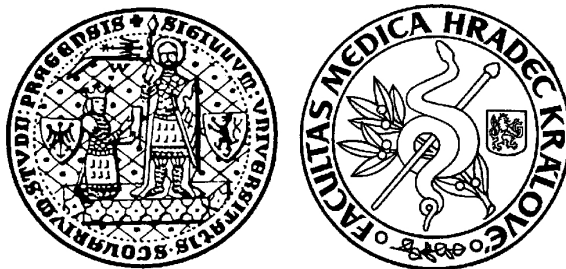


**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



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

**Zuzana Havlínová**

**Autoreferát disertační práce**

**Doktorský studijní program *Lékařská farmakologie***

**Hradec Králové**

**2014**

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Lékařská farmakologie na Ústavu farmakologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Ing. Zuzana Havlínová, Ústav farmakologie

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

Oponenti: Doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, CSc.  
LF UP Olomouc, Ústav lékařské chemie a biochemie  
Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

Doc. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.  
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Heyrovského 1203, 500 05

Obhajoba disertační práce se bude konat dne..... před Komisí pro obhajoby dizertační práce v DSP Lékařská farmakologie v Zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantů: MSM 0021620820; MSM 1P05C066-COST B25,004; Prvok P37/05

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Vladimír Geršl, CSc.  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Lékařská farmakologie

## Obsah

<b>1. Souhrn</b>	<b>4</b>
<b>2. Summary</b>	<b>5</b>
<b>3. Úvod do problematiky</b>	<b>6</b>
<b>4. Cíle disertační práce</b>	<b>7</b>
<b>5. Metodiky</b>	<b>7</b>
5.1. EXPERIMENTÁLNÍ MODEL Y A PODMÍNKY CHOVU	7
5.1.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana kmene Wistar	7
5.1.2. Model ovalbuminem navozeného alergického zánětu u potkana kmene Brown Norway	8
5.2. FARMAKOKINETICKÉ STUDIE S INHIBITOREM ARGINÁZ N <sup>0</sup> -HYDROXY-NOR-L-ARGININEM (NORNOHA)	8
5.3. VYŠETŘOVACÍ METODY	9
5.3.1. Vydechovaný oxid dusnatý	9
5.3.2. Dusitany a dusičnany v plazmě a BAL	9
5.3.3. Malondialdehyd v plazmě a BAL	9
5.3.4. Stanovení N <sup>0</sup> -hydroxy-nor-L-argininu (norNOHA) a argininu v plazmě	9
5.3.5. Spektrum aminokyselin v plazmě	9
5.3.6. Celková bílkovina v BAL	9
5.3.7. Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v BAL a v krvi	9
5.3.8. Sledování exprese proteinů (Western blot)	9
5.3.9. Sledování exprese mRNA (qRT-PCR)	10
5.4. FARMAKOKINETICKÁ A STATISTICKÁ ANALÝZA	10
<b>6. Výsledky</b>	<b>10</b>
6.1. MODEL AKUTNÍHO POŠKOZENÍ PLIC BAKTERIÁLNÍM LIPOPOLYSACHARIDEM U POTKANA WISTAR	10
6.1.1. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu	10
6.1.2. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách	11
6.1.3. Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu	11
6.1.4. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu	12
6.1.1. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání	12
6.1.2. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po podání LPS: srovnání intraperitoneálního a intratracheálního podání	12
6.1.3. Vliv pentoxifylinu na indikátory nitračního a oxidačního stresu po intratracheálním podání LPS	13
6.1.4. Vliv pentoxifylinu (PX) na propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po intratracheálním podání LPS	13
6.1.5. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intratracheálním podání bakteriálního lipopolysacharidu a vliv pentoxifylinu	13
6.2. MODEL OVALBUMINEM NAVOZENÉHO ALERGICKÉHO ZÁNĚTU U POTKANA KMENE BROWN NORWAY	13
6.2.1. Změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a indikátory nitračního a oxidačního stresu v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway	13
6.2.2. Propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway	14
6.2.3. Změny exprese genů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway	14
6.2.4. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý v podmínkách alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway	14
6.3. FARMAKOKINETIKA INHIBITORU ARGINÁZ NOR-NOHA	14
6.3.1. Srovnání farmakokinetiky po jednorázovém injekčním podání intravenózní a intraperitoneální cestou a po intratracheální aplikaci aerosolu	14
6.3.2. Opakované intraperitoneální podání nor-NOHA	16
6.3.3. Identifikace metabolitu norNOHA v potkaní plazmě	18
<b>7. Diskuze</b>	<b>19</b>
7.1. MODEL AKUTNÍHO POŠKOZENÍ PLIC BAKTERIÁLNÍM LIPOPOLYSACHARIDEM U POTKANA WISTAR	19
7.2. MODEL OVALBUMINEM NAVOZENÉHO ALERGICKÉHO ASTMATU U POTKANA KMENE BROWN NORWAY	20
7.3. FARMAKOKINETIKA INHIBITORU ARGINÁZ NOR-NOHA	21
<b>8. Závěr</b>	<b>23</b>
<b>9. Použitá literatura</b>	<b>25</b>
<b>10. Přehled publikovaných prací</b>	<b>29</b>
<b>11. Seznam použitých zkratk</b>	<b>30</b>

## 1. Souhrn

První část předložené dizertační práce popisuje změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý na modelu akutního poškození plic (ALI) navozeného bakteriálním lipopolysacharidem (LPS) u potkana Wistar. Po *i.p.* nebo *i.t.* podání 5 mg/kg LPS (*Escherichia Coli*, serotyp O55:B5) byl experiment ukončován ve 3., 6. a 24. hod. Ve vzorcích plic a jater byla sledována exprese endoteliální a indukovatelné syntázy NO (eNOS, iNOS), argináz 1 a 2 (ArgI, ArgII) a transportérů pro L-arginin (CAT) na úrovni mRNA a proteinu. Experimentální práce dále zahrnovala vyšetřování hladiny vydechovaného NO (eNO) a koncentrace argininu v plazmě a tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL). Model byl dále charakterizován pomocí biochemických ukazatelů propustnosti alveolokapilární membrány, přítomnosti buněk zánětu a indikátorů oxidačního a nitračního stresu v dýchacích cestách.

Po *i.p.* podání 5 mg/kg LPS 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 výrazně narostla syntéza NO, jak doložily koncentrace vydechovaného NO (>30krát vyšší) a NO<sub>x</sub> v BAL (4krát vyšší) a v plazmě (>20krát vyšší). Přes tuto skutečnost se koncentrace argininu ve slizniční tekutině v bronších (analýza BAL) nezměnila, zatímco v plazmě se v 6. hod snížila o 70%. Po *i.t.* podání LPS došlo navíc k projevům zvýšeného oxidačního stresu v dýchacích cestách (zvýšená koncentrace MDA v BAL) a v porovnání s *i.p.* aplikací byla pozorována větší infiltrace leukocytů a neutrofilů do dýchacích cest a byly nalezeny vyšší koncentrace celkové bílkoviny v BAL, což částečně způsobilo samotné *i.t.* podání. Indukce eNO a NO<sub>x</sub> byla naopak nižší. Nezávisle na cestě podání způsobil LPS v 6. hod od aplikace indukci exprese iNOS proteinu v plicní i jaterní tkáni. Expres na úrovni mRNA iNOS po *i.p.* podání byla zvýšena ve 3. i 6. hod. Expres eNOS na úrovni mRNA byla v plicích v porovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší. Po podání LPS došlo již za 3 hod ke zvýšení exprese na úrovni mRNA v plicích jak u ArgI tak i ArgII, zároveň došlo ke zvýšení exprese transportérů CAT1, -2 a -3. Zvýšení exprese ArgII oproti kontrole bylo výrazně vyšší než v případě ArgI. Po *i.t.* podání PX experimentální skupině s *i.t.* aplikací LPS jsme pozorovali výrazný pokles eNO koncentrace NO<sub>x</sub> v plazmě a BAL. Dále došlo ke snížení exprese iNOS na úrovni proteinu, jak v plicích, tak v játrech. Ostatní projevy ALI nebyly ovlivněny.

