

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Doktorský studijní program
Lékařská farmakologie**

**Metabolická dráha arginin-oxid dusnatý a možnosti jejího farmakologického
ovlivnění u akutních a chronických onemocnění dýchacích cest**

**The metabolic pathway arginine-nitric oxide and its pharmacological modulation in
acute and chronic airway diseases**

Ing. Zuzana Havlínová

Školitel: Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Obhajoba dne:

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, .2014

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomáhali během celého studia. Můj největší dík patří mému školiteli Doc. Ing. Jaroslavu Chládkovi, Ph.D, bez jehož vedení, cenných připomínek, trpělivosti a přátelského přístupu by tato práce nikdy nevznikla.

Poděkování také náleží Doc. MUDr. Stanislavovi Mičudovi, Ph.D. přednostovi Ústavu farmakologie, Prof. MUDr. Vladimíru Geršlovi, CSc. a MUDr. Jolaně Cermanové, Ph.D. za osobní podporu a cenné rady během mého studia. Také bych ráda poděkovala dalším spolupracovníkům na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty v Hradci Králové za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Dále bych ráda poděkovala Dagmar Ježkové a Anežce Kunové za pomoc při *in vivo* studiích.

Zároveň bych ráda poděkovala Mgr. Monice Maasem Paňákové, Ph.D. za zprostředkování roční stáže na institut aplikované mikrobiologie na univerzitě RWTH Aachen.

A v neposlední řadě patří velký dík mým rodičům, sestře Lence a kamarádům za podporu a trpělivost, kterou mi během celého studia projevovali.

Tato dizertační práce vznikla za finanční podpory níže v abecedním pořadí uvedených grantů: MSM 0021620820; MSM 1P05C066-COST B25,004; Prvouk P37/05.

OBSAH

1.	ÚVOD	14
2.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	19
2.1.	PRŮDUŠKOVÉ ASTMA.....	19
2.2.	AKUTNÍ POŠKOZENÍ PLIC A SYNDROM AKUTNÍ DECHOVÉ TÍSNĚ	22
2.3.	BIOCHEMIE OXIDU DUSNATÉHO A JEHO ÚČINKY V DÝCHACÍCH CESTÁCH	23
2.3.1.	Účinky oxidu dusnatého	23
2.3.2.	Syntázy oxidu dusnatého (NOS)	25
2.3.3.	Využití vyšetření koncentrací NO a jiných látek při diagnóze a sledování terapie onemocnění dýchacích cest	28
2.4.	METABOLICKÁ DRÁHA ARGIN-OXID DUSNATÝ	30
2.4.1.	Membránové transportéry pro L-arginin	32
2.4.2.	Arginázy	34
2.5.	VÝZNAM METABOLICKÉ DRÁHY ARGININ-OXID DUSNATÝ V PATOGENEZI PLICNÍCH ONEMOCNĚNÍ	35
2.6.	MOŽNOSTI FARMAKOLOGICKÉHO OVLIVNĚNÍ METABOLICKÉ DRÁHY ARGININ-OXID DUSNATÝ	37
2.6.1.	Inhibitory argináz	37
2.6.2.	Inhibitory NOS a látky potlačující zánět	39
2.7.	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y PLICNÍCH ONEMOCNĚNÍ	41
2.7.1.	Průduškové astma	41
2.7.2.	ALI/ARDS.....	42
3.	CÍLE PRÁCE	45
4.	PŘEHLED POUŽITÝCH METOD	46
4.1.	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y A PODMÍNKY CHOVU	46
4.1.1.	Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana kmene Wistar	46
4.1.2.	Model ovalbuminem navozeného alergického zánětu u potkana kmene Brown Norway 47	
4.2.	FARMAKOKINETICKÉ STUDIE S INHIBITOREM ARGINÁZ N ^Ω -HYDROXY-NOR-L- ARGINEM (NORNOHA).....	49
4.3.	VYŠETŘOVACÍ METODY	50
4.3.1.	Vydechovaný oxid dusnatý.....	50
4.3.2.	Dusitany a dusičnany v plazmě a BAL.....	51
4.3.3.	Malondialdehyd v plazmě a BAL.....	51
4.3.4.	Stanovení N ^Ω -hydroxy-nor-L-argininu (norNOHA) a argininu v plazmě	52
4.3.5.	Spektrum aminokyselin v plazmě.....	53
4.3.6.	Celková bílkovina v BAL.....	53
4.3.7.	Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v BAL a v krvi	53
4.3.8.	Sledování exprese proteinů (Western blot).....	54
4.3.9.	Sledování exprese mRNA (qRT-PCR)	55
4.4.	FARMAKOKINETICKÁ A STATISTICKÁ ANALÝZA	56
5.	VÝSLEDKY	57
5.1.	MODEL AKUTNÍHO POŠKOZENÍ PLIC BAKTERIÁLNÍM LIPOPOLYSACHARIDEM U POTKANA WISTAR.....	57
5.1.1.	Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu	57
5.1.2.	Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách 61	

5.1.3.	Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu.....	63
5.1.4.	Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání LPS	69
5.1.5.	Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání.....	71
5.1.6.	Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání	73
5.1.7.	Vliv pentoxifylinu na indikátory nitračního a oxidačního stresu po intratracheálním podání LPS	74
5.1.8.	Vliv pentoxifylinu na propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po intratracheálním podání LPS.....	77
5.1.9.	Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intratracheálním podání LPS a vliv pentoxifylinu	78
5.2.	MODEL OVALBUMINEM NAVOZENÉHO ALERGICKÉHO ZÁNĚTU U POTKANA KMENE BROWN NORWAY.....	82
5.2.1.	Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.....	82
5.2.2.	Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.....	84
5.2.3.	Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.....	86
5.2.4.	Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.....	89
5.3.	FARMAKOKINETIKA INHIBITORU ARGINÁZ NORNOHA	90
5.3.1.	Srovnání farmakokinetiky po jednorázovém injekčním podání intravenózní a intraperitoneální cestou a po intratracheální aplikaci aerosolu	90
5.3.2.	Opakované intraperitoneální podání norNOHA	101
5.3.3.	Identifikace metabolitu norNOHA v potkaní plazmě	108
6.	DISKUZE.....	111
6.1.	MODEL AKUTNÍHO POŠKOZENÍ PLIC BAKTERIÁLNÍM LIPOPOLYSACHARIDEM U POTKANA WISTAR.....	111
6.2.	MODEL OVALBUMINEM NAVOZENÉHO ALERGICKÉHO ASTMATU U POTKANA KMENE BROWN NORWAY.....	117
6.3.	FARMAKOKINETIKA INHIBITORU ARGINÁZ NOR-NOHA	120
7.	ZÁVĚR.....	125
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	128
9.	PŘÍLOHY	143

Seznam obrázků

Obrázek 1: Senzitivizace dýchací cest po kontaktu s alergenem a IgE zprostředkovaná časná a pozdní fáze astmatické reakce u atopického (alergického) astmatu.	21
Obrázek 2: Syntéza NO indukovatelnou formou NOS.	27
Obrázek 3: Chemická struktura L-argininu.	30
Obrázek 4: Metabolismus L-argininu.	31
Obrázek 5: Transport a metabolismus L-argininu.	33
Obrázek 6: Metabolická dráha arginin-NO.	36
Obrázek 7: Vybrané inhibitory argináz.	38
Obrázek 8: Měřicí komora na neinvazivní vyšetření vydechovaného NO a chemiluminiscenční analyzátor NO.	50
Obrázek 9: Schematické znázornění struktury farmakokinetického modelu.	94
Obrázek 10: Strukturní vzorec norargininu.	109

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příklady látek potenciálně využitelných jako bioindikátory plicních onemocnění.	29
Tabulka 2: Vlastnosti experimentálních modelů využívajících malých laboratorních zvířat a jejich vzájemné srovnání s ohledem na charakteristiky průduškového astmatu u člověka.	44
Tabulka 3: Přehled experimentálních skupin: akutní poškození plic indukované LPS.	47
Tabulka 4: Přehled experimentálních skupin: model alergického zánětu dýchacích cest indukovaného ovalbuminem.	48
Tabulka 5: Schéma alergizace a provokace ovalbuminem (OVA).	49
Tabulka 6: Gradient mobilní fáze použitý při stanovení derivátu norNOHA.	52
Tabulka 7: Seznam použitých protilátek.	55
Tabulka 8: Použité geny.	56
Tabulka 9: Výsledky nekompartmentové farmakokinetické analýzy závislosti průměrné koncentrace norNOHA v plazmě na čase po intravenózním, intraperitoneálním a intratracheálním podání v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg.	92
Tabulka 10: Kinetika absorpce norNOHA dekonvolucí po intraperitoneální a intratracheální aplikaci v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg. Parametry biexponenciálního modelu.	94
Tabulka 11: Populační farmakokinetické parametry norNOHA.	95
Tabulka 12: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního farmako-kinetického modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg intravenózní injekcí.	99
Tabulka 13: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg norNOHA intraperitoneální injekcí a intratracheálně.	100
Tabulka 14: Výsledky nekompartmentové analýzy a analýzy absorpční kinetiky dekonvolucí závislosti průměrné koncentrace norNOHA v plazmě na čase po jednorázovém intravenózním (<i>i.v.</i> aplikace) a intraperitoneálním (<i>i.p.</i> aplikace, den 1) podání dávky 30 mg/kg a po 5. dávce po opakovaném intraperitoneálním podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (<i>i.p.</i> aplikace, den 5).	102
Tabulka 15: Parametry populačního farmakokinetického modelu.	103

Tabulka 16: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního modelu po jednorázovém intravenózním (<i>i.v.</i> aplikace) a intraperitoneálním (<i>i.p.</i> aplikace, den 1) podání dávky 30 mg/kg a po 5. dávce po opakovaném intraperitoneálním podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (<i>i.p.</i> aplikace, den 5).....	104
Tabulka 17: Koncentrace argininu v plazmě před aplikací a její změny po jednorázovém podání <i>i.v.</i> a <i>i.p.</i> a po opakovaném <i>i.p.</i> podávání norNOHA v dávce 30 mg/kg jednou denně.....	107
Tabulka 18: Koncentrace aminokyselin v plazmě ($\mu\text{mol/l}$).....	108

Seznam grafů

Graf 1: Vliv LPS na koncentraci vydechaného oxidu dusnatého (eNO).....	58
Graf 2: Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	59
Graf 3: Koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	60
Graf 4: Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	60
Graf 5: Celková bílkovina v BAL po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	61
Graf 6: Poměr hmotnosti plic a těla po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	61
Graf 7: Buněčná složka BAL: Počet leukocytů (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	62
Graf 8: Počet leukocytů v krvi (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.....	63
Graf 9: Expres iNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	64
Graf 10: Expres eNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	64
Graf 11: Expres ArgI na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	65
Graf 12: Expres ArgII na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	66
Graf 13: Expres CAT1 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	67
Graf 14: Expres CAT2 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	67
Graf 15: Expres CAT3 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	68
Graf 16: Expres proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v plicní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	69
Graf 17: Expres proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.....	70
Graf 18: Vliv podání LPS v dávce 5 mg/kg intraperitoneální a intratracheální cestou na koncentraci vydechaného oxidu dusnatého (eNO).....	71
Graf 19: Koncentrace dusitanů a dusičnanů (NO_x) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).....	72
Graf 20: Koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).....	72
Graf 21: Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).....	73
Graf 22: Poměr hmotnosti plic a těla po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).....	74

Graf 23: Počet bílých krvinek a diferenciální rozpočet v BAL (A, C) a v krvi (B, D) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg)	75
Graf 24: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na koncentraci vydechovaného NO (eNO) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).	75
Graf 25: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na koncentrace NO _x A/ v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a B/ v plazmě po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).....	76
Graf 26: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).	76
Graf 27: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na koncentraci celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).....	77
Graf 28: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na hmotnost plic (v % tělesné hmotnosti) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).	77
Graf 29: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek) na počet leukocytů v krvi (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>).....	78
Graf 30: Expresé iNOS proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek).....	79
Graf 31: Expresé eNOS proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek).....	80
Graf 32: Expresé ArgI proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek).....	80
Graf 33: Expresé ArgII proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg <i>i.t.</i>) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg <i>i.t.</i> rozděleně do 2 dávek).....	81
Graf 34: Koncentrace NO _x v tekutině z bronchoalveolární laváže (A) a v plazmě (B) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	83
Graf 35: Koncentrace MDA v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.....	83
Graf 36: Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže (A) a v plazmě (B) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	84
Graf 37: Koncentrace proteinu v BAL po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	85
Graf 38: Poměr hmotností plic a těla po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	85
Graf 39: Počet bílých krvinek a zastoupení eozinofilů v diferenciálním rozpočtu v buněčné složce BAL (A, C) a v krvi (B, D) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	86
Graf 40: Expresé iNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	87
Graf 41: Expresé eNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	87
Graf 42: Expresé ArgI a ArgII na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.....	88
Graf 43: Expresé CAT1 a CAT2 na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.....	88

Graf 44: Expres proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v plicní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.	89
Graf 45: Průměrné (SD) koncentrace norNOHA v plazmě po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální injekci a intratracheálně formou aerosolu.	91
Graf 46: Analýza kinetiky absorpce norNOHA po A/ intraperitoneální a B/ intratracheální aplikaci dekonvolucí profilů průměrných plazmatických koncentrací. Křivky byly získány fitováním parametrů biexponenciálního modelu na experimentální data.	93
Graf 47: Ověření kvality predikce plazmatických koncentrací norNOHA Bayesovou metodou s využitím populačního farmakokinetického modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální injekci a intratracheálně formou aerosolu.	97
Graf 48: Závislosti mezi středními hodnotami (\pm SD) C_0 , C_{max} a $AUC_{0-\infty}$ po <i>i.v.</i> , <i>i.p.</i> a <i>i.t.</i> podání a dávkou.	98
Graf 49: Průměrné (SD) koncentrace norNOHA v plazmě vynesené na A/ lineární a B/ logaritmické stupnici v závislosti na čase po jednorázovém podání dávky 30 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální (<i>i.p.</i> den 1) injekci a po 5. dávce po opakovaném <i>i.p.</i> podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (<i>i.p.</i> den 5). ..	101
Graf 50: Průměrné (SD) koncentrace argininu v plazmě po <i>i.p.</i> a <i>i.v.</i> podání norNOHA A/ po první a B/ po páté dávce norNOHA nebo fyziologického roztoku.	105
Graf 51: Koncentrační poměr citrulin/arginin a citrulin/ornitin v plazmě 5. den po opakovaných <i>i.p.</i> injekcích 30 mg/kg norNOHA (<i>i.p.</i> norNOHA, den 5) a fyziologického roztoku (<i>i.p.</i> FR, den 5) jednou denně. Uveden je aritmetický průměr \pm SD.	106
Graf 52: Reprezentativní chromatogramy a) extraktu plazmy potkana (blank), b) extraktu plazmy potkana s přídatkem norNOHA (i, 50 μ M), argininu (iii, 147 μ M) a vnitřního standardu N-monnoethylargininu (iv, 200 μ M) a c) extraktu plazmy potkana odebrané v čase 5 min. po podání 10 mg/kg norNOHA <i>i.v.</i> s píkem neznámého metabolitu (ii).	109
Graf 53: Koncentrace norNOHA (a, μ M) a nor-argininu (b, relativní vyjádření v procentech plochy největšího píku) v plazmě potkanů Wistar (n=5) po podání 10 mg/kg norNOHA <i>i.v.</i>	110

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2-AIHA	(+)-S-2-amino-iodoacetamidohexanová kyselina
A	
AB	průduškové astma
ABH	2(S)-amino-6-boronohehexanová kyselina
ADC	agmatin dekarboxyláza
ADMA	asymetrický dimethylarginin
AGAT	agmatin transferáza
ALI	akutní poškození plic
AP1	aktivátorový protein 1
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
ASS	argininosukcinát syntáza
ASL	argininosukcinát lyáza
AUC	plocha pod křivkou koncentrací
B	
BAL	bronchoalveolární laváž
BEC	[S]-[2-boronoethyl]-L-cystein HCl
BH ₄	tetrahydrobiopterin
C	
CAT	transportér pro kationické aminokyseliny
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD23	„nízkoafinitní“ receptor pro IgE
cGMP	cyklický guanozinmonofosfát
CL	clearance
cNOS	konstitutivní NOS
D	
DAN	2,3-diaminonaftalen
DFMO	difluoromethylornitin
DTT	dithiotreitol
E	
ECP	eozinofilní kationický protein
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
eNOS (NOSIII)	endoteliální syntáza oxidu dusnatého
EPO	eozinofilní peroxidáza
EXP	eozinofilní protein X
F	
F	biologická dostupnost
FAD	flavin adenin dinukleotid
FEV ₁	usilovně vydechnutý objem za jednu sekundu
FENO	koncentrace NO ve vzduchu vydechovném ústí
FMN	flavin mononukleotid
FVC	usilovná vitální kapacita plic
FV	vitální kapacita plic
G	
GABA	γ-aminomáselná kyselina
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GRO	„ <i>growth-related oncogene</i> “
GW271540	specifický inhibitor iNOS
CH	
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
I	
ICAM	mezibuněčná adhezivní molekula

sICAM-1	rozpuštná mezibuněčná adhezivní molekula
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IgE Fc	vysokoafinitní receptor pro IgE
IL	interleukin
iNANC	inhibiční neadrenergní necholinergní neurotransmise
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
<i>i.p.</i>	intraperitoneálně
IRF1	interferonový regulační faktor 1
<i>i.t.</i>	intratracheálně
<i>i.v.</i>	intravenózně
J	
JAK- STAT	Janus kinázy –transkripční faktory
L	
L-arg	L-arginin
LPS	lipopolysacharid
LT	leukotrien
LTB ₄	leukotrien B ₄
L-NAME	methylester nitro-L-argininu
L-NMMA	monomethyl-L-arginin
M	
M	mezikompartmentová clearance
mARC	mitochondriální enzym katalyzující redukci na atomu dusíku
MBP	hlavní bazický protein
MF	mobilní fáze
MDA	malondialdehyd
MMP	matrixové metaloproteinázy
MPO	myeloperoxidáza
MPE a MAPE	střední chyba predikce a střední absolutní chyba predikce
MRT	střední pobytový čas
MTT	střední čas tranzitu
MU	methylurea
N	
NADP ⁺	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NCA	nekompartmentová analýza
NF-κB	nukleární faktor κB
NMEA	N-monoethylarginin
NMMA	N-monomethylarginin
NO	oxid dusnatý
NOHA	N ^ω -hydroxy-L-arginin
norNOHA	N ^ω -hydroxy- nor-L-arginin
NOS	syntáza oxidu dusnatého
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NSAID	nesteroidní antiflogistika
O	
OAT	ornitin aminotransferáza
ODC	ornitin dekarboxyláza
ONNO ⁻	peroxodusitan
OPA	<i>o</i> -phtaldialdehyd
OTC	ornitin transkarbamoyláza
OVA	ovalbumin
P	
P5C	pyrrolin-5-karboxylát

P5CR	pyrrolin-5-karboxylát reduktáza
PDE	fosfodiesteráza
PG	prostaglandiny
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PP	primární protilátka
ppb	parts per billion
pO ₂	parciální tlak kyslíku v krvi
PRRs	motiv rozpoznávající receptory
PX	pentoxifylin
Q	
Q	mezikompartmentová clearance
R	
RNS	reaktivní dusíkaté látky
ROS	reaktivní látky obsahující kyslík
RSD	relativní směrodatná odchylka
RSE	relativní chyba
S	
SC-51	specifický inhibitor iNOS
SD	směrodatná odchylka
SDMA	symetrický dymethylarginin
SDS	dodecylsírán sodný
SOD	superoxid dismutáza
SPE	extrakce pevným sorbentem
SP	sekundární protilátka
SPF	chov “ <i>specific pathogen-free</i> “
SpdS	spermidin syntáza
SpmS	spermin syntáza
STAT	převodník signálů a transkripční faktor
T	
TBST	pufr TRIS s přídavkem Tweenu 20
TGF-β	transformující růstový faktor
T _H 1	T- pomocný lymfocyt 1 (T- helper1)
T _H 2	T- pomocný lymfocyt 2 (T- helper2)
THP-1	lidská myeloidní buněčná linie THP-1
TLR-4	receptor podobný genu Toll typ 4
TNF-α	tumor nekrotizující faktor α
TxB ₂	tromboxan B ₂
V	
V _c	distribuční objem centrálního kompartmentu
V _T	distribuční objem periferního kompartmentu

1. Úvod

Předložená práce se zaměřuje na metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý (NO) a její farmakologické ovlivnění při chronických zánětlivých onemocněních dýchacích cest a při akutním poškození plic (ALI/ARDS), které je život ohrožující komplikací u nemocných v sepsi. V dýchacích cestách má NO důležité fyziologické regulační funkce, z nichž nejznámější je bronchodilatační a vazodilatační účinek, zajištění přednostní perfúze ventilovaných oblastí plic krví a inhibiční neurotransmise, podílející se na regulaci průduškové reaktivity. Vysoké koncentrace NO jsou uvolňovány ve fagocytujících buňkách jako součást nespecifické imunitní obranné reakce proti bakteriím a intracelulárním parazitům (Abramson et al. 2001; Lirk et al. 2002; Nahrevanian 2009).

Mezi chronická zánětlivá onemocnění dýchacích cest se řadí zejména průduškové astma, chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) a intersticiální plicní procesy. První dvě zmíněná onemocnění představují závažný zdravotnický problém z důvodu vysoké prevalence, morbidity a v případě CHOPN i mortality. Prevalence astmatu u dospělých za posledních 20 let vzrostla ze 4 % na 7-10 %. U dětí se udává až 15 % (GINA, Report 2012). Ve většině zemí Evropy se prevalence CHOPN pohybuje mezi 4 a 6%. Současné epidemiologické průzkumy v ČR ukazují na 7-8 % (Maly et.al. 2013). Léčba těchto onemocnění proto spotřebovává významnou část prostředků na zdravotní péči.

Společným rysem průduškového astmatu a CHOPN je chronický zánět, který se ale mezi těmito klinickými jednotkami liší anatomickou lokalizací, mechanismy vzniku a podstatou včetně spektra mediátorů a buněk účastnících se zánětu. V podmínkách alergického zánětu dýchacích cest je zdrojem vysokých koncentrací NO ve vzduchu vydechovaném ústy indukovatelná forma syntázy oxidu dusnatého (iNOS), která je zvýšeně exprimovaná v bronchiálním epitelu po expozici aeroalergenům následované nárůstem koncentrace interleukinů 4 a 13 (King et al. 2004; Zimmermann et al. 2003). V menší míře dochází k indukci iNOS i v dýchacích cestách nemocných s CHOPN, kde je hlavním problémem oxidační stres a zvýšená aktivita proteáz. Vysoké koncentrace NO a superoxidového radikálu vedou k tvorbě peroxodusitanu, silného nitračního činidla. Zvýšený oxidační a nitrační stres přispívá k zánětu dýchacích cest a vede k poškození jejich struktury.

Vyšetření koncentrace NO v dýchacích cestách je považováno za diagnosticky přínosné u osob s atopickým astmatem a s ciliární dyskinezí (Ferkol et al. 2006; Singer et

al. 2010; Singer et al. 2013) a výzkum probíhá i u řady jiných plicních onemocnění a dalších patofyziologických stavů (Birrell et al. 2006; Donnelly 2010; Morris 2007). Technika měření frakce NO ve vzduchu vydechovaném ústy (FENO) je rychlá a neinvazivní. Prošla mezinárodní standardizací, má prokázaný přínos při diagnóze a monitorování farmakoterapie alergického (atopického) průduškového astmatu a stala se součástí praxe (Carraro et al. 2010; Donnelly 2010; Singer et al. 2013). Výzkumným trendem v této oblasti je vývoj a validace technik schopných odlišit bronchiální a alveolární zdroj NO a tak získat informaci o alergickém zánětu malých dýchacích cest a to zejména u nemocných s těžším astmatem nedostatečně kontrolovaným inhalačními kortikosteroidy. Do této oblasti směřuje naše pracoviště část výzkumné kapacity, stejně jako ověřování přínosu metody na vyšetření koncentrací biochemických indikátorů nitračního stresu v kondenzátu vydechovaného vzduchu u nemocných s chronickými onemocněními plic (Rihák et al. 2010).

Preklinické i klinické studie usilující o snížení přítomnosti NO v dýchacích cestách v podmínkách chronického zánětu dýchacích cest podáním nespecifických inhibitorů NOS nebo látek selektivně inhibujících iNOS poskytly rozporuplné výsledky (Redington 2006) Negativní závěry přinesla dvojitě slepá placebem kontrolovaná studie s opakovaným podáváním látky GW271540 (specifický inhibitor iNOS) nemocným s průduškovým astmatem po dobu 14 dní. Inhibitor snížil koncentraci vydechovaného NO, ale nezpůsobil pokles bronchiální hyperreakivity v testu s adozinem, metacholinem a příčinným alergenem ani snížení počtu eozinofilů v bronchoalveolární laváži (Singh et al. 2007).

Akutní poškození plic (ALI) a syndrom akutní dechové tísně (ARDS) jsou závažné patofyziologické stavy různé etiologie s vysokou morbiditou a mortalitou. Indukce iNOS a masivní uvolnění NO jsou považovány za jeden z klíčových faktorů v patogenezi septického šoku s oběhovým selháním, hypoxémií a multiorgánovou dysfunkcí včetně ALI. Zvýšené koncentrace NO při sepsi jsou součástí nespecifické imunity, ale zároveň jsou zodpovědné za systémovou vazodilataci, působí prozánětlivě a kardiodepresivně. Snahy za těchto podmínek potlačit syntézu NO inhibitory NOS vedly k nejednoznačným výsledkům. Po podání neselektivních inhibitorů NOS došlo ke zvýšení středního arteriálního tlaku ale zároveň ke zhoršení plicní hypertenze, snížení srdečního výdeje a k prohloubení tkáňové hypoxie (Griffiths et al. 1997; Mitaka et al. 1997). Výsledky preklinických studií zaměřených na mortalitu a další důležité výstupy po podání specifických a nespecifických inhibitorů NOS při sepsi byly také nejednotné, ale převažovaly pozitivní závěry (De Cruz et al. 2009; Kirkeboen et al. 1999). Zásadní zlom

do úvah o podávání inhibitorů NOS nemocným v septickém šoku ale přinesla rozsáhlá kontrolovaná klinická studie s neselektivním inhibitorem N-monomethyl-L-argininem, která byla předčasně ukončena po zaznamenání trendu k nárůstu mortality o 10 % při srovnání se skupinou s placebem (59 % oproti 49 % při sledování po dobu 28 dní) (López et al. 2004). Jiná multicentrická kontrolovaná studie neprokázala vliv podání stejného inhibitoru na mortalitu u nemocných s kardiogenním šokem po infarktu myokardu (Alexander et al. 2007). Hlavní příčinou hypoxémie u většiny nemocných s ALI je ventilačně-perfúzní nerovnováha a plicní pravo-levé zkraty spolu s nekardiogenním edémem plic v důsledku zvýšené propustnosti alveolo-kapilární membrány. Inhalovaný NO byl dlouho považován za ideální selektivní vazodilatans, upravující plicní hypertenzi a perfúzi a zvyšující oxygenaci krve. Tento názor podpořily pozitivní výsledky farmakoterapie inhalovaným NO doložené na experimentálních modelech ALI, ischemického-reperfúzního poškození a po transplantaci plic u velkých zvířecích druhů (Ryter et al. 2011). Také v řadě klinických studií bylo pozorováno přechodné (do 72. hod) zlepšení oxygenace při terapii inhalovaným NO u dospělých nemocných s ALI/ARDS (Griffiths et al. 2005; Kaisers et al. 2003; Taylor et al. 2004). Systematické přehledy a metaanalýzy studií publikovaných v posledních letech nicméně ukázaly, že terapie inhalovaným NO nesnižuje mortalitu u dospělých nemocných s ARDS (Afshari et al. 2011). Značně poklesl také zájem o využití farmakoterapie inhalovaným NO v neonatologii. Stejně jako u dospělých nemocných s ALI/ARDS ani u ventilovaných nezralých novorozenců s ARDS nebyly ovlivněny klinicky důležité výstupy jako mortalita, riziko rozvoje bronchopulmonální dysplázie a intrakraniálního krvácení (Dani et al. 2013). Jako možné příčiny jsou zmiňovány přechodný charakter pozitivních účinků NO, „rebound“ efekt u nemocných s plicní hypertenzí, rozvoj methemoglobinémie a toxicita vysokých koncentrací NO (nitrační stres) (Afshari et al. 2011; Gayat et al. 2011).

Poznatky preklinického výzkumu i klinické studie v posledních 10 letech upozorňují na význam argináz 1 a 2 v patofyziologii průduškového astmatu a jiných onemocnění dýchacích cest. Arginázy soutěží se syntázami NO o společný substrát arginin, a tak mohou snižovat tvorbu NO v reakci na různé stimuly a ovlivňovat fyziologické procesy, kterých se účastní (Maarsingh et al. 2008a). Genetický polymorfismus arginázy 1 souvisí s atopií a ovlivňuje riziko rozvoje průduškového astmatu (Li et al. 2006; Salam et al. 2009). Jiné klinické studie prokázaly zvýšenou expresi argináz v dýchacích cestách astmatiků a její korelaci se sníženou plicní funkcí (Lara et al. 2008) a dále popsaly vztah mezi genetickým polymorfismem arginázy 1 a intenzitou bronchodilatačního účinku

inhalovaných beta2-agonistů (Duan et al. 2011). Také u nemocných s CHOPN a cystickou fibrózou koreluje aktivita arginázy s tíží onemocnění (Maarsingh, Pera et al. 2008a). Interindividuální variabilitu koncentrace vydechovaného NO u dětí s astmatem ovlivňuje kromě jiných faktorů i genetický polymorfismus iNOS a arginázy 2 (Salam et al. 2011).

V preklinických experimentech zvyšovaly inhibitory argináz dostupnost argininu pro konstitutivní NOS a tím i fyziologické ochranné účinky NO v dýchacích cestách. Na modelech průduškového astmatu u malých laboratorních zvířat byl prokázán jejich bronchoprotektivní a protizánětlivý účinek. Navíc byly inhibitory argináz schopné zabránit anatomickým změnám způsobeným chronickým zánětem (remodelace průdušky) (Maarsingh et al. 2011; Maarsingh et al. 2009; Maarsingh et al. 2008c; North et al. 2009). Zvýšená aktivita arginázy 1 v cévním endotelu je dávana do souvislosti s nedostatečnou syntézou vazodilatačně působícího NO enzymem eNOS, tedy s dějem přispívajícím ke zvýšenému cévnímu tonu a fibrogenezi v myokardu u nemocných s hypertenzí (Bagnost et al. 2010), k mikrovaskulární dysfunkci koronárních artérií u diabetiků (Gronros et al. 2011) a k ischemicko-reperfúznímu poškození myokardu a jater (Jeyabalan et al. 2008; Jung et al. 2010). Několik experimentálních prací naznačilo možné příznivé ovlivnění zmíněných patologických stavů inhibitory argináz (Aristoteles et al. 2013; Durante et al. 2007; Kim et al. 2009a; Kitowska et al. 2008). Indukce arginázy 1 účinkem bakteriálních toxinů se může na základě stejného mechanismu podílet na zvýšené propustnosti alveolokapilární membrány a rozvoji plicního edému u nemocných se sepsí a ALI (Lucas et al. 2012).

Z výše uvedených poznatků vyplývá, že inhibitory argináz podávané systémově nebo inhalační cestou by mohly mít příznivé účinky u akutních i chronických onemocnění dýchacích cest, v jejichž patofyziologii má významnou účast NO. Strategie nepřímého ovlivnění dostupnosti a účinků NO inhibicí argináz by mohla být přínosná na rozdíl od inhalace NO, použití inhibitorů NOS nebo suplementace argininu. Posouzení výhodnosti takového postupu není možné bez detailního studia změn v metabolických drahách arginin-NO za patofyziologických stavů s použitím vhodných experimentálních modelů a dále bez znalosti farmakologického ovlivnění těchto drah inhibitory argináz. Další neméně důležitou informací jsou údaje o osudu inhibitorů argináz v organizmu a základních farmakokinetických charakteristikách, s jejichž pomocí je možné racionálně navrhnout dávkování ve studiích farmakologických účinků.

První část předložené dizertační práce popisuje změny v metabolické dráze arginin-NO na modelu akutního poškození plic navozeného bakteriálním lipopolysacharidem

u potkana Wistar. Byly provedeny studie exprese endoteliální a indukovatelné syntázy NO, argináz 1 a 2 a membránových transportérů CAT pro arginin v plicní tkáni a játrech na úrovni mRNA a proteinu. Experimentální práce zahrnuje sledování koncentrace vydechovaného NO a argininu v plazmě a tekutině z bronchoalveolární laváže. Model byl dále charakterizován pomocí biochemických ukazatelů propustnosti alveolokapilární membrány, přítomnosti buněk zánětu a indikátorů oxidačního a nitračního stresu v dýchacích cestách. Další část práce využívá výše popsané metodické přístupy k charakterizaci modelu ovalbuminem indukovaného alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway. Třetí část práce uvádí výsledky farmakokinetických studií, zaměřených na dávkovou závislost farmakokinetiky inhibitoru argináz N^o-hydroxy-nor-argininu (norNOHA) a biologickou dostupnost u potkana Wistar po jednorázovém podání intravenózní a intraperitoneální cestou a inhalačně formou aerosolu. V rámci studie byl identifikován metabolit látky. Jiná farmakokinetická studie se zaměřila na opakované intraperitoneálním podání a změny plazmatických koncentrací aminokyselin.

2. Úvod do problematiky

2.1. Průduškové astma

Průduškové astma (AB) je onemocnění spojené s variabilní bronchiální obstrukcí. Řadí se mezi chronická zánětlivá onemocnění dýchacích cest, jejichž prevalence celosvětově vzrůstá. Může se manifestovat v jakémkoliv věku. Chronický zánět způsobuje hyperreaktivitu průdušek, tj. přehnané zužování na různé stimuly. Průdušková hyperreaktivita se projevuje charakteristickými symptomy AB: epizodami pískotů při dýchání, dušností, tlakem na hrudi a kašlem. Proměnlivá bronchiální obstrukce může vést až k akutní dechové tísní při silné akutní exacerbaci onemocnění (astmatický záchvat) a ohrozit pacientův život (GINA, Report 2012) Bronchiální obstrukce je nejčastěji reverzibilní a odeznívá spontánně nebo po léčbě (Ulrik 1999; Zimmermann et al. 2006).

Na vzniku atopického AB se podílejí genetická predispozice, specifické faktory prostředí (alergeny zevního prostředí) a nespecifické faktory prostředí (kouření, pasivní kouření, infekce, znečištění ovzduší aj). Nárůst prevalence alergie a atopického AB ve vyspělých zemích podle hygienické hypotézy z části souvisí i se zlepšením hygieny a snížením přenosu infekčních chorob. U predisponovaných jedinců dochází za těchto podmínek k přesmyku z žádoucí T_{H1} na vystupňovanou T_{H2} imunitní reakci.

V současnosti je AB považováno za heterogenní skupinu onemocnění. Mluví se spíše o syndromu. Jednotlivé fenotypy astmatu jsou charakterizovány rozdílným typem zánětu, který se projevuje odlišnými klinickými příznaky, jinak reaguje na protizánětlivou farmakoterapii, liší se průběhem onemocnění a jeho prognózou. Nejčastěji se jedná o eozinofilní zánět u atopického (alergického) AB, který lze úspěšně potlačit farmakoterapií inhalačními kortikosteroidy (Townshend et al. 2007). Hlavními buňkami, které se účastní zánětu v dýchacích cestách nemocných s AB, jsou T_{H2} -lymfocyty, eozinofilní granulocyty a žírné buňky (Maarsingh et al. 2008b). Méně se uplatňují neutrofilní a bazofilní granulocyty. Charakteristická je zvýšená tvorba IgE protilátek.

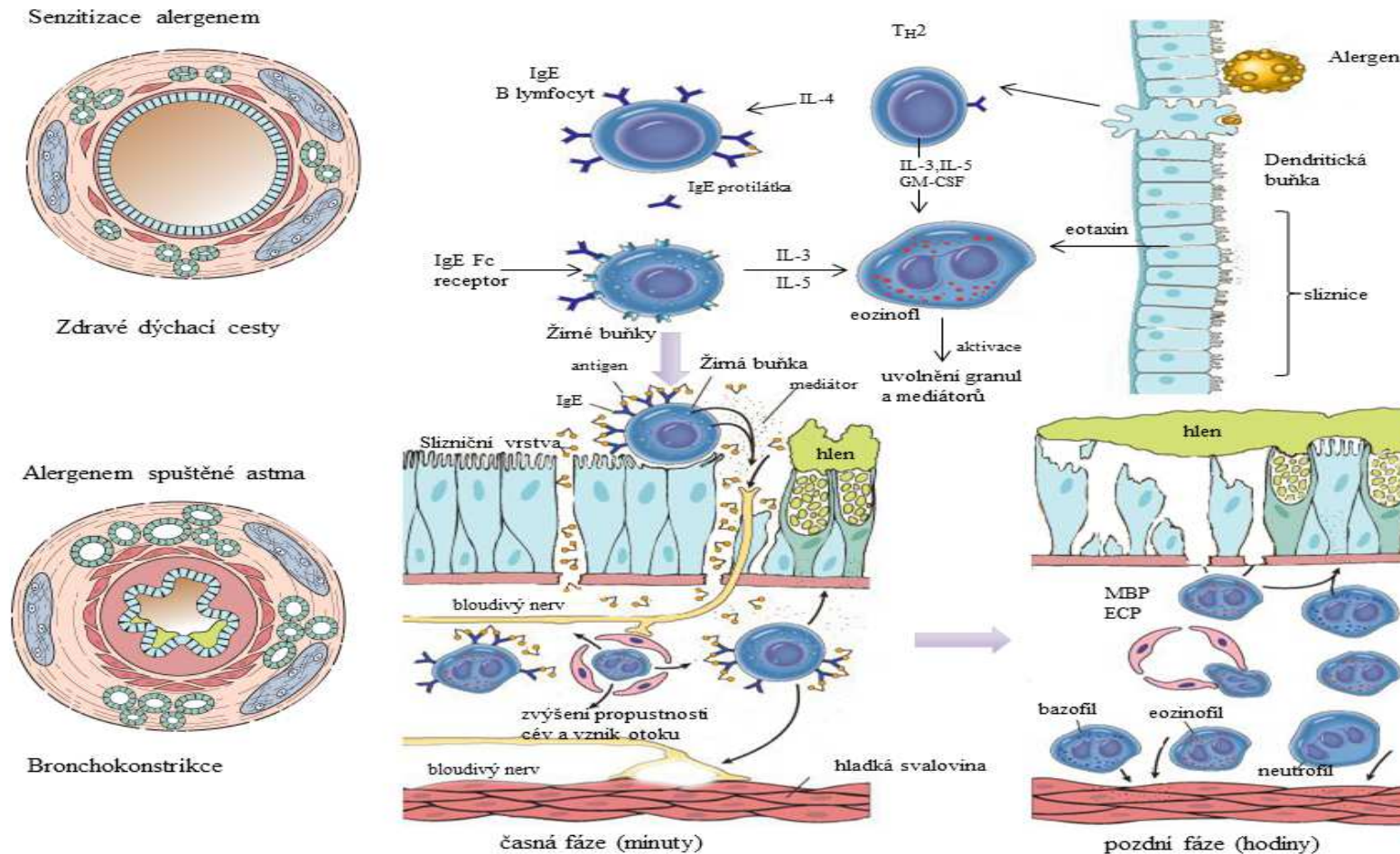
Časná fáze astmatické reakce se projevuje akutní bronchokonstrikcí, která se rozvíjí v reakci na vyvolávající podnět velmi rychle. Plicní funkce se snižuje během minut a její maximální pokles obvykle nastává do 30 minut. Patofyziologickou podstatou je alergenem vyvolané a IgE protilátkami zprostředkované uvolnění zánětlivých mediátorů (histamin, adenosin, proteolytické enzymy, prostaglandiny, leukotrieny, faktory chemotaxe, kyslíkové radikály aj.) z žírných buněk a makrofágů. Ty poté způsobují kontrakci hladké

svaloviny průdušek, stimulují aferentní nervy, produkci hlenu, vazodilataci a uvolňování tekutiny z krevních kapilár (otok průdušky). Zúžuje se průsvit průdušky a k menší průchodnosti dolních dýchacích cest přispívají i hlenové zátky.

Během pozdní fáze astmatické reakce, která je rozhodující pro chronické AB, uvolňují aktivované buňky struktur dýchacích cest cytokiny a chemokiny a přitahují do dýchacích cest buňky zánětu (zejména eozinofily, bazofily, lymfocyty a monocyty), které se hromadí v dýchacích cestách. Tento proces významně ovlivňují endoteliální adhezivní molekuly. T_{H2} lymfocyty ($CD4^+$) uvolňují prozánětlivé cytokiny IL-5, -9, -10 a -13 (obrázek 1). Zejména interleukiny IL-4 a IL-13 jsou nacházeny ve vysokých koncentracích a jsou považovány za centrální regulátory celé řady patofyziologických procesů, probíhajících u nemocných s AB (Zimmermann et al. 2006). Zvýšeně přítomné a aktivované buňky zánětu uvolňují mediátory poškozující bronchiální epitel a růstové faktory, které vyvolávají hypertrofii hladké svaloviny. Mizí řasinkový epitel, proliferují fibroblasty a v bazální membráně se ukládá kolagen, čímž dochází k postupné remodelaci průdušky (Maarsingh et al. 2008b; Snell et al. 2008; Zimmermann et al. 2006). Dlouhodobě nedostatečná protizánětlivá farmakoterapie vede k rozvoji strukturálních změn a k progresivnímu a mnohdy trvalému snížení plicní funkce a také může způsobit fixaci hyperreaktivity průdušek.

Při alergickém astmatu byla v plicní tkáni, kromě mnoha jiných změn v genové expresi, prokázána výrazně indukovaná exprese genů pro membránový transportér argininu CAT2 a argináza ArgI a ArgII (Zimmermann et al. 2006). Na základě výsledků recentních studií se lze domnívat, že změny v metabolismu argininu (L-Arg), vedoucí ke zvýšené syntéze polyaminů a L-prolinu a ke snížené produkci NO konstitutivními syntázami NO s ochrannou úlohou, mohou být důležité i při remodelaci průdušky a při změnách průduškové reaktivity, které jsou charakteristické u AB (Maarsingh, et al. 2008b).

Obrázek 1: Senzitivace dýchací cest po kontaktu s alergenem a IgE zprostředkovaná časná a pozdní fáze astmatické reakce u atopického (alergického) astmatu.



Vysvětlivky: ECP...eozinofilní kationický protein; GM-CSF...faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů; IgE...imunoglobulin E; IgE Fc...vysokoafinitní receptor pro IgE; IL...interleukiny; MBP...hlavní bazický protein; T_H2 ...T- pomocný lymfocyt
Převzato a upraveno z: <http://medicinembbs.blogspot.cz/2011/02/asthma-and-its-types.html>

2.2. Akutní poškození plic a syndrom akutní dechové tísně

Akutní poškození plic (ALI) a jeho závažnější forma syndrom akutní respirační tísně (ARDS) se řadí mezi syndromy difúzního poškození plicního parenchymu způsobené různými lokálními nebo systémovými inzulty. Společným rysem všech forem ALI/ARDS je narůstající propustnost alveolo-kapilární membrány, která vede k tomu, že jsou alveoly postupně zaplavovány tekutinou bohatou na protein (edém plic). Dále dochází ke zvýšené infiltraci neutrofilů, makrofágů a erytrocytů a také ke zvýšené expresi prozánětlivých mediátorů v alveolech, plicním endotelu a cévách, což vede k jejich zánětlivému poškození (Jansson et al. 2005; Maniatis et al. 2008; Rocco et al. 2009; Villar et al. 2012; Wang et al. 2008).

Příčiny vzniku ALI/ARDS se formálně dělí na přímé (primární, plicní) a nepřímé (sekundární, mimoplicní). Za přímé příčiny jsou považovány takové faktory a stavy, které působí přímo na plicní parenchym (inhalace dráždivých plynů a par, aspirace, nevhodná plicní ventilace aj.). Nepřímé příčiny zahrnují např.: sepsi a trauma, intoxikaci léčiv, sekundární poškození po primárním postižení jiného orgánu (srdce, pankreas, játra...) expozici endotoxinům aj.. Polovina všech případů výskytu ALI/ARDS je dávana do souvislosti se sepsí a endotoxiny, 25 % se rozvíjí po traumatech případně aspiracích a zbylých 25 % spadá na vrub intoxikace léčiv, inhalace kouře, plicní kontuze apod. (Lessa et al. 2008; Wang et al. 2008).

V klinické praxi se spoluuplatňuje celá škála faktorů, a to může pacienty učinit vnímavější k riziku rozvoje ALI/ARDS. Např. u pacientů s polytraumaty může ALI/ARDS vyvolat tuková embolie, krevní transfuze či nozokomiální nákaza. U pacientů se sepsí se jako vyvolávající příčiny mohou sdružit endotoxémie, ventilátorová pneumonie a případně inhalace vyšších koncentrací kyslíku aj. (Maniatis et al. 2008). I přes poměrně dobře známou patogenezí ALI/ARDS a intenzivní podpůrnou léčbu se mortalita pohybuje mezi 40-65 % (Jansson et al. 2005; Krafft et al. 1996; Maniatis et al. 2008; Nie et al. 2013; Villar et al. 2012; Wang et al. 2008).

Toxiny vyvolávající ALI/ARDS mohou být bakteriálního, virového či kvasinkového původu. Nejagresivnější jsou v tomto ohledu bakteriální endotoxiny lipopolysacharidy (LPS) produkované gram negativními bakteriemi. Tyto endotoxiny vedou nejen k rozvoji ALI/ARDS, ale uplatňují se v etiologii multiorgánového selhání při sepsí (Jansson, Eriksson and Wang 2005). Po inhalaci LPS dochází u lidí ke snížení objemu usilovně vydechnutého objemu za první sekundu (FEV_1), usilovné vitální kapacity

plic (FVC) a vitální kapacity plic (FV). Dále dochází ke zvýšení migrace, aktivaci a uvolňování prozánětlivých mediátorů z neutrofilů (Maniatis et al. 2008; Thorn 2001). Endotoxemie velmi brzy vede k poklesu parciálního tlaku kyslíku v krvi (pO_2), progresivnímu snížení plicní elasticity a nárůstu rezistence (Jansson, et al. 2005). U experimentálních modelů způsobuje intratracheální aplikace LPS primárně akutní plicní zánět a ALI, které je charakterizováno aktivací makrofágů v alveolech, infiltrací neutrofilů, plicním otokem a zvýšenou produkcí prozánětlivých mediátorů. Kromě jiných enzymů je indukována exprese a aktivita iNOS, což se projevuje velkým nárůstem koncentrace NO v dýchacích cestách (Nie et al. 2013; Sanz et al. 2005). Mnohé výše popsané děje jsou považovány za společné rysy těchto preklinických modelů a klinického obrazu ALI/ARDS.

2.3. Biochemie oxidu dusnatého a jeho účinky v dýchacích cestách

Úloha NO a jiných reaktivních dusíkatých látek (RNS) v patofyziologii plicních onemocnění je již delší dobu předmětem intenzivního výzkumu. Před více než 20 lety byl NO považován pouze za škodlivinu, která ohrožuje životní prostředí. V roce 1987 bylo prokázáno, že NO je ve skutečnosti látka dříve označovaná jako endoteliální faktor vyvolávající vazodilataci. Od té doby stále stoupá počet vědeckých prací přinášejících další překvapivé objevy o funkci NO v organismu. V roce 1998 byly tyto objevy oceněny Nobelovou cenou za fyziologii a lékařství (Moncada et al. 2006).

