

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

**MECHANISMY TRANSPORTU LÁTEK HEMATOENCEFALICKOU
BARIÉROU A JEJICH OVLIVNĚNÍ L-KARNITINEM**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové, 2008

Radim Havelek

Děkuji školiteli Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za podnětné připomínky a všestrannou pomoc při vzniku této práce.

Dále děkuji por. Mgr. Janě Karasové z Katedry toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za cenné rady při práci v laboratoři.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, pod odborným vedením pana Doc. MUDr. Josefa Herinka, DrSc. a pouze s použitím literatury citované v textu a uvedené v seznamu literatury.

V Hradci Králové dne 12.5.2008

podpis:

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HEB	hematoencefalická bariéra
CNS	centrální nervový systém
P-gp	P-glycoprotein
MCT1	proton/monocarboxylate co-transporter
ACEI	inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu
AMT	adsorpci zprostředkovaná transcytóza
RMT	receptorem zprostředkovaná transcytóza
MCT1	monokarboxylátový ko-transportér
NBMPR	nitrobenzylthioinosin
OCTN	organic cation/carnitine transportér
MEOTA	7-methoxytakrin
Tfr	transferrinový receptor
MRP	protein svázaný s multi-látkovou rezistencí
BCRP	breast cancer resistance protein
MK	mastné kyseliny
CoA	koenzym A
EEG	elektroencefalograf
CRT	L-karnitin
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
AChE	acetylcholinesteráza
IACHe	inhibitor acetylcholinesterázy
BuChE	butyrylcholinesteráza
TMABA	4-trimethylaminobutyraldehyd
OAT	organic ion transportér

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hematoencefalická bariéra a transport látek

2.1.1 Hematoencefalická bariéra (HEB)

2.1.2 Mechanismy transportu látek přes hematoencefalickou bariéru

2.1.2.1 Transport limitovaný molekulovou hmotností vs. P-gp efluxní transport.

2.1.2.2 Transport látek přes HEB pomocí specifických přenašečů

2.1.2.2.1 Hexosový transportní systém

2.1.2.2.2 Transportní systém pro aminokyseliny

2.1.2.2.3 Transportní systémy pro monokarboxylové kyseliny

2.1.2.2.4 Transportní systémy pro aminy

2.1.2.2.5 Transportní systémy pro nukleosidy

2.1.2.2.6 Ostatní transportní systémy zodpovědné za přenos látek HEB

2.1.2.2.7 Přenos peptidů přes HEB

2.1.2.2.7.1 Příjem peptidů přes HEB za pomoci přenašečových systémů

2.1.2.2.7.2 Přenos peptidů přes HEB pomocí adsorpcí zprostředkované transcytózy

2.1.2.2.7.3 Přenos peptidů přes HEB pomocí receptorově zprostředkované transcytózy

2.1.2.2.8 Systém zajišťující eflux léčiv

2.2 Možnosti ovlivnění transportních mechanismů hematoencefalickou bariérou.

2.3 L-karnitin

2.3.1 Historie

2.3.2 Chemická charakteristika

2.3.3 Biologický význam karnitinu

2.3.4 Metabolismus karnitinu

2.3.4.1 Exogenní příjem karnitinu

2.3.4.2 Metabolismus exogenního karnitinu

2.3.4.3 Endogenní syntéza karnitinu

2.3.4.3.1 Distribuce enzymu biosyntézy karnitinu

2.3.4.4 Exkrece endogenního a exogenního karnitinu

2.3.5 Fyziologický význam karnitinu a acetyl-karnitinu v CNS

2.3.6 Transport L-karnitinu a acetyl-L-karnitinu přes HEB

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl práce

3.2 Uspořádání vlastního pokusu

3.3 Stanovení aktivity AChE

3.3.1 Princip Ellmanovy metody

3.3.2 Použitý materiál a chemikálie

3.3.3 Pracovní postup Ellmanovy metody

4. VÝSLEDKY

5. DISKUZE

5.1 Ellmanova metoda

5.2 Vliv současného podání L-karnitinu a MEOTA na aktivitu AChE

6. ZÁVĚR

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Hematoencefalická bariéra (HEB) je unikátní anatomický membránový systém, který odděluje prostor centrálního nervového systému (CNS) a systémového krevního řečiště, dovoluje průnik jen látkám určitého chemického charakteru, molekulové hmotnosti a fyziologického významu. Svým významem udržuje specifické prostředí pro fungování CNS, chrání jej před vlivem některých toxických látek a metabolitů pocházejících ze systémového řečiště. Na druhou stranu ale významně ovlivňuje průnik některých terapeutik do CNS. Z důvodu omezené palety látek schopných penetrovat přes HEB do CNS, je stále obtížné léčit některá onemocnění a infekce objevující se v oblasti CNS. Z tohoto důvodu je dnes HEB a transportní mechanismy přes HEB zájmem mnoha studií a experimentů.

L-karnitin je látka s širokou škálou fyziologických účinků. Mezi nejznámější patří usnadnění transportu aktivovaných mastných kyselin přes vnitřní mitochondriální membránu i zpětný transport toxických zbytků beta-oxidace. Krom toho karnitin zlepšuje metabolismus glukózy stimulací enzymových komplexů pyruvátdehydrogenázy a fruktokinázy. Jeho další funkcí je modulace koncentrace koenzymu A a odstraňování různých acylových zbytků z organismu. Posledně byly objeveny specifické transportní proteiny pro L-karnitin přítomné také v HEB.

Cílem diplomové práce bylo popsat z dostupné literatury poznatky o struktuře HEB, popsat informace o transportních mechanismech přes HEB a jejich ovlivnění. Dále shrnout současné vědomosti o úloze L-karnitinu ve fyziologických dějích. Cílem experimentální části bylo zjistit možnosti ovlivnění účinku 7-methoxytakrinu L-karnitinem. Jako ukazatel efektu bylo zvoleno stanovení aktivity acetylcholinesterázy (AChE) ve vybraných částech mozku laboratorního potkana.

2. TORETICKÁ ČÁST

2.1 Hematoencefalická bariéra a transport látek

2.1.1 Hematoencefalická bariéra

HEB tvoří unikátní systém, který těsně odděluje prostor mozku od tělního oběhu. CNS obsahuje krevní kapiláry, jejichž struktura je odlišná od kapilár v ostatních orgánech. Tato strukturální odlišnost vede k odlišné prostupnosti látek mezi kapilárami a extracelulární tekutinou tkáně mozku. Strukturálním podkladem HEB je systém céva – astrocyt – neuron. Kapiláry mozku a míchy obratlovců postrádají malé póry, které jinak umožňují rychlou výměnu látek mezi krevním oběhem a příslušnou tkání. Endotelie mozkových kapilár jsou těsně spojeny, pomocí tzv. zonulae occludentes nebo-li *tight junctions*. Součástí těsných spojů jsou výběžky astrocytárních buněk. V endotheliích nejsou vytvořeny fenestrace, ani se zde nevyskytuje rozsáhlejší „pinocytární základna“. Buňky, které vystylají mozkové komory a neurogliové buňky jsou v zásadě trojího typu.¹

Astrocyty jsou všude v CNS. Podle tvaru se rozlišují na *protoplasmatické astrocyty* a *vláknité astrocyty*. Výběžky astrocytů hvězdicovitě vyzařují na všechny strany z poměrně malého buněčného těla obsahujícího jádro. Výběžky se mohou dále větvit, až v periférii přecházejí v tenká plochá rozšíření, jež se přikládají ke skupinám axonů a k tělům a dendritům nervových buněk a lemují je, zatímco jiné výběžky obdobným způsobem obklápějí cévy. Sousední výběžky nebo výběžky sousedních astrocytů se při tom doplňují a zčásti překrývají. Mezi výběžky astrocytů dále mohou vznikat desmosomy a spojení typu nexus. Na kapilárách tak pokrývají asi 85% jejich zevní plochy. Na druhé straně jsou výběžky astrocytů přiloženy k tělům i výběžkům nervových buněk, pro které udržují homeostatickými mechanismy vhodné prostředí. Podílejí se např. na cirkulaci iontů K^+ .¹

Oligodendrocyty jsou buňky menší než astrocyty, s kulatým nebo polygonálním tělem, v němž je relativně velké jádro. Tělo těchto buněk vysílá menší počet výběžků,

větvičích se různými směry. Výběžky sousedících oligodendrocytů mají místní vzájemná spojení typu nexus. Oligodendrocyty se vyskytují jako satelitní buňky kolem těl neuronů a jsou s nimi v těsném kontaktu. Význam astrocytů a oligodendrocytů pro životní funkce a látkovou výměnu nervových buněk vyplývá i z omezení transportu látek stěnou kapilár z krve daného přítomností HEB.²

Přítomnost *tight junctions* mezi buňkami endotelu vede ke vzniku velmi vysokého trans-endotelového elektrického odporu v rozmezí 1500-2000 Ωcm^2 ve srovnání s 3-33 Ωcm^2 , který je přítomný u krevních kapilár ostatních orgánů. Tato vysoká hodnota brání para-celulární difuzi, která existuje v jiných orgánech. Cévy zásobující mozek mají poněkud menší průměr a tenčí stěnu, než cévy v ostatních orgánech. Také hustota mitochondrií v kapilárách mozku je vyšší, než v jiných orgánech. Výměna látek zde probíhá trans-celulárně a nebo pomocí specifických transportních mechanismů. Obecně jen látky lipofilní charakteru mohou projít difuzí membránami buněk endotelu kapilár tvořících HEB.¹

Některé regiony CNS nevytvářejí klasicky typ endotelových buněk běžný pro HEB. Kapiláry jsou zde podobné těm v periférii. Jedná se o tzv. *cirkumventrikulární orgány*. Cirkumventrikulární orgány jsou ohraničené, lehce vyvýšené okrsky na stěnách III. a IV. mozkové komory, s určitými zvláštnostmi stavby ependymu, přilehlých cév a přiléhající glie. S výjimkou subkomisurálního orgánu, který má výrazný sekreční charakter, se jedná především o místa, kde je výrazně pozměněna HEB a umožněna tak snadnější výměna různých látek, event. působků mezi krví a mozkomíšním mokem, mezibuněčnou tekutinou a nervovou tkání. Prostředníkem výměny látek jsou zde patrně zvlášť upravené ependymové *tancyty* s rozvětvenými, do nitra komory vyčnívajícími silnými výběžky. Tancyty jsou navzájem spojeny pomocí zonulae occludentes, a proto stěnou komor v místech, kde se tancyty vyskytují, nemůže pronikat mozkomíšní mok. V místech, kde není hematoencefalická bariéra, se výběžky tancytů stýkají s cévami. Cirkumventrikulární orgány zahrnují organum vasculosum laminae terminalis (tuberculum intercolumnare), organum subfornicale – subfornikální orgán, organum subcommissurale – subkomisurální orgán, recessus pinealis, recessus suprapinealis a recessus infundibuli, area postrema a neurohypofýzu.²

HEB má také dodatečný enzymatický aparát. Látky procházející buněčnou membránu jsou následně podrobeny působení degradačních enzymů, které jsou přítomny v buňkách endotelu ve velkém množství, stejně tak enzymy mohou být v mitochondriích představujících vysoce metabolicky aktivní buněčné organely.

Enzymy HEB detekují a rychle degradují většinu peptidů, včetně přirozeně se vyskytujících neuropeptidů. Dále je HEB posílena vysokou koncentrací P-glykoproteinu (P-gp), transportního proteinu pro aktivní eflux látek v luminální membráně endotelu mozkových kapilár. Tento efluxní transportní systém aktivně odstraňuje řadu látek, včetně léčiv, z cytoplasmy buněk endotelu, dříve než projdou do parenchymu mozku (podrobněji viz dále).¹

2.1.2 Mechanismy transportu látek přes hematoencefalickou bariéru

2.1.2.1 Transport limitovaný molekulovou hmotností vs. P-gp efluxní transport

Dlouho se věřilo, že rozhodujícím faktorem, který určuje transport léčiv do CNS přes HEB, je lipofilita a molekulární hmotnost dané látky. Pardridge (1995) zjistili, že lipofilita jako index transportu látek přes HEB, platí přibližně do molekulové hmotnosti 400-600 Da. Předpokládali existenci molekulárně hmotnostního prahu na základě toho, že v membráně fosfolipidové dvojvrstvy vznikají dočasné kanálky, popřípadě kličky, a to na podkladě rotace okolo vazby uhlík-uhlík. Maximální velikost takto vzniklých pórů je určující pro limity transportu závislého na molekulární hmotnosti látek. Podle této hypotézy, jestliže molekulární hmotnost léčiva přesáhne rozmezí 400-600 Da, tak i přes jeho lipofilitu nemůže být transportováno přes HEB ve farmakologicky významném množství.³

V rozporu s předchozí teorií nový koncept tvrdí, že nedostatečný průnik některých léčiv je zapříčiněn aktivním efluxem zprostředkovaným P-gp, k jehož expresi dochází na luminální membráně buněk endotelu kapilár mozku. Jasný *in vivo* důkaz o participaci P-gp na snížené penetraci některých léčiv přes HEB byl získán při objevení genu *mdr1a*, který ho kóduje. K experimentu byly použity gen *mdr1a*-knockout laboratorní myši. Měření hladin koncentrace léčiv u *mdr1* genu-knockout myši, byly zjištěny vyšší koncentrace digoxinu, doxorubicinu a cyklosporinu A v mozku, než u kontrolní skupiny myši, jejichž genom byl v pořádku. Výsledky tohoto pokusu indikují závěr, že P-gp je zodpovědný za aktivní eflux těchto tří - a patrně i řady dalších - léčiv z mozku.⁴

2.1.2.2 Transport látek přes HEB pomocí specifických přenašečů

V endotelových buňkách kapilár tvořících HEB existuje několik transportních systémů pro živiny a endogenní látky. Jsou zde přítomny hexosový transportní systém pro glukosu a manosu, transportní systém pro neutrální aminokyseliny fenylalanin, leucin, isoleucin a další neutrální aminokyseliny, transportní systém pro kyselé aminokyseliny jako je kys. asparagová, transportní systém pro bazické aminokyseliny lysin, arginin, histidin, transportní systém pro β -amino kyseliny, to je β -alanin a taurin, dále transportní systém pro monokarboxylové kyseliny, pro laktát a mastné kyseliny s krátkým řetězcem, např. acetát. Taky jsou zde přítomny transportní systémy pro cholin, jež přenáší cholin a thiamin, aminový transportní systém pro mepyramin, transportní systém pro nukleosidy, který přenáší purinové baze jako je adenin a guanin, ale ne pyrimidinové baze. Poslední z transportních systémů je peptidový transportní systém pro malé peptidy jako je např. vazopresin. Využití rozdílů v afinitě a maximální transportní aktivitě těchto transportních systémů HEB je zajímavou strategií jak kontrolovat prostup a zadržení léčiv v mozku.⁵

2.1.2.2.1 Hexosový transportní systém

Glukóza je esenciální pro funkci mozku a prochází HEB přes specifický transportér. Jelikož je kapacita glukózového transportéru v HEB významně vyšší (1420nmol/min/g tkáně), než u ostatních transportéru pro živiny, předpokládá se jeho využití i pro přenos jiných látek, včetně léčiv. Existují dva typy transportéru pro glukózu, Na^+ - závislý a Na^+ -nezávislý, které jsou rozděleny do rodiny SGLT a GLUT. V lumenální membráně buněk endotelu kapilár mozku, stejně jako v choroidálním plexu a v neuronální membráně je přítomen Na^+ nezávislý glukózový transportér, GLUT1, který přenáší z plazmy D-glukózu a manózu, ale ne L-glukózu. Zajímavostí je, že stupeň glykosylace GLUT1 se liší podle místa exprese, což vede k rozdílné molekulové hmotnosti 54, 47 a 42 kDa v kapilárách mozku, choroidálního plexu a v neuronálních buňkách. Použití chemoterapeutik k léčbě mozkových nádorů je limitováno jejich všeobecně nízkou penetrací přes HEB. Možností, jak zvýšit transport takto špatně procházejících látek HEB, je modifikovat tyto látky tak, aby byly transportovány do mozku hexosovým

transportérem GLUT1, protože mozkový typ transportéru GLUT1 má vysokou hodnotu maximálního transportního poměru V_{max} . Exprese GLUT1 je v rozsahu okolo $6 \cdot 10^6$ molekul na jednu buňku endotelu kapilár mozku. Exprese přenašeče GLUT1 je regulována hladinou glukózy v krvi a jeho úlohou je udržení konstantního přívodu glukózy do mozku navzdory její přirozeně kolísající hladině v krvi.^{6,18}