Další část práce využila výše popsané metodické přístupy k charakterizaci modelu ovalbuminem (OVA) indukovaného alergického zánětu dýchacích cest u potkana Brown-Norway. Alergizace probíhala aplikací 5 mg OVA v kombinaci s Al(OH)<sub>3</sub>. Rozvoj alergického zánětu ve studovaných skupinách v porovnání s kontrolní skupinou potvrdil zvýšený počet bílých krvinek a výrazný nárůst procentuálního zastoupení eozinofilů v buněčné složce BAL. Zvýšila se propustnost alveolokapilární membrány a v BAL byly zaznamenány známky zvýšeného oxidačního a nitračního stresu (koncentrace MDA a NO<sub>x</sub>). Sledování exprese na úrovni mRNA a proteinů prokázalo v plicní tkáni jak indukci iNOS tak i eNOS. Expres ArgI a ArgII v plicích se zvýšila na úrovni mRNA, ale metodou Western blot byl prokázán nárůst pouze u ArgII a zvýšení exprese ArgI bylo pouze minimální. Expres transportérů CAT1 a -2 v plicní a jaterní tkáni byla sledována na úrovni mRNA a bylo prokázáno její zvýšení v případě obou membránových transportérů pro L-arginin.

Třetí část práce uvádí výsledky farmakokinetických studií, zaměřených na dávkovou závislost farmakokinetiky inhibitoru argináz N<sup>o</sup>-hydroxy-nor-argininu (norNOHA) a biologickou dostupnost po jednorázovém podání intravenózní a intraperitoneální cestou a inhalačně formou aerosolu. Pro účely studií byla vyvinuta a poprvé opublikována HPLC metoda na stanovení norNOHA v plazmě. 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<sub>max</sub> se zvyšovaly téměř úměrně k dávce. Pokles plazmatické koncentrace měl dvě fáze a během 20 minut po podání se koncentrace snížila pod 10 % počáteční hodnoty. V rámci studie byl identifikován metabolit inhibitoru norarginin za pomoci HPLC s detekcí hmotnostní spektrometrií. Tvorba tohoto metabolitu byla pozorována pouze po aplikaci norNOHA potkanům a nikoli, pokud byla látka inkubována s plnou krví nebo s plazmou *in vitro*. Po opakovaném podávání norNOHA *i.p.* cestou v dávce 30 mg/kg jednou denně po dobu 5 dní nebyla zaznamenána významná kumulace inhibitoru v plazmě ani změny farmakokinetiky. Oproti první dávce se mírně zvýšily hodnoty AUC a C<sub>max</sub>. Inhibiční působení norNOHA na arginázy se projevilo v 90. min po páté dávce zvýšením poměru koncentrací citrulin/ornitin v plazmě o 45 %. Poměr citrulin/arginin se zvýšil o 25 %. Po jednorázové aplikaci ani opakovaném podávání inhibitoru se nezměnila plazmatická koncentrace argininu. Po opakovaném podávání norNOHA se zvýšily koncentrace glutaminu a histidinu v plazmě. Zda tyto změny nepřímo ukazují na sníženou detoxifikaci amoniaku z důvodu inhibice arginázy I v cyklu močoviny je nutné dále ověřit. Takový nežádoucí účinek norNOHA by mohl představovat významnou překážku pro využití inhibitoru ve farmakoterapii, a to zejména u pacientů s encefalopatií z důvodu jaterní dysfunkce.

## 2. Summary

The first part of the theses describes the changes in the metabolic pathway of arginine- nitric oxide using a model of acute lung injury (ALI) induced by bacterial lipopolysaccharide (LPS) in Wistar rats. ALI was induced by *i.p.* or *i.t.* administration of 5 mg/kg LPS (*Escherichia coli*, serotype O55:B5). The observational period was terminated at 3, 6 and 24 hrs following the administration. After that, the expression was studied at mRNA and protein levels of inducible and endothelial NO synthases (eNOS, iNOS), arginase 1 and 2 (ArgI, ArgII), and of cationic amino acid transporters (CAT) in lung and liver tissue. Experimental work also included the monitoring of exhaled nitric oxide (eNO) and arginine concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BAL). The model was further characterized by biochemical markers, the indices of alveolo-capillary membrane permeability, the presence of inflammatory cells and the concentrations of oxidative and nitrosative stress markers in the airways.

After *i.p.* injection of LPS, a profound increase occurred in exhaled eNO and NO<sub>x</sub> concentrations in BAL and plasma. The increase in eNO was observed already in 2 hr following LPS application and its maximum was >30fold above the controls. After *i.t.* application, there were signs of increased oxidative stress in the airways (MDA in BAL). Compared with *i.p.* application, greater infiltration of leukocytes and neutrophils in the airways and a higher concentration of total protein in the BAL were detected. Regardless of the route of administration, LPS induced iNOS mRNA and protein expression in lung tissue. The eNOS mRNA in the lung was significantly lower than in controls. As early as at 3 hrs following LPS administration, the expression of ArgI, ArgII and CAT1, -2 and -3 was augmented in the lungs at the mRNA level. The magnitude of ArgII induction was significantly higher than that of ArgI. After *i.t.* administration of pentoxifylline (PX) combined with *i.t.* LPS, the increase was abolished of the eNO and NO<sub>x</sub> concentrations in the plasma and BAL. Furthermore, the protein expression of iNOS in the lung and liver was attenuated.

Another part of the theses was devoted to a model of ovalbumin (OVA)-induced allergic airway inflammation in Brown-Norway rats. Sensitization of rats was carried out using OVA in combination with the adjuvant Al (OH)<sub>3</sub>. The development of allergic inflammation was confirmed by the increased number of white blood cells and, in particular, of the percentage of eosinophils in BAL. Moreover, the permeability of the alveolo-capillary membrane increased and the concentration of MDA and NO<sub>x</sub> in BAL were elevated. Monitoring of mRNA and protein expression in the lung tissue showed an induction of iNOS and eNOS. Both the ArgI and ArgII enzymes were induced in the lungs at the mRNA level. However, only the ArgII protein was markedly increased and the elevation of ArgI in the lungs was marginal. An increased expression at the mRNA level was found of the transporters CAT1 and -2 in the lung and liver tissues.

The third part of the theses presents, for the first time, the data on the pharmacokinetics of the arginase inhibitor N<sup>ω</sup>-hydroxy-nor-arginine (norNOHA). The bioavailability was studied in the Wistar rats after single intravenous and intraperitoneal injections and, after intratracheal application of the aerosol. The pharmacokinetics were linear after *i.p.* and *i.v.* doses from 10 to 90 mg/kg. The parameters AUC and C<sub>max</sub> increased almost in proportion to the dose. The decrease in norNOHA plasma concentration was biphasic and rapid: the concentration at 20 min was less than 10 % of the initial one. The unknown metabolite of norNOHA which eluted during HPLC of plasma extracts was identified as nor-arginine with the help of mass spectrometry. Formation of this metabolite was not observed when norNOHA was incubated with whole blood or plasma *in vitro*. The second pharmacokinetic study was focused on the repeated *i.p.* administration of norNOHA and the changes in plasma amino acid concentrations. No significant accumulation of norNOHA in the plasma occurred during repeated *i.p.* injections at the dose of 30 mg/kg once daily for 5 days. Only small increases were found between the first and fifth applications in the AUC and C<sub>max</sub> values. Due to the inhibitory effect of norNOHA the shift was observed from arginine utilization: the ratio of citrulline/ornithine in the plasma augmented by 45 % and that of citrulline/arginine by 25 %, respectively. Regardless of the dosing schedule, norNOHA caused no changes in plasma L-arginine. Following the fifth *i.p.* dose of norNOHA, plasma levels were elevated of glutamine and histidine v plazmě. Whether or not this finding indirectly signals inhibition of the liver Arg I and decreased ammonia detoxification in the urea cycle should be further explored.

### 3. Úvod do problematiky

Předložená práce se zaměřuje na metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý (NO) a její farmakologické ovlivnění při chronických zánětlivých onemocnění 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 nejnámější 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; 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). Léčba těchto onemocnění proto spotřebovává významnou část prostředků na zdravotní péči.

