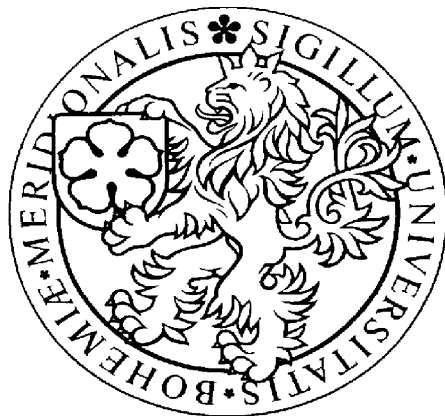


**BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



**Mechanismus účinku katecholaminů  
v termogenezi izolovaných lidských leukocytů**

**Magisterská diplomová práce**

**Bc. Aleš Mikulka**

**Vedoucí práce: prof. RNDr. Ladislav Janský, DrSc.**

**2007**

## Magisterská diplomová práce

Mikulka A., 2007: Mechanismus účinku katecholaminů v termogenezi izolovaných lidských leukocytů. [The Mode of Catecholamine Adrenergic Action in Human Peripheral Mononuclear Blood Cells. Master Thesis in Czech] – 55 pages.

Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

### Anotation:

Effects of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_3$  adrenergic agonists on resting oxygen consumption and effects of  $\alpha$  and  $\beta_2$  adrenergic antagonists on noradrenaline stimulated oxygen consumption of the human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were studied using the Clark oxygen electrode. It was found that, the  $\alpha_2$  agonist increases slightly the resting oxygen consumption in the PBMC while, the  $\beta_2$  and the  $\alpha$  antagonists inhibit the noradrenaline stimulated oxygen consumption considerably. The  $\alpha_1$  and  $\beta_3$  agonists have no effect on the resting oxygen consumption. The NA thermogenesis in the PBMC is mediated by  $\beta_1$  (25%),  $\beta_2$  (8%) and  $\alpha_2$  (12%) adrenergic receptors and not by  $\beta_3$  adrenoreceptors. The NA thermogenesis in the PBMC is mediated by different adrenoreceptors than the NA thermogenesis in the brown adipose tissue.

The NA thermogenesis of PBMC is independent on the presence of organic substrates in the cultivation medium. Administration of external substrates (glucose, glutamine, methionine) to the medium has no effect on resting and NA stimulated oxygen consumption of PBMC, while administration of cysteine increases NA stimulated oxygen consumption considerably, indicating that acetyl-CoA could be an important substrate for NA thermogenesis in PBMC.

Tato magisterská diplomová práce byla finančně podpořena darem od lázněmi Priessnitz u Jeseníku.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracoval samostatně pouze s použitím citované literatury.

.....  
Bc. Aleš Mikulka

V Českých Budějovicích dne 19.4.2007

### Poděkování:

Především bych rád poděkoval mému školiteli panu profesoru Ladislavu Janskému, DrSc. za jeho nesmírnou trpělivost a pomoc při řešení diplomové práce, za jeho vstřícnost, ochotu debatovat o problémech a jeho přátelský ba až kamarádský přístup ke mně. Mé vřelé díky patří i mé rodině, která mě nejen finančně podporovala a dodávala mi energii a optimismus v průběhu celého studia, ale i motivovala k lepším výkonům. Můj obdiv a vřelou úctu si zasluhují všichni dobrovolní dárci krve, bez kterých by tuto práci nebylo možno realizovat, a proto bych jim chtěl tímto poděkovat. Můj dík také patří panu profesoru Pavlu Blažkovi, Mgr. Janu Okrouhlíkovi, Bc. Haně Kratochvílové a ostatním kolegům naší laboratoře fyziologie živočichů za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. A na závěr nemohu opomenout velmi cennou pomoc MUDr. Františka Součka a jeho kolektivu za jeho trpělivost při odběru krve.

# Obsah

<b>1. Úvod</b>	1
<b>2. Literární přehled</b>	2
2.1. Biochemická podstata hormonální termogeneze u živočichů a lidí	2
2.2. Termogenní účinek ostatních hormonů	4
2.3. Adrenergní receptory a jejich fyziologická funkce	4
2.4. $\alpha_1$ a $\alpha_2$ adrenergní receptory	6
2.5. $\beta_1$ , $\beta_2$ a $\beta_3$ adrenergní receptory	7
2.6. Výskyt adrenergních receptorů na lidských izolovaných leukocytech	8
2.7. Úloha vnitrobuněčných signálních molekul	8
2.8. Hnědá tuková tkáň	9
2.9. Metody měření hormonální termogeneze	10
<b>3. Cíle práce</b>	11
<b>4. Materiál a metody</b>	12
4.1. Odběr a zpracování vzorků	12
4.2. Izolace bílých krvinek (PBMC)	12
4.3. Stanovení počtu bílých krvinek (PBMC)	13
4.4. Měření spotřeby kyslíku	13
Princip polarografického měření	14
Popis měřicího systému	14
Kalibrace	16
Průběh vlastního měření	17
4.5. Zpracování naměřených dat	17
4.6. Použité kultivační média, farmaka a chemikálie	18
<b>5. Výsledky</b>	
5.1. Spotřeba $O_2$ izolovanými PBMC po homogenizaci	20
5.2. Ovlivnění spotřeby $O_2$ PBMC použitím farmak	20
5.3. Vliv exogenních substrátů na termogenezi lidských PBMC	29
<b>6. Diskuze</b>	
6.1. Úloha adrenergních receptorů v termogenezi lidských leukocytů	33
6.2. Význam různých substrátů pro NA termogenezi PBMC	35
<b>7. Závěr</b>	38
<b>8. Literatura</b>	39
<b>9. Seznam zkratk</b>	45
<b>10. Příloha</b>	
10.1. Chemické složení kultivačních médií	46
10.2. Chemické složení Hanks` fyziologického roztoku	47
10.3. Farmakologické vlastnosti použitých léčiv	48

# 1. Úvod

„ Vynález je jen 1% inspirace a 99% dřiny “  
Thomas Alva Edison

Netřesovou termogenezi (NST) bývá označována produkce tepla vyvolaná působením katecholaminů u malých savců vystavených chladu (Janský, 1973). Největší množství tepla při netřesové termogenezi vzniká v hnědém tuku lokalizovaném především kolem páteře, mezi lopatkami a v podpažní jámě. Účinek katecholaminů je u malých savců zprostředkován hlavně  $\beta_3$  adrenergními receptory umístěnými na membráně cílových buněk. Byla však prokázána i úloha  $\alpha_1$  adrenoreceptorů. Biochemická podstata této termogeneze spočívá v odpřažení oxidací od fosforylací, v důsledku zpětného přesunu protonů přes mitochondriální membránu, prostřednictvím tzv. odpřahujících proteinů (UCP).

Výzkum hormonální termogeneze u lidí se potýká s řadou problémů. Mezi ně patří velmi malý výskyt hnědé tukové tkáně, obtížné získávání lidských tkání pro molekulárně biologické studie a infuze katecholaminů, které představují určité zdravotní riziko pro pokusné osoby. Navíc u dospělého člověka, který nemá dostatek hnědého tuku, nebyl výskyt netřesové termogeneze donedávna předpokládán. Recentní nálezy českých autorů však dokázaly existenci NST noradrenalinového a adrenalinového typu i u člověka (Lesná a kol., 1999).

Vzhledem k mizivému množství hnědého tuku se uvažuje o tom, že aktivace hormonální termogeneze u lidí je řízena jinými mechanismy než u živočichů, a to jak za podmínek *in vivo*, tak i za podmínek *in vitro*. Nedávné výsledky naší laboratoře prokázaly, že i izolované lidské leukocyty (PBMC) po aplikaci katecholaminů zvyšují svůj metabolismus (Janský a kol., 2006). Uvažuje se o tom, že by tedy mohly být využity pro studium hormonální termogeneze za podmínek *in vitro*.

Dalším důvodem pro použití leukocytů při studiu hormonální termogeneze je, že u nich byla prokázána přítomnost specifických  $\alpha$  a  $\beta$  adrenergních receptorů (Brodde a kol., 1986; Fleury a kol., 1997). Mechanismus účinku katecholaminů na hormonální termogenezi PBMC a úloha různých typů adrenergních receptorů včetně vlivu exogenních substrátů, které jsou využívány při tvorbě tepla, nebyly dostatečně studovány. Cílem této práce bylo farmakologickým přístupem a měřením spotřeby kyslíku u PBMC tuto problematiku vyřešit.

## **2. Literární přehled**

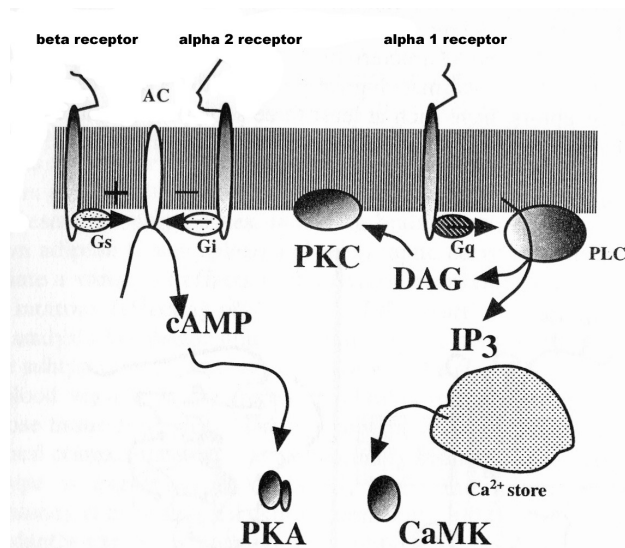
### **2.1. Biochemická podstata hormonální termogeneze u živočichů a lidí**

Hormonální termogeneze představuje výkonný termoregulační mechanismus zodpovědný za chladovou adaptaci savců. Podílí se na udržování tepelné homeostázy v chladu. Tato produkce tepla není závislá na svalových kontrakcích a je vyvolána působením katecholaminů (adrenalin, noradrenalin) na adrenergní receptory adipocytů hnědé tukové tkáně u živočichů (Janský, 1973).

Hormonální termogeneze je vyvinuta nejvíce u malých savců, kde produkce tepla může osmkrát převýšit bazální hodnoty. S rostoucí hmotností organismu velikost hormonální produkce tepla klesá a u savců, kteří jsou těžší než 10 kg je už intenzita katecholaminové termogeneze velmi malá. U dospělých zvířat může být opětovně vyvolaná dlouhodobým působením chladu (Janský, 1973, 1988, 1995). Hormonální termogeneze začíná působit přibližně pod termoneutrální zónou a představuje tak první linii obrany vůči chladu.

U živočichů je hormonální termogeneze řízena termoregulačními centry v hypotalamu a je realizována prostřednictvím nervových drah sympatického nervového systému. Při vnějším stresovém stimulu ať už jde o chlad či nadměrné přejídání (Perkins a kol., 1981) dochází k uvolnění noradrenalinu a jeho vazbě převážně na  $\beta_3$  adrenoreceptory (Cannon a kol., 1996, 2000; Zhao a kol., 1998) a na synergicky působící  $\alpha_1$  adrenergní receptory (Zhao a kol., 1997; Bronnikov a kol., 1998) buněk hnědého tuku. Vazba katecholaminu na  $\beta_3$  adrenergní receptor vede přes stimulaci G(s)-proteinu k aktivaci adenylátcyklázy. Vzniká cAMP, který pracuje jako druhý posel a aktivuje proteinkinázu A (viz. obr. 2.1.). Proteinkináza A fosforyluje hormon-senzitivní lipázu, která katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolů na glycerol a volné mastné kyseliny. Volné mastné kyseliny a acetyl-CoA slouží jako substrát pro mitochondriální  $\beta$ -oxidace a vyvolávají odpřažení těchto oxidací od fosforylace, takže nedochází k tvorbě ATP.

V důsledku oxidace mastných kyselin vzniká pak pouze teplo, které se přenáší z adipocytů hnědé tukové tkáně krevním průtokem do celého organismu. Podmínkou pro produkci tepla u živočichů je přítomnost specifického proteinu UCP1 o molekulární váze 32kDa, který se nachází na vnitřní straně mitochondriální membrány.



**Obr. 2.1. Intracelulární signální dráhy pro  $\beta$ ,  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  adrenergické receptory.**

(Bengtsson a kol., 1996, upraveno)

Jedná se o protonový kanál s vazbou na purinové nukleotidy (GDP, ATP), který je v klidovém stavu uzavřen. Volné mastné kyseliny odpojí GDP a učiní membrány mitochondrií propustné pro vodíkové ionty ze substrátových oxidací zpět do mitochondriální matrix (Cannon a kol., 1982; Ricquier a kol., 1983; Bouillaud a kol., 1986; Casteilla a kol., 1987). Tímto je zajištěno odpražení oxidace od fosforylace a spalování substrátu pak může probíhat tak dlouho, dokud je přítomný vhodný substrát. Tento děj je závislý na stupni aktivace sympatického nervového systému, na velikosti produkce noradrenalinu a na množství substrátu. Nezávisí však na akceptoru energie ADP.

Hormonální termogeneze u lidí se liší v mnoha ohledech od hormonální netřesové termogeneze u živočichů a byla donedávna považovaná za málo pravděpodobnou (Cannon a kol., 2000) z důvodů nedostatečného množství hnědé tukové tkáně u lidí (Heaton, 1972). Teprve experimenty na lidech v termoneutrálním prostředí s použitím různých koncentrací isoprenalinu, noradrenalinu a adrenalinu poukázaly na její přítomnost (Lesná a kol., 1999). Hormonální termogeneze u chladově neadaptovaných lidí je indukována působením noradrenalinu a adrenalinu. U chladově adaptovaných osob je adrenalinová termogeneze potencována, zatímco noradrenalinová termogeneze není chladovou adaptací ovlivněna (Janský a kol., 1996b, 1997; Šrámek a kol. 1999; Vybíral a kol., 2000 a,b).

Produkce tepla vyvolaná působením katecholaminů u lidí vzniká v kosterních svalech

(Lundholm a kol., 1965; Astrup, 1986; Astrup a kol., 1984, 1985a,b, 1986, 1989; Simonsen a kol., 1999) a v bílé tukové tkáni (Simonsen a kol., 1992, 1993). Určitou roli v produkci tepla u lidí zde má i malé množství hnědé tukové tkáně (Huttunen a kol., 19981). Vazba katecholaminů na efektorové buňky je zprostředkována  $\beta_1$  a  $\beta_2$  adrenergními receptory (Astrup a kol., 1989; Blaak a kol., 1994). Úloha  $\alpha$  adrenergních receptorů nebyla neprokázána (Frank a kol., 1996). Produkce tepla a odpřažení mitochondriální  $\beta$ -oxidace od fosforylace se u lidí účastní především proteiny UCP2 (Negre-Salvayre a kol., 1997) a UCP3 (Giacobino, 1999). Mechanismus účinku katecholaminů a jeho biochemická podstata u lidí nebyla však zatím dostatečně objasněna.

## **2.2. Termogenní účinek ostatních hormonů**

Je nesporné, že vedle noradrenalinu mají termogenní účinek i jiné hormony, jmenovitě adrenalin, tyroidní hormony, glukagon, steroidní hormony, adenokortikotropní hormon (ACTH) a inzulin. Termogenní účinek je také přisuzován sympatomimetickým látkám jako je např. isoprenalin, efedrin a kofein.

Adrenalinová termogeneze vzniká převážně ve svalech. Po působení adrenalinu vzniká v hnědém tuku jen asi 40% celkové produkce tepla. U zvířat je její velikost ovlivněna chladovou adaptací jen málo a je menší než u noradrenalinu (Janský, 2003, 1993, 2002). Tyroidní hormony zvyšují bazální metabolismus asi o 10-50% a působí téměř na všechny orgány v těle s výjimkou mozku. Jejich účinek je spíše permissivního charakteru, tzn. že vytváří podmínky pro rozvoj termogeneze jiných hormonů. Glukagonová termogeneze se vyskytuje hlavně u ptáků a je lokalizovaná v kosterní svalovině a v játrech. Existuje řada údajů, které naznačují, že hormony se ve svém termogenním účinku vzájemně doplňují. Detailní biochemický mechanismus termogenního působení různých hormonů není však definitivně objasněn (Janský, 2005).

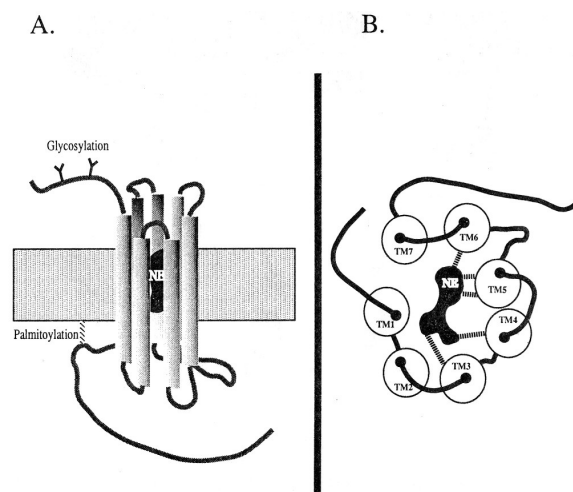
## **2.3. Adrenergní receptory a jejich fyziologická funkce**

Adrenergní receptory (adrenoreceptory) jsou membránové povrchové proteiny, které zprostředkovávají působení katecholaminů (adrenalin, noradrenalin) na membránách cílových buněk. Patří do rozsáhlé rodiny receptorů spojených s G-proteiny (Kobilka, 1992). Tato rodina obsahuje

několik stovek členů, zejména receptorů pro peptidy (vasopresin, oxytocin, angiotenzin), pro bílkoviny (glukagon, folikuly stimulující hormon, luteinizační hormon), pro katecholaminy a jiné malé molekuly (acetylcholin, dopamin, histamin, prostaglandin) a také pro světlo.

Adrenoreceptory jsou tvořeny jednovláknovým polypeptidickým řetězcem obsahujícím sedm transmembránových úseků (domén), které jsou složeny z 20-30 hydrofobních aminokyselin. Domény procházející membránu mají konformaci  $\alpha$ -helixů a jejich C-terminální konec směřuje dovnitř buňky, kdežto N-terminální konec směřuje ven z buňky (obr. 2.3). Cytoplasmatické domény poskytují vazebná místa pro fosforylaci proteinkinázy A, proteinkinázy C a G-protein receptor kinázy (Lefkowitz a kol., 1988; Strosberg, 1991; Kobilka, 1992; Strosberg, 1992).

Farmakologická klasifikace adrenergických receptorů na  $\alpha$  a  $\beta$ -adrenoreceptory byla poprvé provedena Ahlquistem v roce 1948 na základě vazby specifických agonistů a antagonistů a jejich rozdílné afinitě k receptorům. V současné době rozlišujeme tři hlavní skupiny adrenoreceptorů:  $\alpha_1$  adrenergní receptory,  $\alpha_2$  adrenergní receptory a  $\beta$  adrenergní receptory.  $\beta$  adrenoreceptory se dále dělí na tři podskupiny ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  a  $\beta_3$ ).



**Obr. 2.3. Strukturní model adrenergických receptorů.** (A) Boční pohled na transmembránové domény receptoru s navázanou molekulou noradrenalinu. (B) Horní pohled na receptor. Zachycena vazba noradrenalinu na transmembránové domény. (Strosberg a kol., 1996, upraveno)



Všechny typy adrenergických receptorů se liší svojí funkcí, molekulární stavbou, strukturou i vazbou specifických farmak. Vyskytují se prakticky ve všech orgánech a tkáních zvířat i lidí. Adrenergní receptory mají důležité regulační úlohy v řadě metabolických drah. Jednou z nich je katecholaminová indukce hormonální termogeneze u živočichů.

Katecholaminy (adrenalin, noradrenalin) prostřednictvím adrenoreceptorů podmiňují glykogenolysu v játrech a svalech, lipolysu v tukové tkáni, vasodilataci v kosterní i srdeční svalovině, mozku a vasokonstrikci cév kůže a střev. Navozují uvolnění plicních bronchů a bronchiolů, zvyšují rychlost a sílu srdečních stahů, zvyšují krevní tlak. Jsou produkovány prakticky za všech stresových situací.

#### **2.4. $\alpha_1$ a $\alpha_2$ adrenergní receptory**

$\alpha_1$  adrenergní receptory jsou složeny z 466-560 aminokyselin a podle nové nomenklatury (Hieble a kol., 1995; Watson a kol., 1995; Kikuchi-Utsumi a kol., 1997) se rozdělují do třech funkčních podskupin na ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  a  $\alpha_{1D}$ ). Jejich klasifikace vychází z různých afinit několika antagonistů k receptorům. Farmaka 5-methyl urapidil (5-MU), WB4101 a (+)-niguldipin mají vysokou afinitu k  $\alpha_{1A}$  adrenergním receptorům, chlorethylclonidin k  $\alpha_{1B}$  adrenoreceptorům (Ford a kol., 1994; Minneman a kol., 1994) a antagonistu BMY 7378 k  $\alpha_{1D}$  receptorům (Goetz a kol., 1995; Saussy a kol., 1996).