2.3.1. Účinky oxidu dusnatého

NO je signální molekula, která se účastní mnoha fyziologických procesů, jako jsou vazodilatace (NO patří mezi velmi silné vasodilatační faktory), přenos nervových vzruchů (inhibiční neadrenergnní necholinergní neurotransmise, iNANC), inhibice agregace destiček, aktivace neutrofilů a ovlivnění jejich adheze (Durante et al. 2007; Zimmermann et al. 2006). V dýchacích cestách má NO řadu významných regulačních funkcí, z nichž nejznámější je ovlivnění tonu hladkého svalstva průdušek a cév. NO je hlavním neurotransmiterem iNANC systému u lidí a morčat. Vysoké koncentrace NO jsou důležitou součástí imunitní reakce jako součást obrany proti infekci (aktivace leukocytů) a nádorovému bujení (iniciace apoptózy) (Jung, et al. 2010). Při zajištění nespecifické imunity je NO produkován převážně alveolárními makrofágy, v nichž je indukován enzym iNOS. Takto uvolněné vysoké koncentrace NO mají cytotoxický efekt na invadující bakterie a parazity, podporují buněčnou sekreci cytokinů a zvyšují cyklooxygenázovou

aktivitu (Moali et al. 2000; Yang et al. 2002). Vysoké koncentrace na jednu stranu chrání plíce před infekcí, ale na druhé straně tyto procesy zhoršují zánět probíhající v plicích a to z důvodu zvýšeného oxidačního a nitračního stresu (Yang et al. 2002).

NO je malá nenabitá molekula, která velmi rychle difunduje z místa vzniku a proniká snadno buněčnými membránami. Vzhledem ke své radikálové povaze je také velmi reaktivní a má krátký biologický poločas (1-5 sekund) (Zimmermann et al. 2006). Rychle se váže na různá cílová místa, zejména kovy v molekulách hemu a metaloenzymů. V tělních tekutinách NO velmi rychle reaguje s radikály, zejména se superoxidovým radikálem za vzniku reaktivního a toxického peroxodisitanu nebo se váže na nízko a vysokomolekulární látky obsahující thiolové skupiny (glutathion, albumin) a jiné molekuly.

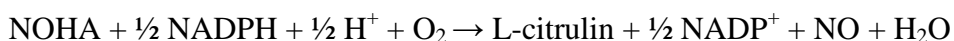
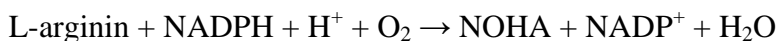
Jak ukázaly preklinické experimenty (Dupuy et al. 1992; Hogman et al. 1993) a klinické studie s nemocnými s astmatem, inhalovaný NO má ve srovnání s beta2-agonisty pouze velmi mírný bronchodilatační účinek. Také perorálně nebo inhalačně podaný L-arginin neovlivnil plicní funkci (FEV_1) a vedl pouze k mírnému a přechodnému nárůstu koncentrace NO ve vydechaném vzduchu (Kharitonov et al. 1995; Sapienza et al. 1998). Podání nescifických inhibitorů (L-NAME, L-NMMA) a iNOS specifických inhibitorů (SC-51, MU) způsobilo rychlý a výrazný pokles koncentrace NO ve vydechaném vzduchu, přičemž plicní funkce (FEV_1) se nezměnila (Hansel et al. 2003).

Naopak výrazným způsobem NO ovlivňuje reakci dýchacích cest na nescifické i specifické bronchokonstrikční stimuly. Bronchokonstrikční účinek metacholinu, histaminu, bradykininu a adenosinu je možné snížit inhalací NO a podáním L-argininu (Kacmarek et al. 1996) nebo naopak zesílit snížením dostupnosti NO v dýchacích cestách pomocí inhibitoru NOS (Ricciardolo et al. 1996; Taylor et al. 1998). Závěry četných studií dokládají bronchoprotektivní účinek NO u zvířat i člověka, který se dostavuje velmi rychle a je zprostředkovan konstitutivními formami NOS (cNOS). Podíl nNOS a eNOS na ochranném účinku není zcela objasněn a pravděpodobně se liší mezi jednotlivými zvířecími druhy a mezi zvířaty a člověkem (Redington 2006). Bronchoprotektivní účinek NO se snižuje u nemocných s těžším stupněm průduškového astmatu a při akutní exacerbaci vyvolané alergenem (Ricciardolo et al. 2001).

2.3.2. Syntázy oxidu dusnatého (NOS)

NO vzniká z aminokyseliny L-argininu syntázami NO (NOS) a jeho buněčná produkce je závislá na dostupnosti L-argininu (Sonoki et al. 1997). Enzymatická oxidace L-argininu na L-citrulin a NO zahrnuje přenos 5 elektronů z kyslíku a NADPH. Jde o sled dvou monooxygenázových reakcí, kde meziproduktem je N^ω-hydroxy-L-arginin (NOHA), který má zároveň vlastnosti inhibitoru argináz (Bratt et al. 2011; Maarsingh et al. 2008b).

Sumární chemická rovnice je následující:



Byly popsány tři různé formy NOS, které se liší tkáňovou expresí, množstvím NO, které produkují, a také v aktivačním a regulačním mechanismu. Konstitutivní formy cNOS zahrnují eNOS (endoteliální, NOS3) a nNOS (neuronální, NOS1). Jsou exprimovány kontinuálně, mají receptorově řízenou aktivitu, tvoří velmi rychle (v řádu sekund) krátkodobé pulzy nízkých koncentrací NO na femtomolární až pikomolární úrovni, které působí převážně lokálně. Pro jejich aktivaci je nutná přítomnost intracelulárního kalcia a kalmodulinu. Aktivita nNOS je dále regulována fosforylací serinových a threoninových míst v molekule enzymu. Naopak indukovatelná forma iNOS (NOS2) s transkripčně řízenou aktivitou tvoří vysoké koncentrace NO (nanomolární koncentrace), které narůstají pomaleji (v řádu hodin), působí však po delší dobu a uplatňují se hlavně při imunitní a zánětlivé odpovědi (Bratt et al. 2011). Enzym iNOS má vysokou afinitu ke kalmodulinu (v podstatě trvale váže kalmodulin) a je relativně nezávislý na koncentraci intracelulárního kalcia. Stejně jako cNOS však pro svou aktivaci vyžaduje transkripční aktivátory: nukleární faktor-kappa B (NF-κB), aktivátorový protein (AP1) a transkripční faktor 1α (STAT1α). Enzymový komplex NOS vyžaduje přítomnost NADPH (redukováná forma nikotinamid-adenindinukleotid fosfátu, O₂, BH₄ (tetrahydrobiopterin), FAD (flavin adenin dinukleotid a FMN (flavin mononukleotid) v roli kofaktorů (Moali, et al. 2000).

Všechny tři izoformy lze nalézt v dýchacích cestách a jsou zapojeny do regulace plicní funkce (Zimmermann et al. 2006). NO produkovaný konstitutivními formami má bronchodilatační, vazodilatační a bronchoprotektivní účinek. Vazodilatace probíhá mechanismem aktivace cytozolické guanylát cyklázy, následované zvýšením koncentrace cyklického guanozinmonofosfátu (cGMP, druhý posel), který aktivuje proteinkinázu G, která fosforyluje řadu proteinů ovlivňujících koncentraci volného Ca²⁺ v buňce a citlivost

k jeho účinkům. K relaxaci hladké svaloviny vede snížení intracelulární koncentrace kalcia několika mechanismy (inhibice kalciových kanálů typu L, stimulace Ca^{2+} ATPázy aj.), stimulace kalcium řízených draslíkových kanálů (hyperpolarizace membrány), aktivace fosfatázy lehkých řetězců myosinu vedoucí k jejich defosforylaci a dále snížení vnímavosti kontraktálního aparátu ke kalcium (Getz et al. 2006; Maarsingh et al. 2008b; Meurs et al. 2000; Morris 2007; Takahashi et al. 2010).

Enzym iNOS je exprimován ve většině tkání a exprese je indukována v odpovědi na prozánětlivé cytokiny TNF- α , interleukin-1 β , γ -interferon a bakteriální LPS (Ricciardolo et al. 2004). Indukce enzymu dosahuje maxima za několik hodin po spouštějícím stimulu a přetrvává v intervalu hodin až dnů. Signální dráhy LPS indukované exprese iNOS zahrnují interakci LPS navázaného na specifický protein s receptorem CD14, který po aktivaci interaguje s TLR-4 („*Toll-like 4 receptor*“) a pomocí řady solubilních i membránově vázaných regulačních proteinů uvnitř buňky aktivuje transkripční faktor NF- κ B. Prozánětlivé cytokiny uvolněné z infikovaných buněk zvyšují expresi iNOS po aktivaci příslušných cytokinových receptorů a signálních drah vedoucích k ovlivnění NF- κ B nebo kináz a transkripčních faktorů JAK-STAT (Reed et al. 2001).

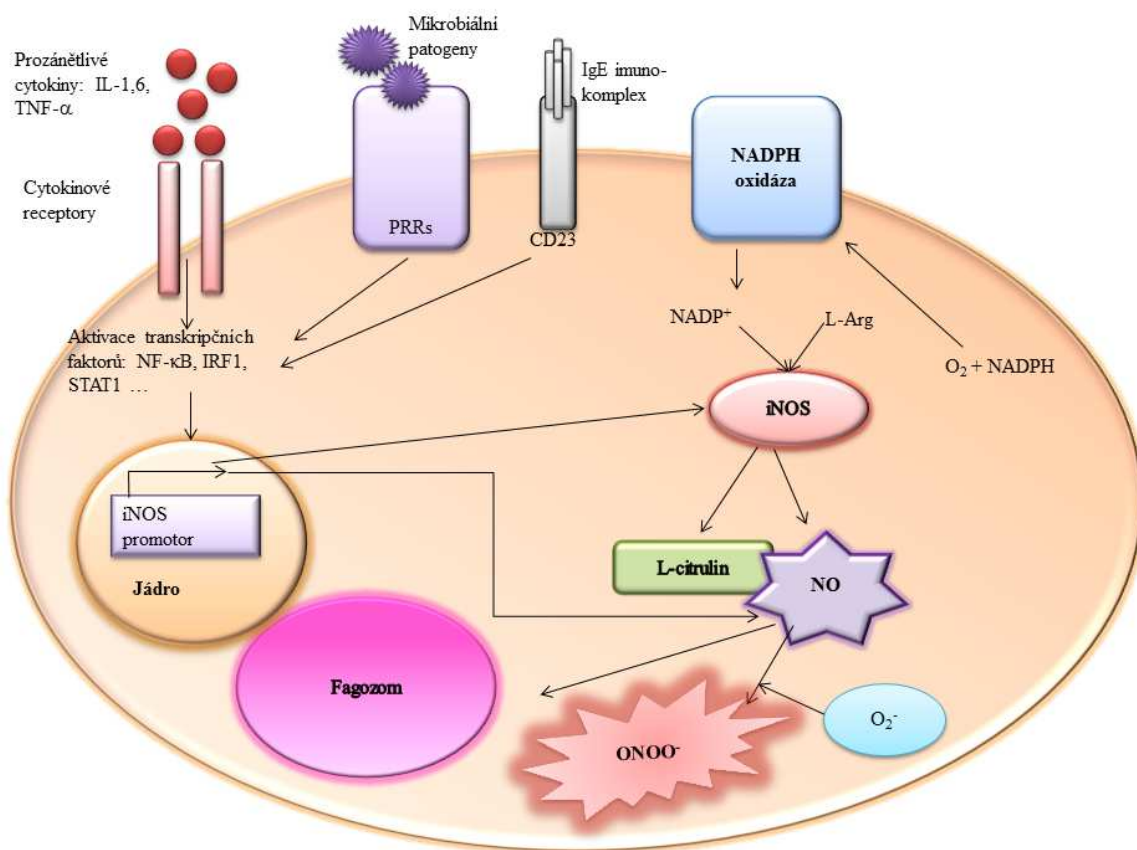
Konstitutivní formy cNOS přeměňují L-Arg na NO a L-citrulin za přítomnosti kyslíku v dvojfázové biochemické reakci. Při nedostatku L-Arg a/nebo při nedostatku BH_4 dochází k procesu, který se nazývá rozpojení (z angl. „*uncoupling*“). Přitom vznikají superoxidové radikály, které ve velmi rychlé reakci s NO generují peroxodisitan.

V případě iNOS dochází ke stejnému jevu pouze při nedostatku BH_4 a nikoli při samotné snížené dostupnosti L-Arg. Podle jedné z teorií je v případě iNOS za vznik superoxidového radikálu odpovědná oxygenázová doména enzymu na rozdíl od cNOS, kde je to flavin-vázající reductázová doména (Xia et al. 1998a; Xia et al. 1998b). Tento rozdíl v katalytických mechanismech má pravděpodobně význam pro antimikrobiální vlastnosti vysokých koncentrací NO (Bratt et al. 2011).

V dýchacích cestách byla přítomnost a aktivita iNOS prokázána v epiteliálních buňkách průdušek, sekrečních buňkách, v makrofázích, neutrofilech a žírných buňkách. Endoteliální formu NOS lze nalézt v cévním endotelu a v epiteliálních buňkách dýchacích cest a enzym nNOS v neadrenergických a necholinergních neuronech. Imuno-histochemickými technikami byla v epitelu průdušek u nemocných s nekontrolovaným průduškovým astmatem prokázána nejen zvýšená exprese iNOS, ale i nárůst koncentrace nitrotyrozinu jako bioindikátoru nitračního stresu (Hammermann et al. 2001; Zimmermann et al. 2006).

NO tvořený enzymem iNOS (Obrázek 2) hraje důležitou roli v patofyziologii aleregických, zánětlivých i autoimunitních onemocnění a to nejen v dýchacích cestách. (Yang et al. 2002). Hladina exhalovaného NO je úměrná tíži zánětu. Exhalované NO je tak možné použít jako biomarker k posouzení závažnosti astmatu a účinku protizánětlivé farmakoterapie (Bratt et al. 2010; Zimmermann et al. 2006). Zimmermann a spolupracovníci prokázali, že exprese iNOS je signifikantně zvýšená v dýchacích cestách postižených astmatickým zánětem. Z výsledku usoudili, že iNOS se hlavní měrou podílí na nárůstu exhalovaného NO jak u člověka, tak u zvířat (Zimmermann et al. 2006).

Obrázek 2: Syntéza NO indukovatelnou formou NOS.



Vysvětlivky: CD23... nízkofinitní receptor pro IgE; IgE... imunoglobulin E; IL... interleukin; iNOS... indukovatelná syntáza oxidu dusnatého; IRF1... interferon regulační protein; L-Arg... L-arginin; NF-κB... nukleární faktor-kappa B; NO... oxid dusnatý; NADP⁺... nikotinamid-adenindinukleotidfosfát; NADPH... redukovaná forma nikotinamid-adenindinukleotidfosfátu; O₂⁻... superoxidový radikál; ONOO⁻... peroxodisitan; PRRs... motiv rozpoznávající receptory; STAT1... převodník signálů a aktivátor transkripce 1; TNF-α... tumor nekrotizující faktor α
Převzato a upraveno z: Abcam nitric oxide poster 14/12/2009, http://docs.abcam.com/pdf/cancer/nitric_oxide_signaling.pdf

Naopak jiní autoři poukazují na skutečnost, že klinické testy s inhibitory NOS u pacientů s astmatem přinesly rozporuplné výsledky. Úloha NO při exacerbaci astmatu je

pravděpodobně mnohem komplexnější, než se předpokládalo (Bratt et al. 2011). V podmínkách chronického zánětu dýchacích cest mají vysoké koncentrace NO a peroxodusitanu negativní dopad zejména svým prozánětlivým působením a poškozením struktur dýchacích cest (Zimmermann et al. 2006; Getz et al. 2006).

2.3.3. Využití vyšetření koncentrací NO a jiných látek při diagnóze a sledování terapie onemocnění dýchacích cest

Při výzkumu zaměřeném na měření koncentrací bioindikátorů zánětu bylo zjištěno, že u nemocných s chronickým zánětlivým onemocněním dýchacích cest je na lokální i systémové úrovni zvýšená koncentrace biochemických mediátorů a indikátorů zánětu, oxidačního a nitračního stresu. Naskytla se tak možnost analýzou biologických vzorků z dýchacích cest získat informace o charakteru a intenzitě patologických procesů v dýchacích cestách.

Detekce NO ve vydechovaném vzduchu využívá skutečnost, že v plynné fázi v nízkých koncentracích je NO podstatně stabilnější než v tělních tekutinách. Koncentrace NO je možné měřit v průběhu výdechu nebo dokonce po krátkodobém uschování vzorku vydechnutého vzduchu ve vzduchotěsném balónu. Koncentrace vydechovaného NO jsou vyšší u osob s atopickým astmatem, odrážejí intenzitu zánětu a korelují s výsledky jiných vyšetření, jako jsou počet eozinofilů v indukovaném sputu a koncentrace IgE (Moncada et al. 2006; Redington 2006). Velkou výhodou vyšetření NO je neinvazivnost, opakovatelnost, relativní snadnost a okamžitá dostupnost výsledku.

Koncentraci NO v průduškách je možné zjistit také nepřímo biochemickým vyšetřením koncentrace jeho metabolitů (dusitany/dusičnany NO_x, nitrotyrozin, nitrozothioly) v kondenzátu vydechovaného vzduchu, v supernatantu indukovaného sputa nebo ve vzorcích tekutiny z bronchoalveolární laváže (BAL). V těchto biologických vzorcích se dále podařilo stanovit například metabolity kyseliny arachidonové (leukotrieny B₄, C₄, D₄, E₄, prostaglandin E₂, tromboxany např. TxB₂, 8-izoprostan), interleukiny, TNF- α , peroxid vodíku, adenzin, biogenní aminy, proteiny jako eozinofilní kationický protein (ECP) a další látky (Belvisi 2004; Dweik et al. 2001; Kharitonov et al. 2001). Příklady vybraných látek, které byly zkoumány, jako potenciálně využitelné bioindikátory plicních onemocnění jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Příklady látek potenciálně využitelných jako bioindikátory plicních onemocnění.

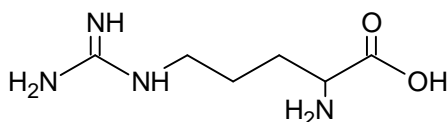
<p><i>eikosanoidy a jejich metabolity</i></p> <p>leukotrieny B₄, C₄, D₄, E₄ prostaglandiny E₂ tromboxany (např. TxB₂) 8-izoprostan</p>
<p><i>proteiny</i></p> <p>ECP a ECX interleukiny (IL-1β, IL-6, IL-5 aj.) GM-CSF ICAM-1 endotelin-1 TNF-α enzymy (glutathion peroxidáza, matrix metaloproteázy, neutrofilní elastáza aj.)</p>
<p><i>biologicky aktivní aminy a jiné látky</i></p> <p>katecholaminy histamin serotonin adenozin</p>
<p><i>indikátory oxidačního stresu</i></p> <p>malondialdehyd peroxid vodíku 4-hydroxy-2-nonenal glutathion</p>
<p><i>indikátory nitračního stresu</i></p> <p>dusičnany/dusitany nitrotyrozin</p>
<p><i>plyny</i></p> <p>oxid dusnatý oxid uhelnatý etan, pentan</p>

Vysvětlivky: ECP...eozinofilní kationický protein; EXP...eozinofilní protein X; GM-CSF...faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů; ICAM...mezibuněčná adhezivní molekula; TNF- α ...tumor nekrotizující faktor alfa; TxB₂...tromboxan B₂

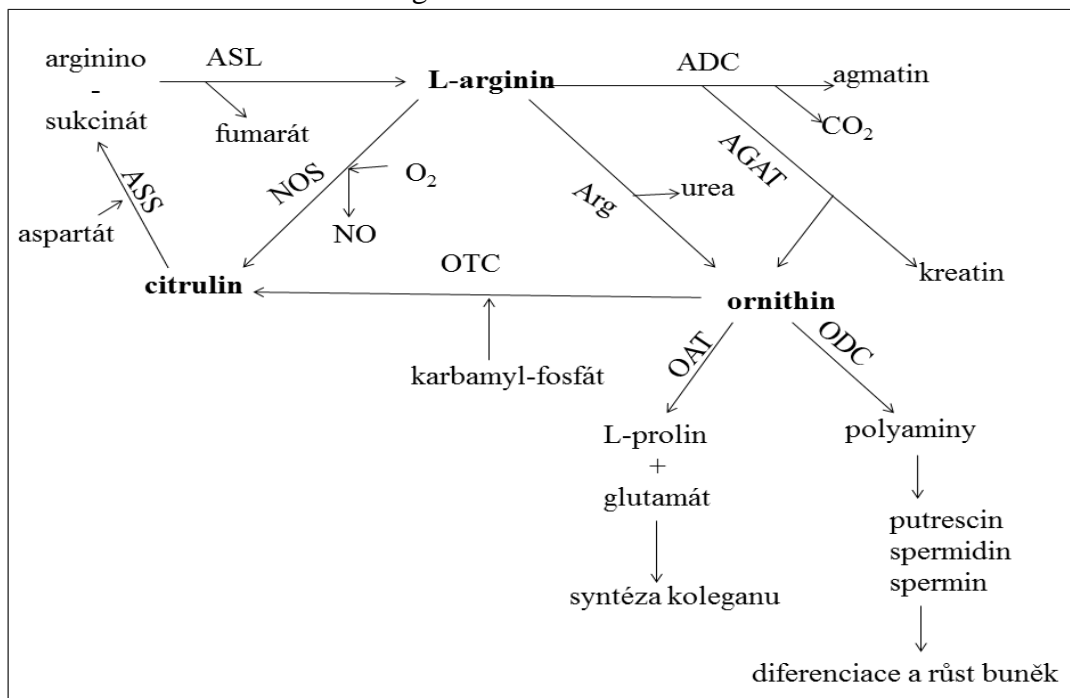
2.4. Metabolická dráha argin-oxid dusnatý

L-arginin (L-Arg) je polární semiesenciální aminokyselina s bazickou guanidinovou skupinou v postranním řetězci (Obrázek 3). Většina buněk v lidském organizmu je schopna syntetizovat L-Arg. Přes tuto skutečnost je externí transport L-Arg do buňky primárním mechanismem regulujícím intracelulární koncentraci aminokyseliny (Schwartz et al. 2003). Stálá koncentrace L-Arg v extracelulární tekutině je udržována procesy zahrnujícími přísun potravou, syntézu z L-ornitinu v játrech a z L-citrulinu v ledvinách. Exogenní zdroje L-Arg jsou velmi důležité v dětství pro růst a dále při vysoké zátěži organismu nebo např. pro dobré hojení ran (Lortie et al. 2000).

Obrázek 3: Chemická struktura L-argininu.



Metabolismus L-Arg (Obrázek 4) je značně komplexní. Arginin slouží jako substrát pro řadu enzymů a je zapojen v mnoha biochemických dějích, jako jsou syntéza NO, proteinů, močoviny, polyaminů, prolinu, glutamátu, kreatininu a agmatinu (Bratt et al. 2011; Maarsingh et al. 2008b; Watts et al. 2011). Zvýšené koncentrace kreatinu jsou spojovány s rizikem hyperreaktivity dýchacích cest a s nárůstem počtu eozinofilů v dýchacích cestách. Agmatin je slabý inhibitor NOS. Glutamin je prekurzorem pro γ -aminomáselnou kyselinu (GABA) a glutathion. Obě tyto látky zvyšují produkci hlenu plicním epitelem a zároveň působí jako antioxidanty. L-Arg je zapojen i v procesu remodelace plicní tkáně a to přes produkci L-prolinu a polyaminů (petruscein, spermidin a spermin). Prolin je z L-ornitinu syntetizován ve dvoufázové enzymatické reakci katalyzované ornitin aminotransférazou (OAT) a pyrrolin-5-karboxylát reduktázou. Prolin je prekurzor pro syntézu kolagenu. Ornitin dekarboxyláza (ODC) vede k metabolickým drahám syntézy polyaminů, které podporují buněčnou proliferaci strukturálních buněk dýchacích cest. Polyaminy mohou také přispívat k indukci exprese genů zapojených v buněčné proliferaci a to podporou histon acetyltransferázy. Polyaminy jsou důležitým regulátorem buněčného cyklu, proliferace, diferenciaci a apoptózy buněk (Bratt et al. 2011; Maarsingh et al. 2008b). Všechny metabolity vznikající z L-Arg mohou ovlivnit rozvoj a průběh astmatu i celé řady dalších onemocnění dýchacích cest.

Obrázek 4: Metabolismus L-argininu.

Vysvětlivky: ADC... agmatin dekarboxyláza; AGAT... agmatin transferáza; Arg... arginin; ASL... argininsukcinát lyáza; ASS... argininsukcinát syntáza; CO₂... oxid uhličitý; NO... oxid dusnatý; NOS... syntáza oxidu dusnatého; O₂... kyslík; ODC... ornitin dekarboxyláza; OTC... ornitin transkarbamoyláza; OAT... ornitin aminotransferáza

Za patologických stavů, jakými jsou např. snížená funkce ledvin, trauma a zánět, může být dostupnost L-Arg nedostatečná pro zajištění všech metabolických pochodů. V takovém případě dochází k nerovnováze mezi katabolickými a anabolickými reakcemi, kterých se L-Arg účastní s tím, že převažují spíše reakce katabolického charakteru (Bratt et al. 2011; Maarsingh et al. 2008b). Snížená koncentrace L-Arg byla pozorována např. v dýchacích cestách u myší s alergickým zánětem po podávání ovalbuminu (OVA). U pacientů s astmatem je koncentrace plazmatického L-Arg nižší než u zdravých osob (Morris et al. 2004b; Riccioni et al. 2012).

Řada studií se zabývala významem suplementace L-Arg (Butler et al. 2005; Chatterjee et al. 2007; Lin et al. 2005; Morris et al. 2004a; Yoon et al. 2005). Výsledky těchto studií naznačují, že přínos suplementace L-Arg je značně kontroverzní a velmi závislý na typu onemocnění. U plicní hypertenze pacientů se srpkovitou anémií mělo podávání argininu pozitivní účinek. Naopak u pacientů s astmatem nebo autoimunitními onemocněními nebyl po podání argininu zaznamenán žádný výrazný efekt. U hemodynamicky nestabilních pacientů může mít podávání L-Arg naopak závažné nežádoucí účinky, které mohou vést až k úmrtí (Chatterjee et al. 2007; Zimmermann et al.

2006). Z výše zmíněných studií vyplývá, že změny v metabolické dázce arginin-NO po podání L-Arg ať už v potravě nebo inhalační cestou ovlivňují celou řadu dějů a to nejen v dýchacích cestách a mohou mít pozitivní i negativní dopad na zdravotní stav (Maarsingh et al. 2008b; Zimmermann et al. 2006). Na druhou stranu snížená dostupnost L-Arg a NO produkovaného cNOS může také určitým způsobem přispívat k vzniku a rozvoji plicního zánětu. Enzymem eNOS syntetizovaný NO má schopnost redukovat zánět tím, že potlačuje aktivaci nukleárního faktoru NF- κ B, a tím i expresi iNOS a zánětlivých cytokinů (Maarsingh et al. 2008b).

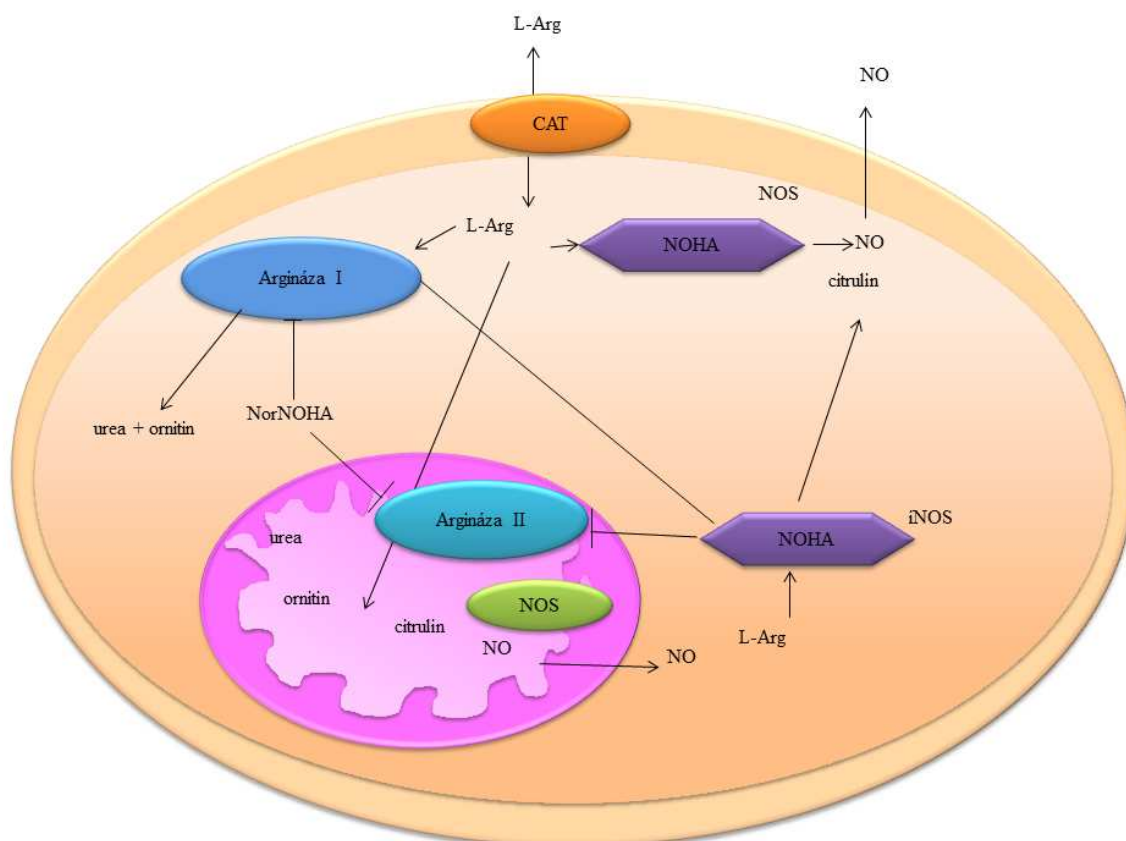
2.4.1. Membránové transportéry pro L-arginin

Prostup aminokyselin přes buněčnou membránu je zajišťován pomocí příslušných membránových transportních proteinů (transportéry). Transportéry pro aminokyseliny lze třídit na základě jejich substrátové specifity, transportního mechanismu a regulačních vlastností. Aktivita transportérů se mění vlivem různých stimulů, jako je např. koncentrace aminokyselin. L-Arg, který patří mezi kationické aminokyseliny, může využít transportéry y^+ , b_0^+ , B_0^+ a y^+L (Schwartz et al. 2003). Transportéry b_0^+ , B_0^+ a y^+L transportují jak kationické tak nenabitě aminokyseliny. Transportéry y^+ systému, takzvané CAT transportéry (z angl. „*cationic amino acid transporters*“) jsou nezávislé na Na^+ , vysokoafinitní, exprimované v mnoha buňkách organismu a specifické pro transport kationických aminokyselin včetně L-Arg. Řada autorů považuje CAT transportéry za hlavní transportní systém pro L-Arg (Obrázek 5) (Deves et al. 1998; Hammermann et al. 1999; Maarsingh et al. 2008b; Schwartz et al. 2003; Zimmermann et al. 2006).

CAT jsou membránové glykoproteiny se čtrnácti transmembránovými segmenty (Closs et al. 2004). Vyskytují se ve 3 izoformách CAT1, CAT2 a CAT3, přičemž CAT2 se dále vyskytuje ve dvou izoformách (Maarsingh et al. 2008b; Zimmermann et al. 2006). Jednotlivé izoformy se navzájem liší tkáňovou distribucí, citlivostí na pH, substrátovou afinitou a citlivostí k transstimulaci. (Kitiyakara et al. 2001). Transportér CAT2A je fyziologicky exprimován hlavně v játrech, kde se jedná o hlavní transportér pro L-Arg. Má nízkou afinitu k L-Arg, proto je transport argininu do jater především závislý na expresi tohoto proteinu. Exprese CAT2 je ovlivňována prozánětlivými molekulami (např. LPS) a pravděpodobně se podílí na regulaci dostupnosti L-Arg pro NOS a tím ovlivňuje syntézu NO (Deves et al. 1998; Zimmermann et al. 2006). Transportér CAT1 je exprimován v mnoha orgánech a tkáních a je považován za rozhodující pro transport L-Arg do alveolárních makrofágů. Tento transport je inhibován eozinofilním kationickým

proteinem, který tak může ovlivnit dostupnost substátu jak pro NOS tak pro arginázy (Zimmermann et al. 2006). Exprese CAT1 se zvyšuje při systémovém nedostatku aminokyselin a regulace exprese CAT1 je považována za součást odpovědi buněk na stres (Fernandez et al. 2004). Transportér CAT3 je exprimován převážně v mozku.

Obrázek 5: Transport a metabolismus L-argininu.



Vysvětlivky: L-Arg...L-arginin; CAT...transportér pro kationické aminokyseliny, NO...oxid dusnatý; NOHA...N^ω-hydroxy-L-arginin; NOS...syntáza oxidu dusnatého; norNOHA...N^ω-hydroxy- nor-L-arginin; iNOS...indukovatelná NOS. Převzato a upraveno z: Topal, et al., 2006

Transport L-Arg γ^+ systémem je ovlivňován 1/ostatními kationickými aminokyselinami jako je L-ornitin nebo L-lyzin, 2/ polykationty jako je hlavní bazický protein (MBP) uvolňovaný z aktivovaných eozinofilů a syntetické peptidy s vysokým obsahem argininu jako poly-L-arginin nebo 3/ deriváty argininu a ornitinu (N-hydroxyargin, N^G-monomethyl-L-arginin, N^G-iminoethyl-L-ornitin) (Maarsingh et al. 2008b). Transport L-Arg do buňky pomocí γ^+ systému se podílí na regulaci syntézy NO v dýchacích cestách tím, že ovlivňuje dostupnost L-Arg pro NOS. Inhibice transportu

L-Arg bazickými proteiny (např. MBP) a peptidy (např. poly-L-arginin) snižuje syntézu NO v alveolárních makrofázích a v tracheálních epitelálních buňkách potkana.

Poly-L-arginin zvyšuje bronchiální reaktivitu na metacholin u potkanů a morčat. Jeho účinek je připisován snížené koncentraci a ochranné funkci NO v dýchacích cestách v důsledku poklesu syntézy konstitutivními formami NOS (Maarsingh et al. 2008b).

2.4.2. Arginázy

Arginázy I a II (E.C. 3.5.3.1.) jsou enzymy katalyzující hydrolyzu L-Arg na močovinu a L-ornitin (Bagnost et al. 2010). Molekula argináz je trimer a každý monomer obsahuje v aktivním místě dva kationty Mn^{2+} . Arginázy mají optimální aktivitu v mírně alkalickém (potkaní argináza pH 7,8 až 8,0) až alkalickém prostředí (lidská argináza pH 9,0 až 9,5) (Cama et al. 2004); (Durante, Johnson and Johnson 2007). *In vitro* jsou arginázy aktivovány Mn^{2+} a jinými kationty kovů jako Co^{2+} , Ni^{2+} nebo Fe^{2+} (Ash 2004). Aktivovaná argináza syntetizuje L-ornitin, který je dále ornitin dekarboxylázou (E.C. 4.1.1.17) přeměňován na polyaminy. Polyaminy a L-prolin jsou potřebné pro buněčnou proliferaci a diferenciaci a také pro syntézu kolagenu. Dále jsou nezbytné pro hojení ran a regeneraci tkání (Ash 2004). Zapojení argináz do těchto pochodů vedlo mnoho odborníků k názoru, že arginázy mají významnou úlohu při remodelaci dýchacích cest, která je důsledkem chronického zánětu při astmatu a CHOPN (Durante et al. 2007; Warnken et al. 2010).

Arginázy I a II jsou kódovány různými geny na odlišných chromozomech. Mají také odlišnou lokalizaci v buňce a jsou regulovány nezávisle na sobě (Krotova et al. 2010; Maarsingh et al. 2008b; Zimmermann et al. 2006). Argináza I (ArgI, jaterní argináza) je cytozolický enzym primárně se vyskytující v hepatocytech, kde katalyzuje závěrečnou biochemickou reakci v cyklu močoviny. Nicméně lze ji nalézt i v makrofázích, neutrofilech, erytrocytech, epitelálních a endoteliálních buňkách nebo fibroblastech (Bratt et al. 2011; Zimmermann et al. 2006). Geneticky podmíněný deficit ArgI v organismu vede k hyperargininémii a hyperamonémii a projevuje se zejména progresivním závažným neurologickým poškozením včetně mentální retardace. Nejtěžší formy onemocnění jsou smrtelné (Zimmermann et al. 2006) Argináza II (ArgII) je mitochondriální enzym, jehož primární funkcí je homeostáza L-Arg v mimojaterních tkáních (Bagnost et al. 2010). Exprese argináz v jednotlivých orgánech je také odlišná u různých živočišných druhů. (Warnken, et al. 2010; Zimmermann et al. 2006). Exprese se zvyšuje u celé řady onemocnění, jako jsou astma, CHOPN, cystická fibróza, srpkovitá anémie, sepse, těžká

traumata. Zvýšená aktivita argináz byla pozorována i po orgánových transplantacích. (Zimmermann et al. 2006; Bratt, et al. 2011).

Expres argináz se mění v reakci na různé stimuly, které často působí společně. Expres ArgI se zvyšuje především při traumatu tkáně a vytváří podmínky pro hojení nebo patologickou remodelaci postižené tkáně. (Reid et al. 2007; Watts, et al. 2011). Je ovlivňována T_H2 cytokiny (IL-4,10,13), které aktivují nukleární transkripční faktor STAT6 přes IL-4R α , který dále indukuje Janus kinázu 1 a následně i STAT6 receptor (Getz et al.2006; Takahashi et al. 2010; Zimmermann et al. 2006). Expres argináz stimulovaná IL-4 a-13 je spojována s inhibicí syntézy NO v makrofázích přes STAT6 závislou cestu. ArgII je na rozdíl od ArgI na STAT6 aktivaci nezávislá (Zimmermann et al. 2006). Další důležité aktivátory exprese ArgI jsou transformující růstový faktor- β (TGF- β) a epidermální růstový faktor (EGF), endotoxiny, cAMP aj. Při zánětlivé reakci po podání LPS dochází v počáteční fázi především k indukci ArgII, zatímco ArgI zvyšuje svoji expresi a aktivitu až v pozdější fázi (Colleluori et al. 2001). ArgII je indukována v reakci na celou řadu stimulů např. endotoxinem, TNF- α , oxidačním stresem, hypoxií, zvýšenou hladinou glukózy aj. (Gonon et al. 2012; Watts et al. 2011).

ArgI a ArgII stejně jako transportéry CAT jsou při experimentálně navozeném alergickém astmatu silně indukovány. Zvýšená aktivita argináz může vést až k projevům lokálního nedostatku L-Arg a k jevu označovanému rozpojení NOS, kdy je místo NO tvořen superoxidový radikál a peroxodusitan, které poškozují dýchací cesty a přispívají k rozvoji průduškové hyperreaktivity např. v průběhu druhé fáze alergické reakce (Bratt et al. 2011). Pacienti s astmatem mají zvýšenou aktivitu argináz v séru a zároveň sníženou koncentraci L-Arg v plazmě (Bratt et al. 2009). Zvýšená aktivita argináz v bioptických vzorcích z dýchacích cest u nich koreluje se sníženou plicní funkcí (FEV₁).

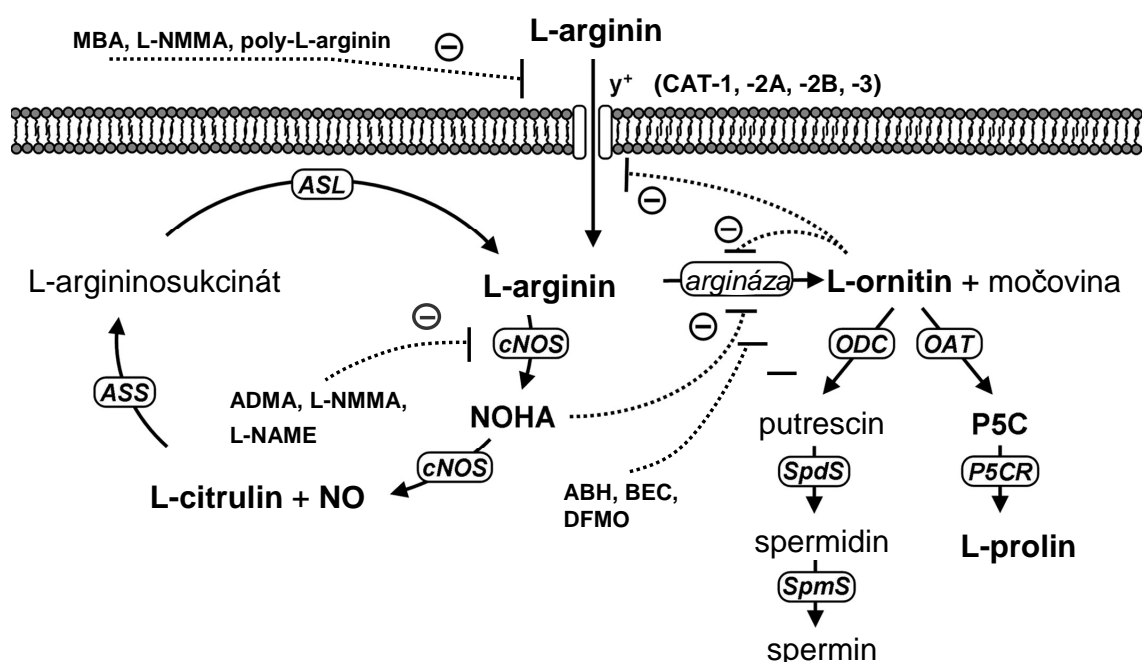
2.5. Význam metabolické dráhy arginin-oxid dusnatý v patogenezi plicních onemocnění

Metabolická dráha arginin-NO je v současnosti v popředí zájmu, protože její změny v podmínkách zánětu dýchacích cest se dávají do souvislosti s patofyziologickými projevy onemocnění, jako jsou bronchiální hyperreaktivita a přestavba dýchacích cest spojená se ztrátou elasticity a poklesem plicní funkce. Na regulaci množství NO v různých buňkách a tkáních v dýchacích cestách se společně podílejí mechanismy ovlivňující expresi a aktivitu NOS a argináz, syntézu L-Arg v játrech a ledvinách, transport L-Arg, dostupnost kalmodulinu, NADPH a tetrahydrobiopterinu a dále mechanismy ovlivňující přítomnost

inhibitorů příslušných enzymů. Obrázek 6 znázorňuje biochemickou dráhu arginin-oxid dusnatý, která ovlivňuje homeostázu argininu a NO (Maarsingh et al. 2008a).

Arginázy soutěží s NOS o substrát L-Arg a zejména za podmínek patologických stavů dýchacích cest, k nimž patří například zánět, mohou výrazně omezovat jeho dostupnost pro NOS. Přestože afinita argináz k L-Arg je mnohem nižší než je tomu v případě NOS (K_m v rozmezí 2-20 mM a 2-20 μ M), je možná efektivní kompetice o L-Arg mezi enzymy protože V_{max} argináz je ve srovnání s NOS naopak až 1000 vyšší.

Obrázek 6: Metabolická dráha arginin-NO.



Vysvětlivky: ABH...2(S)-amino-6-boronohehexanová kyselina; ADMA...asymetrický dimethylarginin; ASS...arginininosukcinát syntáza; ASL...arginininosukcinát lyáza; BEC...([S]-[2-boronoethyl]-L-cystein-HCl; cNOS...konstitutivní NOS; DFMO...difluoromethylornitin; L-NAME... methylester nitro-L-argininu; L-NMMA...L-monomethylarginin; NO...oxid dusnatý; NOHA...N-hydroxy-L-arginin; OAT...ornitin aminotransferáza; ODC...ornitin dekarboxyláza; P5C...pyrrolin-5-karboxylát; P5CR...pyrrolin-5-karboxylát reduktáza; SpdS...spermidin syntáza; SpmS...spermin syntáza. Volně upraveno dle (Maarsingh et al.2008a).

Kromě kompetice o substrát ovlivňují arginázy syntézu NO několika dalšími mechanismy jako jsou (Durante et al. 2007; Maarsingh et al. 2008b):

- zvýšení koncentrace zhášečů NO (superoxid a peroxodusitan)
- potlačení translace a snížení stability proteinu NOS
- přímá inhibice iNOS zvýšenou koncentrací močoviny
- zvýšení citlivosti NOS k endogenním inhibitorům (např. asymetrický dimethyl-L-Arg)

Metabolická přeměna L-Arg arginázami podléhá zpětnovazební kontrole produktem reakce L-ornitinem, který kompetuje s L-argininem o transportéry CAT a inhibuje arginázy. Je zajímavé, že meziproduct NOHA, vznikající při tvorbě NO, je silným inhibitorem argináz a naopak polyaminy inhibují NOS. To ukazuje na značnou propojenost obou dílčích metabolických reakcí a na četné vzájemné interakce mezi NOS a arginázami při regulaci metabolismu L-Arg a produkce NO. Na dostupnosti L-Arg se dále podílí jeho obnova z L-citrulinu za účasti enzymů argininsukcinát syntáza

a argininsukcinát lyáza. Celkově lze říci, že existuje křehká rovnováha mezi NOS a arginázami a jakýkoli zásah do této rovnováhy může ovlivnit pozitivně nebo negativně celou řadu procesů a ovlivnit symptomy onemocnění včetně astmatu/atopie, ALI/ARDS aj.

2.6. Možnosti farmakologického ovlivnění metabolické dráhy arginin-oxid dusnatý

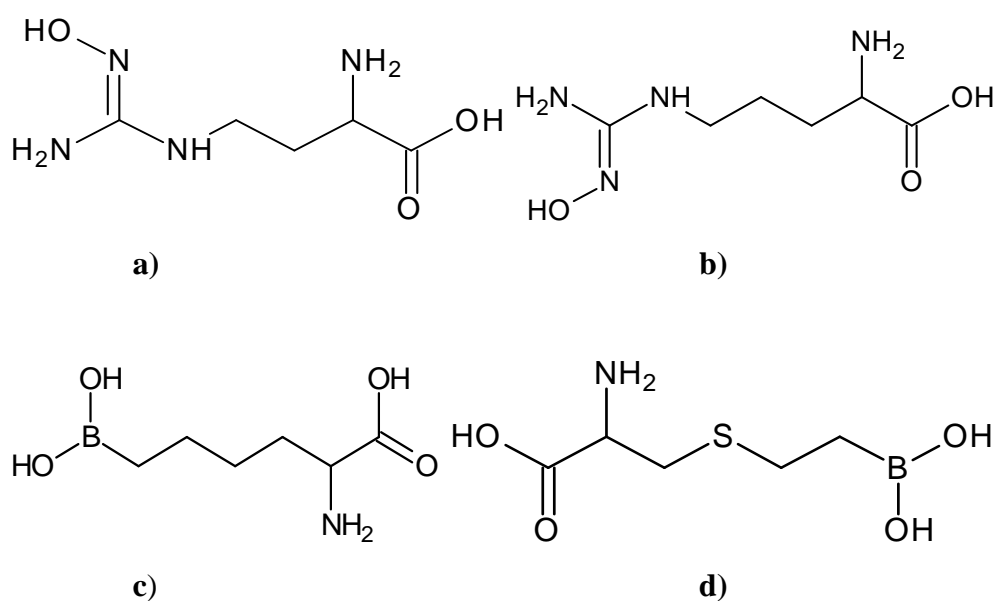
2.6.1. Inhibitory argináz

Inhibitory argináz lze rozdělit podle mechanismu inhibice na reverzibilní a ireverzibilní. Většina reverzibilních inhibitorů jsou analogy odvozené od L-argininu nebo jiných aminokyselin (Bagnost et al. 2010). Patří k nim N⁰-hydroxy-L-arginin (NOHA), N⁰-hydroxy-nor-L-arginin (norNOHA), S-(-2-boronoethyl)-L-cystein (BEC) nebo strukturně již poměrně odlišná 2(S)-amino-6-boronohexanová kyselina (ABH) (Obrázek 7). Mezi syntetické ireverzibilní inhibitory arginázy se řadí např. (+)-S-2-amino-iodoacetamidohexanová kyselina (2-AIHA), což je N⁰ derivát (+) lysinu. Nevýhodou tohoto inhibitoru je nefrotoxicita a hepatotoxicita, která byla prokázána na myším modelu. Nejjednodušším nekompetitivním inhibitorem argináz je fluoridový iont. K endogenním kompetitivním inhibitorům se řadí L-valin a L-ornitin. L-ornitin vzniká při reakci katalyzované arginázami a kompetitivně inhibuje jejich aktivitu (princip zpětnovazební inhibice). L-ornitin navíc inhibuje buněčný transport L-Arg. Většina výše zmíněných látek inhibuje ArgI i ArgII. Inhibitor BEC vykazuje vyšší afinitu k ArgII (Ash 2004) a ABH lze označit za vysoce selektivní inhibitor ArgII (Berkowitz et al. 2003; Colleluori et al. 2001). Mechanismus inhibičního účinku BEC spočívá ve vzniku přemostění dvou míst v molekule enzymu s hořčíkovým kationtem v každém z nich a tím znemožnění aktivace enzymu (Krotova et al. 2010). I některá léčiva mohou svými protizánětlivými účinky nepřímo ovlivňovat aktivitu argináz (NSAID, kortikosteroidy a statiny). Kortikosteroidy a statiny například blokují indukci ArgI v myši i lidské tkáni (Bagnost et al. 2010).