V podmínkách alergického zánětu dýchacích cest je zdrojem vysokých koncentrací NO ve vzduchu vydechovaném ústy indukovatelná forma syntázy oxidu dusnatého (iNOS) zvýšeně exprimovaná v bronchiálním epitelu po expozici aeroalergenům následované nárůstem koncentracemi interleukinů 4 a 13 (King et al. 2004; Zimmermann et al. 2003). V menší míře je indukce iNOS prokazována 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 peroxodisitanu, 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). V současné době je snaho o vývoj a validace technik schopných odlišit bronchiální a alveolární zdroj NO a tak získat informace o alergickém zánětu malých dýchacích cest. Na tomto výzkumném úsilí se naše práce podílela stejně jako na 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 dvojité slepá placebem kontrolovaná studie s opakovaným podáváním látky GW271540 (specifický inhibitor iNOS) nemocným s průduškovým astmatem. Inhibitor snížil koncentraci vydechovaného NO, ale nezpůsobil pokles bronchiální hyperreaktivitu v testu s adenozinem, 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 potlačit syntézu NO inhibitory NOS přinesly rozporuplné výsledky. Podání neselektivních inhibitorů NOS vedlo ke zvýšení středního arteriálního tlaku ale zároveň také 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 klinické výstupy po podání specifických a nespecifických inhibitorů NOS při sepsi byly nejednotné s převahou pozitivních závěrů (De Cruz et al. 2009; Kirkeboen et al. 1999).

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; 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). 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 za posledních 10 let upozorňují na význam Arg1 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 Arg 1 souvisí s atopií a ovlivňuje riziko rozvoje průduškového astmatu (Li et al. 2006; Salam et al. 2009). Jiné klinické studie upozornily na zvýšenou expresi argináz v dýchacích cestách astmatiků a její korelaci se sníženou plicní funkcí (Lara et al. 2008) a dále na vztah mezi genetickým polymorfismem argináz 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 et al. 2008a). Interindividuální variabilitu koncentrace vydechovaného NO u dětí s astmatem ovlivňuje kromě jiných faktorů i genetický polymorfismus iNOS a Arg2 (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; North et al. 2009). Zvýšená aktivita Arg1 v cévním endotelu je dávana do souvislosti s nedostatečnou syntézou vazodilatačně působícího NO pomocí enzymu 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-reperfučnímu 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; Kitowska et al. 2008). Indukce Arg1 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 možného přínosu takového postupu není možné bez detailnějšího 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.

#### 4. Cíle disertační 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. vydechaný 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.

#### 5. Metody

##### 5.1. 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 použitá 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 probíhaly pod dohledem etické komise Lékařské fakulty v Hradci Králové.

##### 5.1.1. 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 (tabulka 1). 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 *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. Zbylý 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 µl supernatantu a 10 µl 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.

**Tabulka 1:** Přehled experimentálních skupin: model s akutním poškozením plic indukovaným LPS. Výsledky v kontrolních skupinách nevykazovaly změny v čase a byly sloučeny do jedné skupiny

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

### 5.1.2. 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±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). 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)<sub>3</sub> (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 2 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 Al(OH)<sub>3</sub> (c=13 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 usmrčeni vykrvením z bifurkace *v.cava*, následoval stejný postup pro odběr vzorků jako u modelu akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana kmene Wistar viz výše.

**Tabulka 2:** 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	

### 5.2. Farmakokinetické studie s inhibítorem arginázy N<sup>ω</sup>-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. 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.

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 usmrčen vykrvením z bifurkace *v. cava*.



### 5.3. Vyšetřovací metody

#### 5.3.1. 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. 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.

#### 5.3.2. Dusitany a dusičnany v plazmě a BAL

Pro stanovení koncentrace dusitanů a dusičnanů (NO<sub>x</sub>) byla použita HPLC metoda s fluorescenční detekcí která je modifikací metody publikované Woitzikem a kol. (Woitzik et al. 2001). Principem metody je enzymatická redukce dusičnanů nitrát reduktázou na dusitany a následná derivatizace dusitanů 2,3 diaminonaftalenem (Sigma-Aldrich, USA) za vzniku naftotriazolu, který je po té detekován.

#### 5.3.3. Malondialdehyd v plazmě a BAL

Pro vlastní stanovení malondyaldehydu (MDA) byla využita modifikovaná HPLC metoda dle Pilze (Pilz et al. 2000). Stanovení je založeno na derivatizaci MDA 2,4-difenylnhydrazinem. Vzniklý derivát je poté stanoven HPLC metodou s UV/VIS detekcí.

#### 5.3.4. Stanovení N<sup>o</sup>-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 naší studie (Hroch et al. 2012). Vzorky po SPE extrakci na kolonkách Waters Oasis MCX 1 ml (30 mg) byly odpařeny pod dusíkem. Po resuspendování odparku v MilliQ vodě a derivatizaci o-phtaldialdehydem byla koncentrace norNOHA a L-arg stanovena HPLC metodou s fluorescenční detekcí.

#### 5.3.5. Spektrum aminokyselin v plazmě

Spektrum aminokyselin ve vzorcích plazmy bylo stanoveno komerčně dodávanou HPLC metodou s fluorescenční detekcí využívající předkolonovou 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.

#### 5.3.6. Celková bílkovina v BAL

Ke stanovení celkové bílkoviny ve vzorcích plazmy, BAL a homogenátech tkáně byl použit spektrofotometrický komerčně dodávaný kit Bicinchoninic Acid Protein Assay (BCA; Pierce, USA).

#### 5.3.7. Počet leukocytů a diferenciální rozpočet v BAL a v krvi

Celkový počet leukocytů byl stanovován počítáním v 50 středních čtvercích Bürkerovy komůrky po reakci vorku BAL nebo plné krve s Türkovým roztokem v poměru 1:20. 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).

Po obarvení nátěrů plné krve nebo BAL dle Giemsa-Romanowského byly v nátěrech počítány neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, lymfocytů a makrofágů 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).

#### 5.3.8. 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 pětinašobném 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 nitrocelulózu 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 přísadkou 0,1 % Tween 20 (TBST) z důvodu blokáce zbylých volných vazebných míst laktoglobuliny. Po promytí v TBST byla membrána inkubována s primární protilátkou po dobu 1,25 hod při laboratorní teplotě. 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).

### 5.3.9. 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 homogenizátor 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. Jako endogenní kontrola byl použit GAPDH (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  $\Delta\Delta Ct$ . 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:

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

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

## 5.4. 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).

## 6. Výsledky

### 6.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana Wistar

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

**Časový průběh koncentrace exhalovaného NO.** Po *i.p.* podání 5 mg/kg LPS došlo ve 2. hod k signifikantnímu nárůstu koncentrace eNO. Nárůst kulminoval 6-8 hodin od podání. Statisticky významné rozdíly mezi LPS a kontrolní skupinou byly zaznamenány ve všech časových intervalech během prvních 24 hod po podání. 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<sub>x</sub> v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.** Po *i.p.* podání LPS došlo k výraznému nárůstu koncentrace NO<sub>x</sub> v BAL i plazmě. Koncentrace NO<sub>x</sub> v BAL byla vyšší v intervalu 24. hod od aplikace LPS než po 6 hodinách. V průměru došlo ke 4,4násobnému (24 hod,  $p<0,001$ ) a 2,8násobnému nárůstu NO<sub>x</sub> (6 hod,  $p<0,001$ ). V plazmě se hodnota NO<sub>x</sub> zvýšila v průměru 14krát (6 hod,  $p<0,001$ ) a 23krát (24 hod  $p<0,001$ ), tedy podstatně více než v BAL. Byl zřejmý časový posun indukce NO<sub>x</sub> směrem k pozdějším intervalům po podání oproti koncentraci eNO, která kulminovala v intervalu 6-8 hodin.

**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 o 71 % ( $p<0,01$ ). Za 24 hod se již koncentrace výrazně nelišila od kontrolní skupiny.

### 6.1.2. 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.

**Hmotnost plic.** Průměrný poměr mezi hmotností 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.

**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 (Tabulka 1). Zatímco mírný 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 (Tabulka 3).

