine in ill preterm and term neonates. J. Pediatr., 127, 1995, s. 975-978.

[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm) (28.3.2009)

[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm) (28.3.2009)

[http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/KVACD.htm](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/KVACD.htm) (28.3.2009)

<http://farm.lf1.cuni.cz/img/vnsparaobr1.jpg> (2.4.2009)

<http://images.google.com> (15.4.2009)

<http://molpharm.aspetjournals.org/content/vol59/issue2/images/large/mo0210692007.jpeg> (2.4.2009)

[http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002\\_v1/equations/karnitin.01.gif](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/equations/karnitin.01.gif)  
(15.4.2009)

<http://www.brenda-enzymes.info> (28.3.2009)

<http://www.expasy.org/cgi-bin/search-biochem-index> (28.3.2009)

[http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni\\_rec.jpg](http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni_rec.jpg) (20.3.2009)

<http://www.nextbio.com/b/home/home.nb?q=7-methoxytacrine> (15.4.2009)

[http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32\\_obr2.jpg](http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_obr2.jpg) (15.4.2009)

[http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32\\_obr2.jpg](http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_obr2.jpg) (15.4.2009)

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení cholinotropních látek.....	- 11 -
Tabulka 2: Receptory pro acetylcholin, mechanismus působení cholinotropních látek.....	- 13 -
Tabulka 3: Obecné vlastnosti cholinesteráz .....	- 17 -
Tabulka 4: Přehled účinků karnitinu na kardiovaskulární aparát.....	- 35 -
Tabulka 5: Přehled účinků karnitinu, které jsou jisté, možné a diskutabilní pro nedostatek literárních údajů .....	- 39 -
Tabulka 6: Naměřené hodnoty aktivit AChE (bližší popis této a následujících tabulek je uveden v textu) .....	- 52 -
Tabulka 7: Naměřené hodnoty aktivit AChE.....	- 52 -

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Cholinergní systém (podle Smith et al., 1995).....	- 10 -
Obrázek 2: pochody cholinergní transmise, podrobnější popis viz text (podle <a href="http://farm.lf1.cuni.cz/img/vnsparaobr1.jpg">http://farm.lf1.cuni.cz/img/vnsparaobr1.jpg</a> ).....	- 12 -
Obrázek 3: Nikotinový cholinergní receptor (podle <a href="http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni_rec.jpg">http://www.lfhk.cuni.cz/rezacovam/receptory/Cholinergni_rec.jpg</a> ) .....	- 14 -
Obrázek 4: Molekula AChE (podle <a href="http://images.google.com">http://images.google.com</a> ).....	- 16 -
Obrázek 5: Molekula BChE (podle <a href="http://images.google.com">http://images.google.com</a> ).....	- 16 -
Obrázek 6: Cholinergní přenos nervového vzruchu (podle <a href="http://images.google.com">http://images.google.com</a> ) .....	- 18 -
Obrázek 7: Schématický průřez ionotropním nikotinovým receptorem (podle <a href="http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_obr2.jpg">http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/psych103/obr/32_obr2.jpg</a> ).....	- 19 -
Obrázek 8: Chemický vzorec karnitinu (podle <a href="http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/equations/karnitin.01.gif">http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/equations/karnitin.01.gif</a> ) - 29 -	- 29 -
Obrázek 9: Transport Kar do buňky (podle <a href="http://molpharm.aspetjournals.org/content/vol59/issue2/images/large/mo0210692007.jpeg">http://molpharm.aspetjournals.org/content/vol59/issue2/images/large/mo0210692007.jpeg</a> ) .....	- 31 -
Obrázek 10: Chemický vzorec 7-methoxytacrinu (podle <a href="http://images.google.com">http://images.google.com</a> ) .....	- 42 -
Obrázek 11: Chemický vzorec 7-methoxytacrinu ( <a href="http://images.google.com">http://images.google.com</a> )....	- 42 -
Obrázek 12: Porovnání hodnot K1 a K2.....	- 54 -
Obrázek 13: Porovnání hodnot K2 a P1 .....	- 54 -
Obrázek 14: Porovnání hodnot K3 a K4.....	- 55 -
Obrázek 15: Porovnání hodnot K4 a P2 .....	- 55 -
Obrázek 16: Porovnání hodnot P1 a P2.....	- 56 -