$\alpha_{1A}$  adrenergní receptorová stimulace vede přes aktivovaný G(q)-protein k mobilizování intacelulárních  $Ca^{2+}$  zásob (Michell, 1975). Zvýšená koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů způsobí pomocí aktivované fosfoinositidázy C (PIC) štěpení fosfatidylinositolu 4,5-bis-fosfátu ( $PIP_2$ ) na inositol 1,4,5-trifosfát ( $IP_3$ ) a diacylglycerol (DAG).

Při pokusech na potkanech byla zjištěna přítomnost  $\alpha_{1A}$  adrenergních receptorů ve slezině, hnědé tukové tkáni, srdci, mozkové kůře a cévních stěnách;  $\alpha_{1B}$  adrenoreceptory jsou exprimovány v játrech, srdci, mozkové kůře, slezině a méně početněji v hnědé tukové tkáni; a  $\alpha_{1D}$  adrenergní receptory se vyskytují převážně v srdci, mozku a hnědé tukové tkáni (Lomasney a kol., 1991; Kikuchi-Utsumi a kol., 1997).

$\alpha_2$  adrenergní receptory se podle farmakologické klasifikace rozdělují do 4 podskupin na  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  a  $\alpha_{2D}$ . Podstata efektorové dráhy  $\alpha_2$  adrenergních receptorů spočívá

v inhibici adenylátcyklázy přes G(i)-protein. Po aktivaci  $\alpha_2$  adrenergních receptorů dochází ke snížení koncentrace intracelulárního cAMP.  $\alpha_2$  adrenoreceptory se vyskytují v mnoha orgánech a tkáních - především krevních destičkách, cévách, slezině, plicích, srdci, játrech, ledvinách, pankreatických ostrůvcích, v zažívacím traktu a tukové tkáni (Lomasney a kol., 1991). Podílejí se na vasokonstrukci cév, agregaci krevních destiček, insulinové sekreci, zpětné resorpci sodíku v ledvinách a na kontrole funkcí sympatického nervového systému.

## 2.5. $\beta_1$ , $\beta_2$ a $\beta_3$ adrenergní receptory

$\beta$  adrenergní receptory jsou složeny z 477 aminokyselin a podle farmakologické studie z roku 1967 (Lands a kol., 1967) se rozdělují do dvou významných podskupin, a to na  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Obě dvě receptorové podskupiny mají velkou afinitu ke katecholaminům. Vazba adrenalinu a noradrenalinu na  $\beta_1$  adrenoreceptor je stejně silná, kdežto u  $\beta_2$  adrenoreceptoru je vazba noradrenalinu silnější než adrenalinu (Perkins, 1991).  $\beta_{1,2}$  receptory jsou spojené s G(s)-proteinem a po navázání katecholaminu na receptor dojde k aktivaci adenylátcyklázy. Vzniká cAMP, který slouží jako druhý posel.  $\beta_1$  adrenergní receptory jsou vysoce exprimovány v srdci, mozkové kůře, slinných žlázách, bílé tukové tkáni a myocytech (Bahouth a kol., 1997; Perkins, 1991). Zatímco  $\beta_2$  receptory se nacházejí převážně v hladké svalovině močového měchýře, bronchů a v ostatních tkáních. Po působení adrenalinu způsobují uvolnění hladkých.

$\beta_3$  „atypický“ adrenergní receptor byl poprvé objeven v 80. letech dvacátého století Harmsem (Harms a kol., 1977). Jedná se o adrenergní receptor složený z 408 aminokyselin, který se liší molekulární strukturou, funkcí i farmakologickým profilem od  $\beta_{1,2}$  adrenergních receptorů.  $\beta_3$  adrenergní receptor neobsahuje rozpoznávací vazebná místa pro cAMP-dependentní kinázu a G-protein vázanou receptor kinázu (GRK) (Emorine a kol., 1989; Nahmias a kol., 1991; Strosberg, 1992), a je pouze z 40-50% homologní s  $\beta_{1,2}$  adrenergními receptory. Také mechanismus  $\beta_3$  adrenergní receptorové regulace je odlišný od  $\beta_{1,2}$  adrenergní regulace. Po navázání katecholaminu na  $\beta_3$  adrenoreceptor dochází k jeho fosforylaci  $\beta$ -adrenoreceptor kinázou a odpřažení receptoru od signální dráhy (Summers a kol., 1995a). Hlavním biologickým efektem  $\beta_3$  adrenoreceptorů je zprostředkování lipolysy v bílé tukové

tkáni a termogeneze v adipocytech hnědé tukové tkáně.  $\beta_3$  adrenoreceptory se vysoce exprimují v bílé a hnědé tukové tkáni (Arch a Kaumann, 1993), v srdci, kosterní svalovině, svalech zažívacího traktu (Bond a kol., 1988; Challiss a kol., 1988; Kaumann, 1989) a střevní mukose (Roberts a kol., 1995).

## 2.6. Výskyt adrenergických receptorů na lidských izolovaných leukocytech

Lidské izolované leukocyty exprimují na svých buněčných membránách řadu receptorů mezi nimiž jsou i adrenergické receptory. Práce Ricciho (Ricci a kol., 1999) prokázala výskyt všech tří typů  $\alpha_1$  adrenergických receptorů. Poměrově nejvíce zastoupeny jsou  $\alpha_{1B}$  adrenoreceptory. Další práce spojené s výzkumem povrchových receptorů prokázaly na lidských izolovaných leukocytech výskyt i  $\alpha_2$  adrenergických receptorů (Titinchi a kol., 1984; Goin a kol., 1991) a  $\beta_2$  adrenoreceptorů (De Blasi a kol., 1985; Heaen a kol., 1991). Přítomnost  $\beta_1$  a  $\beta_2$  adrenergických receptorů částečně prokazala i moje bakalářská práce (Mikulka, 2005).

Množství  $\beta$  adrenergických receptorů se na povrchu lymfocytů zvyšuje s narůstajícím věkem (Gietzen a kol., 1991), ale u žen také v luteální fázi menstruačního cyklu (Tan a kol., 1996). Dále se exprese adrenergických receptorů mění po fyzické zátěži, kdy se zvyšuje počet  $\beta$  adrenergických receptorů na povrchu lymfocytů, a to především receptorů  $\beta_2$  (Graafsma a kol., 1990). Z výsledků je zřejmé, že receptory silně reagují na různé druhy zátěže a stresové faktory.

## 2.7. Úloha vnitrobuněčných signálních molekul

### *G-protein a adenylátcykláza*

Guanin nukleotid-vázající protein patří mezi membránové komponenty spojené s povrchovými membránovými receptory (Emorine a kol., 1991). G-protein přenáší signál dovnitř do buňky a zprostředkovává aktivaci či inaktivaci adenylátcyklázy, která katalyzuje tvorbu intracelulárního cAMP z ATP za přítomnosti hořčíku. G-protein je složen z  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek. Podjednotka  $\alpha$  se skládá přibližně z 20 členů, které jsou rozděleny do  $\alpha(s)$ ,  $\alpha(i)$ ,  $\alpha(q)$  a  $\alpha(12)$  skupin. Podjednotka  $\beta$  se skládá z 5 skupin ( $\beta_{1-5}$ ) a podjednotka  $\gamma$  je složena

z 6 skupin ( $\gamma_{1-6}$ ) (Neer, 1995). Vazba hormonu na receptor navodí receptorem zprostředkovanou aktivaci G(s)-proteinu, což představuje na  $Mg^{2+}$  závislou vazbu GTP na  $\alpha$  podjednotku a následně rozpojení podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$  od  $\alpha$  podjednotky. Komplex  $\alpha(s)$ -GTP následně aktivuje adenylátcyklázu (Hepler a kol., 1992). Podjednotka  $\alpha(s)$  má svou vlastní GTPasovou aktivitu a aktivní forma  $\alpha(s)$ GTP je inaktivována po hydrolyze GTP na GDP. Vytváří se znovu trimerní komplex G(s)-proteinu, který je opětovně použit.

### *cAMP a proteinkináza*

cAMP je cyklická 3',5'-adenylová kyselina vznikající z ATP působením enzymu adenylátcyklázy. Má klíčovou úlohu při působení řady hormonů a slouží jako tzv. druhý posel. Intracelulární hladina cAMP se zvyšuje nebo snižuje vlivem různých hormonů, a tento účinek je v různých tkáních různý.

Proteinkináza je cAMP-dependentní heterotetramerní molekula složená z 2 regulačních podjednotek (R) a 2 katalytických podjednotek (C). Vazba cAMP na R podjednotku způsobí odštěpení R podjednotky od C podjednotky. Uvolněná C podjednotka následně fosforyluje a aktivuje hormon-senzitivní lipasu. Lipasa následně hydrolyzuje TAG a vzniklé volné mastné kyseliny jsou použity pro mitochondriální oxidace.

Všechny vnitrobuněčné signální molekuly, ať už jde o cAMP, ionty  $Ca^{2+}$ , enzymy proteinkinázy a adenylátcyklázy nebo o G-proteiny, se podílejí na přenosu signálu vzniklém vazbou katecholaminů na adrenergní receptory. Účastní se biochemické regulace hormonální termogeneze u živočichů a u lidí.

## **2.8. Hnědá tuková tkáň**

Hnědá tuková tkáň, dříve nazývaná hibernační žlázou (Smith, 1964), je součástí pojivové tkáně, která je přítomna u malých savců, hlodavců a dalších hibernátorů. U malých savců reprezentuje 1-2% celkové tělesné váhy (Smith a kol., 1969; Himms-Hagen, 1976; Foster a kol., 1978b). Vyskytuje se převážně v malých ostrůvcích po celém těle, zejména však kolem lopatek a jámy podpažní, v oblasti šíje a kolem velkých tepen hrudníku. Hnědá tuková tkáň je z 20-25% inervovaná sympatickým nervovým systémem a podléhá regulaci hypotalamem. Je bohatě cévně zásobena, což přispívá k rychlému přímému transportu produkovaného tepla do

celého organismu (Smith, 1964). Hnědá tuková tkáň je složena z nezralých pre-adipocytů, vyzrálých forem adipocytů, endoteliálních a intersticiálních buněk a žírných buněk mastocytů. Adipocyty hnědé tukové tkáně jsou malé kulaté multi-vakuolní buňky s centrálně uloženým buněčným jádrem a velkým množstvím mitochondrií, které obklopují četné tukové vakuoly (Hull, 1966). Barva hnědé tukové tkáně je zapříčiněna velkým množstvím cytochromu C (Smith, 1962). Mitochondrie na vnitřní membránové dvojvrstvě obsahují odpřahující proteiny (UCP) schopné odpřažení buněčné oxidace od fosforylace. Hnědá tuková tkáň se vyznačuje velkou plasticitou. Za určitých podmínek je schopna se přeměnit na bílou tukovou tkáň a naopak.

## **2.9. Metody měření hormonální termogeneze**

Přímé měření hormonální termogeneze u celého organismu je obtížné. Využívá se řada metod, které lze vzájemně kombinovat. Produkci tepla lze měřit těmito způsoby:

1. Přímé měření produkce tepla nebo spotřeby kyslíku u jedinců vystavených nízkých teplotám za současného měření svalového třesu.
2. Blokáda hormonální termogeneze specifickými farmaky u živočichů, vystavených mírnému chladu. Míra poklesu chladem stimulované produkce tepla je měřítkem netřesové termogeneze.
3. Intravenózní aplikace různých koncentrací noradrenalinu savcům v termoneutrální zóně za současného měření velikosti vyloučeného tepla.

Tímto způsobem je možné stanovit dose-response křivku mezi různými dávkami noradrenalinu a metabolickou odpovědí živočicha (Brück a kol., 1976; Mejsnar a kol., 1976).

U člověka je studium NST komplikováno faktem, že nelze bez větších potíží využít adrenalinového či noradrenalinovaného testu pro kvantitativní stanovení NST, poněvadž aplikace těchto farmak vede k tachykardii, zvýšení krevního tlaku a dalším zdravotním problémům. Bez lékařského dohledu nelze tyto pokusy provádět na lidech. Pro měření hormonální termogeneze byly proto použity izolované lidské lymfocyty, jakožto modelový systém, který by mohl být využit k vysvětlení podstaty lidské hormonální termogeneze.

### **3. Cíle práce**

Cílem magisterské diplomové práce bylo objasnit mechanismus působení noradrenalinu v termogenezi izolovaných lidských bílých krvinek (PBMC). Práce byla provedena metodou měření spotřeby kyslíku PBMC pomocí Clarkovy kyslíkové sondy ve vhodném kultivačním médiu.

1. Prvotním cílem práce bylo zjistit, který typ adrenergických receptorů zprostředkovává hormonální termogenezi izolovaných lidských bílých krvinek.
2. Dalším cílem bylo objasnit, které exogenní substráty mohou hormonální termogenezi PBMC ovlivnit.

Tato práce je součástí širší studie prováděné v laboratoři Fyziologie živočichů na Biologické fakultě, která se zabývá možností výskytu hormonální termogeneze u lidí a buněčnými mechanismy, které výskyt hormonální termogeneze u člověka podmiňují.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Odběr a zpracování vzorku

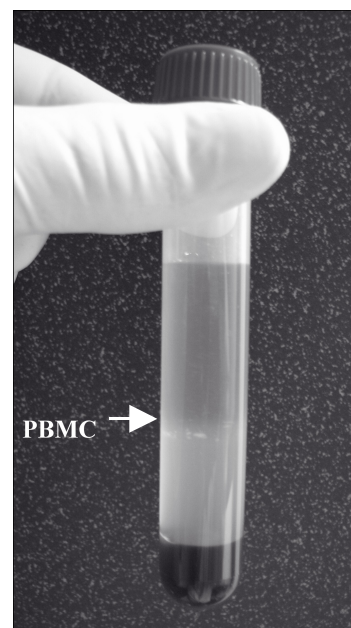
Krevní vzorky byly získávány od dobrovolných zdravých dárců ve věku 18 – 25 let. Skupinu tvořili studentky a studenti Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Bylo vždy odebráno 18 ml žilní krve z předloktí do sterilních 9ml heparinizovaných zkumavek Vacuette® (Greiner bio-one GmbH, Austria) uzavřeným odběrovým systémem pomocí plastového odběrového nástavce a oboustranné jehly (Greiner bio-one GmbH, Austria). Odběr prováděla kvalifikovaná zdravotní sestra z ordinace MUDr. F. Součka. Krevní vzorek byl vždy ručně promíchán a do 15 minut zpracován.

### 4.2. Izolace bílých krvinek (PBMC – peripheral blood mononuclear cells)

Lidské mononukleární buňky byly izolovány z heparinizované venózní krve metodou hustotní gradientové centrifugace za použití izolačního roztoku Ficoll – Paque™ PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden) a pufovaného fyziologického Hanksova roztoku (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). Do třech sterilních zkumavek o objemu 15 ml (GAMA GROUP a.s., Czech Republic) bylo přidáno 6 ml krve a 6 ml Hanksova fyziologického roztoku. Naředěná krev byla řádně promíchána.

Do šesti sterilních 15ml zkumavek bylo napipetováno 3 ml izolačního Ficoll – Paque™ PLUS roztoku a na hladinu bylo následně opatrně vrstveno 6 ml naředěné krve tak, aby nedošlo k vzájemnému promíchání a utvořily se dvě oddělené vrstvy. Vzorky byly poté centrifugovány 40 minut při 1200 ot./min. v centrifuze (Hettich Zentrifugen, Denmark) při laboratorní teplotě.

Krevní vzorek se centrifugací rozdělil do tří vrstev, na sediment, supernatant a vrstvu mononukleárních buněk, která se vytvořila uprostřed sloupce supernatantu. Vzniklý prstenec mononukleárních buněk byl přepipetován do nové sterilní zkumavky. Následně bylo přidáno 10 ml fyziologického Hanksova roztoku a obsah se centrifugoval 10 minut při 1200 ot./min. při laboratorní teplotě.



Obr. 4.2. Izolace PBMC

Toto promytí se provádělo celkem dvakrát za účelem očistit mononukleární buňky od sérových proteinů a roztoku Ficoll – Paque™ PLUS. Po slítí supernatantu byly vyizolované PBMC resuspendovány v 200  $\mu$ l příslušného kultivačního média a rozděleny do dvou alikvótů. Jeden byl ihned použit k měření spotřeby kyslíku a druhý byl uschován v Sanyo CO<sub>2</sub> kultivátoru (Schoeller Instruments s.r.o, Czech Republic) při 37°C a 3,5% CO<sub>2</sub> pro pozdější opakované měření. Použité roztoky byly skladovány při teplotě 4°C a před použitím vytemperovány na laboratorní teplotu. Izolace byla prováděna asepticky v digestoři Juan MSC 12 (Trigon-plus®, Czech Republic).

### 4.3. Stanovení počtu bílých krvinek (PBMC)

Počet bílých krvinek (PBMC) byl stanoven před každým měřením pomocí mikroskopického odečítání (mikroskop ARSENAL s.r.o., Czech Republic ) v Bürkerově komůrce (Meopta, Czech Republic). 10  $\mu$ l suspenze PBMC bylo ředěno 90  $\mu$ l trypanové modři (0,5% vodný roztok). Bílé krvinky byly následně počítány v 25 středních čtvercích při zvětšení 160x.

Jejich počet byl stanoven podle vzorce: *počet buněk v 25 polích*  $\times$  2  $\times$  *ředění*  $\times$   $10^4$  = *počet buněk/ml*

### 4.4. Měření spotřeby kyslíku

#### Princip polarografického měření spotřeby kyslíku

Objev polarografie (1922) a její zavedení do elektrochemické praxe je spojen se jménem profesora Jaroslava Heyrovského (Nobelova cena za chemii v roce 1959). Stanovení spotřeby kyslíku PBMC je založeno na polarografickém principu.

Je-li na dokonale polarizovatelnou Pt katodu vložen dostatečně vysoký záporný potenciál vůči nepolarizovatelné referentní Ag/AgCl anodě, rozpuštěný kyslík ve stanovovaném roztoku se začne na povrchu katody redukovat na H<sub>2</sub>O, potřebné elektrony jsou produkovány při oxidaci anody. Následkem toho začne mezi elektrodami elektrochemického článku procházet difúzní elektrický proud, který nese vlastní analytický signál. Za přítomnosti základního elektrolytu je přenos depolarizátoru k povrchu elektrody řízen pouze difúzí. Děj je závislý na rychlosti transportu kyslíku z hlavního objemu



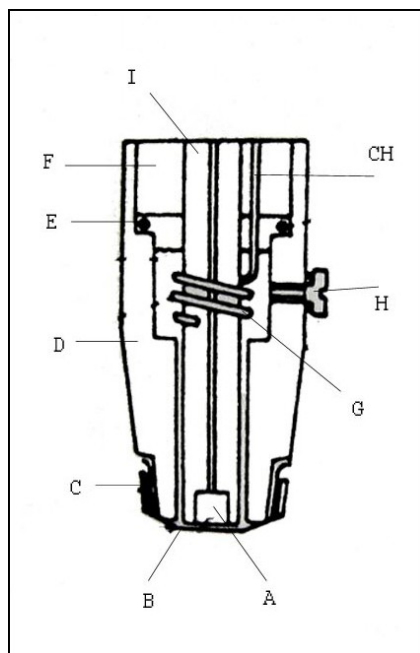
tekutiny přes permeabilní polyethylenovou (PE) membránu, která je propustná pro kyslík (i jiné plyny, jako  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{SO}_2$ ), ale nepropustná pro ionty a většinu adsorptivních nečistot v roztocích.

Pokud vložíme na katodu dostatečně vysoký záporný potenciál, elektrochemická redukce kyslíku vzhledem k transportu ke katodě není ničím limitována. Koncentrace kyslíku je pak na povrchu katody nulová a vznikající difúzní proud je omezen pouze rychlostí difúze kyslíku k povrchu katody (Linek a kol., 1987). Vznikající ustálený proud je pak přímo úměrný koncentraci či parciálnímu tlaku depolarizátoru (kyslíku). Na této úměrnosti je založeno kvantitativní stanovení koncentrace kyslíku v plynné či tekuté fázi.

Polarografií je možno také stanovovat kvalitu plynů. Kvalitativní stanovení je založeno na faktu, že každá látka má své typické rozkladné záporné napětí (mV), při kterém se začne vylučovat – reagovat s povrchem elektrody a přitom se redukuje (nebo oxiduje). Měříme tzv. polarografické křivky, kde půlvolný potenciál umožňuje kvalitativně identifikovat depolarizátor. Výška vlny je podle Ilkovičovy rovnice přímo úměrná koncentraci depolarizátoru. Základním předpokladem smysluplného používání sond je nastavení takových podmínek, aby sonda pracovala v oblasti limitního difúzního proudu.