**Tabulka 3:** Počet leukocytů a zastoupení neutrofilů v BAL a krvi. Hodnoty jsou průměry  $\pm$ SD pro 5-12 zvířat ve skupině. Statistická významnost oproti kontrole: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

	FR i.p.	LPS i.p. 6h	LPS i.p. 24h
leukocyty v BAL ( $10^9/l$ )	$1,79 \pm 0,49$	$3,48 \pm 0,56^{***}$	$4,34 \pm 1,08^{***}$
neutrofilů v dif. rozpočtu BAL (%)	$5,71 \pm 1,98$	$11,83 \pm 2,9^*$	$21,6 \pm 4,83^{***}$
leukocyty v krvi ( $10^9/l$ )	$2,83 \pm 0,66$	$4,64 \pm 1,77^{***}$	$4,51 \pm 1,26^{**}$
neutrofilů v dif. rozpočtu v krvi (%)	$17,86 \pm 5,64$	$44,83 \pm 10,72^{***}$	$59,6 \pm 9,61^{***}$

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

**Expresse iNOS** byla signifikantně a výrazně zvýšená již ve třetí hodině od intraperitoneálního podání LPS a to ve srovnání s kontrolní skupinou 150krát ( $p < 0,001$ ) v plicích a 300krát ( $p < 0,001$ ) v jaterní tkáni. Za 6 hod. od podání exprese ve srovnání s 3. hodinou poklesla, ale stále přetrvávalo 30násobné (plicí,  $p < 0,001$ ) a 90násobné ( $p < 0,001$ ) zvýšení oproti kontrolní skupině.

**Expresse eNOS** v plicní tkáni klesla ve 3. hodině od podání LPS o 64 % ( $p < 0,001$ ) oproti kontrole. V 6. hodině od podání přetrvávalo snížení o 40 % ( $p < 0,05$ ). Expresse eNOS v jaterní tkáni nebyla ve sledovaném časovém intervalu podáním LPS statisticky významně ovlivněna.

**Expresse 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 % úroveň exprese v kontrolní skupině. 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 % úroveň exprese v kontrolní skupině, tj. o 33 % ( $p < 0,01$ ).

**Expresse 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,  $p < 0,001$ ).

**Expresse membránového transportéru CAT1** byla ve třetí hodině od podání LPS v plicní tkáni zvýšena 5,5krát ( $p < 0,001$ ) a v jaterní tkáni 7,5krát ( $p < 0,001$ ) oproti kontrole. 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).

**Expresse membránového transportéru CAT2** v plicní tkáni u skupiny LPS za 3 hod po podání byla zvýšena dvojnásobně ( $p < 0,001$ ). Za 6 hodin 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.

**U exprese membránového transportéru CAT3** došlo po podání LPS jak v plicní tak v jaterní tkáni k významnému nárůstu. 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 ( $p < 0,001$ ).

#### 6.1.4. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intraperitoneálním podání bakteriálního lipopolysacharidu

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,  $p < 0,001$ ), ArgI (4,5 a 3,7krát,  $p < 0,001$ ) a ArgII (1,6 a 1,4krát,  $p < 0,001$ ), zatímco exprese eNOS se nezměnila.

V játrech se exprese uvedených proteinů nezměnila nebo se zvýšila méně než v plicní tkáni. Expresse iNOS se zvýšila 1,2krát ( $p < 0,05$ ) za 3 hod a 1,4krát za 6 hod po podání LPS ( $p < 0,05$ ). Expresse 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%).

#### 6.1.1. 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 intraperitoneálním v porovnání s intratracheálním podáním. Po *i.p.* podání byla koncentrace eNO zvýšena oproti kontrolní skupině 32krát, zatímco po *i.t.* podání pouze 4,8krát (Tabulka 4).

**Koncentrace NO<sub>x</sub> v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.** Také vyšetření NO<sub>x</sub> v BAL a v plazmě ukázalo shodně s eNO na výraznější vliv LPS po podání *i.p.* než *i.t.* Koncentrace NO<sub>x</sub> 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.*) (Tabulka 4).

**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 (Tabulka 4).

**Tabulka 4:** Souhrnné výsledky vybraných markerů v BAL a plazmě porovnání po *i.p.* a *i.t.* aplikaci LPS. Hodnoty jsou aritmetické průměry ± SD pro 8-18 zvířat ve skupině. Statistická významnost oproti kontrole: \*\*\*  $p < 0,001$  (*i.p.* vs. *ip.*, *i.t.* vs. *i.t.*) Statistická významnost *i.p.* vs. *i.t.*: †††  $p < 0,001$

	FR <i>i.p.</i>	FR <i>i.t.</i>	LPS <i>i.p.</i>	LPS <i>i.t.</i>
eNO (ppb)	1,8 ± 1,4	2,62 ± 1,67	56,9 ± 21,07***	12,43 ± 3,9*** †††
NO <sub>x</sub> v BAL (μM)	3,04 ± 1,75	2,45 ± 0,98	8,33 ± 4,51***	3,85 ± 0,89†††
NO <sub>x</sub> v plazmě (μM)	7,89 ± 3,05	5,71 ± 2,1	102,1 ± 41,55***	21,56 ± 6,73†††
MDA v BAL (μM)	0,11 ± 0,06	0,52 ± 0,11†††	0,1 ± 0,03	0,69 ± 0,12†††
celková bílkovina (g/l)	0,11 ± 0,03	0,36 ± 0,25†††	0,15 ± 0,02†††	0,88 ± 0,26***
hmotnost plic (% tělesné hmotnosti)	1,06 ± 0,15	1,06 ± 0,11	1,16 ± 0,13	1,15 ± 0,12**

#### 6.1.2. 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 (Tabulka 4). 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  $p = 0,015$ .

**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 (Tabulka 4).

**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 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 (Tabulka 5).

**Tabulka 5:** Počet leukocytů a zastoupení neutrofilů v BAL a krvi. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$ SD pro 8-18 (počet leukocytů) a 6-8 (diferenciální rozpočet) zvířat ve skupině. Statistická významnost oproti kontrole:\*\*\*  $p < 0,001$  (i.p. vs. i.p., i.t. vs. i.t.) Statistická významnost i.p. vs. i.t.: †††  $p < 0,001$

	FR i.p.	FR i.t.	LPS i.p.	LPS i.t.
leukocyty v BAL ( $10^9/l$ )	1,89 $\pm$ 0,49	2,74 $\pm$ 1,2 <sup>†</sup>	3,48 $\pm$ 0,56 <sup>***</sup>	9,99 $\pm$ 2,71 <sup>*** †††</sup>
neutrofilů v dif. rozpočtu BAL (%)	5,71 $\pm$ 1,97	40,71 $\pm$ 8,64 <sup>†††</sup>	11,83 $\pm$ 2,93 <sup>***</sup>	78,4 $\pm$ 11,52 <sup>***†††</sup>
leukocyty v krvi ( $10^9/l$ )	2,83 $\pm$ 0,66	2,69 $\pm$ 0,85	4,64 $\pm$ 1,70 <sup>**</sup>	2,93 $\pm$ 1,21
neutrofilů v dif. rozpočtu v krvi (%)	17,86 $\pm$ 5,64	39,71 $\pm$ 4,11 <sup>†††</sup>	44,83 $\pm$ 10,72 <sup>***</sup>	59,8 $\pm$ 13,46 <sup>*</sup>

### 6.1.3. 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 vydechaného NO (eNO) a koncentraci NO<sub>x</sub> v plazmě až na úroveň kontrolní skupiny. Koncentraci NO<sub>x</sub> v tekutině z bronchoalveolární laváže snížila pouze částečně. Koncentrace malondialdehydu se změnila pouze mírně a rozdíly mezi skupinami nedosáhly statistické významnosti: vlivem LPS se mírně zvýšila a pentoxifylin tento nárůst částečně snížil.

### 6.1.4. Vliv pentoxifylinu (PX) na propustnost alveolokapilární membrány a buněčný zánětlivý infiltrát v dýchacích cestách po intratracheálním podání LPS

Intratracheální podání PX po podání LPS výrazně neovlivnilo koncentraci celkové bílkoviny v BAL, poměr hmotnosti plic a těla, počet leukocytů a zastoupení neutrofilů v diferenciálním rozpočtu buněčné složky BAL

### 6.1.5. Změny exprese proteinů ovlivňujících metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý po intratracheálním podání bakteriálního lipopolysacharidu a vliv pentoxifylinu

**Indukovatelná syntéza oxidu dusnatého (iNOS).** Po *i.t.* aplikaci LPS došlo k 1,9násobnému ( $p < 0,001$ ) nárůstu exprese iNOS v homogenátech plicní tkáně. Podání PX 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. 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 %.