Z řady experimentů s inhibitory argináz provedených *in vivo* a *in vitro* vyplývá, že inhibice argináz vede ke snížení intenzity zánětu dýchacích cest a zároveň i snižuje jejich hyperreaktivitu. Berkowitz a spolupracovníci (Berkowitz et al. 2003) prokázali, že je mnohem výhodnější zvyšovat dostupnost L-Arg prostřednictvím inhibice argináz než jeho podáním. Inhibice argináz může být potenciálně přínosná v terapii řady onemocnění a patologických stavů jako astma, endoteliální dysfunkce při ateroskleróze a diabetu, ischemie myokardu, aj. (Bagnost et al. 2010).

Mezi středně silné kompetitivní inhibitory argináz patří endogenní látka NOHA, což je meziprodukt vznikající při syntéze NO z L-Arg (Ash 2004; Colleluori et al. 2001). Velmi účinným inhibitorem je syntetický analog norNOHA (Jung et al. 2010). NorNOHA je přibližně 40krát silnějším inhibitorem než NOHA. Na rozdíl od NOHA není norNOHA substrátem pro NOS a NO se z něho přímo netvoří. Podání norNOHA vedlo ke zvýšení koncentrace dusitanů a citrulinu (Tenu et al. 1999). Výhodou tohoto inhibitoru je nízká toxicita.

Obrázek 7: Vybrané inhibitory argináz



Vysvětlivky: a)...norNOHA (*N*^o-hydroxy-nor-L-arginin), b)...NOHA (*N*^o-hydroxy-L-arginin), c)...ABH (2(*S*)-amino-6-boronoheptanová kyselina) a d)...BEC *S*-(2-boronoethyl)-L-cystein)

Podávání norNOHA vedlo k potlačení hyperreaktivity dýchacích cest, zároveň ke snížení počtu eozinofilů v BAL, poklesu koncentrací IL-4, -5 a -13 a snížení histopatologického skóre zánětu (Takahashi et al. 2010). Inhibitor norNOHA snížil tvorbu kolagenu v potkaních a myších makrofázích, expresi a aktivitu argináz a utlumil symptomy alergie (Takahashi et al. 2010). V další práci byl účinek norNOHA kvalitativně podobný podávání L-Arg (Maarsingh et al. 2008b).

Někteří autoři soudí, že NOHA a norNOHA inhibují více lidskou ArgII než ArgI (Colleluori et al. 2001). Nevýhodou je, že inhibice argináz po jednorázovém podání norNOHA je krátkodobá (<2 hod) (Reid et al. 2007). Podrobné údaje o farmakokinetice a metabolismu norNOHA přinesly až výsledky studií organizovaných na našem pracovišti (Havlinova et al. 2013a; Havlínová et al. 2013b).

2.6.2. Inhibitory NOS a látky potlačující záněť

Preklinické i klinické studie usilující o snížení přítomnosti NO v dýchacích cestách v podmínkách chronického zánětu dýchacích cest podáním nespecifických inhibitorů NOS nebo látek selektivně inhibujících iNOS poskytly rozporuplné výsledky (Redington 2006). Nejednoznačnost těchto postupů farmakologického ovlivnění koncentrace a účinků NO odráží komplexnost, složitou souhru a přesnou lokalizaci biochemických dějů vedoucích k syntéze a uvolnění NO a na druhé straně také velmi krátký biologický poločas NO v důsledku rychlého metabolismu a depotní vazby ve formě nitrosothiolů v nízkomolekulárních thiolech a bílkovinách (Janero et al. 2004; Rassaf et al. 2002; Rodriguez et al. 2003). Neúspěch patrně spadá na vrub současné inhibice konstitutivních forem NOS snižující ochrannou úlohu NO, a to eNOS (NOS3, bronchodilatace, vazodilatace) a nNOS (NOS1, inhibiční neurotransmise, potlačení bronchiální hyperreaktivity). Existuje ale názor podložený výsledky preklinických studií, že konstitutivní formy NOS mohou zároveň přispívat více než iNOS k průniku eozinofilů do dýchacích cest při alergickém astmatu (Birrell et al. 2003; Eynott et al. 2002). Negativní závěry přinesla dvojité slepá placebem kontrolovaná studie s opakovaným podáváním látky GW271540 (specifický inhibitor iNOS) nemocným s průduškovým astmatem po dobu 14 dní. Inhibitor snížil koncentraci vydechovaného NO, ale nezpůsobil pokles bronchiální hyperreaktivity v testu s adenzinem, metacholinem a příčinným alergenem ani snížení počtu eozinofilů v brochoalveolární laváži (Singh et al. 2007).

Akutní poškození plic (ALI) a syndrom akutní dechové tísně (ARDS) jsou závažné patofyziologické stavy různé etiologie s vysokou morbiditou a mortalitou. Indukce iNOS

a masivní uvolnění NO jsou považovány za jeden z klíčových faktorů v patogenezi septického šoku s oběhovým selháním, hypoxémií a multiorgánovou dysfunkcí včetně ALI. Ve studii využívající geneticky modifikovaná zvířata (Kristof et al. 1998) a NOS inhibitory autoři prokázali, že zvýšení exprese iNOS a vysoké koncentrace NO hrají důležitou úlohu při rozvoji ALI indukovaného bakteriálním LPS (Mikawa et al. 2003). Zvýšená koncentrace produktů oxidace NO dusitanů a dusičnanů v tekutině z bronchoalveolární laváže koreluje se závažností ARDS u pacientů (Johannes et al. 2009; Yu et al. 2009). V návaznosti na poznatky o důležité úloze NO při rozvoji ALI/ARDS a v šokových stavech různé etiologie se objevila snaha snížit syntézu NO při těchto stavech inhibicí NOS (Cauwels 2007). Inhibitory NOS snižují hypotenzi při šoku vyvolanou LPS, a snižují koncentrace typických cytokinů TNF- α , IL-1 a IL-2. Nicméně už první studie s inhibitory NOS kromě pozitivních účinků ukázaly i účinky negativní (progresivní pokles srdečního výdeje, zhoršení orgánové dysfunkce, zvýšení mortality) (Cauwels 2007). Zásadní zlom do úvah o podávání inhibitorů NOS nemocným v septickém šoku přinesla rozsáhlá kontrolovaná klinická studie s neselektivním inhibitorem N-monomethyl-L-argininem, která byla předčasně ukončena po zaznamenání trendu k nárůstu mortality o 10 % oproti skupině s placebem (59 % vs 49 % při sledování po dobu 28 dní) (López et al. 2004). Jiná multicentrická kontrolovaná studie neprokázala vliv podání stejného inhibitoru na mortalitu u nemocných s kardiogenním šokem po infarktu myokardu (Alexander et al. 2007).

Mezi látky snižující expresi iNOS patří i pentoxifylin (PX) Pentoxifylin stejně jako ostatní xantinové deriváty je kompetitivní neselektivní inhibitor fosfodiesteráz (PDE). Působí protizánětlivě a podporuje imunitu. PX inhibuje expresi mezibuněčné adhezivní molekuly 1 (ICAM-1) a snižuje uvolňování rozpustné mezibuněčné adhezivní molekuly 1 (sICAM-1). Tím, že inhibuje PDE, zvyšuje intracelulární koncentraci cAMP vedoucí k aktivaci proteinkinázy A. V buňce je inhibována NF- κ B závislá transkripce genů kódujících prozánětlivé molekuly a snižuje se syntéza např.: TNF- α a iNOS. Dále působí PX proti aktivaci neutrofilů a zlepšuje mikrocirkulaci při orgánovém poškození (Aikawa et al. 2011; Deree et al. 2008; Lessa et al. 2008; Rolla et al. 1997; Zhang et al. 2010). U chronických endotoxemických modelů podávání PX výrazně snižuje plicní poškození (Coimbra et al. 2006; Kim et al. 2009b).

2.7. Experimentální modely plicních onemocnění

Experimentální modely, využívající malá laboratorní zvířata, představují nesmírně užitečný nástroj pro objasnění patogeneze akutních i chronických onemocnění plic a testování nových postupů a látek využitelných při jejich terapii. Je obecně známo, že tyto modely nevystihují všechny stránky patofyziologických dějů, průběh onemocnění a výsledky terapeutických zásahů tak, jak jsou popsány u pacientů (Zimmermann et al. 2006). Pro extrapolaci výsledků jsou spolehlivější modely využívající velká zvířata. To se týká zejména ALI/ARDS. S ohledem na problematiku řešenou v dizertační práci jsou v následujícím textu stručně popsány vlastnosti experimentálních modelů a jejich vzájemné srovnání s klinickými projevy průduškového astmatu a ALI/ARDS u nemocných.

2.7.1. Průduškové astma

Některé zvířecí druhy jsou přirozeně vnímavější vůči některým alergenům. U ovce na rozdíl od psa se spontánně rozvíjí i plicní složka alergického onemocnění, stejně jako u lidí. Také u koček se spontánně rozvíjí onemocnění dýchacích cest, které se svým charakterem nejvíce blíží perzistujícímu průduškovému astmatu u člověka. Ke spontánnímu rozvoji průduškového astmatu u malých laboratorních zvířat nedochází. U nejčastěji používaných druhů hlodavců (myš, potkan) a u morčete musí být přecitlivělost navozena opakovaným, většinou systémovým podáváním antigenů (ovalbumin, roztočové alergeny, alergeny domácího prachu, *Aspergillus fumigatus*, extrakty z ambrózie aj.) v rámci speciálních protokolů (de Boer et al. 2001).

Výsledky získané studiem modelů alergických zánětlivých onemocnění umožnily popsat migraci a aktivaci buněk zánětu infiltrujících dýchací cesty a účast strukturních buněk jako jsou endoteliální a epiteliální buňky a buňky hladké svaloviny aj. Byly odhaleny molekulární mechanismy alergického zánětu a mediátory, které se ho účastní a představují možný cíl pro farmakoterapii (Zimmermann et al. 2006). Například indukce iNOS a argináz byla pozorována na celé řadě zvířecích modelů používajících různé druhy/kmeny a různé vyvolávající podněty.

Tabulka 2 uvádí vlastnosti modelů využívajících malých laboratorních zvířat a jejich vzájemné srovnání s ohledem na charakteristiky průduškového astmatu u člověka. Obecně platí, že většina experimentálních *in vivo* modelů umožňuje studovat časnou a pozdní fázi akutní zánětlivé reakce dýchacích cest po expozici alergenem. Zvířecí modely obvykle nepostihují dobře chronickou fázi onemocnění, která odpovídá přirozené opakované

expozici alergenům a může u pacientů vést při neadekvátní léčbě ke strukturním změnám dýchacích cest (přestavba dýchacích cest). Bylo opakovaně popsáno, že při chronické expozici alergizovaných myší, potkanů a morčat alergenům se naopak obvykle rozvíjí tolerance (Kumar et al. 2002; Strickland et al. 2006). U zvířecích modelů kromě psa dále chybí hyperaktivita dýchacích cest na nespecifické stimuly, která u pacientů charakteristicky přetrvává v období týdnů až měsíců po akutní exacerbaci zánětu (Zosky et al. 2007).

2.7.2. ALI/ARDS

Ke studiu ALI/ARDS lze využít velkých laboratorních zvířat (prase, ovce, pes). Nejčastěji jsou ale využívána malá laboratorní zvířata (myš, potkan, králík, morče) a to přes mnohem obtížnější extrapolaci závěrů na podmínky u člověka. ALI/ARDS se indukuje různými postupy včetně výplachu plicního surfaktantu ohřátým fyziologickým roztokem někdy s přídavkem nízké koncentrace detergentu nebo např. podáním infuze kyseliny olejové do centrální žíly nebo do pravé síně přes femorální či plicní arteriální katetr. Nejčastěji se ale využívá LPS modelu. Podává se čištěný endotoxin izolovaný z *Escherichia coli* (serotypy O111:B4, O55:B5, O26:B6 a O127:B8), méně často endotoxin *Salmonella enteridis*, *Salmonella typhimuri* nebo *Pseudomonas aeruginosa* (Calkins et al. 2001; Harris et al. 2007; Wang et al. 2008).

Bakteriální endotoxin je hlavní komponentou vnější membrány gramnegativních bakterií, které jsou častým patogenem lidí a zvířat. LPS indukuje silnou imunitní odpověď zvířecího a lidského imunitního systému. Poté, co se LPS dostane do organismu, dochází k aktivaci CD14/TLR4/MD2 receptorového komplexu, který podporuje sekreci prozánětlivých cytokinů v celé řadě buněk, hlavně v makrofázích a B-lymfocytech. LPS aktivuje celou škálu transkripčních faktorů stimulujících syntézu řady mediátorů podílejících se na rozvoji septického šoku. LPS navozuje ALI/ARDS v plicích jednak přímým vlivem na endotel (syntéza cytokinů, adhezivních molekul a buněčných faktorů) a jednak svou schopností aktivovat chemotaxi, průnik a aktivaci buněk zánětu. LPS silně aktivuje alveolární makrofágy, lymfocyty a krevní destičky a je zodpovědný za nárůst koncentrací mnoha humorálních mediátorů. Mimo jiné silně indukuje iNOS v makrofázích a dalších buňkách (Hammermann et al. 2001; Wang et al. 2008; Yang et al. 2002).

Dávka LPS je odvislá od experimentálního druhu, cesty podání a stupně postižení, který je plánován. Např. ALI navozené intratracheálně podaným LPS je velmi intenzivní, především ve své buněčné složce. Použité dávky LPS se v literatuře velmi liší a to

v rozmezí od $\mu\text{g/kg}$ až po dávky mg/kg (Jansson et al. 2004; Krafft et al. 1996; Wang et al. 2008). Lidé jsou k intoxikaci LPS podstatně více vnímaví než ostatní savci. Dávka $1 \mu\text{g/kg}$ u lidí již indukuje vznik septického šoku na rozdíl od myší nebo potkanů, kteří jsou schopni tolerovat dávky 100 i vícekrát vyšší.

Tabulka 2: Vlastnosti experimentálních modelů využívajících malých laboratorních zvířat a jejich vzájemné srovnání s ohledem na charakteristiky průduškového astmatu u člověka.

Model	Výhody	Nevýhody
myš	<ul style="list-style-type: none"> a) snadná alergizace ovalbuminem nebo alergeny příčinnými u lidského astmatu b) výrazná T_H-2 buněčná odpověď, eozinofilie dýchacích cest c) vysoký titr specifických IgE protilátek d) podobné spektrum cytokinů (IL-4, -5 a -13) e) výrazná akutní bronchokonstrikce po provokaci příčinným agens f) výborná dostupnost protilátek pro molekulárně-biologické metody g) výborná dostupnost geneticky modifikovaných kmenů 	<ul style="list-style-type: none"> a) histologický obraz odpovídá spíše alergické alveolitidě b) myší eozinofily málo degranulují c) výrazné uvolňování serotoninu mastocyty d) nevýrazná nebo chybějící bronchokonstrikce při pozdní fázi akutní reakce e) používané postupy alergizace a provokace až na výjimky nevedou k rozvoji chronického astmatu a dlouhodobé bronchiální hyperreaktivita (tolerance na dlouhodobé podávání alergenů) f) problémy související s malou velikostí těla (operativa, odběr a objem vzorků, test plicní funkce)
potkan	<ul style="list-style-type: none"> a,b,c, d) podobné myšimu modelu ale výraznější rozdíly mezi kmeny (přírodně citlivý kmen Brown-Norway, rezistentní kmen např. Wistar) e) výrazná bronchokonstrikce v časně i pozdní fázi po provokaci příčinným agens f) přetrvávající nespecifická bronchiální hyperreaktivita g) vhodná velikost těla (operativa, odběr a objem vzorků, test plicní funkce) 	<ul style="list-style-type: none"> a) horší dostupnost protilátek pro molekulárně-biologické metody b) horší dostupnost geneticky modifikovaných kmenů c) tolerance na dlouhodobé podávání alergenů
morče	<ul style="list-style-type: none"> a,b,d) srovnatelné nebo lepší než u myší e) velmi výrazná bronchokonstrikce v časně i pozdní fázi po nespecifické i specifické bronchoprovokaci f) velmi citlivý druh vhodný na testování inhalovaných dráždivých chemikálií a testování kožní reaktivity na dráždivé látky g) vhodná velikost těla (operativa, odběr a objem vzorků, test plicní funkce) 	<ul style="list-style-type: none"> a) horší dostupnost inbredních kmenů b) špatná dostupnost protilátek pro molekulárně-biologické metody c) nedostupnost geneticky modifikovaných kmenů d) imunologické odchylky - alergická reakce zprostředkována IgG1 protilátkami e) tolerance na dlouhodobé podávání alergenů

3. Cíle práce

1. Vypracovat a charakterizovat následující experimentální modely:
 - a. model bakteriálním lipopolysacharidem indukovaného akutního poškození plic u potkana Wistar
 - b. model ovalbuminem indukovaného alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway
2. Na obou modelech studovat změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý v dýchacích cestách se zaměřením na:
 - a. vydechovaný oxid dusnatý
 - b. koncentraci metabolitů oxidu dusnatého (dusitany, dusičnany)
 - c. koncentraci argininu
 - d. genovou a proteinovou expresi syntáz oxidu dusnatého a argináz
 - e. genovou a proteinovou expresi membránových transportérů pro arginin
3. Posoudit možnosti farmakologického ovlivnění metabolické dráhy arginin-oxid dusnatý s cílem podpořit ochranné účinky oxidu dusnatého v podmínkách studovaných patofyziologických stavů s důrazem na farmakokinetiku a účinek inhibitorů argináz.

4. Přehled použitých metod

4.1. Experimentální modely a podmínky chovu

Pro model akutního bakteriálním lipopolysacharidem indukovaného poškození plic byli použiti potkani kmene Wistar SPF („*specific pathogen-free*“). Model alergického zánětu dýchacích cest indukovaného ovalbuminem byl vypracován na potkanech Brown-Norway, přirozeně vnímavějších k alergizaci. Ve studiích použítá zvířata byla chována v PVC klecích na dřevěných, prachu prostých hoblinách v klimatizovaných místnostech za kontrolovaných podmínek: 12 hodinový světelný cyklus, 50–60% vlhkost, teplota 22 ± 2 °C. Zvířata měla neomezený přístup k vodě a byla krmena komerčně dostupnou dietou *ad libitum*. Všechny experimenty byly prováděny pod dohledem etické komise Lékařské fakulty v Hradci Králové.

4.1.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana kmene Wistar

Pro vytvoření LPS modelu byli použiti dospělí samci potkana Wistar SPF o hmotnosti 245 ± 33 g (Biotest s.r.o., Konárovice, Česká Republika). Zvířata byla náhodně rozdělena do skupin podle způsobu aplikace LPS. Potkanům bylo intraperitoneálně (*i.p.*) nebo intratracheálně (*i.t.*) podáno 5 mg/kg LPS (*Escherichia Coli*, serotyp O55:B5, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika). Kontrolním skupinám byl stejnou cestou podán fyziologický roztok (FR). Experiment byl ukončen za 3 h, 6 h nebo 24 h *i.p.* podáním 50 mg/kg pentobarbitalu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vykrvením z bifurkace *v. cava* do odběrového systému S-Monovette (EDTA K3E, Sarsted Monovette, Nümbrecht, Německo). Po vykrvení byla provedena bronchoalveolární laváž (BAL) celkovým objemem 10 ml chladného sterilního fyziologického roztoku rozděleného na dvakrát 3 ml a jednou 4 ml. Všechny tři vzorky byly na závěr spojeny do jednoho objemu.

V krvi byl stanoven celkový počet buněk za použití Bürkerovy komůrky. Dále byl v krevním nátěru pomocí světelného mikroskopu a barvení roztokem Giemsa-Romanowski (Penta, Praha, Česká Republika) stanoven diferenciální rozpočet bílých krvinek.

Zbýlý objem krve a tekutina z BAL byly centrifugovány po dobu 10 min při 1 800 g a 4 °C. Plazma a supernatant z BAL byly až do doby analýzy uchovávány při -80 °C.

K buněčnému sedimentu z BAL bylo přidáno 20 μ l supernatantu a 10 μ l suspenze bylo použito k určení celkového počtu buněk a zbytek pro zhotovení nátěru a diferenciální rozpočet buněk v BAL.

Plíce a játra byly ihned po vyjmutí opláchnuty ve chladném fyziologickém roztoku (4 °C) a po osušení ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -80 °C.

Rozdělení do experimentálních skupin:

- 1) intraperitoneální podání LPS: *i.p.* podání 5 mg LPS v 1 ml FR na 1 kg hmotnosti v čase 0 hod Ukončení experimentu za 3, 6 nebo 24 hod.
- 2) intratracheální podání LPS: *i.t.* podání LPS v dávce 5 mg/kg nebo FR (1 ml/kg) v čase 0 hod, podání pentoxifylinu (PX) v dávce 25 mg/kg v čase 0 a 2 hod nebo FR ve stejných časech. Ukončení experimentu v čase 6 hod.

Tabulka 3: Přehled experimentálních skupin: akutní poškození plic indukované LPS.

označení skupiny	aplikovaná látka	ukončení
LPS <i>i.p.</i> 3 h	LPS 5 mg/kg	3 h
FR <i>i.p.</i>	FR 1 ml/kg	3, 6, 24 h*
LPS <i>i.p.</i> 6 h	LPS 5 mg/kg	6 h
LPS <i>i.p.</i> 24 h	LPS 5 mg/kg	24 h
LPS <i>i.t.</i>	LPS 5 mg/kg, dvakrát FR 1ml/kg	6 h
LPS+PX <i>i.t.</i>	LPS 5 mg/kg, dvakrát PX 25 mg/kg	6 h
FR <i>i.t.</i>	FR 1 ml/kg, dvakrát FR 1ml/kg	6 h
FR+PX <i>i.t.</i>	FR 1 ml/kg, dvakrát PX 25 mg/kg	6 h

*Vysvětlivky: *...výsledky v kontrolních skupinách nevykazovaly změny v čase a byly sloučeny do jedné skupiny*

4.1.2. Model ovalbuminem navozeného alergického zánětu u potkana kmene Brown Norway

K vytvoření tohoto modelu byli použiti samci kmene Brown Norway (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Německo) ve stáří 2–3 měsíce a o tělesné hmotnosti 236 \pm 32 g. Zvířata byla náhodně rozdělena do tří skupin: kontrolní skupina (K), skupina alergizovaných potkanů (A) a skupina alergizovaných a následně provokovaných potkanů (A+P) tabulka 4. Potkani zařazení do skupiny A+P byli alergizováni podáním 5 mg OVA (Albumin from chicken egg white, Grade V, Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika) v kombinaci s Al(OH)₃ (c=13 mg/ml, Sigma-Aldrich, Praha, Česká

Republika) a FR (B|Braun, Praha, Česká Republika). Následně byla provedena provokace nebulizačním podáním 1% roztoku OVA podle tabulky 5 za použití ultrazvukového inhalátoru MIKRON 2000 (R.T.E. s.r.o., Praha, Česká Republika). Potkani ze skupiny K a A byli podrobena stejnému schématu alergizace a provokace jako potkani ze skupiny A+P. Potkanům ze skupiny K byla aplikována směs $\text{Al}(\text{OH})_3$ ($c=13 \text{ mg/ml}$) rozpuštěná ve sterilním FR, poté následovalo nebulizační podání FR namísto 1% roztoku OVA. Potkani ze skupiny A byli alergizováni stejně jako potkani ze skupiny A+P, provokace byla nebulizačním podáním FR.

Za 24 hod od provokace byli potkani uspání i.p. podáním 50 mg/kg pentobarbitalu sodného (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po té byli potkáni usmrceni vykvrvením z bifurkace v.cava, následovala broncoalveolární laváž (BAL) 10 ml chladného sterilního fyziologického roztoku (objem byl rozdělen na 2x3 ml a 1x4 ml). Po ukončení odběru BAL byly odebrány játra a plíce. Orgány byly ihned po vyjmutí opláchnuty ve fyziologickém roztoku (4 °C), osušeny, zamrazeny v tekutém dusíku a do dalšího zpracování byly uloženy v -80 °C. 10 μl plné krve bylo použito k určení celkového počtu buněk v Bürkerově komůrce a kapka plné krve byla využita ke zhotovení nátěru. Poté byla plná krev i BAL stočeny při 1 800 g po dobu 10 min v chlazené centrifuze na 4 °C. Buněčná peleta z BAL byla resuspendována 20 μl supernatantu. 10 μl resuspendované pelety bylo použito k určení celkového počtu buněk v Bürkerově komůrce. Ze zbytku resuspendované pelety byl zhotoven nátěr pro diferenciální rozpočet. Plazma a BAL byly do dalšího zpracování uchovávány při -80 °C.

Tabulka 4: Přehled experimentálních skupin: model alergického zánětu dýchacích cest indukovaného ovalbuminem.

označení	aplikovaná látka	poznámka
A+P	5 mg OVA + 100 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ + 1 ml FR	alergizace ovalbuminem
A	5 mg OVA + 100 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ + 1 ml FR	alergizace ovalbuminem
K	1 ml FR + 100 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$	kontroly
A+P	1% OVA	provokace ovalbuminem
A	FR	kontroly
K	FR	kontroly

Tabulka 5: Schéma alergizace a provokace ovalbuminem (OVA).

den studie		cesta podání	aplikované množství
1	alergizace	intraperitoneální	5 mg v 1 ml/zvíře
4	alergizace	intraperitoneální	5 mg v 1 ml/zvíře
9	alergizace	subkutánní	5 mg v 0,5 ml/zvíře
11	alergizace	intraperitoneální	5 mg v 1 ml/zvíře
14	alergizace	subkutánní	5 mg v 0,5 ml/zvíře
15	alergizace	intraperitoneální	5 mg v 1 ml/zvíře
16	provokace	nebulizační	15 min 1% OVA
17	provokace	nebulizační	15 min 1% OVA
18	provokace	nebulizační	15 min 1% OVA
19	provokace	nebulizační	15 min 1% OVA
20		ukončení	

4.2. Farmakokinetické studie s inhibitorem argináz N^o-hydroxy-nor-L-argininem (norNOHA)

Byly provedeny dvě farmakokinetické studie. První byla studie farmakokinetiky norNOHA v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg podaných jednorázově jako bolus třemi cestami a to *i.v.*, *i.p.* a *i.t.* Druhá studie srovnala farmakokinetiku norNOHA v dávce 30 mg/kg podávané jednou denně *i.p.* po dobu 5 dní (den 5) s kinetikou po první dávce (den 1). V první studii byli použiti potkani kmene Brown-Norway obou pohlaví o hmotnosti 190-280 g. Studované cesty podání odpovídaly zamýšlenému využití inhibitoru argináz jako úlevového bronchodilatancia a bronchoprotektiva (snížení bronchiální hyperreakivity) podaného především inhalační cestou za účelem zvýšení lokální produkce NO konstitutivními syntázami cNOS. Ve druhé studii byli použiti samci potkana Wistar o hmotnosti 240-300 g. Zájmem studie bylo především posoudit, zda se při opakovaném systémovém podávání nemění farmakokinetika norNOHA například indukcí metabolismu nebo změnami ledvinné clearance.

Navážka norNOHA byla rozpuštěna ve sterilním fyziologickém roztoku. Podání *i.v.* jako bolus bylo provedeno do *v.saphena*. V případě *i.p.* podání směřovala injekce do horního kvadrantu hypogastria. Při podání *i.t.* cestou se jednalo o aplikaci aerosolu s velikostí částic 8-30 μm (údaj výrobce) pomocí speciálního katetru s nebulizační keramickou porézní špičkou MicroSprayer aerosolizer (PennCentury, Glenside, PA, USA).

Opakované odběry plné krve před zahájením a v průběhu farmakokinetické studie byly prováděny z kanyly v *a. carotis*. Po každém odběru bylo odebrané množství krve

nahrazeno příslušným objemem sterilního fyziologického roztoku. Po celou dobu odběrů vzorků krve na stanovení norNOHA byli potkani v pentobarbitalové narkóze (50 mg/kg *i.p.* podání) a tělní teplota potkanů byla udržována na 37 ± 1 °C. Aby byl celkový objem odebrané krve v experimentu trvajícím maximálně 120 min limitován objemem 2,5 ml při současném nahrazování odebrané krve fyziologickým roztokem, byli potkani randomizováni do dvou skupin s odlišnými odběrovými intervaly. Naměřené koncentrační údaje byly z tohoto důvodu vyhodnoceny metodami populační farmakokinetické analýzy. Po posledním odběru byl potkan usmrcen vykrvením z bifurkace *v. cava*.

4.3. Vyšetřovací metody

4.3.1. Vydechovaný oxid dusnatý

K vyšetření koncentrace NO byl využit chemiluminiscenční analyzátor CLD88sp (Eco Medics AG, Duernten, Švýcarsko). Principem měření je chemická reakce NO s ozonem, při které vznikají vyšší oxidy dusíku, které emitují záření ve viditelné oblasti spektra (chemiluminiscence) detekované fotonásobičem. Dynamický rozsah přístroje je 0,1 až 1000 ppb NO („*parts per billion*“). Při vyšetření byl potkan umístěn do hermeticky uzavřené plastové komory o objemu 3 l, která byla před měřením naplněna vzduchem zbaveným NO. Po 10 minutách byl otevřen ventil spojující komoru s nasávací kanylou analyzátoru a koncentrace NO byla stanovena ve vzorku vzduchu v komoře.

Obrázek 8: Měřicí komora na neinvazivní vyšetření vydechovaného NO a chemiluminiscenční analyzátor NO.



4.3.2. Dusitany a dusičnany v plazmě a BAL

Ke stanovení byla po úpravě použita HPLC metoda publikovaná jinými autory (Woitzik et al. 2001). Dusičnany byly před stanovením nejprve enzymaticky redukovány na dusitany pomocí nitrát reduktázy (enzym z *Aspergillus niger*, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika). K 20 μl vzorku bylo přidáno 7,5 μl suspenze nitrát reduktázy a 6 μl roztoku NADPH (0,3 mg v 2,7 ml H_2O). Vzorky byly inkubovány 45 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po enzymatické redukci následovala derivatizace dusitanů

2,3-diaminonaftalenem (DAN, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) za vzniku naftotriazolu. Ke vzorku bylo přidáno 120 μl roztoku DAN (31,6 μM) a vzorky byly inkubovány 10 min ve tmě při laboratorní teplotě. Po poslední inkubaci bylo k vzorkům přidáno 300 μl NaOH (0,1 M) pro zastavení reakce. Naftotriazol byl poté stanoven HPLC metodou s fluorescenční detekcí na systému Shimadzu 10 (Kyoto, Japonsko) Separace probíhala na koloně Gemini Nx 150/4,6 mm se sorbentem C18 o velikosti 5 μm a pórech 110A (Phenomenex, Torrance, USA). Průtok mobilní fáze (70:30, v:v, acetonitril:20 mM borátový pufr o pH 8,7) byl 1 ml/min. Fluorescenční detektor byl nastaven na excitační vlnovou délku $\lambda_{\text{ex}}=365$ nm a emisní vlnovou délku $\lambda_{\text{em}}=425$ nm.

4.3.3. Malondialdehyd v plazmě a BAL

Pro vlastní stanovení malondyaldehydu (MDA) v plazmě a BAL byla využita modifikovaná HPLC metoda dle (Pilz et al. 2000). Před vlastním stanovením byl vzorek o objemu 250 μl nejprve 30 min inkubován s 50 μl 6 M NaOH při teplotě 60 °C. Po ochlazení inkubační směsi následovala deproteinace přidávkem 125 μl 35% (v/v) HClO_4 . Poté byly vzorky centrifugovány 10 min při 9 400 g a 4 °C. K 250 μl supernatantu bylo přidáno 25 μl derivatizačního činidla 2,4-difenyldiazinu (5 mM) a vzorky byly 10 minut inkubovány ve tmě. Vzniklá látka 1-(2,4-dinitrofenyl) pyrazol byl stanoven HPLC metodou s UV/VIS detekcí. Stanovení probíhalo na systému Agilent 1200 series (Santa Clara, Kalifornie, USA). K separaci byla využita kolona EC Nucleosil C₁₈, 125x4,6 mm, 5 μm (Macherey-Nagel, Düren, SRN) s předkolonkou CC Nucleosil C₁₈ 8x4 mm/5 μm (Macherey-Nagel, Düren, SRN) temperovaná na 30 °C. Mobilní fáze (MF) byla směs acetonitril:voda:kyselina octová v objemovém poměru 380:620:2 (pH 3,4). Rychlost průtoku kolonou byla 1 ml/min. UV/VIS detekce probíhala při $\lambda=310$ nm.

4.3.4. Stanovení N^o-hydroxy-nor-L-argininu (norNOHA) a argininu v plazmě

Koncentrace norNOHA a argininu v plazmě a BAL byla stanovena originální HPLC metodou vyvinutou pro účely studie (Hroch et al. 2012).

K přípravě vzorku před analýzou byla použita SPE extrakce. K 200 μ l vzorku plazmy nebo 1000 μ l vzorku BAL byl přidán vnitřní standard N-monoethylarginin (50 μ l, 1 mM) a 600 μ l roztoku fosfátového pufru (50 mM, pH 7,4). Takto upravený vzorek byl podroben SPE extrakci na kolonkách Waters Oasis MCX 1 ml (30 mg, Waters, Praha, Česká Republika). Kolonka byla připravena promytím 2 ml metanolu a 2 ml MilliQ vody. Po nanesení vzorku následovalo promytí 1 ml 0,1 M HCl a 1 ml metanolu. Eluční činidlo (1 ml) obsahovalo 1 M octan draselný, MilliQ vodu a metanol v objemovém poměru 20:20:60. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku do sucha při 35 °C. Odparek byl rozpuštěn ve 200 μ l MilliQ vody a přepipetován do vialky autosampleru.

Při experimentech byl využit HPLC systém Agilent 1200 series. Separace probíhala na koloně Kinetex C18 core-shell column 100 mm \times 3 mm ID, 2.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), chráněné předkolonovým filtrem CrudCatcher Ultra In-Line Filter 0,5 μ m Porosity x 0.004 (Phenomenex, Torrance, USA). Teplota na koloně byla 50 °C. Předkolonová derivatizace byla prováděna automaticky analyzátozem. V dávkovací smyčce přístroj smíchal 1,5 μ l vzorku a 1,5 μ l derivatizačního činidla (15 mM orthoftaldialdehyd). Detekce byla fluorescenční s excitační vlnovou délkou λ_{EX} =235 nm a emisní vlnovou délkou λ_{EM} =450 nm. Eluce stanovovaných látek byla gradientová. Byly míchány složky A (MF A, Milli-Q voda upravená kyselinou mravenčí na pH 3) a B (MF B, metanol) podle tabulky 6. Průtok mobilní fáze byl konstantní (0,75 ml/min).

Tabulka 6: Gradient mobilní fáze použitý při stanovení derivátu norNOHA.

časový interval (min)	složení mobilní fáze
0,0– 8	lineární gradient 5–27 % MF B MF B
8,0– 9,5	60 % MF B
9,5–12	5 % MF B

Vysvětlivky: binární gradient, MF A: Milli-Q voda upravená kyselinou mravenčí na pH 3, MF B: metanol

4.3.5. Spektrum aminokyselin v plazmě

Spektrum aminokyselin ve vzorcích plazmy bylo stanoveno komerčně dodávanou HPLC metodou s fluorescenční detekcí využívající předkolumnovou derivatizaci (AccQ tag kit Waters, Milford, MA, USA) (Reverter et al. 1997). Stanovení provedl Ing. Luděk Šišpera CSc. z Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

4.3.6. Celková bílkovina v BAL

Ke stanovení celkové bílkoviny v BAL byla použita komerčně dostupná metoda *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Jedná se o spektrofotometrické stanovení modrofialových komplexů ($\lambda=562$ nm) mezi ionty Cu^+ a kyselinou bicinchoninovou po redukci Cu^{2+} v alkalickém prostředí za přítomnosti peptidické vazby v proteinech. Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno 40 μl vzorku BAL a 180 μl pracovního činidla připraveného dle návodu. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C. Poté byla odečtena absorbance na přístroji Microplate Reader Model 680 (BioRad Laboratories Inc., Praha, Česká Republika).

4.3.7. Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v BAL a v krvi

Před vlastním stanovením celkového počtu leukocytů byly nejprve vzorek plné krve nebo vzorek suspenze vzniklé rekonstituováním buněčné pelety BAL naředěny Türkovým roztokem (1 ml kyseliny octové, 1 ml 1% roztoku genciánové violeti, 98 ml destilované vody) v poměru 1:20. Poté byly počítány buňky v 50 středních čtvercích Bürkerovy komůrky. Pro počítání byl využit světelný mikroskop B3 (Fisher Scientific, Pardubice, Česká Republika) s okulárem WF 10X (din/18MM) a objektivem 40/0,65 (160/0,17).

Buněčný nátěr byl proveden z kapky resuspendované pelety nebo plné krve. Po zaschnutí nátěru (asi 24 hod) byly nátěry na sklíčku zafixovány ponořením do metanolu na 5 min v případě nátěru z plné krve, v případě nátěru z BAL probíhala fixace pouze po dobu několika sekund. Po fixaci byly nátěry obarveny v roztoku Giemsa-Romanowski (Penta, Praha, Česká Republika) naředěného 1:9 MilliQ vodou. Nátěr z BAL byl barven po dobu 5 min., nátěry zhotovené z plné krve po dobu 15 min. Po obarvení byly preparáty několikrát opláchnuty v MilliQ vodě. Po zaschnutí obarveného nátěru byl proveden diferenciální rozpočet za použití imerzního oleje pro mikroskopii (Carl Roth GmbH+CO.KG, Karlsruhe, Německo) světelného mikroskopu B3 (Fisher Scientific,

Pardubice, Česká Republika) a s okulárem WF 10X (din/18MM) a imerzním objektivem objektivu 100/1,25 (160/0,17). Počet buněk pro diferenciální rozpočet byl 100 buněk na každý preparát. V nátěrech byly počítány neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, lymfocytů a makrofágů.

4.3.8. Sledování exprese proteinů (Western blot)

Tkáně byly homogenizovány na ledu pomocí homogenizátoru Ultra turrax (ULTRA-THURAX, Ika, Staufen, SRN) třikrát na stupeň 4 a poté třikrát pomocí ultrazvukového homogenizátoru UP 100H (cyklus 0,5, amplituda 80, Hielscher, Teltow, SRN). Vzorek tkáně o hmotnosti 5 g byl zhomogenizován v pětinasobném objemu (w/v) studeného homogenizačního pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X (v/v), 1 mM DTT a PMSF, 10 mg/l aprotinin, pepstatin-A a leupeptin, pH 7,4). Homogenát byl centrifugován 10 min při 250 g a teplotě 4 °C. Získaný supernatant byl ultracentrifugován po dobu 30 minut při 19 000 g a 4 °C. Po ultracentrifugaci byl supernatant uchovávan při -80 °C. Supernatant získaný homogenizací (100 µg proteinu na jamku) byl separován v SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu. 10% pro arginázu I, II a β-aktin a 6,25% pro stanovení eNOS a iNOS. Po separaci v gelu byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (BioRad Laboratories Inc., Praha, Česká Republika). Po přenosu byla membrána ponechána za mírného míchání po dobu 1. hod v 5% roztoku odtučněného mléka v pufru Tris s přísávkem 0,1% Tween 20 (TBST) z důvodu blokace zbylých volných vazebných míst laktoglobuliny. Po promytí v TBST byla membrána inkubována s primární protilátkou po dobu 1,25 hod při laboratorní teplotě (tabulka 7). Po odstranění přebytečné primární protilátky promytím v roztoku TBST následovala inkubace s příslušnou sekundární protilátkou po dobu 1,25 hod opět za laboratorní teploty. Po vymytí membrány v TBST byla provedena detekce pomocí chemiluminiscenčního činidla (ECL kit, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg Německo). Snímek získaný expozicí na film (Hyperfilm, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg Německo), byl po naskenování (ScanMaker i900, UMAX, Willich, Německo, Česká Republika) dále kvantifikován za použití programu QuantityOne (BioRad Laboratories Inc., Praha, Česká Republika).

Tabulka 7: Seznam použitých protilátek

antigen	ředění PP	ředění a druh SP	dodavatel
argináza I	1:2000	1:2000 (anti-mouse)	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
argináza II	1:800	1:2000 (anti-rabbit)	Abcam (Cambridge, UK)
iNOS	1:1000	1:2000 (anti rabbit)	Cayman (neratovice, ČR)
eNOS	1:1000	1:2000 (anti-rabbit)	Abcam (Cambridge, UK)
β-aktin	1:5000	1:8000 (anti-mouse)	Sigma Aldrich (Praha, ČR)

Vysvětlivky: PP...primární protilátka; SP...sekundární protilátka; iNOS...indukovatelná syntáza oxidu dusnatého; eNOS...endoteliální syntáza oxidu dusnatého.

4.3.9. Sledování exprese mRNA (qRT-PCR)

Analýza genové exprese byla provedena metodou qRT-PCR s využitím systému Applied Biosystem 7500 HT Fast Real- Time PCR systém (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) RNA byla z homogenátu vzorku tkání izolována pomocí komerčně dodávaného RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Holandsko). K homogenizaci plicní a jaterní tkáně byl použit automatický homogemogenizátor MagNA lyser (Roche, Basel, Švýcarsko). Tkáně byly homogenizovány za pomoci skleněných kuliček o průměru 1,2 mm v RTL pufru (součást soupravy RNeasy Mini Kit). V případě jaterní tkáně byly použity dva homogenizační cykly 15 s při 6 500 rpm. Pro plicní tkáň bylo nutné homogenizační cyklus opakovat třikrát. K přepsání RNA do cDNA byl použit komerčně dodávaný Hig Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). Teplotní program byl následující: 25 °C po dobu 10 min, 32 °C po dobu 2 hod, 85 °C po dobu 3 s, ochlazení vzorků na 4 °C. Do reakce probíhající v duplikátu bylo použito 30 ng cDNA. Pro amplifikaci templátu byl použit TaqMan®Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) a Taq-Man® Gene Expression Assay mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) pro daný gen (tabulka 8). Jako endogenní kontrola byla použita GPDH (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). Použitý teplotní program byl: 1 cyklus 95 °C po dobu 3 min, 40 cyklů 95 °C po dobu 10 s, 60° C po dobu 30 s.

K relativní kvantifikaci genové exprese byla použita metoda $\Delta\Delta C_t$. Jedná se o jednoduchý aritmetický model, jehož základním předpokladem je stejná efektivita amplifikace cílového (*target*) a referenčního (*housekeeping*) genu. Výpočet poměru množství cílového genu vůči genu referenčnímu:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

kde: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ testovaného vzorku – ΔCt kontrolního vzorku, ΔCt testovaného vzorku = Ct cílového (*target*) genu – Ct referenčního (*housekeeping*) genu.

Tabulka 8: Použité geny.

cílový gen	název	ID genu
ArgI	arginase, liver	Rn00567522_m1
ArgII	arginase type II	Rn00569814_m1
iNOS	nitric oxide synthase 2, inducible	Rn00561646_m1
eNOS	nitric oxide synthase 3, endothellia cell	Rn02132634_s1
CAT1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Rn00565399_m1
CAT2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	Rn01488325_m1
CAT3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3	Rn00500256_m1
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Rn01775763_g1

4.4. Farmakokinetická a statistická analýza

Nekompartmentovou farmakokinetickou analýzou byly vyhodnoceny profily průměrných koncentrací po sloučení dat od zvířat v každé experimentální skupině. Byl použit program Kinetica verze 4.0 (InnaPhase Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA). Populační farmakokinetická analýza metodou nelineárního modelování současného vlivu definovaných a náhodných faktorů byla provedena v programu Monolix, verze 4 (zdroj: <http://wfn.software.monolix.org>).

Při statistickém hodnocení získaných dat bylo nejdříve zohledněno jejich rozložení. Pokud se výrazně lišilo od gausovského rozložení, byla analýza provedena analýzou rozptylu (ANOVA) po logaritmické transformaci dat. Pokud rozložení odpovídalo gausovskému, byl použit t-test a při vzájemném srovnávání tří a více experimentálních skupin ANOVA. Testování bylo provedeno na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Pro statistické zpracování byly použity programy Statistica 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), GraphPad Prism, verze 5.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) a SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., Erkhart, Germany).

5. Výsledky

5.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana Wistar

5.1.1. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu

Časový průběh koncentrace exhalovaného NO.

Po podání 5 mg/kg LPS *i.p.* došlo již ve druhé hodině k signifikantnímu nárůstu koncentrace eNO. Nárůst kulminoval v intervalu mezi 6. a 8. hodinou po podání, kdy střední hodnota poměru eNO k výchozí hodnotě před podáním LPS činila 42 a 44. Statisticky významné rozdíly mezi LPS a kontrolní skupinou byly zaznamenány ve všech časových intervalech během prvních 24 hod po podání (Graf 1). Hodnoty eNO ve 2. a 24. hodině byly srovnatelné a zvýšené oproti výchozí hodnotě 5,6krát. Za 48 h se koncentrace eNO vrátila na výchozí hodnotu, jak ukázalo sledování u dvou dalších potkanů (1,2 a 1,9 ppb před podáním LPS a 1,3 a 1,2 ppb po 48 hod).

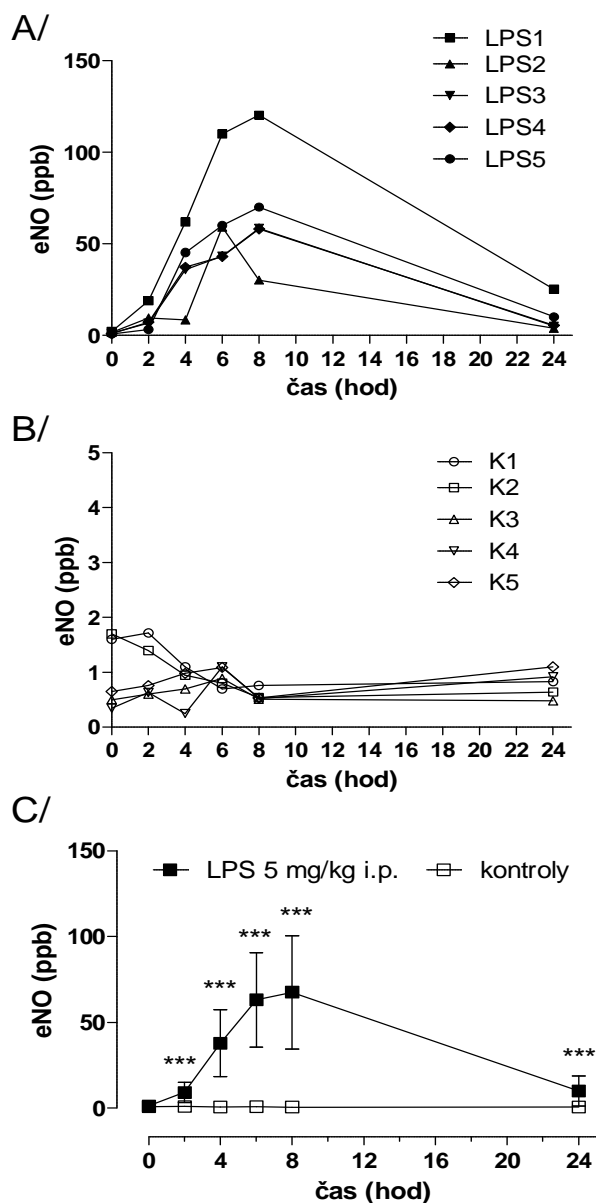
Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.

Analýza koncentrací dusitanů a dusičnanů ve vzorcích BAL byla nejdříve prováděna odděleně. Použitá metoda kvantifikuje dusitany bez redukce dusičnanů a po jejím provedení. Koncentrace dusičnanů se vypočítá jako rozdíl. Tento postup ukázal, že koncentrace dusičnanů jsou vyšší v průměru 20krát (v kontrolní skupině) a 40krát (v LPS skupině) než koncentrace dusitanů. Podobně i ve vzorcích plazmy byl průměrný poměr koncentrací dusičnanů a dusitanů výrazně odlišný v kontrolní skupině (poměr 4,7 v 6. hod po podání FR) a LPS skupině (poměr 48 v 6. hod po podání LPS). Vzhledem k nestabilitě dusitanů v silně pro oxidativním prostředí je možné předpokládat, že dusitany byly z větší části oxidovány na dusičnany *in vivo*. Z tohoto důvodu byla dále prováděna pouze analýza po redukci dusičnanů a hodnocena tak byla celková koncentrace NO_x, tedy součet koncentrací dusičnanů a dusitanů ve vzorcích plazmy a BAL.

