

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_x 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_x byla naopak nižší. Nezávisle na cestě podání způsobil LPS v 6. hod od aplikace indukci exprese iNOS proteinu v plicní i jaterní tkáni. Expresce na úrovni mRNA iNOS po *i.p.* podání byla zvýšena ve 3. i 6. hod. Expresce 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_x 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)₃. 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_x). Sledování exprese na úrovni mRNA a proteinů prokázalo v plicní tkáni jak indukci iNOS tak i eNOS. Expresce 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. Expresce 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^o-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_{max} 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_{max}. 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.