**Endoteliální syntéza oxidu dusnatého (eNOS).** Po podání LPS nedošlo ve srovnání s odpovídajícími kontrolními skupinami ke změně exprese eNOS v homogenátech plicní. 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.*.

**Argináza I (ArgI).** Po *i.t.* podání LPS došlo v plicní tkáni k 2,4násobnému ( $p < 0,001$ ) zvýšení exprese ArgI. Pentoxifylinu částečně snížil tento nárůst. Exprese ArgI v játrech nebyla ovlivněna podáním LPS ani pentoxifylinu.

**Argináza II (ArgII).** Exprese 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 % ( $p < 0,01$ ). Exprese byla ale vyšší než v kontrolní skupině FR *i.t.* 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.

## 6.2. Model ovalbuminem navozeného alergického zánětu u potkana kmene Brown Norway

### 6.2.1. 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<sub>x</sub> v tekutině z bronchoalveolární laváže a v plazmě.** Ve srovnání s kontrolní skupinou K byla koncentrace NO<sub>x</sub> 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 % ( $p < 0,05$ )

**Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže.** U alergizovaných potkanů se po provokaci ovalbuminem (skupina A+P) zvýšila koncentrace MDA v BAL v porovnání s kontrolami 1,6krát (+ 60 %,  $p < 0,01$ ) oproti koncentraci MDA u kontrolní skupiny. Ve skupině A nebyl nárůst koncentrace o 21 % statisticky významný.

**Koncentrace argininu v tekutině z bronchoalveolární laváže.** U alergizovaných potkanů se po provokaci ovalbuminem (skupina A+P) zvýšila koncentrace argininu v BAL ve srovnání s kontrolami 1,5krát (+ 47 %,  $p < 0,01$ ), v plazmě nedošlo ke statisticky významným změnám napříč skupinami.

### 6.2.2. 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,  $p = 0,07$ ).

**Hmotnost plic.** Průměrný poměr mezi hmotnostmi 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 % ( $p < 0,05$ ).

**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 a to 6,8krát ve skupině A ( $p < 0,001$ ) a 7,5krát ve skupině A+P v BAL oproti kontrolní skupině. V plazmě došlo oproti kontrole k 14násobnému ( $p < 0,001$ ) zvýšení ve skupině A a k 7,8násobnému ( $p < 0,001$ ) zvýšení ve skupině A+P ( $p < 0,001$ ) Zvýšení počtu leukocytů byl nalezen i v krvi.

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

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

**U expresi eNOS** došlo ke změnám pouze v plicní tkáni. Ve skupině A došlo ke zvýšení 1,4krát oproti kontrolní skupině (tj. o 40 %,  $p < 0,05$ ) a ve skupině A+P 1,3krát, (tj. o 30 %,  $p < 0,05$ ).

**Expresce ArgI** v plicích se výrazně zvýšila jak u skupiny A, tak u alergizovaných a provokovaných potkanů (A+P). Ve srovnání s kontrolní skupinou se množství mRNA zvýšilo 5,9krát a 8,1krát ( $p < 0,001$ )

**Expresce ArgII** se v plicní tkáni zvýšila 2,4krát ( $p < 0,001$ ) u skupiny A a 3,1krát ( $p < 0,001$ ) u skupiny A+P. Expresce ArgI a ArgII na úrovni mRNA se v játrech nezměnila.

**Expresce mRNA transportérů CAT1 a CAT2** byla zvýšena v plicní tkáni 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. Expresce 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.

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

U skupiny A+P došlo k signifikantnímu zvýšení exprese enzymů iNOS, eNOS a ArgII v homogenátu plicní tkáně a to o 39-44 % ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  u eNOS) nad úroveň exprese u kontrolní skupiny, zatímco rozdíly v expresi ArgI nebyly statisticky významné. U alergizovaných potkanů ze skupiny A došlo k mírnému zvýšení exprese eNOS ( $p < 0,05$ ) a ArgII ( $p < 0,01$ , nárůst o 21-22 %). Expresce iNOS a ArgI se od kontrolní skupiny nelišila. V játrech nedošlo k signifikantním změnám u žádného ze sledovaných enzymů.

## 6.3. Farmakokinetika inhibitoru argináz norNOHA

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

**Nekompartmentová analýza koncentračního profilu norNOHA v plazmě.** 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. 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. 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.

**Analýza kinetiky absorpce norNOHA po intraperitoneální a intratracheální aplikaci dekonvolucí profilů průměrných plazmatických koncentrací.** 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 6. 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 odhanuté dekonvolucí uvádí tabulka 6. 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 6).

**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 7).

**Tabulka 6.** Kinetika absorpce norNOHA dekonvolucí po intraperitoneální a intratracheální aplikaci v dávkách 10, 30 a 90 mg/kg. Parametry biexponenciálního modelu: 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 ( $F_{a2}$ ).

Parametry	Intraperitoneální aplikace			Intratracheální aplikace		
	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	90 mg/kg
$k_{a1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,47	0,26	0,36	0,71	0,40	0,37
$k_{a2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	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 (%)	76,1	81,4	118	63,8	40,9	43

**Tabulka 7.** 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 ( $\text{ml}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	33,1 (8%)	44%	30,4 (5%)	ne	32,1 (4%)	ne
Q ( $\text{ml}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	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%
$k_{a1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	na	na	0,31 (12%)	23%	0,22 (12%)	24%
$k_{a2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	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 ro *i.v.* podání; ne...parametr nemohl být odhadnut

Individuálně odhadnuté koncentrace norNOHA velmi dobře souhlasily s naměřenými hodnotami. 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 interkompartmentová (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 ( $t_{1/2\beta}$ ) byly nižší po dávce 90 mg/kg v porovnání s dávkou 10 mg/kg. Závislosti mezi středními hodnotami  $C_0$  a  $AUC_0$  po *i.v.* podání a dávkou jsou znázorněny na grafu 1. Poměry velikostí dávek 1:3:9 (10, 30 a 90 mg/kg) odpovídaly poměrům středních hodnot farmakokinetických parametrů v jednotlivých dávkových skupinách 1:3,2:7,4 ( $C_0$ ) a 1:3,4:7,3 ( $AUC_0$ ). Zvýšení  $C_0$  a  $AUC_0$  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 ( $C_0$  /dávka a  $AUC_{0-\infty}$  /dávka), neprokázala statisticky významné rozdíly mezi dávkovými skupinami a tedy farmakokinetickou nelinearitu u parametrů  $C_0$  ( $p=0,12$ ) a  $AUC_{0-\infty}$  ( $p=0,30$ ).

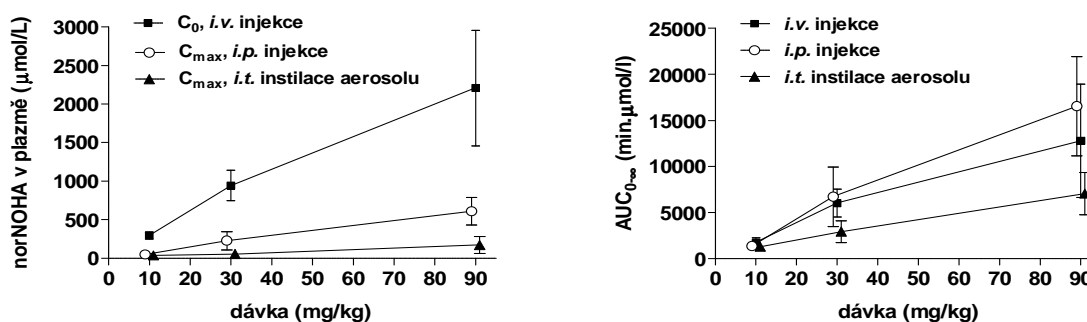
Populační modelování farmakokinetiky norNOHA v plazmě po *i.p.* podání bylo provedeno spolu s koncentračními údaji po *i.v.* aplikaci. Jako počáteční hodnoty parametrů CL, Q,  $V_C$  a  $V_T$  byly použity populační odhady získané samostatným modelováním koncentrací po *i.v.* podání.