Po *i.p.* podání LPS došlo k výraznému nárůstu koncentrace NO_x v BAL i plazmě (Graf 2A a 2B). Koncentrace NO_x v BAL byla vyšší v intervalu 24 hod od aplikace LPS než po 6 hodinách. V průměru došlo ke 4,4násobnému (24 hod) a 2,8násobnému nárůstu

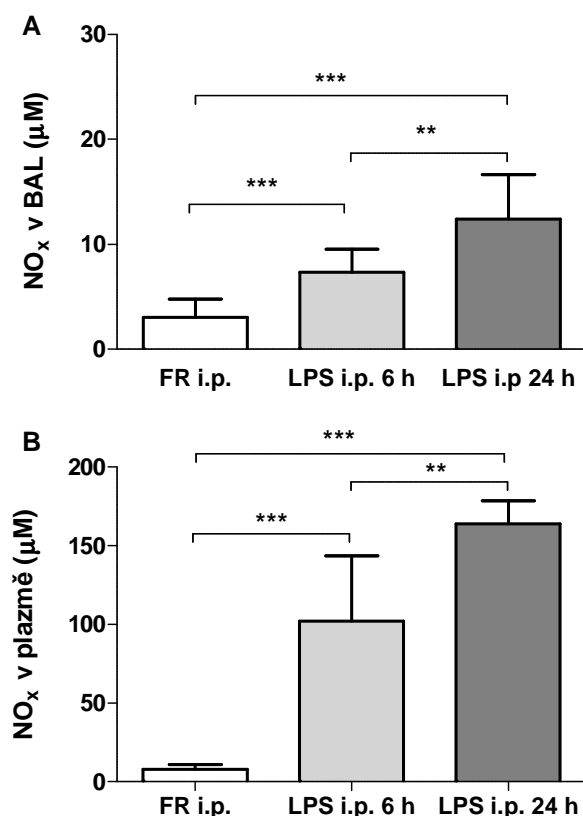
NO_x (6 hod). V plazmě se hodnota NO_x zvýšila v průměru 14krát (6 hod) a 23krát (24 hod), tedy podstatně více než v BAL. Byl zřejmý časový posun indukce NO_x směrem k pozdějším intervalům po podání oproti koncentraci eNO, která kulminovala v intervalu 6-8 hodin.

Graf 1: Vliv LPS na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého (eNO). A/ Individuální profily ve skupině LPS (5 mg/kg LPS *E. coli*, *i.p.*) a B/ v kontrolní skupině (*i.p.* injekce fyziologického roztoku) a C/ průměrné (\pm SD) koncentrace v obou skupinách.



Vysvětlivky: Statistická významnost rozdílů mezi LPS a kontrolní skupinou *** $p < 0,001$

Graf 2: Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 11-14 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

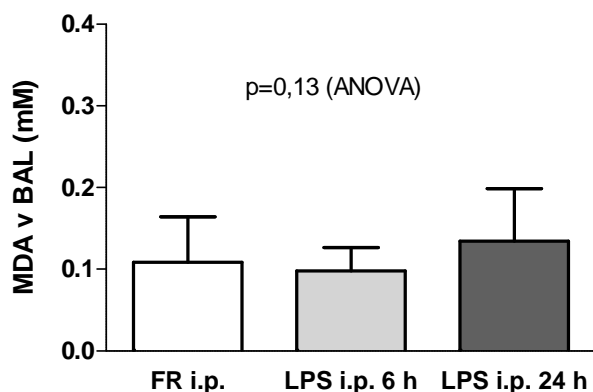
Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže.

V BAL nebyly po podání LPS v dávce 5 mg/kg *i.p.* pozorovány změny koncentrace MDA oproti kontrolní skupině (Graf 3).

Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže.

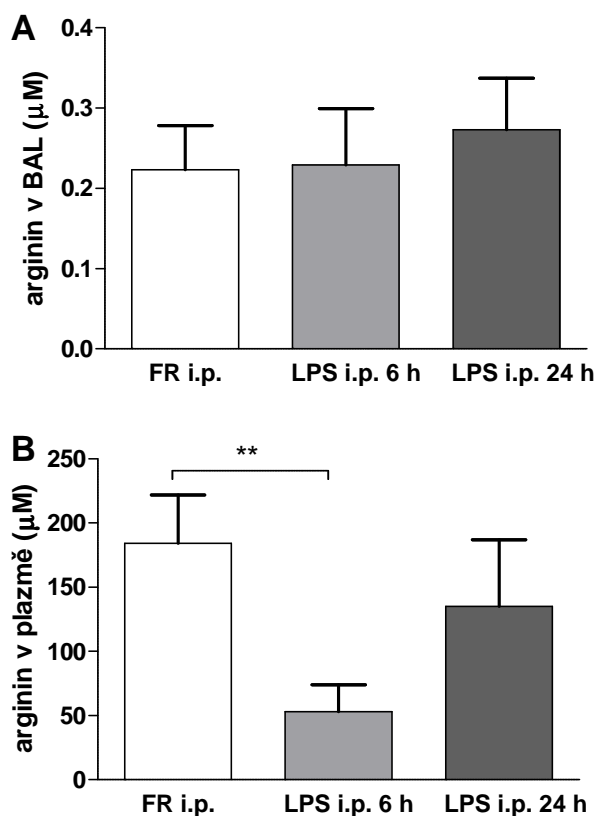
V BAL nebyly po podání LPS v dávce 5 mg/kg *i.p.* pozorovány změny koncentrace argininu oproti kontrolní skupině. V plazmě za 6 hod od podání LPS došlo k hlubokému poklesu koncentrace argininu. Za 24 hod se již koncentrace nelišila od kontrolní skupiny (Graf 4).

Graf 3: Koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním podání 5 mg/ kg LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 11-14 zvířat ve skupině.

Graf 4: Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním podání 5 mg/kg LPS.



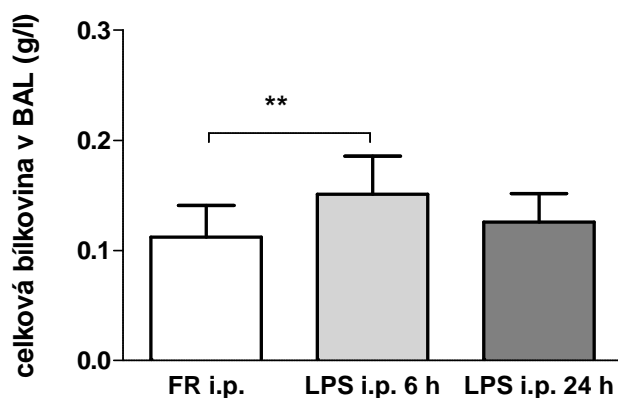
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 11-14 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$

5.1.2. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách

Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže.

V 6. Hod po podání LPS byl pozorován statisticky signifikantní nárůst koncentrace celkové bílkoviny v BAL o 35 % ve srovnání s kontrolní skupinou ($0,15 \pm 0,03$ vs. $0,11 \pm 0,03$ g/l, $p < 0,01$). Za 24 hod po podání se koncentrace celkové bílkoviny v LPS a kontrolní skupině nelišila (Graf 5).

Graf 5: Celková bílkovina v BAL po intraperitoneálním podání 5 mg/ kg LPS.

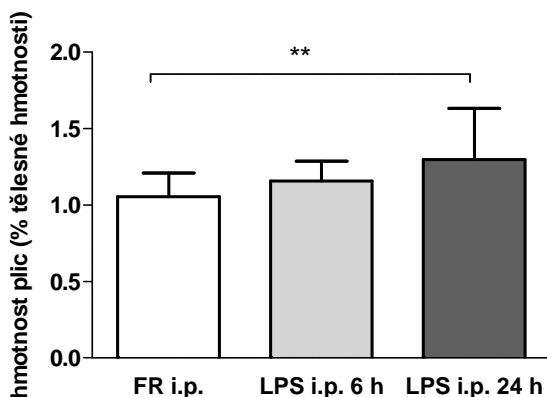


Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry ± SD, pro 11-14 zvířat ve skupině.
Statistická významnost: ** $p < 0,01$

Hmotnost plic.

Průměrný poměr mezi hmotnostmi plic a tělesnou hmotností byl ve skupině LPS ve srovnání s kontrolní skupinou vyšší o 9,5 % za 6 hod (NS) a o 23 % ($p < 0,01$) za 24 hod po podání (Graf 6).

Graf 6: Poměr hmotnosti plic a těla po intraperitoneálním podání 5 mg/ kg LPS.

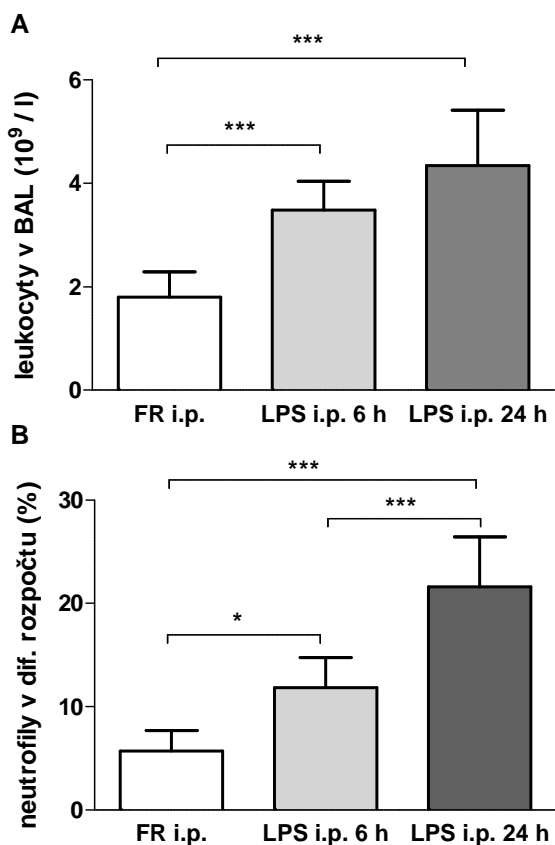


Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry ± SD, pro 11-14 zvířat ve skupině.
Statistická významnost: ** $p < 0,01$

Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v tekutině z bronchoalveolární laváže a v krvi.

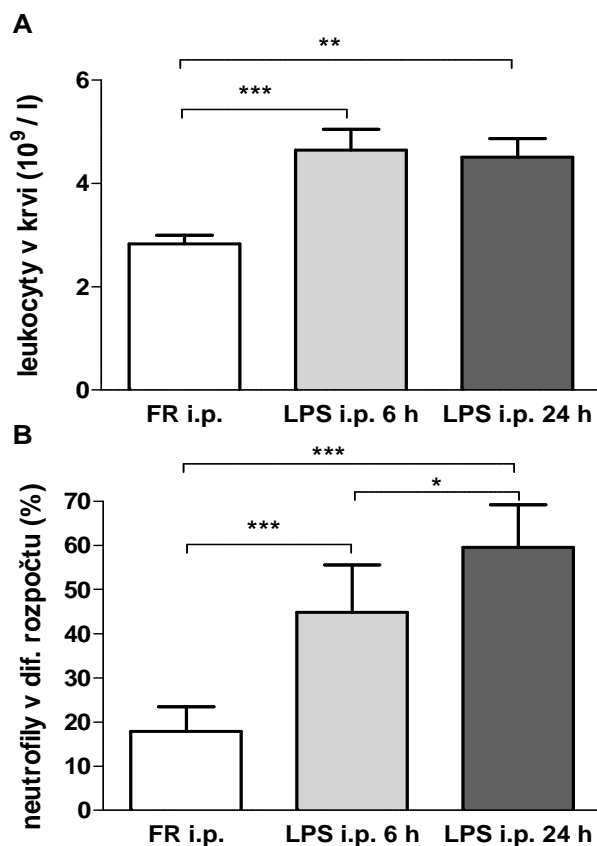
Analýza buněčné složky BAL získané centrifugací ukázala v LPS skupinách oproti kontrolní skupině signifikantní vzestup počtu leukocytů v 6. i 24. hod a současný nárůst zastoupení neutrofilních granulocytů v diferenciálním rozpočtu (Graf 7). Zatímco mírný pokračující nárůst celkového počtu leukocytů v intervalu mezi 6. a 24. hod již nebyl statisticky významný, výrazně se dále zvýšilo procentuální zastoupení neutrofilů v buněčné složce BAL z 11,8 na 21,6 % ($p < 0,001$). Zvýšení počtu leukocytů a zastoupení neutrofilů bylo nalezeno i v krvi (Graf 8).

Graf 7: Buněčná složka BAL: Počet leukocytů (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intraperitoneálním podání 5 mg/ kg LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD pro 5-12 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Graf 8: Počet leukocytů v krvi (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intraperitoneálním podání 5 mg/ kg LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD pro 5-12 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

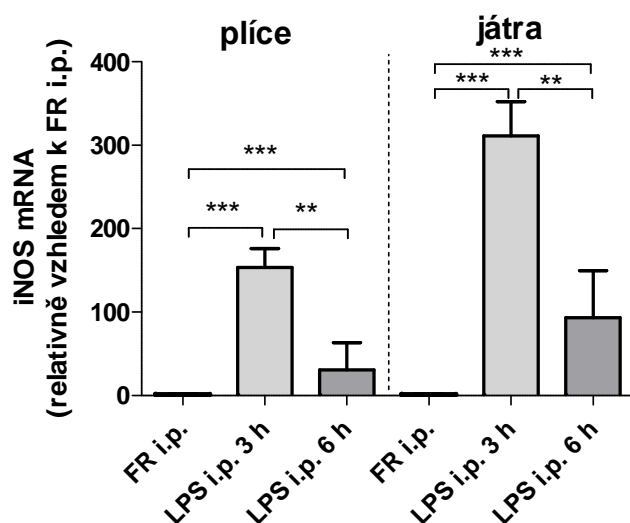
5.1.3. Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu

Expese vybraných genů, majících důležitou úlohu pro metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý, byla stanovena na úrovni mRNA metodou RT-PCR v plicní a jaterní tkáni.

Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS).

Expese iNOS byla signifikantně a výrazně zvýšená již ve třetí hodině od intraperitoneálního podání LPS a to ve srovnání s kontrolní skupinou 150krát v plicích a 300krát v jaterní tkáni. Za 6 hod od podání expese ve srovnání s 3. hodinou poklesla, ale stále přetrvávalo 30násobné (plicce) a 90násobné zvýšení oproti kontrolní skupině (Graf 9).

Graf 9: Expres iNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.

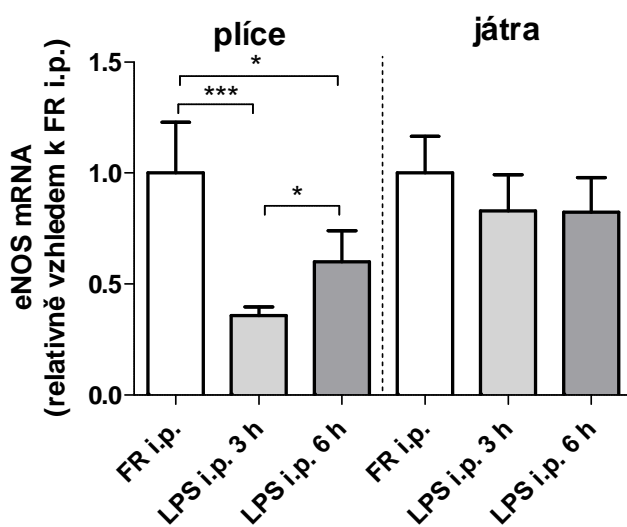


Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS).

Po podání LPS došlo ve třetí hodině od aplikace LPS ke snížení exprese eNOS v plicní tkáni o 64 % ($p < 0,001$) oproti kontrole a v 6. hodině od podání přetrvávalo snížení o 40 % ($p < 0,05$). Expres eNOS v jaterní tkáni nebyla ve sledovaném časovém intervalu podáním LPS statisticky významně ovlivněna (Graf 10).

Graf 10: Expres eNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

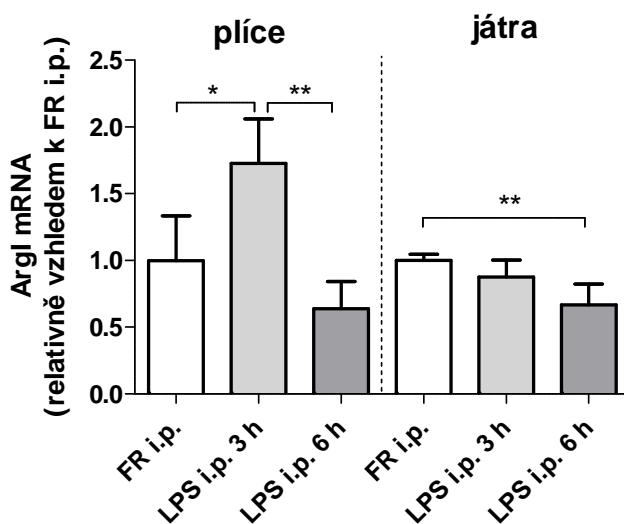
Argináza I (ArgI).

Expres ArgI v plicní tkáni byla za 3 hod po podání LPS zvýšená o 73 % oproti kontrolní skupině FR i.p. ($p < 0,01$). Za 6 hod došlo k poklesu až na 64 % úrovně exprese v kontrolní skupině (Graf 11). V játrech byla exprese ArgI v LPS skupinách pod úrovní kontrolní skupiny. Rozdíl v 6. hod po podání byl statisticky významný. Bylo pozorováno snížení na 67 % úrovně exprese v kontrolní skupině, tj. o 33 % ($p < 0,01$).

Argináza II (ArgII).

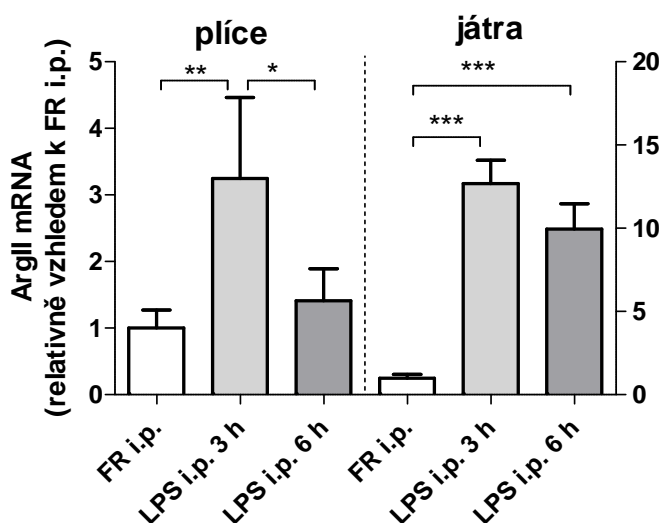
Expres ArgII v plicní tkáni byla za 3 hod po podání LPS oproti kontrolní skupině zvýšena 3,2krát ($p < 0,01$) a za 6 hod poklesla na úroveň srovnatelnou s kontrolní skupinou. V jaterní tkáni potkanů v LPS skupinách byla exprese výrazně zvýšena za 3 hod a 6 hod po podání (12,7krát a 9,9krát, $p < 0,001$, Graf 12).

Graf 11: Expres ArgI na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Graf 12: Expres ArgII na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

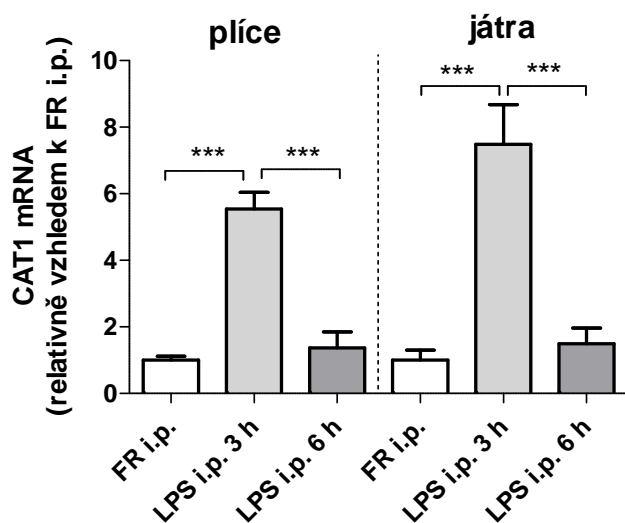
Membránový transportér pro arginin CAT1.

Ve třetí hodině od podání LPS došlo jak v plicích, tak v játrech k výraznému nárůstu exprese transportéru CAT1 oproti kontrolní skupině. V plicích se exprese CAT1 zvýšila 5,5krát ($p < 0,001$) a v játrech 7,5krát ($p < 0,001$). Za 6 hod po podání již nebyl rozdíl mezi úrovní exprese CAT1 u LPS a kontrolní skupiny statisticky významný (1,4násobek v plicích a 1,5násobek v játrech, Graf 13).

Membránový transportér pro arginin CAT2.

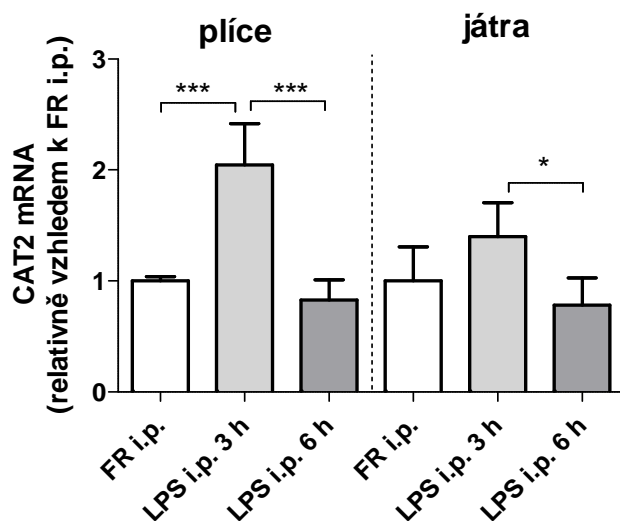
V plicní tkáni se exprese CAT2 u skupiny LPS za 3 hod po podání zvýšila dvojnásobně ($p < 0,001$). V 6. hodině od podání již byla exprese v LPS a kontrolní skupině srovnatelná. Podání LPS nezpůsobilo statisticky významné rozdíly v expresi tohoto transportéru v jaterní tkáni oproti kontrolní skupině (Graf 14).

Graf 13: Expres CAT1 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Graf 14: Expres CAT2 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



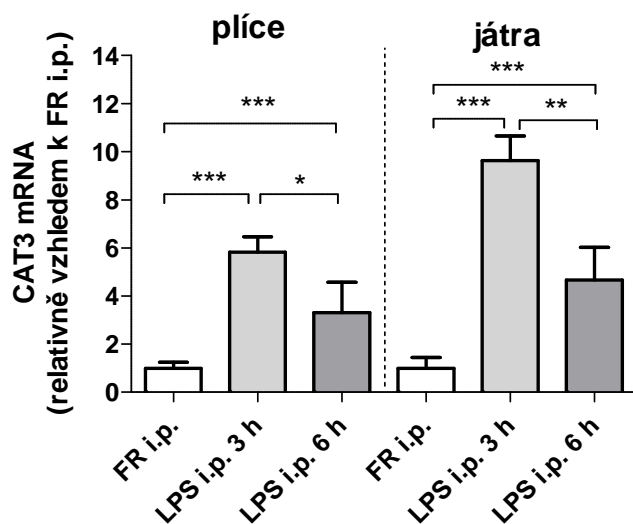
Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Membránový transportér pro arginin CAT3.

Po podání LPS došlo jak v plicní tak v jaterní tkáni k významnému nárůstu exprese sledovaného genu (Graf 15). Ve třetí hodině od podání se exprese CAT3 zvýšila 5,8krát v plicích ($p < 0,001$) a 9,6krát v játrech ($p < 0,001$). Zvýšená exprese transportéru přetrvávala

v plicní i jaterní tkáni i za 6 hod po podání LPS. Ve srovnání s kontrolní skupinou byla exprese CAT3 v plicní tkáni 3krát vyšší ($p < 0,001$) a v játrech 4,7krát vyšší ($p < 0,001$).

Graf 15: Expresce CAT3 na mRNA úrovni v plicní a jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.

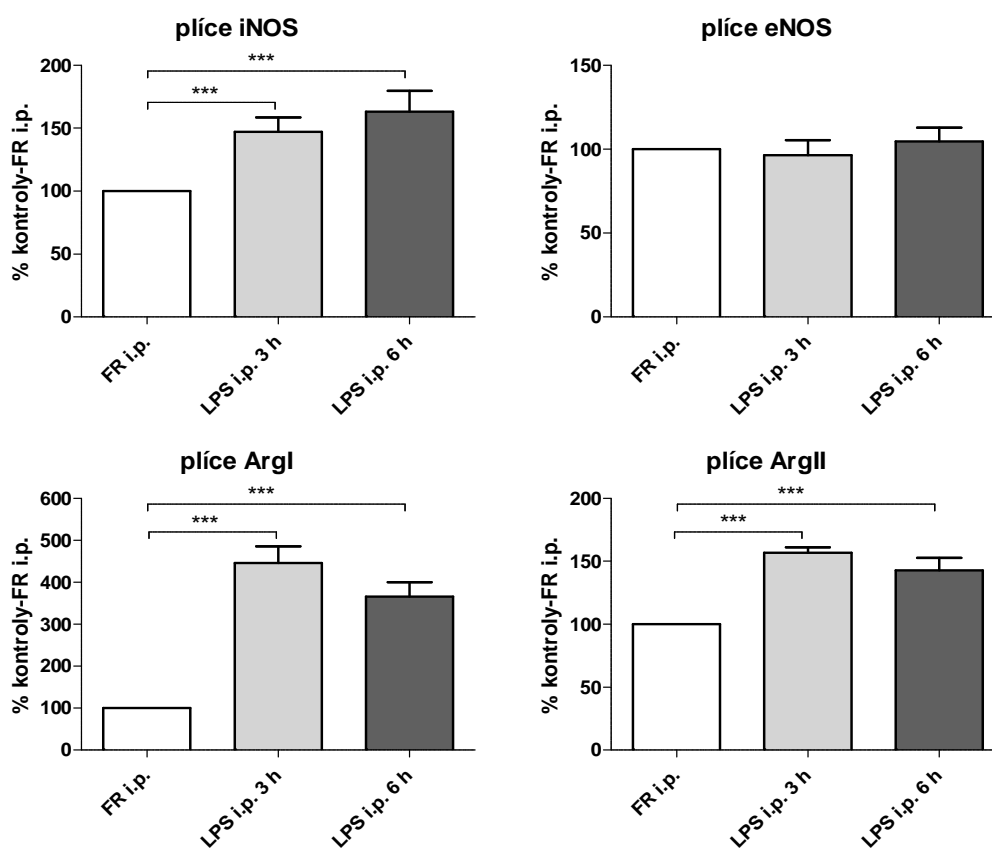


Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.1.4. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání LPS

V plicní tkáni byla metodou Western blot za 3 i 6 hod po podání LPS nalezena zvýšená exprese proteinů iNOS (1,5 a 1,6krát), ArgI (4,5 a 3,7krát) a ArgII (1,6 a 1,4krát), zatímco exprese eNOS se nezměnila (Graf 16).

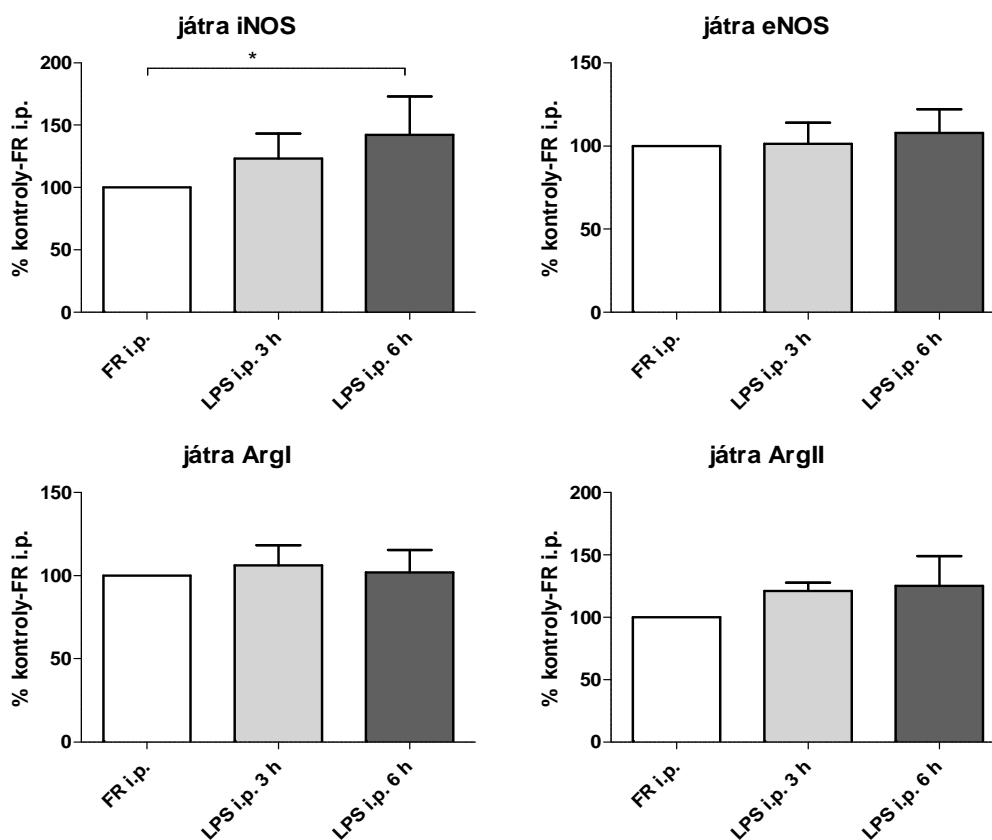
Graf 16: Exprese proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v plicní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



*Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

V játrech se exprese uvedených proteinů nezměnila nebo se zvýšila méně než v plicní tkáni (Graf 17). Exprese iNOS se zvýšila 1,2krát ($p > 0,05$) za 3 hod a 1,4krát za 6 hod po podání LPS ($p < 0,05$). Exprese eNOS a ArgI se v játrech nezměnila a rozdíly v expresi ArgII oproti kontrolní skupině nedosáhly ve 3. ani 6. hod statistické významnosti (zvýšení o 20 a 25 %).

Graf 17: Expres proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v jaterní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.



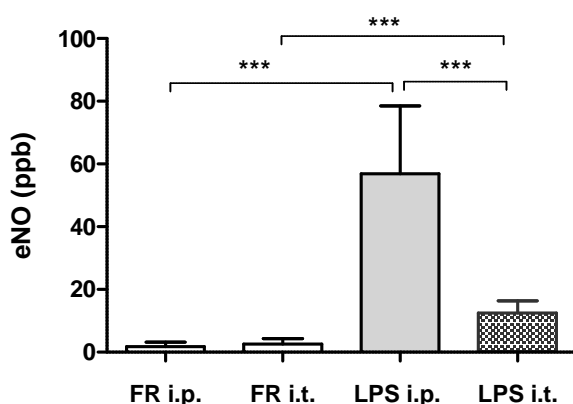
Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině FR i.p.. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 5 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.1.5. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání

Koncentrace exhalovaného NO.

Stejná dávka 5 mg/kg LPS vedla k výrazně vyšší indukci eNO v 6. hodině po podání intraperitoneálním než intratracheálním. Po *i.p.* podání byla koncentrace eNO zvýšena oproti kontrolní skupině 32krát, zatímco po *i.t.* podání pouze 4,8krát (Graf 18).

Graf 18: Vliv podání LPS v dávce 5 mg/kg intraperitoneální a intratracheální cestou na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého (eNO).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 zvířat ve skupině.
Statistická významnost: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

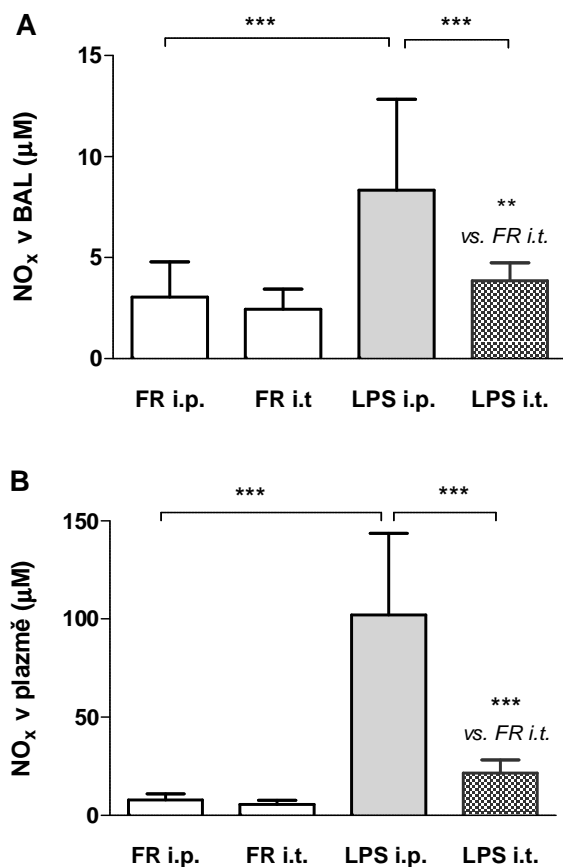
Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.

Také vyšetření NO_x v BAL a v plazmě ukázalo shodně s eNO na výraznější vliv LPS po podání *i.p.* než *i.t.* Koncentrace NO_x byla zvýšena v BAL 2,7krát (*i.p.*) a 1,6krát (*i.t.*) a v plazmě 12,9krát (*i.p.*) a 3,8krát (*i.t.*) (Graf 19).

Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže.

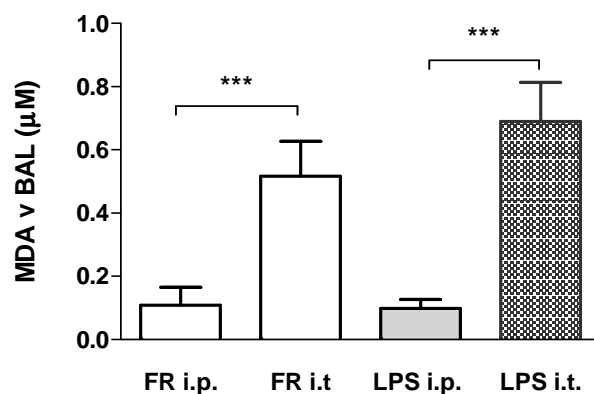
Vyšetření MDA v BAL ukázalo na značný oxidační stres v dýchacích cestách vyvolaný samotnou instilací fyziologického roztoku do trachey. Koncentrace MDA byla zvýšena 4,8krát oproti skupině s intraperitoneálním podáním fyziologického roztoku. Naopak LPS úroveň oxidačního stresu dále významně nezvýšil a nárůst MDA nebyl pozorován ani po jeho intraperitoneálním podání (Graf 20).

Graf 19: Koncentrace dusitanů a dusičnanů (NO_x) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a v plazmě po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Graf 20: Koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).



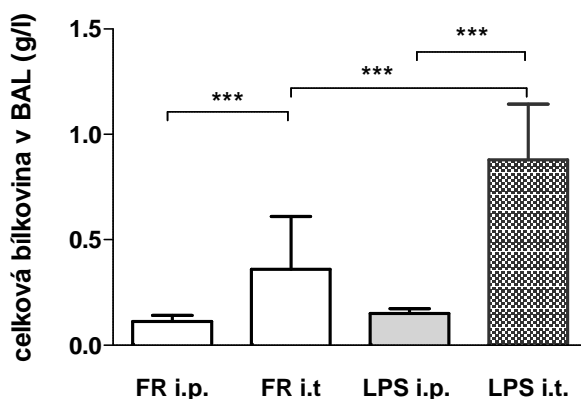
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: *** $p < 0,001$

5.1.6. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání

Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže.

Podobně jako tomu bylo v případě MDA, i celková bílkovina v BAL byla zvýšena 3,7krát samotnou intratracheální instilací fyziologického roztoku. Bakteriální LPS způsobil další podstatné zvýšení průměrné koncentrace celkové bílkoviny na 2,4násobek (Graf 21). Integrita alveolokapilární membrány tedy byla ovlivněna jak samotnou intratracheální aplikací tak přítomností vysoké koncentrace LPS v dýchacích cestách, protože samotný LPS podaný *i.p.* koncentraci celkové bílkoviny zvýšil pouze o 34 % (1,3krát). Tento rozdíl nebyl statisticky významný při současném testování všech skupin analýzou rozptylu s následným testem. Při vzájemném testování t-testem *i.p.* skupin s nízkými rozptyly koncentrace bílkoviny byla získána hodnota $p=0,015$.

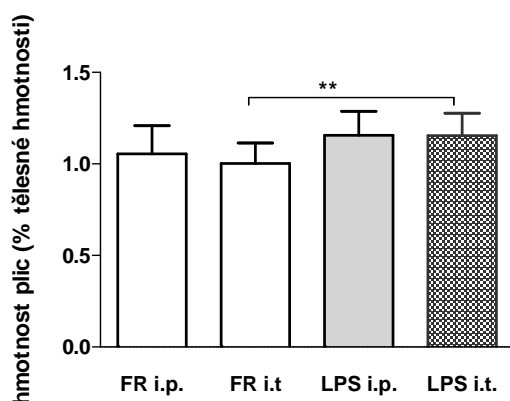
Graf 21: Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: *** $p<0,001$

Průměrný poměr mezi hmotností plic a tělesnou hmotností byl ve srovnání s kontrolní skupinou vyšší o 9,5 % (NS) po intraperitoneálním podání a o 15 % ($p<0,01$) po intratracheálním podání LPS (Graf 22).

Graf 22: Poměr hmotnosti plic a těla po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/kg).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$

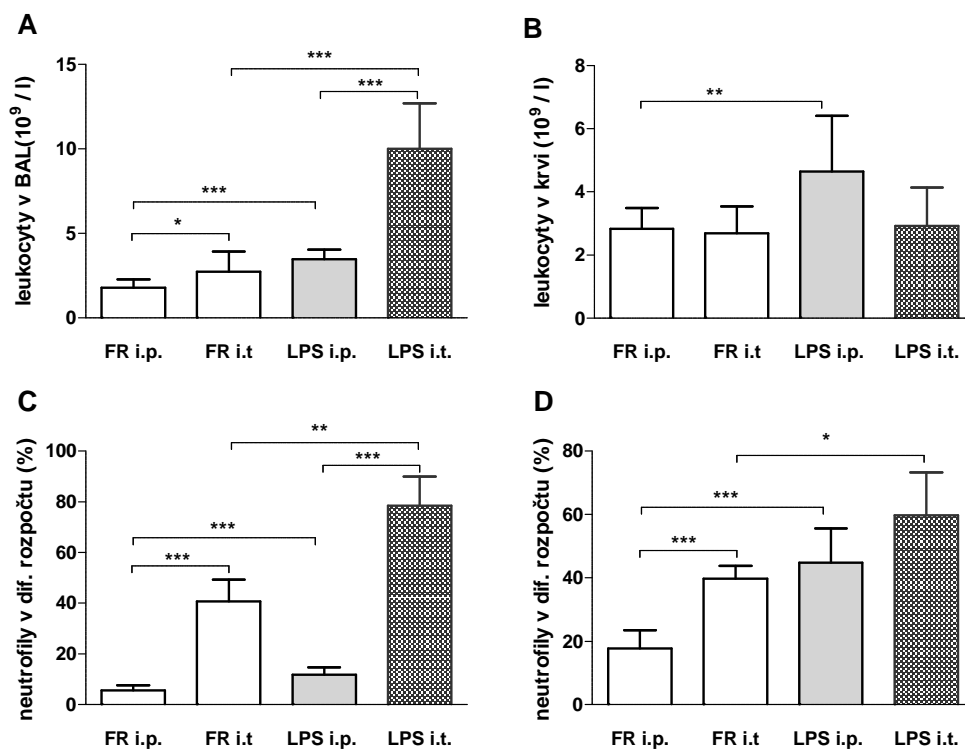
Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v BAL a v krvi.

Analýza buněčné složky BAL ukázala v 6. hod po podání LPS signifikantní vzestup počtu leukocytů a současný nárůst zastoupení neutrofilních granulocytů v diferenciálním rozpočtu, který byl podstatně větší po intratracheálním podání. Také samotná intratracheální aplikace fyziologického roztoku měla v dýchacích cestách odezvu a zvýšila výsledky obou vyšetření. Počet leukocytů v krvi byl signifikantně zvýšen po intraperitoneálním podání, zastoupení neutrofilů výrazně narostlo v obou LPS skupinách i vlivem intratracheální aplikace fyziologického roztoku (Graf 23).

5.1.7. Vliv pentoxifylinu na indikátory nitračního a oxidačního stresu po intratracheálním podání LPS

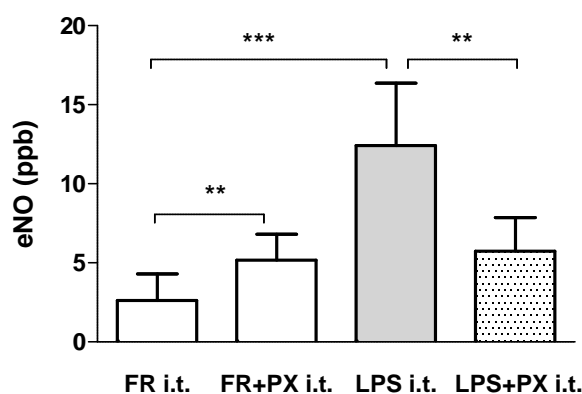
Intratracheální instilace pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) snížila koncentraci vydechovaného NO (eNO) a koncentraci NO_x v plazmě až na úroveň kontrolní skupiny (Grafy 24 a 25). Koncentraci NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže snížila pouze částečně (Graf 25). Koncentrace malondialdehydu se měnila pouze mírně: vlivem LPS se mírně zvýšila a pentoxifylin tomuto nárůstu zabránil (Graf 26).

Graf 23: Počet bílých krvinek a diferenciální rozpočet v BAL (A, C) a v krvi (B, D) po intraperitoneálním a intratracheálním podání LPS (5 mg/ kg).



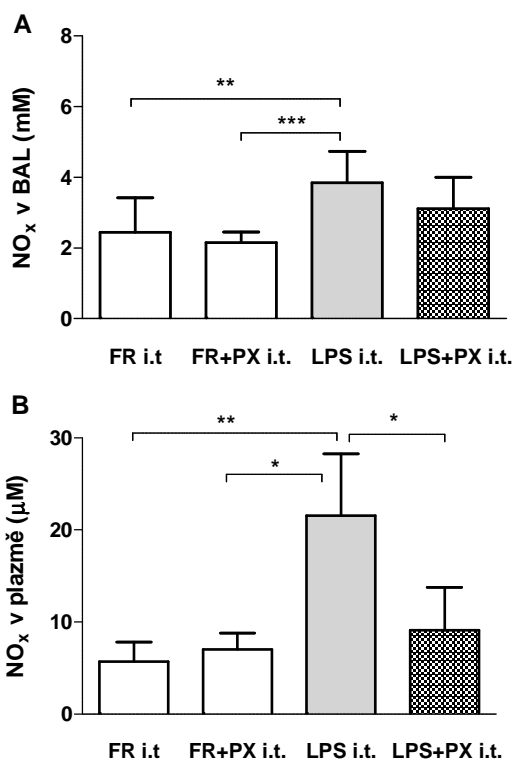
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 8-18 (počet leukocytů) a 6-8 (diferenciální rozpočet) zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Graf 24: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na koncentraci vydechaného NO (eNO) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).



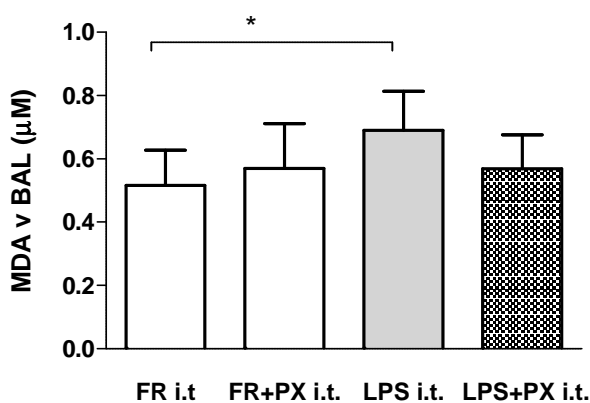
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 6-12 zvířat ve skupině. Statistická významnost: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Graf 25: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na koncentrace NO_x A/ v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) a B/ v plazmě po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry±SD, pro 6-12 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Graf 26: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na koncentrace malondialdehydu (MDA) v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).

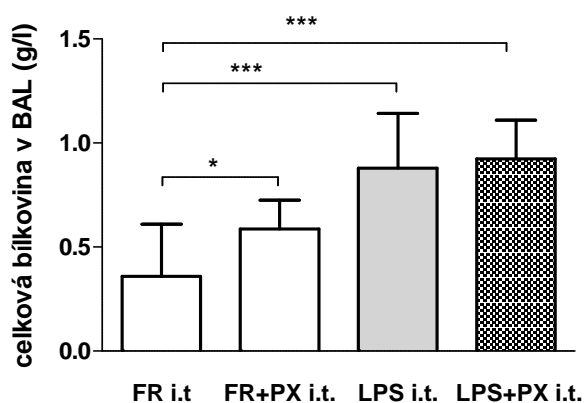


Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry±SD, pro 6-12 zvířat ve skupině.

5.1.8. Vliv pentoxifylinu na propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po intratracheálním podání LPS

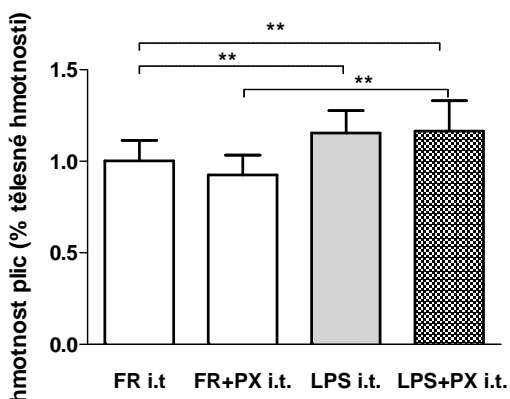
Intratracheální podání pentoxifylinu neovlivnilo koncentraci celkové bílkoviny v BAL, poměr hmotnosti plic a těla, počet leukocytů a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu buněčné složky BAL (Grafy 27 až 29).

Graf 27: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na koncentraci celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).



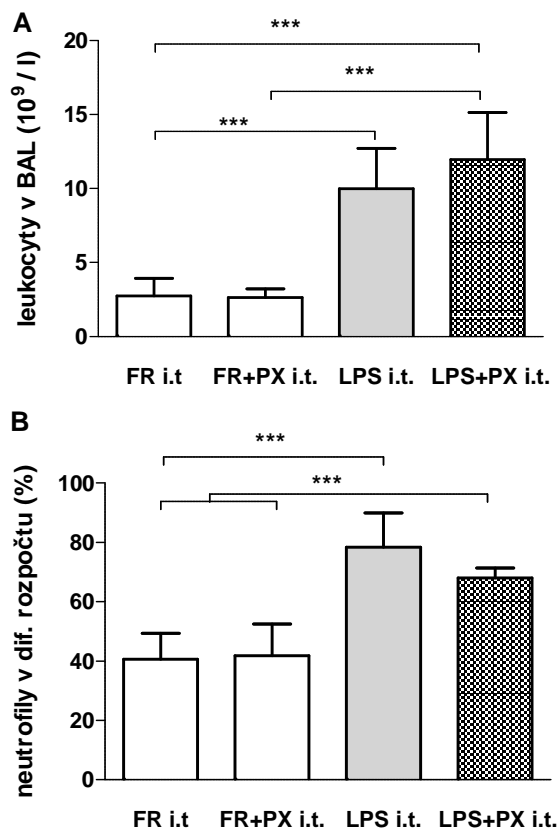
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 6-12 zvířat ve skupině.
Statistická významnost: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

Graf 28: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na hmotnost plic (v % tělesné hmotnosti) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 6-12 zvířat ve skupině.
Statistická významnost: ** $p < 0,01$

Graf 29: Vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek) na počet leukocytů v krvi (A) a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu (B) po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*).