Glukózový transportér je potenciálně použitelný pro přenos membránově neprůchodných látek a některé studie zjistily, že cukerná analoga mohou přecházet bariéry právě za využití jeho transportní aktivity. Studie ukázaly, že některá L-serinyl- β -D-glukosidová analoga odvozená od Met⁵ enkephalinu byla přenášena přes HEB a navodila proto dlouhou a silnou analgesii po intraperitoneálním podání u laboratorních myší, zatímco neglykosylovaný peptid nevykázal takový efekt. Modifikace D-glukózy O-methylsulfonylem byla také zkoušena pro transport alkylačního cytostatika busulfanu do mozku. Mimoto byla také testována glykosylace opioidního peptidu dermorfinu. Zdá se být pravděpodobné, že GLUT1 transportér je zodpovědný za transport těchto glykopeptidových proléčiv do mozku a z výsledků vyplývá, že glykosylace může být slibná cesta, jak transportovat léčiva s aktivitou v CNS, ale nízkou schopností průniku přes HEB.⁵

Ačkoliv do současnosti nebylo s určitostí prokázáno, jestli Na^+ -závislý hexosový transportér SGLT je přítomen v buňkách HEB, nedávná studie např. svědčí o participaci SGLT v přenosu cykasinu přes HEB. Cykasin (methylazoxymethanol β -D-glukosid) byl zjištěn jako významný etiologický faktor Parkinsonovy nemoci. V uvedené studii byl sledován příjem cykasinu do *in vitro* kultivovaných endotelových buněk kapilár mozku skotu. Příjem se děje v množství závislém na dávce, s maximem při koncentraci $10 \mu\text{M}$. Jev byl pozorován při inhibici přenašeče SGLT pomocí α -methyl-D-glukosidu a dinitrofenolu (inhibitory energetického metabolismu) a záměně extracelulárního NaCl za LiCl.⁵

2.1.2.2.2 Transportní systém pro aminokyseliny

Transportéry pro aminokyseliny se běžně rozdělují na základě vlastností, které charakterizují jejich funkci a to podle závislosti na sodíkovém iontu a podle substrátové specifity. Na základě substrátové specifity pak mohou být zhruba rozděleny do tří typů a to v závislosti na náboji substrátu, jestli tedy jde o anionickou, kationickou, nebo neutrální aminokyselinu. Podle toho lze např. rozlišovat přenašeče pro velké neutrální

aminokyseliny (systém L), transportéry pro kationické aminokyseliny (systém y^+), přítomné v HEB jako na sodíkovém iontu nezávislé systémy. Mezi přenašečové systémy přítomné v HEB a závislé na sodíkovém iontu se řadí transportéry pro aniontové aminokyseliny, systém X^- , transportéry pro neutrální a nebo kationické aminokyseliny, Systémy A, B^{0+} a ASC a β -aminokyselinový systém.^{14,5}

Mezi transportní systémy živin přes HEB patří transportní systém L pro velké neutrální aminokyseliny, jako jsou fenylalanin, tyrosin a leucin. Ten má nejvyšší maximum poměru permeability, vyjádřený jako V_{max}/K_m (2,6), kde K_m vyjadřuje Michaelisovou konstantu. Na^+ -nezávislý systém L je symetricky přítomen na obou plochách membrány, tj. v lumenální a ablumenální membráně buněk endotelu kapilár mozku. Předpokládá se, že tento systém je důležitý pro transport léčiv, protože systém L má širokou substrátovou specifitu pro relativně velké molekuly. Dále se předpokládá, že transportní systém L transportuje centrálně působící léky, jako jsou L-dopa, gabapentin i některá další antiepileptika. Nedávno byl objeven gen pro jeden z podtříd transportéru systému L, byl klonován a pojmenován LAT-1. LAT-1 byl detekován v celém mozku pomocí metody Northern blot a proto může být přítomen i v endotelových buňkách kapilár mozku. Na druhou stranu Na^+ -závislý systém A, transportující malé a neutrální aminokyseliny, např. prolin, alanin, glycin, methionin a glutamin, je přítomen jenom na ablumenální straně. Systém ASC transportuje malé neutrální aminokyseliny, např. alanin, serin a cystein. Systém y^+ , zprostředkovává transport kationických aminokyselin, např. lysinu, argininu a ornitinu Na^+ -nezávislým mechanismem. CAT-1 a CAT-2 byly klonovány jako systém y^+ přenašeče. Ačkoliv oba jsou přítomny v mozku, jenom CAT-1 se zdá být i v HEB. Na^+ kotransportér, B^{0+} -systém zodpovědný za přenos analogu N-(methylamino)isomáselné kyseliny (MeAIB) a velkých neutrálních kyselin, je také zastoupen na ablumenální straně membrány. V HEB se dále nachází systém X^- , transportující anionické aminokyseliny, jako jsou asparagová a glutamová kyselina. Naopak transportní systém T, specifický pro transport aromatických aminokyselin, není přítomný v HEB.^{7,14}

Léčiva patřící mezi analoga aminokyselin (např. L-dopa, α -methyl-dopa, gabapentin atd.) mohou být využita jako centrálně aktivní látky. Předpokládá se, že jsou přenášeny pomocí transportních systému pro aminokyseliny. Transport gabapentinu, novějšího antikonvulziva, transportním systémem L ukázal, že je dvojsměrný. Experiment se prováděl na laboratorních potkanech. Propustnost HEB pro influx a eflux léčiva byla

0,042 a 0,36 ml/min. Experiment tedy ukázal, že gabapentin je efektivněji transportován z extracelulární tekutiny mozku do plazmy než naopak.^{5,14}

Některé aminokyseliny jsou prekurzory neurotransmiterů. Plazmatická koncentrace neutrálních aminokyselin po strávení potravy obsahující 40% proteinů u potkanů vzrostla o 1mM, což je více než desetinásobek normální hodnoty. Avšak změna koncentrace v mozku je zanedbatelná, protože hodnota K_m pro neutrální aminokyseliny je okolo 30 μM , což vede k rychlé saturaci přenašeče a proto jen k malé změně v transportu přes HEB. Po podání L-dopy společně se stravou bohatou na proteiny dokonce koncentrace L-dopy v mozku klesla díky jejímu kompetitivnímu vytěsnění z L systému způsobenému zvýšenou hladinou neutrálních aminokyselin v plazmě. Při orálním podání 100mg/kg fenylalaninu laboratornímu potkanu bylo zjištěno pozitronovou emisní tomografií přechodné (cca 60 min) zvýšení jeho plazmatické koncentrace v různých oblastech mozku, při současné redukci příjmu [¹¹C]aminocyklohexankarboxylátu, což je analog velké neutrální aminokyseliny. Jeho influx do celého mozku klesl po podání fenylalaninu z 0,036 na 0,019 ml/g/min. Tento experiment dokázal, že přenos aminokyselinových léčiv za využití transportního systému L s relativně nízkou hodnotou K_m může být – mimo další faktory – silně závislý na kompetitivní inhibici.⁸

Mezi transportní systémy pro aminokyseliny patří také β -alanin transportní systém HEB. Tento přenašečový systém s vysokou mírou vazebnosti byl objeven na základě studia kultury hovězích endotelových buněk mozkových kapilár. Příjem β -alaninu je závislý na sodíkových a chloridových iontech. Aminokyseliny β jako je β -alanin, taurin a hypotaurin silně inhibují příjem β -alaninu, zatímco α - a γ -aminokyseliny mají nízký nebo žádný inhibiční účinek. Tato zjištění potvrzují, že β -alanin je aktivně transportován za využití hnací síly řízené vnitřním gradientem Na^+ a Cl^- , vlastně se jedná o příklad sekundárně aktivního transportu. Taurin je transportován pomocí transportního systému pro β -alanin, který je přítomen jak na luminální, tak abluminální membráně endotelu buněk kapilár mozku, jde o Na^+ a Cl^- závislý transport. Dlouho se také věřilo, že pro neuromediátor L-glutamát existuje transportní systém jen na abluminální membráně buněk, tvořících kapiláry zásobující mozek a proto glutamát jen obtížně prochází HEB do extracelulární tekutiny mozku. Avšak poslední studie využívající perfuzi mozku *in situ* svědčí o tom, že glutamát je přijímán z luminální membrány v HEB přes Na^+ -nezávislý a saturabilní transportní systém. Transportní koeficient glutamátového transportního systému se pohyboval *in situ* v rozmezí od

0,74±0,07 µl/s na jeden gram v parietální kůře, 0,44±0,07 µl/s na jeden gram v hipokampu. Vlastní transport L-glutamátu byl snížen v přítomnosti L-aspartátu či L-homocysteinu, L-cystin tento transport nesnižoval. Samotný L-glutamát zvyšoval průnik D-melfalanu, který jinak přes HEB neprochází ⁹.

HEB dále obsahuje 6-(4-nitrobenzyl)thio-9-β-D-ribofuranosylpurin-senzitivní (*es*) transportní systém s nízkou afinitou, ale s vysokou kapacitou pro saturabilní transport pyrimidinových bází, např. thyminu. Tento *es*-systém může např. přenášet deoxycytidin a uridin. Příkladem nukleosidového analogu transportovaného HEB je tiazofurin (2-β-D-ribofuranosyl thiazole-4-carboxamid). Jednosměrný transport [³H]tiazofurinu, který byl změřen pomocí perfuze kapilár mozku prasete, byl významně snížen v přítomnosti neznačeného tiazofurinu, ale nebyl ovlivněn adenosinem nebo dipyridamolem. Tyto výsledky sice potvrzují, že transport tiazofurinu z krve do mozku se uskutečňuje pomocí transportního systému, ale jen částečně pomocí nukleosidového transportního systému. Uvedené poznatky mohou poskytnout základní informace, jak dodat pomocí přenašečových systémů přes HEB do mozku protirakovinné nukleosidové deriváty k léčbě maligních onemocnění mozku. ⁵

2.1.2.2.3 Transportní systémy pro monokarboxylové kyseliny

Transportní systém pro monokarboxylové kyseliny v HEB transportuje laktát, pyruvát, monokarboxylové kyseliny o krátkém řetězci jako acetát a ketolátky, β-hydroxybutyrát a acetoacetát, jejichž přítomnost je nezbytná pro metabolismus CNS. Důkaz o těchto transportérech prvně pochází ze studií používajících metodu s indexem BUI (brain uptake index), ukazující při sledování hladin kyseliny mléčné v mozku na význam stereospecifity a závislosti na pH. ⁵

Při experimentu, u kterého byl *in vivo* použit způsob podání látky do karotidy a následně *in vitro* metoda zkoumání průchodu látek buněčnou kulturou hovězích endoteliálních buněk kapilár mozku, byla zjištěna významná kompetitivní inhibice transportu [³H]acetátové kyseliny kyselinou salicylovou a valproovou, kdežto di- a trikarboxylové kyseliny a cholin nevykazovaly tyto inhibiční účinky. Uvedené výsledky naznačují, že kyselá léčiva obsahující monokarboxylovou skupinu prochází HEB pomocí vlastních přenašečů. U dalšího experimentu, při kterém byl měřen transcelulární transport a lumenální příjem farmakologicky aktivních inhibitorů 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA), jako jsou simvastatin (nejvíce lipofilní

derivát), lovastatin a pravastatin, pomocí značené lipofilní [¹⁴C]simvastatinové kyseliny, se ukázalo, že tyto látky jsou transportovány proton/monokarboxylovým ko-transportérem. Všechny tyto látky obsahují monokarboxylovou skupinu. Méně lipofilní pravastatin měl nižší afinitu k přenašečovému proteinu, což se projevilo inhibičním efektem na příjem [¹⁴C]simvastatinové kyseliny. Simvastatin, pro léčivo simvastatinové kyseliny, je znám svým vedlejším efektem způsobujícím spánek, zatím pravastatin toto zřejmě nezpůsobuje. Uvedená pozorování svědčí o tom, že se tato léčiva navzájem liší v schopnosti procházet HEB, ačkoliv obecně všechny přechází HEB přes pH-dependentní monokarboxylový transportér. Významný faktor v tomto směru představuje jejich lipofilita. Nejvíce hydrofilní derivát, pravastatin, byl nejméně schopný přecházet HEB a působit nežádoucí vedlejší účinky, ačkoliv prochází intesticiální epitheliální membránu pomocí specifického přenašeče pro monokarboxylové kyseliny. Tato absence vedlejšího účinku pravastatinu na CNS je připisována jeho velice nízké afinitě k přenašeči monokarboxylových kyselin. Proto strategie, jak se vyhnout případnému nežádoucímu účinku, může spočívat v redukci afinity léčiva k příslušnému transportéru v HEB.¹⁰

Proton/monokarboxylátový ko-transportér (MCT1) byl klonován ze střeva potkana. MCT1 cDNA je 3320 párů bází dlouhá a kóduje tento transportní protein skládající se z 494 aminokyselin o celkové molekulové hmotnosti 53 235. Pomocí metody Northern blot hybridizace byl MCT1 identifikován v HEB, ale i v jiných tkáních. Zároveň byl MCT1 nalezen na obou, tzn. jak luminální, tak abluminální straně membrány endotelových buněk kapilár mozku. Tyto výsledky ukazují, že funkcí MCT1 v HEB je zajišťovat dvoj-směrný transport mléčné kyseliny a ostatních monokarboxylových kyselin s molekulovou hmotností do 200Da. Dostatek protonových iontů, které poskytují hnací sílu pro fungování a případné zesílení transportu monokarboxylátu pomocí MCT1 z plazmy do extracelulárního prostoru mozku zajišťuje Na⁺/H⁺ pumpa existující na luminální membráně buněk kapilár mozku. Nadbytek MCT1 v kapilárách mozku narozených myší naznačuje významnou roli tohoto transportéru v přenosu energeticky bohatých látek do neonatálního mozku. Za normálních fyziologických podmínek u dospělých jedinců usnadňuje MCT1 eflux laktátu vznikajícího z glukózy v mozku do krve.⁵

Ačkoliv antikonvulzivum kyselina valproová je známá tím, že inhibuje transport laktátu, pyruvátu a mastných kyselin o krátkém řetězci, jako je acetát přes HEB, je přenášena pomocí přenašeče pro středně-dlouhé mastné kyseliny. Hodnota Michaelisovy konstanty se pohybuje mezi 10 a 20mM, v závislosti na konkrétních

oblastech mozku. Přenos značené valproové kyseliny přes HEB nebyl inhibován za současné přítomnosti mastných kyselin o krátkém řetězci (méně než C₄), dále α -keto kyselinami, ale byl významně snížen působením mastných kyselin o středně dlouhém řetězci (C₆-C₁₂), což vedlo k závěru, že transportní protein pro přenos monokarboxylových kyselin o středně dlouhém řetězci není zodpovědný za lumenální příjem valproové kyseliny. Zároveň se zjistilo, že octová kyselina, probenecid a dikarboxylové kyseliny jako glutarát, příjem valproové kyseliny zvyšovaly. To je připisováno inhibici efluxního mechanismu pro kys.valproovou.¹