### Popis měřicího systému

Pro měření spotřeby kyslíku byla použita Clarkova kyslíková sonda (firma RNDr. Viktor Dvořák, Czech Republic). Schéma konstrukce sondy je na obr. 4.4.1. Sonda je tvořena dvěma



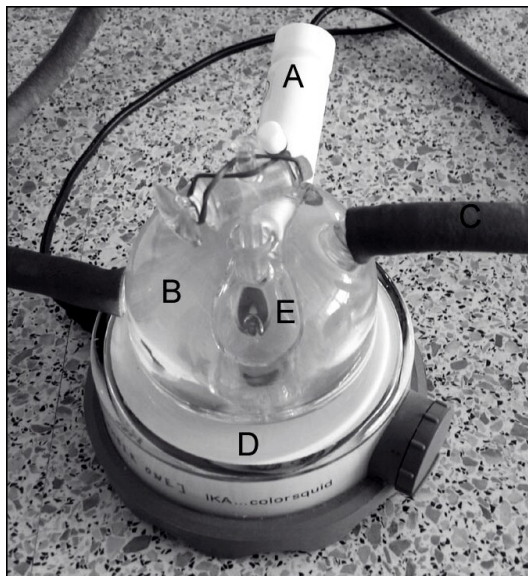
elektrodami, dokonale polarizovatelnou Pt katodou (A) a nepolarizovatelnou Ag/AgCl referentní anodou (CH). Pt katoda je zatavena ve skleněné trubičce (I) o průměru 4 mm, která je zasazena do umělohmotného těla (F). Na povrchu je pokryta polyetylenovou membránou (B), která umožňuje reprodukovatelný transport depolarizátoru (kyslíku) k platinové plošce o průměru 0,2 mm (A). Polyetylenová membrána je upevněna na umělohmotné pouzdro (D) kovovým plochým kroužkem (C). Uvnitř pouzdra sondy je gumový těsnicí kroužek (E) a komora (D), která je naplněna indiferentním elektrolytem (0,1 M KCl).

Obr. 4.4.1. Schéma Clarkovy kyslíkové sondy

Elektrolyt je plněn otvorem (H) v pouzdře sondy. Indiferentní elektrolyt je látka do vysokého stupně disociovatelná, jejíž komponenty v používaném rozsahu potenciálů nereagují s žádnou z obou elektrod. Slouží k přenosu elektronů a rozložení elektrického pole mezi elektrodami. Obě elektrody Clarkovy kyslíkové sondy jsou propojeny koaxiálním kabelem ke zdroji napětí a vlastnímu regulačnímu modulu. Ten je spojen s počítačem, ve kterém jsou vyhodnocována naměřená data.

### Měřicí komůrka (obr. 4.4.2.)

Vlastní měření pomocí kyslíkové sondy probíhá ve vnitřní skleněné měřicí komůrce (E) o objemu 3,6 ml. Ta je umístěna ve skleněném plášti (B), jímž protéká voda o teplotě 37°C,



kteřá je ohřívána ve vodní lázni průtokovým termostatem TE-10D (Techne, Great Britain). Komůrka je připojena k vodní lázni dvěma gumovými hadicemi (C) a na dně vnitřní měřicí komůrky je umístěno magnetické míchadlo, které je poháněno elektromagnetickou míchačkou (D) (IKA color Squit, Germany).

Clarkova kyslíková sonda (A) je vsunuta do postraniho otvoru pláště komůrky a její měřicí konec ústí do vnitřní části komůrky. Vzorky PBMC, chemikálie a farmaka jsou přidávány do

Obr. 4.4.2. Měřicí komůrka

komůrky otvorem v zabroušeném skleněném kohoutu. Před vlastním měřením se měřicí komůrka cca 45 minut temperuje na teplotu 37°C a 5x promývá destilovanou vodou, aby se odstranily zbytky chemikálií, buněk či média z předchozích měření.

### Regulační modul

Naměřený signál z Clarkovy kyslíkové sondy v podobě elektrického proudu (mA) je přijímán regulačním modulem (firma RNDr. Viktor Dvořák, Czech Republic). Ten nejen že umožňuje ruční nastavení offsetu, hodnot rozkladného záporného referenčního napětí (-mV) a zesílení vlastního výstupního signálu, ale i přeměňuje získaný elektrický proud na digitalizované jednotky, které posílá do počítače ke zpracování.

Hodnoty rozkladného záporného napětí se nastavují na hodnotu -700 mV pomocí měřicího programu DIAdem™ modul DAC (National Instrument, Ireland). Tato hodnota je experimentálně zjištěna pro každou sondu zvlášť pomocí voltamperové charakteristiky, při které se plynule zvyšuje vkládané záporné napětí na katodě a sleduje se změna výstupního elektrického proudu. Z naměřených polarografických křivek pro kyslík (vzduch rozpuštěný ve vodě) a dusík (plynný dusík rozpuštěný ve vodě) se určí hodnota rozkladného napětí pro stanovovaný plyn.

### **Kalibrace**

Před každým měřením Clarkovou kyslíkovou sondou bylo třeba provést kalibraci systému. Ta se prováděla těsně před a po vlastním měření. Ke stanovení nulových hodnot koncentrace kyslíku bylo použito malé množství redukčního činidla (dithioničitan sodný) rozpuštěného v destilované vodě. Ke stanovení maximální koncentrace kyslíku byla použita destilovaná voda, která byla intenzivně probublávána vzduchem po dobu přibližně 30 minut pomocí akvarijní vzduchovací pumpy Elite 799 (Pláček s.r.o., Czech Republic).

Do měřicí komůrky se nejprve přidala voda nasycená vzduchem a měřily se hodnoty signálu po dobu cca 3 minut. Po ustálení signálu sondy byla přidána voda s rozpuštěným dithioničitanem sodným a opět se po dobu 3 minut měřil signál. Takto naměřené hodnoty byly použity pro dvoubodovou kalibraci systému.

Z hodnot dvoubodové kalibrace byl sestrojen graf časového průběhu a pomocí programu MS Excel byly určeny rovnice lineárních regresí. Pomocí těchto rovnic, znalostí časové závislosti hodnot měření a znalostí hodnot kalibrace pro nulové a maximální koncentrace kyslíku byly hodnoty v countech (softwarové jednotky programu DIAdem) přepočítány do jednotek vyjadřujících koncentraci kyslíku v  $\mu\text{mol}$ . Tato koncentrace se vypočetla podle následujícího algoritmu:

$$[(A-B)*0,217] / [C-B]$$

$A$  – hodnoty signálu v countech při měření,  $B$  – hodnoty signálu v countech při kalibraci dithioničitanem sodným,  $C$  – hodnoty signálu v countech při kalibraci plynným vzduchem rozpuštěným ve vodě

Při kalibraci vycházíme z předpokladu, že voda nasycená vzduchem při teplotě 37°C obsahuje 0,217  $\mu\text{molO}_2/\text{ml}$  (Zhao a kol., 1997). Víme-li, jaký je obsah kyslíku odvozený z teploty a objemu, můžeme přesně určit, kolik kyslíku bylo spotřebováno.

### **Průběh vlastního měření**

Před počátkem pokusu byla měřicí komůrka vytemperovaná na provozní teplotu 37°C. Do komůrky bylo přidáno injekční stříkačkou příslušné kultivační médium (viz. příloha 10.1.) a následně byl měřen signál sondy po dobu cca 35 minut. Po ustálení signálu sondy byly do komůrky aplikovány PBMC resuspendované v 200  $\mu\text{l}$  kultivačního média. Klidová spotřeba kyslíku PBMC byla měřena cca 10 minut a poté byly přidávány do komůrky v 10 minutových intervalech ostatní chemikálie a farmaka (viz. kapitola 4.6.) v různých koncentracích.

### **4.5. Zpracování naměřených dat**

K vyhodnocení naměřených dat Clarkovou kyslíkovou sondou bylo použito programu DIAdem™ verze 7.00 (National Instrument, Ireland). Program pracuje ve dvou modulech. Modul DAC slouží k ovládní měření a zaznamenávání dat odesílaných z regulačního zařízení. Modul TDM umožňuje získaná data v softwarových jednotkách countech (viz. kapitola 4.4.) zpracovávat. Hodnoty v countech byly nejprve přepočítány na jednotky v  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{O}_2$ . Tyto přepracovaná data byla následně zpět vložena do DIAdem TDM modulu, kde byla dále upravována.

Z křivky získané měřením byly vybrány pětiminutové oblasti odpovídající koncentraci kyslíku v samotném médiu, klidové spotřeby kyslíku bílých krvinek a spotřeby kyslíku při použití různých farmak a chemikálií. Tyto pětiminutové intervaly byly vždy vyjmuty po 2,5 minutách měření jednotlivých sledovaných úseků. U jednotlivých pětiminutových datových intervalů byla provedena stobodová lineární regrese.

Data byla dále transportována do MS Excelu, kde se jednotlivé spotřeby kyslíku datových úseků přepočítaly na standardizovanou jednotku  $\text{nmolO}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^{-6}$  buněk. Z naměřených a přepočítaných hodnot byl u každého pokusu vytvořen sloupcový graf v MS Excelu, znázorňující nejen klidovou spotřebu kyslíku bílých krvinek, ale i spotřebu kyslíku PBMC ovlivněnou přidanými farmaky či chemikáliemi.

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., USA). Pro grafické vyjádření a analýzu naměřených dat byla použita deskriptivní statistika a párový jednostranný t-test.

#### 4.6. Použitá kultivační média, farmaka a chemikálie

Výčet použitých kultivačních médií, farmak a chemikálií s údaji o výrobci, molekulové hmotnosti, katalogovém čísle a stručném biologickém působení shrnují tabulky č.1, 2, 3. Farmakologické vlastnosti většiny použitých léčiv včetně detailního chemického složení jednotlivých kultivačních médií je uvedeno v příloze.

Tab.č.1

	<b>Název</b>	<b>Katalogové číslo</b>	<b>Výrobce</b>	<b>Použití</b>
<b>Kultivační média</b>	Hanks balanced salt solution	10-543	Sigma-Aldrich	udržování pH
	RPMI-1640 with L-glutamine	BE12-702F	Cambrex Bio Science	kultivace a výživa PBMC
	RPMI-1640 without L-glutamine	BE12-167F	Cambrex Bio Science	kultivace a výživa PBMC
	RPMI-1640 with L-glutamine without glukose	BE12-752F	Cambrex Bio Science	kultivace a výživa PBMC
	DMEM without L-Glutamine, L-Cystine, and L-Methionine	BE12-734F	Cambrex Bio Science	kultivace a výživa PBMC

Tab.č.2.

	<b>Název</b>	<b>M<sub>r</sub></b>	<b>Výrobce</b>	<b>Popis</b>
<b>Farmaka</b>	Norepinephrini hydrogentartras	169,18	Zentiva a.s.	alfa-adrenergní sympatomimetikum
	Phentolamine hydrochloride	317,8	Sigma-Aldrich	alfa-adrenergní antagonist
	Clonidine hydrochloride	266,6	Sigma-Aldrich	alfa2-adrenergní agonista
	L755	598,2	Tocris Bioscience	beta3-adrenergní agonista
	Dobutamini hydrochloridum	neuveдено	Lachema a.s.	beta1-adrenergní agonista
	Betaloc (metoprololi tartras)	neuveдено	AstraZeneca AB	beta1-adrenergní antagonist inhibice agonistického účinku katecholaminů
	Bricanyl (terbutalini sulfas)	neuveдено	AstraZeneca AB	beta2-adrenergní agonista
	ICI - 118,551 hydrochloride	313,87	Tocris Bioscience	beta2-adrenergní antagonist
	Cirazoline hydrochloride	270,76	Tocris Bioscience	alfa-adrenergní agonista

Tab.č.3.

	<i>Název</i>	<i>M<sub>r</sub></i>	<i>Výrobce</i>	<i>Popis</i>
<b>Chemikálie</b>	L-Cysteine	240,3	Sigma-Aldrich	neesenciální AMK glutamatergic receptor agonista
	L-Methionine	149,21	Sigma-Aldrich	esenciální AMK
	L-Glutamine	146,14	Sigma-Aldrich	esenciální AMK, hlavní zdroj energie pro buněčné kultury

## 5. Výsledky

### 5.1. Spotřeba O<sub>2</sub> izolovanými PBMC po homogenizaci

Abychom zjistili, zda noradrenalinem (NA) stimulovaná spotřeba kyslíku PBMC je závislá na přítomnosti intaktní buněčné membrány a přítomnosti funkčních adrenergních receptorů, byl provedeno měření spotřeby kyslíku na homogenizovaných PBMC. Po dvouminutové mechanické homogenizaci rotačním biovortexem (Denville Scientific Inc., USA) doplněné minutovou homogenizací ultrazvukem (Ika Labortechnik, Germany). byla měřena klidová spotřeba kyslíku PBMC. Následně byl aplikován noradrenalin (v koncentraci  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ) a zkoumán jeho vliv na PBMC.

Klidová spotřeba homogenizovaných leukocytů ze 12 ml heparinované krve se ve třech pokusech pohybovala v rozmezí 0,162 - 0,191 nmol O<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>; průměrně 0,172 nmol O<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>. Po podání noradrenalinu spotřeba kyslíku PBMC klesla na průměrnou hodnotu 0,095 nmol O<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>, což odpovídá 44,8% poklesu spotřeby kyslíku oproti průměrné klidové spotřebě kyslíku homogenizovaných PBMC. Tyto výsledky kontrastují s výsledky získanými na intaktních PBMC (Mikulka, 2005), kde se spotřeba O<sub>2</sub> po aplikaci  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  NA zvýšila v průměru o 233,8 %.

Intaktní buněčné membrány s funkčními adrenergními receptory na povrchu lidských leukocytů jsou tedy jedním ze základních předpokladů pro studium mechanismů noradrenalinové termogeneze u izolovaných lidských leukocytů.

### 5.2. Ovlivnění spotřeby O<sub>2</sub> PBMC použitím farmak

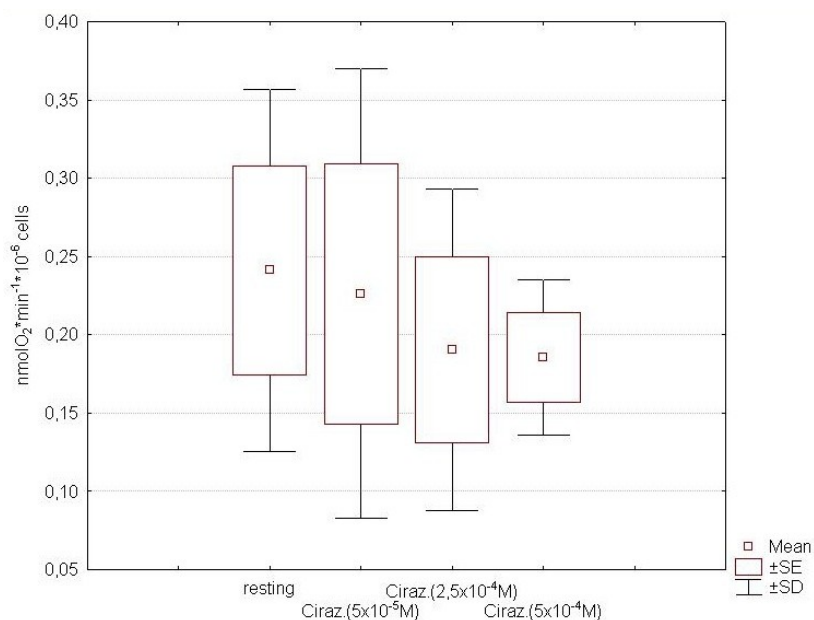
Pro zjištění podílu  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$  a  $\beta_3$  adrenergní receptory v noradrenalinové termogenezi izolovaných lidských leukocytů byl aplikován  $\alpha_1$  agonista (Cirazolin),  $\alpha_2$  agonista (Clonidin),  $\beta_3$  agonista (L755),  $\alpha$  adrenergní antagonist (Phentolamin), a  $\beta_2$  adrenergní antagonist (ICI-118,551). Do diplomové práce jsou zařazeny i měření účinku  $\beta_1$  agonisty,  $\beta_1$  antagonisty a  $\beta_2$  agonisty presentované v mé bakalářské práci (Mikulka, 2005). Vliv těchto farmak na klidovou a noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku byl stanoven měřením spotřeby kyslíku PBMC .

### Cirazoline hydrochloride - $\alpha_1$ selektivní adrenergní agonista

V experimentech byl použit Cirazolin hydrochlorid ve zvyšujících se koncentracích,  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ;  $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$  a  $5 \times 10^{-4} \text{M}$ . Klidovou spotřebu kyslíku izolovaných PBMC a vliv Cirazolinu zachycuje obr. 5.2.1.

Průměrná klidová hodnota spotřeby kyslíku izolovanými lidskými PBMC byla  $0,241 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Během experimentu byly následně aplikovány všechny tři výše zmíněné koncentrace farmaka v desetiminutových intervalech. Po podání Cirazolinu nedošlo ke zvýšení spotřeby  $\text{O}_2$ , naopak v koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  došlo ke snížení spotřeby kyslíku oproti průměrné klidové hodnotě o 6,3 % (na  $0,226 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk). Koncentrace  $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$  snížila spotřebu  $\text{O}_2$  v průměru o 21,2 % a koncentrace  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  spotřebu kyslíku PBMC snížila oproti klidové průměrné spotřebě o 23,3 % na hodnotu  $0,185 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Při použití více koncentrovanějšího farmaka ( $1 \times 10^{-3} \text{M}$ ), spotřeba kyslíku izolovaných PBMC klesla oproti klidové spotřebě až o 41,2 % (není vyznačeno v grafu).

Agonistický účinek Cirazoline hydrochloridu nebyl tedy prokázán. Farmakum snižovalo klidovou spotřebu kyslíku izolovaných PBMC pod klidovou úroveň. Dá se tedy předpokládat, že aktivace spotřeby  $\text{O}_2$  PBMC po aplikaci NA není mediována  $\alpha_1$  adrenoreceptory.



**Obr. 5.2.1. Ovlivnění klidové spotřeby  $\text{O}_2$  PBMC  $\alpha_1$  adrenergním agonistou Cirazolin ( $n = 3$ ), použito RPMI 1640 kultivační médium**

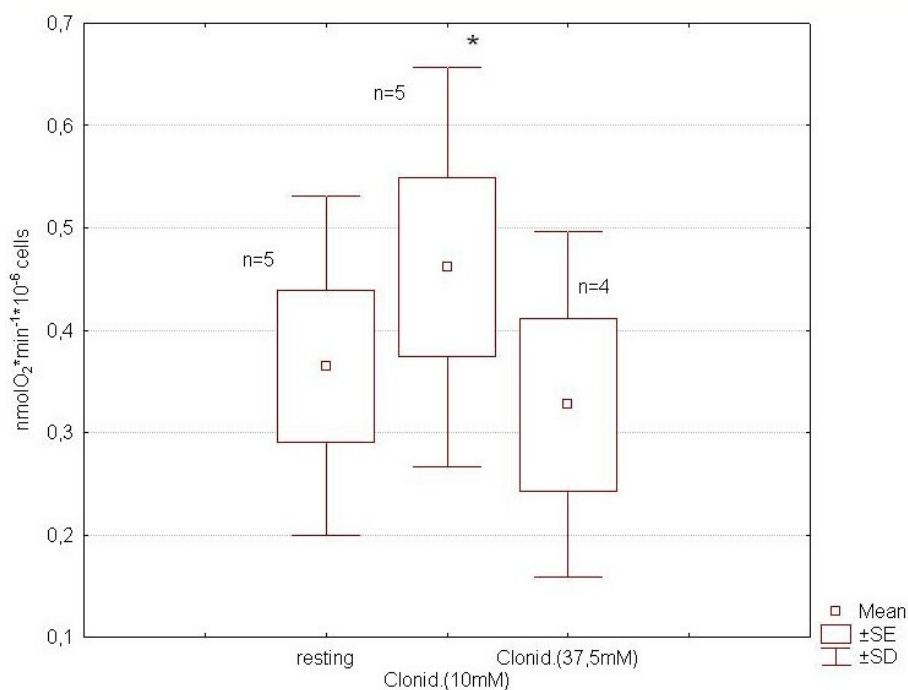


### Clonidine hydrochloride – $\alpha_2$ adrenergní agonista

V pokusech byl Clonidin použit v koncentracích 10mM, 20mM, 37,5mM, které byly aplikovány podobně jako v pokusech s podáním Cirazolinu. Klidová spotřeba kyslíku PBMC a spotřeba kyslíku po podání 10mM, 37,5mM Clonidin hydrochloridu je znázorněna na obr. 5.2.2.

Klidová průměrná spotřeba kyslíku PBMC byla  $0,365 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk ( $n=5$ ). Po podání 10mM Clonidinu došlo k nárůstu klidové spotřeby kyslíku PBMC na průměrnou hodnotu  $0,462 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 26,6% zvýšení. Agonisticky nejúčinněji působila však jen koncentrace 10mM. Po podání 37,5mM koncentrace Clonidinu docházelo ke snížení spotřeby kyslíku PBMC stimulované předchozími nižšími dávkami Clonidinu. K inhibičnímu účinku tedy dochází jen při vysokých koncentracích farmaka.

