



Nové trendy vo farmakoterapii IV.

Zborník prác

Martin, 2012

Nové trendy vo farmakoterapii IV.

Recenzovaný zborník prác

Vydanie zborníka podporili spoločnosti **Alphamedical, CSC Pharmaceuticals, Amgen**

Vydanie zborníka bolo podporené projektom **Dobudovanie Centra experimentálnej a klinickej respirológie (CEKR II)** - „Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov ES“ – ERDF – Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zostavovatelia:

doc. RNDr. Soňa Fraňová, PhD., mim. prof.

doc. MUDr. Juraj Mokry, PhD.

Recenzenti:

doc. MUDr. Ingrid Tonhajzerová, PhD.

doc. MUDr. Martin Wawruch, PhD.

Zborník neprešiel jazykovou korektúrou.

Za jazykovú a gramatickú stránku zodpovedajú autori jednotlivých príspevkov.

Miesto a rok vydania: Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine, 2012

Počet strán: 136

Dostupné online: www.jfmed.uniba.sk

ISBN: 978-80-89544-32-5

Obsah

Antošová et al.	Self-monitoring bronchiálnej astmy s pomocou prenosného analyzátoru vydychovaného oxidu dusnatého – prvé výsledky	7
Baňasová et al.	Bucillamine derivatives with enhanced potential to scavenge hypochlorite	14
Bauer et al.	Pôsobenie reaktívnych foriem kyslíka na hladké svaly zažívacieho, dýchacieho systému a ciev	20
Bauerová et al.	Prepojenie procesov oxidačného stresu a rozvoja zápalu zapojeného do etiopatogenézy reumatoidnej artritídy	28
Brozmanová et al.	Rozdiely v aktivácii nodózných a jugulárnych nociceptívnych vlákien v pažeráku cez TRPA1 receptor	39
Čáповá et al.	Pokroky vo farmakoterapii pľúcnej arteriálnej hypertenzie	45
Fraňová et al.	ACE inhibítory a kašeľ	53
Hrtánek et al.	Antidepresíva a štrukturálne zmeny v mozgu sprevádzajúce depresiu	58
Jošková et al.	Chronické ochorenia a mukociliárny transport	63
Mojžiš et al.	Flavonoidy a chalkóny ako potenciálne inhibítory nádorovej angiogenézy	67
Mokrá a Mokrý	Perspektívy podania inhibítorov fosfodiesteráz v liečbe syndrómu aspirácie mekónia novorodencov	74
Nosál' et al.	K mechanizmu inhibície oxidačného vzplanutia neutrofilných leukocytov prírodnými polyfenolmi	82
Nosáľová	Terapeutická intervencia osteoporózy u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc	88
Péčová a Tatár	Objektívne hodnotenie chronického kašľa a efektívnosti jeho liečby	95
Petrová et al.	Farmakologické ovplyvnenie funkcie endotelu	98
Plevková et al.	Vplyvy nosovej sliznice v „up“ a „down“ regulácii kašľa – možnosti terapeutického využitia	102
Strapková a Antošová	Vzťah glutamátergického a nitrergického systému v podmienkach bronchiálnej hyperreaktivity	109
Šnircová et al.	Atomoxetín - účinná voľba v liečbe hyperkinetickej poruchy	117
Šutovská et al.	CRAC iónové kanály a alergická astma	125

Venovanie

V týchto dňoch sa dožíva významného životného jubilea dlhoročná vedúca Ústavu farmakológie JLF UK v Martine, prof. MUDr. Gabriela Nosáľová, DrSc. Preto sme sa rozhodli okrem gratulácií a prání všetkého najlepšieho vydať tento zborník, ktorý prináša okrem stručného prierezu jej bohatým akademickým životom aj práce z rôznych oblastí farmakológie, z rôznych slovenských farmakologických pracovísk a od viacerých popredných farmakológov, ako prejavenie úcty k jej doterajšej aktívnej práci v oblasti farmakologického výskumu v bývalom Československu ako aj na Slovensku.

Ad multos annos, pani profesorka!

V Martine, 8.10.2012

*doc. RNDr. Soňa Fraňová, PhD., mim. prof.
vedúca Ústavu farmakológie JLF UK v Martine*

Akademický životopis prof. MUDr. Gabriely Nosáľovej, DrSc.

Prof. MUDr. Gabriela Nosáľová, DrSc. sa narodila 8. októbra 1942 v Dolnom Dubovom okrese Trnava. Napriek tomu, že za štúdiami z rodiska odišla krátko pred dovŕšením 14-tich rokov, so svojím rodiskom je doteraz úzko spätá. Po absolvovaní Strednej zdravotníckej školy v Martine v roku 1960 začala pracovať na internom oddelení OÚNZ v Martine ako zdravotná sestra. Na popud primára MUDr. J. Trokana sa rozhodla v roku 1961 pokračovať v štúdiu na Lekárskej fakulte v Bratislave, ktorú v roku 1967 úspešne ukončila na detašovanom pracovisku LF UK v Martine. Od 1. augusta 1967 až doteraz sa stal jej jediným pracoviskom Ústav farmakológie JLF UK Martin, kde pracovala ako asistentka, odborná asistentka, docentka, profesorka a v rokoch 1992 až 2008 bola jeho vedúcou. V roku 1974 úspešne obhájila vedecký titul kandidátky vied na LF KU v Hradci Králové na tému „Vplyv rezerpínu na obsah kalcia v tkanivách“. Od roku 1975 sa venuje riešeniu respirologickej problematiky hlavne farmakológii kašľového reflexu, a to tak v rámci habilitačnej práce (docentúru získala v roku 1978), doktorskej dizertačnej práce (titul DrSc. udelený v roku 1992) ako aj inauguračnej práce (titul profesora získala v roku 1995).

V oblasti farmakológie a klinickej farmakológie dlhodobo aktívne prispieva k výchove absolventov tým, že odovzdáva svoje odborné vedomosti z úrovne poznatkov doby. Ako vedúca pracoviska dôsledne dbala na zvyšovanie úrovne pedagogickej kvalifikácie učiteľov. V praxi tak napĺňala myšlienku, že iba erudovaný odborník zaručí kvalitný pedagogický proces. Dôkazom je súčasný stav pracoviska. Z počtu 7 pracovníkov je 1 profesor, 3 docenti, 1 odborný asistent (tesne pred habilitáciou) a 2 vedeckí pracovníci s hodnosťou PhD.

Počas svojho pôsobenia v odbore farmakológie a klinickej farmakológie bola školiteľkou 15 doktorandov z ktorých doteraz 11 úspešne ukončilo doktorandské štúdium pri zachovaní vysokých požiadaviek na ich odbornosť.

Prof. Nosáľová má veľkú zásluhu na profilizácii pracoviska. Pod jej dlhoročným odborným vedením pracovisko získalo významný kredit v oblasti farmakológie respiračného systému tak doma ako aj v zahraničí. Zvlášť cenné sú zistenia rozširujúce poznanie mechanizmov účinku látok ovplyvňujúcich kašľový reflex, najmä objasnenie úlohy gabaergických, sérotonínergických a opioidných receptorových systémov. Okrem obohatenia teoretickej roviny poznania v tejto oblasti je významná aj praktická realizácia získaných poznatkov. Dôkazom toho je zavedenie prvého československého nenarkotického antitusika dropropizínu do klinickej praxe. Nemenej zaujímavé sú výsledky spolupráce

s Chemickým ústavom SAV v Bratislave a Chemickým ústavom Univerzity v Burdwane v oblasti využitia rastlinných polysacharidov v liečbe kašľa.

Získané poznatky boli publikované vo vedeckých a odborných publikáciách doma i v zahraničí. Prof. Nosáľová je spoluautorkou 3 učebníc, 3 vysokoškolských skrípt, 11 vedeckých monografií z ktorých 2 boli vydané v zahraničí. Jednu z nich vydalo v roku 2002 vydavateľstvo Springer. Táto knižná publikácia bola vydaná v Indii - New Delhi (2005), v Číne – Beijing (2006) a v Grécku – Atény (2009). Na svoje práce získala prof. Nosáľová značný citačný ohlas. Svedčí o tom celkový počet citácií 721, z toho 274 je v SCI. Je tiež nositeľkou 2 patentov, z ktorých 1 je realizovaný. Menovaná uvedené výsledky získala pri riešení 31 grantových úloh (APVV, LPP, VEGA, MZ SR, UK a JLF UK), v ktorých u väčšiny bola zodpovednou riešiteľkou.

Symbiózu jej odborných vedomostí, organizačných zručností a osobnostných vlastností využíva viacero inštitúcií. Okrem iného pôsobila 2 funkčne obdobia ako podpredsedníčka Vedeckej rady SAV v Bratislave, členka Akreditačnej komisie vlády SR a ČR, dlhoročná členka Komisie pre liečivá ŠÚKL, predsedníčka Akademického senátu JLF UK Martin, predsedníčka Vedeckej rady Alpha medical a.s., predsedníčka Etickej komisie na JLF UK Martin, v rokoch 1978-2008 podpredsedníčka výboru Slovenskej farmakologickej spoločnosti, editorka Journal of Physiology and Biophysics, vedecká redaktorka Bratislavských lekárskeho listov a mnohé ďalšie.

Za svoju prácu získala mnohé ocenenia ako napr. Slovak Gold (2003), 5 krát Cenu literárneho fondu (2001 – 2005), Cenu primátora mesta Martin (2005), Čestné uznanie v rámci udeľovania ocenení „Vedec roka 2006“, Zlatú medailu JLF UK Martin (2009) a mnohé ďalšie.

Okrem vyššie uvedeného je potrebné na záver skonštatovať, že je akademicky neustále veľmi aktívna, že všetko zvláda v dobrom zdraví, plná energie a nápadov realizovať svoje plány, a teší sa spolu so svojím manželom z úspechov svojich dvoch synov a piatich vnúčat.