2.1.2.2.4 Transportní systémy pro aminy

Transportní mechanismy léčiv typu aminu nebyly dosud plně objasněny, až na několik léčiv, u kterých byla zjištěna pasivní difuze a podíl přenašečových systémů. Endogenní hydrofilní amin cholin je přijímán přenašečovým systémem. Experimentálně bylo zjištěno, že příjem radioaktivně značeného [³H]cholinu byl inhibován látkami obsahujícími amin (eperison, skopolamin, thiamin, isoproterenol a hemicholinium-3), zatímco obojetné ionty nebo anionty nevykazovaly inhibiční účinky. Předchozí nálezy možností transportu aminových složek HEB naznačují nejméně dva navzájem odlišné přenašečové systémy pro cholin a aminová léčiva. Příkladem může být objasnění transportu H₁-antagonistů. Tento transportní mechanismus pro H₁-antagonisty může mít význam pro nežádoucí tlumivý efekt, který je pravděpodobně způsoben bloádou H₁-receptorů v mozku. U experimentů prováděných za účelem objasnění příjmu a transportu klasického H₁-antagonisty [³H]mepyraminu pomocí monolayeru primární kultury hovězích endoteliálních buněk byl zjištěn jeho saturabilní transport do mozku. Příjem byl inhibován léčivy typu aminu jako je chlorfenylamin, difenhydramin a jiných, ale nebyl např. inhibován cholinem, hemicholinem-3 a léčivy ve formě aniontů. Několik zástupců H₁-antagonistů jako je azelastin, ketotifen, cyproheptadien, emedastin a cetirizin kompetitivně snižují příjem [³H]mepyraminu u monolayeru primární kultury hovězích endotelových buněk na 8.6, 15.1, 15.8, 28.5 a 75.1 % oproti kontrolnímu vzorku. Tyto výsledky ukazují, že tyto látky sdílí společné transportní mechanismy s mepyramidem. Ze všech těchto látek měl nejmenší inhibiční efekt cetirizin, jehož postranní řetězec je karboxylován. Toto odpovídá představě, že pokud je polovina molekuly antihistaminika ve formě aniontu, což je případ cetirizinu, klesá afinita pro

přenašeč v HEB, což může značně snížit, či úplně eliminovat nežádoucí efekt v mozku.^{5,11}

2.1.2.2.5 Transportní systémy pro nukleosidy

Transportéry pro nukleosidy jsou přítomny v různých tkáních a zahrnují Na⁺-závislé a Na⁺-nezávislé přenašeče. Oba jsou dále rozděleny na několik rodin, v závislosti na substrátové specifitě. Funkčně máme dva usnadněné Na⁺-nezávislé transportéry, které mají širokou substrátovou specifitu. Tyto dva transportéry se vyznačují odlišnou citlivostí k NBMPR (nitrobenzylthioinosine), jmenovitě *es*-typ (citlivý k NBMPR) a *ei*-typ (necitlivý k NBMPR). Na⁺-závislé transportéry zahrnují pět členů od N1 po N5, rozlišených na základě substrátové specifity. Některé z těchto transportérů byly podrobněji prostudovány. Aktivita nukleosidového transportu byla zkoumána jak *in vivo*, např. pomocí metody perfuze mozku, stejně jako *in vitro* metodami za použití kultury endoteliálních buněk. Všeobecně vyšší permeabilitu mají nukleosidy odvozené od purinových bázi ve srovnání s pyrimidinovými nukleosidy. Adenin, adenosin, guanosin a inosin vykazují významnou distribuci do mozku, zatímco distribuce cytidinu a thymidinu je zanedbatelná. Distribuce uridinu do mozku je relativně nízká, ale saturovatelná. Výsledky ukazují, že oba purinové a pyrimidinové nukleosidy mohou být transportovány, dále purinové nukleosidy mají vyšší permeabilitu, pravděpodobně z důvodu fyziologické potřeby zásobení purinovými nukleosidy. Adenosinový transportér v HEB má vysokou afinitu, s hodnotou K_m mezi 1 a 5 μM a Na⁺dependentní permeabilitu. Podle členění nukleosidových transportérů patří přenašeč pro adenosin mezi Na⁺dependentní a na NBMPR necitlivé, což vylučuje *es*-typ transportéru. Transportér pro thymidin byl verifikován ve vepřovém srdci jako *es*-typ, stejně jako NBMPR necitlivý, nebo na sodíku závislý N2-typ přenašeče. Tyto rozdíly v zařazení jsou pravděpodobně způsobeny mezidruhovou odlišností. Jak *es*- tak *ei*-typ transportéru byly identifikovány v tkáni mozku, podobně byly Na⁺dependentní transportéry identifikovány v HEB. Gemcitabin (2,2'-difluorodeoxycytidin) je transportován *es*-typem nukleosidového transportéru s hodnotou K_m 329 μM a na sodíku závislým, pyrimidin-selektivním, N2-typem transportéru CTN1, s hodnotou K_m 18,3 μM . Dále CTN1 přenáší antivirotikum 3'-azido-3'-azidodeoxythymidin (AZT) a 2',3'-dideoxycytidin (ddC). Na druhou stranu, AZT a ostatní léčiva jsou efluxně přenášeny z mozku přes HEB, což vede k jejich snížené distribuci v mozku. Tento

efluxní proces lze inhibovat za použití anionických látek, např. probenecidem či *p*-aminohippuronovou kyselinou.^{14, 21, 22}

2.1.2.2.6 Ostatní transportní systémy zodpovědné za přenos látek HEB

Transportní studie, při které bylo použito primární kultury vepřových endotelových buněk kapilár mozku, naznačila existenci Na⁺-nezávislého a satureovatelného (K_m = 28μM) transportního systému pro L-karnitin. Luminální příjem L-karnitinu přes tento satureovatelný přenašečový systém byl inhibován butyrobetainem, zatímco abluminální příjem L-karnitinu byl snížen fenylalaninem, leucinem a inhibitory L-systému. Tyto výsledky naznačují, že L-karnitin vstupuje do mozku přes luminální membránu v HEB přes Na⁺-nezávislý transportní systém a jeho eflux přes abluminální membránu z mozku se děje za užití transportního systému pro aminokyseliny.⁵

Výše popsaný luminální transportér pro L-karnitin se zdá býti funkčně rozdílný od transportéru označovaného jako „organic cation/carnitine transporter“ (OCTN2), protože OCTN2 přijímá L-karnitin Na⁺-závislým způsobem a existuje hojně v ledvinách, kosterních svalech, srdci a v placentě, ale jen nepatrně v mozku. Farmakologická léčba pacientů s Alzheimerovou chorobou dnes nabývá na své důležitosti a acyl-L-karnitiny patří mezi kandidáty na nový lék. Hladina acetyl-L-karnitinu v mozkomíšní tekutině byla po jeho podávání výrazně vyšší, což reflektuje jeho dobrý průnik přes HEB, ačkoliv není přesně jasné, zdali je acetyl-L-karnitin transportován přes satureovatelný transportní systém, nebo pouze mechanismem pasivní difuze.¹²

2.1.2.2.7 Přenos peptidů přes HEB

2.1.2.2.7.1 Příjem peptidů přes HEB za pomoci přenašečových systémů

Již bylo popsáno několik transportních systémů pro malé peptidy. Z dříve objevených zmiňme specializovaný transportní mechanismus pro neurotropin a cytokin. Mezi později objevené patří například přenašečový systém pro glutathion. Při studiu transportu redukovaného glutathionu (GSH) přes HEB pomocí ³⁵S značeného GSH byl zjištěn satureovatelný transport s hodnotou K_m 5.8 mM. Ze studie funkční exprese RNA

získané z kapilár hovězího mozku v oocytech *Xenopus laevis*, byla zjištěna přítomnost Na^+ závislého transportéru GSH.⁵

Dalšími jsou transportéry oligopeptidů PepT1 a PepT2 identifikované u potkana, králíka a člověka. PepT1 je přenašeč o nízké afinitě, ale vysoké kapacitě, přítomný ve velkém množství v tenkém střevě a v menším množství v proximálních tubulech ledvin. PepT2 je transportér o vysoké afinitě a nízké kapacitě, jehož exprese je naopak nejvyšší v ledvinách. S protonem spřažený transportér PepT1 a PepT2 zajišťuje příjem di- a tripeptidů pomocí existujícího vnitřního protonového gradientu a negativního membránového potenciálu. Oba tyto přenašeče jsou fyziologicky a farmakologicky velice významné, protože zajišťují absorpci malých peptidů a peptidomimetických léčiv ve střevě a jejich reabsorpci v ledvinách. Pep T2 byl také nově objeven v mozku potkana. Obecně tyto přenašečové proteiny transportují v trávicím traktu orálně podávaná β -laktátová antibiotika, inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACEI) a léčiva charakteru peptidů.¹³

Mezi přenašeče oligopeptidů objevené v mozku patří ještě HPT zodpovědný za přenos histidinových oligopeptidů a histidinu samotného.⁵

2.1.2.2.7.2 Přenos peptidů přes HEB pomocí adsorpcí zprostředkované transcytózy (AMT)

AMT je spuštěna elektrostatickou interakcí mezi pozitivně nabitou polovinou peptidového řetězce a negativně nabitým povrchem domény buněčné membrány. Tento proces nezahrnuje specifický membránový receptor. Při navázání kationické složky k plazmatické membráně se nastartuje endocytóza, následovaná vytvořením endozomu. Koncept přenosu peptidů přes HEB pomocí AMT byl prvně navržen pro kationizovaný albumin. Ačkoliv nelze předpokládat specifické zacílení transportu pomocí AMT výlučně do mozku z důvodů existence tohoto mechanismu i v ostatních tkáních, zdá se být jeho nižší afinita a vyšší kapacita výhodnější pro přenos peptidů přes HEB ve srovnání s receptory zprostředkovanou transcytózou (RMT). V několika studiích byla sledována AMT syntetických peptidů, které jsou rezistentní k enzymatické destrukci a nesou kladný náboj. Jedná se vlastně o vhodnou chemickou modifikaci endogenních peptidů. Příkladem může být ebiratid, syntetický peptidový analog adrenokortikotropního hormonu, který byl rovněž testován u léčby Alzheimerovy

choroby. Tento syntetický peptid je pozitivně nabitý, jeho izoelektrický bod je 10 a je rezistentní k účinku peptidáz díky vhodné chemické modifikaci části tvořené endogenní aminokyselinou. Internalizace [¹²⁵I]ebiratidu byla studována u primární kultury hovězích endotelových buněk. Účast AMT při jeho transportu přes HEB potvrzoval inhibiční efekt polykationických peptidů a chování inhibitorů endocytózy. K demonstraci transcytózy ebiratidu přes HEB bylo využito kapilární depleční studie (metoda používající ke kvantifikaci transcytózy přes HEB perfuzát, který obsahuje radioaktivně značenou testovanou látku a radioaktivně značený marker) a mikrodialyzační metody. Po desetiminutové infuzi [¹²⁵I]ebiratidu do karotidy byl vypreparován a homogenizován mozek potkana. Jak v dialyzátu, tak v supernatantu z homogenátu mozku byla pomocí HPLC stanovena hladina nemetabolizovaného ebiratidu. Bylo tak zjištěno, že do mozku prochází více než 80% radioaktivně značeného ebiratidu v nezměněné formě. Podobná studie byla provedena pro E-2078, analog dynorfinu, který měl vysokou afinitu k opioidním receptorům a po systémovém podání vykazoval analgetickou aktivitu. Ostatní velké molekuly, které pronikají HEB pomocí AMT, zahrnují různé polykationické proteiny, jako je β-endorfin-kationizovaný komplex, histony a avidin.⁵

V jiném případě, kdy šlo o určení strukturální specifity AMT v HEB pomocí srovnání několika syntetických peptidů, které mají rozdílnou velikost molekuly, bazicitu, hydrofobicitu a karboxy-terminální strukturu, bylo použito primární kultury hovězích endoteliálních buněk. Stabilní stav příjmu modelového bazického peptidu 001-C8, H.MeTyr-Arg-MeArg-D-Leu-NH(CH₂)NH₂, byl závislý na teplotě a koncentraci a byl významně snížen v přítomnosti dansylkadaverinu, protaminu a nebo poly-L-lysinu. Příjem peptidů modifikovaných 1,8-oktandiaminem, 1,5-pentandiaminem, 1,2-ethandiaminem, nebo ethylamidem a peptidů s volným karboxylovým koncem byl naopak zvýšen. Konstanta poloviční saturace a maximální kapacita přenosu těchto peptidů byly v rozsahu 0.2 do 134 μM a 1.1 do 408 pmol/mg. Tyto hodnoty dobře korelovaly s bazicitou molekuly. Výsledky ukazují, že nikoliv počet aminokyselin, které tvoří peptid, ale terminální karboxyl a bazicita molekuly jsou určující pro přenos AMT systémem přes HEB.¹⁶

2.1.2.2.7.3 Přenos peptidů přes HEB pomocí receptorově zprostředkované transcytózy (RMT)

Peptidy, které jsou farmakologicky aktivní, ale neprocházejí membránami, mohou být speciálně upraveny tak, že mohou být přeneseny pomocí RMT. Takto modifikované peptidy jsou nazývány „chimeric peptides“. Transferrinový receptor (TfR) je transmembránový glykoprotein skládající se ze dvou 90-kDa podjednotek. Disulfidický můstek spojuje tyto dvě podjednotky a každá z nich může vázat jednu molekulu transferrinu. TfR je exprimován nejvíce v hepatocytech, erytrocytech, buňkách střev, monocytech a endoteliálních buňkách HEB. V mozku je exprimován zejména v buňkách choroidálního plexu. Nasměrování léčiv na TfR může být dosaženo použitím endogenního ligandu, transferrinu, nebo pomocí protilátky OX-26 namířené proti TfR. Transferrinový receptor, který je hojně přítomný v HEB a OX-26 protilátka, což je IgG2 monoklonální myší protilátka proti potkanímu TfR, mohou být využity jako vektory k přenosu látek přes HEB. Monoklonální protilátka OX-26 se váže k vnějšímu epitopu TfR, který je odlišný od vazebného místa pro přirozený ligand. Proto vazba OX-26 nijak neinterferuje s vazbou samotného transferinu. Transport protilátky OX-26 do mozku byl zkoumán metodou kapilární deplece. Výsledky ukázaly, že RMT využívající protilátku OX-26 je použitelná pro cílený transport („targeting“) peptidů přímo do mozku. Monoklonální protilátka OX-26 byla také využita pro diagnostiku Alzheimerovy choroby a to pro doručení markeru β -amyloidového peptidu ($A\beta$), který se váže k již dříve existujícím amyloidním plakům za tvorby chimerních peptidů z OX-26. Díky modifikaci cílového peptidu monoklonální protilátkou OX-26 tak bylo dosaženo zvýšené permeability HEB. V důsledku toho rovněž klesl plazmatický clearance $A\beta$ z 10.1 na 1,2 mL/min/kg, čímž se jeho plazmatická koncentrace zvýšila přibližně desetinásobně. RMT, využívající monoklonální protilátky, je účinný nástroj pro transport peptidů přes HEB, protože vede ke zvýšení membránové permeability a k poklesu jejich plazmatické clearance.^{14, 15}