Agonistický účinek 10mM Clonidin hydrochloridu je statisticky průkazný na 5% hladině významnosti při použití párového jednostranného t-testu. Vzhledem k tomu, že NA zvyšuje spotřebu  $\text{O}_2$  PBMC o 238,8 % a  $\alpha_2$  agonista jen o 26,6 %, dá se předpokládat, že za podmínek *in vitro* je termogenní účinek NA v PBMC zprostředkován  $\alpha_2$  adrenoreceptory jen z 12%.



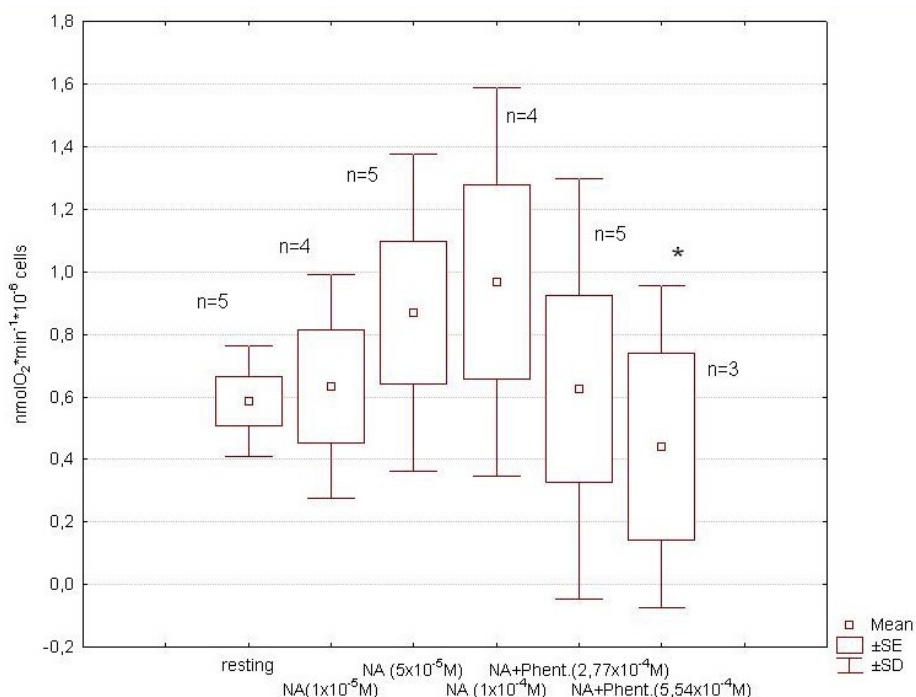
**Obr. 5.2.2. Ovlivnění klidové spotřeby kyslíku PBMC  $\alpha_2$  adrenergním agonistou Clonidin ( $n=5$ ), použito RPMI 1640 kultivační médium**

\* statisticky průkazné zvýšení spotřeby  $\text{O}_2$  proti klidové spotřebě PBMC ( $df = 4$ ;  $t = -3,28$ ;  $p = 0,015148$ ).

### Phentolamine hydrochloride – $\alpha$ adrenergní antagonist

Phentolamin hydrochlorid je nescifický  $\alpha$  adrenergní antagonist. V celém organismu působí vazodilatačně na periferní cévy. V experimentech s izolovanými PBMC byla spotřeba kyslíku nejprve stimulována dávkami noradrenalinu o koncentracích  $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ,  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  a  $1 \times 10^{-4} \text{M}$ . Následně byl pak podán Phentolamin hydrochlorid v koncentracích  $2,77 \times 10^{-4} \text{M}$  a  $5,54 \times 10^{-4} \text{M}$  a posuzován jeho vliv na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Účinek noradrenalinu a působení Phentolaminu na klidovou spotřebu kyslíku PBMC zachycuje obr. 5.2.3.

Průměrná klidová spotřeba kyslíku PBMC byla  $0,586 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk ( $n=5$ ). Po podání noradrenalinu v koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{M}$  došlo ke zvýšení klidové spotřeby kyslíku PBMC v průměru na  $0,967 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 65,3% nárůstu. Po aplikaci Phentolaminu v koncentraci  $5,54 \times 10^{-4} \text{M}$  se noradrenalinem stimulovaná spotřeba kyslíku PBMC snížila na průměrnou hodnotu  $0,440 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 54,5% snížení. Působení  $5,54 \times 10^{-4} \text{M}$  Phentolaminu je statisticky průkazné na 5% hladině významnosti při použití párového jednostranného t-testu. Inhibice NA účinku Phentolaminem potvrzuje účast  $\alpha$  adrenergních receptorů v NA termogenezi.



**Obr. 5.2.3. Ovlivnění noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku PBMC  $\alpha$  adrenergním antagonistou Phentolamin (n=5), použito kultivační médium RPMI 1640**

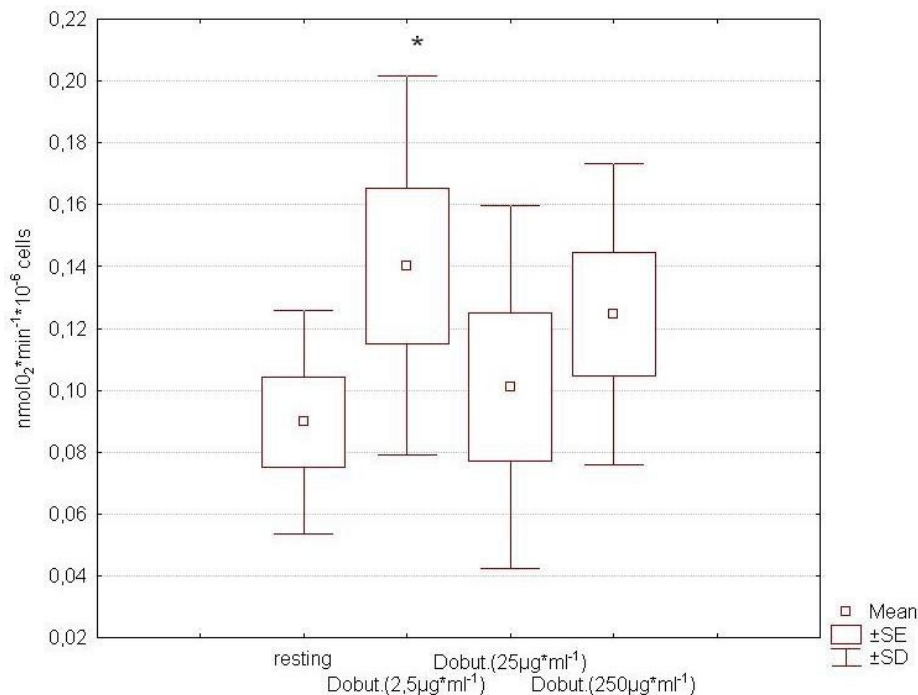
\* statisticky průkazný pokles spotřeby O<sub>2</sub> oproti noradrenalinem stimulované spotřebě kyslíku PBMC (df=3; t=6,18; p= 0,004260)

## Dobutamini hydrochloridum – $\beta_1$ adrenergní agonista

(Za účelem vytvoření celkového obrazu o výskytu receptorů na PBMC a jejich účasti v hormonální termogenezi byly následující výsledky převzaty z bakalářské práce Mikulka, 2005)

Dobutamin působí agonisticky na  $\beta_1$  adrenergní receptory. V medicíně se používá jako inotropní podpora myokardu při léčbě srdečního selhání a srdeční nedostatečnosti. V pokusech byly použity koncentrace 2,5, 25 a 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Dobutaminu. Klidovou spotřebu kyslíku PBMC a působení farmaka ukazuje následující obr. 5.2.4.

Průměrná klidová spotřeba PBMC činila 0,089  $\text{nmol O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^{-6}$  buněk. Po podání 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Dobutaminu došlo ke zvýšení klidové spotřeby kyslíku PBMC na 0,140  $\text{nmol O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^{-6}$  buněk, což představuje 56,4% zvýšení spotřeby. Ostatní podané vyšší koncentrace Dobutaminu nebyly tak účinné a představovaly v případě 25  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  Dobutaminu 12,7% navýšení a při dávce 250  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  38,9% navýšení spotřeby kyslíku proti průměrné klidové spotřebě kyslíku PBMC. Koncentrační závislost účinku Dobutaminu nebyla prokázána. Za tímto účelem by bylo pravděpodobně nutné použít nižších koncentrací Dobutaminu než 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Obr. 5.2.4. Ovlivnění klidové spotřeby kyslíku PBMC  $\beta_1$  adrenergním agonistou Dobutamin (n=6), použito RPMI 1640 kultivační médium**

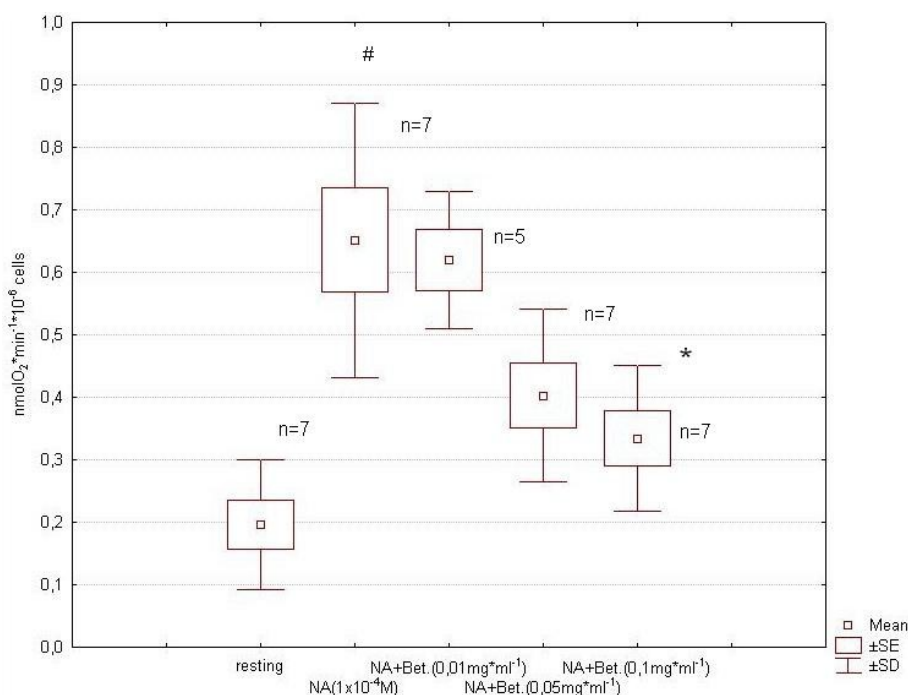
\* statisticky průkazná zvýšená spotřeba  $\text{O}_2$  oproti klidové hodnotě spotřeby PBMC (df=5; t=-2,32; p=0,033226)

Agonistické působení Dobutaminu o koncentraci  $2,5\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a jeho účinek na klidovou spotřebu PBMC je statisticky průkazné na 5% hladině významnosti při použití párového jednostranného t-testu. Výsledky naznačují, že  $\beta_1$  adrenoreceptory se podílejí na NA termogenezi PBMC přibližně z 25 %.

### Betaloc (Metropoli tartaras) – $\beta_1$ selektivní adrenergní antagonistista

(výsledky převzané z bakalářské práce Mikulka, 2005)

Metropoli tartaras (Betaloc) je kardioselektivní betablokátor, který blokuje  $\beta_1$  adrenergní receptory v myokardu. Používá se k léčbě tachyarytmií, zejména supraventrikulárních tachykardií a infarktu myokardu. Slouží jako sympatolytikum či antihypertenzivum. V experimentech byly izolované PBMC nejprve stimulovány dávkou noradrenalinu o koncentraci  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  (za současného měření spotřeby kyslíku). Následně byl podán Betaloc v koncentracích  $0,01\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,  $0,05\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a  $0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a posuzován jeho vliv na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Účinek noradrenalinu a působení Betalocu zachycuje obr. 5.2.5.



**Obr. 5.2.5. Ovlivnění noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku PBMC  $\beta_1$  adrenergním antagonistou Betaloc (n=7), použito RPMI 1640 kultivační médium**

# statisticky průkazný nárůst spotřeby  $\text{O}_2$  proti klidové spotřebě kyslíku PBMC (df=6; t=-9,42; p=0,000041)

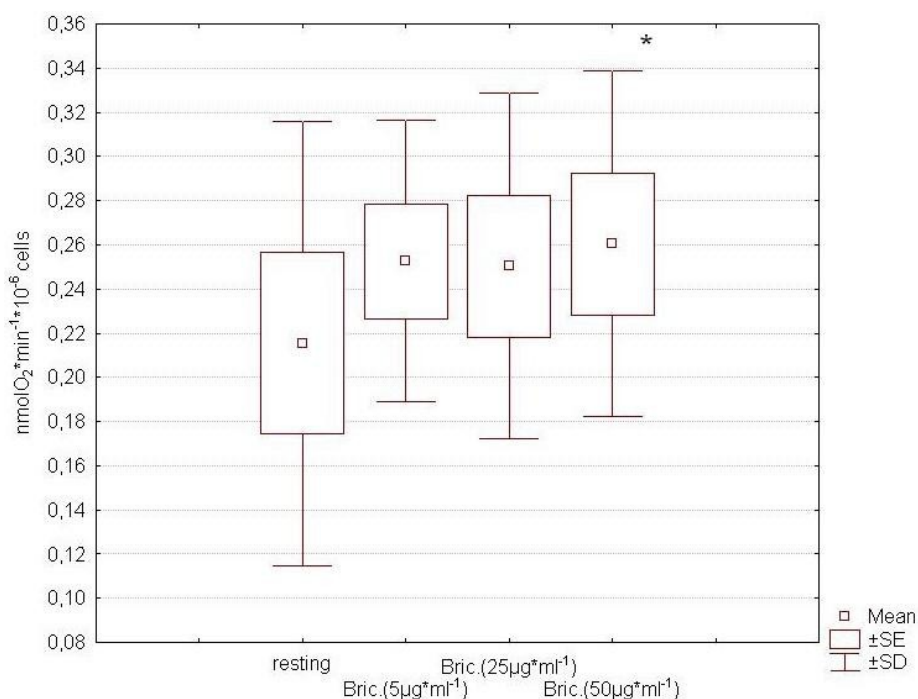
\* statisticky průkazný pokles spotřeby  $\text{O}_2$  oproti noradrenalinem stimulované spotřebě  $\text{O}_2$  PBMC (df=6; t=5,55; p=0,00072)

Průměrná klidová spotřeba kyslíku PBMC byla  $0,195 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Po aplikaci noradrenalinu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  se spotřeba kyslíku PBMC zvýšila na průměrnou hodnotu  $0,651 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což představuje 271% navýšení spotřeby. Po podání Betalocu o koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  došlo k poklesu spotřeby kyslíku noradrenalinem stimulovaných PBMC na průměrnou hodnotu  $0,334 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 48,7% poklesu spotřeby. Antagonistické působení farmaka Betalocu v koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  je vysoce statisticky průkazné na 5% hladině významnosti při použití jednostranného párového t-testu. Výsledky potvrzují výrazný účinek  $\beta_1$  adrenergních receptorů v NA termogenezi.

### Bricanyl (Terbutalini sulfas) – $\beta_2$ adrenergní agonista

(výsledky převzaté z bakalářské práce Mikulka, 2005)

Bricanyl působí jako  $\beta_2$  adrenergní agonista a patří mezi bronchodilatanta. Používá se k léčbě bronchiálního astmatu, chronické bronchitidy a jiných onemocnění plic. V pokusech byly použity tyto koncentrace  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a  $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  Bricanylu. Působení tohoto farmaka na klidovou spotřebu kyslíku PBMC zachycuje obr. 5.2.6.



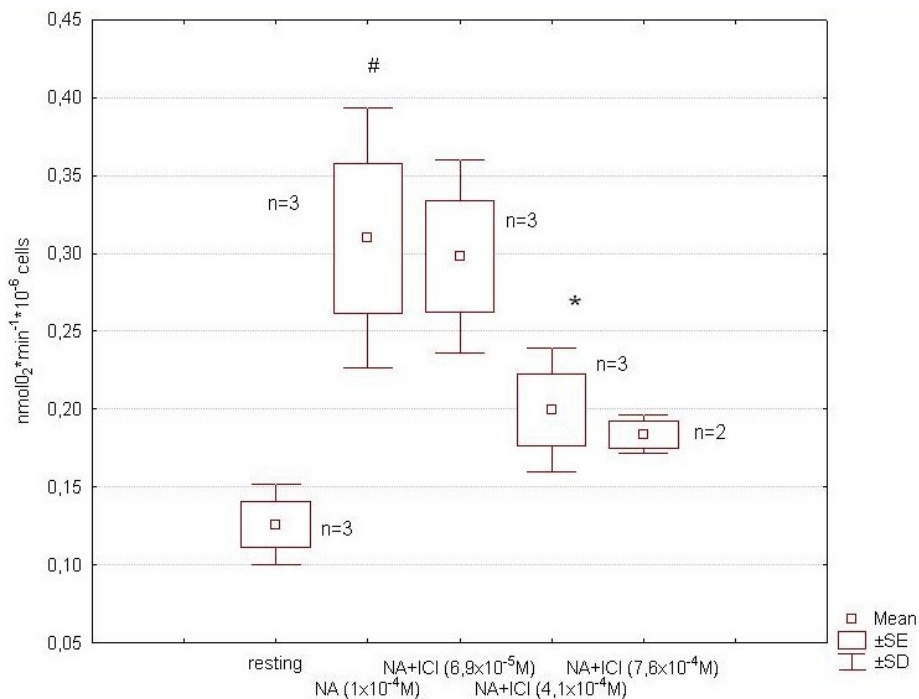
**Obr. 5.2.6. Ovlivnění klidové spotřeby kyslíku PBMC  $\beta_2$  adrenergním agonistou Bricanyl (n=6), použito RPMI 1640 kultivační médium**

\* statisticky průkazné zvýšení spotřeby  $\text{O}_2$  proti klidové spotřebě kyslíku PBMC (df=5; t=-2,95; p= 0,015901)

Průměrná klidová spotřeba kyslíku PBMC byla  $0,215 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ buněk}$  ( $n=6$ ). Po aplikaci farmaka v koncentraci  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  se zvýšila klidová spotřeba kyslíku PBMC na průměrnou hodnotu  $0,260 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ buněk}$ , což představuje 20,93% navýšení spotřeby. Koncentrační efekt farmaka nebyl prokázán. Agonistický účinek  $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  koncentrovaného Bricanylu je statisticky průkazný na 5% hladině významnosti při použití párového jednostranného t-testu.  $\beta_2$  receptory se tedy podílejí na zprostředkování NA termogeneze PBMC asi z 8 %.

### ICI – 118,551 – $\beta_2$ selektivní adrenergní antagonist

ICI – 118,551 patří mezi selektivní  $\beta_2$  adrenergní antagonisty. Ve třech experimentech byly izolované PBMC nejprve stimulovány  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  dávkou noradrenalinu (za současného měření spotřeby kyslíku). Následně bylo podáno farmakum ICI – 118,551 ve zvyšujících se koncentracích  $6,9 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $4,1 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $7,6 \times 10^{-4} \text{ M}$  a pozorován jeho vliv na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC.



**Obr. 5.2.7. Ovlivnění noradrenalinem stimulované spotřeby O<sub>2</sub> PBMC  $\beta_2$  adrenergním antagonistou ICI – 118,551 (n=3), použito kultivační médium RPMI 1640**

# statisticky průkazné zvýšení spotřeby O<sub>2</sub> oproti klidové spotřebě kyslíku PBMC (df=2; t=-2,92; p=0,0498015)

\* statisticky průkazný pokles spotřeby O<sub>2</sub> oproti noradrenalinem stimulované spotřebě O<sub>2</sub> PBMC (df=2; t=3,34; p=0,039524)

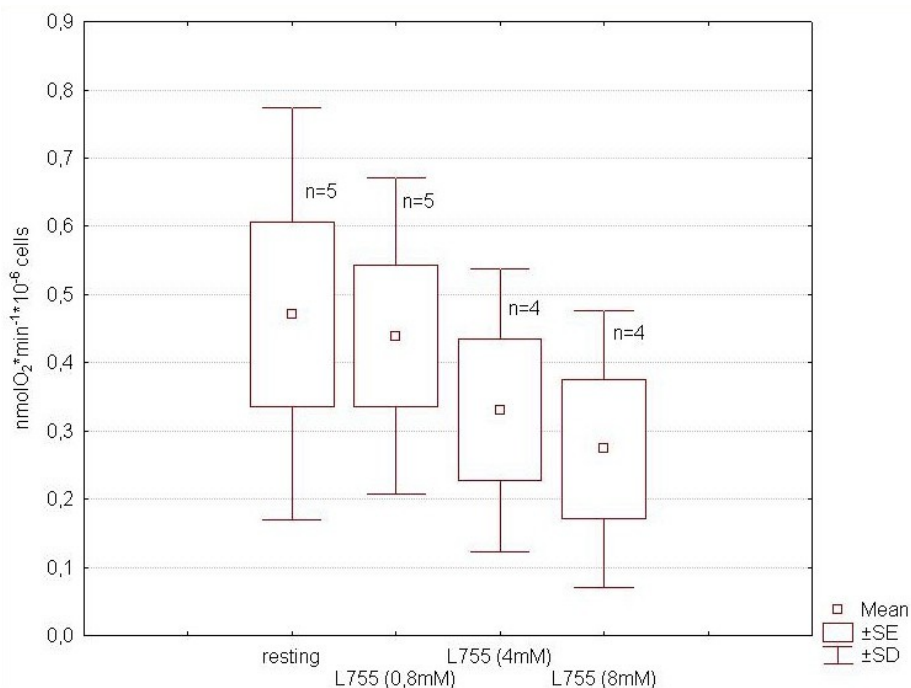
Vliv noradrenalinu na klidovou spotřebu kyslíku PBMC a antagonistický účinek farmaka na noradrenalinem stimulovanou spotřebu PBMC zachycuje obr. 5.2.7.