Self-monitoring bronchiálnej astmy s pomocou prenosného analyzátora vydychovaného oxidu dusnatého – prvé výsledky

Martina Antošová¹, Alica Benčová², Eva Rozborilová²

¹ Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin, ² Klinika pneumológie a ftizeológie, Jesseniova lekárska fakulta a Univerzitná nemocnica Martin, Martin
e-mail: antosova@jmed.uniba.sk

Úvod

Bronchiálna astma patrí k chronic-kým zápalovým ochoreniam respiračného systému. Pre toto ochorenie je typický eozinofilný zápal a určitá variabilita, ktorá môže a nemusí byť spojená s objavením sa objektívnych symptómov. Jednou z metód detekcie rozvoja eozinofilného zápalu a teda aj predpokladu zhoršenia ochorenia je detekcia frakcie vydychovaného oxidu dusnatého (FeNO).

Oxid dusnatý (NO) patrí k základným mediátorom regulujúcim fyziologické i patologické procesy prebiehajúce v respiračnom systéme. Je syntetizovaný z L-arginínu prostredníctvom štyroch izoform NO-syntáz, ktorých expresia a aktivita je modulovaná vplyvom viacerých faktorov ako napr. kompetíciou s inými enzymatickými systémami, aktivitou nukleárných transkripčných faktorov, prítomnosťou

prozápalových cytokínov a pod. Vplyv na účinok NO má aj jeho rýchla biotransformácia a reaktivita s následným vytváraním ďalších produktov (napr. voľných kyslíkových radikálov) (Ricciardolo, 2003). Vo fyziologických podmienkach produkujú konštitutívne izoformy NO-syntáz (cNOS) malé, relatívne stabilné množstvá NO. Tieto množstvá odrážajú „normálne“ hodnoty FeNO, udávané v ppb (parts per billion), ktoré sa u dospelého človeka stanovujú na základe pohlavia, výšky, fajčiarskej, alergickej anamnézy a prítomnosti akútneho ochorenia dýchacích ciest (Tab. 1,2). V patologických podmienkach (napr. zápal), sa hladina NO zvyšuje. Zároveň stúpa aj FeNO. Kontinuálna nadprodukcia je pravdepodobne spojená so zvýšenou expresiou a aktivitou indukčnej NO-syntázy (iNOS) (Dressel et al., 2008)

Tab. 1 Referenčné hodnoty FeNO pre nefajčiarov (upravené podľa Dressel et al., 2008).

	1 Fajčili ste pravidelne v ostatných 4. týždňoch?	Nefajčiar								
		Bez infekcie				Infekcia				
		Bez alergie		Alergia		Bez alergie		Alergia		
4 Výška	155 cm	15	22			18	28			
	160 cm	16	18	24	28	19	23	29	34	
	165 cm	17	20	25	29	21	24	31	36	
	170 cm	18	21	26	31	22	25	32	38	
	175 cm	19	22	28	32	23	27	34	40	
	ŽENA	180 cm	20	23	29	34	24		36	42
	185 cm	21	24	31	36	25	30	38	45	
	MUŽ	190 cm	22	25	32	38	27	31	40	47
	195 cm		27		40		33		50	

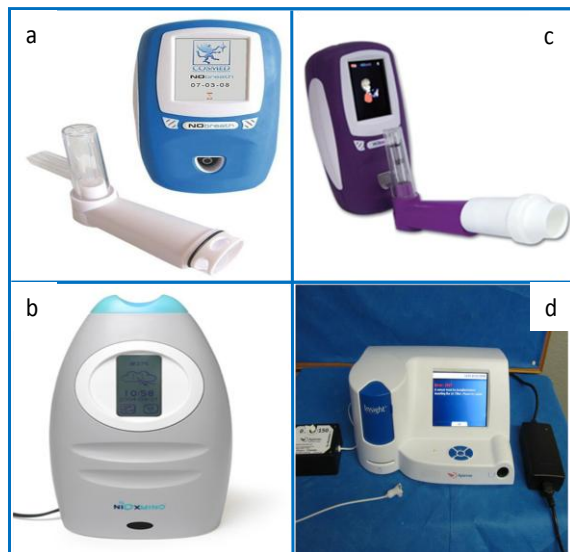
Tab. 2 Referenčné hodnoty FeNO pre fajčiarov (upravené podľa Dressel et al., 2008).

		Fajčiar								
		Bez infekcie				Infekcia				
		Bez alergie		Alergia		Bez alergie		Alergia		
1 Fajčili ste pravidelne v ostatných 4. týždňoch?										
2 Infekcia dých. ciest v ostatných 4. týždňoch?										
3 Známa alergická rinitída?										
4 Výška	155 cm	9		14		12		17		
	160 cm	10	12	15	17		12	14	18	21
	165 cm	10	12	16	18		13	15	19	23
	170 cm	11	13	16	19		14	16	20	24
	175 cm	12	14	17	20		14	17	21	25
	180 cm	12	14	18	21		15	18	23	26
	185 cm	13	15	19	23		16	19	24	28
	190 cm	14	16	20	24		17	20	25	29
	195 cm		17		25			21		31
	ŽENA									
MUŽ										

Viacere práce poukazujú na to, že hladina FeNO koreluje s eozinofilným zápalom dolných dýchacích ciest (FeNO > 50 ppb) a je relevantnou metódou využiteľnou na diferenciálnu diagnostiku nešpecifických respiračných symptómov, metódou objektívnej kontroly bronchiálnej astmy a monitoringu odpovede na liečbu inhalačnými kortikosteroidmi (IKS; Smith et al., 2005). Zvýšenú hladinu FeNO však môžeme zaznamenať aj u zdravých jedincov napr. u mužov, po prijatí potravín bohatých na dusičnany, po užití doplnkov výživy s obsahom L-arginínu a pod. (Kharitonov et al., 1997; ATS/ERS Recommendation 2005;). Vysoké hodnoty FeNO poukazujú na prítomnosť eozinofilného zápalu aj v prípade, kedy je pacient s bronchiálnou astmou asymptomatický. Vtedy sa tu otvára priestor pre viaceré otázky. Jednou z nich je účinnosť antiastmatickej (hlavne protizápalovej) terapie, druhou nutnosť pravidelného a správneho monitoringu astmy. Aj pri správnom diagnostickom postupe a reprodukcií nameraných hodnôt v súlade s odporúčaniami Americkej hrudnej spoločnosti (American Thoracic Society –ATS) a Európskej respirológickej spoločnosti (European Respiratory Society –ERS), môžu pri detekcii FeNO existovať interindividuálne rozdiely vo vzťahu k veku, pohlaviu, antropometrickým parametrom a pridruženým faktorom (napr.

cvičenie, fajčenie, iná ako antiastmatická farmakoterapia a pod.). Vysoké hladiny FeNO sú často podnetom na zvýšenie dávky inhalačných kortikosteroidov, ale pri kontrole účinnosti kortikosteroidnej terapie prostredníctvom FeNO analyzátorov je potrebné byť obzvlášť opatrný a preveriť v tejto súvislosti všetky potenciálne vplyvy (Smith et al., 2009).

V posledných rokoch sa začala odborná verejnosť zaoberať myšlienkou využitia FeNO-analyzátorov v selfmonitoringu bronchiálnej astmy. V tejto súvislosti bola vyslovená hypotéza, ktorá predpokladá, že osobné (individuálne) hodnoty sú klinicky užitočnejšie ako referenčné hodnoty namerané na určitej vzorke populácie. Analyzátory, ktoré sú v súčasnosti používané na detekciu FeNO sú značne drahé a k obsluhu vyžadujú určité technické zručnosti. Toto obmedzenie významne redukuje ich použitie v bežnej klinickej praxi. Aj napriek tomu sa však použitie prenosných analyzátorov vydychnutého vzduchu (obr. 1) pomaly ale isto stáva súčasťou odporúčaní starostlivosti o pacienta (prevažne detského) s bronchiálnou astmou hlavne z dôvodu nevyhnutnosti dobrej kontroly astmy.



Obr. 1 Prehľad dostupných prenosných FeNO analyzátorov: a) Quark NO breath® (COSMED), b) NIOX MINO® (Aerocrine), c) Bedfont NO breath® (Bedfont Scientific Ltd), d) Apeiron Insight NIOX Asthma Monitor® (Aerocrine).

V našej práci sme sa zamerali na možnosť využitia prenosného analyzátoru FeNO v selfmonitoringu novo diagnostikovaného ochorenia a jeho variability. U vybraného pacienta sme začali s monitoringom FeNO, pričom zaznamenávame „day-to-day“ variabilitu hodnôt vydychaného NO vo vzťahu k základnému ochoreniu, peľovej sezóne, iným ochoreniam a terapii.

Metóda

Selfmonitoring FeNO bol realizovaný u dospelého probanda (33 rokov) s novo diagnostikovanou bronchiálnou astmou. Vybraný proband si pomocou prenosného analyzátoru FeNO (NIOX MINO® Aerocrine, Švédsko) zaznamenával hodnoty FeNO 2 x denne pred užitím farmakoterapie (ráno a večer, obr. 2.).

1. Maximálny výdych (mimo prístroja)
2. Maximálny nádych (z prístroja, cez filter)
3. Výdych do prístroja (cez filter, bez prerušenia kontaktu s prístrojom)
4. Výsledok sa zobrazí na prístroji cca do 1-2 minút (je možné ho uložiť a/alebo vytlačiť')



Obr. 2 Postup samovyšetrenia s prenosným analyzátorom FeNO – NIOX MINO® (Upravené podľa Ergonomidesign IFP).

Analýzu tiež realizoval v prípade nočných ťažkostí. Výdychová doba bola nastavená na 6 sekúnd. NIOX MINO® je prenosný analyzátor vydychovaného NO, ktorý bol oficiálne schválený ATS a ERS na detekciu FeNO tak u detí ako aj dospelých. Pacient bol s prístrojom kompletne oboznámený a opakovane preskúšaný. Nameované hodnoty sú aj v porovnaní s prístrojom NIOX® hodnotené ako spoľahlivé, reprodukovateľné a plne využiteľné pre klinickú prax i pre domáci monitoring. Analýza výsledkov bola plánovaná na kvartálny interval, v práci prezentujeme 1 mesiac monitoringu, ktorý bol realizovaný po začatí terapie na začiatku peľovej sezóny. Výsledky boli štatisticky spracované s použitím Mann-Whitneyho testu. Proband mal byť monitorovaný v priebehu celého roka 2012, pre nespoluprácu sme museli následne zvoliť iného probanda.