2.1.2.2.8 Systém zajišťující eflux léčiv

Před rokem 1992 byly studie transportu léčiv do mozku primárně zaměřeny na influxní mechanismy z cirkulující krve do mozku. Náhled na celkovou koncepci HEB

byl revidován posledními zjištěními, které ukázaly že P-gp, exprimovaný na luminální membráně endoteliálních buněk kapilár mozku, funguje jako efluxní pumpa, což vede k restrikci akumulace některých cytotoxických nebo lipofilních léčiv. P-gp patří do rodiny tzv. ATP-binding cassette (ABC), což znamená, že tyto přenašečové proteiny ke své činnosti potřebují ATP. Identifikace P-gp jako aktivního efluxního transportéru v HEB tak změnila dosavadní pohled na HEB a to od modelu statické membránové bariéry na dynamické rozhraní, které obousměrně reguluje pohyb látek mezi mozkem a plazmou za působení aktivních transportních mechanismů. Nejvíce přesvědčivý důkaz pro P-gp zprostředkovaný eflux je demonstrace významně zvýšené distribuce řady léčiv do mozku myši, které postrádají gen *mdr1*, který kóduje expresi P-gp v mozku. U těchto myši byla v mozku zvýšena distribuce některých cytostatik, imunosupresiv i dalších léčiv, které jsou substráty pro P-gp ve srovnání s normální populací. Ukázalo se také, že distribuce cytostatika doxorubicinu v mozku potkanů za podmínek nedostatku ATP způsobeném přechodnou ischemií mozku vzrostla přibližně sedmnáctinásobně. Když se hodnota ATP v mozku obnovila, distribuce léčiva klesla opět k normálu. Jelikož transport P-gp vyžaduje ATP jako energetický zdroj, deplecí ATP poklesne aktivita P-gp zprostředkovaného transportu, což následně vede ke zvýšení hladin jeho substrátů v mozku. Nedávno byly popsány další efluxní transportní systémy pro několik léčiv. Byla tak prokázána existence i jiných efluxních transportních systémů, než pouze P-gp. U salicylátu, benzoátu a probenecidu se myslelo, že jsou přenášeny z intersticiální tekutiny do plazmy pomocí monokarboxylatového přenašeče. Snížená distribuce probenecidu v mozku může být připsána efektivnímu efluxu přes MCT1 anebo další příbuzné přenašeče. Uvedené vlastnosti činí z MCT1, případně i z dalších transportních bílkovin, slibný cíl pokusů pro modifikaci vstupu monokarboxylových léčiv do mozku.^{5,14}

Nový multispecifický transportní peptid pro organické anionty (*oatp2*), byl klonován z mozku potkana. *Oatp2* je protein o 661-aminokyselinách, skládající se z 12 domén a vykazující 77% shodnost v sekvenci aminokyselin s Na⁺-nezávislým polypeptidem organic anion transportér (OAT-K1). Jak ukázala metoda analýzy Northern blot, *oatp2* je hojně přítomen v mozku, játrech a ledvinách, ale nikoliv v srdci, slezině, plicích, kosterních svalech nebo testes. Ve studii funkční exprese v oocytech *Xenopus laevis* *oatp2* zprostředkoval příjem žlučových kyselin, jako jsou taurocholát, cholát, konjugáty estrogenu, např. 17 β -estradiol-glukuronid a kardiogenních glykosidů jako je digoxin. Ačkoliv většina uvedených látek je běžnými substráty některých *oatp*-příbuzných přenašečů, vysoce afinitní transport digoxinu je typický pro *oatp2*.

Eliminace digoxinu z těla po jeho podání je okolo 25% hepatobiliární exkrecí do žluče, 15% přes střevní mukózu a přes 60% pomocí exkrece ledvinami do moče. Je dobře známo, že předávkování digoxinem indukuje několik typů nežádoucích účinků na CNS. Tyto výsledky indikují, že oatp2, který je často přítomen v mozku, játrech a ledvinách, může hrát obzvláště důležitou roli v akumulaci léčiv v mozku, toxicitě digoxinu a v hepatobiliární a renální exkreci kardiogenních glykosidů z těla. Detoxifikace digoxinu a jeho usnadněná exkrece do žluče a moče se děje efluxním mechanismem zprostředkovaným P-gp v HEB, kanalikulární membráně hepatocytů, a v membráně kartáčového lemu tabulárních ledvinových epitelálních buněk, zřejmě i v kombinaci s transportní funkcí oatp2 v těchto tkáních.¹⁷

Proč někteří pacienti se záchvaty jsou úspěšně léčeni antiepileptiky a jiní jsou na stejnou léčbu rezistentní není známo. Nejméně 10% až 20% epileptiků nereaguje na podávání léčiv jako jsou fenytoin, fenobarbital a karbamazepin. Tato tři antiepileptika jsou známa tím, že jsou substráty pro P-gp efluxní pumpu. Jestli je P-gp exprimován v mozku některých pacientů s refrakterní epilepsií ve větším rozsahu, pak antiepileptika jím exportovaná nedosahují efektivních hladin. Jedenáct z devatenácti vzorků mozku odebraných během operace pacientů pro refrakterní záchvaty, mělo hladinu multidrug resistance –associated protein (MDR1) mRNA 10 krát větší, než kontrolní skupina. Imunohistochemie cílená na P-gp u 14 subjektů ukázala nárůst denzity v endoteliálních buňkách kapilár mozku ve srovnání s tou samou studií u zdravých lidí. Genová exprese MDR1 je zvýšená v mozku některých pacientů nereagujících na podání antiepileptik, což naznačuje, že absence odpovědi na medikamentózní léčbu je způsobená nedostatečnou hladinou antiepileptik v mozku. Kombinace antiepileptik s inhibitory efluxní funkce P-gp a nebo nově vyvinutá antiepileptika, které nejsou substráty pro P-gp, mohou vést k zefektivnění léčby pacientů s farmakorezistentní epilepsií.⁵

2.2 Možnosti ovlivnění transportních mechanismů hematoencefalickou bariérou

Ačkoliv ovlivnění transportních mechanismů HEB nepatří dnes mezi nejčastější techniky jak zvýšit prostupnost léčiva do mozku, má již v praxi své místo. Ke zvýšení propustnosti léčiv HEB do mozku se dále používá chemická modifikace pro zvýšení

lipofily, která ale není vždy možná. Zvýšení liposolubility léčiva může mít nežádoucí efekt, jako jsou např. změny v nástupu a délce vlastního efektu dané např. zvýšením vazby na plazmatické proteiny (často s vysokou afinitou), změny biotransformace apod. Mezi další techniky patří použití proléčiv, což zahrnuje podání léčiva ve formě, která je inaktivní, nebo málo aktivní, ale ochotně přechází HEB, typickým případem je L-DOPA. Ideální je, když je proléčivo dobře liposolubilní, snadno přechází HEB a je zcela přeměněno v CNS na aktivní formu, která je více polární než proléčivo, čímž se stane efektivněji uvězněno v CNS. Mezi další patří intracerebrální injekce/infuze. Tato metoda zahrnuje přímou injekci léčiva, buď do parenchymu mozku, nebo intraventrikulárně do cerebrospinální tekutiny. Další možnost představuje intranazální podání, cesta pro podání do CNS přes olfaktorický epitel a nervy je také zajímavý způsob prostupu léčiva do mozku. Dalšími je modulace HEB, jako je například osmotické otevření bariéry za použití infuze 25% roztoku mannitolu do karotidy. Tato metoda se s úspěchem používá několik let zpět k léčbě nádorů mozku. Mezi nejnovější techniky patří použití peptidových vektorů procházejících buňkami, liposomy a nanočástice.¹⁹

Transportní mechanismy přítomné v HEB mohou být v zásadě podrobeny inhibici a nebo indukci, respektive zpomalení nebo zrychlení jejich transportní aktivity. V zásadě může být modulovaná aktivita jak transportéru z třídy SLC (solute carriers consists of specific membrane), jež zahrnují např. rodinu přenašečů pro karnitin (organic cation/carnitine transporter OCTN), transportér pro peptidy (PEPT), pro monokarboxylové kyseliny (MCT), tak z třídy ABC (ATP-binding cassette transporter) transportéru, jejímž hlavním zástupcem je P-gp (MDR1). V roce 1951 byl objeven první nepřímý důkaz ovlivnění transportních mechanismů, když bylo zjištěno, že současné podání probenecidu s penicilinem vedlo k poklesu renální clearance, k prodloužení poločasu a zvýšení plazmatické koncentrace penicilinu, což umožnilo redukci dávky. Mechanismus této interakce byl objasněn o několik let později: aktivní sekrece penicilinu byla redukována inhibicí OAT(organic ion transporter) v basolaterální membráně proximálního tubulu ledvin. Podobně současné podání probenecidu s HIV antivirotiky, nebo antihypertenzivy, jako jsou ACEI, také navozuje redukci renální clearance, prodloužený poločas a zvýšení plazmatické koncentrace těchto léčiv. U člověka digoxin představuje substrát s vysokou afinitou k P-gp (MDR1), některé látky působí jako induktory, častěji však spíše jako inhibitory P-glykoproteinu. Inhibice MDR1 atorvastatinem, klarithromycinem, nebo verapamilem byla spojena s významným zvýšením plazmatické koncentrace digoxinu. Nedávno provedená

preklinická farmakokinetická studie lékové interakce mezi risperidonem, bupropionem a sertralinem u hlodavců svědčí o tom, že sertralin vykazuje významný inhibiční efekt na MDR1 přenašeč v HEB, což vede ke zvýšenému vstupu risperidonu a jeho metabolitu 9-OH-risperidonu do mozku. Zajímavostí je, že jiná studie s hlodavci ukázala, že P-gp lokalizovaný v HEB je více rezistentní k inhibici, než P-gp v ostatních tkáních. Inhibice na MDR1 byla zjišťována *in vitro* pomocí poslední generace antidepresiv, což ukázalo rozdílný potenciál interakce. Zatímco paroxetin se jevil jako silný inhibitor P-gp, citalopram a venlafaxin vykazovaly nízký potenciál interakce s membránovými transportéry. Ačkoliv bylo provedeno několik studií zabývajících se ovlivněním transportéru, specifická data z *in vitro* studií, informace o substrátové specifitě a informace o inhibičním nebo indukčním potenciálu psychiatrických a neurologických léků stále chybí. Příklady ovlivnění transportních mechanismů HEB jsou uvedeny v tabulce I. ^{20, 21}

léčivo	inhibitor/induktor	interakce	efekt
loperamid	quinidin	MDR1 inhibice	vzrůst CNS penetrace loperamidu
digoxin	paroxetin	MDR1 inhibice	vzrůst CNS penetrace digoxinu
desipramin	ritonavir	OCT1 inhibice	pokles jaterního příjmu.
fexofenadin	ovocný džus	OATP inhibice	pokles orální biol. dostupnosti
penicilin	probenecid	OAT inhibice	prodloužení $T_{1/2}$ pro penicilin, ↓ renální clearance

Tabulka 1. Příklady interakcí ovlivňujících transportéry léčiv.

OATP (organic anion transporting peptide), OAT (Organic ion transportr), OCT (organic cation transporter)

2.3 L-karnitin

2.3.1 Historie

Karnitin byl objeven Gulewitschem W. a Kirnbergem R (1905). v mase zvířat v roce jako kvartérní amin, látka podobná aminokyselinám. Byl mylně označen jako vitamin B s indexem T. Je však asi z 30 % syntetizován v těle, nemá tedy charakter

vitaminu a je proto označován jako vitagen. Označení vitamínu B_T pochází z toho, že látka byla přiřazena k vitamínům skupiny B a index T byl přidán proto, že moučný červ *Tenebrio molitor* potřebuje bezpodmínečně ke své existenci karnitin.^{24,43,44}

Objev i význam karnitinu upadl pak v zapomnutí na několik desetiletí. Teprve Friedman a Fraenkel (1955) poznali význam karnitinu pro humánní medicínu, když prokázali základní význam karnitinu pro beta-oxidaci tuků, která je zdrojem energie pro buňku. Štěpení mastných kyselin se odehrává na membránách mitochondrií. Trvalo ještě několik desetiletí, než tyto teoretické znalosti byly uplatněny v klinické praxi. V sedmdesátých letech minulého století probíhal intenzivní výzkum, zabývající se funkčním významem karnitinu. O deset let později začal být karnitin vyráběn průmyslově. Do té doby byla k dispozici jen velmi malá množství, získaná extrakcí ze zvířecího masa a sloužila jen pro výzkumné účely. V roce 1997 byly potvrzeny dvě formy karnitinu jako L(-)- nebo R(-)-3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselná kyselina.^{24,25,42}

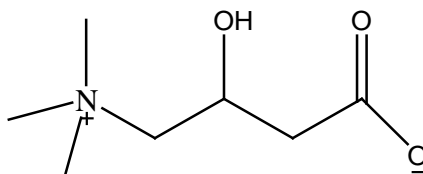
V současné době jsou popisovány pozitivní výsledky podávání karnitinu u zdravého a porušeného srdečního svalu, u svalů kosterních, při kognitivních poruchách centrálního nervového systému, při ovlivnění určitého typu mužské sterility a při některých poruchách v neonatologii.²⁴

2.3.2 Chemická charakteristika

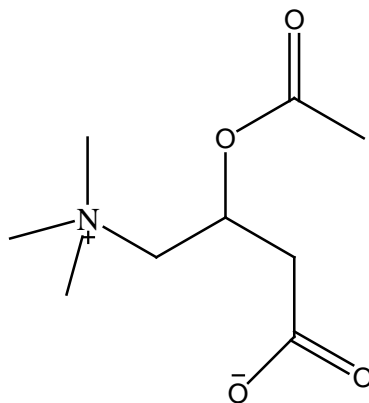
Karnitin je chemicky kyselina 3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselná (ang. 3-hydroxy-4-N-trimethylammonium butyrate) , C₇H₁₅NO₃ . Název je odvozen od latinského slova caro, maso. Molekulová hmotnost je 161,2, jde o nízkomolekulární polární molekulu, je podobná aminokyselinám s tím rozdílem, že atom dusíku je umístěn na 4. atomu uhlíku (v molekulách aminokyselin je aminoskupina umístěna na 2.uhlíku). Atom dusíku poskytuje čtyři vazby, proto se jedná o tzv.kvarterní amin – atom dusíku má kladný náboj. Molekula karnitinu obsahuje jeden asymetrický atom uhlíku, jedná se o třetí atom uhlíkatého řetězce. Látky s asymetrickým atomem uhlíku jsou většinou opticky aktivní, tj. otáčejí rovinu polarizovaného světla. V přírodě se vyskytuje pouze levotočivý L-karnitin. Nejvíce je obsažen v skopovém, jehněčím a hovězím mase. V rostlinné stravě prakticky zcela chybí. V čisté podobě jde o bílý, silně

hygroskopický prášek, který se na vzduchu rychle mění ve vodný roztok. Proto čistý karnitin lze použít jen ve vodném roztoku, tablety nebo kapsle rychle vlhnou a rozpadají se. Má charakteristický zápach po mase a rybách, není příliš příjemný, ale v roztoku nezapáchá, přesto bývá korigován aromatickými ovocnými šťávami. Jeho rozpustnost ve vodě je vysoká: 250g karnitinu se rozpustí ve 100g vody.^{24, 25}

Vyskytuje se jako forma L a D při průmyslové výrobě. Ale jen forma L je biologicky aktivní. Pravotočivá forma D je nejen biologicky neúčinná, ale také škodlivá a do určité míry i toxická, protože kompetitivně inhibuje formu L a může tak vyvolávat příznaky nedostatku L-karnitinu. Proto pokud se uvádí karnitin jako léčebný prostředek, tak vždy se myslí jeho forma L.²⁴



Obr. 1 Chemická struktura L-karnitinu



Obr. 2 Chemická struktura acetyl-L-karnitinu

2.3.3 Biologický význam karnitinu

První prokázanou funkcí karnitinu je bezesporu získání energie pro buněčné pochody uskutečňováním beta-oxidace mastných kyselin. Přesněji usnadňuje transport

aktivovaných mastných kyselin přes vnitřní mitochondriální membránu a tím je zpřístupněn pro β -oxidaci, což má zásadní význam pro jednu ze základních metabolických drah. Mitochondriální beta-oxidace je podstatný zdroj energie zejména v srdečním a kosterním svalu. Volné (neesterifikované) mastné kyseliny (MK) jsou uvolňovány hydrolýzou tuků (triacylglycerolů) z tukových zásob nebo tuků potravy. Tyto mastné kyseliny jsou transportovány na místo dalšího zpracování krví, vlastním přenašečem je albumin. Po přestupu do buňky je molekula MK aktivována jednou molekulou ATP, a získá tak energii pro vstup do metabolických pochodů (tzv. makroergní charakter). Tato aktivace probíhá v cytosolu, je katalyzována skupinou nejméně tří acyl-CoA-synthetas (také zvaných thiokinázy), které se liší délkou řetězce, pro které jsou specifické. Tyto enzymy, které jsou spojeny buď s endoplasmatickým retikulem nebo s vnější mitochondriální membránou, všechny katalyzují reakci:



Vzniká acyladenylát, který reaguje s univerzálním přenašečem aktivovaných zbytků kyselin a koenzymem A (CoA) za vzniku acyl-CoA. Ten však není schopen proniknout mitochondriální membránou, aby předal molekulu MK k beta-oxidaci, která probíhá uvnitř mitochondrií. Pro tento přenos aktivované mastné kyseliny se využívá zvláštní přenašeč – karnitin, který uchovává makroergní charakter acylového zbytku a snadno proniká do mitochondrie. ^{24, 25, 26, 28, 30}

Uvedený proces je využíván pro mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, z nichž tak vznikají deriváty karnitinu, tzv. acylkarnitiny (estery karnitinu). Aktivace nižších mastných kyselin a jejich oxidace v mitochondriích může probíhat nezávisle na karnitinu. ²⁵

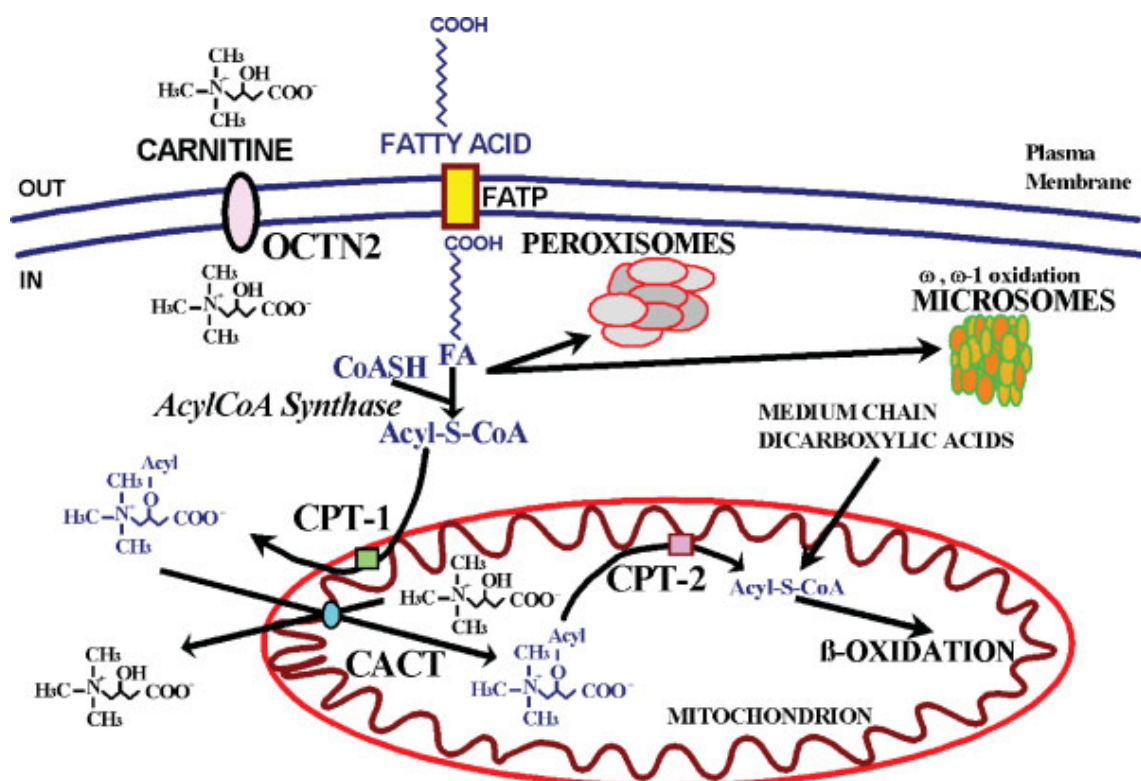
Cytoplazmatické mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (nejčastěji zbytky kyseliny palmitové) ve formě acyl-CoA se přeměňují na acylkarnitiny pomocí enzymu karnitinacyltransferázy-I (nejčastěji karnitinpalmitoyltransferázy – CTP I, EC 2.3.1.21), která je umístěna ve vnější mitochondriální membráně. V této reakci je acylová skupina přemístěna z CoA na hydroxylovou skupinu karnitinu. Vzniklý O-acylkarnitin je transportován přes vnitřní mitochondriální membránu karnitinacyltranslokázou (carnitine/acyl-carnitine translocase – CACT), která transportuje acylkarnitin dovnitř výměnou za karnitin transportovaný ven. Uvnitř mitochondrie potom acylkarnitin reaguje s intramitochondriálním CoA za katalýzy karnitinacyltransferázou-II (nejčastěji karnitinpalmitoyltransferázou – CTP II), která se vyskytuje na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány. Tak je v mitochondriální matrix opět vytvořen acyl-CoA a

uvolněn karnitin, který je karnitinacyltranslokázou opět přenesen do cytoplazmy. Tento dej se opakuje a bývá nazýván jako tzv. shuttle mechanismus (shuttle = kyvadlový). Výsledkem β -oxidace je vznik acetyl-CoA. Acetyl-CoA je dále předáván do Krebsova cyklu. Buňka přitom udržuje oddělené cytosolové a mitochondriální zdroje CoA. Mitochondriální zásoba funguje v oxidačním odbourání pyruvátu a určitých aminokyselin jakož i mastných kyselin, zatímco cytosolová zásoba slouží jako zdroj pro biosyntézu mastných kyselin.^{24, 26, 27, 30}

Nejsou-li při nedostatku karnitinu volné mastné kyseliny odbourávány, zvyšuje se jejich koncentrace v cytosolu, což působí toxicky, snižuje se hladina kalia a zvyšuje se intracelulární natrium a kalcium. Energie se pak získává alternativním pochodem ne z mastných kyselin, ale z glykogenu nebo glukózy. Buněčné membrány trpí edémem, dochází k poruše poměru produkce ATP/ADP, vznikají produkty oxidace a peroxidace lipidů, což vede až k nekróze buňky.²⁴

Karnitin však neslouží jen k zásobování mitochondrií zbytky kyselin určených k oxidaci, ale také k odstraňování toxických zbytků beta-oxidace v opačném směru, s jejich konečným vyloučením ledvinami. Stejně tak reguluje hladiny mnohých spatně metabolizovatelných acylových skupin, ať už mají exogenní, nebo endogenní původ v důsledku vrozených poruch metabolismu. Tyto zbytky jsou konjugovány s CoA a v důsledku toho je snížena jeho volná frakce v buňce. Karnitin napomáhá vyloučit tyto zbytky jako acylkarnitiny ven z buňky, a obnovit tak volnou frakci CoA. Podobně při nadměrné produkci acetylových zbytků (acetyl-CoA) v některé z metabolických drah přejímá karnitin tyto zbytky v reakci katalyzované karnitinacetyltransferázou (CAT, EC 2.3.1.7). Funkce tohoto enzymu však ještě není plně objasněna.^{26, 27}

Karnitin neovlivňuje jen metabolismus mastných kyselin, ale také produkci energie z aminokyselin a sacharidů. Předpokládá se, že zvyšuje produkci energie z těchto zdrojů zvýšením aktivity enzymových komplexů pyruvátdehydrogenázy (pyruvate dehydrogenase complex, PDC) a fruktokinázy v důsledku snížení intramitochondriálního poměru acetyl-CoA/CoA. Intramitochondriální pokles poměru acetyl-CoA/CoA stimuluje aktivitu PDC, což vede ke zvýšené oxidaci glukózy. A právě tento poměr je regulován karnitinem, který tak rozhoduje, bude-li přednostně stimulována beta-oxidace mastných kyselin, nebo oxidace glukózy.²⁴



Obr. 3 Cyklus karnitinu v oxidaci mastných kyselin. FATP: transportní protein pro mastné kyseliny; FA: mastná kyselina; CPT-1: carnitine palmitoyl transferase-1; CPT-2: carnitine palmitoyl transferase-2; CACT: carnitine/acyl-carnitine translocase ³²

2.3.4 Metabolismus karnitinu

2.3.4.1 Exogenní příjem karnitin

Hlavním zdrojem exogenního karnitinu pro lidský organismus je potrava, především maso (červené maso), ryby a mléčné výrobky. Karnitin naopak prakticky chybí v rostlinné stravě. Člověk jako všežravec absorbuje zažívacím traktem z potravy něco mezi 2-12 μ mol karnitinu za den na kg tělesné váhy, což představuje 23 – 135mg u průměrné dospělé osoby. Absorpce probíhá v duodenu a jejunu, méně v ileu, a to aktivním procesem pomocí speciálního bílkovinného nosiče (fatty acid-binding protein), méně významný je pasivní přenos. Ke sníženému vstřebávání dochází za snížené dodávky energie, jako jsou např. stavy ischemie a nedostatek iontu Na, ale také za přítomnosti D-formy karnitinu a acetyl-karnitinu. Množství přijaté potravou je větší, než množství vzniklé endogenní biosyntézou, která se odhaduje na 1.2 μ mol karnitinu za den na kg tělesné váhy. Z toho plyne, že přibližně 75% karnitinu v lidském těle pochází z potravy a 25% z biosyntézy *de novo*. Protože je karnitin přítomen především v potravě živočišného původu, přísní vegetariáni získají z potravy jen velmi málo karnitinu (<0,1 μ mol za den na kg tělesné váhy). Proto přísní vegetariáni získávají více než 90% tělesného karnitinu biosyntézou. Tento rozdíl je však většinou bez jakékoliv klinické manifestace.^{24, 25, 26}

2.3.4.2 Metabolismus exogenního karnitinu

L-karnitin podaný intravenózně je ze 70-90% vyloučen ledvinami během 24 hodin. Zbytek z podané dávky je inkorporován do tkáně jako L-karnitin, nebo jako další složky tvořící pool karnitinu, např. různé acyl-karnitiny. Dosud prováděné studie neodhalily - s výjimkou acyl-karnitinů - jiné metabolity karnitinu. Pouze byl popsán nízký stupeň dekarboxylace na β -methylcholin. L-karnitin podaný orální cestou je z 54-87% absorbován, zbytek je přeměněn aktivitou enterálních bakterií v tlustém střevě na trimethylamin a γ -butyrobetain. Tyto metabolity bakteriální degradace jsou vyloučeny převážně stolicí, byl rovněž popsán malý prostup těchto metabolitů do systémového řečiště. Osud perorálně podaného L-karnitinu byl zkoumán na potkanech v anestézii. Absorbovaný L-karnitin se objevil primárně v portální cirkulaci. Enterohepatální

cirkulace L-karnitinu byla ukončena jeho vyloučením do žluči ve formě esterů karnitinu a to z více než 66%.^{29, 26, 42}

2.3.4.3 Endogenní syntéza karnitinu

Endogenní karnitin je částečně syntetizován v těle ze dvou esenciálních aminokyselin, lysinu a methioninu. Lysin poskytuje uhlíkovou kostru a zdroj dusíku pro syntézu karnitinu, 4-N-methylová skupina pochází z methioninu. Tvoří se ve všech buňkách těla. K jeho tvorbě je zapotřebí vitamínu C, vitamínu B₆, niacinu a železa. U savců jisté proteiny obsahují N⁶-trimethyl-lysinové (dále jen TML) zbytky. N-methylace těchto lysinových zbytků se objevuje jako post-translační úprava proteinů jako je kalmodulin, myozin, aktin, cytochrom C a histonů. Tato reakce je katalyzována specifickou methyltransferázou, která požívá S-adenosylmethionin jako methylový donor. Lysozomální hydrolýza těchto proteinů je ukončena uvolněním TML, který je prvním metabolitem biosyntézy karnitinu. TML je nejprve hydroxylován na třetí pozici TML dioxygenasou (TMLD; EC1.14.11.8) za vzniku 3-hydroxy-TML (dále jen HTML). Dále následuje aldolové štěpení HTML na 4-trimethylaminobutyraldehyd (dále jen TMABA) a glycin v reakci katalyzované HTML aldolasou (HTMLA; EC 4.1.2.X). Dehydrogenací TMABA za katalýzy TMABA dehydrogenásou (TMABA-DH; EC1.2.1.47) vzniká 4-N-trimethylaminobutyrat (γ -butyrobetaine). V posledním kroku je 4-N-trimethylaminobutyrat hydroxylován na třetí pozici uhlíku (v pozici β) enzymem γ -butyrobetainedioxygenase (BBD; EC 1.14.11.1) za vzniku L - karnitinu. TML dále může vznikat metylací lysinu S-adenosylmethioninem za účasti specifické lysinmethyltransferázy (ϵ -N-L-methyl transferaze) a vzniká ϵ -N-trimethyllysin (TML).^{26, 31}

2.3.4.3.1 Distribuce enzymu biosyntézy karnitinu

Orgánové rozložení enzymů biosyntézy karnitinu studoval Rebouche a Engel (1980). Aktivita enzymu TMLD je největší v ledvinách, ale je také přítomen v játrech, srdci, svalech a CNS. Enzym HTMLA je především aktivní v játrech, v ostatních orgánech je aktivita nízká. Množství oxidovaného TMABA je nejvyšší v játrech, s značnou aktivitou nalezenou také v ledvinách, naopak nízkou v mozku, srdci a svalech. Tyto výsledky ukazují, že všechny zkoumané tkáně obsahují enzymy nutné k přeměně TML

na butyrobetaine. Avšak jen ledviny, játra a mozek jsou schopny přeměnit butyrobetaine na karnitin. Vzniklý karnitin je potom vyplavován do krve a vychytáván periferními tkáněmi. Ve většině tkání je koncentrace karnitinu 20-50krát vyšší než v plazmě. Byla prokázána existence aktivního transportního systému, který přenáší karnitin do buňky proti koncentračnímu gradientu (organic cation/carnitine transporter – OCTN2), méně významný je i pasivní přenos. Mezi buňkami jednotlivých tkání je velká variabilita v míře transportu karnitinu a z toho vyplývající rozdíly v jeho koncentraci.^{26, 28, 31}

2.3.4.4 Exkrece endogenního a exogenního karnitinu

Vzhledem k nízké vazbě L-karnitinu na plazmatické proteiny, rozhodující úloha v regulaci hladiny karnitinu v plazmě přísluší ledvinám. Běžně okolo 90-98% endogenního karnitinu je opět reabsorbováno tubulárním systémem. Exkrece zbylého podílu endogenního karnitinu se děje formou L-karnitinu, acetyl-L-karnitinů a esterů karnitinu o delším řetězci. Za dobu 24 hodin, zdravý člověk konzumující běžnou potravu, průměrně vyloučí močí mezi 100 a 300 μmol celkového karnitinu, celková exkrece závisí na množství exogenního karnitinu. Intravenózně podaný L-karnitin je rovněž převážně vylučován ledvinami. Když se vezme v úvahu normální plazmatická koncentrace L-karnitinu, která je 40-50 $\mu\text{mol/L}$, to že je 8-9 mmol L-karnitinu denně přefiltrováno, to že celkový tělesný pool je okolo 128 mmol a denní příjem pomocí biosyntézy a absorpce z potravy činní 0,1-0,3 mmol, je jasné, že při selhání absorpčních mechanismů hrozí tělu nedostatek L-karnitinu. Při intravenózním podání vysoké dávky L-karnitinu subjektu bez nedostatku karnitinu se úměrně tomu zvýší jeho exkrece a většina z podané dávky se vyloučí během 24 hodin.^{29, 26}

2.3.5 Fyziologický význam karnitinu a acetyl-karnitinu v CNS

Dnes už je dobře známo, že karnitin hraje esenciální úlohu v transportu mastných kyselin o dlouhém řetězci přes vnitřní mitochondriální membránu. Tento přenos vyžaduje enzymy a transportéry, které akumulují karnitin dovnitř buňky (tzn. OCTN2 carnitine transporter), konjugují karnitin s mastnou kyselinou (carnitine palmitoyl transferaze 1, CPT1), přenáší acylkarnitin přes vnitřní plazmatickou membránu (carnitine-acylcarnitine translocase, CACT) a konjugují mastnou kyselinu zpět s CoA.