Průměrná klidová spotřeba kyslíku izolovanými lidskými PBMC ve třech pokusech byla  $0,125 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Po aplikaci noradrenalinu o koncentraci  $1 \times 10^{-4} \text{ M}$  došlo ke zvýšení spotřeby kyslíku v průměru na  $0,309 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 147,2% nárůstu spotřeby kyslíku. Po následném podání  $\beta_2$  adrenergního antagonisty v koncentraci  $6,9 \times 10^{-5} \text{ M}$  došlo ke snížení noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku na průměrnou hodnotu  $0,298 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 3,6% poklesu spotřeby kyslíku. U koncentrace  $4,1 \times 10^{-4} \text{ M}$  se spotřeba kyslíku ještě snížila v průměru na  $0,199 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 35,6% poklesu spotřeby kyslíku. Po podání ICI - 118,551 v koncentraci  $7,6 \times 10^{-4} \text{ M}$  došlo ke snížení noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku PBMC na průměrnou hodnotu  $0,183 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 40,8% poklesu spotřeby. K největšímu poklesu spotřeby  $\text{O}_2$  u noradrenalinem stimulovaných PBMC došlo u farmaka v koncentraci  $7,6 \times 10^{-4} \text{ M}$ , ale z důvodu malého počtu opakování nebylo možno prokázat signifikanci. Vliv noradrenalinu a antagonistický účinek  $4,1 \times 10^{-4} \text{ M}$  ICI - 118,551 farmaka je statisticky průkazný na 5% hladině významnosti při užití párového jednostranného t-testu. Výsledky potvrzují účast  $\beta_2$  adrenergních receptorů v NA termogenezi PBMC.

### **L 755 – $\beta_3$ adrenergní agonista**

L 755 je  $\beta_3$  adrenergní agonista s částečně agonistickým účinkem na  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  adrenergní receptory, které stimuluje při tisícinásobně větších koncentracích, než je tomu u  $\beta_3$  adrenoreceptorů. V experimentech byly použity vzestupné koncentrace 0,8mM, 4mM a 8mM farmaka. Klidovou spotřebu kyslíku PBMC a spotřebu kyslíku po aplikaci L 755 farmaka znázorňuje obr. 5.2.8.

Průměrná klidová spotřeba PBMC byla  $0,471 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Po podání 0,8mM farmaka klesla klidová spotřeba kyslíku PBMC na průměrnou hodnotu  $0,438 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 7% poklesu spotřeby kyslíku. U koncentrace 4mM spotřeba kyslíku PBMC klesla v průměru na  $0,330 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což je 30% pokles. Po aplikaci 8mM  $\beta_3$  adrenergního agonisty došlo k poklesu spotřeby kyslíku PBMC na průměrnou hodnotu  $0,273 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 42% poklesu spotřeby.  $\beta_3$  agonistický účinek L 755 nebyl tedy prokázán. Z výsledků vyplývá, že  $\beta_3$  adrenergní receptory se neúčastní NA termogeneze izolovaných lidských leukocytů.



**Obr. 5.2.8. Ovlivnění klidové spotřeby kyslíku PBMC  $\beta_3$  adrenergním agonistou L 755 (n=5), použito kultivační médium RPMI 1640**

### 5.3. Vliv exogenních substrátů na termogenezi lidských PBMC

Aby se zjistilo, které exogenní substráty mohou NA termogenezi PBMC ovlivnit a jaký zdroj energie je v hormonální termogenezi využit, byl měřen vliv vybraných aminokyselin (glutamin, cystein, methionin) a glukosy na noradrenalinem stimulovanou spotřebu PBMC. Pro studium vlivu exogenních substrátů na termogenezi lidských leukocytů bylo vždy použito kultivační médium, které postrádalo ty složky, jejichž vliv na termogenezi byl zkoumán. Informace o přesném látkovém složení jednotlivých kultivačních médií jsou v příloze 10.1.

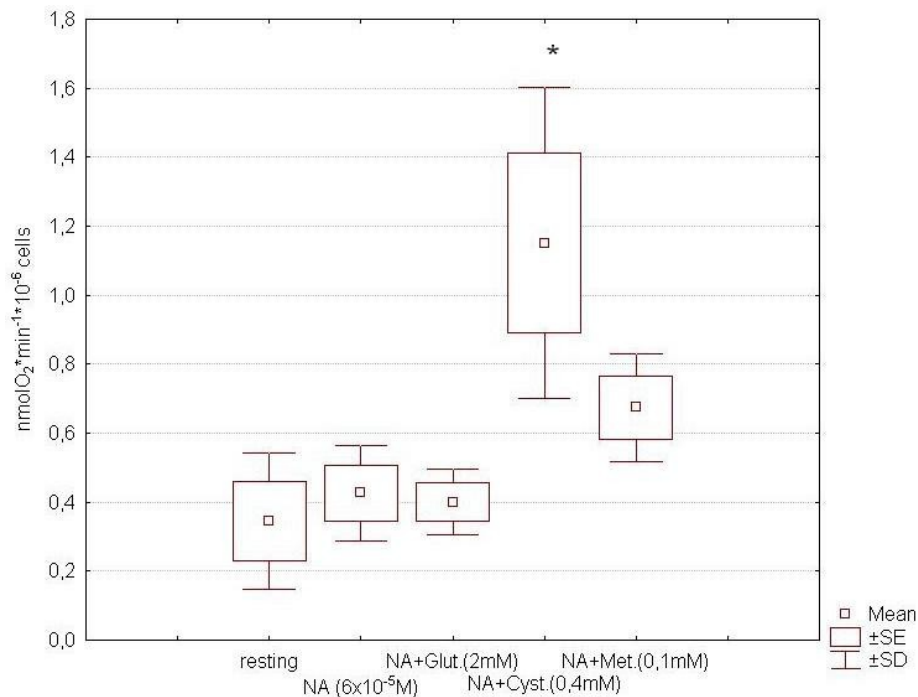
#### Vliv aminokyselin na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC

Pro zjištění vlivu aminokyselin glutaminu, cysteinu a methioninu na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC bylo použito kultivační médium DMEM (katalogové č. BE12-734F) deficientní o cystein, glutamin a methionin. Ve třech experimentech byly izolované PBMC nejprve stimulovány nízkou dávkou noradrenalinu o koncentraci  $6 \times 10^{-5} \text{M}$  (za současného měření spotřeby kyslíku). Následně byl podán 2mM glutamin, 0,4mM cystein a 0,1mM methionin v tomto pořadí a posuzován jejich vliv na noradrenalinem



stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Klidovou spotřebu kyslíku PBMC a spotřebu kyslíku PBMC po aplikaci noradrenalinu a dávek AMK zachycuje obr. 5.3.1. Průměrná klidová spotřeba PBMC byla  $0,344 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk.

Po aplikaci  $6 \times 10^{-5} \text{ M}$  noradrenalinu se klidová spotřeba PBMC zvýšila na průměrnou hodnotu  $0,426 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 23,8% nárůstu spotřeby. Po podání glutaminu se noradrenalinem stimulovaná spotřeba kyslíku PBMC nesignifikantně snížila v průměru na  $0,400 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk.



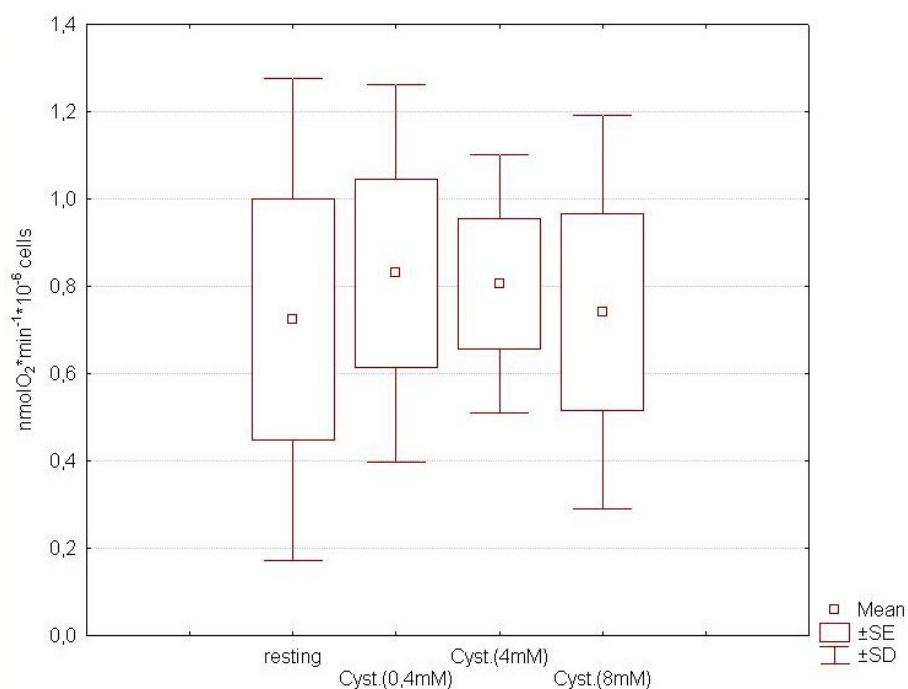
**Obr. 5.3.1. Vliv aminokyselin glutaminu, cysteinu, methioninu na noradrenalinem stimulovanou spotřebu O<sub>2</sub> PBMC (n=3), použito DMEM kultivační médium**

\* statisticky průkazné zvýšení spotřeby O<sub>2</sub> PBMC oproti noradrenalinem stimulovaným PBMC (df=2; t=-2,87; p= 0,05148)

Překvapivé výsledky přineslo podání cysteinu, kde noradrenalinem stimulovaná spotřeba O<sub>2</sub> PBMC po jeho aplikaci vzrostla na průměrnou hodnotu  $1,15 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 169,9% nárůstu spotřeby kyslíku. Následné přidání methioninu spotřebu kyslíku PBMC ovlivněnou cysteinem snížilo na průměrnou hodnotu  $0,674 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což představuje 43,2% pokles spotřeby. Pozitivní vliv cysteinu na NA stimulovanou spotřebu O<sub>2</sub> PBMC je statisticky průkazný na 5% hladině významnosti při užití párového jednostranného t-testu.

### Vliv cysteinu na spotřebu kyslíku PBMC

Pro studium vlivu samotného cysteinu na klidovou spotřebu kyslíku O<sub>2</sub> PBMC bylo použito DMEM kultivační médium deficientní o cystein, glutamin a methionin. Průměrná hodnota klidové spotřeby kyslíku PBMC byla 0,723 nmol O<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>\*10<sup>-6</sup> buněk. Následně byl podán cystein v rostoucí koncentraci 0,4 mM, 4 mM a 8 mM a sledován jeho vliv na klidovou spotřebu PBMC (zachyceno v obr. 5.3.2). Aplikace 0,4mM cysteinu zvýšila klidovou spotřebu PBMC nepatrně, v průměru na 0,830 nmol O<sub>2</sub>\*min<sup>-1</sup>\*10<sup>-6</sup> buněk, což odpovídá 14,8% nárůstu spotřeby. U koncentrovanějších dávek cysteinu (4 mM, 8 mM) k nárůstu spotřeby nedocházelo. Výrazný pozitivní vliv cysteinu na klidovou spotřebu kyslíku PBMC nebyl tedy zaznamenán.



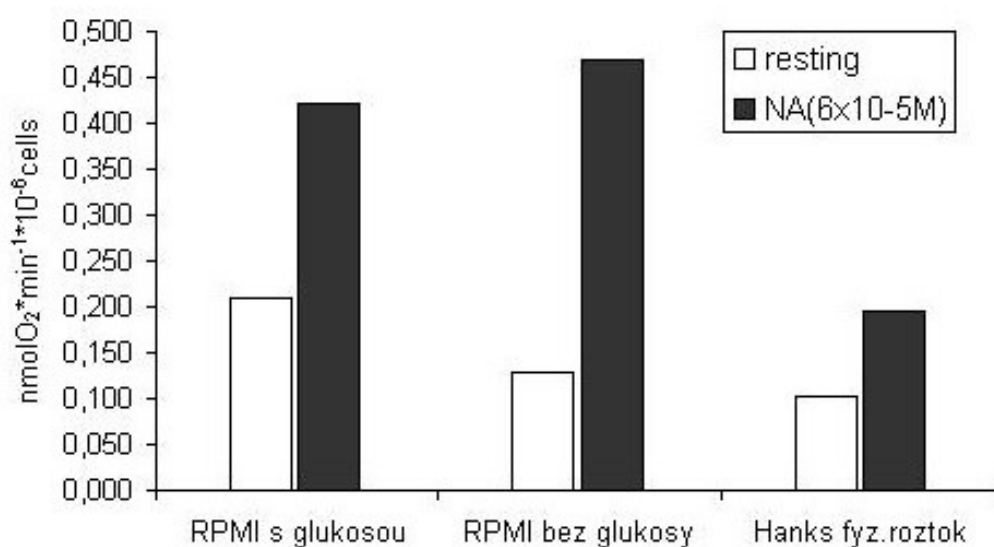
Obr. 5.3.2. Vliv cysteinu na klidovou spotřebu kyslíku PBMC (n= 4), použito DMEM kultivační médium

### Vliv glukosy na termogenezi PBMC

Byl sledován vliv glukosy na klidovou a NA stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. V pokusech bylo použito kultivační médium RPMI 1640 (katalogové č. BE-12-702) s obsahem 2000 mg\*l<sup>-1</sup> glukosy, kultivační médium RPMI 1640 (katalogové č. BE 12-752) bez glukosy a Hanksův fyziologický roztok s 1000 mg\*l<sup>-1</sup> glukosy bez přítomnosti organických látek (katalogové č.10-543). Výsledky klidové a NA stimulované spotřeby kyslíku PBMC v médiích lišících se obsahem glukosy jsou znázorněny na obr. 5.3.3.

Klidová spotřeba  $O_2$  PBMC činila v médiu s glukosou  $0,209 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, po aplikaci noradrenalinu se zvýšila na  $0,421 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 97% zvýšení. V médiu bez glukosy byla klidová spotřeba PBMC  $0,128 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, po aplikaci noradrenalinu se zvýšila na  $0,469 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 266% zvýšení spotřeby kyslíku PBMC. Hodnoty spotřeb kyslíku při použití obou RPMI médií po NA stimulaci PBMC jsou téměř shodné. V Hanksově fyziologickém roztoku byla klidová spotřeba PBMC  $0,101 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, po podání noradrenalinu se zvýšila na  $0,195 \text{ nmol } O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, což odpovídá 93% zvýšení.

Z toho plyne, že absence organických látek v médiu nebrání termogennímu účinku noradrenalinu. Jeho účinek za těchto podmínek je snížen, což znamená že noradrenalinová termogeneze v PBMC je závislá i na přítomnosti jiných organických látek v kultivačním médiu. Z výsledků lze soudit, že obsah glukosy v médiu ovlivňuje počáteční hodnoty klidových spotřeb kyslíku PBMC, ale její nadbytek nemá přímý vliv na NA termogenezi PBMC.



**Obr. 5.3.3. Vliv glukosy na termogenezi PBMC (n=1), použito kultivační médium RPMI 1640 bez glukosy, médium RPMI 1640 s glukosou a Hanksův fyziologický roztok bez organických substrátů**

## 6. Diskuze

Tato diplomová práce vyšla ze zjištění, že metabolismus izolovaných lidských leukocytů (PBMC) je stimulovatelný aplikací katecholaminů (Janský a kol., 2006; Mikulka, 2005; Stránská, 2003). Cílem této práce bylo proto objasnit biochemickou a fyziologickou podstatu tohoto jevu. Pilotními pokusy bylo zjištěno, že termogenní účinek noradrenalinu (NA) je podmíněn neporušenou strukturou buněčných membrán, poněvadž účinek NA nebylo možno prokázat v homogenizovaných leukocytech. Zaměřil jsem se proto nejdříve na studium významu jednotlivých typů adrenergních receptorů pro NA termogenezi, protože je známo, že jsou lokalizovány v buněčných membránách. Dále jsem studoval význam různých organických substrátů v indukci NA termogeneze.

### 6.1. Úloha adrenergních receptorů v termogenezi lidských leukocytů

Experimentální data byla získávána měřením klidové spotřeby kyslíku izolovaných lidských leukocytů Clarkovou kyslíkovou sondou a srovnávána se spotřebou  $O_2$  po stimulaci jejich metabolismu různými farmaky, která selektivně působila na adrenergní receptory na buněčném povrchu. Tím, že došlo ke změně spotřeb kyslíku po aplikaci jednotlivých farmak, jsem kvalitativně potvrdil přítomnost  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_2$  adrenergních receptorů na povrchu leukocytů a prokázal úlohu těchto receptorů v noradrenalinové termogenezi. Naopak skutečnost, že  $\alpha_1$  a  $\beta_3$  adrenergní agonisté neovlivňovali klidovou spotřebu PBMC ukázala na neúčast těchto receptorů v noradrenalinové termogenezi izolovaných leukocytů. Metoda stanovení podílu adrenergní recepce měřením spotřeby kyslíku Clarkovou kyslíkovou sondou má však svoje limity: použitá farmaka nejsou plně specifickými agonisty a antagonisty; nepodařilo se prokázat koncentrační efekt těchto farmak, poněvadž tento postup vyžaduje provedení velkého množství opakování, což nebylo možno z nedostatku materiálu (leukocytů) provést.

Literární údaje potvrzují výskyt  $\alpha_1$  adrenoreceptorů (Ricii a kol., 1999), přítomnost  $\alpha_2$  adrenergních receptorů (Titinchi a kol., 1984; Goin a kol., 1991) a  $\beta$  adrenergních receptorů (Landmann a kol., 1988, 1992; De Blasi a kol., 1986) na povrchu membrán izolovaných lidských leukocytů. Neuvádějí však úlohu těchto receptorů a jejich subtypů v noradrenalinem indukované termogenezi PBMC. Z tohoto důvodu jsem nemohl porovnat mé výsledky s odbornou literaturou.

Podání  $\alpha_1$  agonisty nepřineslo zvýšení klidové spotřeby, naopak při nejvyšší podané koncentraci farmaka  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  došlo k poklesu klidové spotřeby kyslíku PBMC v průměru o 23,3 %. Po aplikaci  $\alpha_2$  adrenergního agonisty došlo u 10mM koncentrace farmaka k signifikantnímu nárůstu spotřeby kyslíku v průměru o 26,6 % z klidové spotřeby  $0,365 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk na průměrnou spotřebu  $0,462 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk. Po aplikaci  $\alpha$  adrenergního antagonisty o koncentraci  $5,54 \times 10^{-4} \text{M}$  došlo k signifikantnímu snížení spotřeby kyslíku v průměru o 54,5 % z noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku  $0,967 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk na  $0,440 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk.

Látka se specifickými  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  adrenergními antagonistickými účinky nebyla dostupná, takže bližší stanovení podílů  $\alpha$  adrenergní receptce na mediaci noradrenalinové termogeneze nebylo možné. Na základě *in vitro* experimentů prováděných s  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  agonistou a  $\alpha$  adrenergním antagonistou lze soudit, že v noradrenalinové termogenezi PBMC se uplatňují  $\alpha_2$  adrenergní receptory. Výrazný antagonistický účinek  $\alpha$  adrenergního antagonisty lze připsat tomu, že použité farmakum nepůsobí jen inhibičně na  $\alpha$  adrenergní receptory, ale může působit antagonisticky i na jiné receptory účastníci se noradrenalinové odpovědi.

Pokusy s  $\beta_2$  selektivním antagonistou a  $\beta_3$  adrenergním agonistou doplnily naměřené výsledky uvedené v mé bakalářské práci o úloze  $\beta$  adrenergních receptorů v hormonální termogenezi PBMC. Po aplikaci  $\beta_2$  selektivního adrenergního antagonisty v nejvyšší podané koncentraci  $7,6 \times 10^{-4} \text{M}$  došlo k poklesu spotřeby kyslíku noradrenalinem stimulovaných PBMC o 40,8 % (z průměrné hodnoty  $0,309 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk na  $0,183 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk). Naměřená data s  $\beta_2$  agonistou (Mikulka, 2005) ukazují zvýšení klidové spotřeby  $\text{O}_2$  jen o 20,9 %. Tento procentuální rozdíl mezi působením  $\beta_2$  antagonisty a  $\beta_2$  agonisty lze vysvětlit tím, že v případě  $\beta_2$  agonisty nebyla použita dostatečně vysoká účinná koncentrace farmaka, která by zvýšila klidovou spotřebu kyslíku na odpovídající hodnotu poklesu spotřeby kyslíku po aplikaci  $\beta_2$  antagonisty.