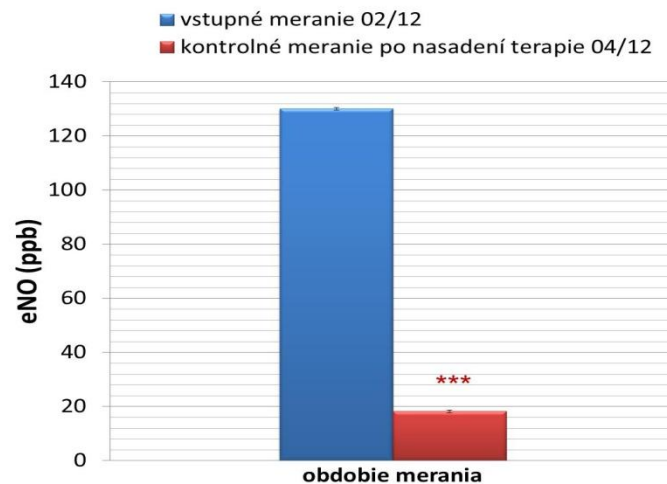
Výsledky

U 33-ročného pacienta s prolongovaným záchvatovitým kašľom po dobu 2 mesiace po infekte horných dýchacích ciest bolo vzhľadom na charakter a dennú variabilitu symptómov vyslovené podozrenie na bronchiálnu astmu. Spirometrickým vyšetrením bola potvrdená obštrukčná ventilačná porucha stredne ťažkého stupňa ($FEV_1/FVC < 70\%$, $FEV_1 = 3,08l = 71,9\%NH$). Následne bol realizovaný bronchodilatačný test, kde po 400ug salbutamolom došlo zlepšeniu FEV_1 o 24,9%. Pacient bol vyšetrený aj klinickým alergológom a aj napriek uvádzanej negatívnej alergickej anamnéze boli vykonané kožné alergické testy, s pozitivitou: tráva++++, buriny+++ , ambrózia++, lipa++, plesne+++ , jarné pele+. Neskôr bolo komplexné vyšetrenie doplnené o vyšetrenie FeNO, ktoré bolo vysoko pozitívne, 130ppb (obr 3). U pacienta bola preto nasadená inhalačná liečba v kombinácii salmeterol/flutikazón 50/500ug 1 inhalácia ráno a večer a salbu-

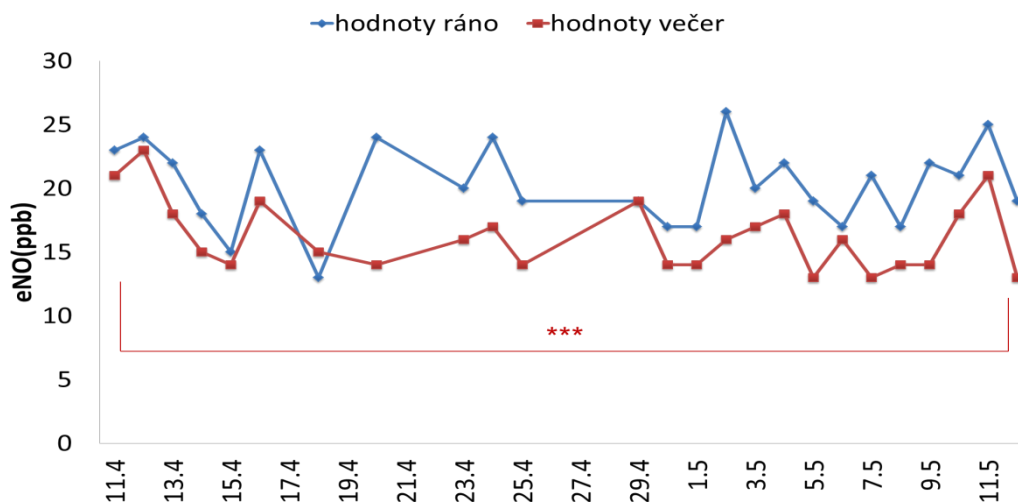
tamol 100ug 1 inhalácia podľa potreby. Následne sme pacienta inštruovali o dôležitosti kontroly astmy a začal so selfmonitoringom. Ten prebiehal 1 mesiac, pričom pacient bol nastavený na každodenné monitorovanie – ráno a večer – pred užitím farmakoterapie. V rámci monitoringu si zaznamenával aj vplyv externých faktorov akými v tomto prípade boli cvičenie (jazda na bicykli) a ich vplyv na zmeny hladín FeNO. Pacient nemal počas selfmonitoringu žiadne subjektívne ani objektívne ťažkosti, ani raz nemusel použiť predpísané krátkodobo pôsobiace bronchodilatancium. Zistili sme, že priemerné večerné hodnoty FeNO ($16,24 \pm 2,78$ ppb) boli signifikantne nižšie ako priemerné ranné hodnoty ($20,28 \pm 3,27$ ppb) (obr 4). Výsledky boli spracované a štatisticky vyhodnotené s použitím Mann-Whitney testu ($p < 0,001$). Hodnoty po cvičení boli pri individuálnom porovnaní nižšie, vcelku však tento faktor nemal na zmeny hladiny FeNO signifikantný vplyv.

Diskusia

Bronchiálna astma je ochorenie s postupnou progresiou, ktoré vyžaduje pravidelný monitoring a kontrolu. V tejto súvislosti sú sledované hlavne objektívne príznaky astmy v zmysle zvýšenia ich frekvencie, zvýšenia potreby tzv. „úľavových“ liekov, zhoršenie pľúcnych funkcií a zvýšenia počtu exacerbácií (Bateman et al., 2008). Tento prístup ale nezahŕňa monitoring zápalového procesu v dýchacích cestách. Aj preto sa metodika, ktorá neinvazívne, jednoducho, rýchlo a reprodukovateľne odráža úroveň eozinofilného zápalu v dýchacích cestách stala stabilnou súčasťou klinickej praxe a starostlivosti o astmatika. Jednou z výhod monitoringu frakcie vydychovaného NO je možnosť denného monitoringu v domácom prostredí (Pifferi et al., 2011).



Obr.3 Signifikantné zlepšenie hodnôt FeNO po pravidelnom 2 mesačnom užívaní inhalačných kortikosteroidov.



Obr.4 Vyhodnotenie self-monitoringu FeNO u vybraného probanda v 1-mesačnom intervale na terapii inhalačnými kortikosteroidmi. $p < 0,001$ (Mann-Whitney test).

Literatúra zaoberajúca sa touto problematikou je značne rozporuplná. De Jonste a spolupracovníci (2009) poukazujú na to, že pravidelné monitorovanie FeNO môže znížiť riziko exacerbácií. Na druhej strane, práca van der Valka a kolegov (2012) tento záver nepotvrďuje, aj keď priznáva že nie všetci probandi v skupine mali závažnú exacerbáciu v priebehu realizácie štúdie. Exacerbáciu môžeme definovať ako vystupňovanie zápalu dýchacích ciest, ktoré sa líši etiopatogeneticky (infekčný alebo alergický stimul) (Sykes, Johnson, 2008). Po pôsobení týchto stimulov môže hladina FeNO pomaly stúpať aj viac

ako 1 -2 týždne pred exacerbáciou. Nami vybraný proband nemal v priebehu mesačného selfmonitoringu stabilné hladiny FeNO. Rozdiely medzi dňami niekedy predstavovali aj viac ako 10 ppb. Len dve z hodnôt ranných meraní však prekročili hladinu 25 ppb a večerné hladiny FeNO boli všetky medzi 13 -23 ppb. Hladiny FeNO negatívne neovplyvnilo ani cvičenie a proband mohol aktívne cvičiť (jazda na bicykli) bez prítomnosti objektívnych príznakov astmy. U detí bola potvrdená určitá krížová korelácia medzi FeNO a prítomnosťou symptómov, čo môže byť pre identifikáciu hrozacej exacerbácie dôležité

(Stern et al., 2011). U dospelých sa táto korelácia zatiaľ nepotvrdila.

Ďalší faktor, ktorý môže ovplyvniť hladinu FeNO je terapia inhalačnými kortikosteroidmi. Protizápalová liečba kortikosteroidmi je základom liečby bronchiálnej astmy. Vzhľadom k systémovým a lokálnym nežiaducim účinkom, ktoré sa pri užívaní týchto liekov objavujú, je nevyhnutné nastaviť liečbu tak, aby pacient dostával čo najnižšie dávky s čo najvyšším terapeutickým účinkom. Pri variabilite odpovede na kortikosteroidnú liečbu je nevyhnutné aby mali lekári v klinickej praxi k dispozícii jednoduchý, efektívny, objektívny a zároveň bezpečný spôsob titrácie dávky kortikosteroidov (Smith et al., 2005). Základné terapeutické postupy odporúčajú aby bolo dávkovanie prispôbené objektívnej symptomatológii a výsledkom základných funkčných vyšetrení pľúc. Ďalšie práce poukazujú na to, že lepšie výsledky prináša zmena dávok v závislosti na sledovaní zmien hyperreaktivity dýchacích ciest a eozinofílie v indukovanom spúte. Tieto vyšetrenia sú však časovo náročné a v niektorých prípadoch aj ťažko realizovateľné. Dlhodobé pravidelné monitorovanie FeNO umožní porovnať reakciu zápalu v dýchacích cestách na prebiehajúcu farmakoterapiu. V našej práci sme zaznamenali účinnosť predpísanej terapie. Pôvodne detegovaná hladina FeNO (130ppb) bola po dvojmesačnej kombinovanej terapii zredukovaná na hladinu 18,26 ppb. V rámci selfmonitoringu si pacient detegoval hladiny NO, ktoré boli v norme, čo poukazuje na fakt, že eozinofilný zápal bol pod kontrolou. Pacient tiež doteraz nepoužil žiadne „úľavové“ antiastmatikum (salbutamol). Môžeme teda predpokladať, že predpísaná terapia je účinná a nateraz postačujúca. Pri korelácii FeNO s objektívnymi príznakmi astmy je možné povedať, že táto metóda je využiteľná pri kontrole ochorenia, priebehu zápalového procesu, správnosti a efektívnosti terapie a pod.