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 7). Populační střední hodnoty rychlostních konstant absorpce  $k_{a1}$  a  $k_{a2}$  činily 0,31 a 0,071  $\text{min}^{-1}$  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 7). 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  $AUC_{0-\infty}$  (1:4,9:12) byla vyšší než odpovídající relativní změny dávky (1:3:9) (graf 1). Dávkově normalizované hodnoty pro  $C_{\max}$  a  $AUC_{0-\infty}$  ukázaly trend k nižším hodnotám po dávce 10 mg/kg než po vyšších dávkách, ale statistická významnost rozdílů byla pouze hraniční ( $p=0,13$  a  $p=0,056$ ). Stejně jako v případě *i.v.* podání tedy farmakokinetika nevykázala významné odchylky od linearitu. V rozmezí aplikovaných dávek nor-NOHA bylo  $C_{\max}$  po *i.p.* podání nižší než  $C_0$  po *i.v.* podání ( $p<0,001$ ). V hodnotách  $AUC_{0-\infty}$  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  $AUC_{0-\infty}$  uvádí graf 1. Relativnímu zvýšení dávky v poměru 1:3:9 odpovídal výrazně nižší než proporcionalní nárůst  $C_{\max}$  (1:1,5:4,6) i  $AUC_{0-\infty}$  (1:2,2:5,4).

Normalizovaná hodnota  $C_{\max}$ , tj. poměr  $C_{\max}/\text{dávka}$ , byla signifikantně vyšší po dávce 10 mg/kg v porovnání s vyššími dávkami. Poměr  $AUC_{0-\infty}/\text{dávka}$  se snižoval s rostoucí dávkou a signifikantní rozdíl byl nalezen mezi dávkovými skupinami 10 a 90 mg/kg. 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. Také po *i.t.* podání naměřené koncentrace nor-NOHA výborně souhlasily s koncentracemi predikovanými populačním modelem. 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).

**Graf 1:** Závislosti mezi středními hodnotami ( $\pm$ SD) počáteční koncentrace po *i.v.* podání  $C_0$ , maximální koncentrace po *i.p.* a *i.t.* podání  $C_{\max}$  a plochy pod křivkou plazmatických koncentrací  $AUC_{0-\infty}$  a dávkou.



### 6.3.2. Opakované intraperitoneální podání nor-NOHA

Graf 2 znázorňuje průměrné koncentrace ( $\pm$ 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 8.

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 9). 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).

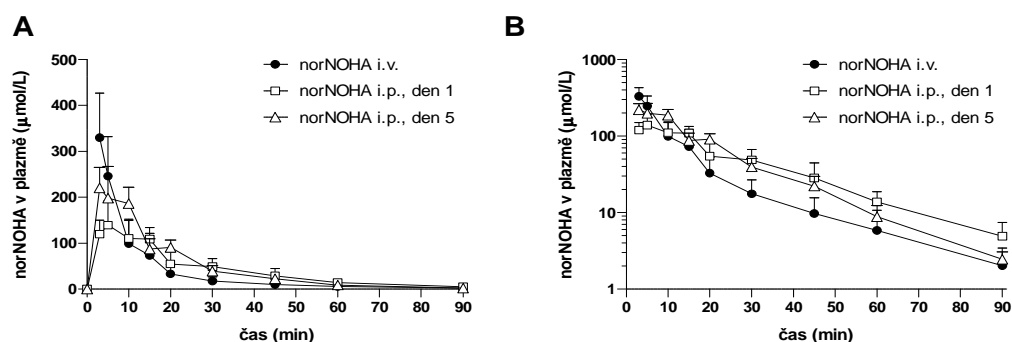
S ohledem na výsledky dekonvoluční analýzy, byly dva paralelní vstupy prvního řádu  $a_1$  a  $a_2$  přidány do farmakokinetického modelu pro inhibitor norNOHA podaný *i.p.* Pomocí simultánního porovnání dat po *i.p.* a *i.v.* podání bylo možné odhadnout kinetické parametry charakterizující absorpci s přijatelnou přesností (tabulka 8). Populační model vykázal 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 8. V hodnotách celkové clearance ( $CL$ ), 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 významné rozdíly mezi první a pátou *i.p.* aplikací byly zjištěny také v hodnotách  $F$ ,  $F_{a1}$  a  $F_{a2}$  (Tabulka 10).

**Graf 2:** 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 8:** 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>I.v.</i> aplikace	<i>I.p.</i> aplikace, den 1	<i>I.p.</i> aplikace, den 5
$C_0, C_{max}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>a</sup>	568	139	221
$T_{max}$ (min)	NA	5	3
$AUC_{0-t}$ (min. $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>b</sup>	4167	3703	4349
$AUC$ (min. $\mu\text{mol/l}$ )	4225	3824	4400
$\lambda_z$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,0348	0,0387	0,0472
$t_{1/2}$ (min)	19,9	17,9	14,7
$MRT, MTT$ (min) <sup>b</sup>	12,5	26,6	19,3
$k_{a1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	NA	0,307	0,396
$k_{a2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	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
$F_{a1}$ (%) <sup>c</sup>	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 ( $a1$ ) a pomalejším ( $a2$ ), biologická dostupnost ( $F$ ) a části dávky dostupné rychlým ( $F_{a1}$ ) a pomalejším procesem absorpce ( $F_{a2}$ ), rychlostní konstanty a poločasy absorpce, charakterizující absorpční procesy  $a1$  a  $a2$  ( $k_{a1}, k_{a2}, t_{1/2,a1}, t_{1/2,a2}$ )

**Koncentrace aminokyselin v plazmě** Průměrné koncentrace argininu v plazmě v závislosti na čase jsou znázorněny v Grafu 3. 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. 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 % ( $p < 0,02$ ). 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.

**Tabulka 9 :** Parametry populačního farmakokinetického modelu

Parametr	I.v. aplikace		I.p. aplikace, den 1		I.p. 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
$k_{el}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,166 (8%)	16%	0,149 (7%)	ne	0,148 (7%)	ne
$k_{12}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,050 (16%)	27%	0,034 (11%)	ne	0,035 (11%)	ne
$k_{21}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	0,057 (18%)	49%	0,049 (11%)	ne	0,050 (10%)	ne
$F_{a1}$ (%)	na	na	32,2 (24%)	18%	25,4 (42%)	34%
$F_{a2}$ (%)	na	na	58,6 (15%)	37%	77,6 (15%)	4,9%
$k_{a1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	na	na	0,37 (29%)	25%	0,84 (10%)	13%
$k_{a2}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	na	na	0,051 (12%)	12%	0,089 (14%)	19%
reziduální chyba	0,19 (19%)	ne	0,19 (12%)	ne	0,16 (13%)	ne

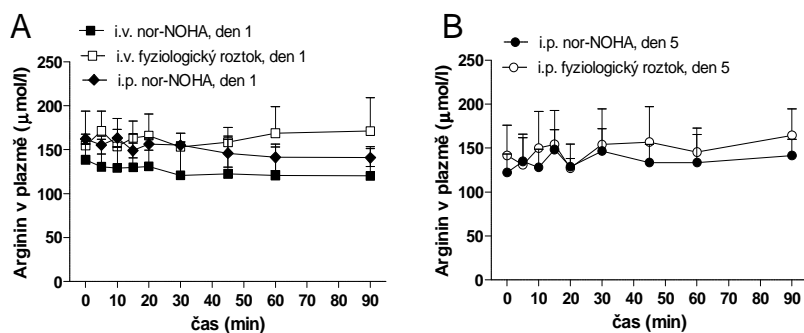
Vysvětlivky: na...neaplikovatelné pro i.v. podání, ne..parametr nemohl být odhadnut

**Tabulka 10:** 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.v. aplikace	I.p. aplikace, den 1	I.p. 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 ( $\text{ml}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	42,3 (30,0-59,7)	44,3 (36,7-53,6)	43,0 (34,6-53,4)
Q ( $\text{ml}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	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 <sup>c</sup> (3,4-4,7)
$C_0, C_{max}^{\#}$ ( $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	670 <sup>ip1, ip5</sup> (553-812)	139 <sup>iv, ip5</sup> (111-176)	182 <sup>iv, ip1</sup> (141-236)
AUC (min. $\mu\text{mol}/\text{l}$ )	4030 (2850-5680)	3502 (2530-4849)	4112 <sup>ip1</sup> (3217-5256)
$t_{1/2\alpha}$ (min)	2,89 <sup>ip1, ip5</sup> (2,47-3,38)	3,54 <sup>iv</sup> (3,30-3,81)	3,53 <sup>iv</sup> (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 <sup>c</sup> (0,79-0,83)
$t_{1/2,a2}$ (min)	ne	13,6 (13,0-14,3)	7,8 <sup>c</sup> (7,0-8,7)
F (%)	ne	91,2 (78,3-106)	104 <sup>a</sup> (99,1-109)
$F_{a1}$ (%)	ne	32,3 (30,1-34,7)	25,9 <sup>a</sup> (21,2-31,6)
$F_{a2}$ (%)	ne	58,3 (46,1-73,8)	77,6 <sup>b</sup> (77,0-78,2)