Pro úplný přehled působení adrenergních receptorů v hormonální termogenezi uvádím i výsledky  $\beta_1$  adrenergní receptce z bakalářské práce (Mikulka, 2005). Po aplikaci  $\beta_1$  adrenergního antagonisty o koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  došlo ke snížení noradrenalinem stimulované spotřeby kyslíku PBMC v průměru o 48,7 %, kdežto  $\beta_1$  agonista zvýšil klidovou spotřebu PBMC o 38,9 %.

Po podání  $\beta_3$  adrenergního agonisty nebyl pozorován vzestup klidové spotřeby kyslíku PBMC. Naopak se klidová spotřeba kyslíku po podání farmaka v nejvyšší použité koncentraci 8mM snížila o 42 % (z 0,471 nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk na průměrnou hodnotu 0,273 nmol  $O_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk). Objektivnější stanovení  $\beta_3$  adrenergní receptce na mediaci noradrenalinové termogeneze nebylo provedeno kvůli nedostupnosti  $\beta_3$  adrenergního antagonisty. Lze tedy předpokládat, že  $\beta_3$  adrenergní receptory se nepodílejí na zprostředkování hormonální termogeneze u PBMC. Výsledky získané měřením spotřeby kyslíku na PBMC se liší od dat naměřených na adipocytech hnědé tukové tkáně laboratorních hlodavců, kde se na noradrenalinové termogenezi převážně podílely  $\beta_3$  receptory (Zhao a kol., 1998; Cannon a kol., 2000) a  $\alpha_1$  adrenergní receptory (Zhao a kol., 1997).

Z *in vitro* experimentů prováděných na lidských izolovaných leukocytech s adrenergními specifickými agonisty a antagonisty lze říci, že na zprostředkování noradrenalinové termogeneze se podílejí z 12 %  $\alpha_2$  adrenoreceptory, z 8 %  $\beta_2$  adrenoreceptory, z 25 %  $\beta_1$  adrenergní receptory.  $\alpha_1$  a  $\beta_3$  adrenergní receptory se v mechanismu indukce hormonální termogeneze neprojevují.

## 6.2. Význam různých substrátů pro NA termogenezi PBMC

Měřením spotřeby kyslíku PBMC v Hanksově fyziologickém roztoku bylo zjištěno, že NA termogeneze probíhá i bez přítomnosti externích organických látek v médiu. Námí použitý Hanksův fyziologický roztok obsahoval pouze anorganické látky a jen 1000  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  glukosy (viz. 10.1.) Klidová spotřeba  $O_2$  PBMC v Hanksově roztoku byla však menší než klidová spotřeba v RPMI médiu s glukosou (2000  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Podání noradrenalinu leukocytům v Hanksově fyziologickém roztoku vedlo ke zvýšení spotřeby kyslíku o 93 %. Hodnota této spotřeby dosahovala jen poloviny hodnot získaných po NA stimulaci PBMC v médiu s glukosou.

Problematika vlivu různých substrátů využívaných pro odpřažení oxidace od fosforylace v procesu noradrenalinové termogeneze u živočichů a jejich potencionálního využití jako zdroje energie pro tvorbu tepla není dostatečně známá.

Řada autorů popsala, že působení mastných kyselin a acetyl-CoA jako univerzálních molekul, které se vážají na purinový nukleotid odpřahujícího proteinu (UCP) umožňuje

zprůchodnění UCP pro vodíkové ionty získané z mitochondriálních oxidací (Cannon a kol., 1982; Ricquier a kol., 1983; Bouillaud a kol., 1986; Casteilla a kol., 1987).

Abychom zjistili, které substráty mají význam pro indukci hormonální termogeneze, jsme studovali vliv glutaminu, cysteinu, methioninu a glukosy na NA termogenezi PBMC v médiu postrádajícím tyto substráty. Z experimentů vyplývá, že aminokyselina glutamin se v NA termogenezi PBMC neprojevuje. Po její aplikaci NA stimulovaná spotřeba kyslíku nesignifikantně klesla o 6,1 %. Lze předpokládat, že nadbytek glutaminu v buňce nejprve podléhá deaminaci katalyzovanou enzymem glutaminasou a posléze transaminaci enzymem transaminázou za vzniku  $\alpha$ -ketoglutarátu, který se použije v citrátovém cyklu na tvorbu ATP (Murray, a kol., 1993). Tento osud glutaminu a jeho biochemické využití buňkou bude patrně stejný jak u PBMC, tak i u adipocytů hnědé tukové tkáně. Noradrenalinem zvýšená spotřeba kyslíku PBMC není tedy závislá na externí dodávce glutaminu.

Dále jsme zkoumali vliv cysteinu a methioninu na NA stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC. Cystein signifikantně zvýšil NA stimulovanou spotřebu kyslíku PBMC v průměru o 169 %, zatímco methionin tuto spotřebu inhiboval v průměru o 43 %. Samotná aplikace stejných koncentrací cysteinu leukocytům, které nebyly stimulovány noradrenalinem, neměla na jejich klidovou spotřebu kyslíku žádný účinek. Lze říci, že zvýšená nabídka cysteinu může sloužit buňkám jako externí zdroj energie pro noradrenalinovou termogenezi. Cystein je zřejmě katabolizován jak cestou přímé oxidace (cysteisulfínátová cesta), tak cestou transaminace (3-merkaptopyruvátová cesta) na intermediát pyruvát (Murray, a kol., 1993). Pyruvát je v mitochondriích přeměněn pyruvát-dehydrogenasou na acetyl-CoA. Acetyl-CoA by se tedy mohl v NA termogenezi PBMC vázat na purinový nukleotid UCP a odpráhnout oxidace od fosforylace.

Katabolismus cysteinu může být stejný jak u adipocytů hnědé tukové tkáně (BAT), tak i u PBMC. Výsledným metabolickým intermediátem je pyruvát, který po přeměně na acetyl-CoA může být využit v citrátovém cyklu pro tvorbu energie. Přeměna pyruvátu na acetyl-CoA bude pravděpodobně intenzivnější v hnědé tukové tkáni z důvodu velkého obsahu mitochondrií (Smith, 1962) než v izolovaných leukocytech.

Vliv glukosy na NA termogenezi byl studován měřením velikosti termogenní odpovědi PBMC na noradrenalin. Používali jsme RPMI kultivační médium bez glukosy a RPMI médium obsahující glukosu. V médiu s glukosou činila klidová spotřeba kyslíku PBMC  $0,209 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6} \text{ buněk}$ , po podání NA se zvýšila o 97 %. V médiu neobsahujícím glukosu

činila klidová spotřeba kyslíku PBMC  $0,128 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10^{-6}$  buněk, po aplikaci NA se zvýšila o 266 %. Absolutní hodnoty NA stimulovaných spotřeb  $\text{O}_2$  PBMC byly téměř shodné. Z toho lze vyvodit, že přebytek glukosy pozitivně ovlivňuje jen klidový metabolismus a ne NA stimulovanou termogenezi. Tento závěr je podpořen literárními údaji shrnujícími metabolismus glukosy tukovou tkání (Murray, a kol., 1993). Glukosa se účastní v tukové tkáni několika drah, například oxidace na  $\text{CO}_2$  v citrátovém cyklu, oxidace v pentozové dráze, přeměny na mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a tvorby acylglycerolu přes glycerol-3-fosfát. Předpokládá se, že glycerol-3-fosfát (vzniklý glykolýzou) zvyšuje esterifikaci volných mastných kyselin. Stoupá-li využití glukosy tukovou tkání, klesá výdej volných mastných kyselin v buňce. Volné mastné kyseliny spolu s acetyl-CoA jsou v adipocytech hnědé tukové tkáně využity pro odpáření oxidace od fosforylace. Domnívám se, že využití glukosy v NA termogenezi bude stejné jak v lidských izolovaných leukocytech, tak i v buňkách hnědé tukové tkáně.

Z výsledků mé diplomové práce vyplývá, že význam různých substrátů pro NA termogenezi PBMC je následující: NA termogeneze není závislá na přítomnosti organických substrátů v médiu (glutamin, methionin, glukóza) s výjimkou cysteinu, který u PBMC spotřebu kyslíku zvyšoval. Tato získaná data však nemohou být porovnána s údaji v odborné literatuře, protože se touto problematikou dosud nikdo nezabýval.



## 7. Závěr

Použitím Clarkovy kyslíkové sondy byl v této práci měřen účinek  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  a  $\beta_3$  adrenergických agonistů na klidovou spotřebu kyslíku a účinek  $\alpha$  a  $\beta_2$  adrenergických antagonistů na noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku izolovaných lidských leukocytů (PBMC).

Bylo zjištěno, že  $\alpha_2$  adrenergní agonista (Clonidin) zvyšuje klidovou spotřebu o 26,6 %,  $\alpha$  adrenergní antagonist (Phentolamin) snížil noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku v průměru o 54,4 % a  $\beta_2$  adrenergní antagonist (ICI – 118,551) o 40,8 %. Zatímco  $\alpha_1$  agonista (Cirazolin) snížil klidovou spotřebu kyslíku izolovaných PBMC o 23,3 %, a  $\beta_3$  adrenergní agonista (L755) o 42 %. Tyto výsledky spolu s výsledky prezentovanými v mé bakalářské práci (které prokázaly význam  $\beta_1$  i  $\beta_2$  adrenergních receptorů) naznačují, že termogenní účinek noradrenalinu v lidských izolovaných leukocytech je mediován přibližně z 25 %  $\beta_1$  adrenoreceptory, z 8 %  $\beta_2$  adrenergními receptory a z 12 %  $\alpha_2$  adrenergními receptory.  $\beta_3$  a  $\alpha_1$  adrenergní receptory se v noradrenalinové termogenezi PBMC neuplatňují. Výsledky naznačují, že termogenní účinek NA v PBMC se realizuje přes jiné adrenoreceptory, než termogenní účinek NA v buňkách hnědého tuku.

Dále byla zkoumána úloha exogenně podaných substrátů (glutaminu, cysteinu, methioninu a glukosy) v noradrenalinové termogenezi PBMC. Bylo zjištěno, že termogenní působení noradrenalinu se projevuje i v médiu, které neobsahuje žádné organické substráty (Hanksův fyziologický roztok). Přidání glukosy a aminokyselin nemělo vliv na NA stimulovanou spotřebu kyslíku. V médiu ochuzeném o aminokyseliny (glutamin, cystein, methionin) však přidaný cystein zvyšoval noradrenalinem stimulovanou spotřebu kyslíku o 169,9 %. Oproti tomu nadbytek methioninu tuto zvýšenou spotřebu kyslíku snižoval v průměru o 43,2 %.

Z výsledků vyplývá, že noradrenalinová termogeneze v PBMC není závislá na přítomnosti organických látek v kultivačním médiu, ale je realizována z interních vnitrobuněčných substrátů. Substrátem pro noradrenalinovou termogenezi v PBMC může být aminokyselina cystein. Vzhledem k tomu, že cystein může sloužit jako substrát pro tvorbu acetyl-CoA, je možno předpokládat, že jedním ze substrátů pro NA termogenezi PBMC je acetyl-CoA.

## 8. Literatura

- Ahlquist, R.:** Study of adrenotropic receptors. *Am. J. Physiol.*, 153: 586-599, 1948
- Arch, J. R. S., Kaumann, A. J.:**  $\beta_3$  and  $\beta$ -adrenoreceptors. *Med. Res. Rev.*, 13: 663-729, 1993
- Astrup, A., Simonsen, L., Bulow, J., Madsen, J., Christensen, N. J.:** Epinephrine mediates facultative carbohydrate-induced thermogenesis in human skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, 257: E340-E345, 1989
- Astrup, A.:** Thermogenesis in human brown adipose tissue and skeletal muscle induced by sympathomimetic stimulation. *Acta Endocrinol.*, 112 (Suppl.278): 1-132, 1986
- Astrup, A., Bulow, J., Christensen, N. J., Madsen, J.:** Ephedrine-induced thermogenesis in man: no role for interscapular brown adipose tissue. *Clin. Sci.*, 64: 179-186, 1984
- Astrup, A., Andersen, T., Henriksen, O., Christensen, N.J., Bulow, J., Madsen, J., Quaade, F.:** Impaired glucose-induced thermogenesis in skeletal muscle in obesity, the role of the sympathoadrenal system. *Int. J. Obes.*, 11: 51-66, 1986
- Astrup, A., Bulow, J., Christensen, N. J., Madsen, J.:** Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *AM. J. Physiol.*, 248: E507-515, 1985a
- Astrup, A., Lunsgaard, C., Madsen, J., Christensen, N. J.:** Enhanced thermogenic responsiveness during chronic ephedrine treatment in man. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42: 83-94, 1985b
- Brodde, O. E., Kretsch, R., Ikezono, K., Zerkowski, H. R., Reidemeister, J. C.:** Human  $\beta$ -adrenoreceptors: relation of myocardial and lymphocyte  $\beta$ -adrenoreceptors density. *Science*, 231: 1584-1585, 1986
- Bronnikov, G., Zhang, S. J., Cannon, B., Nedergaard, J.:**  $\alpha_1$  inhibition of cAMP accumulation of  $(Ca^{2+})_i$  – mediated stimulation of phosphodiesterase xxx in brown adipocytes. Submitted for publ.000, 1998
- Bengtsson, T., Redegren, K., Strosberg, A. D., Nedergaard, J., Cannon, B.:** Down regulation of  $\beta_3$ -adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor. *J. Biol. Chem.*, 271: 33366- 33375, 1996
- Bouillaud, F., Weissenbach, J., Ricquier, D.:** Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown adipose tissue uncoupling protein. *J. Biol. Chem.*, 261: 1487-1491, 1986
- Brück, K., Baum, E., Schwennicke, H. P.:** Cold adaptive modifications in man induced by repeated short-term cold exposure and duty a 10-day and – night cold exposure. *Pflügers Arch.*, 363: 125-133, 1976
- Bond, R. A., Clarke, D. E.:** Agonist and antagonist characterization of a putative adrenoreceptor with distinct pharmacological properties from the  $\alpha$ - and  $\beta$ - subtypes. *Brit. J. Pharmacol.*, 95: 723-734, 1988
- Bahouth, S. W., Cui, X., Beauchamp, M. J., Shimomura, H., George, S. T., Park, E. A.:** Promoter analysis of the rat  $\beta_1$ -adrenergic receptor gene identifies sequences involved in basal expression. *Mol. Pharmacol.*, 51: 620-629, 1997
- Blaak, E. E., Van Baak, M. A., Kemerink, G. J., Pakbiers, M. T. W., Heidendal, G. A. K., Saris, W. M. H.:**  $\beta$ -Adrenergic stimulation of energy expenditure and forearm skeletal muscle metabolism in lean and obese men. *Am. J. Physiol.*, 267: E306-E315, 1994
- Cannon, B., Nedergaard, J.:** Adrenergic regulation of brown adipocyte differentiation. *Biochem. Soc. trans.*, 24: 407-412, 1996

**Cannon, B., Golozoubova, V., Matthias, A., Ohlson, K. E., Jacobsson, A., Nedergaard, J.:** Is there a life in the cold without UCP1? Uncoupling proteins and thermoregulatory thermogenesis. In: Heldmaier, G., Klingenspor, M. (Eds.), *Life in the cold*. Springer, Berlin, pp., 387-400, 2000

**Cannon, B., Hedin, A., Nedergaard, J.:** Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue. *FEBS Lett.*, 150: 129-132, 1982

**Casteilla, L., Forest, C., Robelin, J., Ricquier, D., Lombet, A., Ailhaud, G.:** Characterization of mitochondrial-uncoupling protein in bovine fetus and newborn calf. *Am. J. Physiol.*, 252: E627-E636, 1987

**De Blasi A., Lipartiti M., Motulsky H. J., Insel P. A., Fratelli M.:** Agonist – induced redistribution of beta – adrenergic receptors on intact human mononuclear leukocytes: redistributed receptors are nonfunctional. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61 (6): 1080 – 1088, 1985

**De Blasi A., Maisel A. S., Feldman R. D.:** In vivo regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors on human mononuclear leukocytes: Assessment of receptor number, location, and function after posture change, exercise, and isoproterenol infusion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 847-853, 1986

**Emorine, L.J., Feve, B., Pairault, J., Briend-Sutren, M. M., Marullo, J., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, D.A.:** Structural basis for functional diversity of  $\beta$ 1-  $\beta$ 2- and  $\beta$ 3-adrenergic receptors. *Biochem. Pharmacol.*, 41: 853-859, 1991

**Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-utren, M. M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutchko, C., Strosberg, A. D.:** Molecular characterization of the human  $\beta$ 3-adrenergic receptor. *Science.*, 245: 1118-1121, 1989

**Fleury, Ch., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillard, F., Seldin, M. F., Surwit, R.S., Ricquier, D., Warden, C. H.:** Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genetics*, 15: 269-272, 1997

**Ford, A. P. D., Williams, T. J., Blue, D. R., Clarke, D. E.:**  $\alpha$ 1-Adrenoreceptors classification: sharpening Occams razor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 167-170, 1994

**Foster, D. O., Frydman, M. L.:** Nonshivering thermogenesis in the rat.II. Measurement of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of the calorogenesis induced by noradrenaline. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 110-122, 1978b

**Frank, S. M., El-Gamal, N., Raja, S. N., Wu, P. K.:** Alpha-adrenoreceptor mechanisms of thermoregulation during cold challenge in humans. *Clin.Sci.*, 91: 627-631, 1996

**Goetz, A. S., King, H. K., Ward, S. D., True, T. A., Rimele, T. J., Saussy, D. L.:** BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of alpha 1-adrenoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 272: R5-R6, 1995

**Gilman, A.:** G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36: 577, 1984

**Graafsma S. J., Van Tits L. J., Willems P. H., Hectors M. P., Rodrigues De Miranda J. F., De Pont J. J., Thien T.:** Beta 2-adrenoreceptor up-regulation in relation to cAMP production in human lymphocytes after physical exercise. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 30: 142S-144S, 1990

**Gietzen D. W., Goodman T. A., Weiler P. G., Graf K., Gregau D. R., Magliozzi J. R., Doran A. R., Maddock R. J.:** Beta receptors density in human lymphocyte membranes: Change with aging? *J. Gerontol.: biol. Scien.*46 (4): B130-134, 1991

**Goin J. C., Sterin-Borda E. S., Finiasz M., Fernandez J., De Bracco M. E.:** Active alpha-2 and beta-adrenoreceptors in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int. J. Cancer*,49: 178 – 181, 1991

**Giacobino, J. P.:** The significance of uncoupling protein 3 (UCP3) for skeletal muscle thermogenesis. Abstract from the Symposium: Molecular Basis of Human Adrenergic Thermogenesis, Prague, p.7, 1999

**Hieble, J. P., Bylund, D. B., Clarke, D. E., Eikenberg, D. C., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Ruffalo J. R.:** International union of pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoreceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.*, 47: 267-270, 1995

**Heaton, J. M.:** The distribution of brown adipose tissue in the human. *J. Anat.*, 112: 35-39, 1972

**Hull, D.:** The structure and function of brown adipose tissue. *Br. Med. Bull.*, 22: 92-96, 1966

**Hepler, J. R., Gilman, A. G.:** G proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 17: 383-387, 1992

**Haen E., Liebl B., Lederer T., Pliska V.:** Revised radioreceptor assay for beta 2-adrenoreceptors expressed on peripheral mononuclear leukocytes. *J. Recept. Res.*, 11: 129 – 140, 1991

**Harms, H. H., Zaagsma, J., De Vente, J.:** Differentiation of  $\beta$ -adrenoreceptors in right atrium, diaphragm and adipose tissue of the rat, using stereoisomers of propranolol, alprenolol, niferalol and practolol. *Life Sci.*, 21: 123-128, 1977

**Hutten, P., Hirvonen, J., Kinnula, V.:** The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 46: 339-345, 1981

**Himms-Hagen, J.:** Cellular thermogenesis. *Annu.Rev.Physiol.*, 38: 315-351, 1976

**Challis, R. A. J., Leighton, B., Wilson, S., Thurlby, P. L., Arch, J. R. S.:** An investigation of the  $\beta$ -adrenoreceptors that mediates metabolic responses to the novel agonist BRL28410 in rat soleus muscles. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 947-950, 1988

**Janský, L.:** Non-shivering thermogenesis and its thermoregulatory significance. *Biol. Rev.*, 48: 85-132, 1973

**Janský, L., Matoušková, E., Stránská, E.:** Thermogenic action of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells. *J. of Thermal. Biol.*, 31: 50-52, 2006

**Janský, L., Šrámek, P., Šavlíková, J., Uličný, B., Janáková, H., Horký, K.:** Change in sympathetic activity, cardiovascular functions and plasma hormone concentrations due to cold water immersion in men. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 74: 148-152, 1996b