Pokles FeNO neznamena, že zápal je len dobre liečený, ale že pacient aj lieky užíva správne a tie sa dostávajú do dýchacích ciest (de Jongste 2005). Táto informácia je užitočná, pretože nesprávna technika inhalácie môže významne ovplyvniť proces liečby bronchiálnej astmy. Naše výsledky poukazujú na to, že proband bol správne zaškolený, dobre zvládol techniku inhalácie a liečivo sa dostáva do dýchacích ciest.

Záver

Aj napriek tomu, že monitoring prebiehal len krátku dobu, môžeme poukázať na to, že pravidelná realizácia takto citlivého vyšetrenia v domácom prostredí môže viesť k nastaveniu personalizovaného prístupu k pacientovi. To ale samozrejme vyžaduje ochotu spolupracovať na oboch stranách. Aj napriek tomu, že sme pre neochotu pacienta ďalej spolupracovať museli zvoliť pre ďalší selfmonitoring iného pacienta môžeme konštatovať, že perspektíva pre domáci monitoring FeNO existuje, hlavne pri komplikovaných prípadoch bronchiálnej astmy s ťažko nastaviiteľnou terapiou a nešpecifickými príznakmi.

Práca vznikla v rámci projektu Ministerstva zdravotníctva č 2007/46-UK-11 a Dobudovania Centra experimentálnej a klinickej respirológie (CEKR II) - „Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov ES“ – ERDF – Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Zoznam použitej literatúry

1. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:912-30.
2. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. Eur Respir J 2008; 31:143–178.

Nové trendy vo farmakoterapii IV.

3. de Jongste JC, Carraro S, Hop WC, Baraldi E. Daily telemonitoring of exhaled nitric oxide and symptoms in the treatment of childhood asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:93–97.
4. de Jongste JC. Yes to NO: the first studies on exhaled nitric oxide-driven asthma treatment. *Eur Respir J* 2005; 26: 379–381.
5. Dressel H, de la Motte D, Reichert J, Ochmann U, Petru R, Angerer P, Holz O, Nowak D, Jörres RA. Exhaled nitric oxide: Independent effects of atopy, smoking, respiratory tract infection, gender and height. *Respir Med* 2008;
6. Pifferi M, Bush A, Pioggia G, Di Cicco M, Chinnellato I, Bordini A, Macchia P, Boner AL. Monitoring asthma control in children with allergies by soft computing of lung function and exhaled nitric oxide. *Chest* 2011; 139:319–327.
7. Kharitonov S, Alving K, Barnes PJ. Exhaled and nasal nitric oxide measurements: Recommendations *Eur Respir J* 1997; 10: 1683–1693.
8. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003;58:175-182.
9. Smith AD, Cowan JO, Brassett KP, Herbison GP, Taylor DR. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med* 2005; 352:2163-73.
10. Smith AD, Cowan JO, Taylor DR. Exhaled nitric oxide levels in asthma: Personal best versus reference values. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 714-718.
11. Stern G, de Jongste J, van der Valk R, Baraldi E, Carraro S, Thamrin C, Frey U. Fluctuation phenotyping based on daily fraction of exhaled nitric oxide values in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:293– 300.
12. Sykes A, Johnston SL. Etiology of asthma exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:685–688.
13. van der Valk RJP, Baraldi E, Stern G, Frey U, de Jongste JC. Daily exhaled nitric oxide measurements and asthma exacerbations in children. *Allergy* 2012; 67: 265–271.

Bucillamine derivatives with enhanced potential to scavenge hypochlorite

Mária Baňasová¹, Lukáš Kerner², Ivo Juránek¹, Martin Putala², Katarína Valachová¹, Ladislav Šoltés¹

¹ Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, SK-84104, Bratislava, Slovakia, ² Department of Organic Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University of Bratislava, SK-84215, Slovakia
e-mail: Maria.Banasova@savba.sk

Introduction

Bucillamine (*N*-(2-mercapto-2-methylpropionyl)-L-cysteine, Fig. 1) is clinically used to treat rheumatoid arthritis and inflammation diseases. Horwitz in 2003 (Horwitz, 2003) confirmed that this drug is efficacious in reducing of acute

phase of inflammation and oxidative stress. Plausible mechanism of action is in response to oxidants such as hydroxyl and other radicals, forming a 7-membered cyclic disulfide - SA981, (*R*)-7,7-dimethyl-6-oxo-1,2,5-dithiazepane-4-carboxylic acid (Fig. 1).

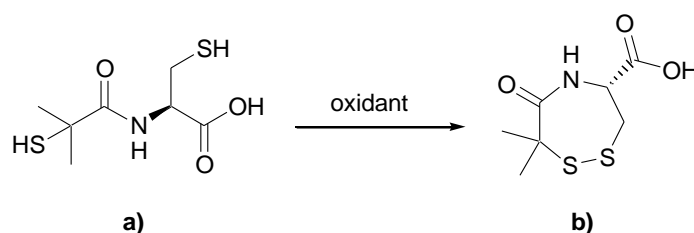


Fig. 1 Chemical structure of bucillamine a) and its 7-membered cyclic disulfide b).

Bucillamine acted also as a powerful $\cdot\text{OH}$ and $\text{ROO}\cdot$ scavenger. This fact was well established in 2011 with Valachová *et al.* and in 2012 with Baňasová *et al.* (Valachová *et al.*, 2011, Baňasová *et al.*, 2012).

Neutrophilic polymorphonuclear leukocytes produce and release not only reactive oxygen species (ROS); it is known that HOCl and taurine-*N*-monochloramine (TauCl) are the end-products of the neutrophilic polymorphonuclear leukocyte respiratory burst (Mainnemare *et al.*, 2004). Hypochlorous acid activates tyrosine kinase signaling cascades, leading to increased production of extracellular matrix components, growth factors, and inflammatory mediators. HOCl also increases capacity of α_2 -macroglobulin to bind TNF- α , IL-2, and IL-6. In human neutrophils, HOCl is generated from hydrogen

peroxide by action of myeloperoxidase (MPO) in the presence of chloride anion (Cl^-) (Weiss *et al.*, 1982). Oxygen-chlorine bond is highly polarized, and HOCl is the source of electrophilic Cl atom. Reaction of this bond with endogenous substrates can result in a generation of toxic intermediates, which may eventually lead to cell death (Thomas *et al.*, 1983, Grisham *et al.*, 1984).

Taurine, also generated by neutrophils, in a reaction with HOCl forms a relatively stable taurine chloramine (TauCl), which is less toxic and inhibits the production of inflammatory mediators, prostaglandins, and nitric oxide (Mainnemare *et al.*, 2004).

For targeting oxygen radicals and hypochlorous acid, the two compounds, bucillamine and taurine may be administered simultaneously. However, such ap-

plication has certain limitations, mainly due to different distribution and hence bioavailability of these distinct compounds within the body compartments. It would therefore be preferable having incorporated both functions into one single molecule, thus being able to deliver the desired effects to the respective site at once. For this reason, we were interested in extending the activity of bucillamine by the taurine's HOCl-scavenging ability.

Bucillamine is *in vivo* metabolized to the cyclic disulfide SA981 (Fig. 1) and *S*-methyl and *S,S'*-dimethyl derivatives SA679 and SA672, respectively (Fig. 2). Together with the parent structure, these have been investigated in connection with their immunomodulating effects (Matsuno *et al.*, 1998) as well as in respect to their

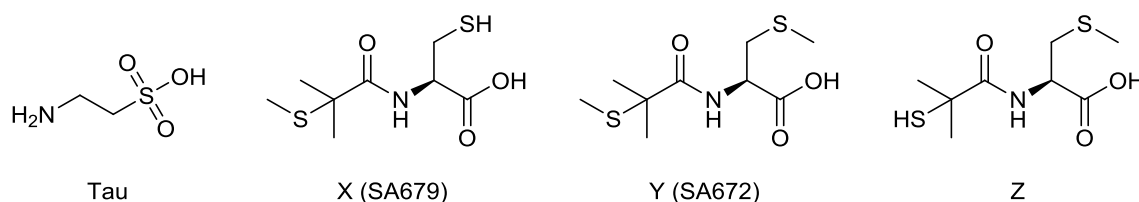


Fig. 2 Chemical structures of taurine and bucillamine derivatives.

The aims of the present study were:

1. *in vitro* testing of bucillamine by rotational viscometry. The initiator of oxidative degradation of high-molar-mass HA was Weissberger's oxidative system, comprising ascorbate (100 μ M) and Cu(II) ions (1 μ M).
2. to design a bucillamine derivative capable of scavenging HOCl/OCl⁻ by combining the structures of the parent compound and taurine. The original activity of bucillamine has to be retained and molecular weight of the resulting derivative should not exceed 500 Da.

Materials and methods

Biopolymer and chemicals for rotational viscometry

High-molar-mass HA sample P0207-1 (M_w = 970.4 kDa) was purchased

potential to improve impaired angiogenesis *via* inducing synthesis of vascular endothelial growth factor (VEGF) (Distler *et al.*, 2004). Interaction of bucillamine, its derivatives X, Y, Z (Fig. 2) and others with human serum albumin (HSA) has been examined in a study of Narazaki *et al.* (1996), aimed to elucidate reaction mechanism of covalent binding between HSA and thiol containing compounds. The ability of bucillamine and SA981 to induce glutathione biosynthesis *via* activation of the antioxidant-response element (ARE) by transcription factor Nrf2 has also been studied and their possible chemopreventive properties against cancer have been suggested (Wielandt *et al.*, 2006).

from Lifecore Biomedical Inc., Chaska, MN, U.S.A. Further chemicals used were identical to those reported previously (Baňasová *et al.*, 2012, Valachová *et al.*, 2011).