Deficience OCTN2 karnitin transportéru způsobuje primární deficienci karnitinu, která je charakterizována zvýšenou ztrátou karnitinu močí a sníženou akumulací karnitinu ve tkáních. U pacientů je přítomná hypoglykémie, hepatická encefalopatie a nebo skeletální či srdeční myopatie. Tato porucha dobře odpovídá na suplementaci karnitinem. Karnitin dále může tvořit estery s xenobiotiky a OCTN2 přítomný v basolaterální membráně v HEB může plnit důležitou fyziologickou roli v odstraňování toxických složek z mozku. Jeho koncentrace v mozku je nízká, jen asi 10% toho, co je v srdci, svalech, játrech. U psů byla nejvyšší koncentrace karnitinu v mozečku, nejnižší v hipokampu a pontu. Mozek je energeticky závislý na glukóze a ketolátkách, a to více než na mitochondriální oxidaci mastných kyselin o dlouhých řetězcích. Acetyl-karnitin tvořený na mitochondriích, může poskytovat acetyl skupinu pro tvorbu acetylcholinu pomocí enzymu acetyltransferázy. Jsou práce, které referují o tom, že sám karnitin má slabou acetylcholinovou aktivitu. Acetyl-karnitin má mít dokonce asi třetinovou jako acetylcholin. Acetyl-karnitin se také kumuluje v mozku během anestézie. Karnitin v mozku může stimulovat glykolýzu, a tak ovlivňovat excitační funkce mozku. Chybí ale přesvědčivý průkaz o tom, že by karnitin byl přímým neurotransmiterem. Bylo však prokázáno, že podávání acetyl-karnitinu zvyšuje u laboratorního potkana spontánní i evokované výboje v neuronech mozečku. Je pravděpodobné, že acetyl-karnitin má facilitační účinek na odpovědi neuronů na acetylcholin. Acetyl-karnitin jako neuroaktivní agens se teoreticky může podílet na cholinergním přenosu, protože je chemicky blízký acetylcholinu. Jeho podávání synchronizuje kortikální rytmy, modifikuje EEG záznam a evokované potenciály. Zlepšuje příznaky Alzheimerovy demence, u níž dochází k deficitu acetylcholinu. Z toho lze nepřímo vyvozovat příznivé ovlivnění demence, provázející někdy Parkinsonovu nemoc a vždy Huntingtonovu chorobu. Příznivý efekt acetyl-karnitinu na klinický obraz i na biochemické parametry (hladiny vysokoenergetických fosfátů – fosfomonoesterů) byl prokázán u Alzheimerovy demence při srovnání se skupinou léčenou placebem. Jde právě o acetyl-karnitin, který je přirozenou komponentou savčí tkáně. Bylo zjištěno, že zvyšuje aktivitu acetyl-CoA i cholinacetyltransferázy, podporuje vychytávání cholinu, čímž také podporuje syntézu acetylcholinu. Acetyl-karnitin snadno proniká do mozkomíšního moku přes krevně-likvorovou bariéru a ovlivňuje hypotalamicko-hypofyzárně-adrenokortikální osu. Ovšem přesnější mechanismus ovlivnění mozku není přesně znám. ^{24, 32}

Při dlouhodobém užívání valproové kyseliny u epileptiků se může vyvinout nebezpečný, život ohrožující, hepatocerebrální Reyův syndrom s nadměrnou tvorbou

neaktivních esterů karnitinu. K rizikové skupině v tomto směru patří především nemocní, u nichž byl zjištěn heterozygotní defekt přestupu karnitinu přes buněčnou membránu. To vyvolává chronický deficit karnitinu. Tento kritický stav je dramaticky ovlivnitelný podáváním karnitinu. U pacientů léčených valproátem se objevuje v moči valproyl-karnitin, v krvi hyperamonémie a snížení plazmatického karnitinu. Karbamazepin i antiepileptika I. generace tuto poruchu nevyvolávají. Substituce karnitinem se také osvědčila při náhodném předávkování kyselinou valproovou u dětí. Případný deficit karnitinu nelze však obecně vztáhnout na podávání antikonvulziv. U potkanů však bylo zjištěno, že při současném podávání karnitinu a valproové kyseliny dochází ke zvýšení koncentrace valproátu v mozku potkana. Karnitin by tak mohl potencovat účinek valproátu. ^{24, 25, 27}

2.3.6 Transport L-karnitinu a acetyl-L-karnitinu přes HEB

Intracelulární homeostáza je kontrolována pomocí různých membránových transportérů. Primární funkcí OCT (organic cation transporter) je eliminace kationických léčiv, endogenních aminů a jiných xenobiotik v tkáních jako jsou ledviny, střeva a játra. Mezi tyto molekuly patří karnitin, obojetný ion, endogenní amin, který je esenciálním kofaktorem pro mitochondriální β -oxidaci a modulaci vnitrobuněčné koncentrace CoA. Z zástupců rodiny OCT se zaměříme podrobněji na transportér, jehož substrátem je právě karnitin, OCTN2. Tento na sodíku závislý kotransportér OCTN2 (ang. organic cation/carnitine transporter) je intenzivně studován v souvislosti s jeho nově objevenými mutacemi v kódujícím genu, který způsobí vznik primární systémové deficiencie karnitinu - SCD (systemic carnitine deficiency). SCD je autozomálně recesivní porucha oxidace mastných kyselin, která je charakterizována myopatií, progresivní kardiomyopatií, hypoglykemií a hyperamonemií. Transport karnitinu přenašečem OCT1, OCT2 a OCT3 nebyl dosud popsán. Avšak tři jiní a noví členové OCT rodiny, nazváni OCTN1, OCTN2, OCTN3, kteří představují rozdílnou podrodinu, mají schopnost transportovat karnitin, ale s rozdílnou charakteristikou. **OCTN1**, původně klonovaný z lidských fetálních ledvin, je široce exprimován v různých tkáních, jako jsou ledviny, srdce, játra. Lidský OCTN1 je složen z 551 aminokyselin s 11 transmembránovými doménami. Je to multispecifický, dvojsměrný a na pH-závislý transportér organických kationů. Nejnověji byl izolován a charakterizován potkaní a myší OCTN1. Potkaní OCTN1, klonován z placenty, je široce přítomen v různorodých

tkáních, obzvláště v játrech, střevě, ledvinách, mozku a placentě. Má 553 aminokyselin, což ukazuje významnou homologii k lidskému OCTN1 (85% podobnost), zajišťující na Na^+ -nezávislý a naopak na pH-závislý transport tetraethylamonia a celé řady organických kationů. Tento přenašeč obsahuje nízkoafinitní vazebné místo pro karnitin a proto nezprostředkovává jeho transport ve významném rozsahu. Nicméně, myší OCTN1, mající 553 aminokyselin, může zprostředkovat transport karnitinu Na^+ závislým způsobem, což ilustruje zjevnou mezidruhovou rozdílnost pro ten samý typ transportéru. **OCTN2** byl prvně izolován z lidské linie buněk placentárního trofoblastu a z cDNA lidských ledvin. Gen kódující lidský OCTN2 je lokalizován na chromozómu 5g31, skládá se z 10 exonů. OCTN2 polypeptid má 557 aminokyselin s 12 transmembránovými doménami a vykazuje 78,8 % homologii s OCTN1. OCTN2 funguje jako Na^+ dependentní transportér karnitinu, stejně jako Na^+ -nezávislý transportér pro ostatní kationy. Samotný transport L-karnitinu pomocí OCTN2 je vysoce afinní s hodnotou K_m 4,3 μM . Pro D-karnitin byla hodnota K_m 10,9 μM . Některé organické kationy a acyl estery karnitinu o krátkém řetězci, které se v současné době používají jako léčiva u různých poruch, jsou také transportovány pomocí OCTN2. Například acetyl-L-karnitin, který je používán jako neuroprotektivum u Alzheimerovy choroby, je přenášen lidským vysokoafinitním OCTN2 (K_m , 8,5 μM). OCTN2 je velice zajímavý farmakologicky a toxikologicky. Klinicky používaná léčiva charakteru kationů, jako je pyrilamin, quinidin, verapamil a valproát, jsou transportována OCTN2. Některé látky, např. emetin a chinin, významně inhibují OCTN2 zprostředkovaný transport. Nedávno bylo zjištěno, že β -laktamová antibiotika jako je cefaloridin, cefoselis, cefepim, cefluprenam, inhibují OCTN2 zprostředkovaný transport karnitinu. OCTN2 je u člověka exprimován zejména v srdci, kosterních svalech, ledvinách (proximální a distální tubuly a glomerulus), placentě, tenkém střevě a některých částech mozku (kortex, hippokampus, cerebellum). OCTN2 je exprimován v obou typech buněk tvořících HEB, tzn. jak v endoteliálních buňkách kapilár, tak v astrocytech. Zajímavostí je také polarizovaná lokalizace OCTN2 v membráně endoteliálních buněk. Není novinkou, že endoteliální buňky tvořící HEB jsou vysoce polarizovány a stejně tak i přenašeče lokalizované v luminální (apikální) nebo abluminální (basolaterální) membráně. Naproti tomu OCTN2 chybí v apikální membráně. Hlavní otázkou je tedy fyziologická funkce takto polarizované lokalizace. Byla také popsána regulace transportu organických kationů pomocí několika cest fosforylace. Aktivita OCTN2 může být regulována fosforylací a defosforylací pomocí specifických kináz. OCTN2

dále hraje důležitou roli v modulaci produkce triglyceridů. Poslední dosud identifikovaný člen rodiny OCTN, označený jako **OCTN3**, byl teprve nedávno izolován z myši. OCTN3 nebyl dosud klonován u jiných druhů, než je myš. Myši OCTN3 má 564 aminokyselin, je exprimován zejména v testes a jen zřídka v ledvinách. Funkčně OCTN3 zajišťuje transport karnitinu Na^+ -nezávislým způsobem, oproti myším typům OCTN1 a OCTN2, které transportují karnitin Na^+ -závislým způsobem. Typický organický kationt, jakým je TEA (tetraethylammonium), není pomocí OCTN3 přenášen. Transportér OCTN3 má také vyšší specifitu pro transport karnitinu, než OCTN1 a OCTN2. OCTN3 je unikátní z hlediska své omezené tkáňové distribuce a také Na^+ -nezávislým transportem karnitinu.^{33, 34, 35}

Další transportér pro karnitin, který byl popsán (Enomoto et al. 2002), se nazývá CT2 a je evolučně řazen mezi rodinu OCTN a organic anion transporters (OATs), není však přítomen v mozku.³⁶

Dále byl popsán transport karnitinu pomocí transportéru pro aminokyseliny $\text{ATB}^{0,+}$, v Na^+ - a Cl^- závislém systému, který je charakterizován nízkou afinitou a expresí v trávicím traktu, trachei, plicích, mléčné žláze a hippocampu.³⁷

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Cíl práce

L-karnitin je látka s potenciálním efektem na transportní mechanismy buněčných membrán. Cílem praktické části bylo zjistit, zda je CRT schopen zvýšit průnik centrálně aktivní látky přes HEB. Jako ukazatel případného efektu bylo zvoleno stanovení aktivity acetylcholinesterázy (AChE) v různých částech mozku laboratorního potkana po podání 7-methoxytakrinu (MEOTA).

Pracovní hypotéza: MEOTA je reverzibilní inhibitor acetylcholinesterázy a to i v CNS. Pokud L-karnitin zvýší průnik MEOTA k cílovým mozgovým strukturám, musí při současném podání obou testovaných látek dojít k zesílení inhibičního efektu MEOTA.

3.2 Uspořádání vlastního pokusu

K pokusům bylo použito celkem 24 samců laboratorního potkana kmene *Wistar albino*, konvenčního chovu, krmených peletovanou standardní Larsenovou dietou a s přísunem vody *ad libitum*. Hmotnostní rozpětí zvířat se pohybovalo v rozmezí 210-235 g. Zvířata byla rozdělena do 2 kontrolních a 2 pokusných skupin. V každé skupině bylo po 6 zvířatech.

Skupině K1 byl podán p.o. CRT a to celkem ve třech dávkách po 250 mg/kg vzájemně oddělených intervalem 24 hodin.

Skupině K2 byl podán pouze MEOTA a to v jednorázové dávce 100 mg/kg i.m.

Skupině P1 byl podán opět p.o. CRT a to ve třech po sobě následujících dávkách 250 mg/kg v intervalu 24 hodin, za 30 minut po poslední dávce pak následovalo i.m. podání MEOTA v dávce 100 mg/kg.

Skupině P2 byla ve stejném časovém sledu jako u P1 podána vyšší p.o. dávka CRT (400 mg/kg) a opět za 30 minut po poslední dávce následovalo i.m. podání MEOTA v dávce 100 mg/kg.

Zvířata byla usmrcena dekapitací za 30 minut po posledním podání testovaných látek. Následovalo šetrné vyjmutí mozku a jeho bezprostřední zmrazení při nízké teplotě pro pozdější odběr vzorků (frontální kůra, hipokampus, septum a bazální ganglia).

3.3 Stanovení aktivity AChE

Při stanovení aktivit cholinesteráz je možno využít mnoho principů. Obecným principem je, že do reakční směsi je dán enzym z různých zdrojů a vlastní reakce je zahájena přidáním substrátu. Po určité době, popř. kontinuálně, je sledován buď úbytek nerozloženého substrátu nebo přírůstek reakčních produktů, obojí buď přímo nebo nepřímo. Metod pro stanovení cholinesteráz bylo popsáno mnoho. Je možno však říct, že nejrozšířenější jsou modifikace těchto metod:

- kolorimetrické metody, které určují změnu zabarvení indikátoru při změně pH.
- elektrometrické metody, založené na měření změny potenciálu, způsobené H^+ ionty kyseliny uvolněné při štěpení substrátu.
- manometrické metody, určující objem CO_2 uvolněného kyselinou.

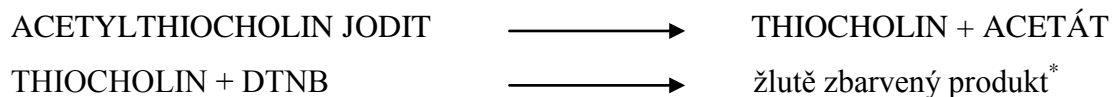
- titrační, využití neutralizace při hydrolýze vznikající kyseliny louhem při zachování konstantního pH.

- radiometrické, využití značených substrátů.