Vysvětlivky: Uveden je geometrický průměr a interval odpovídající průměru $\pm$ 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... $p < 0.001$ ;

**Graf 3:** 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.



### 6.3.3. Identifikace metabolitu norNOHA v potkaní plazmě

Na chromatogramech vzorků plazmy po podání norNOHA potkanům byl pozorován pík neznámé látky, označené za možný metabolit norNOHA. Tento pík nebyl přítomen na chromatogramech extraktů plazmy po přidání norNOHA k vzorkům plazmy nebo plné krve potkana a inkubaci *in vitro*. Molekulová hmotnost iontu a dceřiných iontů z experimentu MS<sup>n</sup> s přihlédnutím

k fragmentačnímu schématu ukázala na norarginin jako pravděpodobný metabolit norNOHA (Hroch, Havlinova, Nobilis and Chladek 2012). 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 nebyla použita jako kalibrační standard pro stanovení norargininu. Z důvodu dalšího potvrzení výsledku identifikace neznámé látky jako norargininu, 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 ultračistěvodě infundovaného do proudu mobilní fáze bez přítomnosti chromatografické kolony (Hroch, Havlinova, Nobilis and Chladek 2012). Koncentrace norargininu v plazmě se po podání 10 mg/kg norNOHA potkanům Wistar jako *i.v.* bolus snižovaly ve srovnání s norNOHA podstatně pomaleji.

## 7. Diskuze

### 7.1. Model akutního poškození plic bakteriálním lipopolysacharidem u potkana Wistar

Model endotoxémie po podání bakteriálního lipopolysacharidu je jednoduchý a často využívaný. 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.

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. Za 48 hod došlo k poklesu eNO na úroveň kontrolní skupiny. Popsaný časový profil koncentrací eNO odpovídá literárním údajům (Lee et al. 2001; Rolla et al. 1997). Lee a spolupracovníci popsali 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. Expres eNOS na úrovni proteinu byla zvýšena také v játrech. Expres proteinu eNOS se po podání LPS nezměnila. Expres na úrovni mRNA iNOS byla zvýšena ve 3. i 6. hod po *i.p.* podání. Za 6 hod byla expres 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 v literatuře dobře popsán (Agorreta et al. 2003; Mori et al. 1998). Oproti zvýšené expresi iNOS mRNA, expres eNOS mRNA byla 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 intratracheální aplikaci exprese mRNA iNOS nebyla sledována.

Po *i.t.* podání LPS došlo 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 zvýšené propustnosti alveolokapilární membrány, která je pro ALI/ARDS charakteristická. Také zvýšení procentuálního zastoupení neutrofilů je považováno za charakteristický znak probíhajícího 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. 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- $\alpha$ , 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 experimentálně navozenou endotoxémií po *i.v.* podání LPS *E. coli*, u nichž byl pozorován charakteristický 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 sepsí 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 poškození 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

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 indukcí 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 indukcí 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 při sepsi (Freund et al. 1979). Výsledky dalších studií ukazují na synchronizovanou indukcí iNOS, argináz, a transportérů CAT1 a -2 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).

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 indukcí exprese a aktivity tohoto enzymu dochází až v pozdější fázi, tj. za 6 až 12 hod (Colleluori et al. 2001; Mori, et al. 1998; 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 došlo na úrovni mRNA ke zvýšení 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- $\alpha$ , interferon- $\gamma$  a IL-1 $\beta$  uvolňující se po podání LPS indukují expresi CAT2 (King, et al. 2004; Nelin et al. 2001; Visigalli et al. 2004; Yang et al. 2004). Naopak v tekutině z BAL se koncentrace argininu neměnila. Pokud je možné předpokládat, že koncentrace v BAL odráží dostupnost argininu v dýchacích cestách, pak je důležitým zjištěním, že dostupnost neklesá i přes indukcí iNOS a argináz a výrazné zvýšení syntézy NO. Je možné usuzovat na souvislost tohoto nálezů s časnou indukcí membránových transportérů pro arginin ve strukturálních 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- $\alpha$ . Předpokládáme, ale dosud ne zcela objasněnými mechanismy protizánětlivého účinku jsou inhibice fosfodiesteráz vedoucí ke zvýšení cAMP a snížení genové exprese TNF- $\alpha$  a aktivace histon deacetylázy 2 potlačující genovou expresi prozánětlivých mediátorů (Barnes 2013; Deree et al. 2008). V publikovaných studiích PX u endotoxemických potkanů výrazně snížil koncentraci TNF- $\alpha$  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 nález odpovídá všeobecně přijímanému názoru že PX inhibuje NF- $\kappa$ 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 4 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).

Akutní poškození plic je stále aktuální téma v klinické medicíně. Výsledky recentních studií naznačily, že zvýšená exprese argináz přispívá ke zvýšení propustnosti endoteliální bariéry a k edému plic při ALI a to potlačením produkce NO syntázou eNOS. Je otázkou, zda je možné inhibicí argináz ovlivnit nejen časnou zánětlivou fázi, ale i signální dráhy a další děje iniciující následnou 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

## 7.2. 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 Nosálové, 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<sub>x</sub> v BAL. V této fázi studie jsme neměli možnost využít přímé neinvazivní měření vydechovaného NO pro dlouhodobou závalu 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<sub>x</sub>. 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 neurotropní 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-κB. 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 signifikantnímu 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 hyperreaktivity (viz níže), také dochází ke zvýšené produkci polyaminů a L-prolinu, což jsou hlavní složky podléjící 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).

Expresí 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 transportéru 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 průduškové hyperreaktivitě v časně 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).

### 7.3. Farmakokinetika inhibitoru argináz norNOHA

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<sub>max</sub> 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 podané 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.

Rada 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 samcům 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 meziprodukt 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).

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  $\mu\text{m}$  (Cryan et al. 2007). Lze předpokládat, že částice takové velikosti byly zachyceny především v proximální části dýchacích cest, které jsou méně prostupné než distální část 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, N<sup>6</sup>-monomethyl-L-arginine a N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl)-L-lysin (inhibitory NOS). Tyto látky využívají pro průnik Calu-3 buňkami (lidské bronchiální epiteliální buňky) na apikální straně transportér B<sup>0,+</sup> a na straně bazolaterální transportér y<sup>1</sup>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 závisí na aerodynamickém průměru inhalované částice. Část dávky tak mohla proniknout 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 i po *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 zaznamenány jen malé rozdíly mezi první a pátou aplikací v hodnotě AUC a C<sub>max</sub> (nárůst AUC o 17 % a C<sub>max</sub> o 31 %). Z výsledků populačního kompartmentového modelování vyplývá, že by tyto změny mohly být způsoben zvyšujícím se rozsahem (F) a mírou absorpce (t<sub>1/2, a1</sub> a t<sub>1/2, a2</sub>). 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<sub>max</sub> 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 (ornithin, 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. Expres 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 argininu NOS je rozhodující lokální dostupnost substrátu v místě enzymu a přítomnost mnoha faktorů včetně transportérů, enzymů a jejich kofaktorů (Luiking, Ten Have, Wolfe and Deutz 2012; Ryo 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 ornithinu účinkem norNOHA mohlo být menší z důvodu, že i kontrolní potkani v naší studii měli nižší koncentraci ornithinu 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 nor-NOHA v plazmě  $C_{max}$  se v naší studii pohybovala v rozmezí 130 až 350  $\mu$ M a koncentrace se snížila pod 10  $\mu$ M do 90 min po podání. Pro srovnání, inhibiční účinek norNOHA na arginázu v myších makrofázích charakterizuje inhibiční konstanta  $IC_{50}=10 \mu$ 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  $K_i=0,5 \mu$ 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 argináz. Tato 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 tkáňové koncentrace, aktivity enzymů zapojených do metabolismu aminokyselin, exprese transportérů, změny v katabolismu a syntéze proteinů aj.