Chemicals for synthesis of a bucillamine derivative

2-Bromoethylamine hydrobromide and *N,N*-dimethylformamide (DMF, absolute, over molecular sieve) were purchased from Sigma-Aldrich. Reaction progress was monitored by thin-layer chromatography (TLC) on Merck silica gel F-254 plates and visualization was performed using UV light (254 nm). Structure of the compounds was analyzed by ¹H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy Varian Mercury Plus Instrument (300 MHz) at 20°C in CDCl₃ with (CH₃)₄Si (0.00 ppm) as an internal standard. Column

chromatography was performed on Merck silica gel 60.

Rotational viscometry and study of uninhibited and inhibited hyaluronan degradation

Standard experimental conditions used were as already published (Valachová *et al.*, 2011). The dynamic viscosity of the reaction mixture (8 ml) containing HA (20 mg), ascorbate (100 μM) and Cu(II) ions (1 μM) in the absence and presence of bucillamine (1–100 μM) was monitored by a Brookfield LVDV-II+PRO digital rotational viscometer (Brookfield Engineering Labs., Inc., Middleboro, MA, U.S.A.) at $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ at a shear rate of 237.6 s^{-1} for 3 h in a reservoir-spindle couple made of Teflon[®] (Valachová *et al.*, 2011). The drug was introduced into the reservoir vessel at the start of reaction or 1 h after the reaction onset.

Synthesis of a bucillamine derivative

The alkylation of SA981 was carried out as follows. SA981 (50 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 1 ml of DMF in a 25-ml round-bottomed flask, and triethylamine (0.11 ml, 0.79 mmol) was added drop-wise *via* syringe followed by 2-bromoethylamine hydrobromide (70 mg, 0.34 mmol). The mixture was heated to 50°C for 1 hour and then left to stay at

room temperature. The reaction was stopped after 24 hours. After this time, it was diluted with distilled water, extracted with ethyl acetate (3 \times), dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was separated by column chromatography ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH} = 30:1$).

Results and discussion

Rotational viscometry

Time-dependent rheological changes of HA macromolecules in solution can directly be assessed by rotational viscometry (Šoltés *et al.*, 2006, Valachová *et al.*, 2008). Free-radical degradation of high-molar-mass HA was induced by Weissberger's system, 1 μM Cu(II) plus 100 μM ascorbic acid, generator of 100 μM $\cdot\text{OH}$ radicals (Valachová *et al.*, 2011). Under these conditions the dynamic viscosity of the HA solution decreased during three hours significantly (Fig. 3, panel A, B, curve 0). However, as evident from Figure 3, addition of 1, 10 or 100 μM bucillamine either before the reaction onset (panel A) or 1 h after the initiation of HA degradation (panel B) totally inhibited degradation of HA macromolecules. The fact that bucillamine, in all concentrations tested, totally inhibited oxidative degradation of high-molar-mass HA may be explained also by sequestration of Cu(II).

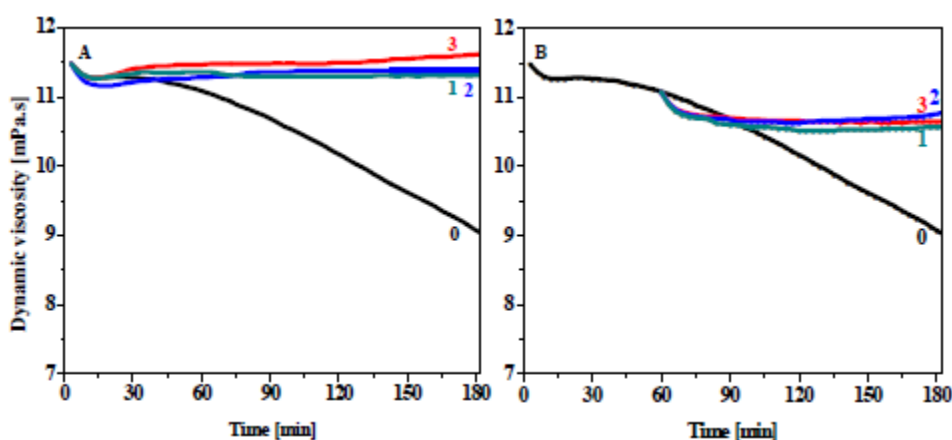
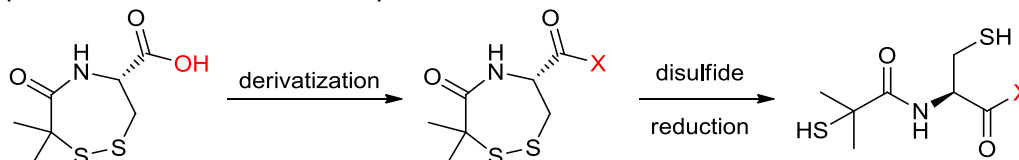


Fig. 3 Effect of bucillamine on free-radical degradation of HA induced by Weissberger's oxidative system comprising 1.0 μM Cu(II) and 100 μM ascorbate. Concentration of bucillamine in the reaction mixture was 0, 1, 10 and 100 μM , traces 0, 1, 2 and 3, respectively. The drug was added before the reaction onset (panel A) or 1 h after the reaction onset (panel B) (adapted from Baňasová *et al.*, 2012).

Synthesis of a buccillamine derivative

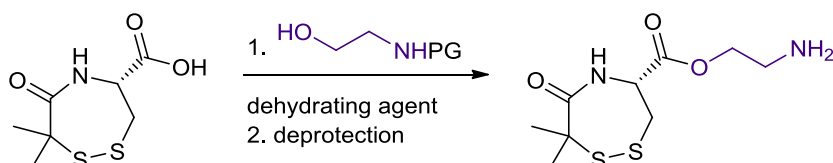
When a molecular structure is to be modified, a detailed investigation concerning its features is required. Of the modes of buccillamine and a resulting disulfide metabolite SA981 action, it is evident that two thiol functions are inevitable to the original activity of the compound. Among the remaining functional groups, only carboxylate is amenable for simple modification. From the synthetic



HOCl scavenging activity of taurine is due to the primary amino group in its structure. Direct reaction of SA981 with taurine is not feasible, because NH_2 group would preferably form an amide with carboxylic function of the former. It is conceivable to protect the amino group of taurine, but still the resulting mixed anhydride would be prone to hydrolysis and at least two more steps would be necessary.

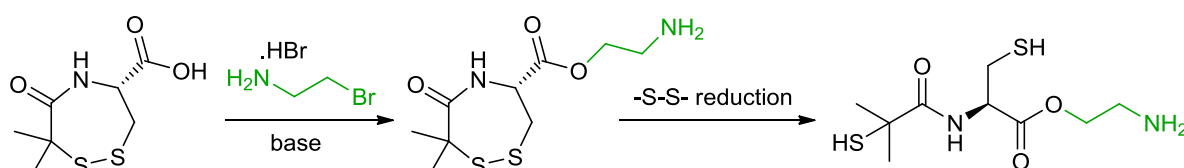
Introduction of $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ moiety to SA981 could be instead carried out by means of:

a) esterification with commercially available *N*-protected aminoethanol in the presence of a dehydrating agent. However, conditions for the last step - removal of the protecting group (PG) would have to be compatible with the rest of the molecule (ester and amide functions).



b) reduction of carboxylate to carbinol and subsequent reaction with (protected?) taurine. This approach would present a significant alteration to buccillamine structure, though. Moreover and again, the reducing conditions would have to be compatible with ester, amide and disulfide functions.

c) direct alkylation of carboxylate by 2-bromoethylamine in the presence of a base. The reaction should proceed under mild conditions and beside 2-bromoethylamine, a number of analogous reagents is commercially available as hydrochlorides or -bromides for further investigation. We decided to favor this approach.



M = 266.38

To increase solubility of the target compound in water, the primary amino group could be eventually transformed into hydrochloride.

The alkylation of SA981 following approach c) was performed as described in Materials and methods. After time-

consuming chromatography, 10 mg of a product (which would account for a 17% yield) was obtained in the form of yellow oil. Its ^1H NMR spectrum, see Figure 4. Stoichiometric addition of silver(I) salt (AgNO_3) as a catalyst did not lead to any improvement (Aron *et al.*, 2005).

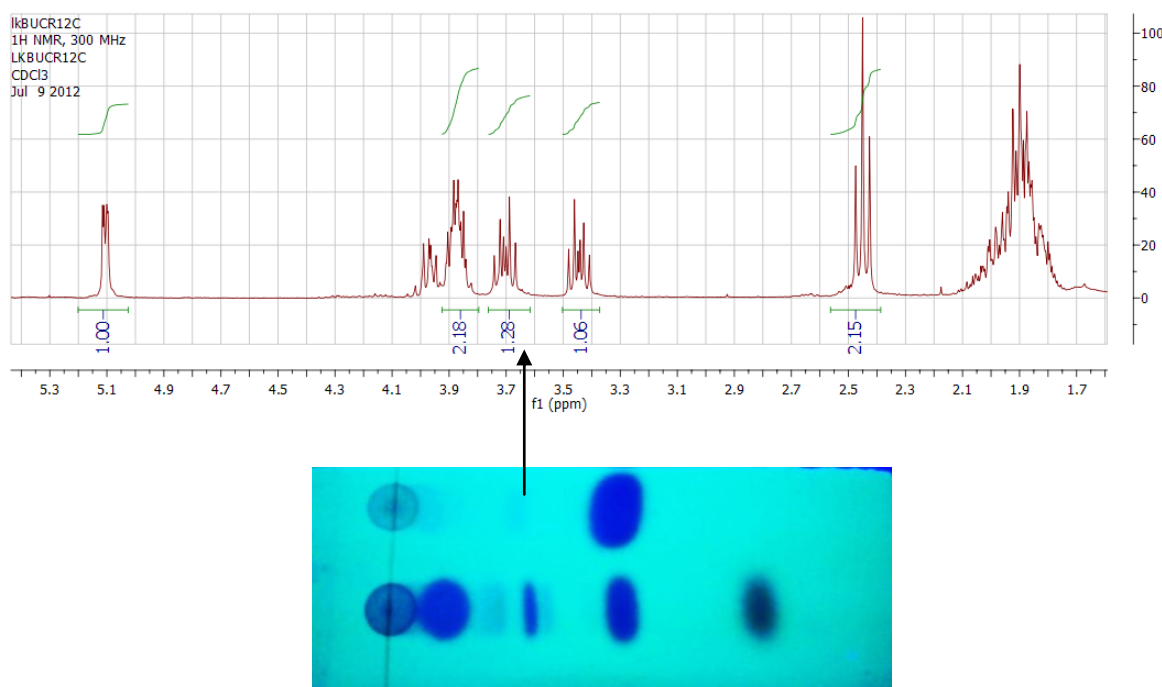


Fig. 4 ^1H NMR spectrum of SA981 alkylation product and TLC plate.