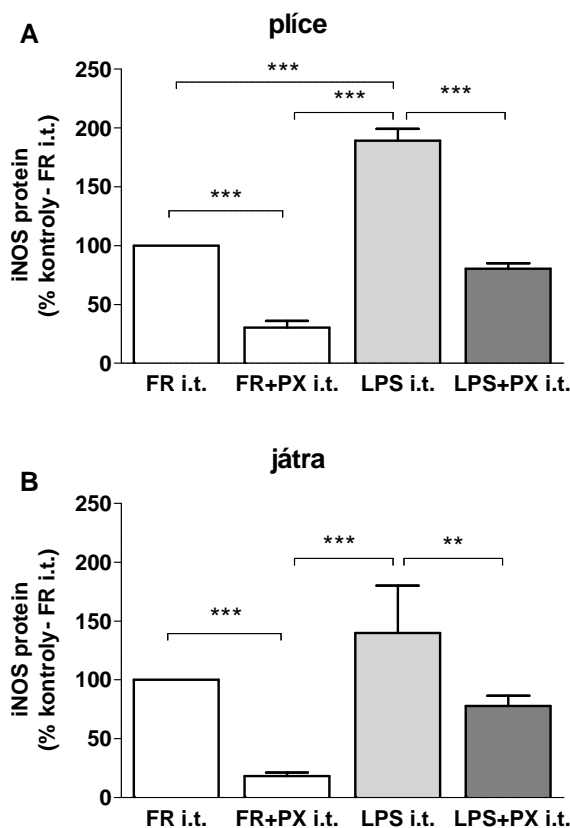
Vysvětlivky: Hodnoty jsou aritmetické průměry \pm SD, pro 6-12 zvířat ve skupině. S tatistická významnost: ** $p < 0,01$

5.1.9. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intratracheálním podání LPS a vliv pentoxifylinu

Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS).

Po *i.t.* aplikaci LPS došlo k 1,9násobnému ($p < 0,001$) nárůstu exprese iNOS v homogenátech plicní tkáně. Podání pentoxifylinu snížilo expresi proteinu o 70 % ($p < 0,001$) pod úroveň exprese u potkanů, kterým byl podán intratracheálně fyziologický roztok. Pentoxifylin dále zcela potlačil indukční vliv LPS na expresi iNOS (Graf 30). V játrech byly nálezy velmi podobné s tím rozdílem, že exprese iNOS se ve skupině LPS *i.t.* zvýšila pouze 1,4krát, tj. o 40 % (Graf 30).

Graf 30: Expres iNOS proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 5-12 zvířat ve skupině. Statistická významnost: $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

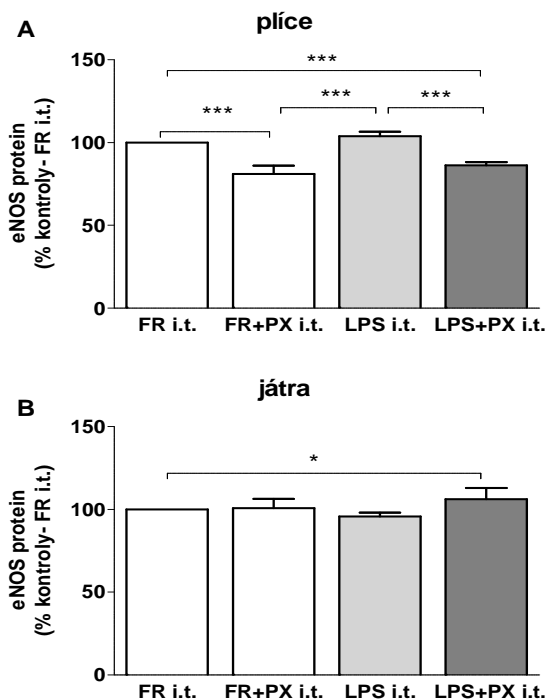
Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS).

Po podání LPS nedošlo ve srovnání s odpovídajícími kontrolními skupinami ke změně exprese eNOS v homogenu plic (Graf 31). Podání pentoxifylinu se projevilo mírným snížením exprese eNOS v plicní tkáni jak v kontrolní tak v LPS skupině. V játrech byla exprese eNOS ve všech skupinách srovnatelná. Statisticky významně ale pouze mírně vyšší (+ 6 %) byla exprese ve skupině LPS+PX *i.t.* ve srovnání s kontrolní skupinou FR *i.t.* (Graf 31).

Argináza I (ArgI).

Po *i.t.* podání LPS došlo v plicní tkáni k 2,4násobnému zvýšení exprese ArgI. Pentoxifylinu částečně snížil tento nárůst (Graf 32). Expres ArgI v játrech nebyla ovlivněna LPS ani pentoxifylinem.

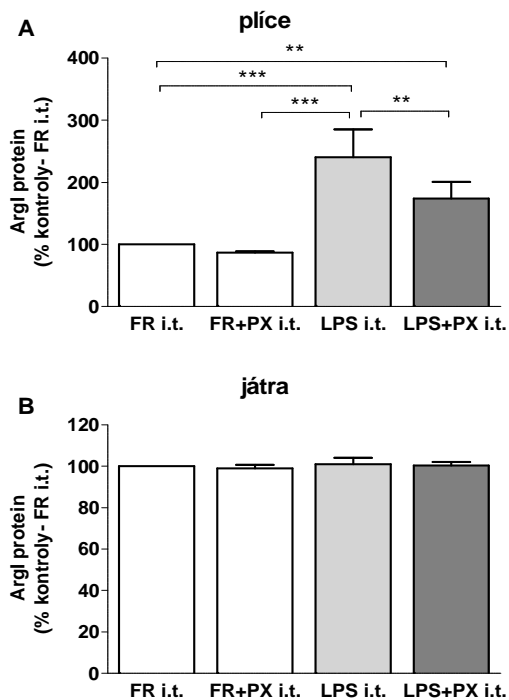
Graf 31: Expres eNOS proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 5-12 zvířat ve skupině.

Statistická významnost: $p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

Graf 32: Expres ArgI proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek).



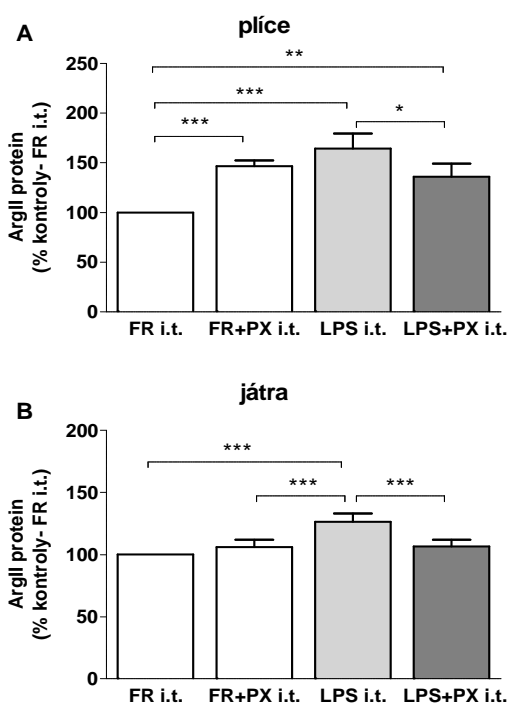
Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 5-12 zvířat ve skupině.

Statistická významnost: $p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$

Argináza II (ArgII).

Expres ArgII v plicích byla po *i.t.* podání LPS zvýšena 1,6krát ($p < 0,001$). Podání pentoxifylinu překvapivě zvýšilo expresi ArgII ve srovnání s kontrolní skupinou FR *i.t.*, které byl aplikován fyziologický roztok. V LPS skupině způsobil pentoxifylin pokles exprese o 20 % ($p < 0,01$). Expres byla ale vyšší než v kontrolní skupině FR *i.t.* (Graf 32). Po podání LPS došlo v játrech k mírnému nárůstu exprese ArgII o 26 % ($p < 0,001$) v porovnání s expresí v kontrolní skupině a podání pentoxifylinu zcela zabránilo tomuto zvýšení (Graf 33).

Graf 33: Expres ArgII proteinu v plicní a jaterní tkáni po intratracheálním podání LPS (5 mg/kg *i.t.*) a vliv pentoxifylinu (50 mg/kg *i.t.* rozděleně do 2 dávek).



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 5-12 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2. Model ovalbuminem navozeného alergického zánětu u potkana kmene Brown Norway

Potkani Brown-Norway ve skupinách A (alergizace) a A+P (alergizace + provokace) byli alergizováni opakovanými intraperitoneálními a subkutánními injekcemi ovalbuminu s hydroxidem hlinitým (adjuvans). Ve skupině A+P byla následně prováděna bronchoprovokace nebulizovaným ovalbuminem a skupina A byla exponována nebulizovanému fyziologickému roztoku. Kontrolní skupině K byl podáván fyziologický roztok místo alergizace a poté nebulizačně opět fyziologický roztok. Na konci experimentu (viz část metody) byla ve vzorcích plazmy a BAL stanovena koncentrace vybraných biochemických parametrů a exprese na úrovni proteinu a mRNA v plicní tkáni.

5.2.1. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.

Ve srovnání s kontrolní skupinou K byla koncentrace NO_x v BAL ve skupinách A a A+P zvýšená o 71 % a 72 %, tj. 1,7krát ($p < 0,001$). V plazmě se zvýšila o 40 % a 50 % ($p < 0,05$; Graf 34).

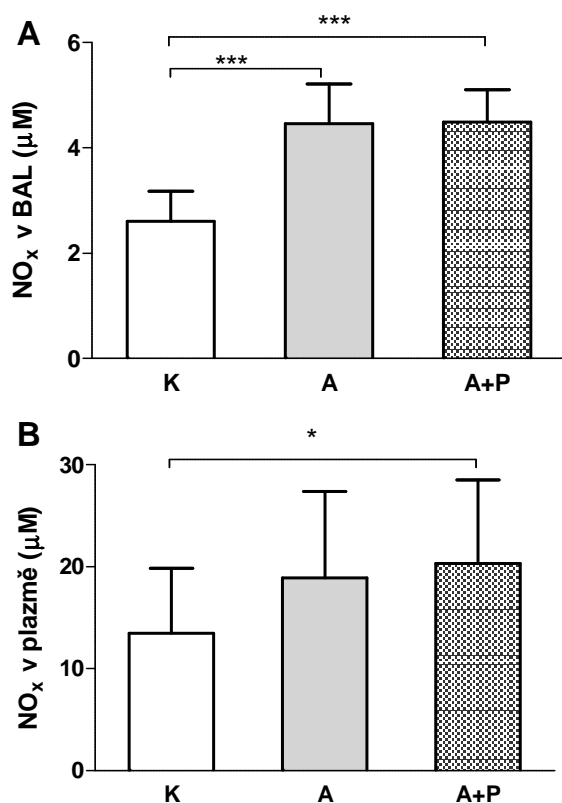
Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže.

U alergizovaných potkanů se po provokaci ovalbuminem (skupina A+P) zvýšila koncentrace MDA v BAL ve srovnání s kontrolami 1,6krát (+60 %, $p < 0,01$) oproti koncentraci MDA u kontrolní skupiny. Ve skupině A nebyl nárůst koncentrace o 21 % statisticky významný (Graf 35).

Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže.

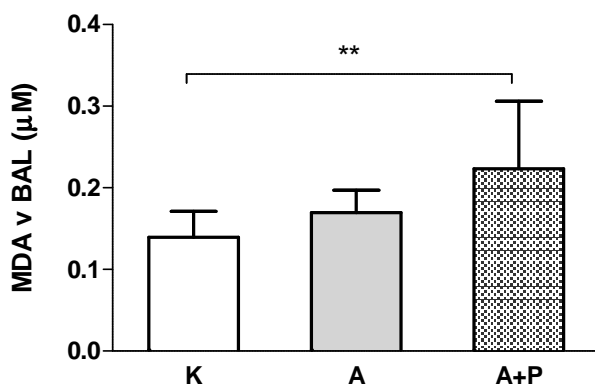
U alergizovaných potkanů se po provokaci ovalbuminem (skupina A+P) zvýšila koncentrace MDA v BAL ve srovnání s kontrolami 1,5krát (+ 47 %, $p < 0,01$; Graf 36).

Graf 34: Koncentrace NO_x v tekutině z bronchoalveolární laváže (A) a v plazmě (B) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



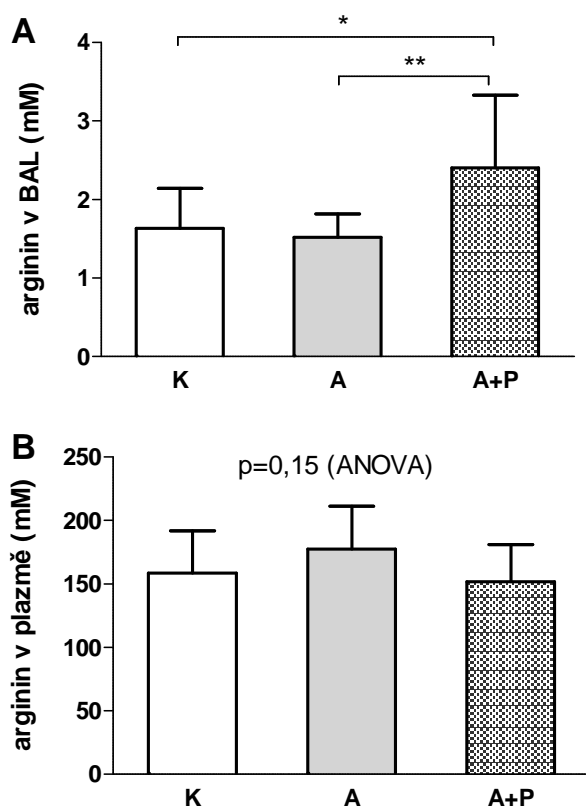
Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 8-16 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Graf 35: Koncentrace MDA v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD, pro 6-12 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$

Graf 36: Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže (A) a v plazmě (B) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5.2.2. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

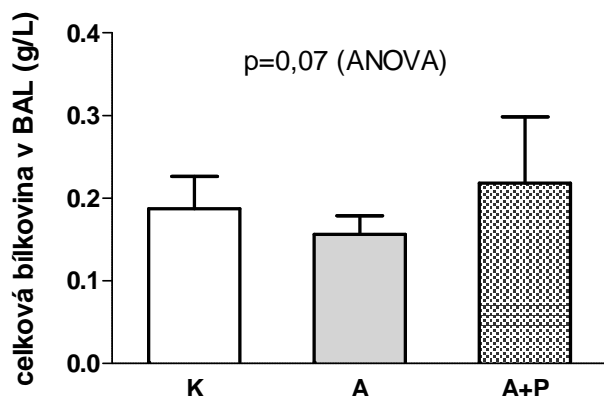
Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže.

Ve skupině A+P bylo pozorováno mírné zvýšení koncentrace celkové bílkoviny (+17 %), ale rozdíl byl pouze hraničně signifikantní (ANOVA, $p = 0,07$; Graf 37).

Hmotnost plic.

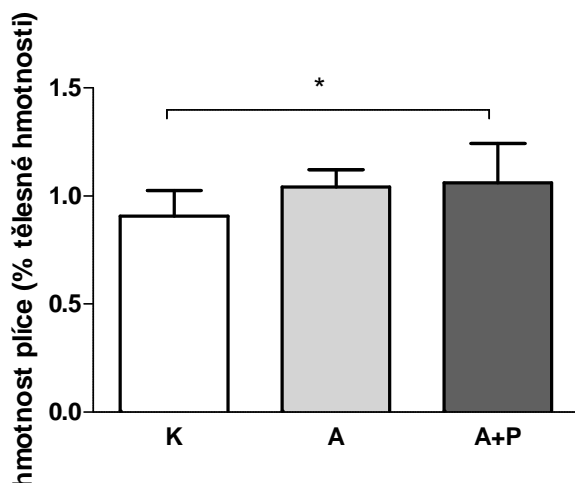
Průměrný poměr mezi hmotností plic a tělesnou hmotností byl ve skupině A o 15 % vyšší než u kontrol, ale tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti. Ve skupině A+P došlo ke zvýšení o 17 % ($p < 0,05$; Graf 38).

Graf 37: Koncentrace proteinu v BAL po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD pro 8-18 zvířat ve skupině.

Graf 38: Poměr hmotnosti plic a těla po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.

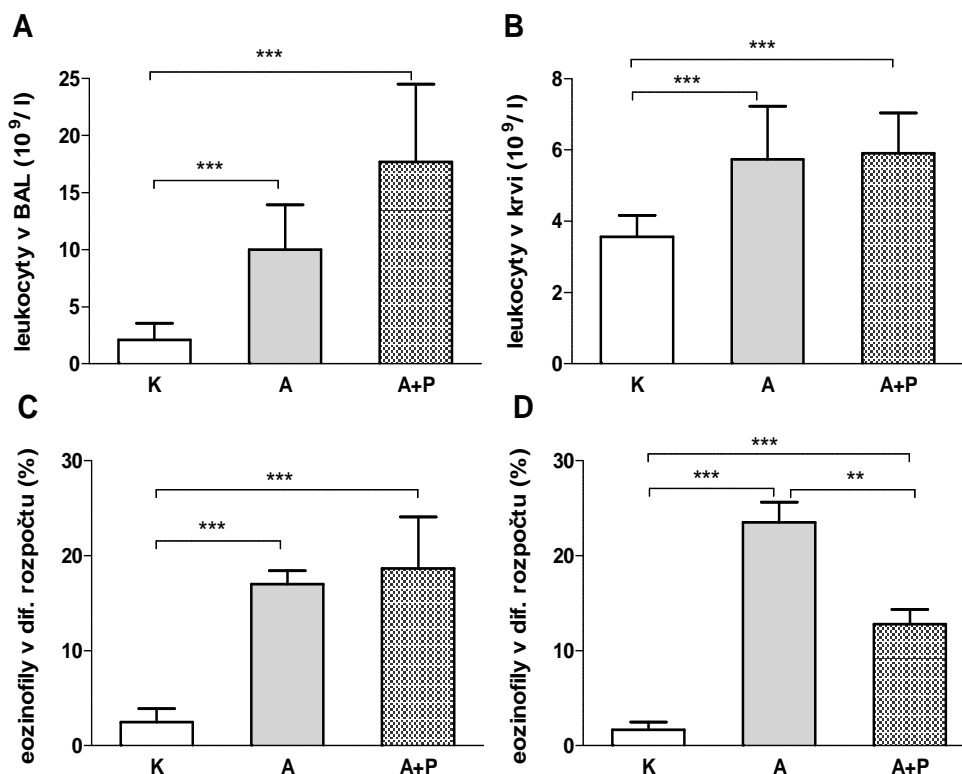


Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$

Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v tekutině z bronchoalveolární laváže a v krvi.

Analýza buněčné složky získané centrifugací BAL ukázala, že ve skupině A se počet leukocytů zvýšil ve srovnání s kontrolní skupinou 5,2krát ($p < 0,001$) a ve skupině A+P 8,4krát ($p < 0,001$). Dále došlo v obou skupinách k markantnímu nárůstu zastoupení eozinofilních granulocytů v diferenciálním rozpočtu (Graf 39). Zvýšení počtu leukocytů a zastoupení eozinofilů bylo nalezeno i v krvi (Graf 39).

Graf 39: Počet bílých krvinek a zastoupení eozinofilů v diferenciálním rozpočtu v buněčné složce BAL (A, C) a v krvi (B, D) po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou průměr +SD pro 8-18 zvířat ve skupině.
 Statistická významnost: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.3. Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

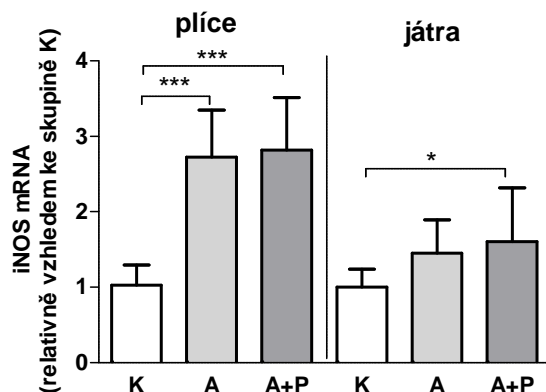
Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého (iNOS).

Expresce iNOS na úrovni mRNA byla zvýšena ve skupině A i A+P, a to 2,7krát ($p < 0,001$) a 2,8krát ($p < 0,001$; Graf 40). V játrech došlo ke statisticky významnému zvýšení exprese iNOS pouze u skupiny A+P (1,6krát, $p < 0,01$) oproti kontrole (Graf 40).

Endoteliální syntáza oxidu dusnatého (eNOS).

Stejně jako v případě iNOS ale v menší míře se zvýšilo i množství mRNA eNOS v plicní tkáni ve skupině A (1,4krát, tj. o 40 %, $p < 0,05$) i A+P (1,3krát, tj. o 30 %, $p < 0,05$). V játrech nedošlo ke změnám v expresi eNOS (Graf 41).

Graf 40: Expres iNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.

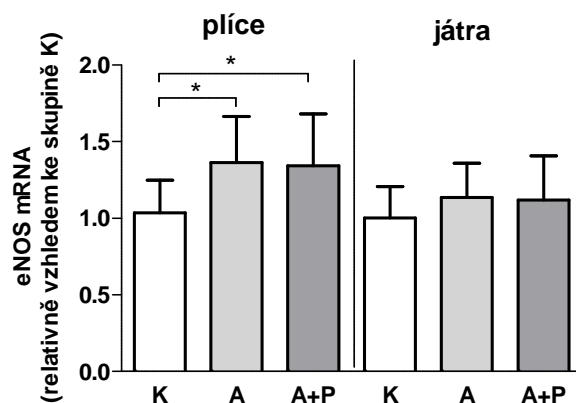


Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině K.

Uveden je aritmetický průměr a SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Signifikantní rozdíl oproti kontrole :

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Graf 41: Expres eNOS na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



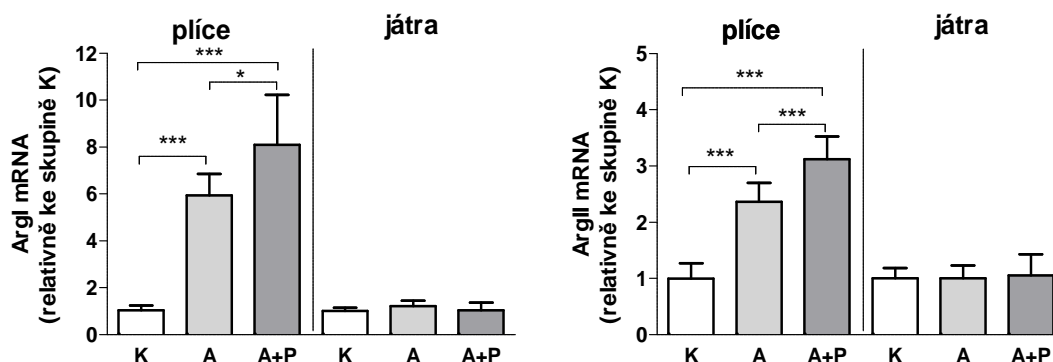
Vysvětlivky : Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině K.

Uveden je aritmetický průměr a SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$

Argináza I (ArgI) a argináza II (ArgII).

Expres ArgI v plicích se výrazně zvýšila jak u alergizovaných (A), tak u alergizovaných a provokovaných potkanů (A+P). Ve srovnání s kontrolní skupinou se množství mRNA zvýšilo 5,9krát a 8,1krát ($p < 0,001$; Graf 42). V případě ArgII byl nárůst exprese v plicní tkáni v obou skupinách nižší: množství mRNA se zvýšilo 2,4krát (skupina A) a 3,1krát (skupina A+P). Expres ArgI a ArgII mRNA v játrech se nezměnila (Graf 41).

Graf 42: Expres ArgI a ArgII na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.

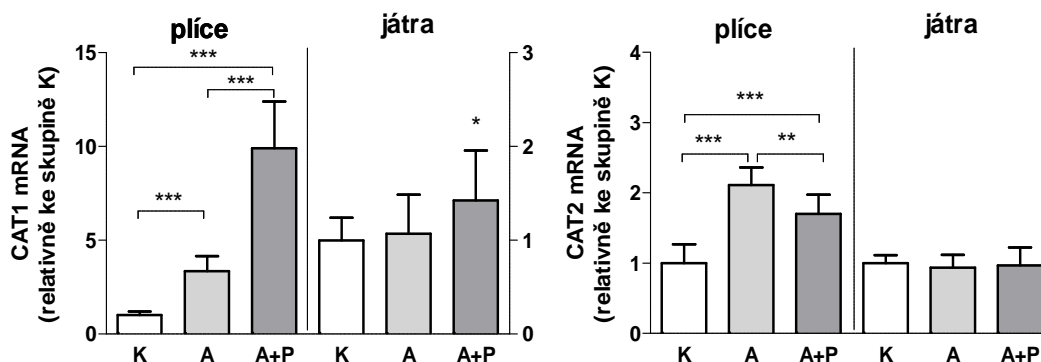


Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině K. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$

Membránové transportéry pro arginin CAT1 a CAT2.

Zvýšená expres mRNA transportérů CAT1 a CAT2 byla zaznamenána v plicní a v případě CAT1 i v jaterní tkáni. V plicní tkáni došlo k výraznému nárůstu CAT1 ve skupině A (3,4krát, $p < 0,01$) a zvláště ve skupině A+P (9,9krát, $p < 0,001$). V jaterní tkáni došlo k mírnému zvýšení CAT1 (1,4krát, tj. o 40 %, $p < 0,05$) pouze u skupiny A+P. Expres CAT2 na úrovni mRNA v plicích se zvýšila méně: 2,1krát ve skupině A a 1,7krát ve skupině A+P, zatímco v játrech se nezměnila (Graf 43).

Graf 43: Expres CAT1 a CAT2 na úrovni mRNA v plicní a jaterní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.

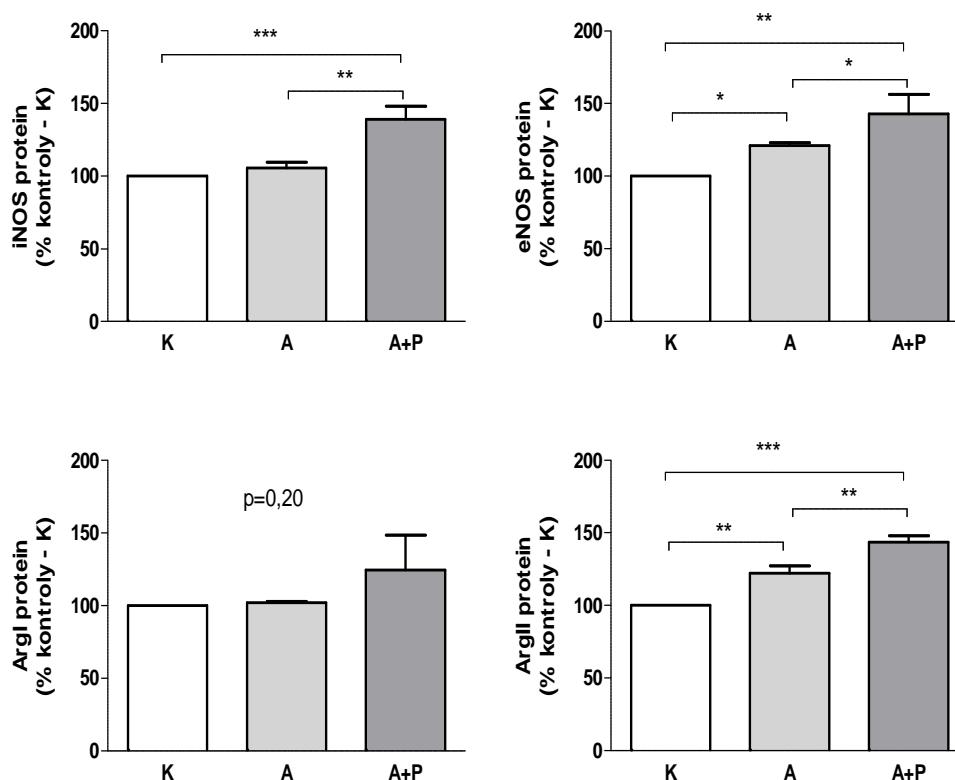


Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině K. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.4. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

U alergizovaných potkanů došlo po provokaci nebulizovaným ovalbuminem (skupina A+P) k signifikantnímu zvýšení exprese enzymů iNOS, eNOS a ArgII v homogenátu plicní tkáně o 39-44 % nad úroveň exprese u kontrolní skupiny, zatímco rozdíly v expresi ArgI nebyly statisticky významné (Graf 44). U alergizovaných potkanů, kteří inhalovali fyziologický roztok (skupina A), se mírně zvýšila exprese eNOS a ArgII (nárůst o 21-22 %). Exprese iNOS a ArgI se od kontrolní skupiny nelišila (Graf 43).

Graf 44: Exprese proteinů iNOS, eNOS, ArgI a ArgII v plicní tkáni po alergizaci (skupina A) a alergizaci a bronchoprovokaci (skupina A+P) potkanů Brown-Norway ovalbuminem.



Vysvětlivky: Hodnoty jsou vyjádřeny relativně vzhledem ke kontrolní skupině K. Uveden je aritmetický průměr a SD pro 3-4 zvířat ve skupině. Statistická významnost: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.3. Farmakokinetika inhibitoru argináz norNOHA

5.3.1. Srovnání farmakokinetiky po jednorázovém injekčním podání intravenózní a intraperitoneální cestou a po intratracheální aplikaci aerosolu

Nekompartmentová analýza koncentračního profilu norNOHA v plazmě.

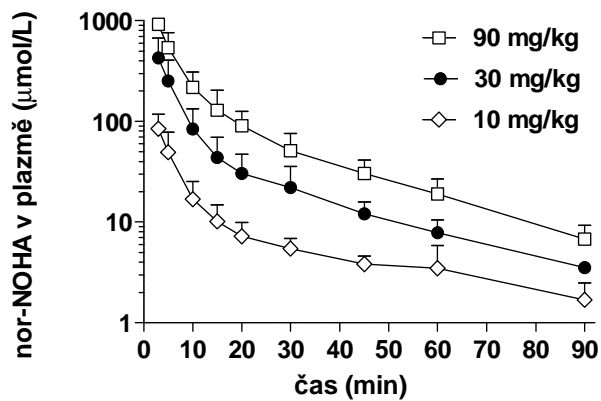
Graf 45 uvádí průměrné koncentrace (+SD) norNOHA v plazmě potkanů v závislosti na čase po podání látky *i.v.*, *i.p.* a intratracheálně formou aerosolu v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg. Po *i.v.* podání byl pokles koncentrací zřetelně bifazický a rychlý. Probíhal paralelně ve všech 3 dávkových skupinách, přičemž průměrné koncentrace za 20 min po podání byly nižší než 10 % z hodnot nejvyšších koncentrací změřených ve 3 min. Farmakokinetické parametry odhadnuté nekompartmentovou analýzou (NCA) jsou shrnuty v tabulce 9. Koncentrace extrapolovaná do času 0 (C_0) a celková plocha pod křivkou průměrná koncentrace-čas ($AUC_{0-\infty}$) se zvýšily v použitém dávkovém rozmezí 8,4krát a 8,2krát, tj. téměř úměrně k 9násobnému nárůstu dávky.

Po intraperitoneální aplikaci bylo maximum na křivce průměrná koncentrace-čas (C_{max}) pozorováno ve druhém odběrovém intervalu (5 min) a hodnoty C_{max} se příliš nelišily od koncentrací ve 3 min (Graf 45 B). I po *i.p.* aplikaci byly průběhy koncentračních profilů ve všech dávkových skupinách paralelní a bifazické, ale rychlost poklesu v první a druhé fázi se lišila méně než po *i.v.* podání. Charakteristiky rychlosti a míry biologické dostupnosti C_{max} a $AUC_{0-\infty}$ se v dávkovém rozmezí 10-90 mg/kg zvýšily 11,3krát a 12,6krát, tj. mírně více než přímo úměrně k nárůstu dávky. Absolutní biologická dostupnost F, odhadnutá jako poměr hodnot $AUC_{0-\infty}$ (*i.p./i.v.*) v dávkových skupinách 10, 30 a 90 mg/kg činila 80; 92 a 124 %.

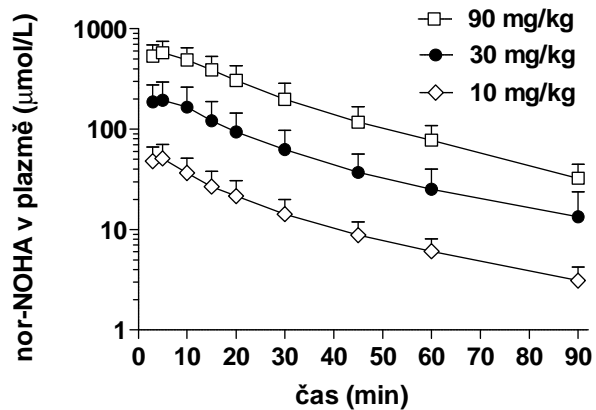
Nejvyšší naměřené koncentrace norNOHA v plazmě po *i.t.* podání aerosolu byly výrazně nižší než po *i.v.* a *i.p.* aplikaci. Další odlišností byly mnohem vyšší hodnoty $t_{1/2}$, které upozornily na ovlivnění výsledku odhadu $t_{1/2}$ v intervalu 45 až 90 min pokračující absorpcí norNOHA z dýchacích cest (flip-flop kinetika). Hodnoty $t_{1/2}$ z tohoto důvodu bylo nutné považovat za falešně zvýšené a nepoužitelné pro výpočet extrapolované části AUC. Pro nemožnost odhadu $AUC_{0-\infty}$ nemohla být vypočítána ani biologická dostupnost F (Tabulka 9).

Graf 45: Průměrné (SD) koncentrace norNOHA v plazmě po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální injekci a intratracheálně formou aerosolu.

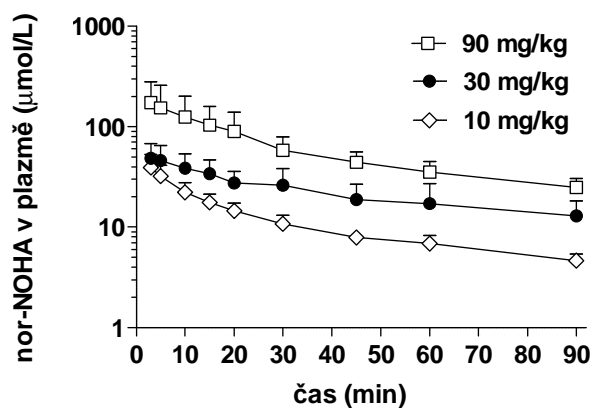
a) Intravenózní injekce



b) Intraperitoneální injekce



c) Intratracheální podání aerosolu



Tabulka 9: Výsledky nekompartmentové farmakokinetické analýzy závislosti průměrné koncentrace norNOHA v plazmě na čase po intravenózním, intraperitoneální a intratracheálním podání v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg.

Parametr	Intravenózní aplikace			Intraperitoneální aplikace			Intratracheální aplikace		
	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
C_{\max} ($\mu\text{mol/l}$) ^a	241	920	2020	51,2	194	579	39,3	48,6	174
T_{\max} (min)	na	na	na	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	3,0
$AUC_{0-90\text{min}}$ (min. $\mu\text{mol/l}$) ^b	1620	6120	13620	1260	5330	16290	989	2050	5320
$AUC_{0-\infty}$ (min. $\mu\text{mol/l}$)	1710	6380	13980	1380	5840	17360	ne	ne	ne
$t_{1/2}$ (min)	28,5	23,8	23,1	27,8	27,5	23,3	51,2	63,5	49,4

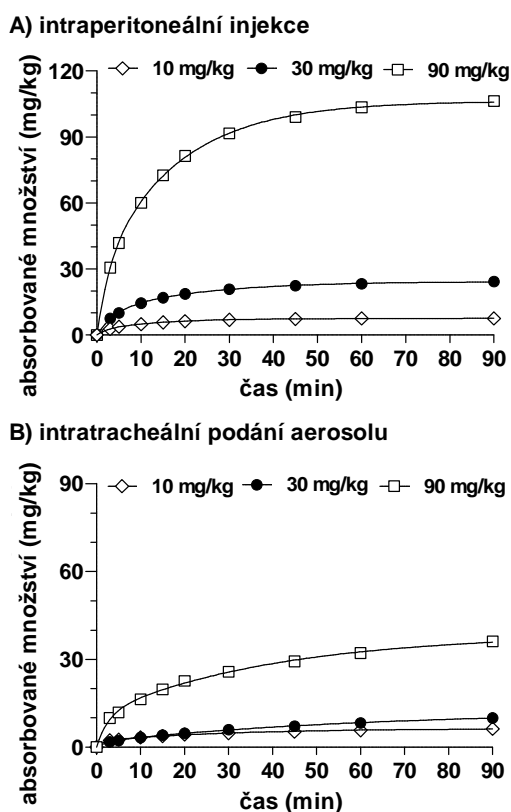
Vysvětlivky: a...koncentrace extrapolovaná do času 0 min (C_0) je uvedena pro i.v. podání; b...poslední interval odběru vzorku 90 min; na...neaplikovatelné pro i.v. podání, ne...parametr nemohl být odhadnut (extrapolace AUC nebyla provedena, protože vysoká hodnota $t_{1/2}$ odhadnutého v intervalu 45-90 min po i.t. podání ukázala na pokračující absorpci nor-NOHA)

Analýza kinetiky absorpce norNOHA po intraperitoneální a intratracheální aplikaci dekonvolucí profilů průměrných plazmatických koncentrací (Graf 46).

Pro obě cesty podání a ve všech 3 dávkových skupinách vystihoval kinetiku absorpce lépe biexponenciální než monoexponenciální model ($p < 0,002$). Koeficient determinace r^2 charakterizující těsnost proložení experimentálních dat modelem byl vždy vyšší než 0,999. Parametry modelu uvádí tabulka 10. Přesnost odhadu charakterizovala standardní chyba menší než 15 % u všech parametrů absorpce.

Po aplikaci *i.p.* a *i.t.* probíhala absorpce dvěma paralelními procesy: rychlejším a_1 s podobnými hodnotami poločasu $t_{1/2,a_1}$ a pomalejším a_2 s hodnotami $t_{1/2,a_2}$, které byly delší po *i.t.* než *i.p.* podání. Hodnota $t_{1/2,a_2}$ po *i.p.* podání byla v rozmezí 10-15 min zatímco pro *i.t.* aplikaci byla v rozmezí 21-42 min. Hodnoty F po *i.p.* podání odhadnuté dekonvolucí (Tabulka 10) a jako poměr celkových ploch pod křivkou (Tabulka 9) byly podobné. Dekonvolucí odhadnuté hodnoty F po *i.t.* aplikaci aerosolu po dávkách 30 a 90 mg/kg byly výrazně nižší než po podání stejných dávek *i.p.* (Tabulka 10).

Graf 46: Analýza kinetiky absorpce norNOHA po A/ intraperitoneální a B/ intratracheální aplikaci dekonvolucí profilů průměrných plazmatických koncentrací. Křivky byly získány fitováním parametrů biexponenciálního modelu na experimentální data.



Tabulka 10: Kinetika absorpce norNOHA dekonvolucí po intraperitoneální a intratracheální aplikaci v dávkách 10, 30 and 90 mg/kg. Parametry biexponenciálního modelu.

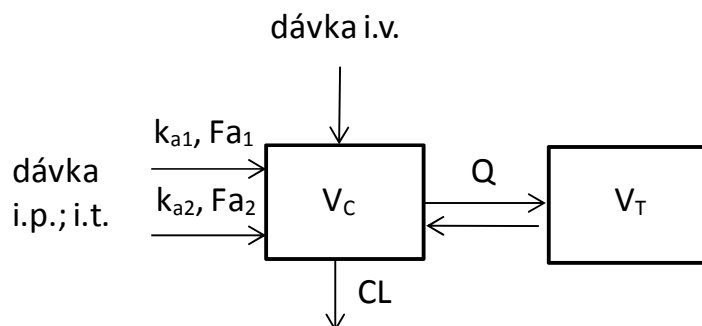
Parametry ^a	Intraperitoneální aplikace			Intratracheální aplikace		
	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
k_{a1} (min^{-1})	0,47	0,26	0,36	0,71	0,40	0,37
k_{a2} (min^{-1})	0,071	0,046	0,056	0,033	0,017	0,025
$t_{1/2,a1}$ (min)	1,5	2,7	2,0	0,98	1,7	1,9
$t_{1/2,a2}$ (min)	9,7	15,2	12,3	20,8	41,9	27,5
F_{a1} (%)	23,2	33,7	30,6	20,5	5,6	12,1
F_{a2} (%)	52,9	47,7	87,4	43,3	35,3	30,9
F (%) ^b	76,1	81,4	118	63,8	40,9	43

Vysvětlivky: a... absorpce probíhala paralelně dvěma procesy rychlejším (a_1) a pomalejším (a_2);
b...biologická dostupnost (F) a části dávky dostupné rychlým (F_{a1}) a pomalejším procesem absorpce (F_{a2})

Populační farmakokinetická analýza.

Koncentrace norNOHA v plazmě po *i.v.* podání nejlépe vystihl dvou-kompartmentový model s eliminací prvního řádu z centrálního kompartmentu. Při hodnocení modelu byla použita grafická a statistická analýza odchylek mezi naměřenými a predikovanými koncentracemi. Všechny parametry modelu byly přesně odhadnuty, což doložila nízká hodnota relativní chyby odhadu (RSE v rozmezí 6 až 12 % pro všechny parametry, viz tabulka 11).

Obrázek 9: Schematické znázornění struktury farmakokinetického modelu.



Vysvětlivky: CL...clearance; zdánlivý distribuční objem centrálního (V_C) a periferního (V_T) kompartmentu; Q ...mezi kompartmentová clearance rychlostních konstant absorpčních procesů a_1 a a_2 (k_{a1} a k_{a2}); absolutní biologická dostupnost – části celkové hodnoty F , na nichž se podílely absorpční procesy a_1 a a_2 (F_{a1} a F_{a2}).

Tabulka 11: Populační farmakokinetické parametry norNOHA.

Parametr	<i>I.v.</i> aplikace		<i>I.p.</i> aplikace		<i>I.t.</i> aplikace	
	Průměr (RSE)	IIV	Průměr (RSE)	IIV	Průměr (RSE)	IIV
V _C (l/kg)	0,19 (6%)	24%	0,18 (4%)	ne	0,17 (4%)	ne
V _T (l/kg)	0,43 (12%)	63%	0,42 (3%)	ne	0,39 (2%)	ne
CL (ml/min.kg ⁻¹)	33,1 (8%)	44%	30,4 (5%)	ne	32,1 (4%)	ne
Q (ml/min.kg ⁻¹)	16,9 (9%)	47%	17,3 (6%)	ne	16,6 (5%)	ne
F _{a1} (%)	na	na	27 (13%)	36%	14 (20%)	72%
F _{a2} (%)	na	na	71 (11%)	52%	39 (5%)	14%
k _{a1} (min ⁻¹)	na	na	0,31 (12%)	23%	0,22 (12%)	24%
k _{a2} (min ⁻¹)	na	na	0,071 (10%)	31%	0,016 (11%)	21%
Residual variability	0,14 (6%)	na	0,28 (4%)	na	0.16 (4%)	na

Vysvětlivky: RSE...relativní chyba; IIV...interindividuální variabilita; na...neaplikovatelné pro i.v. podání, ne..parametr nemohl být odhadnut

Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů pro *i.v.* podání norNOHA získaných pomocí Bayesovy metody odhadu obsahuje tabulka 12. Individuálně odhadnuté koncentrace norNOHA velmi dobře souhlasily s naměřenými hodnotami (Graf 47). Průměrná chyba odhadu byla -0,3 % (95% IS:-1,6 až 1,1 %) a průměrná absolutní chyba byla 7,7 % (95% IS:6,7-8,6 %). Celková (CL) a interkompartimentová (Q) clearance a zdánlivý distribuční objem centrálního kompartmentu (V_C) nezávisely na dávce. Distribuční objem periferního kompartmentu (V_T) a eliminační poločas druhé fáze beta (t_{1/2β}) byly nižší po dávce 90 mg/kg v porovnání s dávkou 10 mg/kg (tabulka 12). Závislosti mezi středními hodnotami C₀ a AUC₀ po *i.v.* podání a dávkou jsou znázorněny na grafu 48. Poměru velikostí dávek 1:3:9 (10, 30 a 90 mg/kg) odpovídaly poměry středních hodnot farmakokinetických parametrů v jednotlivých dávkových skupinách 1:3,2:7,4 (C₀) a 1:3,4:7,3 (AUC₀). Zvýšení C₀ a AUC₀ při vzestupu dávky z 10 na 90 mg/kg bylo tedy o 19 % nižší než odpovídající nárůstu dávky. Nicméně analýza rozptylu aplikovaná na dávkově normalizované hodnoty parametrů (C₀ /dávka a AUC_{0-∞} /dávka), neprokázala statisticky významné rozdíly mezi dávkovými skupinami a tedy farmakokinetickou nelinearitu u parametrů C₀ (p=0,12) a AUC_{0-∞} (p=0,30) (tabulka 12).

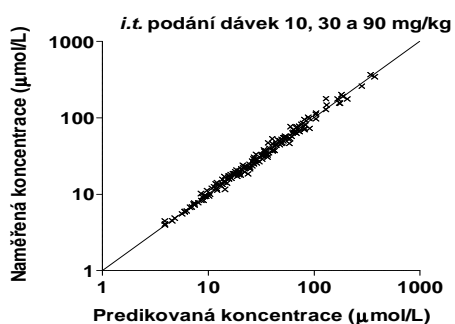
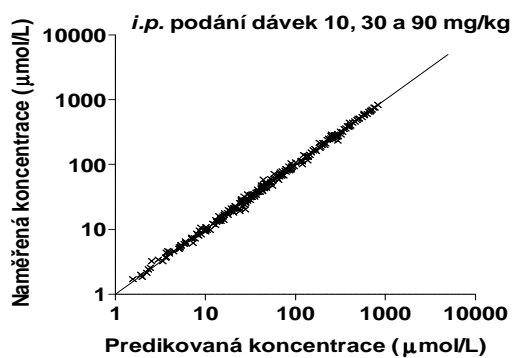
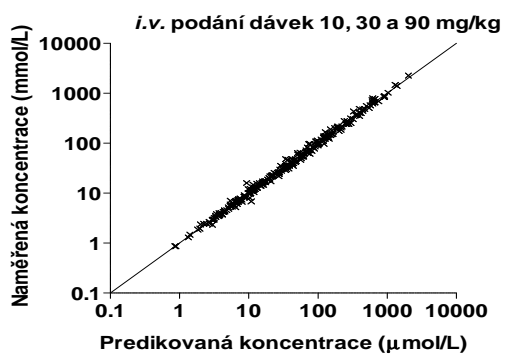
Populační modelování farmakokinetiky nor-NOHA v plazmě po *i.p.* podání bylo provedeno spolu s koncentračními údaji po *i.v.* aplikaci. Jako počáteční hodnoty parametrů

CL, Q, V_C a V_T byly použity populační odhady získané samostatným modelováním koncentrací po *i.v.* podání. Strukturu farmakokinetického modelu znázorňuje obrázek 9.