## 8. 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 zastoupením 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 vydechaného NO (>30 krát) a NO<sub>x</sub> 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 se již ve 3. hod po podání LPS zvýšila exprese iNOS, ArgI, ArgII, membránových transportérů pro arginin CAT1, CAT2 a CAT3. Expres 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<sub>x</sub>, nárůst exprese iNOS, ArgI a ArgII byl však srovnatelný. Jiné projevy ALI včetně oxidačního stresu byly výraznější, ale měla na nich významný podíl samotná tracheostomie a kanylace. Intratracheální podání pentoxifylinu potlačilo indukci iNOS a výrazně snížilo koncentrace vydechaného NO a NO<sub>x</sub> až na úroveň kontrolní skupiny. Expres 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 NOx 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 také 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 obstrukčních onemocnění dýchacích cest. Byla vyvinuta, rozsáhle validována a poprvé opublikována 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 norarginin. Jde o analogii s endogenní látkou hydroxyargininem, která je přeměňována 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/ Při 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/ Při opakovaném podávání norNOHA dochází k nárůstu plazmatických koncentrací glutaminu a histidinu. Nelze vyloučit, že tyto změny nepřímo ukazují na sníženou detoxifikaci amoniaku z důvodu 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.



## 9. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- BÖGER, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr*, Jun 2007, vol. 137, no.6, s. 1650S-1655S.
- 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.
- 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.
- 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.; SCHUURMAN, F.; POWW, 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 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.

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.

DONNELLY, L. E. Exhaled breath condensate: nitric oxide-related compounds. *Exhaled Biomarkers*. 2010, vol. 49, s. 207-216.

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.

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.

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.

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.

HAQUE, K.; PAMMI, M. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011 2011, vol. 10, CD004205.

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.

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-(omega)-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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.; SUGIHARA, 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.

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.

LUCAS, R.; YANG, G.; GORSHKOV, B. A.; ZEMSKOV, E. A. et al. Protein kinase C- $\alpha$  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, 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.; 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.

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.

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.

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.

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.

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.

SOOP, A.; ALBERT, J. ; WEITZBERG, E. ; BENGTTSSON, 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.

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.

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 $\omega$ -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.

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.

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.

VISIGALLI, R.; BUSSOLATI, O.; SALA, R.; BARILLI, A. et al. The stimulation of arginine transport by TNF $\alpha$  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.

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, 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.

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.

#### 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](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_March13.pdf)

## 10. Přehled publikovaných prací

### Původní vědecké práce s impakt faktorem:

**HAVLÍNOVÁ Z., HROCH M., NAGY A., ŠIŠPERA L., HOLEČEK M., CHLÁDEK J.** Single- and multiple-dose pharmacokinetics of arginase inhibitor N $\omega$ -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]. **IF: 0,852**

**HAVLÍNOVÁ Z., BABICOVÁ A., HROCH M., CHLADEK J.** Comparative pharmacokinetics of N( $\omega$ )-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. **IF:1,984**

**BABICOVA A., HAVLINOVA Z., HROCH M., REZACOVA M., PEJACHAL J., VAVROVA J., CHLADEK J.** In vivo study of radioprotective effect of NO-synthase inhibitors and acetyl-L-carnitine. *Physiological research*. Dec 2013, vol. 62, no. 6, s. 701-10. Epub 2013 Jul 17. **IF: 1,531**

**CHLADKOVÁ J., SENKERIK M., HAVLINOVA Z., KRČMOVA I., CHLADEK J.** Alveolar concentration and bronchial flux of nitric oxide: two linear modeling methods evaluated in children and adolescents with allergic rhinitis and atopic asthma. *Pediatric Pulmonology*. Nov 2012, vol. 47, no. 11, s. 1070-9. **IF:2,375**

**HROCH M., HAVLÍNOVÁ Z., NOBILIS M., CHLÁDEK J.** HPLC determination of arginases inhibitor N-( $\omega$ )-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 science*. Jan 2012, vol. 880, no. 1, s. 90-9. **IF:2,487**

BABICOVA A., HAVLINOVA Z., PEJCHAL J., TICHY A., REZACOVA M., VAVROVA J., CHLADEK J.. Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats. *International journal of radiation biology*. Oct 2011, vol. 87, no. 10, s. 1067-73. **IF:2,275**

RIHAK V., ZATLOUKAL P., CHLADKOVA J., ZIMULOVA A., HAVLINOVA Z., CHLADEK J.. Nitrite in exhaled breath condensate as a marker of nitrosative stress in the airways of patients with asthma, COPD, and idiopathic pulmonary fibrosis. *Journal of clinical laboratory analysis*. Sep 2010, vol. 24, no. 5, s. 317-22. **IF:1,031**

CHLADKOVÁ J., HAVLÍNOVÁ Z., CHYBA T., KRCMOVÁ I., CHLÁDEK J. Analysis of single-breath profiles of exhaled nitric oxide in children with allergy and asthma: guideline-derived plateau concentrations compared to results of automatic evaluation by two analyzers. *Journal of asthma*. Nov. 2008, vol. 45, no.9, s. 820-6. **IF:1,330**

#### **Původní vědecké práce bez impakt faktorů:**

CHLÁDKOVÁ, J., HAVLÍNOVÁ, Z., KRČMOVÁ I., CHYBA, T., CHLÁDEK, J. Metodická hlediska vyšetření vydechaného oxidu dusnatého u dětí. 2008 *Alergie*. vol. 10, no. 4, s. 262-268

HAVLÍNOVÁ Z., CHLÁDEK J., MIČUDA S., MARTÍNKOVÁ J., PROKOPOVÁ J.. Arginine metabolism in a rat model of bronchial asthma. *Biomedical Papers of the Faculty of Medicine of Palacky University*. Sep 2007, vol. 151, s. 29-31

#### **Postery na odborných setkáních**

BABICOVA A., HAVLINOVA Z., CHLADEK J., REZACOVA M., HROCH M., PEJCHAL J., VAVROVA J.. Markers of oxidative and nitrosative stress in response to developing radiation pneumonitis. *14th International Congress of Radiation Research*, Varšava, 28.8.-1.9.2011.

BABICOVA A., HAVLINOVA Z., CHLADEK J., REZACOVA M., HROCH M., PEJCHAL J., VAVROVA J. Radioprotective effect of selected substances in Wistar rat after whole-body irradiation. *38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society*, Stockholm, 5.-9.9.2010.

BABICOVA A., HAVLINOVA Z., CHLADEK J., REZACOVA M., HROCH M., PEJCHAL J., VAVROVA J.. Bioindicators of nitrosative stress in Wistar rats following whole body irradiation. *37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society*, Praha, 26.9.-29.9.2009.

HAVLINOVA Z., CHLADEK J., MICUDA S., HROCH M., MARTINKOVA J. Changes in the metabolic pathway arginin-nitric oxide in inflammatory lung disease, *58. Farmakologicke dny*, Praha, 3.-5.9.2008

HAVLINOVA Z., CHLADEK J., MICUDA S., PROKOPOVA J., MARTINKOVA J.. Arginine metabolism in A rat model of bronchial asthma. *57. Farmakologicke dny, Olomouc*, 12.-14.9.2007

## **11. Seznam použitých zkratk**

**ALI**...akutní poškození plic; **ARDS**... syndrom akutní dechové tísně; **Arg**...argináza; **BAL**... bronchoalveolární laváž; **CAT**...transportér pro kationické aminokyseliny; **eNOS**...endoteliální syntáza oxidu dusnatého; **FR**...fyziologický roztok; **CHOPN**...chronická obstrukční plicní nemoc; **GINA**... *Global initiative for asthma*; **iNOS**...indukovatelná syntáza oxidu dusnatého; **LPS**...lypopolysacharid; **MDA**... malondialdehyd; **mRNA**...mediátorová RNA; **nNOS**...neuronální syntáza oxidu dusnatého; **norNOHA**...N<sup>ω</sup>-hydroxy- nor-L-arginin; **NS**...nesignifikantní; **qRT-PCR**...polymerázová řetězová reakce v reálném čase; **OVA**...ovalbumin; **PX**...pentoxifylin; **RSE**...relativní chyba; **SPE**...extrakce pevným sorbentem; **SPF**...*specific pathogen-free*; **TBST**...tris pufr s přísadkou Tweenu 20