Triplet at 2.45 ppm with doubled integrated intensity compared to other signals clearly shows incorporation of $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ moiety into the structure. The other triplet is presumably hidden in the multiplet at 1.76-2.11 ppm. Detailed analysis of the spectrum would be possible after additional purification. Further investigations are performing.

We have prepared a buccillamine derivative with a potential to act as a scavenger of hypochlorite. This is in accordance with our aim to synthesize and assess a modified buccillamine structure with enhanced activity towards reactive oxygen species, namely HOCl. However, further elaboration of synthetic procedure (replacement of base, solvent) is required.

The work was supported by the VEGA grants 2/0011/11, 2/0149/12 and APVV 0351-10. We thank to Dr. Fumio Tsuji from Santen Pharmaceutical Co., Ltd. Osaka, Japan for providing buccillamine and (R)-7,7-dimethyl-6-oxo-1,2,5-dithiazepane-4-carboxylic acid.

References

1. Aron ZD, Overman LE. Total synthesis and properties of the crambescidin core zwitterionic acid and crambescidin 359. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 3380-3390.
2. Baňasová M, Valachová K, Juránek I, Šoltés L. Scavenging of oxygen-derived free radicals by buccillamine and its disulfide derivative SA981: the effect likely involved in the protection of oxidative hyaluronan degradation. In: *Drugs: Their action in pharmacology and toxicology*. Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, SASc., 2012; ISBN: 978-80-971042-0-7, 176-184.

3. Distler JH, Hagen C, Hirth A, Müller-Ladner U, Lorenz HM, del Rosso A, Michel BA, Gay RE, Nanagara R, Nishioka K, Matucci-Cerinic M, Kalden JR, Gay S, Distler O. Bucillamine induces the synthesis of vascular endothelial growth factor dose-dependently in systemic sclerosis fibroblasts via nuclear factor-kappaB and simian virus 40 promoter factor 1 pathways. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 389-399.
4. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *J Biol Chem* 1984; 259: 10404-10413.
5. Horwitz LD. Bucillamine: a potent thiol donor with multiple clinical applications. *Cardiovascular Drug Rev* 2003; 21: 77-90.
6. Mainnemare A, Mégarbane B, Soueidan A, Daniel A, Chapple ILC. Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *J Dent Res* 2004; 83: 823-831.
7. Matsuno H, Sugiyama E, Muraguchi A, Nezuka T, Kubo T, Matsuura K, Tsuji H. Pharmacological effects of SA96 (bucillamine) and its metabolites as immunomodulating drugs - the disulfide structure of SA-96 metabolites plays a critical role in the pharmacological action of the drug. *Int J Immunopharmacol* 1998; 20: 295-304.
8. Narazaki R, Hamada M, Harada K, Otagiri M. Covalent binding between bucillamine derivatives and human serum albumin. *Pharm Res* 1996; 13: 1317-1321.
9. Šoltés L, Brezová V, Stankovská M, Kogan G, Gemeiner P. Degradation of high molecular-weight hyaluronan by hydrogen peroxide in the presence of cupric ions. *Carbohydr Res* 2006; 341: 639-644.
10. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. *J Clin Invest* 1983; 72(2): 441-54.
11. Valachová K, Hrabárová E, Gemeiner P, Šoltés L. Study of pro- and anti-oxidative properties of d-penicillamine in a system comprising high-molar-mass hyaluronan, ascorbate, and cupric ions. *Neuroendocrinol Lett* 2008; 29: 697-701.
12. Valachová K, Hrabárová E, Priesolová E, Nagy M, Baňasová M, Juránek I, Šoltés L. Free-radical degradation of high-molecular-weight hyaluronan induced by ascorbate *plus* cupric ions. Testing of bucillamine and its SA981-metabolite as antioxidants. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 56: 664-670.
13. Weiss JS, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 1982; 70: 598-607.
14. Wielandt AM, Vollrath V, Farias M, Chianale J. Bucillamine induces glutathione biosynthesis via activation of the transcription factor Nrf2. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 455-462.

Pôsobenie reaktívnych foriem kyslíka na hladké svaly zažívacieho, dýchacieho systému a ciev

Viktor Bauer, Ružena Sotníková, Štefan Mátyás

Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Bratislava

e-mail: Viktor.Bauer@savba.sk

Úvod

Už v roku 1775 Pristley upozornil na to, že kyslík, bez ktorého život živočíchov na Zemi by bol nepredstaviteľný a ktorý udržiava v chode väčšinu základných životných pochodov, môže byť aj toxický. Zhruba pol storočia po objave existencie voľných radikálov (Gomberg, 1900) Gerschman et al. (1954) boli prví, ktorí vyslovili predpoklad o spoločnom základe radiačného poškodenia a toxicity kyslíka. Tento predpoklad bol neskôr potvrdený objavom superoxididizmutázy (SOD) McCordom a Fridovichom (1969). Dnes vieme, že prenosom jedného elektrónu na O_2 vzniká superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), ktorý sa dizmutuje pôsobením SOD na H_2O_2 . Za prítomnosti železa alebo medi z H_2O_2 vzniká hydroxylový radikál ($\bullet OH$) a z neho myeloperoxidázou kyselina chlórna (HOCl) alebo singletový kyslík (1O_2). V endoteli ciev, v nervových vláknach, v kostnej dreni a v iných tkanivách vznikajú aj ďalšie radikály, napr. endotelový relaxačný faktor ($\bullet NO$), alkoxylový radikál, peroxylový radikál, semichinónový radikál, atď. Vzniknuté radikály (vrátane reaktívnych foriem kyslíka - ROS), môžu interagovať napr. s fosfolipidmi, nukleovými kyselinami (DNK, RNK), aminokyselinami, proteínmi, sacharidmi, alebo navzájom napr. $O_2^{\bullet-}$ s $\bullet NO$ za tvorby peroxinitritu, ktorý je reaktívnejší a menej stabilný ako pôvodný radikál. Rýchlosť a selektivita radikálových reakcií je ovplyvnená koncentráciou prítomného

radikálu a jeho životnosťou (Tab.1). Mnohé radikály sú pre základné metabolické, alebo obranné procesy živočíšneho organizmu nevyhnutné. Ak sa naruší rovnováha medzi tvorbou a odbúravaním-elimináciou radikálov prostredníctvom SOD, katalázy (CAT), glutatiónpoxidázy a antioxidantov (napr. α -tokoferol, kyselina l-askorbová, β -karotén, kyselina močová, glutatión, taurín, laktoferín, albumín, ceruloplazmín, transferín), t.j. medzi prooxidačnými a antioxidačnými procesmi v prospech prooxidačných procesov, stávajú sa radikály škodlivými (pre prehľad vid'. Bauer a Bauer, 1999; Maghzal et al., 2012; Verbon et al., 2012).

Počas posledných troch desaťročí sa postupne nahromadilo množstvo experimentálnych údajov svedčiacich o významnej úlohe ROS za fyziologických aj patologických podmienok u cicavcov. Ukázalo sa, že nadmerná tvorba, alebo znížená eliminácia ROS zohráva významnú úlohu v patogeneze veľkého počtu chorôb sprevádzaných, alebo zapríčinených poruchou tonusu hladkých svalov, ako sú ochorenia srdca a ciev, dýchacích ciest, ako aj poškodenia zažívacieho systému (Repine, 1991; Martínez a Andriantsitohaina, 2009; Alfadda a Sallam, 2012). Cieľom tejto práce je zhrnúť niektoré z našich výsledkov získaných v pokusoch na preparátoch hladkých svalov zažívacieho, dýchacieho systému a ciev.

Tab. 1 Počas rozkladu voľných radikálov.

Voľný radikál	Počas (s)	Fyziologická koncentrácia (mol/l)
Superoxidový aniónradikál ($O_2^{\bullet -}$)	spontánne hodiny/dni (enzymaticky 10^{-6})	10^{-12} - 10^{-11}
Peroxid vodíka (H_2O_2)	spontánne hodiny/dni (enzymaticky minúty)	10^{-9} - 10^{-7}
Hydroxylový radikál ($\bullet OH$)	10^{-9}	
Singletový kyslík (1O_2)	10^{-5}	
Kyselina chlórna ($HOCl$)	niekoľko sekúnd	
Oxid dusnatý ($\bullet NO$)	1 – 10	10^{-9}
Peroxyinitrit ($ONOO^-$)	0,05 – 1,0	
Alkoxylový radikál ($RO\bullet$)	10^{-6}	
Peroxylový radikál ($ROO\bullet$)	7	
Semichinónový radikál	minúty/hodiny	

Metodiky

Pokusy sme uskutočnili na izolovaných preparátoch ilea a trachey morčiat ako aj hrudnej aorte potkanov. Podrobný popis použitých metodických postupov a roztokov je uvedený v našich predchádzajúcich prácach (Bauer, 1981; Bauer et al., 1999, 2011a; Mátyás et al., 2002). Zvieratá boli usmrtené pretrhnutím väzu. Experimentálne postupy boli odsúhlasené Eticou komisiou ÚEFT SAV a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SK. H_2O_2 bol jednoduchou chemikáliou, $\bullet OH$ sme generovali systémami $FeSO_4$ /kyselina askorbová, alebo $FeSO_4/H_2O_2$, $O_2^{\bullet -}$ xantín/xantínoxidázou a 1O_2 systémom $NaOCl/H_2O_2$.