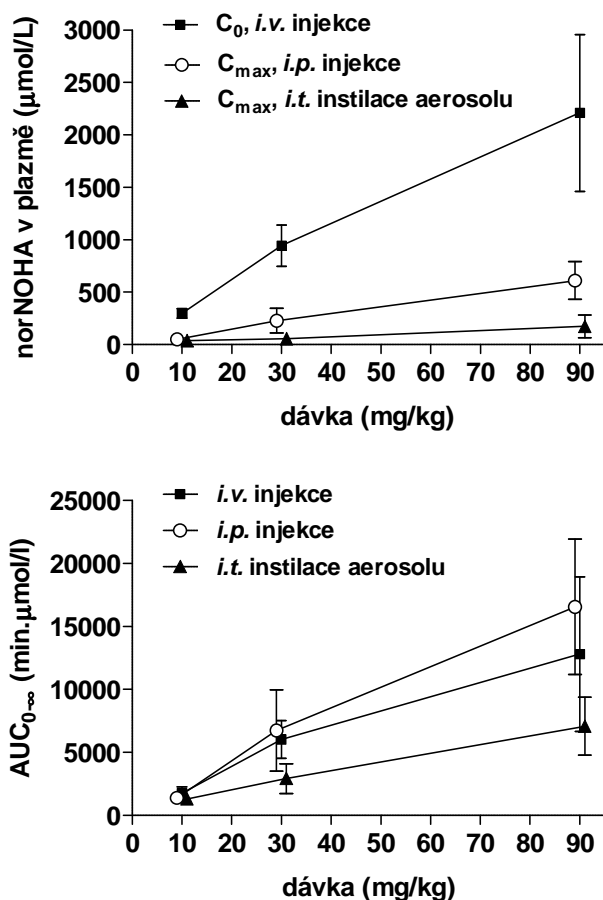
V souladu s výsledky dekonvoluce model předpokládá dva paralelní procesy absorpce a_1 a a_2 . Tento postup vedl k přesným odhadům farmakokinetických parametrů F_{a1} , F_{a2} , k_{a1} a k_{a2} se standardní chybou odhadu v rozmezí 10 až 13 % (tabulka 11). Populační střední hodnoty rychlostních konstant absorpce k_{a1} a k_{a2} činily 0,31 a 0,071 min^{-1} a odpovídající poločasy absorpce $t_{1/2a1}$ a $t_{1/2a2}$ dosáhly hodnot 2,2 a 9,8 min. V porovnání s pomalejším procesem a_2 se z místa absorpce vstřebala menší část dávky rychlým procesem a_1 ($F_{a1}=27$ %, $F_{a2}=71$ %). Mezi dávkovými skupinami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách většiny parametrů farmakokinetického modelu (tabulka 9). Hodnoty F a F_{a2} se s dávkou zvyšovaly ($p<0,0001$). Zdánlivý distribuční objem periferního kompartmentu V_T byl největší po dávce 10 mg/kg. Relativní zvýšení průměrné hodnoty C_{max} (1:4,5:12) a hodnoty $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1:4,9:12) byla vyšší než odpovídající relativní změny dávky (1:3:9; graf 48). Dávkově normalizované hodnoty pro C_{max} a $\text{AUC}_{0-\infty}$ ukazovaly trend k nižším hodnotám po dávce 10 mg/kg než po vyšších dávkách, ale statistická významnost rozdílů byla pouze hraniční ($p=0,13$ a $p=0,056$; tabulka 13). Stejně jako v případě *i.v.* podání tedy farmakokinetika nevykázala významné odchylky od linearity. V rozmezí aplikovaných dávek norNOHA bylo C_{max} po *i.p.* podání nižší než C_0 po *i.v.* podání ($p<0,001$). V hodnotách $\text{AUC}_{0-\infty}$ nebyly nalezeny mezi oběma cestami podání statisticky významné rozdíly.

Výsledky simultánního modelování koncentračních dat po *i.t.* a *i.v.* aplikaci ukazují, že kinetika absorpce norNOHA z dýchacích cest je v porovnání s kinetikou po *i.p.* podání charakterizována nižší hodnotou biologické dostupnosti F (53 %) a 4krát nižší hodnotou absorpční konstanty k_{a2} . Absorpční proces a_2 byl výrazně pomalejší při absorpci z dýchacích cest: poločas $t_{1/2a2}$ byl 43,3 min ve srovnání s 9,8 min po *i.p.* podání. Vztah mezi dávkou a C_{max} a $\text{AUC}_{0-\infty}$ uvádí graf 48. Relativnímu zvýšení dávky v poměru 1:3:9 odpovídal výrazně nižší než proporcionalní nárůst C_{max} (1:1,5:4,6) i $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1:2,2:5,4).

Graf 47: Ověření kvality predikce plazmatických koncentrací norNOHA Bayesovou metodou s využitím populačního farmakokinetického modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální injekci a intratracheálně formou aerosolu.



Graf 48: Závislosti mezi středními hodnotami (\pm SD) C_0 , C_{\max} a $AUC_{0-\infty}$ po *i.v.*, *i.p.* a *i.t.* podání a dávkou.



Normalizovaná hodnota C_{\max} , tj. poměr C_{\max} /dávkou, byla signifikantně vyšší po dávce 10 mg/kg v porovnání s vyššími dávkami. Poměr $AUC_{0-\infty}$ /dávkou se snižoval s rostoucí dávkou a signifikantní rozdíl byl nalezen mezi dávkovými skupinami 10 a 90 mg/kg (tabulka 13). Hodnota CL byla signifikantně vyšší a $t_{1/2\beta}$ byl kratší po dávce 90 mg/kg v porovnání s dávkou 10 mg/kg. Hodnota F byla signifikantně vyšší po dávce 10 mg/kg v porovnání s ostatními dávkami (tabulka 13). Také po *i.t.* podání naměřené koncentrace norNOHA výborně souhlasily s koncentracemi predikovanými populačním modelem (graf 48). Ukazatele správnosti a přesnosti predikce MPE a MAPE dosáhly hodnot 0,7% (98-% CI: -0,9 až 2,2) a 7,7%, 95-%CI:6,8-8,6).

Tabulka 12: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního farmakokinetického modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg intravenózní injekcí.

Parametry	Intravenózní injekce		
	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
V_C (l/kg)	0,19±0,03	0,19±0,04	0,21±0,04
V_T (l/kg)	0,72±0,40	0,38±0,21	0,37±0,14 ^a
CL (ml/min.kg ⁻¹)	37,8±14,1	32,7±13,7	42,8±14,5
Q (ml/min.kg ⁻¹)	23,3±9,6	14,7±6,5	18,5±7,6
C_0 (μmol/l)	298±46,7	944±197 ^a	2210±749 ^{b,c}
AUC _{0-∞} (min.μmol/l)	1760±794	6030±2220 ^a	12800±7350 ^{b,c}
C_0 /dávka	5,3±0,8	5,5±1,2	4,3±1,5
AUC _{0-∞} /dávka	31,0±14,0	35,4±14,0	25,1±14,4
$t_{1/2\alpha}$ (min)	2,3±0,55	2,8±0,74	2,4±0,68
$t_{1/2\beta}$ (min)	35,4±11,6	26,5±4,5 ^a	21,4±3,2 ^b

Vysvětlivky: a...signifikantně odlišné od skupiny 10 mg/kg ($p < 0,05$); b...signifikantně odlišné od skupiny 10 mg/kg ($p < 0,01$); c...signifikantně odlišné od skupiny 30 mg/kg ($p < 0,01$).

Tabulka 13: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního modelu po jednorázovém podání 10, 30 a 90 mg/kg norNOHA intraperitoneální injekcí a intratracheálně.

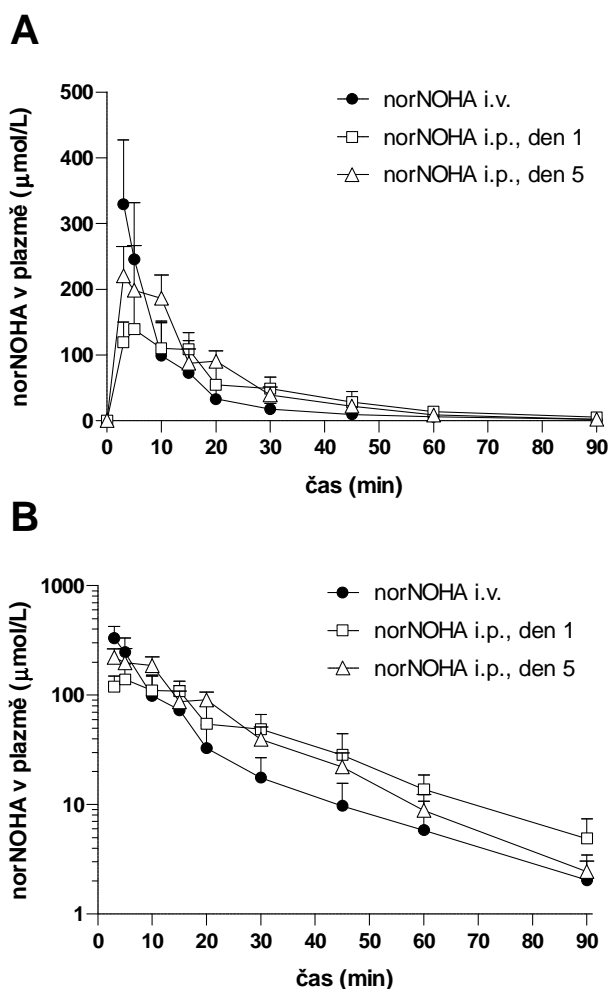
Parametr	Intraperitoneální injekce			Intratracheální podání aerosolu		
	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
V _C (l/kg)	0,23±0,048	0,22±0,10	0,25±0,066	0,15±0,03	0,17±0,04	0,19±0,02 ^a
V _T (l/kg)	0,66±0,27	0,42±0,22 ^a	0,50±0,28 ^b	0,38±0,021	0,39±0,012	0,39±0,018
CL (ml/min.kg ⁻¹)	35,2±7,8	34,2±19,4	37,4±9,5	28,2±3,7	31,6±8,5	40,0±5,5 ^b
Q (ml/min.kg ⁻¹)	27,2±9,8	16,5±8,3	22,9±12,1	16,9±0,52	17,1±2,6	16,6±0,50
T _{max} (min)	4,4 (3,5-5,6)	4,8 (4,6-5,2)	5,3 (4,2-6,5)	3,3 (2,4-4,5)	2,0 (1,9-2,2)	4,9 (3,3-5,7) ^d
C _{max} (μmol/l)	51,2±18,9	229±118 ^a	612±179 ^{e,f}	38,3±11,8	55,9±26,0	175±109 ^{a,c}
AUC _{0-∞} (min.μmol/l)	1380±323	6730±3510 ^a	16560±5830 ^{e,f}	1300±135	2920±1180 ^b	7070±2290 ^{d,e}
C _{max} /Dávka	0,90±0,33	1,3±0,69	1,2±0,35	0,67±0,21	0,33±0,15 ^b	0,34±0,21 ^b
AUC _{0-∞} /Dávka	24,4±5,7	39,5±20,6	32,4±11,4	23,0±2,4	17,2±6,9	13,8±4,5 ^b
t _{1/2α} (min)	2,2±0,22	2,3±0,19	2,4±0,23	3,2±0,11	3,3±0,06	3,2±0,08
t _{1/2β} (min)	35,8±13,0	28,2±6,7	27,8±15,2	44,7±5,6	43,3±10,5	34,0±3,7 ^b
k _{a1} (min ⁻¹)	0,31±0,07	0,30±0,05	0,29±0,08	0,24±0,049	0,22±0,007	0,21±0,030
k _{a2} (min ⁻¹)	0,077±0,039	0,054±0,018	0,075±0,027	0,016±0,002	0,015±0,001	0,016±0,002
t _{1/2,a1} (min)	2,2±0,12	2,3±0,08	2,4±0,16	3,0±0,55	3,1±0,11	3,4±0,48
t _{1/2,a2} (min)	10,1±3,4	14,4±5,8	10,2±3,3	43,4±4,4	46,6±3,9	44,8±4,6
F (%)	82,0±6,7	102±2,1 ^e	112±11,1 ^{c,e}	63,2±7,8	50,0±3,3 ^b	53,9±7,7
F _{a1} (%)	26,1±5,8	33,1±2,0	31,5±9,3	19,9±9,3	13,6±4,7	13,0±6,6
F _{a2} (%)	55,9±5,5	68,6±12,5 ^a	80,5±10,6 ^{d,e}	43,0±2,5	36,4±2,9 ^a	40,9±2,3 ^c

Vysvětlivky: a...(p<0,01); b...(p<0,05); e...(p<0,001) signifikantně odlišné od skupiny 10 mg/kg; c...(p<0,0), d...(p<0,01), f...(p<0,001), signifikantně odlišné od skupiny 30 mg/kg

5.3.2. Opakované intraperitoneální podání norNOHA

Graf 49 znázorňuje průměrné koncentrace (+SD) norNOHA v plazmě potkanů v závislosti na čase po podání 30 mg/kg jednorázově *i.v.* a *i.p.* a po 5. dávce po opakovaném *i.p.* podávání jednou denně v intervalu 24 hod (den 5). Farmakokinetické parametry odhadnuté nekompartmentovou analýzou (NCA) z profilů průměrné koncentrace a výsledky dekonvoluční analýzy shrnuje tabulka 14.

Graf 49: Průměrné (SD) koncentrace norNOHA v plazmě vynesené na A/ lineární a B/ logaritmické stupnici v závislosti na čase po jednorázovém podání dávky 30 mg/kg v intravenózní a intraperitoneální (*i.p.* den 1) injekci a po 5. dávce po opakovaném *i.p.* podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (*i.p.* den 5).



Tabulka 14: Výsledky nekompartmentové analýzy a analýzy absorpční kinetiky dekonvolucí závislostí průměrné koncentrace norNOHA v plazmě na čase po jednorázovém intravenózním (*i.v.* aplikace) a intraperitoneálním (*i.p.* aplikace, den 1) podání dávky 30 mg/kg a po 5. dávce po opakovaném intraperitoneálním podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (*i.p.* aplikace, den 5).

Parametr	I.v. aplikace	I.p. aplikace, den 1	I.p. aplikace, den 5
C_0, C_{\max} ($\mu\text{mol/l}$) ^a	568	139	221
T_{\max} (min)	na	5	3
AUC_{0-t} (min, $\mu\text{mol/l}$)	4167	3703	4349
AUC (min, $\mu\text{mol/l}$)	4225	3824	4400
λ_z (min^{-1})	0,0348	0,0387	0,0472
$t_{1/2}$ (min)	19,9	17,9	14,7
MRT, MTT (min) ^b	12,5	26,6	19,3
k_{a1} (min^{-1})	na	0,307	0,396
k_{a2} (min^{-1})	na	0,0524	0,0821
$t_{1/2,a1}$ (min)	na	2,26	1,75
$t_{1/2,a2}$ (min)	na	13,2	8,44
F_{a1} (%) ^c	na	31,3	53,1
F_{a2} (%)	na	58,9	51,9
F (%)	na	90,2	105

Vysvětlivky: a...koncentrace extrapolovaná do času 0 min (C_0) je uvedena pro *i.v.* podání; b...MRT, MTT...střední pobytový čas po *i.v.* podání a střední čas tranzitu (=MAT + MRT, kde MAT je střední čas absorpce) po *i.p.* podání absorpce probíhala paralelně dvěma procesy rychlejším (a_1) a pomalejším (a_2), biologická dostupnost (F) a části dávky dostupné rychlým (F_{a1}) a pomalejším procesem absorpce (F_{a2}), rychlostní konstanty a poločasy absorpce, charakterizující absorpční procesy a_1 a a_2 (k_{a1} , k_{a2} , $t_{1/2,a1}$, $t_{1/2,a2}$), na...neaplikovatelné pro *i.v.* podání, ne..parametr nemohl být odhadnut

Po podání *i.v.* injekcí následoval rychlý dvoufázový pokles průměrné koncentrace norNOHA v plazmě. Eliminace byla rychlá, jak dokládá hodnota středního pobytového času (MRT) 12,5 min. Maxima na křivkách koncentrace-čas byla pozorována v 5. a 3. min po první a páté *i.p.* aplikaci. Poměry hodnot (den 5/ den 1) C_{\max} a $AUC_{0-\infty}$ byly 1,6 a 1,15, tj. ukázaly na zvýšení parametrů expozice organismu látkou norNOHA o 60 % (C_{\max}) a 15 % ($AUC_{0-\infty}$) po 5. dávce ve srovnání s dávkou první. Ve všech vzorcích plazmy odebraných bezprostředně před pátou *i.p.* injekcí (den 5) byla koncentrace norNOHA nižší než spodní mez kvantifikace 5 $\mu\text{mol/l}$. Biexponenciální model lépe vystihl kinetiku absorpce než model monoexponenciální ($p < 0,01$). Odhady poločasů pro rychlý (a_1) a pomalý (a_2) absorpční proces dosáhly 2,3 a 13,2 min. (den 1) a 1,8 a 8,4 min. (den 5). Absolutní biologická dostupnost (F) byla 90,2 % (den 1) a 105 % (den 5). Hodnoty F získané dekonvolucí byly v dobré shodě s výsledky výpočtu F jako poměru parametru $AUC_{0-\infty}$ po *i.p.* a *i.v.* podání (tabulka 14).

Výsledky populačně kompartmentového modelování ukázaly, že plazmatické koncentrace norNOHA po *i.v.* injekci dobře vystihuje dvoukompartmentový model s eliminací prvního řádu

z centrálního kompartmentu. Všechny parametry populačního modelu byly přesně odhadnuty. Relativní chyba odhadu (RSE) se pohybovala mezi 8 a 18 % (tabulka 15). Predikce koncentrací Bayesovou metodou s využitím populačního modelu se ukázala být správná a přesná. Chyby predikce charakterizovala střední chyba -2,8 %, která nebyla statisticky odlišná od nuly (95 - % interval spolehlivosti: -7,2 až 1,6) a střední absolutní chyba 11,5 % (95 % CI: -8,4 až 14,6).

Tabulka 15: Parametry populačního farmakokinetického modelu.

Parametr	<i>I.v.</i> aplikace		<i>I.p.</i> aplikace, den 1		<i>I.p.</i> aplikace, den 5	
	Průměr (RSE)	IIV	Průměr (RSE)	IIV	Průměr (RSE)	IIV
V_1 (l/kg)	0,252 (12%)	20%	0,296 (9%)	ne	0,293 (9%)	ne
k_{el} (min^{-1})	0,166 (8%)	16%	0,149 (7%)	ne	0,148 (7%)	ne
k_{12} (min^{-1})	0,050 (16%)	27%	0,034 (11%)	ne	0,035 (11%)	ne
k_{21} (min^{-1})	0,057 (18%)	49%	0,049 (11%)	ne	0,050 (10%)	ne
F_{a1} (%)	ne	ne	32,2 (24%)	18%	25,4 (42%)	34%
F_{a2} (%)	ne	ne	58,6 (15%)	37%	77,6 (15%)	4,9%
k_{a1} (min^{-1})	ne	ne	0,37 (29%)	25%	0,84 (10%)	13%
k_{a2} (min^{-1})	ne	ne	0,051 (12%)	12%	0,089 (14%)	19%
reziduální chyba	0,19 (19%)	ne	0,19 (12%)	ne	0,16 (13%)	ne

Tabulka 16: Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou s využitím populačního modelu po jednorázovém intravenózním (*i.v.* aplikace) a intraperitoneálním (*i.p.* aplikace, den1) podání dávky 30 mg/kg a po 5. dávce po opakovaném intraperitoneálním podávání stejné dávky jednou denně v intervalu 24 hod (*i.p.* aplikace, den 5).

Parametr	<i>I.v.</i> aplikace	<i>I.p.</i> aplikace, den 1	<i>I.p.</i> i aplikace, den 5
V_C (l/kg)	0,254 (0,210-0,308)	0,297 (0,266-0,331)	0,291 (0,254-0,333)
V_T (l/kg)	0,222 (0,167-0,294)	0,211(0,155-0,285)	0,207 (0,140-0,305)
CL (ml/min.kg ⁻¹)	42,3 (30,0-59,7)	44,3 (36,7-53,6)	43,0 (34,6-53,4)
Q (ml/min.kg ⁻¹)	12,8 (10,4-15,9)	10,2 (8,62-12,1)	10,2 (7,92-13,2)
T_{max} (min)	ne	5,0 (4,3-5,7)	4,0 ^c (3,4-4,7)
$C_0, C_{max}^{\#}$ (μmol/l)	670 ^{ip1, ip5} (553-812)	139 ^{iv, ip5} (111-176)	182 ^{iv, ip1} (141-236)
AUC (min.μmol/l)	4030 (2850-5680)	3502 (2530-4849)	4112 ^{ip1} (3217-5256)
$t_{1/2\alpha}$ (min)	2,89 ^{ip1, ip5} (2,47-3,38)	3,54 ^{iv} (3,30-3,81)	3,53 ^{iv} (3,24-3,87)
$t_{1/2\beta}$ (min)	17,2 (12,9-23,1)	18,8 (15,6-22,5)	18,6 (15,7-22,0)
$t_{1/2,a1}$ (min)	ne	1,9 (1,8-2,0)	0,82 ^c (0,79-0,83)
$t_{1/2,a2}$ (min)	ne	13,6 (13,0-14,3)	7,8 ^c (7,0-8,7)
F (%)	ne	91,2 (78,3-106)	104 ^a (99,1-109)
F_{a1} (%)	ne	32,3 (30,1-34,7)	25,9 ^a (21,2-31,6)
F_{a2} (%)	ne	58,3 (46,1-73,8)	77,6 ^b (77,0-78,2)

Vysvětlivky: a: Uveden je geometrický průměr a interval odpovídající průměru±SD. #...koncentrace extrapolovaná do času 0 (C_0) byla vypočítána po *i.v.* podání; Tukeyův test ($p < 0,05$): *iv*... signifikantně odlišné od výsledku po *i.v.* injekci; *ip1*...signifikantně odlišné od výsledku po první *i.p.* injekci (den 1); *ip5*... signifikantně odlišné od výsledku po páté *i.p.* injekci (den 5). Výsledky *t*- testu srovnávajícího skupiny *i.p.* den 1 a *i.p.* den 5: a... $p < 0,05$; b... $p < 0,01$; c... $p < 0,001$

S ohledem na výsledky dekonvoluční analýzy, byly dva paralelní vstupy prvního řádu a_1 a a_2 přidány do farmakokinetického modelu pro inhibitor norNOHA podaný *i.p.* Pomocí simultánního porovnání dat po *i.p.* a *i.v.* podání bylo možné odhadnout kinetické parametry charakterizující absorpci s přijatelnou přesností (tabulka 16). Populační model vykazoval dobrou správnost a přesnost při predikci koncentrací po první i páté dávce. Střední chyba predikce byla -1,1 % (95-% CI: -5,3 až 3,1) a 0,9 % (95 -% CI: -3,9 až 2,1) a střední absolutní chyba 11,1 % (95-% CI:8,1-14,1) a 6,8 % (95-%CI:4,9-8,7).

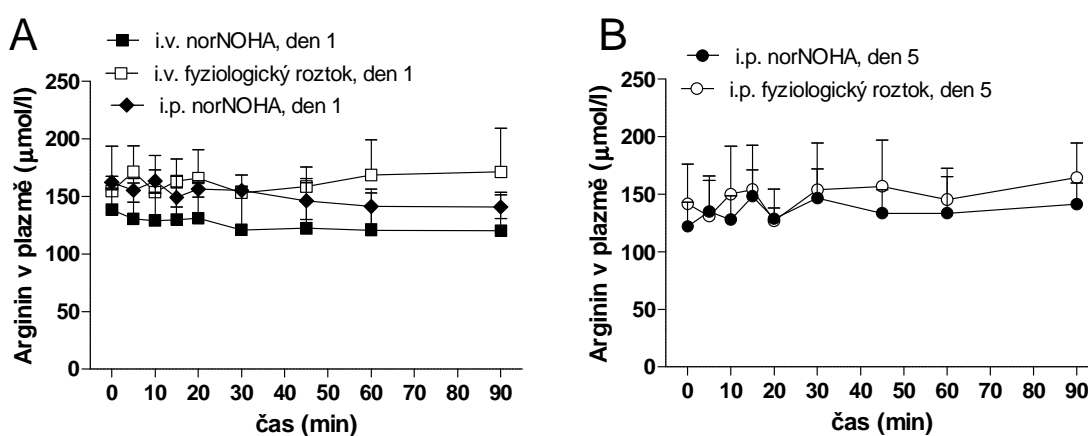
Statistický souhrn individuálních hodnot farmakokinetických parametrů získaných Bayesovou metodou je uveden v tabulce 16. V hodnotách celkové clearance (C_L), interkompartmentové clearance (Q), distribučního objemu centrálního kompartmentu (V_C), distribučního objemu periferního kompartmentu (V_T) a terminálního eliminačního poločasu ($t_{1/2\beta}$) nebyly mezi skupinami signifikantní rozdíly. Poločas $t_{1/2\alpha}$ byl signifikantně kratší po *i.v.*

podání v porovnání s *i.p.* podáním ($p < 0,05$). Podle předpokladů byly nejvyšší počáteční koncentrace norNOHA naměřeny po *i.v.* podání. Průměrná hodnota C_{max} po páté *i.p.* dávce byla o 31 % vyšší než po dávce první ($p < 0,05$) a také hodnota $AUC_{0-\infty}$ vyšší o 17 % ($p < 0,05$) doložila mírný nárůst biologické dostupnosti. Poločasy absorpce $t_{1/2a1}$ a $t_{1/2a2}$ byly kratší po páté *i.p.* aplikaci. Malé ale statisticky signifikantní rozdíly mezi první a pátou *i.p.* aplikací byly zjištěny také v hodnotách F , F_{a1} a F_{a2} (tabulka 16).

Koncentrace aminokyselin v plazmě

Průměrné koncentrace argininu v plazmě v závislosti na čase jsou znázorněny v Grafu 50. Výchozí koncentrace před podáním norNOHA se mezi skupinami nelišily. V rámci žádné skupiny nebyly pozorovány změny v koncentraci plazmatického argininu po podání norNOHA nebo fyziologického roztoku (tabulka 17).

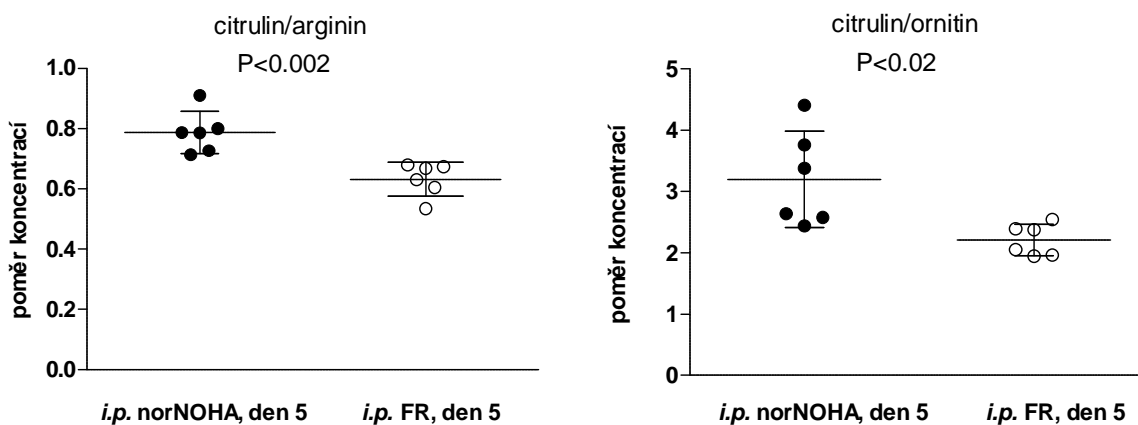
Graf 50: Průměrné (SD) koncentrace argininu v plazmě po *i.p.* a *i.v.* podání norNOHA A/ po první a B/ po páté dávce norNOHA nebo fyziologického roztoku.



Koncentrace aminokyselin v plazmě ve vzorcích odebraných pátý den 90 minut po poslední *i.p.* aplikaci norNOHA a fyziologického roztoku uvádí tabulka 18. Aplikace norNOHA jednou denně po dobu 5. dní měla za následek významné zvýšení koncentrace citrulinu (o 25 %, $p < 0,01$). Hladiny argininu a ornitinu se ve skupině potkanů, kterým byl podáván inhibitor norNOHA, nelišily od výsledků v kontrolní skupině. Průměrná hodnota koncentračního poměru citrulin/ornitin byla 3,2 (SD 0,8) po podání norNOHA, zatímco v kontrolní skupině dosáhla hodnota tohoto poměru 2,2 (SD 0,3). Opakované podávání norNOHA způsobilo tedy zvýšení o 45 % ($p < 0,02$; graf 51). Poměr koncentrací citrulin/arginin se zvýšil o 25 % ($p < 0,002$) z 0,63 (SD 0,056) u kontrolní skupiny na 0,79 (0,070) ve skupině s

aplikací norNOHA, zatímco poměr ornitin/arginin byl v obou skupinách srovnatelný: 0,29 (SD 0,05) vs. 0,26 (SD 0,07), $p=0,42$. U potkanů s aplikací norNOHA byl zaznamenán nárůst koncentrace histidinu (+15 %), glutaminu (+11 %) a threoninu (+28 %), zatímco hladina glycinu byla ve srovnání s kontrolní skupinou o 11 % nižší.

Graf 51: Koncentrační poměr citrulin/arginin a citrulin/ornitin v plazmě 5. den po opakovaných *i.p.* injekcích 30 mg/kg norNOHA (*i.p.* norNOHA, den 5) a fyziologického roztoku (*i.p.* FR, den 5) jednou denně. Uveden je aritmetický průměr \pm SD.



Tabulka 17: Koncentrace argininu v plazmě před aplikací a její změny po jednorázovém podání *i.v.* a *i.p.* a po opakovaném *i.p.* podávání norNOHA v dávce 30 mg/kg jednou denně.

skupina	před aplikací. ($\mu\text{mol/l}$) ^a	koncentrace v procentech hodnoty před aplikací (0 min) ^b									
		0 min	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	45 min	60 min	90 min	
<i>I.v.</i> norNOHA, den 1	139 (18)	100	100 (0,5)	98,0 (5,4)	94,7 (11)	99,0 (11)	94,1 (16)	90,6 (23)	91,8 (19)	93,5 (3,5)	
<i>I.v.</i> FR Den 1	155 (39)	100	97,2 (4,8)	98,1 (11)	101 (12)	108 (13)	96,4 (11)	98,5 (13)	105 (27)	112 (20)	
<i>I.p.</i> norNOHA, den 1	162 (5,3)	100	98,3 (6,9)	106 (8,1)	100 (2,0)	115 (25)	113 (7,9)	92,8 (3,6)	113 (20)	105 (16)	
<i>I.p.</i> norNOHA, den 5	122 (21)	100	100 (0,6)	101 (5,3)	107 (4,2)	115 (6,8)	110 (4,7)	104 (6,0)	102 (6,5)	104 (5,9)	
<i>I.p.</i> FR, den 5	142 (34)	100	100 (3,6)	97,7 (5,4)	106 (8,2)	103 (9,3)	110 (16)	101 (15)	108 (13)	115 (12)	

Vysvětlivky: a...ANOVA aplikovaná na koncentrace před podáním norNOHA neprokázala rozdíly mezi skupinami ($p=0,39$); b...ANOVA pro opakované pozorování aplikovaná na relativní změny koncentrace argininu nenalezla statisticky významné změny v žádné skupině ($p>0,60$)

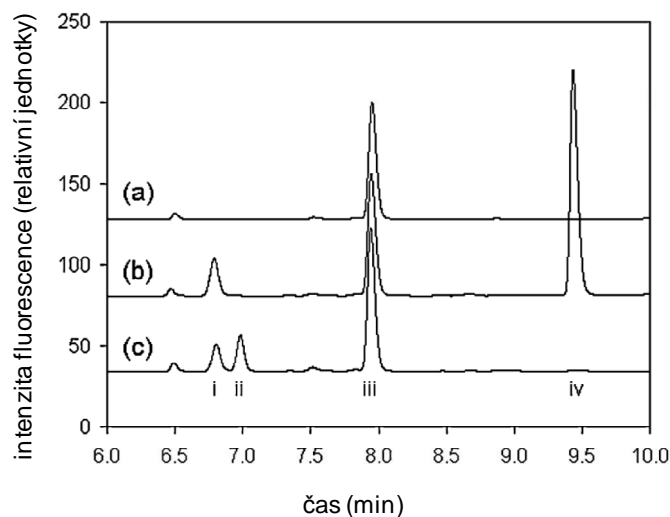
Tabulka 18: Koncentrace aminokyselin v plazmě (μmol/l).

	<i>I.p.</i> norNOHA, Den 5		<i>I.p.</i> fyz.roztok, Den 5		Fold-diff.	P-value
	Průměr	SD	Průměr	SD		
kys. glutamová	65,5	13,7	72,7	15,3	0,90	0,41
serin	178	22,7	201	12,0	0,89	0,058
asparagin	55,6	6,03	53,4	8,63	1,04	0,62
glycin	278	19,0	312	31,8	0,89	0,047
glutamin	638	51,2	577	22,1	1,11	0,024
histidin	75,6	8,16	66,0	2,13	1,15	0,019
taurin	167	57,8	120	17,0	1,39	0,16
threonin	339	49,3	264	35,2	1,29	0,012
citrulin	105	10,3	83,6	12,3	1,25	0,0093
alanin	496	54,3	484	63,7	1,02	0,75
arginin	134	19,7	132	10,0	1,02	0,82
prolin	174	26,5	161	20,9	1,08	0,38
tyrosin	83,1	6,80	80,2	10,1	1,04	0,58
valin	240	34,2	207	21,9	1,16	0,075
methionin	50,7	9,64	48,7	4,41	1,04	0,64
ornitin	34,5	9,61	38,7	9,51	0,89	0,47
izoleucin	127	17,9	111	13,4	1,15	0,098
leucin	223	28,6	192	23,2	1,16	0,063
lyzin	350	22,0	334	28,6	1,05	0,30
fenylalanin	88,4	7,09	79,4	9,84	1,11	0,100

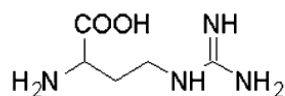
5.3.3. Identifikace metabolitu norNOHA v potkaní plazmě

Na chromatogramech vzorků plazmy po podání norNOHA potkanům byl pozorován pík neznámé látky, označené za možný metabolit norNOHA (Graf 52). Tento pík nebyl přítomen na chromatogramech extraktů plazmy po přidání norNOHA k vzorkům plazmy nebo plné krve potkana a inkubaci *in vitro* při teplotě 37 °C. Molekulová hmotnost iontu a dceřiných iontů z experimentu MSⁿ s přihlédnutím k fragmentačnímu schématu ukázala na nor-arginin jako pravděpodobný metabolit norNOHA (Obrázek 10) (Hroch et al. 2012)

Graf 52: Reprezentativní chromatogramy a) extraktu plazmy potkana (blank), b) extraktu plazmy potkana s přidavkem norNOHA (i, 50 μ M), argininu (iii, 147 μ M) a vnitřního standardu N-monnoethylargininu (iv, 200 μ M) a c) extraktu plazmy potkana odebrané v čase 5 min. po podání 10 mg/kg norNOHA *i.v.* s píkem neznámého metabolitu (ii).



Obrázek 10: Strukturní vzorec norargininu.

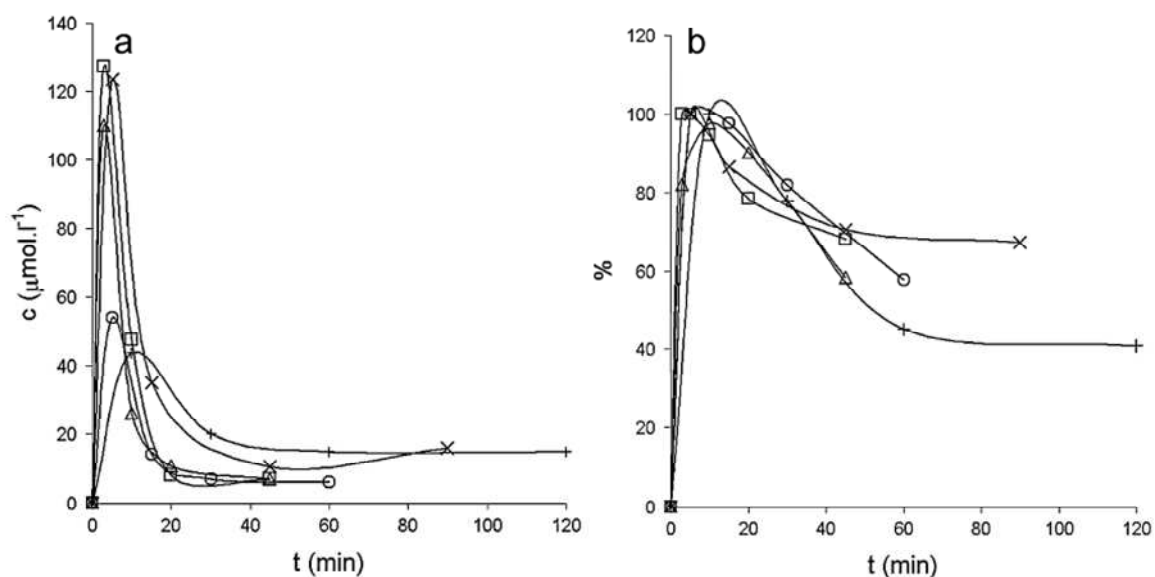


Pro další identifikaci byl zakoupen standard norNOHA od společnosti IS Chemical Technology (Šanghaj, Čína). Látka ale nebyla dodána v požadované čistotě a s analytickým certifikátem. Proto nabyla použita jako kalibrační standard pro stanovení norargininu.

Z důvodu dalšího potvrzení výsledku identifikace neznámé látky jako nor-argininu, byla látka přidána do plazmy potkana, vzorek byl podroben extrakci a derivatizaci a nastříknut na kolonu. Retenční čas derivátu se shodoval s píkem neznámé látky a identifikace byla potvrzena na základě iontu $[M+H]^+$ s poměrem m/z 365, aduktu $[M+Na]^+$ s poměrem m/z 387 a dimeru $[2M+H]^+$ s poměrem m/z 729. Další potvrzení poskytla spektra MS^1 až MS^4 derivátu standardu norNOHA s OPA připraveného v ultračisté vodě infundovaného do proudu mobilní fáze bez přítomnosti chromatografické kolony (Hroch et al. 2012). Koncentrace nor-argininu v plazmě se po podání 10 mg/kg norNOHA potkanům Wistar jako *i.v.* bolus snižovaly ve srovnání s norNOHA podstatně

pomaleji (Graf 53). Jelikož nebyla možná kvantifikace norargininu pro nedostupnost standardu o dostatečné kvalitě, bylo použito relativního vyjádření pomocí ploch píků.

Graf 53: Koncentrace norNOHA (a, μM) a nor-argininu (b, relativní vyjádření v procentech plochy největšího píku) v plazmě potkanů Wistar ($n=5$) po podání 10 mg/kg norNOHA *i.v.*.



6. Diskuze

6.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana Wistar

Provádění klinických studií s nemocnými v kritickém stavu je mimořádně obtížné. Z tohoto důvodu mají experimentální modely orgánového poškození a selhávání indukovaného sepsí nebo jiné etiologie velký význam pro studium patobiochemických a patofyziologických změn spojených s těmito stavy a pro ověřování farmakoterapeutických postupů nebo vyhledávání nových cílů ovlivnitelných léčiv. V literatuře jsou dostupné přehledové práce, které hodnotí přednosti a slabiny experimentálních modelů zejména z pohledu toho, jak dobře odrážejí patogenezí a klinické projevy sepse u pacientů a jaké existují limity při extrapolaci výsledků preklinických studií do klinické praxe (Poli-de-Figueiredo et al. 2008; Rittirsch et al. 2007).

Model endotoxémie po podání bakteriálního LPS je jednoduchý a často využívaný. Jinou možností představuje intravenózní podání baktérií nebo bakteriémie způsobená porušením slizničních bariér např. cekální ligací a punkcí (Doi et al. 2009). Lipopolysacharidový model především dobře odráží první (hyper-)zánětlivou fázi gramnegativní bakteriální sepse s charakteristickým zvýšením cytokinů jako TNF- α a IL-1 β , následovanou imunitní odpovědí, která zahrnuje uvolnění dalších cytokinů (např. IL-6, IL-8, IL-10), indukci cyklooxygenázy II, expresi integrinů, aktivaci komplementu, indukci oxidu dusnatého a mnoho dalších změn. K projevům endotoxémie po podání LPS patří dysfunkce endotelu se zvýšenou permeabilitou, progredující vazodilatace a pokles krevního tlaku, akutní poškození plic, akutní poškození ledvin s hypoperfúzí a poklesem glomerulární filtrace a šokový stav s projevy tkáňové hypoxie.

Na druhou stranu je potřebné zmínit některé nedostatky LPS modelu. Především, vnímavost k účinkům LPS je mnohem vyšší u člověka než u hlodavců. Proto jsou za vhodnější považovány velké živočišné druhy jako např. prase a ovce, ale velkým problémem je pracovní náročnost a nákladnost experimentů. Často je kritizováno, že studie jsou prováděny s velmi mladými a zdravými zvířaty, zatímco v klinické praxi se sepse rozvíjí především u starých osob s komorbiditami nebo u imunosuprimovaných nemocných. Preklinické studie se od klinické praxe dále liší způsobem farmakoterapie, která bývá selektivní a pomíjí běžné další postupy při sepsi jako volumoterapii krystaloidy a/nebo koloidy, antibiotickou léčbu a podávání katecholaminů (Dellinger et al. 2013;

Dorresteijn et al. 2005). Na rozdíl od klinické praxe je farmakoterapie v experimentálních studiích zahajována v časných stádiích rozvoje sepse nebo se jedná o profylaktické podávání před indukcí sepse. U většiny nemocných je diagnóza stanovena za 12-24 hod po rozvoji sepse a léčba naopak probíhá v podmínkách více nebo méně rozvinutého orgánového poškození. Zatímco u nemocných i vlivem terapie dochází k hyperkinetické cirkulaci, u experimentálních modelů se v publikacích často setkáváme s hypodynamickým stavem, hypovolémií a výrazným poklesem srdečního výdeje, krevního tlaku a orgánové perfúze (Doi et al. 2009; Sadowitz et al. 2011; Tarpey et al. 1998).

Intraperitoneální injekce 5 mg/kg LPS z *E. coli* serotyp 055:B5 v našich podmínkách nevedla k úmrtí potkanů, zatímco po dávce 10 mg/kg jsme pozorovali 20% mortalitu. Jiní autoři po dávce 5 mg/kg *i.p.* pozorovali 50% mortalitu u mladých i starých potkanů Wistar (Tanira et al. 1997).

Vzhledem k cíli práce studovat metabolickou dráhu arginin-NO a možnosti jejího ovlivnění inhibitorem argináz u onemocnění dýchacích cest spojených s indukcí iNOS a zvýšenou produkcí NO je žádoucí porovnat výsledky LPS modelu a změny stejné metabolické dráhy doprovázející sepsi u nemocných popisované v publikacích. Po *i.p.* aplikaci LPS došlo u potkanů k výraznému zvýšení hladiny exhalovaného eNO a koncentrace NO_x v bronchoalveolární tekutině a plazmě. Zvýšení bylo zaznamenáno již ve 2. hod od podání a maximum koncentrace eNO bylo mezi 4. a 6. hod od aplikace (graf 1). Za 48 hod se koncentrace eNO snížila na úroveň kontrolní skupiny. Popsaný časový profil koncentrací eNO odpovídá literárním údajům (Lee et al. 2001; Rolla et al. 1997). Lee a spolupracovníci pozorovali dávkové závislý lineární nárůst eNO po *i.v.* dávkách LPS *E. coli* v rozmezí 1 až 10 mg/kg *i.v.* s maximem ve 4. hod u potkana Sprague-Dawley. Zvýšení dávky na 20 mg/kg další nárůst eNO nezpůsobilo (Lee, et al. 2001). V naší práci jsme našli rozdíl mezi podáním stejné dávky LPS *i.p.* a *i.t.* cestou. Po *i.p.* aplikaci došlo k výrazně vyššímu nárůstu eNO a koncentrací NO_x jak v BAL tak v plazmě. Nezávisle na cestě podání způsobil LPS indukci exprese iNOS proteinu v homogenátu plicní tkáně v 6. hod. Exprese iNOS na úrovni proteinu byla zvýšena také v játrech. Exprese proteinu eNOS se po podání LPS nezměnila. Exprese mRNA iNOS byla zvýšena ve 3. i 6. hod po *i.p.* podání. Za 6 hod byla exprese iNOS na úrovni mRNA zvýšená více v játrech než v plicích. Časné zvýšení exprese iNOS na úrovni mRNA již ve třetí hodině s následným poklesem je jev, který je uváděn ve větším počtu studií (Agorreta et al. 2003; Mori et al. 1998). Oproti zvýšené expresi iNOS mRNA byla exprese eNOS mRNA v plicích v porovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší. Existují poznatky

z recentních studií, že up-regulace argináz, kterou jsme ukázali i v naší studii, následně vede k inhibici aktivace a exprese eNOS (Durante et al. 2007). Po *i.t.* aplikaci jsme expresi mRNA iNOS nesledovali. Také výsledky dalších publikovaných studií doložily, že systémové nebo inhalační podání LPS je následováno indukci iNOS, zvýšením eNO a koncentrací NO_x v plazmě, BAL a v tkáních potkana (Bachetti et al. 2003; Birrell et al. 2006; Su et al. 2007).

Podání LPS *i.t.* vedlo v soulase se závěry jiných autorů (Xia et al. 2007) k projevům zvýšeného oxidačního stresu v dýchacích cestách (zvýšená koncentrace MDA v BAL). Ve srovnání s *i.p.* injekcí byla větší infiltrace leukocytů a neutrofilů do dýchacích cest a byly nalezeny vyšší koncentrace celkové bílkoviny v BAL. Zvýšená koncentrace celkové bílkoviny v BAL je jedním ze znaků poškození alveolokapilární membrány, které je pro ALI/ARDS charakteristické. Také zvýšené procentuální zastoupení neutrofilů je považováno za charakteristický znak ALI (Liu et al. 2013; Tulić et al. 2001). Změny těchto parametrů oproti skupině s *i.p.* podáním fyziologického roztoku byly pozorovány i ve skupině s *i.t.* podáním fyziologického roztoku, což ukazuje na příspěvek samotné intratracheální kanylace k patologickým změnám. Podání formou aerosolu nebulizací jsme původně zkoušeli, ale ukázalo se, že plicní dávka a účinky LPS jsou značně nereprodukovatelné. Inhalační a v menší míře intratracheální podání LPS je vhodný model respirační infekce gram-negativními bakteriemi, ale také zánětlivých procesů a poškození dýchacích cest po inhalaci prachových částic s vysokým zastoupením organické hmoty jako např. v zemědělství a potravinářském průmyslu (mlýny). Cigaretový kouř obsahuje významné koncentrace LPS, který tak přispívá k progresi CHOPN a zvyšuje počet exacerbací. Experimentální modely s inhalací LPS mají tedy výpovědní hodnotu i ve vztahu k neutrofilnímu zánětu u CHOPN a jeho akutnímu vzplanutí při exacerbaci (Kharitonov et al. 2007; Möller et al. 2012; Thorn 2001).

Bylo publikováno velmi málo klinických studií, které sledovaly eNO u nemocných se sepsí. U nemocných s umělou plicní ventilací a pneumonií byly koncentrace vyšší než u ventilovaných nemocných bez pneumonie (Adrie et al. 2001; Brett et al. 1998). Autoři těchto studií uvádějí podstatně menší indukci NO, než jsme pozorovali na našem modelu. Výsledky novější klinické studie ukázaly na trojnásobné zvýšení eNO u nemocných s pneumonií v septickém šoku, zatímco nemocní se sepsí jiné než respirační etiologie a ventilovaní neseptičtí nemocní měli hodnoty eNO nezvýšené. Koncentrace NO_x v plazmě v obou skupinách septických nemocných byly ve srovnání s nemocnými bez sepse dvakrát až třikrát vyšší (ten Oever et al. 2013). Zajímavé informace v tomto ohledu přinesly také

kontrolované studie se zdravými dobrovolníky, kterým byl podán LPS *E. coli* v dávce 2 ng/kg *i.v.*. Tato velmi nízká dávka endotoxinu vyvolala charakteristickou zánětlivou reakci s nárůstem tělesné teploty na 38 °C, tachykardií a výrazným zvýšením koncentrací TNF- α , IL-6, -8 a -10 v krvi. Maximální zvýšení eNO činilo 50 % a bylo zaznamenáno ve 4. hod (Soop et al. 2004; Soop et al. 2009). Z uvedeného srovnání vyplývá, že nemocní s gramnegativní sepsí vydechují podstatně nižší koncentrace eNO, než jsme pozorovali v našich experimentech u potkana. Vydechované eNO u nemocných navíc reaguje zvýšením pouze u respirační pneumonie a sepse, což ukazuje na plíce jako hlavní zdroj vydechovaného NO. Ke stejnému závěru vedly i studie u dobrovolníků s endotoxémií po *i.v.* podání LPS *E. coli*, u nichž byl pozorován charakteritický vzestup cytokinů zánětu jako u experimentálního modelu, ale eNO a koncentrace NO_x v plazmě byly zvýšené pouze 2 až 3krát (Dandona et al. 2010).