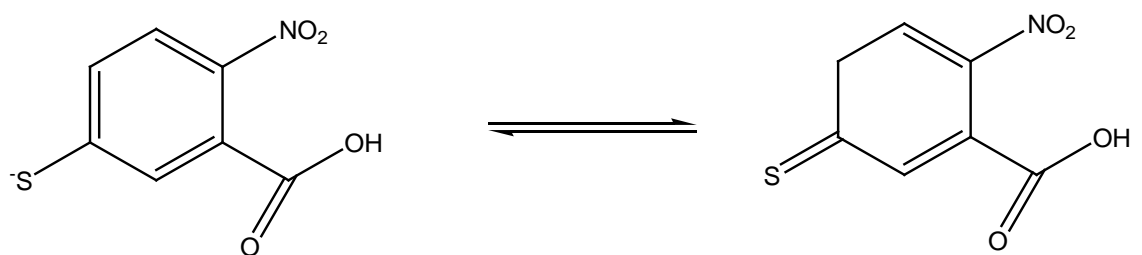
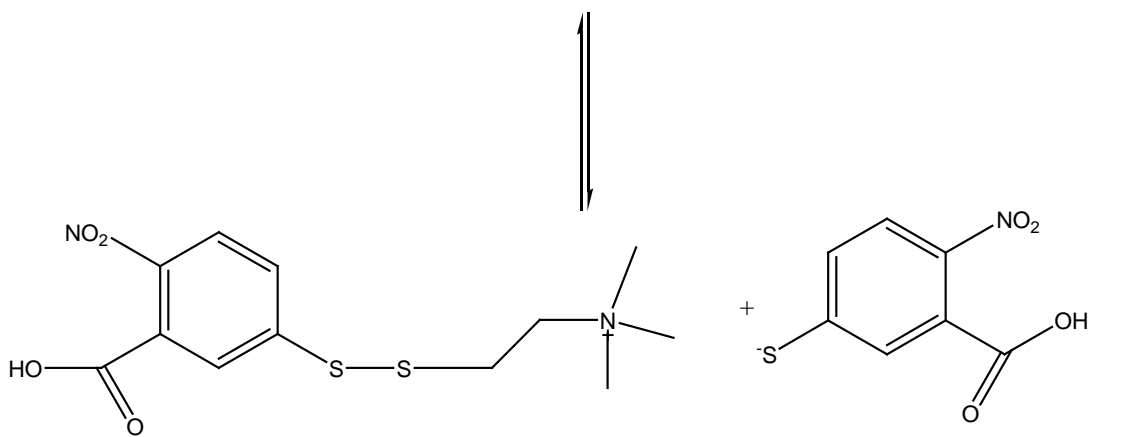
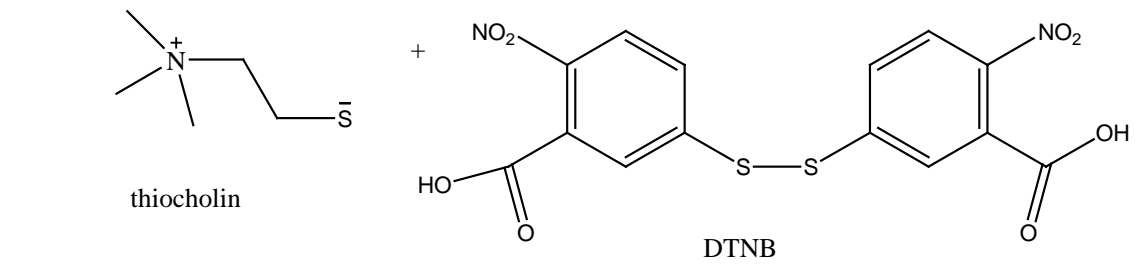
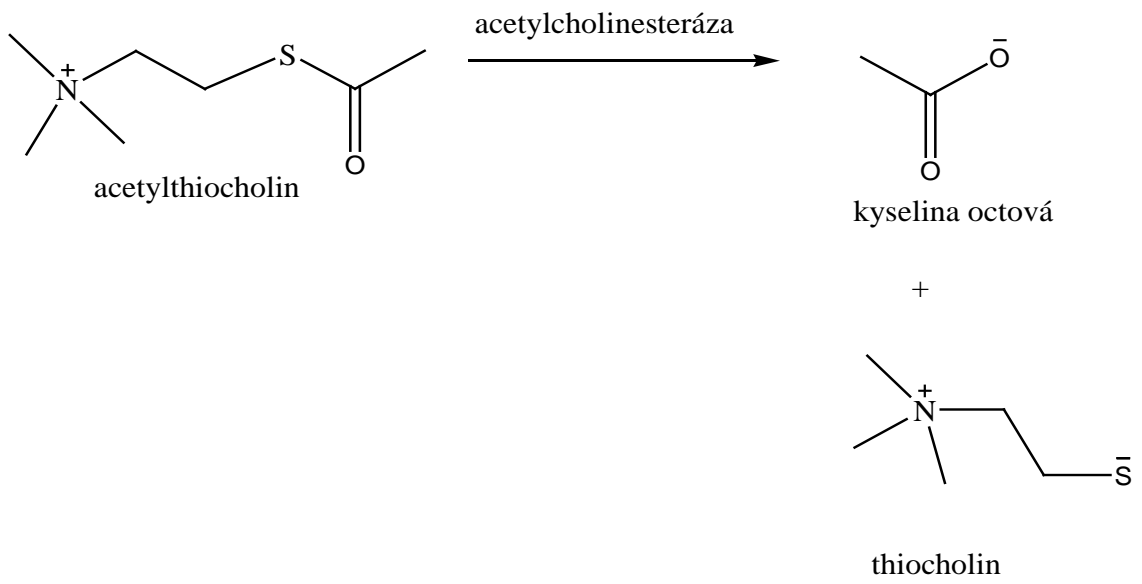
V našem experimentu byla použita modifikace kolorimetrické metody. Jde o tzv. Ellmanovu metodu, za použití 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoové kyseliny (DTNB, Ellmanovo činidlo).

3.3.1 Princip Ellmanovy metody

Ellmanova metoda je jedna z nejcitlivějších a nejpoužívanějších metod pro stanovení aktivity AChE a butyrylcholinesterázy (BuChE). Jako substráty se používají estery thiocholinu, které jsou cholinesterázami štěpeny na thiocholin a příslušnou kyselinu. Stanovuje se SH- skupina thiocholinu, která se naváže na DTNB, a jeho zbytek 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina je fotometrován při vlnové délce 436 nm. Optimální podmínky při stanovení jsou pH 7,6, teplota 25°C a iontová síla, která by měla odpovídat iontové síle fyziologického roztoku. Aktivita cholinesteráz se zvyšuje s rostoucí koncentrací substrátu a při určité hodnotě koncentrace, „maximum koncentrace“, nastává inhibice substrátu. ^{38, 39, 40, 41}



*produkt reakce je 5-merkapt-2-nitrobenzoová kyselina



3.3.2 Použitý materiál a chemikálie

VZOREK: potkaní mozek (frontální kůra, hipokampus, septum, bazální ganglia)

POUŽITÉ CHEMIKÁLIE:	Acetylthiocholin-jodit	Sigma-Aldrich
	DTNB	Sigma-Aldrich
	1,1,1,-tris-(hydroxymethyl)aminomethan	Lachema
	HCl 0,2M	Lachema

DALŠÍ MATERIÁL:

- špičky pipet
- zkumavky
- kyvety
- gáza
- gumové rukavice

POUŽITÉ PŘÍSTROJE:

- spektrofotometr firmy Helios
- homogenizátor

3.3.3 Pracovní postup Ellmanovy metody

Nejdříve je nutné připravit si zásobní roztoky. TRIS – HCL pufr se připraví rozpuštěním 24,2 g 1,1,1,-tris-(hydroxymethyl)aminomethanu v 1000,0 ml destilované vody. 50,0 ml tohoto roztoku bylo smícháno s 38,4 ml 0,2 M HCl, a doplněno destilovanou vodou na 200,0 ml a pH bylo upraveno na 7,6. Roztok DTNB byl připraven rozpuštěním jeho 0,1g v 50,0 ml 0,2 M TRIS pufru. Substrát pro reakci byl připraven rozpuštěním 0,029 g acetylthiocholin-jodidu v 10,0 ml destilované vody. Po přípravě roztoku následovala úprava vzorku. Mozek byl očištěn od zbytku srsti zvířete, dále zvážen a homogenizován pomocí speciálního homogenizátoru v tlustostěnné zkumavce s TRIS pufrém, dokud není z mozku uniformní disperze v pufru. Na každých 30 mg mozku byl přidán jeden ml pufru. Do kyvety se napipetuje 0,2 ml výše popsaným způsobem upraveného vzorku, přidá se 0,4 ml DTNB a 1,2 ml TRIS-HCl pufru. Reakce je zahájena přidáním 0,2 ml substrátu. Měření probíhalo při vlnové délce 436 nm. Pro kalibraci se místo vzorku do kyvety pipetuje roztok různých koncentrací cysteinu.

4. VÝSLEDKY

Při podání dávky MEOTA v dávce 100mg/kg i.m. (K2) bylo dosaženo snížení aktivity AChE oproti skupině, která byla premedikována podáním 3×250mg v intervalu 24h. karnitinu na kg hmotnosti (K1) v oblasti frontální kůry o 36,5%, v hippocampu o 14,5%, v septu o 23,5% a v bazálních gangliích o 9,3%. Dále byl zkoumán vliv současněho podání karnitinu a MEOTA. U skupiny P1, které byl podán karnitin v dávce 3× 250mg/kg/24h. p.o. spolu s dávkou MEOTA v hodnotě 100mg/kg hmotnosti těla, bylo zjištěno, že v frontální kůře došlo k snížení aktivity AChE oproti skupině, které byl podán samotný MEOTA (K2) o 32%, hippocampu o 8,5%, septu o 38,6%, bazální ganglia o 52,3%. U skupiny P1 došlo k snížení aktivity oproti kontrolní skupině premedikované samotným karnitinem (K1) v frontální kůře o 56,7%, hippocampu o 21,6%, septu o 53% a v bazálních gangliích o 56,7%. Dále byla stanovena aktivita AChE v skupině, které byl podán karnitin v dávce 3× 400mg/kg/24h. a MEOTA 100mg/kg i.m. (P2). Zde došlo k snížení aktivity enzymu AChE oproti skupině P1 v frontální kůře a to o 6,5% a dále v bazální ganglia o 18%. V hippocampu a septu nedošlo ke snížení aktivity, ale naopak vzrůstu. Po podání skoro dvojnásobné dávky karnitinu spolu se stejnou dávkou MEOTA toto činilo v hippocampu nárůst o 0,5% a v septu o 3,4% procenta oproti skupině P1. Skupina P2 ve srovnání s skupinou K2 (samotný MEOTA v dávce 100mg/kg) vykazovala v frontální kůře snížení aktivity o 36,3%, hippocampu o 7,9%, septum o 36,5% a bazální ganglia o 61%.

Skupina:	frontální kůra	hipokampus	septum	bazální ganglia
K1	425±25	222±20	766±30	1484±45
K2	270±20*	190±15	586±30*	1346±35*
P1	184±15**	174±15*	360±25**	642±35**
P2	172±15**	175±15*	372±25**	525±30**

Tabulka 2. Naměřené hodnoty aktivit AChE

hodnoty aktivity acetylcholinesterázy jsou vyjádřeny v nmol/min/100 mg vlhké tkáně

* signifikantní proti K1 na 5% hladině významnosti

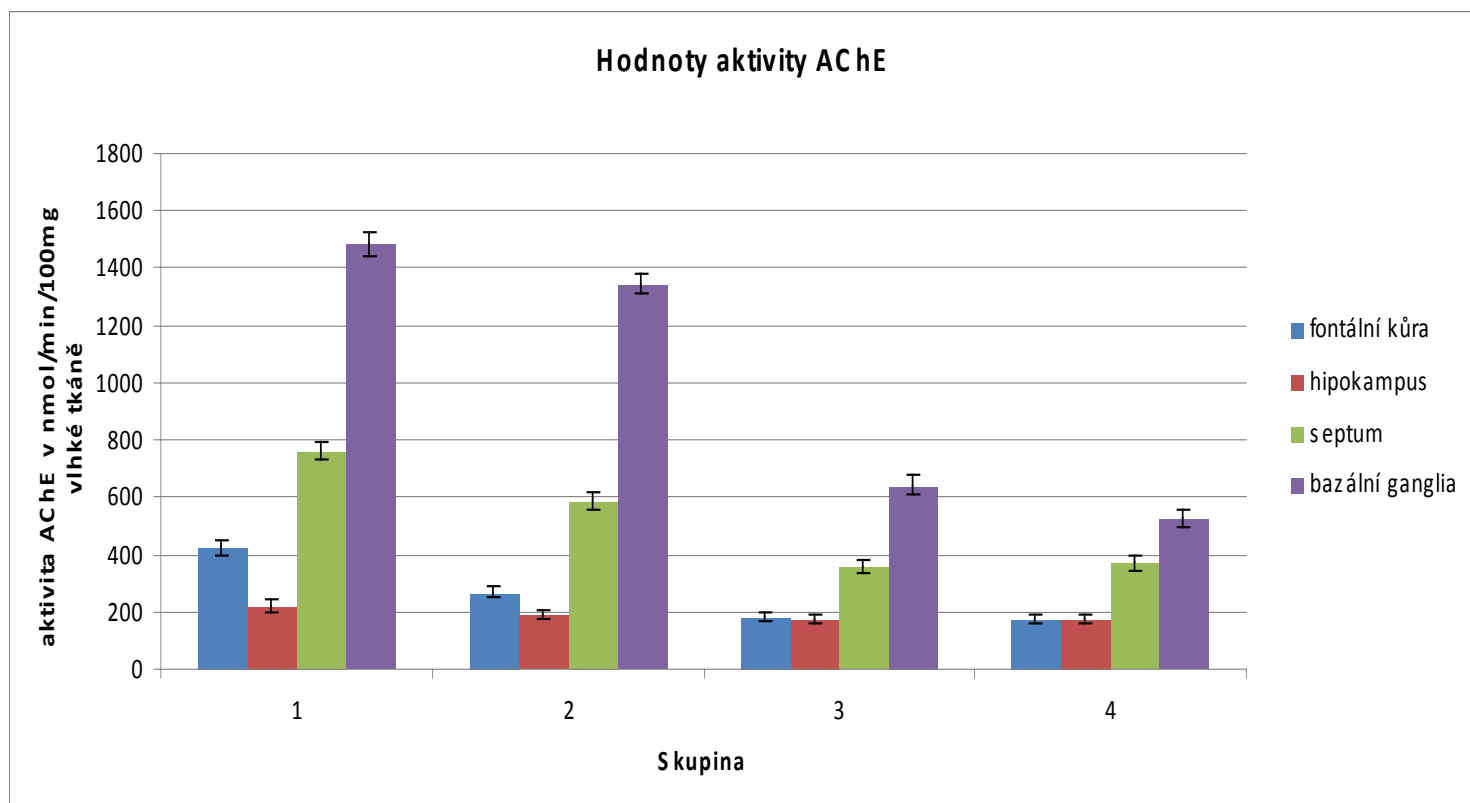
** signifikantní proti K2 na 5% hladině významnosti

Skupině K1 byl podán 3×L-karnitin 250 mg/kg p.o. v intervalech 24 hodin

skupině K2 byl podán MEOTA 100 mg/kg i.m.

skupině P1 byl podán 3× L-karnitin 250 mg/kg v intervalu 24h. + MEOTA 100 mg/kg

skupině P2 byl podán 3× L-karnitin 400 mg/kg v intervalu 24h.+ MEOTA 100 mg/kg



Graf 1. Naměřené hodnoty aktivity AChE

skupina 1 (K1)

skupina 2 (K2)

skupina 3 (P1)

skupina 4 (P2)

5. DISKUSE

5.1 Ellmanova metoda

Ke stanovení aktivity enzymu AChE v této práci bylo použito modifikace Ellmanovy metody. Jde o metodu s vysokou citlivostí, jednoduchostí provedení a vysokou specifitou. Právě tyto vlastnosti ji dělají ideální k použití pro experimentální účely a měření větších souborů vzorků. V průběhu doby bylo vyvinuto mnoho metod stanovení AChE, např. elektrometrické, manometrické, radiometrické, polarografické, fluorimetrické a jiné. Avšak rutinní použití těchto metod stěžuje laboratorní příprava vzorků, dlouhý čas měření, nedostatečná substrátová specifita a rušení matrix vzorku. Kolorimetrická Ellmanova metoda je všeobecně preferována k měření profesionální expozice a terapeutickému monitorování pacientů otrávených pesticidy. Vlastní stanovení je již dnes automatizována a adaptována pro přístroje používající mikrotitrační destičky. Ačkoliv mezi nesporné výhody patří rychlost, jednoduchost a nízké finanční náklady na provedení, Ellmanova metoda není schopna poskytnout přesné určení AChE v plné krvi a nebo erytrocytech z důvodu interakce absorpčního maxima 5-merkapto-2-nitrobenzoeové kyseliny a hemoglobinu při 412nm. Toto lze omezit ředěním vzorku, čímž se omezí senzitivita měření, nebo změnou vlnové délky fotometrování na 436nm. V našem případě bylo použito měření při 436nm.