Výsledky

Vplyv ROS na ileum morčata

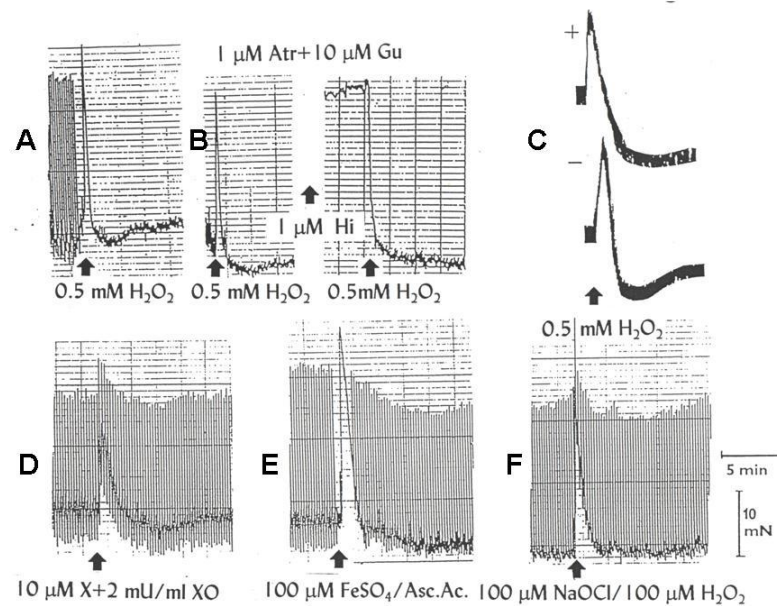
Na rozdiel od $O_2^{\bullet -}$ (Obr. 1D) a 1O_2 (Obr. 1F), ktoré vyvolali monofázickú kontrakciu, H_2O_2 (Obr. 1A-C) a $\bullet OH$ (Obr. 1E) zvýšili tonus celého ilea (Obr. 1) a jeho longitudinálnej svalovej vrstvy (Obr. 2) len prechodne. Aj za pretrvávajúcej prítomnosti použitých ROS v roztoku svalový tonus klesol pod iniciálnu úroveň. Za prí-

tomnosti atropínu (1 μM) a guanetidínu (10 μM) (Obr. 1B), alebo po odstránení epitelu (Obr. 1C) sa nezmenil charakter, len intenzita pôsobenia ROS (na obrázku je príklad v prípade pôsobenia H_2O_2). Ak však bol tonus zvýšený napr. histamínom (1 μM), H_2O_2 relaxoval sval po prechodnej minimálnej kontrakcii (Obr. 1B).

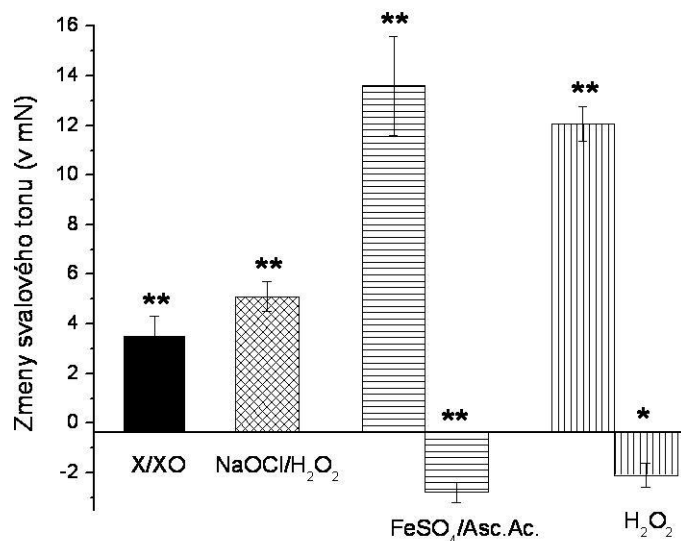
Amplitúda kontrakcie ilea morčiat vyvolaná acetylcholínom (10^{-11} - 10^{-4} M) bola závislá od koncentrácie. Ak sme aplikovali acetylcholín po rozvinutí druhej fázy účinku H_2O_2 (1 a 10 mM), došlo ku nekompetitívnemu potlačeniu kontrakcie (Obr. 3), t.j. zníženiu svalového tonusu.

Vplyv ROS na hrudnú aortu potkana

ROS významne ovplyvnili aj tonus cievneho hladkého svalu. Pôsobenie H_2O_2 a $\bullet OH$ sa aj na cievnom hladkom svale líšilo od účinku $O_2^{\bullet -}$. Tonus prúžkov hrudnej aorty potkana, predkontrahovanej KCl (100 mM) sa zvýšil po aplikácii $O_2^{\bullet -}$, generovanom xantínom (0,1 mM) a xantínoxidázou (0,1 IU/ml), alebo N-formyl-metionyl-leucyl-phenylalanínom (0,1 μM) aktivovanými neutrofilmi (10^6 buniek/ml).



Obr. 1 Originálny záznam pôsobenia H_2O_2 (A), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (xantín/xantínoxidáza - D), $\bullet\text{OH}$ (FeSO_4 /kyselina askorbová - Asc.Ac. - E) a $^1\text{O}_2$ ($\text{NaOCl}/\text{H}_2\text{O}_2$ - F) na tonus transmuralne stimulovaného morčacieho ilea. B - pôsobenie H_2O_2 za prítomnosti atropínu (Atr) a guanetidínu (Gu) za bazálneho tonusu a na preparáte predkontrahovanom histamínom. C - pôsobenie H_2O_2 za (+) a bez (-) prítomnosti epitelu.



Obr. 2 Zmeny svalového tonusu longitudinálneho svalu morčacieho ilea vyvolané pôsobením X/XO (10 mM xantín/2 mU/ml xantínoxidáza), $\text{NaOCl}/\text{H}_2\text{O}_2$ (100 mM $\text{NaOCl}/100$ mM H_2O_2), $\text{FeSO}_4/\text{Asc.Ac.}$ (100 mM $\text{FeSO}_4/100$ mM kys. askorbová) a H_2O_2 (1mM). Výsledky sú priemer \pm S.E.M zo 7-10 experimentov, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

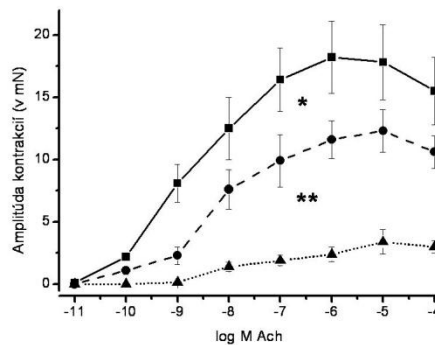
Na rozdiel od $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$ aj H_2O_2 relaxovali predkontrahovanú aortu. Zatiaľ čo relaxačné pôsobenie H_2O_2 bolo významné, $\bullet\text{OH}$ znižoval tonus predkontrahovanej aorty len minimálne (Obr. 4A). Acetylcholí (1 μM) znížil tonus predkontrahovanej

aorty o 20-35%. Na vrchole účinku $\text{O}_2^{\bullet-}$ sa amplitúda relaxácie vyvolanej acetylcholínom významne nezmenila. Aj v tomto ohľade sa odlišovalo pôsobenie $\text{O}_2^{\bullet-}$ od $\bullet\text{OH}$ aj H_2O_2 , ktoré oslabovali relaxačné pôsobenie acetylcholínu (Obr. 4B).

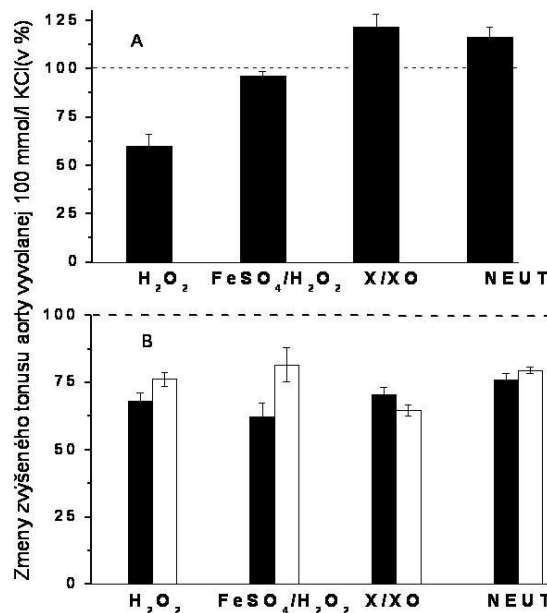
Vplyv ROS na tracheu morčťa

Pokojevý tonus trachey morčťa bol tiež významne ovplyvnený ROS. Pôsobenie H_2O_2 a $\cdot OH$ sa aj na dýchacom hladkom svale líšilo od účinku $O_2^{\cdot -}$. Počas dlhodobého pôsobenia $O_2^{\cdot -}$ (10 mM xantín/ 2 mU/ml xantínoxidáza) sa svalový tonus signifikantne nezmenil (Obr. 5D). Obe fázy pôsobenia $\cdot OH$ (iniciálna kontrakcia a neskorá relaxácia) boli niekoľkonásobne väčšie ak sa na produkciu $\cdot OH$