Experimentální studie zaměřené na mortalitu a další důležité klinické výstupy po podání specifických a nespecifických inhibitorů NOS při sepsi často uvádějí pozitivní výsledky (De Cruz et al. 2009; Kirkeboen et al. 1999). Neselektivní a iNOS selektivní inhibitory NOS a glukokortikoidy u potkanů s endotoxémií snižují eNO a průnik neutrofilních granulocytů do dýchacích cest. Na rozdíl od inhibitorů NOS ale glukokortikoidy na experimentálních modelech navíc potlačují expresi cytokinů zánětu a výrazněji snižují orgánové postižení při sepsi (Birrell et al. 2006; McCluskie et al. 2004). Nicméně zájem o využití inhibitorů NOS v klinické praxi snížila rozsáhlá kontrolovaná studie s neselektivním inhibitorem N-monomethyl-L-argininem, která byla předčasně ukončena z důvodu trendu k nárůstu mortality o 10 % oproti skupině s placebem (López et al. 2004).

Inhalovaný NO, snižující plicní hypertenzi a zvyšující perfúzi plic a oxygenaci krve, byl dlouho považován za ideální selektivní vazodilatans použitelné za patologických stavů spojených s indukcí iNOS a relativním nedostatkem dostupnosti NO syntetizovaného konstitutivními NOS s ochrannou funkcí. Tento názor byl podpořen pozitivními výsledky farmakoterapie inhalovaným NO doloženými na experimentálních modelech ALI, ischemického-reperfúzního poškození a po transplantaci plic u velkých zvířecích druhů (Ryter et al. 2011). Také u nemocných s ALI/ARDS inhalovaný NO přechodně zlepšuje oxygenaci krve (Griffiths et al. 2005; Kaisers et al. 2003; Taylor et al. 2004), ale zásadní klinické ukazatele, tj. mortalita u dospělých nemocných s ARDS není ovlivněna (Afshari et al. 2011).

Stále více poznatků o metabolické dráze arginin-NO při sepsi ukazuje na skutečnost, že za patofyziologické projevy v kardiovaskulárním systému je z velké části zodpovědná nedostatečná aktivita eNOS vedoucí ke snížení prospěšných účinků NO produkovaného tímto enzymem. Zvláště při septickém šoku dochází i při zvýšeném srdečním výdeji k poruchám prokrvení orgánů a tkání způsobeným systémovou vazodilatací, sníženou periferní cévní rezistencí a zvýšenou propustností cévní stěny. Všechny tyto projevy jsou přičítány indukci iNOS a nadprodukcí NO tímto enzymem. Zároveň vzniká relativní nedostatek argininu a kofaktorů pro konstitutivní formy NOS a dochází i k tzv. rozpojení eNOS, kdy tento enzym nesyntetizuje NO ale superoxidový radikál (Annane et al. 2000). Při sepsi výrazně klesá koncentrace argininu v plazmě, což souhlasí s našimi výsledky za 6 hod po podání LPS. Pokles podle publikovaných studií časově předchází indukci iNOS a je způsoben sníženou syntézou argininu z citrulinu především v ledvinách (Luiking et al. 2009; Munger et al. 2006). Autoři starší publikace dokonce posali vztah mezi sníženou koncentrací argininu a zvýšenou mortalitou na sepsi (Freund et al. 1979). Výsledky dalších studií ukazují na synchronizovanou indukci iNOS, argináz, a transportérů CAT1 a CAT2 nejen při endotoxémii, ale i u alergického zánětu (Scumpia et al. 2002; Zimmermann et al. 2006). U nemocných v septickém šoku je aktivita arginázy v plazmě zvýšená a koreluje s počtem neutrofilů v krvi (Darcy et al. 2013). Suplementace argininu formou kontinuální *i.v.* infuze na modelu endotoxémie u prasete zlepšila perfúzi krví a oxygenaci splachnických orgánů a zabránila vzestupu krevního tlaku v plicní cirkulaci za současné absence kardiovaskulárních nežádoucích účinků (Poeze et al. 2011).

Po podání LPS došlo již za 3 hod ke zvýšení exprese mRNA ArgI i ArgII v plicích, nicméně zvýšení exprese ArgII oproti kontrole bylo výrazně vyšší než v případě ArgI. Nález časného zvýšení exprese ArgI je tak částečně v rozporu s výsledky publikovaných studií, že k indukci exprese a aktivity tohoto enzymu dochází až v pozdější fázi, tj. za 6 až 12 hod (Ash 2004; Colletuori et al. 2001; 1999; Mori et al. 1998; Salimuddin et al.). Aktivace ArgI v pozdější fázi zánětu podporovaná protizánětlivými cytokiny IL-4, -10 a -13 je dávana do souvislosti s iniciací procesu hojení, pro nějž ArgI zajišťuje syntézu polyaminů a prolinu (Getz et al. 2006). Již za 3 hod po podání LPS jsme pozorovali na úrovni mRNA nárůst exprese transportérů CAT1, -2 a -3 v homogenátu plic. Zvýšená exprese genu CAT1 je v literatuře obecně dávana do souvislosti s reakcí organismu na zátěž různé etiologie, která zvyšuje nároky na dostupnost argininu (Fernandez et al. 2004). Prozánětlivé mediátory TNF- α , interferon- γ a IL-1 β uvolňující se po podání LPS indukují expresi CAT2 (King et al. 2004; Nelin et al. 2001; Visigalli et al. 2004; Yang et al. 2004).

Přes hluboký pokles koncentrace L-argininu v plazmě nedošlo v tekutině z BAL ke změně jeho koncentrace. Pokud je možné předpokládat, že koncentrace v BAL odráží dostupnost L-argininu v dýchacích cestách, pak je důležitým zjištěním, že dostupnost neklesá i přes indukci iNOS a argináz a výrazné zvýšení syntézy NO. Je možné usuzovat na souvislost tohoto nálezu s časnou indukcí membránových transportérů pro L-arginin v homogenátu plicní tkáně již za 3 hod po podání LPS, které jsou zřejmě schopné udržovat jeho intracelulární koncentrace ve strukturních buňkách dýchacích cest a plic a buňkách zánětu na potřebné výši.

Methylxantiny jako pentoxifylin (PX) a teofylin účinkují protizánětlivě u patologických stavů spojených se zvýšenou expresí TNF- α . Předpokládanými, ale dosud ne zcela objasněnými mechanismy protizánětlivého účinku jsou inhibice fosfodiesteráz vedoucí ke zvýšení cAMP a snížení genové exprese TNF- α a aktivace histon deacetylázy 2 potlačující genovou expresi prozánětlivých mediátorů (Barnes 2013; Deree et al. 2008), Hlavním izoenzymem, který hydrolyzuje cAMP v buňkách zánětu, je PDE4. Selektivní inhibitory PDE4 jako roflumilast se v současnosti uplatňují v léčbě CHOPN (Spina 2008). V publikovaných studiích PX u endotoxemických potkanů výrazně snížil koncentraci TNF- α v plazmě a BAL a potlačil expresi prozánětlivých cytokinů a naopak zvýšil koncentraci protizánětlivého cytokinu IL-10 (Coimbra et al. 2006; Oliveira-Júnior et al. 2010). Po *i.t.* podání PX jsme v naší studii pozorovali výrazný pokles eNO a koncentrace NO_x v plazmě a BAL. Tento nálezu odpovídá všeobecně přijímanému názoru že PX inhibuje NF- κ B závislou genovou transkripci a syntézu mediátorů zánětu zahrnujících NO syntetizované iNOS (Aikawa et al. 2011; Deree et al. 2008; Lessa et al. 2008; Rolla et al. 1997; Zhang et al. 2010). V souladu s tím došlo k poklesu exprese iNOS jak v plicích, tak v játrech. Nenašli jsme v literatuře preklinickou práci, která by popsala sníženou expresi argináz v plicní tkáni vlivem PX u endotoxémie indukované LPS nebo na jiném modelu sepse. Na tomto místě je zajímavé uvést, že ve starší klinické studii s dospělými nemocnými v těžké sepsi zlepšila dlouhodobá *i.v.* infuze PX kardiovaskulární parametry u nemocných a snížila mortalitu o 13 %. Tento rozdíl nedosáhl statistické významnosti pro malý počet nemocných (Staubach et al. 1998). Také v neonatologii PX přitahuje stále pozornost, protože ve čtyřech klinických studiích malého rozsahu a v Cochranově souhrnu autoři dospěli k závěru, že PX snižuje morbiditu a mortalitu (o 60 %) u novorozenců se sepsí a nemá nežádoucí účinky, z nichž nejobávanější je v této populaci nemocných intrakraniální krvácení (Haque et al. 2011; Lauterbach et al. 1999). Na druhé straně

zkušenosti s protilátkami proti TNF- α a IL-1 nebo s fúzními proteiny neutralizujícími TNF- α byly pozitivní u preklinických modelů sepsy, ale tyto látky neovlivnily mortalitu u nemocných se sepsí (Karzai et al. 2003; McNamara et al. 1993; Qiu et al. 2011; Tracey et al. 1987).

Akutní poškození plic je stále aktuální téma v klinické medicíně. Výsledky recentních studií naznačily, že zvýšená exprese argináz přispívá ke zvýšení propustnosti alveolo-kapilární membrány a k edému plic při ALI a to potlačením produkce NO syntázou eNOS. Inhibitor argináz S-2-boronoronoetyl-L-cystein snížil aktivitu argináz indukovanou bakteriálním pneumolyzinem v buňkách lidského plicního mikrovaskulárního endotelu *in vitro*, zvýšil syntézu NO syntázou eNOS a zlepšil bariérovou funkci (Lucas et al. 2012). Je otázkou, zda je možné inhibicí argináz ovlivnit nejen časnou zánětlivou fázi, ale i signální dráhy a další děje vedoucí k následné fibroproliferaci plic. Protože fibroprodukce je iniciována bezprostředně po spuštění zánětlivé reakce, musejí být snahy o ovlivnění dlouhodobých následků plicního poškození cíleny do první fáze časné zánětlivé reakce. K podobným závěrům dospěly i snahy o imunosupresi steroidy při sepsi s ALI. S ohledem na řadu nežádoucích (především infekčních) komplikací nebyly nikdy plošně steroidy do klinické praxe zavedeny (Tang et al. 2009). Další výzkum ukáže, zda norNOHA potvrdí teoretické předpoklady o tom, že by tato látka mohla snížit akutní i pozdní následky akutního plicního poškození bez současného zvýšení rizika infekčních komplikací.

6.2. Model ovalbuminem navozeného alergického astmatu u potkana kmene Brown Norway

Navodit eozinofilní alergický zánět dýchacích cest se symptomy jako jsou dušnost a průdušková hyperreaktivita je u hlodavců poměrně komplikované. Navíc žádný z používaných modelů není schopen věrně napodobit přirozený průběh průduškového astmatu u pacientů. I přes nedostatky ale experimentální modely umožňují studovat klíčové patobiochemické a patofyziologické pochody u průduškového astmatu a postupy jejich terapeutického ovlivnění (King et al. 2004; Zimmermann et al. 2006).

V naší studii jsme použili potkany kmene Brown Norway, kteří jsou vnímavější k navození alergického zánětu. Při zavádění modelu jsme vycházeli ze schematu alergizace ověřeném na pracovišti prof. MUDr. Gabriely Nosál'ové, DrSc. (Ústav farmakologie, Univerzita Komenského v Bratislavě Jesseniova lékařská fakulta v Martine), ve kterém jsme pouze mírně upravili dávkování a typ použitého ovalbuminu. Rozvoj alergického

zánětu potvrdil zvýšený počet bílých krvinek oproti kontrolám a to jak u skupiny A tak u skupiny A+P a zejména výrazný nárůst procentuálního zastoupení eozinofilů v buněčné složce BAL. Při zánětu také dochází ke zvýšené propustnosti alveolokapilární membrány pro bílkoviny. K poškození alveolokapilární membrány došlo ve skupině A+P, tj. u alergizovaných potkanů po nebulizaci ovalbuminu, která vyvolá akutní vzplanutí alergického zánětu. V této skupině se zvýšila hmotnost plic, hraničně signifikantní byl vzestup koncentrace celkové bílkoviny v BAL. Na zvýšený oxidační stres ukázala koncentrace MDA v BAL.

Naopak zvýšenou syntézu NO v dýchacích cestách jsme pozorovali jak u alergizovaných potkanů (skupina A), tak u alergizovaných potkanů po nebulizaci ovalbuminu (skupina A+P). V obou skupinách narostla koncentrace NO_x v BAL. V této fázi studie jsme neměli možnost využít přímé neinvazivní měření vydechovaného NO pro dlouhodobou závadu analyzátoru NO, kterou se servisní firmě podařilo opravit až po 6. měsících. Je zajímavé, že u dětí i dospělých s atopií je koncentrace vydechovaného eNO také zvýšena i při nepřítomnosti symptomů alergického onemocnění horních a/nebo dolních dýchacích cest, tj. alergické rýmy nebo průduškového astmatu, a to v závislosti na počtu pozitivních výsledků v kožním prick testu na pyly, roztoče a plísňe (Scott et al. 2010; van Amsterdam et al. 2003).

Sledování exprese mRNA a proteinů prokázalo indukci iNOS a eNOS v plicní tkáni. Na úrovni proteinu bylo toto zvýšení patrné až po bronchoprovokaci, tj. ve skupině A+P. Množství mRNA bylo zvýšené jak ve skupině A+P tak ve skupině A. Zvýšená exprese a aktivita iNOS byla u pacientů s alergickým astmatem mnohokrát popsána. Zvýšení exprese na úrovni mRNA a proteinu zejména v bronchiálním epitelu vede ke zvýšení hladiny exhalovaného eNO a ke zvýšení koncentrace NO_x. Hladina eNO koreluje s intenzitou zánětu v průduškách a klesá v průběhu 1 až 2 týdnů po zahájení protizánětlivé farmakoterapie inhalačními kortikosteroidy (Zimmermann et al. 2006). Konstitutivní formy NOS (eNOS a nNOS) jsou primárně zapojeny do ovlivnění bronchiálního a vaskulárního tonu a průduškové reaktivity. K ovlivnění dochází neurotrofní i myotropní cestou mechanismy s účastí cGMP i jinými. Snížená syntéza NO enzymem cNOS přispívá ke vzniku průduškové hyperreaktivity u alergického astmatu jak na preklinických modelech, tak i u pacientů s astmatem. (de Boer et al. 1996; Maarsingh et al. 2006; Ricciardolo et al. 2001; Samb et al. 2001; Vonk et al. 2010). Navíc NO syntetizované eNOS vykazuje schopnost inhibovat zánět v dýchacích cestách tím, že potlačuje aktivaci

NF- κ B. Následně se snižuje exprese iNOS a řady prozánětlivých cytokinů (Maarsingh et al. 2008a).

ArgI a ArgII jsou konstitutivně exprimovány v celé řadě tkání. Ke zvýšení jejich exprese v plicní tkáni dochází po vystavení plic alergenu (Maarsingh et al. 2008c; Santhanam et al. 2008; Vonk et al. 2010). Zvýšenou expresi ArgII na úrovni proteinu jsme našli v plicní tkáni jak u skupiny A tak u skupiny A+P. V případě ArgI došlo k minimálnímu zvýšení exprese pouze u skupiny A+P. Nicméně na úrovni mRNA došlo k významnému zvýšení exprese argináz I i II. V extrahepatálních tkáních je argináza zapojena především do syntézy L-prolinu, který je prekurzorem pro syntézu kolagenu, glutamátu a polyaminů (spermin a spermidin). Zároveň se arginázy účastní imunitní odpovědi organismu. Zvýšená exprese argináz vede k vyššímu riziku vzniku průduškové hyperreaktivita (viz níže), také dochází ke zvýšené produkci polyaminů a L-prolinu, což jsou hlavní složky podílející se na plicní remodelaci (King et al. 2004; Maarsingh et al. 2008a; Ogino et al. 2012; Santhanam, et al. 2008; Vonk et al. 2010; Zimmermann et al. 2006). Zvýšená aktivita a exprese argináz v plicní tkáni byla prokázána nejen v *in vivo* modelech, ale také u nemocných s astmatem. (Maarsingh et al. 2008c).

Expese CAT1 se obecně zvyšuje při zátěži organismu a při nedostatku argininu (Fernandez et al. 2004). Alergický zánět charakterizuje zvýšená exprese argináz, čímž dochází k vyčerpání zásob argininu a stoupají nároky na jeho transport. Následně se zvyšuje exprese CAT1. King a kolektiv ve své studii uvádějí, že u astmatických myší dochází v plicích ke zvýšené expresi CAT2 na úrovni mRNA, což připisují zvýšené potřebě transportu L-argininu do buněk. (King et al. 2004; Zimmermann et al. 2006). Zimmermann a spolupracovníci ve své studii zaznamenali, že při rozvoji alergického astmatu je silně indukována exprese CAT2 a argináz. V naší studii došlo jak ke zvýšení exprese argináz na úrovni proteinu a mRNA, tak k nárůstu exprese transportérů CAT1 a -2 v plicní a jaterní tkáni na úrovni mRNA.

Změny v homeostáze L-argininu přispívají k charakteristickým projevům průduškového astmatu, kterými jsou průdušková hyperreaktivita, chronický zánět a přestavba průdušky. U alergického astmatu dochází ke snížení dostupnosti L-argininu pro konstitutivní syntázy cNOS a iNOS několika mechanismy. Patří k nim indukce iNOS a argináz, které spotřebovávají L-arginin a také inhibice transmembránového transportu argininu z důvodu zvýšených koncentrací kationických proteinů v plazmě, např. eozinofilního kationického proteinu. Následkem jsou nedostatek bronchodilatačního NO a zvýšená produkce superoxidového radikálu a peroxodisitanu, který přispívá k akutní

růduškové hyperreaktivitě v časné i pozdní fázi astmatické reakce. *Ex vivo* studie indikují, že alergenem indukovaná průdušková hyperreaktivita může být potlačena podáním L-argininu a L-citrulinu, heparinu nebo inhibitoru argináz (Ahmed et al. 2013; Ahmed et al. 2012; de Boer et al. 1999; Kumar et al. 2003; Maarsingh et al. 2004; Meurs et al. 2002). Vzhledem k tomu, že aktivita argináz je při alergickém astmatu zvýšená, mohla by zvýšená nabídka substrátu podáváním L-argininu nebo L-citrulinu vést k nežádoucí přestavbě průdušky podpořené větší syntézou kolagenu. Z tohoto důvodu se podávání inhibitoru argináz nejlépe inhalační cestou zdá být výhodnějším postupem, neboť by zajistilo zvýšenou dostupnost L-argininu a syntézu bronchoprotektivního a protizánětlivého NO při současně snížené syntéze extracelulární matrix v průduškách (Maarsingh et al. 2008b).

6.3. Farmakokinetika inhibitoru argináz nor-NOHA

Po *i.v.* a *i.p.* aplikaci v dávkách 10 až 90 mg/kg. byla farmakokinetika norNOHA v plazmě lineární, tj. parametry AUC a C_{max} se zvyšovaly téměř úměrně k dávce. Pokles plazmatické koncentrace měl dvojfázový charakter. Po podání *i.v.* a *i.p.* cestou byl inhibitor velmi rychle eliminován z plazmy. To je v souladu s výsledky sledování inhibičního účinku norNOHA u potkanů *in vivo* (Reid et al. 2007). Absolutní biologická dostupnost F po *i.p.* podání byla vysoká. Hodnota F se překvapivě zvyšovala s dávkou a překročila 100% po dávce 90 mg/kg *i.p.*, což je možné vysvětlit z části interindividuální variabilitou farmakokinetiky a z části chybou způsobenou relativně málo početnými skupinami potkanů. Nižší hodnota plochy pod křivkou AUC v poměru k dávce 10 mg/kg *i.p.* pak mohla být např. způsobena ztrátami látky v místě podání před absorpcí (vazba, degradace apod.) a ty mohly být relativně nižší po vyšších dávkách.

Řada studií provedených s hlodavci zdokumentovala příznivé účinky jak jednorázové aplikace tak opakovaného *i.v.* nebo *i.p.* podávání norNOHA v rozmezí dávek použitých v naší kinetické studii (Bagnost et al. 2008; Bagnost et al. 2010; Gronros et al. 2011; Jung et al. 2010; Reid et al. 2007). Ve výše zmiňovaných studiích látka efektivně inhibovala aktivitu argináz a tím podpořila zvýšenou syntézu NO syntázami NOS. Akutní toxicita norNOHA je velmi nízká. Injekce norNOHA v dávce 800 mg/kg samečům potkana kmene Lewis nezpůsobila žádné změny chování zvířat, tělesné hmotnosti, biochemických hodnot v krvi a histologických nálezů na vnitřních orgánech (Reid et al. 2007).

Endogenní látka N-hydroxyarginin (NOHA) je reakční meziproduct v dvojstupňové syntéze NO z L-argininu. Má vlastnosti inhibitoru argináz, který je ale nacházen ve velmi

nízkých koncentracích z důvodu velmi rychlé metabolické přeměny na L-citrulin buď enzymatickou cestou za katalýzy NOS, cytochromy P450 a dalšími hemoproteiny nebo neenzymatickou cestou v reakci se superoxidem (Clement et al. 2006; Vetrovsky et al. 2002). Látka NOHA může být podle recentních studií také zpětně metabolizována na L-arginin v redukční metabolické dráze popsané u savců za katalýzy komplexem membránově vázaných enzymů v hladkém endoplazmatickém retikulu a v mitochondriích, zahrnujícím cytochrom b5 reduktázu, cytochrom b5 a mitochondriální enzym katalyzující redukci na atomu dusíku „mitochondrial amidoxime reducing component“ (mARC) (Clement et al. 2006; Kotthaus et al. 2011). Tyto reduktázy s širokou substrátovou specifitou detoxikují xenobiotika a aktivují proléčiva s hydroxylovou skupinou na dusíku (Gruenewald et al. 2008; Havemeyer et al. 2006).

Inhibitor norNOHA je analog NOHA s řetězcem kratším o jeden atom uhlíku, ze kterého se netvoří ve významné míře NO z důvodu nízké afinity k NOS (Mansuy et al. 2004). V naší studii jsme našli na chromatogramu extraktů ze vzorků plazmy, pík neznámé látky, možného metabolitu. Metabolit byl přítomen ve vzorcích odebraných již v prvních odběrových intervalech po podání norNOHA. Předpokládali jsme, že analogicky jako u endogenní látky NOHA může norNOHA podléhat redukci. Za pomoci HPLC s detekcí hmotnostní spektrometrií se podařilo prokázat, že neznámým metabolitem je skutečně nor-L-arginin. Tvorba tohoto metabolitu byla pozorována pouze po aplikaci norNOHA potkanům a nikoli, pokud byla látka inkubována s plnou krví nebo s plazmou *in vitro* (Hroch et al. 2012).

Při léčbě průduškového astmatu a CHOPN je silně preferována inhalační cesta podání, protože je schopna zajistit vysoké lokální koncentrace léčiv a zároveň systémová dostupnost léčiva je relativně malá a tím je sníženo riziko nežádoucích účinků. Příznivé ovlivnění remodelace plicní tkáně, bronchoprotektivní a protizánětlivý účinek inhalačně podávaných inhibitorů argináz byly opakovaně prokázány na modelu průduškového astmatu u hlodavců (Maarsingh et al. 2011; Maarsingh et al. 2009). Jelikož v literatuře nebyly k dispozici údaje o farmakokinetice a systémové dostupnosti po inhalačním podání, provedli jsme farmakokinetickou studii s intratracheální aplikací norNOHA formou aerosolu. K aplikaci norNOHA byl použit speciální katetr s porézní špičkou, který v závislosti na viskozitě aplikovaného roztoku tvoří částice aerosolu o velikosti 10-30 μm (Cryan et al. 2007). Lze předpokládat, že částice takové velikosti byly zachyceny především v proximálních dýchacích cestách, které jsou méně prostupné než distální (=malé) dýchací cesty a alveoly pro hydrofilní nebo nabitě molekuly jako je norNOHA

(Gonda 2006; Tronde et al. 2003). Farmakokinetiku norNOHA charakterizovala ve srovnání s *i.p.* cestou pomalá a nekompletní absorpce z dýchacích cest. Absolutní biologická dostupnost v průměru dosáhla 53 %. Takto vysoká dostupnost není překvapivá. V rozsáhlé práci, která sledovala vztah struktura-systémová dostupnost léčiva po inhalačním podání bylo prokázáno, že epitelie dýchacích cest jsou dobře prostupné i pro polární látky s menší molekulou jako terbutalin (F=74 %) a kromolyn (F=36 %) (Tronde, et al.2003). Transepiteliální transport norNOHA v dýchacích cestách je pravděpodobně realizován pomocí stejných transportérů jako pro L-arginin, N⁶-monomethyl-L-arginine a N⁶-(1-iminoethyl)-L-lysin (inhibitory NOS). Tyto látky využívají pro průnik Calu-3 buňkami (lidské bronchiální epiteliální buňky) na apikální straně transportér B^{0,+} a na straně bazolaterární transportér y⁺L (Rotoli et al. 2005).

Jak dekonvoluční analýza tak populační kompartmentové modelování ukázalo na dvojfázovou kinetiku absorpce norNOHA jak po *i.p.* injekci tak po *i.t.* aplikaci aerosolu. Pro tento výsledek lze najít celou řadu možných vysvětlení. Rychlost absorpce se liší v proximální a distální části dýchacích cest a hloubka průniku závisí na aerodynamickém průměru inhalované částice. Část dávky se tak mohla dostat hlouběji do dýchacích cest a mohla být absorbována rychleji. Navíc, fagocytující buňky a mukociliární clearance mají také schopnost ovlivnit rychlost a rozsah biologické dostupnosti inhalačně podávaných látek. Mezi dalšími možnými faktory s vlivem na absorpci po *i.t.* a *i.p.* pdání je možné uvést vazbu v místě aplikace, lokální metabolismus, problémy s rozpustností a ionizací molekuly.

Po opakovaném podávání norNOHA *i.p.* cestou v dávce 30 mg jednou denně po dobu 5 dní nebyla zaznamenána významná kumulace inhibitoru v plazmě. Zároveň byly pozorovány jen malé rozdíly mezi první a pátou aplikací v hodnotě AUC a C_{max} (nárůst AUC o 17 % a C_{max} o 31 %). Z výsledků populačního kompartmentového modelování vyplývá, že by tyto změny mohly být způsoben zvyšujícím se rozsahem (F) a mírou absorpce (t_{1/2,a1} a t_{1/2,a2}). Dávka inhibitoru byla zvolena s ohledem na linearitu farmakokinetiky a také na výsledky publikovaných studií účinků látky v kardiovaskulárním systému (Bagnost et al. 2008; Bagnost et al. 2010; Gronros et al. 2011; Jung et al. 2010; Reid, et al. 2007).

Studie umožnila porovnat farmakokinetiku po jednorázovém podání dávky 30 mg/kg norNOHA *i.v.* a *i.p.* cestou u potkana Wistar s výsledky předchozí studie s potkany Brown-Norway. Po *i.v.* aplikaci byla u potkanů Wistar zjištěna vyšší CL a nižší hodnota AUC o 33 %. Po *i.p.* aplikaci byly hodnoty AUC a C_{max} v průměru nižší o 48 % a 40 %.

Farmakokinetické modelování ukázalo rozdíly v hodnotách CL a v případě *i.p.* podání také dostupnosti F a poločasů absorpce. Pravděpodobně se jedná o odlišnosti ve farmakokinetice mezi použitými kmeny potkana, protože v obou studiích byla použita stejná metoda na stanovení norNOHA a ostatní experimentální techniky se také nelišily.

Koncentrace L-arginu v plazmě je ovlivňována mnoha faktory, jako jsou příjem v potravě, katabolismus proteinů a syntéza „*de novo*“ z citrulinu. Citrulin je syntetizován z glutaminu, glutamátu a L-prolinu v mitochondriích enterocytů. Především v ledvinách poté dochází k vychytávání L-citrulinu z krve a jeho metabolismu na L-arginin (Wu 2009). Aminokyselina L-arginin se účastní celé řady metabolických dějů včetně syntézy proteinů, reakcí vzájemné přeměny aminokyselin (ornitin, prolin, glutamát, citrulin), syntézy močoviny a syntézy kreatininu, agmatinu a NO. Plazmatická koncentrace je výrazně ovlivněna také transportem do buněk, ve kterých jsou koncentrace L-Arg několikanásobně vyšší než v plazmě. Exprese a aktivita membránových transportérů CAT také hraje významnou roli (Ricciardolo et al. 2005). Studie zkoumající osud L-argininu značeného stabilními izotopy po podání do organismu potvrdily, že přibližně 15 % plazmatického L-Arg je využíváno jako substrát arginázami a jen 1,5 % jako substrát pro NOS (Luiking et al. 2012). Nevýznamné změny v hladině L-argininu v plazmě, zaznamenané v našich studiích po jednorázovém podání i po opakovaném podávání inhibitoru, jsou v souladu s literárními poznatky, že příspěvek arginázové cesty k metabolickému obratu L-argininu je minoritní. To dále znamená, že nárůst produkce NO a jeho protektivní účinek po podání inhibitoru argináz přímo nesouvisí s koncentrací L-argininu v plazmě. Uvedený závěr je zcela v souladu s teorií označovanou jako argininový paradox. Syntéza NO může být podpořena podáním argininu nebo inhibicí argináz i přes skutečnost, že hodnota K_m NOS je 20 až 50krát nižší než koncentrace argininu v plazmě (Böger 2007). Při metabolismu L-argininu syntázami NOS je rozhodující lokální dostupnost substrátu v místě enzymu a přítomnost mnoha faktorů včetně transportérů, enzymů a jejich kofaktorů (Luiking et al. 2012; Ryoo et al. 2011).

Inhibiční působení norNOHA na arginázy se projevilo 90 min po páté dávce zvýšením poměru koncentrací citrulin/ornitin v plazmě o 45 %. Poměr citrulin/arginin se zvýšil o 25%. Ve dvou studiích zaměřených na kardioprotektivní účinek norNOHA, byl zaznamenán podobný nárůst poměru citrulin/arginin a vyšší nárůst poměru citrulin/ornitin po jednorázovém *i.v.* podání 100 mg/kg norNOHA (Gronros et al. 2011; Jung et al. 2010). Poměr ornitin/arginin nebyl v naší studii signifikantně snížen, což je v rozporu s výsledky jiných autorů (Gronros et al. 2011). Možným vysvětlením může být, že dávka norNOHA

v naší studii byla nižší a vyšetření koncentrací aminokyselin bylo provedeno v pozdějším časovém intervalu po podání inhibitoru. Navíc snížení koncentrace ornitinu účinkem norNOHA mohlo být menší z důvodu, že i kontrolní potkani v naší studii měli nižší koncentraci ornitinu v plazmě.

V poslední době se v literatuře zvyšuje počet důkazů o tom, že norNOHA má příznivé účinky na kardiovaskulární systém a dýchací cesty po jednorázovém podání nebo opakovaném podávání jednou denně po dobu několika dní až týdnů v podobných dávkách jako v naší farmakokinetické studii (Bagnost et al. 2008; Bagnost et al. 2010; Gronros et al. 2011; Jung et al. 2010; Prati et al. 2012; Reid et al. 2007). Maximální koncentrace norNOHA v plazmě C_{\max} se v naší studii pohybovala v rozmezí 130 až 350 μM a koncentrace se snížila pod 10 μM do 90 min po podání. Pro srovnání, inhibiční účinek norNOHA na arginázu v myších makrofázích charakterizuje inhibiční konstanta $\text{IC}_{50}=10 \mu\text{M}$ (Tenu et al. 1999). Ve světle našich poznatků o velmi rychlé eliminaci norNOHA je na místě otázka, zda dávkování jednou denně v uvedených studiích bylo optimální a zda by častější podávání bývalo nevedlo k lepším výsledkům.

Látka norNOHA je velmi silný kompetitivní inhibitor jaterní arginázy potkanů *in vitro* s $K_i=0,5 \mu\text{M}$. Obavu z tohoto důvodu vyvolává možnost, že by po terapeutických dávkách norNOHA mohlo dojít k nežádoucímu ovlivnění jaterní detoxifikace amoniaku v cyklu močoviny inhibicí jaterních argináz (Custot et al. 1997). Alternativní detoxikační cesta je syntéza glutaminu v kosterních svalech a v mozku (Clemmesen et al. 2000; Girard et al. 1992). Bylo také popsáno, že zvýšený přísun glutaminu enterální nebo parenterální cestou zvyšuje koncentraci histidinu v plné krvi (Holecek 2012; Jeevanandam et al. 1995). V naší studii došlo k signifikantnímu nárůstu plazmatických koncentrací jak glutaminu, tak i histidinu. Nelze vyloučit, že tyto změny nepřímo ukazují na sníženou detoxifikaci amoniaku z důvodu inhibice arginázy I. Hypotéza ale vyžaduje další ověřování. Na tomto místě je vhodné uvést, že interpretace změn koncentrací aminokyselin v plazmě je problematická bez dalších informací, jako jsou jejich tkáňové koncentrace, aktivity enzymů zapojených do metabolismu aminokyselin, exprese transportérů, změny v katabolismu a syntéze proteinů aj.

7. Závěr

Dizertační práce se zaměřila na změny metabolické dráhy arginin-NO a možnosti jejich farmakologického ovlivnění inhibitorem argináz norNOHA při akutním poškození plic navozeném bakteriálním lipopolysacharidem u potkana Wistar a v podmínkách ovalbuminem indukovaného alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

Vzhledem k cílům dizertační práce je možné zformulovat následující závěry:

1/ U endotoxemických potkanů Wistar po *i.p.* podání 5 mg/kg LPS *E. coli* se rozvinulo ALI charakterizované zvýšenou propustností alveolokapilární membrány, nárůstem počtu leukocytů a zastoupení neutrofilních granulocytů v diferenciálním rozpočtu v buněčné složce BAL a otokem plic. V dýchacích cestách a v systémové cirkulaci došlo k silné indukci iNOS, jak doložily výrazně zvýšené koncentrace vydechovaného NO (>30krát) a NO_x v BAL (4krát) a v plazmě (>20krát). Přes tuto skutečnost se koncentrace argininu ve slizniční tekutině v bronších (analýza BAL) nezměnila, zatímco v plazmě se v 6. hod snížila o 70 %. Na úrovni mRNA se v homogenátu plic již ve 3. hod po podání LPS zvýšila exprese iNOS, ArgI, ArgII, membránových transportérů pro arginin CAT1, CAT2 a CAT3. Exprese genu eNOS na úrovni mRNA se snížila. Metodou Western blot byla potvrzena zvýšená exprese iNOS, ArgI, ArgII. Exprese CAT nebyla studována. Po *i.t.* podání ve srovnání s *i.p.* aplikací LPS byl zaznamenán nižší nárůst koncentrace NO a NO_x, zvýšení exprese iNOS, ArgI a ArgII bylo přibližně srovnatelné. Jiné projevy ALI včetně oxidačního stresu byly výraznější po *i.t.* aplikaci, ale měla na nich významný podíl samotná tracheostomie a kanylace. Intratracheální podání pentoxifylinu potlačilo indukci iNOS a výrazně snížilo koncentrace vydechovaného NO a NO_x až na úroveň kontrolní skupiny. Exprese ArgI, ArgII a eNOS byla snížena méně. Pentoxifylin neovlivnil další známky ALI.

2/ Potkany Brown-Norway se podařilo úspěšně alergizovat a indukovat u nich akutní exacerbaci alergického zánětu dýchacích cest nebulizací ovalbuminu, jak ukázala především výrazně zvýšená infiltrace leukocytů a zastoupení eozinofilních granulocytů v BAL a známky oxidačního stresu v dýchacích cestách. Indukce iNOS a koncentrace NO_x v dýchacích cestách byly mnohem nižší než po podání LPS, ale exprese ArgI se naopak zvýšila podstatně více. Dále bylo pozorováno zvýšení exprese ArgII, eNOS a transportérů CAT1 a CAT2. Koncentrace argininu v BAL se po bronchoprovokaci zvýšila.

3/ V práci byla poprvé popsána farmakokinetika inhibitoru argináz norNOHA u potkanů Brown-Norway a Wistar. Ve farmakokinetických studiích byly použity terapeuticky relevantní dávky a cesty podání navržené s ohledem na recentní literární údaje o přínosu norNOHA u experimentálních modelů kardiovaskulárních onemocnění a chronických obstruktivních onemocnění dýchacích cest. Byla vyvinuta, rozsáhle validována a poprvé publikována HPLC metoda na stanovení norNOHA v plazmě. Pomocí hmotnostní spektrometrie byl identifikován metabolit norarginin, přítomný v plazmě potkanů. Byl vypracován populační farmakokinetický model pro norNOHA. Závěry farmakokinetických studií jsou následující:

a/ Po jednorázovém podání *i.v.* a *i.p.* jako bolus je farmakokinetika norNOHA lineární v dávkovém rozmezí 10-90 mg/kg. Látka je velmi rychle eliminována z organismu. Pokles plazmatické koncentrace má dvě fáze a během 20 minut po podání se koncentrace snižuje pod 10 % počáteční hodnoty.

b/ Inhibitor norNOHA podléhá reduktivnímu metabolismu na nor-arginin. Jde o analogii s endogenním inhibitorem argináz hydroxyargininem, který je přeměňován na arginin.

c/ Absolutní biologická dostupnost po jednorázovém *i.p.* podání 10-90 mg/kg norNOHA potkanům Brown-Norway je v průměru 98 %. Při opakovaném *i.p.* podávání potkanům Wistar v dávce 30 mg/kg jednou denně po dobu 5 dní nedochází k výraznějším změnám farmakokinetiky ani ke kumulaci látky v plazmě.

d/ Po jednorázovém podání 10-90 mg/kg norNOHA potkanům Brown-Norway intratracheálně formou aerosolu činí absolutní biologická dostupnost v průměru 53 %. Látka je pomalu absorbována z dýchacích cest s poločasem druhé fáze 43 min. To je výhodná vlastnost pro zamýšlené využití inhibitoru při inhalační farmakoterapii chronických zánětlivých onemocnění dýchacích cest

e/ Po opakovaném podávání 30 mg/kg norNOHA potkanům Wistar *i.p.* jednou denně po dobu 5 dnů se účinek inhibitoru argináz projevuje zvýšením koncentrace citrulinu v plazmě o 25 % a poměru koncentrací citrulin/ornitin o 45 %, ale koncentrace argininu v plazmě se nemění.

f/ Po opakovaném podávání norNOHA se zvyšují plazmatické koncentrace glutaminu a histidinu. Je možné, že tyto změny nepřímo ukazují na sníženou detoxifikaci amoniaku v důsledku inhibice argináz. Další výzkum by se měl zaměřit na otázku, zda a do jaké míry norNOHA inhibuje jaterní arginázu I a zasahuje tak do cyklu močoviny. Nežádoucí účinek norNOHA ve smyslu snížení detoxifikace amoniaku by mohl

představovat významnou překážku pro využití ve farmakoterapii, zejména u pacientů s encefalopatií z důvodu jaterní dysfunkce.

8. Použitá literatura

- ABRAMSON, S. B.; AMIN, A. R.; CLANCY, R. M.; ATTUR, M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, Dec 2001, vol. 15, no. 5, s. 831-845.
- ADRIE, C.; MONCHI, M.; DINH-XUAN, A. T.; DALL'AVA-SANTUCCI, J. et al. Exhaled and nasal nitric oxide as a marker of pneumonia in ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med*, Apr 2001, vol. 163, no. 5, s. 1143-1149.
- AFSHARI, A.; BROK, J.; MØLLER, A. M.; WETTERSLEV, J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in adults and children: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Anesth Analg*, Jun 2011, vol. 112, no. 6, s. 1411-1421.
- AGORRETA, J.; GARAYOA, M.; MONTUENGA, L. M.; ZULUETA, J. J. Effects of acute hypoxia and lipopolysaccharide on nitric oxide synthase-2 expression in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, Aug 2003, vol. 168, no. 3, s.287-296.
- AHMED, T.; SMITH, G.; ABRAHAM, W. M. Heparin-derived supersulfated disaccharide inhibits allergic airway responses in sheep. *Pulm Pharmacol Ther*, Dec 2013. [Epub ahead of print]
- AHMED, T.; SMITH, G.; VLAHOV, I.; ABRAHAM, W. M. Inhibition of allergic airway responses by heparin derived oligosaccharides: identification of a tetrasaccharide sequence. *Respir Res*, 2012, vol.13(1), 6.
- AIKAWA, P.; ZHANG, H. B.; BARBAS, C. S. V.; PAZETTI, R. et al. The Effects of Low and High Tidal Volume and Pentoxifylline on Intestinal Blood Flow and Leukocyte-Endothelial Interactions in Mechanically Ventilated Rats. *Respiratory Care*, Dec 2011, vol. 56, no. 12, s. 1942-1949.
- ALEXANDER, J. H.; REYNOLDS, H. R.; STEBBINS, A. L.; DZAVIK, V. et al. Effect of tilarginine acetate in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock: the TRIUMPH randomized controlled trial. *JAMA*, Apr 2007, vol. 297, no. 15, s. 1657-1666.
- ANNANE, D.; SANQUER, S.; SÉBILLE, V.; FAYE, A. et al. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet*, Apr 2000, vol. 355, no. 9210, s. 1143-1148.
- ARISTOTELES, L. R., R. F. RIGHETTI, N. M. PINHEIRO, R. B. FRANCO, et al. Modulation of the oscillatory mechanics of lung tissue and the oxidative stress response induced by arginase inhibition in a chronic allergic inflammation model. *BMC Pulm Med*, Aug 2013, vol.15, s.13-52.
- ASH, D. Structure and function of arginases. *Journal of Nutrition*, Oct 2004, vol. 134, no. 10, s. 2760S-2764S.
- BACHETTI, T.; PASINI, E.; SUZUKI, H.; FERRARI, R. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia. *Crit Care Med*, May 2003, vol. 31, no. 5, s. 1509-1514.
- BAGNOST, T.; BERTHELOT, A.; BOUHADDI, M.; LAURANT, P. et al. Treatment with the arginase inhibitor N-omega-hydroxy-nor-L-arginine improves vascular function and lowers blood pressure in adult spontaneously hypertensive rat. *Journal of Hypertension*, Jun 2008, vol. 26, no. 6, s. 1110-1118.
- BAGNOST, T.; MA, L.; DA SILVA, R.; REZAKHANIHA, R. et al. Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovascular Research*, Aug 2010, vol. 87, no. 3, s. 569-577.

- BARNES, P. Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Oct 2013, vol. 188, no. 8, s. 901-906.
- BELVISI, M. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. In.: *Proc Am Thorac Soc.*, 2004, vol. 1, no. 3, p. 207-214.
- BERKOWITZ, D.; WHITE, R.; LI, D.; MINHAS, K. et al. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*, Oct 2003, vol. 108, no. 16, s. 2000-2006.
- BIRRELL, M. A.; MCCLUSKIE, K.; HADDAD, E. B.; BATTRAM, C. H. et al. Pharmacological assessment of the nitric-oxide synthase isoform involved in eosinophilic inflammation in a rat model of sephadex-induced airway inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, Mar 2003, vol. 304, no. 3, s. 1285-1291.
- BIRRELL, M. A.; MCCLUSKIE K.; HARDAKER, E.; KNOWLES, R. et al. Utility of exhaled nitric oxide as a noninvasive biomarker of lung inflammation in a disease model. *Eur Respir J*, Dec 2006, vol. 28, no. 6, s. 1236-1244.
- BRATT, J.; FRANZI, L.; LINDERHOLM, A.; O'ROARK, E. et al. Arginase inhibition in airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Jan 2010, vol. 242, no. 1, s. 1-8.
- BRATT, J. M.; FRANZI, L. M.; LINDERHOLM, A. L.; LAST, M. S. et al. Arginase enzymes in isolated airways from normal and nitric oxide synthase 2-knockout mice exposed to ovalbumin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Feb 2009, vol. 234, no. 3, s. 273-280.
- BRATT, J. M.; ZEKI, A. A.; LAST, J. A.; KENYON, N. J. Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma. *Journal of Biomedical Research*, 2011, vol. 25, no. 5, s. 299-308.
- BRETT, S. J.; EVANS, T. W. Measurement of endogenous nitric oxide in the lungs of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, Mar 1998, vol. 157, no. 3, s. 993-997.
- BUTLER, M. F. S.; LANGKAMP-HENKEN, B.; HERRLINGER-GARCIA, K. A.; KLASH, A. E. et al. Arginine supplementation enhances mitogen-induced splenocyte proliferation but does not affect in vivo indicators of antigen-specific immunity in mice. *Journal of Nutrition*, May 2005, vol. 135, no. 5, s. 1146-1150.
- BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr*, Jun 2007, vol. 137, no.6, s. 1650S-1655S.
- CALKINS, C.; BENSARD, D.; HEIMBACH, J.; MENG, X. et al. L-Arginine attenuates lipopolysaccharide-induced lung chemokine production. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Mar 2001, vol. 280, no. 3, s. L400-L408.
- CAMA, E.; PETHE, S.; BOUCHER, J.; HAN, S. et al. Inhibitor coordination interactions in the binuclear manganese cluster of arginase. *Biochemistry*, Jul 2004, vol. 43, no. 28, s. 8987-8999.
- CARRARO, S.; BARALDI, E.; PIJNENBURG, M. W. H.. Exhaled nitric oxide measurements. *Paediatric Lung Function*. 2010, p. 137-154.
- CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. *Kidney International*, Sep 2007, vol. 72, no. 5, s. 557-565.
- CHATTERJEE, S.; PREMACHANDRAN, S.; SHUKLA, J.; PODUVAL, T. Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock. *Journal of Surgical Research*, Jun 2007, vol. 140, no. 1, s. 99-108.
- CLEMENT, B.; KUNZE, T.; HEBERLING, S. Reduction of N(omega)-hydroxy-L-arginine to L-arginine by pig liver microsomes, mitochondria, and human liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Oct 2006, vol. 349, no. 2, s. 869-873.

- CLEMMESSEN, J.; KONDRUP, J.; OTT, P. Splanchnic and leg exchange of amino acids and ammonia in acute liver failure. *Gastroenterology*, Jun 2000, vol. 118, no. 6, s. 1131-1139.
- CLOSS, E.; SIMON, A.; VEKONY, N.; ROTMANN, A. Plasma membrane transporters for arganine. *Journal of Nutrition*, Oct 2004, vol. 134, no. 10, s. 2752S-2759S.
- COIMBRA, R.; MELBOSTAD, H.; LOOMIS, W.; PORCIDES, R. et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: Effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappa B, and ICAM-1 expression. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, Jan 2006, vol. 60, no.1, s. 115-125.
- COLLELUORI, D.; ASH, D. Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase. *Biochemistry*, Aug 2001, vol. 40, no. 31, s. 9356-9362.
- CRYAN, S.; SIVADAS, N.; GARCIA-CONTRERAS, L. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Sep 2007, vol. 59, no. 11, s. 1133-1151.
- CUSTOT, J.; MOALI, C.; BROLLO, M.; BOUCHER, J. et al. The new alpha-amino acid N-omega-hydroxy-nor-L-arginine: A high-affinity inhibitor of arginase well adapted to bind to its manganese cluster. *Journal of the American Chemical Society*, Apr 1997, vol. 119, no. 17, s. 4086-4087.
- DANDONA, P.; GHANIM, H.; BANDYOPADHYAY, A.; KORZENIEWSKI, K. et al. Insulin suppresses endotoxin-induced oxidative, nitrosative, and inflammatory stress in humans. *Diabetes Care*, Nov 2010, vol. 33, no. 11, s. 2416-2423.
- DANI, C.; PRATESI, S. Nitric oxide for the treatment of preterm infants with respiratory distress syndrome. *Expert Opin Pharmacother*, Jan 2013, vol. 14, no. 1, s. 97-103.
- DARCY, C. J.; WOODBERRY, T.; DAVIS, J. S.; PIERA, K. A. et al. Increased plasma arginase activity in human sepsis: association with increased circulating neutrophils. *Clin Chem Lab Med*, Oct 2013, vol. 0, no. 0, s.1-9. ISSN: 1434-6621
- DE BOER, J.; DUYVENDAK, M.; SCHURMAN, F.; POUW, F. et al. Role of L-arginine in the deficiency of nitric oxide and airway hyperreactivity after the allergen-induced early asthmatic reaction in guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology*, Nov 1999, vol. 128, no. 5, s.1114-1120.
- DE BOER, J.; MEURS, H.; COERS, W.; KOOPAL, M. et al. Deficiency of nitric oxide in allergen-induced airway hyperreactivity to contractile agonists after the early asthmatic reaction: an ex vivo study. *British Journal of Pharmacology*, Nov 1996, vol. 119, no. 6, s. 1109-1116.
- DE BOER, J.; MEURS, H.; FLENDRIG, L.; KOOPAL, M. et al. Role of nitric oxide and superoxide in allergen-induced airway hyperreactivity after the late asthmatic reaction in guinea-pigs. *British Journal of Pharmacology*, Aug 2001, vol. 133, no. 8, s. 1235-1242.
- DE CRUZ, S. J.; KENYON, N. J.; SANDROCK, C. E. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. *Expert Rev Respir Med*, Oct 2009, vol. 3, no. 5, s. 511-521.
- DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M. ; RHODES, A.; ANNANE, D. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*, Feb 2013, vol. 39, no. 2, s. 165-228.
- DEREE, J.; MARTINS, J.; MELBOSTAD, H.; LOOMIS, W. et al. Insights into the regulation of TNF-alpha production in human mononuclear cells: The effects of non-specific phosphodiesterase inhibition. *Clinics*, Jun 2008, vol. 63, no. 3, s. 321-328.
- DEVES, R.; BOYD, C. Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Physiological Reviews*, Apr 1998, vol. 78, no. 2, s. 487-545.
- DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. ; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*, Oct 2009, vol. 119, no. 10, s. 2868-2878.