**Janský, L., Vybíral, S., Štich, V., Šrámek, P., Kvítek, J., Lesná, I., Šimečková, M.:** Human humoral thermogenesis. In: Blatteis, C.M. (Ed.), *Thermoregulation*. Vol. 813, *Annals New York Acad. Sci.* pp. 689-696, 1997

**Janský, L.:** Cold-induced thermogenesis. In: *High-Altitude Medical Science*.(Ed.), Ueda, G., Kusama, S., N.F. Voekel. Shinsu University. pp. 349-360, 1988

**Janský, L.:** Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.*, 75: 237-239, 1995

**Janský, L., Janský, P., Vávra, V.:** Man in a cold environment: Whole body cooling versus local cooling. In: *Environmental Ergonomics X*. (Ed.), Tochiara et. Al., Fukuoka, Japan. pp. 203-206, 1998

**Janský, L.:** Fyziologická podstata přizpůsobení člověka na chlad. *Čs. Fyziol.*, 52: 3, 107-117, 2003

**Janský, P., Janský, L.:** Sites and cellular mechanisms of human adrenergic thermogenesis- a review. *J. Therm. Biol.*, 27: 269-277, 2002

**Kobilka, B.:** Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 15: 87-114, 1992

**Kikchi-Utsumi, K., Kikchi-Utsumi, M., Cannon, B., Nedergaard, J.:** Differential regulation of the expression of  $\alpha$ 1-adrenergic subtypes genes in brown adipose tissue. *Biochem. J.*, 322: 417-422, 1997

**Kaumann, A. J.:** Is there a third heart  $\beta$ -adrenoreceptor. *TIPS*, 10: 316-316, 1989

- Lesná, I., Vybíral, S., Janský, L., Zeman, V.:** Human non-shivering thermogenesis. *Journal of Thermal Biology*, 24: 63-69, 1999
- Linek, V., Vacek, V., Sinkule, J., Beneš, P.:** Měření koncentrace kyslíku membránou pokrytými kyslíkovými sondami. *Academia*, 10-141, 1987
- Lefkowitz, R. J., Caron, M. G.:** Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.*, 263: 4993-4996
- Lomasney, J. W., Cotacchia, S., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G.:** Molecular biology of  $\alpha$ -adrenergic receptors: implications for receptor classification and structure function relationship. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1095: 127-139, 1991
- Lesná, I., Vybíral, S., Janský, L., Zeman, V.:** Human nonshivering thermogenesis. *J. Therm. Biol.*, 24: 63-69, 1999
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., Brown, T. G.:** Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature*, 214: 597-598, 1967
- Landmann, R., Portenier, M., Staehelin, M., Wesp, M., Box, R.:** Changes in  $\beta$ -adrenoreceptors and leukocyte subpopulations after physical exercise in normal subject. *Arch Pharmacol*, 337: 261-266, 1988
- Landmann R.:** Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur. J. of Clin. Investigation*, 22 (Suppl.1): 30-36, 1992
- Lundholm, L., Svedmyr, N.:** Influence of adrenaline on blood flow and metabolism in the human forearm. *Acta Physiol. Scand.*, 65: 344-351, 1965
- Mikulka, A.:** Úloha různých typů adrenergických receptorů v termogenezi lidských lymfocytů. Diplomová bakalářská práce. JČU, 2005
- Minneman, K. P., Esbenshade, T. A.:**  $\alpha$ 1- Adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34: 117-133, 1994
- Michell, R.:** Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochem. Biophys. Acta.*, 415: 81-147, 1975
- Mejsnar, J., Červinka, M., Janský, L.:** Substitution of calorogenic effect of noradrenaline and adrenaline and differences in their inhibition by propranolol. *Physiol. Bohemoslov.*, 25: 201-206, 1976
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.:** *Harper's Biochemistry*. Appleton and Lange, 1993
- Neer, E. J.:** Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*, 80: 249-257, 1995
- Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J. M., Mattei, M. G., Grossberg, A. D., Emorine, L. J.:** Molecular characterization of  $\beta$ 3-adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes. *EMBO J.*, 10: 3721-3727, 1991
- Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G.:** A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J.*, 11: S47-51, 1997
- Perkins, N. M., Rothwell, N. J., Stock, M. J., Stone, T. W.:** Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature.*, 289: 401-402, 1981
- Perkins, J. P.:** *The beta-adrenergic receptors*. Humana Press, Clifton, New Jersey, 1991
- Ricquier, D., Barlet, J. P., Garel, J. M., Combes-Georges, M., Dubois, M. P.:** An immunological study of the uncoupling protein of brown adipose tissue mitochondria. *Biochem. J.*, 210: 859-866, 1983

- Ricci A., Bornzeti E., Conterno A., Greco S., Mulatero P., Schena M., Schiavone D., Taybati S. K., Veglio F., Amenta F.:** Alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human peripheral blood lymphocytes. *Hypertension*, 33: 708 – 712, 1999
- Roberts, S. J., Russel, F. D., Molenaar, P., Summers, R. J.:** Characterization and localization of atypical  $\beta$ -adrenoreceptors in rat ileum. *Brit. J. Pharmacol.*, 116: 2549-2556, 1995
- Strosberg, A. D.:** Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.*, 196: 1-10, 1991
- Strosberg, A. D.:** Biotechnology of  $\beta$ -adrenergic receptors. *Mol. Neurobiol.*, 4: 211-250, 1992
- Strosberg, A. D., Pietri-Rouxel, F.:** Function and regulation of the  $\beta_3$ -adrenoreceptor. *Trends Pharmacol. Sci.*, 17: 373-381, 1996
- Saussy, D. L., Goetz, A. S., Queen, K. L., King, H. K., Lutz, M. W., Rimele.:** Structure activity relationships of a series of buspirone analogs at alpha-1 adrenoreceptors: further evidence that rat aorta alpha-1 adrenoreceptors are of the alpha-1D-subtype. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 278: 136-144, 1996
- Smith, R. E.:** Thermoregulation by brown adipose tissue in cold. *Fed. Proc.*, 21: 221, 1962
- Smith, R. E.:** Thermoregulatory and adaptive behavior of brown adipose tissue. *Science*, 146: 1686- 1689, 1964
- Smith, R. E., Horwitz, B. A.:** Brown fat and thermogenesis. *Physiol.Rev.*, 49: 330-425, 1969
- Summers, R. J., McMartin, L. R., Kompa, A., Gu, X., Molenaar, P.:** Signaling pathways in cardiac failure. *Clin. Pharmacol. Physiol.*, 22: 874-876, 1995a
- Simonsen, L., Bulow, J., Madsen, J., Christensen, N. J.:** Thermogenic response to epinephrine in the forearm and abdominal subcutaneous adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 263: E850-E855, 1992
- Simonsen, L., Stallknecht, B., Bulow, J.:** Contribution of skeletal muscle and adipose tissue to adrenaline-induced thermogenesis in man. *Int. J. obes.*, 17 (Suppl.3): S47-S51, 1993
- Simonsen, L., Stefl, B., Christensen, N. J., Bulow, J.:** Thermogenic response to adrenaline during restricted blood flow in the forearm. *Acta Physiol. Scand.*, 166: 31-38, 1999
- Stránská, E.:** Ovlivnění růstu a spotřeby kyslíku lidských lymfocytů adrenergními agonisty. Diplomová práce. JČU, 2002
- Šrámek, P., Šimečková, M., Janský, L., Šavlíková, J., Vybíral, S.:** Human physiological response due to immersion into water of different temperatures. *Eur. J. Appl. Physiol. Occupational Physiol.*, 81: 436-442, 1999
- Tan K. S., McFarlane L. C., Coutie W. J., Lipworth B. J.:** Effects of exogenous female sex – steroid hormones on lymphocyte beta 2-adrenoreceptors in normal females. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 41 (5): 414 -416, 1996
- Titinchi S., Clark B.:** Alpha 2-adrenoreceptors in human lymphocytes: direct characterization by [ $H^3$ ]-yohimbine binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 121: 1 – 7, 1984
- Vybíral, S., Janský, L., Lesná, I., Štich, V., Zeman, V.:** Differences in thermoregulatory response to cold in cold adapted and obese humans. In: Werner, J., Hexamer, M. (Ed.), *Environmental Ergonomics IX*, Shaken Verlag, Aachen. pp. 169-172, 2000a
- Vybíral, S., Janský, L., Lesná, I., Zeman, V.:** Thermoregulation in winter swimmers and physiological significance of human adrenergic thermogenesis. *Exp. Physiol.*, 85: 322-326, 2000b
- Watson, S., Girdlestone, D.:** Receptor and ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol. Sci. Suppl.*, 1-73, 1995

**Zhao, J., Cannon, B., Nedergaard, J.:**  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of  $\beta$ 3-adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 32847-32856, 1997

**Zhao, J., Cannon, B., Nedergaard, J.:** Thermogenesis is  $\beta$ 3-but not  $\beta$ 1-adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am. J. Physiol.*, 275: R2002-R2011, 1998

**Zhao, J., Cannon, B., Nedergaard, J.:**  $\alpha$ 1-adrenergic stimulation potentiates the thermogenic action of  $\beta$ 3-adrenoreceptor-generated cAMP in brown fat cells. *J. Biol. Chem.*, 272: 32847-32856, 1997

## **Seznam internetových odkazů**

<http://www.sciencedirect.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Europe\\_Home/Czech\\_Republic.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Europe_Home/Czech_Republic.html)

<http://www.astrazeneca.com/>

<http://www.biopharmalink.com/home.htm>

<http://citaty.jirpa.cz/>

## 9. Seznam zkratek

AMK	aminokyseliny
ATP	adenozintrifosfát
BAT	hnědá tuková tkáň (z angl. Brown Adipose Tissue)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
DAG	diacylglycerol
GRK	G-protein receptor kináza
IP <sub>3</sub>	inositol 1,4,5-trifosfát
NA	noradrenalin
NST	netřesová termogeneze (z angl. Non Shivering Thermogenesis)
ot./min.	počet otáček za minutu
PE	polyethylen
PBMC	bílé krvinky (z angl. Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PAK	cAMP-dependentní proteinkináza
PIC	fosfoinositidáza C
PIP <sub>2</sub>	fosfatidylinositol 4,5-bis-fosfát
UCP	odpřahující termogenní protein, tzv. termogenin (z angl. Uncoupling Protein)
SD	směrodatná odchylka (z angl. Standart Deviation)
SE	střední chyba průměru (z angl. Standart Error)





## 10.2. Chemické složení Hanksova fyziologického roztoku

### Hank's balanced salt solution (HBSS)

Cat. No.	04-315	10-508	10-527	10-543	10-547
	Liquid	Liquid	Liquid	Liquid	Liquid
Component	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
<b>Inorganic Salts</b>					
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O		186.00	186.00		
KCl	400.00	400.00	400.00	400.00	400.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60.00	60.00	60.00	60.00	60.00
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O		200.00	200.00		
NaCl	8,000.00	8,000.00	8,000.00	8,000.00	8,000.00
NaHCO <sub>3</sub>	350.00	350.00	350.00	350.00	350.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	90.00	90.00	90.00	90.00	90.00
<b>Other Components</b>					
Glucose	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00	1,000.00
Phenol Red•Na		20.00		20.00	

## 10.3. Farmakologické vlastnosti použitých léčiv

Informace pro použití, čtěte pozorně

# NORADRENALIN LÉČIVA

(Norepinephrini hydrogenotartras)  
injekce

### Výrobce

ZENTIVA, a.s., Praha, Česká republika

### Složení

Účinná látka: Norepinephrinum (ut hydrogenotartras) 1mg v 1 ml injekčního roztoku.

Pomocné látky: Acidum tartaricum, Natrii pyrosulfis, Dinatrii edetas dihydricus, Aqua pro injectione

### Indikační skupina

Periferní analeptikum, alfa-adrenergní sympatomimetikum

### Charakteristika

Norepinefrin (noradrenalin), hormon dřene nadledvinek patří do skupiny katecholaminů. Má vazokonstrikční účinek již v minimálních dávkách, působí na alfa-adrenergní receptory odporového cévního řečiště. Je mediatorem většiny postgangliových sympatických nervových zakončení. Je rychle inaktivován enzymem monoaminoxidázou. Norepinefrin působí pozitivně inotropně na myokard. Zvýší systolický objem a systolický TK. Vazokonstrikčním účinkem na cévy zvýší periferní odpor a diastolický TK. Vzestup tlaku vyvolá vagovým reflexem bradykardii, kterou lze zrušit atropinem. Na rozdíl od epinefrinu nezvyšuje spotřebu kyslíku v myokardu. Metabolicky mobilizuje lipidy, ale jeho hyperglykemické působení je 10krát slabší než u epinefrinu. Nepůsobí na CNS a neovlivňuje bronchiální svalovinu.

### Farmakokinetické údaje

Po intravenózní infuzi dochází k rychlé inaktivaci norepinefrinu. Jen 5% norepinefrinu se vyloučí v nezměněné formě močí. Prostupuje placentární bariérou, snižuje placentární průtok. Neprochází hematoencefalickou bariérou.

### Indikace

Podává se jako periferní analeptikum, při hypotenzii u akutního infarktu myokardu, při anafylaktickém šoku, při výkonech na sympatiku, při operacích tumorů nadledvin, po extirpaci feochromocytomu.

### Kontraindikace

Hypertenze, pokročilá arterioskleróza, srdeční arytmie, přecitlivělost na norepinefrin. Anestezie halotanem vyžaduje zvýšenou opatrnost.

### Nežádoucí účinky

Třes, nauzea, sucho v ústech, bolesti hlavy, palpitace, bradykardie, hypertenze, retrosternální a faryngeální bolest, omezení placentární perfúze, omezení perfúze ledvin a splanchnické oblasti. Vznik tachyfyaxe je možný.

### Lékové interakce

Norepinefrin při současné léčbě inhibitory monoaminoxidázy působí těžkou dlouhotrvající hypertenzi. Účinnost norepinefrinu zvyšují: amfetamin, tricyklická antidepresiva, ganglioplegika, nitrity, antihistaminika, anticholinergika a glukokortikoidy. Naopak snížení účinnosti způsobí sympatolytika, saluretika. V roztocích s alkalickým pH se inaktivuje.

### Dávkování a způsob použití

Podává se přísně intravenózně do žil s větším průsvitem, v kapénkové infuzi s fyziologickým roztokem nebo v 5% roztoku glukózy v dávkách odpovídajících reakci krevního tlaku a stavu pacienta, průměrně 0,1 mg na 10 kg tělesné hmotnosti během 1-2 hodin. Při paravenózním podání a po delším podávání do tenkých žil vzniknou nekrózy. Celková doba podávání a tím i celková dávka norepinefrinu se řídí stavem pacienta a ústupem příznaků. Pečlivé sledování TK, srdeční frekvence, EKG a diurézy jsou nutné.

Noradrenalin Léčiva lze přidat k místním infiltračním anestetikům v koncentraci 1: 200 000.

### Upozornění

Po mnohahodinovém podávání norepinefrinu se infuze nesmí náhle přerušit pro riziko prudkého poklesu TK ze snížené reaktivity cévní stěny na relativně malé množství endogenního norepinefrinu. Norepinefrin je citlivý na alkalickou reakci, injekční stříkačky a jehly nesmějí obsahovat stopy vody. Roztok norepinefrinu musí být čirý a bezbarvý nebo jen lehce nažloutlý!

### Varování

Přípravek se nesmí používat po uplynutí doby použitelnosti vyznačené na obalu.

### Balení

5 ampulí po 1 ml

### Datum poslední revize

srpen 1993, SÚKL, Praha, Česká republika

061196

TISK K. L.

ZENTIVA

ZENTIVA, a.s., U kabelovny 130  
102 37 Praha 10, Dolní Měcholupy, ČESKÁ REPUBLIKA



ZV/308 75



Saint Louis, Missouri 63103 USA  
Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765  
Fax (314) 286-7828  
email: techserv@sigma.com  
sigma-ldrich.com

## Product Information

### Clonidine hydrochloride

Product Number C 7897

Storage Temperature 2-8 °C

#### Product Description

Molecular Formula:  $C_9H_9Cl_2N_3 \cdot HCl$

Molecular Weight: 266.6

CAS Number: 4205-91-8

pK<sub>a</sub>: 8.2<sup>1</sup>

Clonidine is an  $\alpha_2$ -adrenergic agonist that has been used clinically as an antihypertensive<sup>3</sup> and an analgesic.<sup>4</sup> It is an inhibitor of gastrointestinal motility that blocks  $\alpha_2$  sites, which leads to an adrenergic response.<sup>2</sup> Clonidine reduces sympathetic stimulation, which leads to lowering of blood pressure and a slowing of heart rate.<sup>5</sup> It has been generally proposed that clonidine and related antihypertensives act through a group of receptors called the imidazoline receptors.<sup>6,7,8</sup>

#### Precautions and Disclaimer

For Laboratory Use Only. Not for drug, household or other uses.

#### Preparation Instructions

Clonidine hydrochloride is soluble in water (50 mg/ml), with heat as needed, yielding a clear to slightly hazy colorless solution. A solution of 50 mg/ml clonidine in water has a pH of 4.0-5.0. It is also soluble in dehydrated alcohol and slightly soluble in chloroform.<sup>7</sup>

#### Storage/Stability

Solutions of clonidine may be sterilized by autoclaving.

Clonidine should be stored protected from light and in airtight containers.<sup>8</sup>

#### References

1. Clarke's Isolation and Identification of Drugs, Moffat, A. C. et al., eds, The Pharmaceutical Press (London, GB: 1986), p. 481.
2. Clinical Veterinary Pharmacology, 2nd ed., Upson, D.W., ed., Veterinary Healthcare Communications (Lenexa, KS: 1985), p. 450.
3. Szabo, B., Imidazoline Antihypertensive Drugs: a Critical Review on Their Mechanism of Action. *Pharmacol. Ther.*, **93**(1), 1-35 (2002).
4. Boyd, R. E., Alpha2-adrenergic Receptor Agonists as Analgesics. *Curr. Top. Med. Chem.*, **1**(3), 193-197 (2001).
5. Martindale The Extra Pharmacopoeia, 30th ed., Reynolds, J. E. F., ed., The Pharmaceutical Press (London, England: 1993), p. 348.
6. Eglon, R. M., et al., Seeing through a glass darkly: Casting Light on Imidazoline 'I' Sites. *Trends Pharmacol. Sci.*, **19**(9), 381-390 (1998).
7. Head, G.A., et al., Relationship Between Imidazoline and Alpha2-adrenoceptors Involved in the Sympatho-inhibitory Actions of Centrally Acting Antihypertensive Agents. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **72**(2-3), 163-9 (1998).
8. Khan, Z. P., et al., Alpha-2 and Imidazoline Receptor Agonists. Their Pharmacology and Therapeutic Role. *Anaesthesia*, **54**(2), 146-165 (1999).

GCY/RXR 11/02

Tocris Cookson Inc.  
16144 Westwoods Business Park,  
Ellisville, Missouri 63021, USA  
Phone: 800-421-3701  
Fax: 800-483-1993

**TOCRIS**  
b i o s c i e n c e

Tocris Cookson Ltd.  
Northpoint, Fourth Way,  
Avonmouth, BS11 8TA, UK  
Phone: + 44 (0)117 916 3333  
Fax: + 44 (0)117 916 3344

## Product Information

L 755507

Cat. No: 2197

Batch No: 1

4-[[[(Hexylamino)carbonyl]amino]-N-[4-[2-[[[(2S)-2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino]ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide

### Description:

*Subnanomolar potent  $\beta_3$ -adrenergic receptor partial agonist that is > 1000-fold selective over  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors ( $EC_{50}$  values are 0.43, 580 and > 10000 nM for activation of cloned human  $\beta_3$ -,  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors respectively). In vitro, stimulates lipolysis in rhesus adipocytes with an  $EC_{50}$  of 3.9 nM.*

### Physical and Chemical Properties:

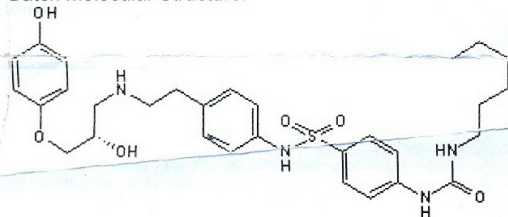
Batch Molecular Formula:  $C_{30}H_{40}N_4O_6S \cdot \frac{3}{4}H_2O$

Batch Molecular Weight: 598.24

CAS Number: [159182-43-1]

Physical Appearance: Off-white solid

Batch Molecular Structure:



Storage: Desiccate at RT

### References:

Parmee *et al* (1998) Discovery of L-755,507: a subnanomolar human  $\beta_3$  adrenergic receptor agonist. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **8** 1107. Fisher *et al* (1998) A selective human  $\beta_3$  adrenergic receptor agonist increases metabolic rate in rhesus monkeys. *J.Clin.Invest.* **101** 2387.

Solubility: DMSO to 100 mM  
Ethanol to 100 mM

### Stability and Solubility Advice:

Some solutions can be difficult to obtain and can be encouraged by rapid stirring, sonication or gentle warming (in a 45-60°C water bath).