Jako u každé laboratorní metody i zde je důležitý správný odběr vzorku a jeho zpracování. Pokud vzorek není určen ihned po odběru, je uchováván v mrazicím boxu při -20°C . Při stanovení aktivity AChE v jednotlivých částech mozku je nutný také správný odběr vzorku. Správné provedení analytické fáze měření je zvláště důležité u vzorků mozku potkana, kde je aktivita enzymu o tři řády nižší (nmol/min/100 mg mozkové tkáně), než je tomu u člověka ($\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{mg}$ mozkové tkáně).

5.2 Vliv současného podání L-karnitinu a MEOTA na aktivitu AChE

Za cílovou látku byl vybrán derivát takrinu MEOTA, což je reverzibilní inhibitor AChE (IAChE) ze skupiny akridinových derivátů. Míra jeho účinku v CNS byla měřena jako schopnost inhibovat enzym AChE v různých částech mozku laboratorního potkana.

Zkoumané oblasti mozku byly vybrány záměrně z důvodu nakupení velkého množství cholinergních vláken. Nejdříve byla měřena aktivita AChE po podání samotného MEOTA a to v dávce 100mg/kg hmotnosti i.m. . Pak byla stejná dávka MEOTA podána potkanům premedikovaných podáním 3× 250 a 400mg/kg L-karnitinu po sobě následujícím intervalu 24 hodin. Předpokládalo se, že pokud L-karnitin usnadňuje přenos látek přes HEB, dojde při stejné dávce inhibitoru enzymu do systémového řečiště k zesílení inhibičního potenciálu v CNS. Současně byl pozorován vliv podání samotného L-karnitinu na aktivitu AChE a to v dávce 3 × 250mg/kg p.o. po dobu tří dnů. Výsledky ukázaly, že k největšímu snížení aktivity AChE došlo za současného podání L-karnitinu a MEOTA a to v oblasti frontální kůry, septa a bazálních ganglií. Zde to tvořilo až snížení o 36,3% ve frontální kůře, 38,6% v septu a 61% v bazálních gangliích. Nejnižší hodnoty aktivity AChE byly přirozeně pozorovány při podání inhibitoru spolu s nejvyšší dávkou L-karnitinu. Překvapením ale bylo, že skoro dvojnásobná dávka způsobila jen nevýznamné snížení v oblasti frontální kůry a bazálních ganglií a to o 4,3% a 8,7%. V oblasti hipokampu a septa došlo dokonce ke zvýšení aktivity AChE při podání dávky 400mg/kg oproti dávce 250mg/kg L-karnitinu.

Rozdílné výsledky pro různé koncentrace L-karnitinu naznačují, že snížení aktivity AChE se neděje výlučně mechanismem zvýšení průniku MEOTA přes HEB do CNS, ale zřejmě i jiným způsobem. V úvahu připadá ovlivnění aktivního místa enzymu L-karnitinem, nebo spolupůsobení L-karnitinu a MEOTA v reverzibilní inhibici enzymu. Tento mechanismus má své maximum účinku, které se při podání dvojnásobné dávky L-karnitinu již nezvýší. Rozdíly v inhibici AChE mezi jednotlivými strukturami mozku mohou znamenat jejich rozdílný význam v působení MEOTA a L-karnitinu. Roli může také hrát vliv L-karnitinu v procesu syntézy a odbourávání acetylcholinu, tím je jeho vliv na enzym cholinacetyltransferázu a karnitinacetyltransferázu, která má důležitou roli v odstraňování acetylových zbytků.

6. ZÁVĚR

Při podání samotného MEOTA v dávce 100mg/kg i.m. došlo k statisticky významnému snížení aktivity AChE v frontální kůře, septu a bazálních gangliích oproti skupině K1. Při premedikaci podáním 3×dávky L-karnitinu v intervalu 24h. za současné

i.m. aplikace 100mg MEOTA došlo k statistickému snížení aktivity AChE v oblasti frontální kůry, septa a bazálních ganglií oproti podání samotného MEOTA. Toto platí jak pro podávání dávky 250 nebo 400mg L-karnitinu/kg p.o. V hipokampu došlo k statisticky významnému snížení aktivity AChE u skupiny P1 a P2 a to oproti skupině které byl podáván samotný L-karnitin (K1).

Z výše popsaných výsledků je patrné, že k nejvyššímu snížení aktivity AChE po podání MEOTA došlo u skupiny laboratorních potkanů premedikovaných L-karnitinem v oblasti frontální kůry, septa a bazálních ganglií. Ukázala se i určitá závislost na podané dávce L-karnitinu v zesílení inhibičního efektu MEOTA. Za dostatečnou lze však pokládat střední dávku 250 mg/kg hmotnosti. Při podání skoro dvojnásobné dávky již nedošlo k snížení aktivity AChE k tomu odpovídajícím způsobem. Ze sledovaných struktur to platilo nejvíce v případě septa a hipokampu.

Premedikace L-karnitinem zvýšila inhibiční účinek MEOTA v určitých částech mozku laboratorního potkana, proto se zdá být L-karnitin vhodným kandidátem pro zesílení účinku MEOTA. Jestli se toto zvýšení účinku MEOTA děje ovlivněním aktivního místa enzymu, zvýšením přestupu MEOTA přes HEB, nebo jiným mechanismem však není dosud známo.

Abstrakt

S tím jak populace stárne, se zvyšuje prevalence mnoha neurodegenerativních chorob, rakoviny a infekce mozku. To je jeden z důvodů, proč je hematoencefalická bariéra a její transportní mechanismy intenzivně zkoumány. Hematoencefalická bariéra je unikátní membránová bariéra, která těsně odděluje mozek od cirkulující krve. Hematoencefalická bariéra je tvořena spojením těsně přiléhajících tight junction mezi endotelovými buňkami kapilár mozku, které nejsou fenestrovány a které vykazují minimální pinocytózu. Endotelové buňky kapilár vytvářejí polarizovanou bariéru, která reguluje přenos molekul přes hematoencefalickou bariéru. L-karnitin je složka nepostradatelná v periferních tkáních pro transfer mastných kyselin k jejich oxidaci do buňky, akumulující se v mozku nehledě na nízkou β -oxidaci v tomto orgánu. V případě vstupu do mozku, L-karnitin přechází hematoencefalickou bariéru přes specifické transportéry pro karnitin. Cílem práce bylo popsat současné informace o hematoencefalické bariéře, L-karnitinu, transportních mechanismech přes

hematoencefalickou bariéru a zjistit zdali podání L-karnitinu může ovlivnit efekt 7-methoxytakrinu. Jako ukazatel efektu testovaného léčiva bylo zvoleno stanovení aktivity AChE Ellmanovou metodou ve vybraných částech mozku potkana. Aktivita AChE byla měřena ve frontální kůře, hipokampu, septu a bazálních gangliích laboratorního potkana. Výsledky ukázaly, že 7-methoxytakrin prochází hematoencefalickou bariérou a jeho hladina v mozku slabě vzrostla po opakovaném podání L-karnitinu.

Abstract

Many neurodegenerative diseases, cancer and infections of the brain become more prevalent as population become older. That is one of the reasons, why blood-brain barrier and its transport mechanisms are intensively investigated. The blood-brain barrier is a unique membranous barrier that tightly segregates the brain from the circulating blood. The blood-brain barrier is formed by the connection of closely adjacent tight junctions between the capillary endothelial cells, which are not fenestrated and which display minimal pinocytosis. The capillary endothelial cells form a polarized barrier, which regulates transport of molecules across the blood-brain barrier. L-carnitine is compound necessary in the peripheral tissues for a transfer of fatty acids for their oxidation within the cell, it accumulates in the brain despite low β -oxidation in this organ. In order to enter the brain, L-carnitine has to cross the blood-brain barrier via specific carnitine transporters. The aim of this work was to describe recent information about blood-brain barrier, L-carnitine, transport mechanisms across blood-brain barrier and to find whether administration of L-carnitine can affect effect of 7-methoxytacrine. As a marker of the effect of drugs tested was chosen determination of activity of AChE by Ellman method in selected parts of the rat brain. Activity of AChE was measured in the frontal cortex, hippocampus, septum and basal ganglia of laboratory rat. The results showed that 7-methoxytacrine crossed blood-brain barrier and its levels in the brain were weakly increased after L-carnitine repeated administration.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Shrenik P.Shah, Drug delivery to the central nervous system: a review. Pharmacy Department, M.S. University of Boroda, Journal of Pharmaceutical Science 6, 2003, s. 252-237.
- [2] Čihák R. Anatomie 3. Grada Publishing, Praha, 1997.
- [3] Pardridge, W.M., Transport of small molecules through the blood – brain barrier: biology and methodology, Advanced Drug Delivery Review 15, 1995, s. 5-36.
- [4] Schinkel A.H.,a kol. Destruction of mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs, Cell 77, 1994, s. 491-502.
- [5] Akira T., Ikumi T., Carrier-mediated or specialized transport of drugs across the blood-brain barrier, Faculty of Pharmaceutical Sciences Kanazawa, Advanced Drug Delivery Review 36, 1999, s. 277-290.
- [6] Pardridge W.M., Oldendorf W.H., Kinetics of blood-brain barrier transport of hexoses, Biochemistry Biophysic Acta 382, 1975, s. 377-392.
- [7] del Pino M.M.S., Peterson D.R., Neutral amino acid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of blood-brain barrier, Journal of Biology and Chemistry, 270, 1996, s. 14913-14918.
- [8] Pardridge W.M., Blood-brain barrier delivery, Drug Discovery Today 12, 2007, s.54-60.
- [9] Benrabh H., Lefauconnier J.M., Glutamate is transported across the rat blood-brain barrier by sodium-independent system, Neuroscience Letters, 1996, s. 9-12.

- [10] Tamai I., Tsuji A., Drug delivery through the blood-brain barrier, *Advanced Drug Delivery Review* 19, 1996, s. 401-424.
- [11] Yamazaki M., Terasaki T., Carrier-mediated transport of H₁-antagonists at the blood-brain barrier: A common transport system of H₁-antagonists and lipophilic basic drugs, *Pharmaceutical Research* 1, 1994, s. 1516-1519.
- [12] Tamai I., Ohashi R., Nezu J., Molecular and functional identification of sodium ion-dependent high affinity human carnitine transporter OCTN2, *Journal of Biological Chemistry* 273, 1998, s. 2387-2382.
- [13] Cathaleen S., Hong S., Role of PepT2 in peptide/mimetic trafficking at the blood-cerebrospinal fluid barrier: Studies in rat choroids plexus epithelial cells in primary culture, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 301, 2002, s.820-829.
- [14] Ikumi T., Akira T., Transporter-mediated permeation of drugs across the blood brain barrier, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89, 2000, s. 1371-1388.
- [15] Rolf D., Spray D.C. Nedergaard M., *Blood-Brain Barriers*, Wiley-VCH, 2006.
- [16] Tamai I., Sai H., Kobayashi H., Structure-internalization relationship for adsorptive mediated endocytosis of basis peptides at the blood-brain barrier, *Journal of Pharmacology* 280, 1997, s. 410-415.
- [17] Mayer U., Wageneear E., Beijnen J.H., Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the *mdr1a* P-glycoprotein, *British Journal of Pharmacology* 119, 1992, s. 1038-1044.
- [18] Pardridge WM, *Brain metabolism: A perspective from the blood brain barrier*, *Physiology Review* 63, 1983, s.1481-1535.
- [19] Begley J.D., *Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilites*, School of Biomedical Science, King`s College London, *Pharmacology & Therapeutics* 104, 2004, s. 29-45.

[20] Girardin F, Membrane transporter proteins: a challenge for CNS drug development, *Dialogues in Clinical Neuroscience* 8 , 2006, s. 311-321.

[21] Griffith D, Jarvis S., Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cell. *Biochimica et Biophysica Acta* 1286, 1996, s. 153-181.

[22] Kalaria R., Harik S., Nucleoside transporter of cerebral microvessels and choroid plexus, *Journal of Neurochemistry* 47, 1986, s.1849-1856.

[23] Rebouche, C.J. Carnitine function and requirements during the life cycle, *FASEB J.* 6, 3379-3386.

[24] Steidl L., Zbránková B., *Význam karnitinu a jeho použití v medicíně*, Triton, Praha, 2000.

[25] Cibulka R., *Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. Klinická biochemie metabolismu* 13 , 2005, s. 24-28.

[26] Rebouche, J., Hermann S., Carnitine metabolism and it's regulation in microorganisms and mammals, *Annual Reviews of Nutrition* 18, 1998, s. 39-61.

[27] Ferrari, R., Di Mauro, S., Scherwood, G.: *L-carnitine and it's role in medicine. From function to therapy*, Academia Press. London, 1992.

[28] Rebouche, C.J. and Engel A.G. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man, *Biochimica et Biophysica Acta* 630 , 1980, s. 22-29.

[29] Evans A., Fornasini G., *Pharmacokinetics of L-carnitine*, *Clinical Pharmacokinetics* 42, 2003, s. 941-967.

[30] Voet D., Voetová J.G.: *Biochemie*, Victoria Publishing a.s. Praha, 1995.

- [31] Frédéric M., Wanders R., Carnitine biosynthesis in mammals, *Biochemistry Journal* 361, 2002, s. 417-429.
- [32] Longo N., Pasquali M., Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle, *American Journal of Medical Genetics* 142C, 2006, s. 77-85.
- [33] Lahjouji K., Grant A., Carnitine transport by organic cation transporters and systemic carnitine deficiency, *Molecular Genetics and Metabolism* 73, 2001, s.287-297.
- [34] Kido Y., Tamai I., Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier, *Journal of Neurochemistry* 79, 2001, s.959-969.
- [35] Miecz D., Januszewicz E., Localization of organic cation/carnitine transporter (OCTN2) in cells forming the blood-brain barrier, *Journal of Neurochemistry*, 2007, s.1-11.
- [36] Enomoto A., Wempe M., Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis, *Journal of Biological Chemistry* 277, 2002, s. 3262-3267.
- [37] Nakanishi T., Hatanaka T., Na⁺- and Cl⁻ - coupled active transport of carnitine by the amino acid transporter ATB (O,+)₁ from mouse colon expressed in HRPE cells and *Xenopus oocytes*, *Journal of Physiology* 532, 2001, s.297-304.
- [38] Bajgar J., Stanovení aktivity cholinesterázy v lidské krvi – možná modifikace pro polní použití, *Vojenské zdravotnické listy* 46, 1972, s. 78-80.
- [39] Worek F., Ulrike M., Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, *Clinica Chimica Acta* 288, 1999, s.73-90.
- [40] Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, 7, 1961, s. 88-95

[41] Bajgar J., Michalek H., Bisso G.M., Inhibition of acetylcholinesterase molecular forms of the rat frontal cortex by 7-methoxytacrine, *Homeostasis*, 35, 1994, s. 301-303

[42] Gudjonsson H., , Shug L., Studies of carnitine metabolism in relation to intestinal absorption, *American Journal of Physiology* 248, 1985, s. 313-319.

[43] Friedmann, S., Fraenkel, G. Reversible enzymatic acetylation of carnitine. *Arch. Biochem. Biophys*, 1955, 59, s. 491–501.

[44] Gulewitsch W, Krimberg R. 1905. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung. Über das Carnitin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 45, s. 326–330.