- DONNELLY, L. E. Exhaled breath condensate: nitric oxide-related compounds. *Exhaled Biomarkers*. 2010, vol. 49, s. 207-216.
- DORRESTEIJN, M. J.; VAN EIJK, L. T.; NETEA, M. G.; SMITS, P. et al. Iso-osmolar prehydration shifts the cytokine response towards a more anti-inflammatory balance in human endotoxemia. *J Endotoxin Res*, 2005, vol. 11, no. 5, s. 287-293.
- DUAN, Q. L.; GAUME, B. R.; HAWKINS, G. A.; HIMES, B. E. et al. Regulatory haplotypes in ARG1 are associated with altered bronchodilator response. *Am J Respir Crit Care Med*, Feb 2011, vol. 183, no. 4, s. 449-454.
- DUPUY, P.; SHORE, S.; DRAZEN, J.; FROSTELL, C. et al. Bronchodilator action of inhaled nitric-oxide in guinea-pigs. *Journal of Clinical Investigation*, Aug 1992, vol. 90, no. 2, s. 421-428.
- DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, Sep 2007, vol. 34, no. 9, s. 906-911.
- DWEIK, R.; COMHAIR, S.; GASTON, B.; THUNNISSEN, F. et al. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Feb 2001, vol. 98, no. 5, s. 2622-2627.
- EYNOTT, P. R.; GRONEBERG, D. A.; CARAMORI, G.; ADCOCK, I. M. et al. Role of nitric oxide in allergic inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Eur J Pharmacol*, Sep 2002, vol. 452, no. 1, s. 123-133.
- FERKOL, T.; MITCHISON, H. M.; O'CALLAGHAN, C.; LEIGH, M. et al. Current issues in the basic mechanisms, pathophysiology, diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Respiratory Diseases in Infants and Children*. 2006, vol. 37, s. 291-313.
- FERNANDEZ, J.; LOPEZ, A.; WANG, C.; MISHRA, R. et al. Transcriptional control of the arginine/lysine transporter, Cat-1, by physiological stress. *Journal of Biological Chemistry*, Feb 2004, vol. 279, no. 6, s. 5048-5048.
- FREUND, H.; ATAMIAN, S.; HOLROYDE, J.; FISCHER, J. E. Plasma amino acids as predictors of the severity and outcome of sepsis. *Ann Surg*, Nov 1979, vol 190, no. 5, s. 571-576.
- GAYAT, E.; MEBAZAA, A. Pulmonary hypertension in critical care. *Curr Opin Crit Care*, Oct 2011, vol. 17, no. 5, s. 439-448.
- GETZ, G.; REARDON, C. Arginine/arginase NONONO. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, Feb 2006, vol. 26, no. 2, s. 237-239.
- GIRARD, G.; BUTTERWORTH, R. Effect of portacaval anastomosis on glutamine-synthetase activities in liver, brain, and skeletal-muscle. *Digestive Diseases and Sciences*, Jul 1992, vol. 37, no. 7, s. 1121-1126.
- GONDA, I. Systemic delivery of drugs to humans via inhalation. *Journal of Aerosol Medicine-Deposition Clearance and Effects in the Lung*, Spr 2006, vol. 19, no. 1, s. 47-53.
- GONON, A. T.; JUNG, C.; KATZ, A.; WESTERBLAD, H. et al. Local Arginase Inhibition during Early Reperfusion Mediates Cardioprotection via Increased Nitric Oxide Production. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 7, s. e42038.
- GRIFFITHS, M. J.; CURZEN, N. P.; MITCHELL, J. A.; EVANS, T. W. In vivo treatment with endotoxin increases rat pulmonary vascular contractility despite NOS induction. *Am J Respir Crit Care Med*, Aug 1997, vol. 156, no. 2 Pt 1, s. 654-658.
- GRIFFITHS, M. J.; EVANS, T. W. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N Engl J Med*, Dec 2005, vol. 353, no. 25, s. 2683-2695.
- GRONROS, J.; JUNG, C.; LUNDBERG, J.; CERRATO, R. et al. Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats. *American Journal*

- of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, Apr 2011, vol. 300, no. 4, s. H1174-H1181.
- GRUENEWALD, S.; WAHL, B.; BITTNER, F.; HUNGELING, H. et al. The Fourth Molybdenum Containing Enzyme mARC: Cloning and Involvement in the Activation of N-Hydroxylated Prodrugs. *Journal of Medicinal Chemistry*, DEC 2ec 2008, vol. 51, no. 24, s. 8173-8177.
- HAMMERMANN, R.; HIRSCHMANN, J.; HEY, C.; MOSSER, J. et al. Cationic proteins inhibit L-arginine uptake in rat alveolar macrophages and tracheal epithelial cells - Implications for nitric oxide synthesis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Aug 1999, vol. 21, no. 2, s. 155-162.
- HAMMERMANN, R.; STICHNOTE, C.; CLOSS, E.; NAWRATH, H. et al. Inhibition of nitric oxide synthase abrogates lipopolysaccharides-induced up-regulation of L-arginine uptake in rat alveolar macrophages. *British Journal of Pharmacology*, Jun 2001, vol. 133, no. 3, s. 379-386.
- HANSEL, T.; KHARITONOV, S.; DONNELLY, ERIN, E. et al. A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase inhibits exhaled breath nitric oxide in healthy volunteers and asthmatics. *Faseb Journal*, May 2003, vol. 17, no. 10, s. 1298-300.
- HAQUE, K.; PAMMI, M. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011 2011, vol. 10, CD004205.
- HARRIS, J.; ADEN, J.; LYONS, C.; TESFAIGZI, Y. Resolution of LPS-induced airway inflammation and goblet cell hyperplasia is independent of IL-18. *Respiratory Research*, Mar 2007, vol.8, no. 1, s. 6-24.
- HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R. et al. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, Nov 2006, vol. 281, no. 46, s. 34796-34802.
- HAVLÍNOVÁ Z., BABICOVÁ A., HROCH M., CHLADEK J.. Comparative pharmacokinetics of N(ω)-hydroxy-nor-L-arginine, an arginase inhibitor, after single-dose intravenous, intraperitoneal and intratracheal administration to brown Norway rats. *Xenobiotica*. Oct 2013a, vol. 43, no. 10, s. 886-894.
- HAVLÍNOVÁ Z., HROCH M., NAGY A., ŠIŠPERA L., HOLEČEK M., CHLÁDEK J.. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of arginase inhibitor N ω -hydroxy-nor-L-arginine, and its effect on plasma amino acids concentrations in Wistar rats. *General Physiology and Biophysics*, 2013b Oct 31. [Epub ahead of print].
- HOGMAN, M.; FROSTELL, C.; ARNBERG, H.; HEDENSTIERNA, G. Inhalation of nitric-oxide modulates methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. *European Respiratory Journal*, Feb 1993, vol. 6, no. 2, s. 177-180.
- HOLECEK, M. Side Effects of Long-term Glutamine Supplementation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, Sep 2012, vol. 37, no. 5, s. 607-616.
- HROCH, M.; HAVLINOVA, Z.; NOBILIS, M.; CHLADEK, J. HPLC determination of arginases inhibitor N-(ω)-hydroxy-nor-L-arginine using core-shell particle column and LC-MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, Jan 2012, vol. 880, s. 90-99.
- JANERO, D. R.; BRYAN, N. S.; SAIJO, F.; DHAWAN, V. et al. Differential nitrosylation of blood and tissue constituents during glyceryl trinitrate biotransformation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Nov 2004, vol. 101, no. 48, s. 16958-16963.

- JANSSON, A.; ERIKSSON, C.; WANG, X. Lung inflammatory responses and hyperinflation induced by an intratracheal exposure to lipopolysaccharide in rats. *Lung*, 2004, vol. 182, no. 3, s. 163-171.
- JANSSON, A.; ERIKSSON, C.; WANG, X. Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. *Vascular Pharmacology*, Aug 2005, vol. 43, no. 2, s. 101-111.
- JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, N.; PETERSEN, S. Altered brain and muscle amino-acid levels due to remote injury during glutamine supplementation. *Clinical Nutrition*, Dec 1995, vol. 14, no. 6, s. 365-372.
- JEYABALAN, G.; KLUNE, J.; NAKA, A.; MARTIK, N. et al. Arginase blockade protects against hepatic damage in warm ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, Aug 2008, vol. 19, no. 1, s. 29-35.
- JOHANNES, T.; MIK, E. G.; KLINGEL, K.; DIETERICH, H. J. et al. Low-dose dexamethasone-supplemented fluid resuscitation reverses endotoxin-induced acute renal failure and prevents cortical microvascular hypoxia. *Shock*, May 2009, vol. 31, no. 5, s. 521-528.
- JUNG, C.; GONON, A.; SJOQUIST, P.; LUNDBERG, J. et al. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research*, Jan 2010, vol. 85, no. 1, s. 147-154.
- KACMAREK, R.; RIPPLE, R.; COCKRILL, B.; BLOCH, K. et al. Inhaled nitric oxide - A bronchodilator in mild asthmatics with methacholine-induced bronchospasm. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Jan 1996, vol. 153, no. 1, s. 128-135.
- KAISERS, U.; BUSCH, T.; DEJA, M.; DONAUBAUER, B. et al. Selective pulmonary vasodilation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, Apr 2003, vol. 31, no. 4, s. 337-342.
- KARZAI, W.; CUI, X.; MEHLHORN, B.; STRAUBE, E. et al. Protection with antibody to tumor necrosis factor differs with similarly lethal *Escherichia coli* versus *Staphylococcus aureus* pneumonia in rats. *Anesthesiology*, Jul 2003, vol. 99, no. 1, s. 81-89.
- KHARITONOV, S.; LUBEC, G.; LUBEC, B.; HJELM, M. et al. L-Arginine increases exhaled nitric-oxide in normal human-subjects. *Clinical Science*, Feb 1995, vol. 88, no. 2, s. 135-139.
- KHARITONOV, S. A.; BARNES, P. J. Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, Jun 2001, vol. 1, no. 3, s. 217-224.
- KHARITONOV, S. A.; SJÖBRING, U. Lipopolysaccharide challenge of humans as a model for chronic obstructive lung disease exacerbations. *Contrib Microbiol*, 2007, vol. 14, s. 83-100.
- KIM, J. H.; BUGAJ, L. J.; OH, Y. J.; BIVALACQUA, T. J. et al. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* (1985), Oct 2009a, vol. 107, no. 4, s. 1249-1257.
- KIM, S. J.; KIM, J. W.; KIM, Y. H.; LEE, S. H. et al. Effects of Tranilast and Pentoxifylline in a Mouse Model of Chronic Asthma Using House Dust Mite Antigen. *Journal of Asthma*, 2009b, vol. 46, no. 9, s. 884-894.
- KING, N. E.; ROTHENBERG, M. E.; ZIMMERMANN, N. Arginine in asthma and lung inflammation. *Journal of Nutrition*, Oct 2004, vol. 134, no. 10, s. 2830S-2836S.
- KIRKEBØEN, K. A.; STRAND, A. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*, Mar 1999, vol. 43, no. 3, s. 275-288.
- KITIYAKARA, C.; CHABRASHVILI, T.; JOSE, P.; WELCH, W et al. Effects of dietary salt intake on plasma arginine. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, Apr 2001, vol. 280, no. 4, s. R1069-R1075.

- KITOWSKA, K.; ZAKRZEWICZ, D.; KONIGSHOFF, M.; CHROBAK, I. et al. Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Jan 2008, vol. 294, no. 1, s. L34-L45.
- KOTTHAUS, J.; WAHL, B. ; HAVEMEYER, A.; SCHADE, D. et al. Reduction of N-omega-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochemical Journal*, Jan 2011, vol. 433, s. 383-391.
- KRAFFT, P.; FRIDRICH, P.; PERNERSTORFER, T.; FITZGERALD, R. et al. The acute respiratory distress syndrome: Definitions, severity and clinical outcome - An analysis of 101 clinical investigations. *Intensive Care Medicine*, Jun 1996, vol. 22, no. 6, s. 519-529.
- KRISTOF, A.; GOLDBERG, P.; LAUBACH, V.; HUSSAIN, S. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Dec 1998, vol.158, no. 6, s. 1883-1889.
- KROTOVA, K.; PATEL, J. M.; BLOCK, E. R.; ZHARIKOV, S. Endothelial arginase II responds to pharmacological inhibition by elevation in protein level. *Molecular and Cellular Biochemistry*, Oct 2010, vol. 343, no.1-2, s. 211-216.
- KUMAR, R.; FOSTER, P. Modeling allergic asthma in mice - Pitfalls and opportunities. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Sep 2002, vol. 27, no. 3, s. 267-272.
- KUMAR, R.; HERBERT, C.; THOMAS, P.; WOLLIN, L. et al. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Oct 2003, vol. 307, no. 1, s. 349-355.
- LARA, A.; KHATRI, S. B.; WANG, Z.; COMHAIR, S. A. et al. Alterations of the arginine metabolome in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, Oct 2008, vol. 178, no. 7, s. 673-681.
- LAUTERBACH, R.; PAWLIK, D.; KOWALCZYK, D.; KSYCINSKI, W. et al. Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: A placebo-controlled, double-blind trial. *Critical Care Medicine*, Apr 1999, vol. 27, no. 4, s. 807-814.
- LEE, R. P.; WANG, D.; S. J. KAO, S. J.; CHEN, H. I. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, Apr 2001, vol. 28, no. 4, s. 315-320.
- LESSA, A.; SUGUIHARA, C.; XIANYU, S.; HEHRE, D. et al. The effect of pentoxifylline on the pulmonary response to high tidal volume ventilation in rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2008, vol. 21, no. 1, s. 54-60.
- LI, H.; ROMIEU, I.; SIENRA-MONGE, J. J.; RAMIREZ-AGUILAR, M. et al. Genetic polymorphisms in arginase I and II and childhood asthma and atopy. *J Allergy Clin Immunol*, Jan 2006, vol. 117, no. 1, s. 119-126.
- LIN, W. T.; YANG, S. C.; CHEN, K. T.; HUANG, C. C. et al. Protective effects of L-arginine on pulmonary oxidative stress and antioxidant defenses during exhaustive exercise in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, Aug 2005, vol. 26, no. 8, s. 992-999.
- LIRK, P.; HOFFMANN, G.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, Mar 2002, vol. 1, no. 1, s. 89-108.
- LIU, F.; LI, W.; PAULUHN, J.; TRÜBEL, H. et al. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats: comparative assessment of intratracheal instillation and aerosol inhalation. *Toxicology*, Feb 2013, vol. 304, s.158-166.
- LORTIE, M.; ISHIZUKA, S.; SCHWARTZ, D.; BLANTZ, R. Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, Jun 2000, vol. 278, no. 6, s. C1191-C1199.

- LUCAS, R.; YANG, G.; GORSHKOV, B. A.; ZEMSKOV, E. A. et al. Protein kinase C- α and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *Am J Respir Cell Mol Biol*, Oct 2012, vol. 47, no. 4, s. 445-453.
- LUIKING, Y.; TEN HAVE, G.; WOLFE, R.; DEUTZ, N. Arginine de novo and nitric oxide production in disease states. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Nov 2012, vol. 303, no. 10, s. E1177-E1189.
- LUIKING, Y. C.; POEZE, M.; RAMSAY, G.; DEUTZ, N. E. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production. *Am J Clin Nutr*, Jan 2009, vol. 89, no. 1, s. 142-152.
- LÓPEZ, A.; LORENTE, J. A.; STEINGRUB, J.; BAKKER, J. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*, Jan 2004, vol. 32, no. 1, s. 21-30.
- MAARSINGH, H.; DE BOER, J.; KAUFFMAN, H. F.; ZAAGSMA, J. et al. Heparin normalizes allergen-induced nitric oxide deficiency and airway hyperresponsiveness. *Br J Pharmacol*, Aug 2004, vol. 142, no. 8, s. 1293-1299.
- MAARSINGH, H.; DEKKERS, B.; ZUIDHOF, A.; BOS, I. et al. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic allergic asthma. *European Respiratory Journal*, Aug 2011, vol. 38, no. 2, s. 318-328.
- MAARSINGH, H.; LEUSINK, J. ; BOS, I. S.; ZAAGSMA, J. et al. Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respir Res*, 2006, vol. 7, no. 1, doi: 10.1186.
- MAARSINGH, H.; PERA, T.; MEURS, H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Aug 2008a, vol. 378, no. 2, s. 171-184.
- MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. Arginine homeostasis in allergic asthma. *European Journal of Pharmacology*, May 2008b, vol. 585, no. 2-3, s. 375-384.
- MAARSINGH, H.; ZAAGSMA, J.; MEURS, H. Arginase: a key enzyme in the pathophysiology of allergic asthma opening novel therapeutic perspectives. *British Journal of Pharmacology*, Oct 2009, vol. 158, no. 3, s. 652-664.
- MAARSINGH, H.; ZUIDHOF, A.; BOS, I. ; VAN DUIN, M. et al. Arginase inhibition protects against allergen-induced airway obstruction, hyperresponsiveness, and inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, SEP 15 2008 2008c, vol. 178, no. 6, s. 565-573.
- MALY M, Z. M.; ROZBORILOVA E., VONDRA V. Respiratory Mortality in Czech and Slovak Republics in the year 2011. *Stud pneumol et phtiseol*, 2013, vol. 73, no. 2, [Epub ahead of print.
- MANIATIS, N.; KOTANIDOU, A.; CATRAVAS, J. ; ORFANOS, S. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascular Pharmacology*, Oct-Dec 2008, vol. 49, no. 4-6, s.119-133.
- MANSUY, D.; BOUCHER, J. Alternative nitric oxide-producing substrates for no synthases. *Free Radical Biology and Medicine*, Oct 2004, vol. 37, no. 8, s. 1105-1121.
- MCCLUSKIE, K.; BIRRELL, M. A.; WONG, S.; BELVISI, M. G. Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide-induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *J Pharmacol Exp Ther*, Nov 2004, vol. 311, no. 2, s. 625-633.
- MCNAMARA, M.; NORTON, J.; NAUTA, R.; ALEXANDER, H. Interleukin-1 receptor antibody (IL-1RAB) protection and treatment against lethal endotoxemia in mice. *Journal of Surgical Research*, Apr 1993, vol. 54, no. 4, s. 316-321.
- MEURS, H.; HAMER, M.; PETHE, S.; VADON-LE GOFF, S. et al. Modulation of cholinergic airway reactivity and nitric oxide production by endogenous arginase activity. *British Journal of Pharmacology*, Aug 2000, vol.130, no. 8, s. 1793-1798.

- MEURS, H.; MCKAY, S.; MAARSINGH, H.; HAMER, M. et al. Increased arginase activity underlies allergen-induced deficiency of cNOS-derived nitric oxide and airway hyperresponsiveness. *British Journal of Pharmacology*, Jun 2002, vol. 136, no. 3, s.391-398.
- MIKAWA, K.; NISHINA, K.; TAKAO, Y.; OBARA, H. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Anesthesia and Analgesia*, Dec 2003, vol. 97, no. 6, s. 1751-1755.
- MITAKA, C.; HIRATA, Y.; YOKOYAMA, K.; NAGURA, T. et al. Beneficial effect of carboxy-PTIO on hemodynamic and blood gas changes in septic shock dogs. *Crit Care*, 1997, vol. 1, no. 1, s. 45-50.
- MOALI, C.; BROLLO, M.; CUSTOT, J.; SARI, M. et al. Recognition of alpha-amino acids bearing various C=NOH functions by nitric oxide synthase and arginase involves very different structural determinants. *Biochemistry*, Jul 2000, vol. 39, no. 28, s. 8208-8218.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, Jan 2006, vol. 147, s. S193-S201.
- MORI, M., GOTOH, T.; NAGASAKI, A. ; TAKIGUCHI, M. et al. Regulation of the urea cycle enzyme genes in nitric oxide synthesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, Jun 1998, vol. 21, s. 59-71.
- MORRIS, C.; VICHINSKY, E.P.; SINGER, S.T. Pulmonary Hypertension in Thalassemia: Association with Hemolysis, Arginine Metabolism Dysregulation, and a Hypercoagulable State. *In Advances in Pulmonary Hypertension Spring*, 2007, vol. 6, no.1, s. 31-38.
- MORRIS, C.; POLJAKOVIC, M.; LAVRISHA, L.; MACHADO, L. et al. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Jul 2004a, vol. 170, no. 2, s. 148-153.
- MORRIS, C. R.; POLJAKOVIC, M.; LAVRISHA, L.; MACHADO, L. et al. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, Jul 2004b, vol. 170, no. 2, s. 148-153.
- MUNGER, K. A.; BLANTZ, R. C.; LORTIE, M. J. Acute renal response to LPS: impaired arginine production and inducible nitric oxide synthase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Sep 2006, vol. 291, no. 3, s. R684-691.
- MÖLLER, W.; HEIMBECK, I.; HOFER, T. P.; KHADEM SABA, G. et al. Differential inflammatory response to inhaled lipopolysaccharide targeted either to the airways or the alveoli in man. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 4, s. e33505.
- NAHREVANIAN, H. Involvement of nitric oxide and its up/down stream molecules in the immunity against parasitic infections. *Braz J Infect Dis*, Dec 2009, vol. 13, no. 6, s. 440-448.
- NELIN, L.; NASH, H.; CHICOINE, L. Cytokine treatment increases arginine metabolism and uptake in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Nov 2001, vol. 281, no. 5, s. L1232-L1239.
- NIE, Y. K.; WANG, Z. Y.; LIN, J.; LU, X. Y. et al. Stevioside Protects LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*, Feb 2013, vol. 36, no. 1, s.242-250.
- NORTH, M.; KHANNA, N.; MARSDEN, P.; GRASEMANN, H. et al. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Jun 2009, vol. 296, no. 6, s. L911-L920.
- OGINO, K., M. KUBO, H. TAKAHASHI, R. ZHANG, et al. Anti-inflammatory Effect of Arginase Inhibitor and Corticosteroid on Airway Allergic Reactions in a

- Dermatophogoides farinae-induced NC/Nga Mouse Model. *Inflammation*, Feb 2013, vol. 36, no. 1, s. 141-51.
- OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S.; OLIVEIRA, I. S.; OLIVEIRA, W. R.; CAVASSANI, S. S. et al. Effects of pentoxifylline on inflammation and lung dysfunction in ventilated septic animals. *J Trauma*, Apr 2010, vol. 68, no. 4, s. 822-826.
- PILZ, J.; MEINEKE, I.; GLEITER, C. H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, Jun 2000, vol. 742, no. 2, s. 315-325.
- POEZE, M.; BRUINS, M. J.; KESSELS, F.; LUIKING, Y. C. et al. Effects of L-arginine pretreatment on nitric oxide metabolism and hepatosplanchnic perfusion during porcine endotoxemia. *Am J Clin Nutr*, Jun 2011, vol 93, no. 6, s. 1237-1247.
- POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F.; GARRIDO, A. G.; NAKAGAWA, N.; SANNOMIYA, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, Oct 2008, vol. 30 No. 1, s. 53-59.
- PRATI, C.; BERTHELOT, A.; KANTELIP, B.; WENDLING, D. et al. Treatment with the arginase inhibitor N-w-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, vol. 14, no. 3, s. R130.
- QIU, P., X. CUI, A. BAROCHIA, Y. LI, et al. The evolving experience with therapeutic TNF inhibition in sepsis: considering the potential influence of risk of death. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Nov 2011, vol. 20, no.11, s. 1555-1564.
- RASSAF, T.; BRYAN, N. S.; KELM, M.; FEELISCH, M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*, Dec 2002, vol. 33, no. 11, s. 1590-1596.
- REDINGTON, A. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *European Journal of Pharmacology*, Mar 2006, vol. 533, no. 1-3, s. 263-276.
- REED, C.; MILTON, D. Endotoxin-stimulated innate immunity: A contributing factor for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Aug 2001, vol.108, no. 2, s. 157-166.
- REID, K. M.; TSUNG, A.; KAIZU, T.; JEYABALAN, G. et al. Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N-omega-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA). *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, Feb 2007, vol. 292, no. 2, s. G512-G517.
- REVERTER, M.; T. LUNDH, T.; LINDBERG, J. E. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, Aug 1997, vol. 696, no. 1, s. 1-8.
- RICCIARDOLO, F.; GEPPETTI, P.; MISTRETTA, A. ; NADEL, J. et al. Randomised double-blind placebo-controlled study of the effect of inhibition of nitric oxide synthesis in bradykinin-induced asthma. *Lancet*, Aug 1996, vol. 348, no. 9024, s. 374-377.
- RICCIARDOLO, F.; STERK, P. ; GASTON, B.; FOLKERTS, G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiological Reviews*, Jul 2004, vol. 84, no. 3, s. 731-765.
- RICCIARDOLO, F.; TIMMERS, M.; GEPPETTI, P.; VAN SCHADEWIJK, A. et al. Allergen-induced impairment of bronchoprotective nitric oxide synthesis in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Aug 2001, vol. 108, no. 2, s. 198-204.
- RICCIARDOLO, F.; ZAAGSMA, J; MEURS, H. The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Oct 2005, vol. 14, no. 10, s. 1221-1231.

- RICCIONI, G.; BUCCIARELLI, V.; VERINI, M.; CONSILVIO, N. P.; et al. ADMA, SDMA, L-Arginine and nitric oxide in allergic pediatric bronchial asthma. *J Biol Regul Homeost Agents*, Jul-Sep 2012, vol. 26, no. 3, s. 561-566.
- RIHÁK, V.; ZATLOUKAL, P.; CHLÁDKOVÁ, J.; ZIMULOVÁ, A. et al. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Lab Anal*, 2010, vol. 24, no. 5, s. 317-322.
- RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*, Jan 2007, vol. 81, no. 1, s. 137-143.
- ROCCO, P. R.; DOS SANTOS, C.; PELOSI P. Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva Anesthesiol*, Dec 2009, vol. 75, no. 12, s. 730-740.
- RODRIGUEZ, J.; MALONEY, R. E.; RASSAF, T.; BRYAN, N. S. et al. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jan 2003, vol. 100, no. 1, s. 336-341.
- ROLLA, G.; BUCCA, C.; BRUSSINO, L.; DUTTO, L. et al. Pentoxifylline attenuates LPS-induced bronchial hyperresponsiveness but not the increase in exhaled nitric oxide. *Clinical and Experimental Allergy*, Jan 1997, vol. 27, no. 1, s. 96-103.
- ROTOLI, B. M.; BUSSOLATI, O.; SALA, R.; GAZZOLA, G. C. et al. The transport of cationic amino acids in human airway cells: expression of system y(+)L activity and transepithelial delivery of NOS inhibitors. *Faseb Journal*, Mar 2005, vol. 19, no. 3, s. 810-2.
- RYOO, S.; BERKOWITZ, D. E.; LIM, H. K. Endothelial arginase II and atherosclerosis. *Korean J Anesthesiol*, 2011, vol. 61, no. 1, s. 3-11.
- RYTER, S. W.; CHOI A. M. Gaseous therapeutics in acute lung injury. *Compr Physiol*, Jan 2011, vol. 1, no. 1, s. 105-121.
- SADOWITZ, B.; ROY, S.; GATTO, L. A.; HABASHI, N. et al. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther*, Dec 2011, vol. 9, no. 12, s. 1169-1178.
- SALAM, M. T.; T. M. BASTAIN, T. M.; APPAPORT, E. B.; ISLAM, T. et al. Genetic variations in nitric oxide synthase and arginase influence exhaled nitric oxide levels in children. *Allergy*, Mar 2011, vol. 66, no. 3, s. 412-419.
- SALAM, M. T.; ISLAM, T.; GAUDERMAN, W. J.; GILLILAND, F. D. Roles of arginase variants, atopy, and ozone in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, Mar 2009, vol. 123, no. 3, s. 596-602.
- SALIMUDDIN; NAGASAKI, A.; GOTOH, T. ; ISOBE, H. et al. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Jul 1999, vol. 277, no. 1, s. E110-E117.
- SAMB, A.; PRETOLANI, M.A.; DINH-XUAN, T.; OUKSEL, H. et al. Decreased pulmonary and tracheal smooth muscle expression and activity of type 1 nitric oxide synthase (nNOS) after ovalbumin immunization and multiple aerosol challenge in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*, Jul 2001, vol. 164, no. 1, s.149-154.
- SANTHANAM, L.; CHRISTIANSON, D. W.; NYHAN, D.; BERKOWITZ, D. E. Arginase and vascular aging. *Journal of Applied Physiology*, Nov 2008, vol. 105, no. 5, s. 1632-1642.
- SANZ, M.; ABU NABAHA, Y.; CERDA-NICOLAS, M.; O'CONNOR, J. et al. Erythromycin exerts in vivo anti-inflammatory activity downregulating cell adhesion molecule expression. *British Journal of Pharmacology*, Jan 2005, vol. 144, no.2, s. 190-201.

- SAPIENZA, M.; KHARITONOV, S.; HORVATH, I.; CHUNG, K. et al. Effect of inhaled L-arginine on exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects. *Thorax*, Mar 1998, vol., 53, no. 3, s. 172-175.
- SCHWARTZ, D.; SCHWARTZ, I. F.; GNESSIN, E.; WOLLMAN, Y. et al. Differential regulation of glomerular arginine transporters (CAT-1 and CAT-2) in lipopolysaccharide-treated rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, Apr 2003, vol. 284, no. 4, s. F788-F795.
- SCOTT, M.; RAZA, A.; KARMAUS, W.; MITCHELL, F. et al. Influence of atopy and asthma on exhaled nitric oxide in an unselected birth cohort study. *Thorax*, Mar 2010, vol. 65, no. 3, s. 258-262.
- SCUMPIA, P.; P. SARCIA, P.; V. DEMARCO, V.; B. STEVENS, B. et al. Hypothermia attenuates iNOS, CAT-1, CAT-2, and nitric oxide expression in lungs of endotoxemic rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Dec 2002, vol. 283, no. 6, s. L1231-L1238.
- SINGER, F.; LATZIN; P. Exhaled nitric oxide in infants: a marker of inflammation? *Exhaled Biomarkers*. 2010, vol. 49, s. 56-70.
- SINGER, F.; LUCHSINGER, I.; INCI, D. ; KNAUER, N. et al. Exhaled nitric oxide in symptomatic children at preschool age predicts later asthma. *Allergy*, Apr 2013, vol. 68, no.4, s. 531-538.
- SINGH, D.; RICHARDS, D.; KNOWLES, R. G.; SCHWARTZ, S. et al. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition has no effect on allergen challenge in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, Nov 2007, vol. 176, no. 10, s. 988-993.
- SNELL, N.; NEWBOLD, P. The clinical utility of biomarkers in asthma and COPD. *Curr Opin Pharmacol*, Jun 2008, vol. 8, no. 3, s. 222-235.
- SONOKI, T.; NAGASAKI, A.; GOTOH, T.; TAKIGUCHI, M. et al. Coinduction of nitric-oxide synthase and arginase I in cultured rat peritoneal macrophages and rat tissues in vivo by lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, Feb 1997, vol. 272, no. 6, s. 3689-3693.
- SOOP, A.; ALBERT, J. ; WEITZBERG, E. ; BENGTSSON, A. et al. Nicotinamide does not influence cytokines or exhaled NO in human experimental endotoxaemia. *Clin Exp Immunol*, Jan 2004, vol. 135, no. 1, s. 114-118.
- SOOP, A.; SUNDÉN-CULLBERG, J.; ALBERT, J. ; HÅLLSTRÖM, L. et al. Adenosine infusion attenuates soluble RAGE in endotoxin-induced inflammation in human volunteers. *Acta Physiol (Oxf)*, Sep 2009, vol. 197, no. 1, s.47-53.
- SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. *British Journal of Pharmacology*, Oct 2008, vol. 155, no. 3, s. 308-315.
- STAUBACH, K.; SCHRODER, J.; STUBER, F.; GEHRKE, K. et al. Effect of pentoxifylline in severe sepsis - Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Archives of Surgery*, Jan 1998, vol. 133, no. 1, s. 94-100.
- STRICKLAND, D.; STUMBLES, P. ; ZOSKY, ; SUBRATA, L. et al. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4(+) CD25(+) regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*, Nov 2006, vol. 203, no. 12, s.2649-2660.
- SU, C. F.; YANG, F. L. ; CHENH.I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, Apr 2007, vol. 34, no. 4, s. 339-346.
- TAKAHASHI, N.; OGINO, K.; TAKEMOTO, K.; HAMANISHI, S. et al. Direct inhibition of arginase attenuated airway allergic reactions and inflammation in a Dermatophagoides farinae-induced NC/Nga mouse model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Jul 2010, vol. 299, no. 1, s. L17-L24.

- TANG, B.; CRAIG, J. ; ESLICK, G. ; SEPPELT I. et al. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care Medicine*, May 2009, vol. 37, no. 5, s. 1594-1603.
- TANIRA, M. O.; ALI, B. H.; BASHIR, A. K. Effect of endotoxin on gentamicin pharmacokinetics in old and young adult rats. *Life Sci*, 1997, vol. 60, no. 6, s. 413-424.
- TARPEY, S. B.; BENNETT, T.; RANDALL M. D.; GARDINER S. M. Differential effects of endotoxaemia on pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II and arginine vasopressin in conscious rats. *Br J Pharmacol*, Apr 1998, vol. 123, no. 7, s. 1367-1374.
- TAYLOR, D.; MCGRATH, J. ; ORR, L.; BARNES, P. et al. Effect of endogenous nitric oxide inhibition on airway responsiveness to histamine and adenosine-5'-monophosphate in asthma. *Thorax*, Jun 1998, vol. 53, no. 6, s. 483-489.
- TAYLOR, R. W.; ZIMMERMAN, J. L.; DELLINGER, R. P.; STRAUBE, R. C. et al. Low-dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA*, Apr 2004, vol. 291, no. 13, s. 1603-1609.
- TEN OEVER, J.; MANDON, J.; NETEA, M. G.; VAN DEUREN, M. et al. Pulmonary infection, and not systemic inflammation, accounts for increased concentrations of exhaled nitric oxide in patients with septic shock. *J Breath Res*, Sep 2013, vol. 7, no. 3, 036003.
- TENU, J.-P.; LEPOIVRE, M.; MOALI, C.; BROLLO, M. et al. Effects of the New Arginase Inhibitor N ω -Hydroxy-nor-L-Arginine on NO Synthase Activity in Murine Macrophages. *Nitric Oxide*, 1999, vol. 3, no. 6, s. 427-438.
- THORN, J. The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review. *Inflammation Research*, May 2001, vol. 50, no. 5, s. 254-261.
- TOPAL, G.; BRUNET, A.; WALCH, L.; BOUCHER, J.L.; DAVID-DUFILHO, M. Mitochondrial arginase II modulates nitric-oxide synthesis through nonfreely exchangeable (L)-arginine pools in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, Oct 2006, vol. 318, no. 3, s. 1368-74.
- TOWNSHEND, J.; HAILS, S.; MCKEAN, M. Diagnosis of asthma in children. *British Medical Journal*, Jul 2007, vol. 335, no. 7612, s. 198-202.
- TRACEY, K.; FONG, Y.; HESSE, D.; MANOGUE, K. et al. Anti-cachectin TNF monoclonal-Antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature*, Dec 1987, vol. 330, no. 6149, s. 662-664.
- TRONDE, A.; NORDEN, B. ; MARCHNER, H.; WENDEL, A. et al. Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs in vivo in rats: Structure-absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Jun 2003, vol. 92, no. 6, s. 1216-1233.
- TULIĆ, M. K.; KNIGHT, D. A; HOLT, P. G.; SLY, P. D. Lipopolysaccharide inhibits the late-phase response to allergen by altering nitric oxide synthase activity and interleukin-10. *Am J Respir Cell Mol Biol*, May 2001, vol. 24. no. 5, s. 640-646.
- ULRIK, C. S. Outcome of asthma: longitudinal changes in lung function. *European Respiratory Journal*, Apr 1999, vol. 13, no. 4, s. 904-918.
- VAN AMSTERDAM, J.; JANSSEN, N.; DE MEER, G.; FISCHER, P. et al. The relationship between exhaled nitric oxide and allergic sensitization in a random sample of school children. *Clinical and Experimental Allergy*, Feb 2003, vol. 33, no. 2, s. 187-191.
- VETROVSKY, P.; BOUCHER, J. L.; SCHOTT, C.; BERANOVA, P. et al. Involvement of NO in the endothelium-independent relaxing effects of N-omega-Hydroxy-L-arginine and other compounds bearing a C=NOH function in the rat aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Nov 2002, vol. 303, no. 2, s. 823-830.

- VILLAR, J.; KACMAREK, R. The American-European Consensus Conference definition of the acute respiratory distress syndrome is dead, long live positive end-expiratory pressure! *Medicina Intensiva*, Nov 2012, vol. 36, no. 8, s. 571-575.
- VISIGALLI, R.; BUSSOLATI, O. ; SALA, R. ; BARILLI, A. et al. The stimulation of arginine transport by TNF α in human endothelial cells depends on NF-kappaB activation. *Biochim Biophys Acta*, Jul 2004, vol. 1664, no. 1, s. 45-52.
- VONK, J.; POSTMA, D.; MAARSINGH, H.; BRUINENBERG, M. et al. Arginase 1 and arginase 2 variations associate with asthma, asthma severity and beta(2) agonist and steroid response. *Pharmacogenetics and Genomics*, Mar 2010, vol. 20, no. 3, s.179-186.
- WANG, H.; BODENSTEIN, M.; MARKSTALLER, K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *European Surgical Research*, 2008 2008, vol. 40, no. 4, s. 305-316.
- WARNKEN, M.; HAAG, S. ; MATTHIESEN, S.; U. JUERGENS, U. et al. Species differences in expression pattern of arginase isoenzymes and differential effects of arginase inhibition on collagen synthesis in human and rat pulmonary fibroblasts. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, Apr 2010, vol. 381, no. 4, s. 297-304.
- WATTS, J.; MARCHICK, M.; GELLAR, M.; KLINE, J. Up-regulation of arginase II contributes to pulmonary vascular endothelial cell dysfunction during experimental pulmonary embolism. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, Aug 2011, vol. 24, no. 4, s. 407-413.
- WOITZIK, J.; ABROMEIT, N.; SCHAEFER, F. Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay. *Analytical Biochemistry*, Feb 2001, vol. 289, no. 1, s. 10-17.
- WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, May 2009, vol. 37, no. 1, s. 1-17.
- XIA, Y.; ROMAN, L.; MASTERS; ZWEIER, B. J. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *Journal of Biological Chemistry*, Aug 1998a, vol. 273, no. 35, s. 22635-22639.
- XIA, Y., L. ROMAN, B. MASTERS; J. ZWEIER Superoxide generation from the reductase domain of inducible nitric oxide synthase. *Circulation*, Oct 1998b, vol. 98, no. 17, s. 387-388.
- XIA, Z. Y., WANG, X. Y.; CHEN X.; XIA Z. Effect of NO donor sodium nitroprusside on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats. *Injury*, Jan 2007, vol. 38, no. 1, s. 53-59.
- YANG, S., HUANG, C.; TSAI, P.; CHENG, C. et al. Renal transcription of high-affinity type-2 cationic amino acid transporter is up-regulated in LPS-stimulated rodents. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, Mar 2004, vol. 48, no. 3, s. 308-316.
- YANG, X.; MA, J.; BARGER; M. et al. Transport and utilization of arginine and arginine-containing peptides by rat alveolar macrophages. *Pharmaceutical Research*, Jun 2002, vol. 19, no. 6, s. 825-831.
- YOON, S. K.; LEE, K. N.; LEE, J. H.; JEONG, J. S. et al. Pulmonary vascular dilation induced by L-Arginine: Correlation with induction of endothelial nitric oxide synthase in a rabbit model. *Acta Radiologica*, Feb 2005, vol. 46, no. 1, s. 48-54.
- YU, Z.; OUYANG, J. P.; LI, Y. P. Dexamethasone attenuated endotoxin-induced acute lung injury through inhibiting expression of inducible nitric oxide synthase. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2009, vol. 41, no.2, s. 117-125.
- ZHANG, X. D.; HOU, J. F.; QIN, X. J; LI, W. L. et al. Pentoxifylline inhibits intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and lung injury in experimental phosgene-exposure rats. *Inhalation Toxicology*, Sep 2010, vol. 22. no. 11, s. 889-895.

- ZIMMERMANN, N.; KING, N.; LAPORTE J.; YANG, M. et al. Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, Jun 2003, vol. 111, no. 12, s. 1863-1874.
- ZIMMERMANN, N.; ROTHENBERG, M. E. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *European Journal of Pharmacology*, Mar 2006, vol. 533, no. 1-3, s. 253-262.
- ZOSKY, G.; SLY, P. Animal models of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, Jul 2007, vol. 37, no. 7, s. 973-988.

Internetové zdroje:

ginasthma. © *Global Initiative for Asthma*. [online]. 2012 [cit. 2013-12-16]. Dostupné z: http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_March13.pdf

Asthma and its Types. *MBBS Medicine (Humanity First)*. [online]. 2011 [cit. 2013-12-19]. Dostupné z: <http://medicinembbs.blogspot.cz/2011/02/asthma-and-its-types.html>

Nitric oxide signaling. *Abcam*. [online]. 2009 [cit. 2013-09-23]. Dostupné z: http://docs.abcam.com/pdf/cancer/nitric_oxide_signaling.pdf

software.monolix. *monolix*. [online]. 2013 [cit. 2013-05-19]. Dostupné z: <http://software.monolix.org>

9. Přílohy

Příloha I

Expres proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý

Příloha II

HAVLÍNOVÁ Z., BABICOVÁ A., HROCH M., CHLADEK J.. Comparative pharmacokinetics of N(ω)-hydroxy-nor-L-arginine, an arginase inhibitor, after single-dose intravenous, intraperitoneal and intratracheal administration to brown Norway rats. *Xenobiotica*. Oct 2013, vol. 43, no. 10, s. 886-894.

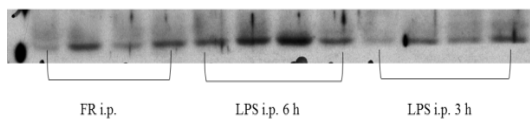
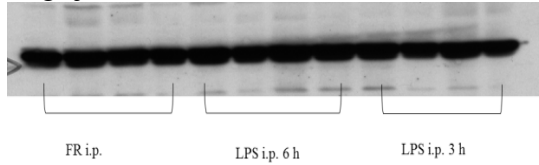
Příloha III

HAVLÍNOVÁ Z., HROCH M., NAGY A., ŠIŠPERA L., HOLEČEK M., CHLÁDEK J.. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of arginase inhibitor N ω -hydroxy-nor-L-arginine, and its effect on plasma amino acids concentrations in Wistar rats. *General Physiology and Biophysics*, 2013 Oct 31. [Epub ahead of print].

Příloha I: Expresa vybraných proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý.

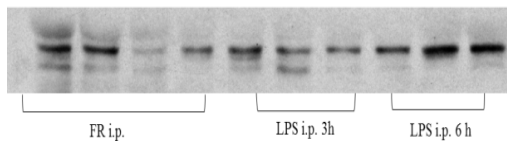
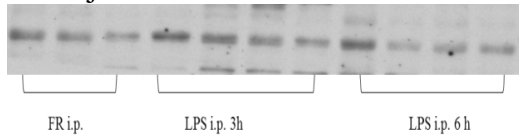
1) Expresa vybraných proteinů v jaterní a plicní tkáni po intraperitoneálním podání LPS.

ArgI jaterní tkáň



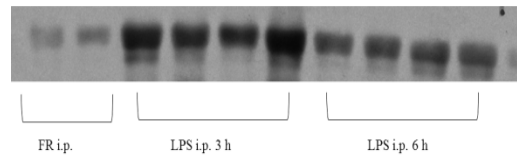
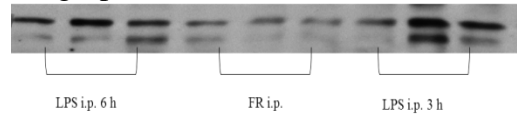
ArgII jaterní tkáň

iNOS jaterní tkáň



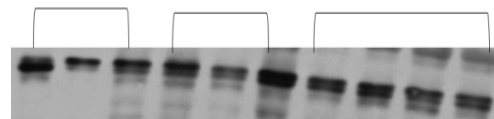
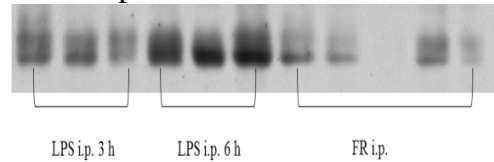
eNOS jaterní tkáň

ArgI plicní tkáň



ArgII plicní tkáň

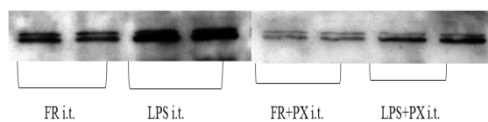
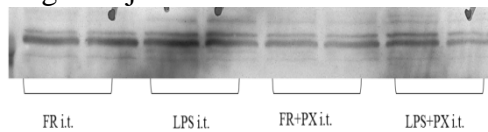
iNOS plicní tkáň



eNOS plicní tkáň

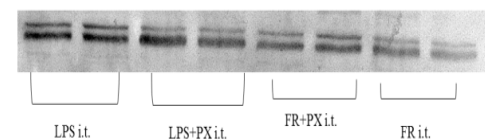
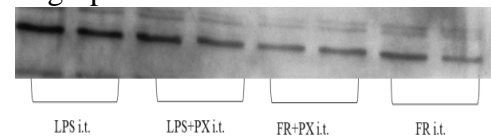
2) Expresa vybraných proteinů v jaterní a plicní tkáni po intraperitoneálním podání LPS a vliv pentoxifylinu.

ArgI a II jaterní tkáň



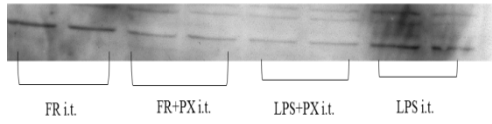
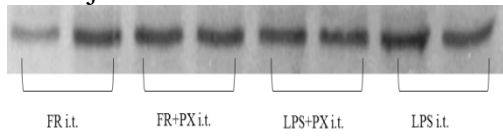
ArgII jaterní tkáň

ArgI plicní tkáň



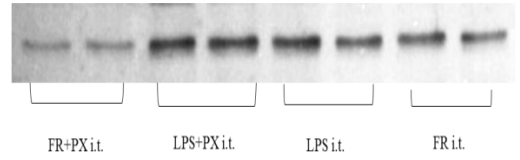
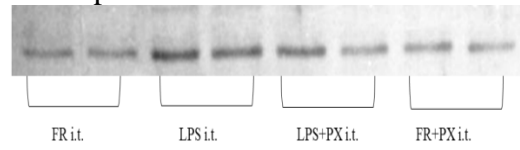
ArgII plicní tkáň

iNOS jaterní tkáň



eNOS jaterní tkáň

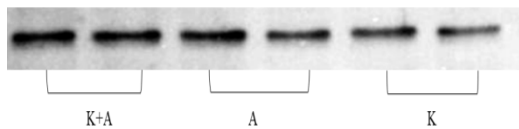
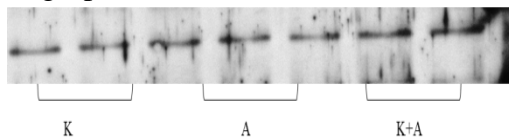
iNOS plicní tkáň



eNOS plicní tkáň

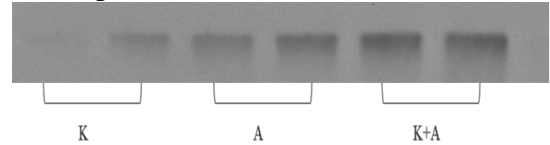
3) Expres vybraných proteinů v jaterní a plicní tkáni v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway.

ArgI plicní tkáň



ArgII plicní tkáň

eNOS plicní tkáň



iNOS plicní tkáň