Information concerning product stability, particularly in solution, has rarely been reported and in most cases we can only offer a general guide. Our standard recommendations are:

SOLIDS: Provided storage is as stated on the product label and the vial is kept tightly sealed, the product can be stored for up to 6 months from date of receipt.

SOLUTIONS: We recommend that stock solutions, once prepared, are stored aliquoted in tightly sealed vials at -20°C or below and used within 1 month. Wherever possible solutions should be made up and stored on the same day.

### Other Information:

CAUTION – Not fully tested. For research use only. Not for human use.

# Bricanyl® 0,5 mg/ml

(terbutalini sulfas)

injekční roztok

**DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI**

AstraZeneca UK Ltd., Macclesfield, Cheshire, Velká Británie

**VÝROBCE**

AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje, Švédsko

**SLOŽENÍ****Léčivá látka:** terbutalini sulfas 0,5 mg v 1 ml injekčního roztoku**Pomocné látky:** chlorid sodný, kyselina chlorovodíková 35% na úpravu pH, voda na injekci**INDIKAČNÍ SKUPINA**

Bronchodilatans, antiastmatikum

**CHARAKTERISTIKA**

Bricanyl injekce rozšiřuje dýchací cesty, a tak usnadňuje dýchání. Ve vysokých dávkách relaxuje děložní svalstvo.

**FARMAKOKINETICKÉ ÚDAJE**Nástup bronchodilatačního účinku terbutalinu po subkutánní injekci je do 5 minut. Maximálního účinku je dosaženo do 30 minut. Plasmatický biologický poločas ( $t_{1/2}$ ) terbutalinu je asi 16 hodin. Terbutalin je metabolizován převážně konjugací s kyselinou sirovou a vylučován ve formě sulfátu. Přeměnou nevznikají žádné biologicky aktivní metabolity. Terbutalin je po intravenózním nebo subkutánním podání vyloučen z 90 % močí během 48 - 96 hodin, z toho asi 60 % v nezměněné formě.**INDIKACE**

Bronchiální astma. Chronická bronchitida, emfyzém plic a jiná onemocnění plic, kde je bronchokonstrikce komplikujícím faktorem.

**KONTRAINDIKACE**

Přecitlivělost na kteroukoliv složku přípravku.

**NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY**Intenzita nežádoucích účinků závisí na dávce a způsobu podání. Titrace dávky na počátku léčby snižuje riziko výskytu nežádoucích účinků. Všechny nežádoucí účinky, které byly pozorovány, např. třes, bolest hlavy, tonické svalové křeče a palpitace, jsou typické pro sympatomimetické aminy. Většina těchto nežádoucích účinků spontánně vymizí v průběhu 1 až 2 týdnů léčby. Dále se může objevit kopřivka a vyrážka. Byly pozorovány: **betablokátory**, ospalost a změny chování, jako je agitovanost, zvýšená aktivita a neklid.**INTERAKCE**

Betablokátory (včetně podávání očních kapek s betablokátory), zvláště neselektivní, mohou částečně nebo úplně antagonizovat účinek terbutalinu. Hypokalémie vyvolaná podáváním terbutalinu může být potencována současným podáváním derivátů xantinu, steroidů a některými diuretiky.

**DÁVKOVÁNÍ A ZPŮSOB PODÁVÁNÍ**

Dávkování je závislé na klinickém stavu pacienta. Dávka může být podána intravenózně nebo subkutánně.

**Léčba bronchokonstrikce:****Intravenózní injekce:****Dospělí:** 0,25-0,5 mg terbutalin sulfátu (0,5-1 ml) v pomalé intravenózní injekci. Injekční roztok se doplní sterilním fyziologickým roztokem do 10 ml a podává se pomalou intravenózní injekcí po dobu asi 5 minut. Dávka může být opakována v krátkých intervalech (několik hodin). Celková denní dávka nemá překročit 2 mg terbutalin sulfátu.**Subkutánní injekce:****Dospělí:** 1-2 mg terbutalin sulfátu (2-4 ml) za den v rozdělených dávkách (čtyři a více dávek). **Děti:** Až 25 µg terbutalin sulfátu/kg tělesné hmotnosti (0,05 ml/kg tělesné hmotnosti) za den v rozdělených dávkách (čtyři a více dávek).**ZVLÁŠTNÍ UPOZORNĚNÍ**Vzhledem k pozitivně inotropnímu účinku β2-sympatomimetik (terbutalin) by přípravek **měl být používán velmi opatrně u pacientů s těžkými kardiovaskulárními poruchami**, např. ischemickou chorobou srdeční, tachykardií, těžkým srdečním selháním a dále tyreotoxikózou. Pro možnost navození hyperglykémie β2-sympatomimetiky je nutné u pacientů s diabetem provádět dodatečné kontroly glykémie.

Léčba β2-sympatomimetiky (terbutalin) může vyvolat hypokalémii, která může být dále zhoršována u pacientů s akutním astmatickým záchvatem v důsledku hypoxie. Hypokalemický účinek terbutalinu může být potencován další současnou léčbou (viz "Interakce"). V těchto případech je nutné sledovat kalémii.

U experimentálních zvířat ani u lidí nebyl zjištěn teratogenní účinek terbutalinu. Doporučuje se však zvýšená opatrnost při podávání terbutalinu v prvním trimestru gravidity.

Terbutalin přechází do mateřského mléka, ale účinek na kojenec při použití terapeutických dávek je nepravděpodobný. U předčasně narozených novorozenců byla pozorována přechodná hypoglykémie v případě, že matka užívala β2-sympatomimetika.

**PŘEDÁVKOVÁNÍ**

Možné symptomy předávkování zahrnují bolest hlavy, úzkost, třes, tonické svalové křeče, palpitace a arytmie. Někdy jsou tyto symptomy doprovázeny poklesem krevního tlaku. Z laboratorních známek předávkování stojí v popředí možnost vzniku hyperglykémie a laktacidózy a hypokalémie jako následek redistribuce draslíku při terapii β2-sympatomimetiky.

**Léčba předávkování:**

Obvykle není nutná žádná léčba. V případech těžkého předávkování je třeba mít na paměti následující opatření:

- stanovit acidobazickou rovnováhu, glykémii a koncentraci elektrolytů v krvi
- monitorovat srdeční činnost a krevní tlak
- nejvhodnějším antidotem předávkování terbutalínem je kardioselektivní betablokátor (betablokátory je nutné podávat velmi opatrně u pacientů s bronchokonstrikcí v anamnéze)
- pokud je pokles krevního tlaku vyvolán především β2-sympatomimetickým účinkem terbutalinu, uvažovat o možnosti podání plasmaexpanderů

**UCHOVÁVÁNÍ**

Při teplotě 15-25 °C, uchovávejte vnitřní obal v krabičce, aby byl chráněn před světlem.

**VAROVÁNÍ**

Přípravek nesmí být používán po uplynutí doby použitelnosti vyznačené na obalu. Uchovávejte mimo dosah dětí.

**BALENÍ**

10x1 ml

**DATUM POSLEDNÍ REVIZE**

pr osinec 2001

Ochranná známka BRICANYL, e majetkem AstraZeneca plc.  
© AstraZeneca 2001AstraZeneca 

Tocris Cookson Inc.  
16144 Westwoods Business Park,  
Ellisville, Missouri 63021, USA  
Phone: 800-421-3701  
Fax: 800-483-1993

**TOCRIS**  
b i o s c i e n c e

Tocris Cookson Ltd.  
Tocris House, Hung Road,  
Bristol, BS11 9XJ, UK  
Phone: + 44 (0)117 916 3333  
Fax: + 44 (0)117 916 3344

## Product Information

ICI-118,551 hydrochloride

Cat. No: 0821

Batch No: 1

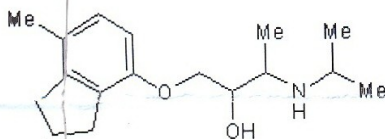
(±)-1-[2,3-(Dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol hydrochloride

### Description:

**Very selective  $\beta_2$  adrenergic antagonist ( $K_i$  values are 1.2, 120 and 257 nM for  $\beta_2$ ,  $\beta_1$  and  $\beta_3$  receptors respectively). Active in vivo.**

### Physical and Chemical Properties:

Batch Molecular Formula:  $C_{17}H_{27}NO_2 \cdot HCl$   
Batch Molecular Weight: 313.87  
CAS Number: [72795-19-8]  
Physical Appearance: White solid  
Batch Molecular Structure:  
.HCl



**Storage:** Store at RT

### References:

**Bilski et al** (1983) The pharmacology of a  $\beta_2$ -selective adrenoceptor antagonist (ICI-118,551). *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **5** 430. **Cook et al** (1993)  $\beta$ -Adrenoceptor subtypes and the opening of plasmalemmal  $K^+$ -channels in trachealis muscle: electrophysiological and mechanical studies in guinea-pig tissue. *Br.J.Pharmacol.* **109** 1140. **Ten Berge et al** (1995)  $\beta_2$ -but not  $\beta_3$ -adrenoceptors mediate prejunctional inhibition of non-adrenergic non-cholinergic contraction of guinea pig main bronchi. *Eur.J.Pharmacol.* **275** 199. **Strosberg and Pietri-Rouxel** (1996) Function and regulation of the  $\beta_3$ -adrenoceptor. *TIPS* **17** 373.

**Solubility:** DMSO to 10 mM  
Water to 10 mM

### Stability and Solubility Advice:

Some solutions can be difficult to obtain and can be encouraged by rapid stirring, sonication or gentle warming (in a 45-60°C water bath).

Information concerning product stability, particularly in solution, has rarely been reported and in most cases we can only offer a general guide. Our standard recommendations are:

**SOLIDS:** Provided storage is as stated on the product label and the vial is kept tightly sealed, the product can be stored for up to 6 months from date of receipt.

**SOLUTIONS:** We recommend that stock solutions, once prepared, are stored aliquoted in tightly sealed vials at -20°C or below and used within 1 month. Wherever possible solutions should be made up and stored on the same day.

### Other Information:

**CAUTION – Not fully tested. For research use only. Not for human use.**

[www.tocris.com](http://www.tocris.com)

Tocris Cookson Inc.  
16144 Westwoods Business Park,  
Ellisville, Missouri 63021, USA  
Phone: 800-421-3701  
Fax: 800-483-1993

**TOCRIS**  
b i o s c i e n c e

Tocris Cookson Ltd.  
Northpoint, Fourth Way,  
Avonmouth, BS11 8TA, UK  
Phone: + 44 (0)117 916 3333  
Fax: + 44 (0)117 916 3344

## Product Information

Cirazoline hydrochloride

Cat. No: 0888

Batch No: 8

2-(2-Cyclopropylphenoxy)methylimidazoline hydrochloride

### Description:

**Selective  $\alpha_1$  agonist.**

### Physical and Chemical Properties:

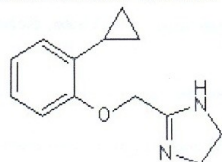
Batch Molecular Formula:  $C_{13}H_{16}N_2O.HCl.H_2O$

Batch Molecular Weight: 270.76

CAS Number: [40600-13-3]

Physical Appearance: White solid

Batch Molecular Structure:



.HCl

**Storage:** Store at RT

### References:

**Gellai and Ruffolo** (1987) Renal effect of selective alpha-1 and alpha-2 adrenoreceptor agonists in conscious normotensive rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **250** 723. **Wikberg and Uklen** (1990) Further characterisation of the guinea pig cerebral cortex idazoxan receptor: solubilization, distinction from the imidazole site, and demonstration of cirazoline as an idazoxan receptor-selective drug. *J.Neurochem.* **55** 192. **Le Rouzic et al** (1995) Binding of [ $^3H$ ]cirazoline to an imidazoline site in rat brain and kidney membranes. *Eur.J.Pharmacol.* **278** 261.

**Solubility:** Water to 100 mM

### Stability and Solubility Advice:

Some solutions can be difficult to obtain and can be encouraged by rapid stirring, sonication or gentle warming (in a 45-60°C water bath).

Information concerning product stability, particularly in solution, has rarely been reported and in most cases we can only offer a general guide. Our standard recommendations are:

**SOLIDS:** Provided storage is as stated on the product label and the vial is kept tightly sealed, the product can be stored for up to 6 months from date of receipt.

**SOLUTIONS:** We recommend that stock solutions, once prepared, are stored aliquoted in tightly sealed vials at -20°C or below and used within 1 month. Wherever possible solutions should be made up and stored on the same day.

**Other information:**

**CAUTION – Not fully tested. For research use only. Not for human use.**



# Betaloc® 1 mg/ml

(metoprolol tartras)  
injekce

## DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI

AstraZeneca UK Ltd., Macclesfield, Cheshire, Velká Británie

## VÝROBCE

AstraZeneca AB, S-151 85 Södertälje, Švédsko

## SLOŽENÍ

Metoprolol tartras 1 mg; natrii chloridum 9 mg v 1 ml roztoku na injekci. Aqua pro iniectione ad 1 ml.

## INDIKAČNÍ SKUPINA

Antihypertenzivum, sympatolytikum

## CHARAKTERISTIKA

Metoprolol je kardioselektivní betablokátor, tj. blokuje beta-receptory v myokardu při řádově nižších dávkách než je potřebné k blokádě beta<sub>2</sub>-receptorů. Metoprolol má nevýznamný membrány stabilizující účinek a nemá částečně agonistické vlastnosti (vnitřní sympatomimetickou aktivitu). Metoprolol snižuje nebo inhibuje agonistický účinek

katecholaminů na srdce (uvolňovaných při zátěži nebo stresu). To znamená, že obvyklý vzestup tepové frekvence, srdečního výkonu, stážitosti srdce a krevního tlaku po akutním vzestupu koncentrace katecholaminů je metoprololem snižován.

V případě vysokých koncentrací endogenního adrenalinu má metoprolol menší vliv na krevní tlak než neselektivní betablokátor. Metoprolol interferuje méně s uvolňováním inzulínu, metabolismem cukrů a kardiiovaskulární odpovědí na hypoglykémii ve srovnání s neselektivními betablokátor.

Krátkodobé studie prokázaly, že metoprolol může vyvolat mirný vzestup plazmatické koncentrace triglyceridů a pokles koncentrace volných mastných kyselin. V některých případech byl pozorován mirný pokles HDL cholesterolu, avšak menší než při podání neselektivních betablokátorů. Ve studii s metoprololem, která trvala několik let, bylo pozorováno významné snížení plazmatické koncentrace celkového cholesterolu. U mužů s mírnou až středně těžkou hypertenzí snižuje metoprolol riziko úmrtí na kardiiovaskulární onemocnění především snížením rizika náhlé smrti, rizika fatálních a nefatálních infarktů myokardu a mozkových cévních příhod.

**Účinek na srdeční akci**  
Metoprolol má příznivý vliv na srdeční akci zejména u supraventrikulárních tachykardií nebo atriálních fibrilací a ventrikulárních extrasystol.

**Účinek na infarkt myokardu**  
U pacientů se suspektním nebo potvrzeným infarktem myokardu snižuje metoprolol mortalitu, především snížením rizika náhlé smrti. Je to alespoň z části důsledek preventivního působení metoprololu na vznik komorové fibrilace.

Tento příznivý antifibrilační účinek má dvoji vysvětlení: vagový účinek na elektrickou stabilitu myokardu a přímý účinek na receptory sympatiku ovlivňující kontraktilitu, tepovou frekvenci a krevní tlak. Jak časná, tak pozdní intervence vede ke snížení mortality u pacientů s dřívějším kardiiovaskulárním onemocněním a s diabetem. Metoprolol snižuje také riziko nefatálních reinfarktů myokardu.

## FARMAKOKINETICKÉ ÚDAJE

### Absorpce a distribuce:

Metoprolol se po iv. injekci rychle distribuuje během 5 - 10 minut. Plazmatické hladiny ukazují lineární závislost na podané dávce v dávkovém rozmezí 5 - 20 mg. Vazba metoprololu na plazmatické bílkoviny je asi 5 - 10 %.

### Metabolismus a eliminace:

Metoprolol je metabolizován oxidací v játrech. Byly identifikovány tři hlavní metabolity. Žádný z nich nemá klinicky významný betasympatolytický účinek. Více než 95 % podané dávky se vylučuje močí. Asi 5 % podané dávky se vylučuje močí v nezměněné formě. V ojedinělých případech dosahuje tato hodnota až 30 %. Poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ) metoprololu je v průměru 3,5 hodiny (s variabilitou 1 až 9 hodin). Celková plazmatická clearance ( $Cl_c$ ) je asi 1 l/min<sup>-1</sup>.

U starších lidí nedochází ve srovnání s mladými lidmi k významným změnám farmakokinetiky metoprololu. Poškozená funkce ledvin nemá vliv na biologickou dostupnost metoprololu nebo na rychlost jeho eliminace. Eliminace jeho metabolitů je zpomalena. Významná kumulace metabolitů byla pozorována u pacientů s glomerulární filtrační rychlostí (GFR) menší než 5 ml/min<sup>-1</sup>, ale tato kumulace nemá vliv na účinek metoprololu.

## Informace pro použití, čtěte pozorně!

## INDIKACE

Léčba tachyarytmií, zejména supraventrikulárních tachykardií; akutní infarkt myokardu.

## KONTRAINDIKACE

A-V blok druhého a třetího stupně, dekompenzovaná srdeční nedostatečnost; sinusová bradykardie (<50 tepů/min.), sick-sinus syndrom, sinoatriální blok, kardiogenní šok a těžká periferní arteriální cirkulační insuficience, hypotenze (TK systolický pod 100 mm Hg), astma bronchiale a chronická obstrukční choroba bronchopulmonální těžkého stupně, neléčený feochromocytom, metabolická acidóza. Metoprolol nesmí být podáván pacientům se suspektním akutním infarktem myokardu, pokud je tepová frekvence menší než 50 tepů/min, P-Q interval je delší než 0,24 s nebo je systolický krevní tlak menší než 100 mm Hg (13,33 kPa). Betaloc 1 mg/ml je kontraindikován u pacientů, kteří jsou precitlivlí na kteroukoliv složku přípravku nebo jiné betablokátor.

## NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY

Betaloc 1 mg/ml je dobře tolerován a nežádoucí účinky jsou obecně mírné a reverzibilní. V mnoha registrovaných případech nebyl zjištěn kauzální vztah k léčbě metoprololem. Frekvence výskytu nežádoucích účinků jsou definovány následovně: velmi často (≥10 %), často (1 - 9,9 %), ojediněle (0,1 - 0,9 %), vzácně (0,01 - 0,09 %), velmi vzácně (<0,01 %).

### Kardiiovaskulární systém:

Často - bradykardie, posturální poruchy (velmi vzácně doprovázené synkopou), studené končetiny, palpitace. Ojediněle - přechodné zhoršení symptomů srdečního selhání, A-V blok 1. stupně, edémy a bolest u srdce.

Vzácně - poruchy srdečního vedení, srdeční arytmie. Velmi vzácně - gangréna u pacientů s již existující těžkou poruchou periferního prokrvení.

### Centrální nervový systém:

Velmi často - únava.

Často - závratě a bolest hlavy.

Ojediněle - parestézie, svalové křeče.

### Gastrointestinální systém:

Často - nauzea, bolest břicha, průjem, zácpa.

Ojediněle - zvracení.

Vzácně - sucho v ústech.

### Krev:

Velmi vzácně - trombocytopenie.

### Játra:

Vzácně - abnormální funkční jaterní testy.

Velmi vzácně - hepatitida.

### Metabolismus:

Ojediněle - přibývání na tělesné hmotnosti.

### Svalová a kosterní soustava:

Velmi vzácně - artralgie.

### Psychiatrické:

Ojediněle - deprese, poruchy soustředění, ospalost nebo

naopak nespavost, nepříjemné noční sny.

Vzácně - nervozita, úzkost, impotence a sexuální poruchy.

Velmi vzácně - amnézie/poruchy paměti, zmatenost,

halucinace.

### Respirační systém:

Často - dušnost při námaze.

Ojediněle - bronchospasmus.

Vzácně - rýma.

### Smyslové orgány:

Vzácně - poruchy vidění, sucho v očích nebo podráždění očí,

zánět spojivek.

Velmi vzácně - hučení v uších a poruchy chuti.

### Kůže:

Ojediněle - rash (ve formě psoriaticiformní vyrážky

a dystrofických kožních lézí), zvýšené pocení.

Vzácně - vypadávání vlasů.

Velmi vzácně - fotosenzitivita a zhoršení psoriázy.

## INTERAKCE

Zvýšený lékařský dohled vyžadují všichni pacienti, kteří užívají současně jiná léčiva s obsahem beta-sympatolytik (např. oční kapky) a ganglioplegik. Současné užívání inhibitorů MAO se nedoporučuje pro nebezpečí zesílení hypotenzivního účinku metoprololu, a rovněž pro riziko vzniku hypertenzní krize, ke které může dojít až do 14 dnů po vysazení IMAO.

Betablokátor mohou zvýraznit „rebound hypertenzi“, ke které