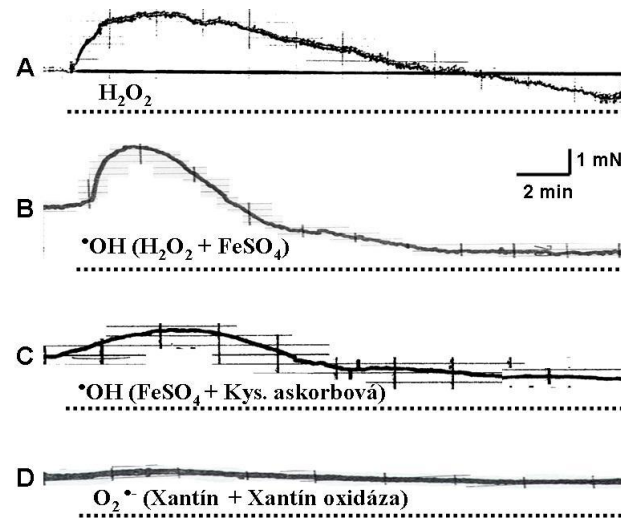
použila zmes 100 mM $FeSO_4$ a 100 mM H_2O_2 (Obr. 5B) v porovnaní so zmesou 100 mM $FeSO_4$ a 100 mM kys. askorbovej (Obr. 5C). Časový priebeh ich pôsobenia sa však navzájom nelíšil. Amplitúda kontrakčného pôsobenia H_2O_2 (0,5 mM) bola porovnateľná s amplitúdou kontrakcie vyvolanej zmesou $FeSO_4/H_2O_2$. Zvýšený tonus však pretrvával až dvojnásobne dlhšie a relaxačná fáza bola miernejšia ako v prípade $FeSO_4/H_2O_2$ (Obr. 5A).



Obr.3 Inhibícia kriviek závislosti účinku od koncentrácie acetylcholínu (Ach; 10^{-11} – 10^{-4} M, ■-kontrola) pôsobením H_2O_2 v koncentracii 1 mM (●, * $P < 0,05$) a 10 mM (▲ ** $P < 0,01$) na izolovanom ileu morčťa. Výsledky sú priemer \pm S.E.M z 5-10 experimentov.



Obr.4 A - Vplyv H_2O_2 (0,1 mM); 0,1 mM $FeSO_4$ /0,15 mM H_2O_2 ($\cdot OH$); 0,1 mM xantín/0,1 IU/ml xantínoxidáza ($O_2^{\cdot -}$) a N-formyl-metionyl-leucyl-phenylalanínom (0,1 μM) aktivovaných neutrofylov (NEUT, 10^6 buniek/ml) na svalový tonus izolovanej hrudnej aorty zvýšený 100 mM KCl. B - pôsobenie acetylcholínu (1 μM) pred (plné stĺpce) a za prítomnosti jednotlivých ROS po dobu 15 min (prázdne stĺpce).



Obr.5 Vplyv H_2O_2 (0,1 mM - A), $\cdot\text{OH}$ (0,15 mM H_2O_2 / 0,1 mM FeSO_4 - B, resp. 0,1 mM FeSO_4 / 0,1 mM kys. askorbovej - C) a $\text{O}_2^{\cdot-}$ (0,1 mM xantínu / 0,1 IU/ml xantínoxidázy - D) na izolovanú tracheu morčata.

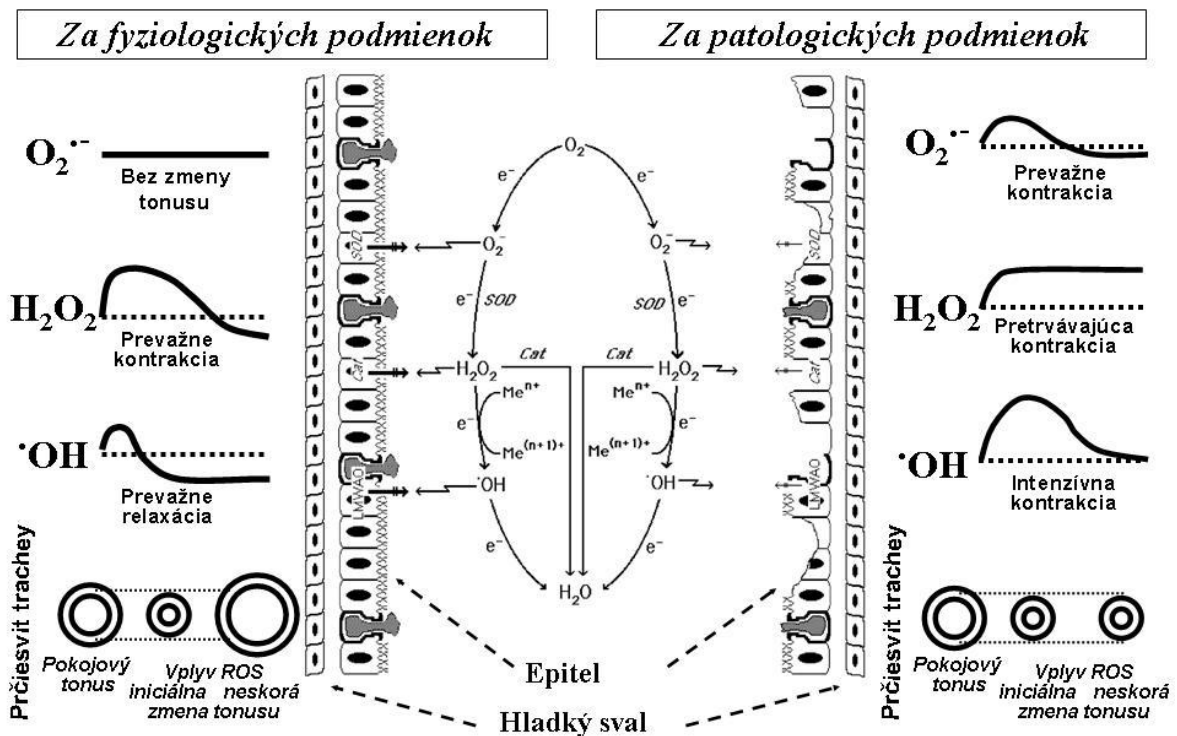
Diskusia

Výsledky prezentované v tejto práci jednoznačne potvrdzujú pôsobenie ROS na tonus, spontánnu a evokovanú aktivitu hladkých svalov, ktoré môžu byť významné pre viacero životne dôležitých funkcií, napr. reguláciu krvného tlaku, gastrointestinálnu motilitu, reaktivitu hladkých svalov dýchacieho systému a pod. (Bauer a Bauer, 1999; Bauer et al., 2011a,b; Henricks a Nijkamp, 2001; Thomas a Balasubramanian, 2004; Fearon a Faux, 2009; Barnes, 2011; Zhang et al., 2011). V mechanizme ich vzniku a pôsobenia zohráva, okrem iných, významnú úlohu ovplyvnenie metabolizmu arachidónovej kyseliny (Mátyás et al., 2002; Bauer et al., 2011a). Pôsobenie jednotlivých ROS na konkrétny orgán obsahujúci hladké svaly sa môže diametrálne odlišovať. Ako sme ukázali, účinok $\text{O}_2^{\cdot-}$ a $^1\text{O}_2$ sa odlišuje od vplyvu H_2O_2 a $\cdot\text{OH}$. Zaznamenali sme významný rozdiel medzi ich pôsobením na všetky študované hladko-svalové preparáty (črevný, cievny, dýchací). Tieto výsledky v zhode so skoršími pozorovaniami

ukázali, že $\text{O}_2^{\cdot-}$ alebo HOCl vyvolávajú hyperreaktivitu dýchacích (Weiss a Bellino, 1986) a cievnych (Bauer et al., 2011a) hladkých svalov blokovateľnú SOD a, že H_2O_2 vyvoláva hyperreaktivitu na karchol a cholínrgické nervové dráždenie (Bauer et al., 1997).

Zdá sa, že epitel zažívacieho a dýchacieho systému a endotel ciev sú zraniteľnejšie ako samotné hladké svaly (Ayars et al., 1989; Bauer et al., 1998; Mátyás et al., 2002). Vyplýva to z faktu, že sú aj častejšie vystavené pôsobeniu ROS exogénneho (napr. ozón, oxidy dusíka, rôzne znečisteniny a cudzorodé látky, častice) a endogénneho pôvodu (napr. ischemia-reperfúzia, zápalové bunky, peroxizómy, metabolity xenobiotík) ako samotné hladké svaly.

Keďže sa pani prof. Nosáľová, ktorej je tento zborník venovaný, vo svojej vedeckej práci venovala predovšetkým otázkam farmakológie respiračného systému, na schéme (Obr.6) sme zosumarizovali naše úvahy o možných mechanizmoch pôsobenia ROS na dýchacie hladké svaly.



Obr.6 Znáznornenie možného mechanizmu pôsobenia ROS na dýchací systém. Za fyziologických okolností (prítomný intaktný epitel) ROS vyvolajú prechodné zmeny svalového tonusu. Za patologických podmienok (po poškodení celistvosti epitelu) spôsobia silnú a dlhotrvajúcu kontrakciu. ROS – reaktívne formy kyslíka, SOD – superoxididizmutáza, Cat – kataláza, LMWAO – nízkomolekulové antioxidanty, $O_2^{\cdot-}$ – superoxid, $\cdot OH$ – hydroxylový radikál; H_2O_2 – peroxid vodíka, Me^{n+} – kation kovu, e^- – elektrón.

Zatiaľ nepoznáme úplne všetky fyziologické úlohy voľných radikálov v dýchacích cestách. Okrem predpokladanej blahodarnej fyziologickej úlohy (napr. vo fagocytóze) sa stále viac hromadia poznatky aj o ich poškodzujúcich účinkoch. Vynára sa otázka, či sú ROS "úspechom alebo omylom" prírody? Kontrakčný účinok ROS na dýchacie cesty sa dnes jednoznačne hodnotí negatívne. Z našich výsledkov však vyplýva, že zo študovaných ROS jedine H_2O_2 zvýši tonus trachey dlhodobo, a to tiež len prechodne pokiaľ je epitel intaktný. $\cdot OH$ je považovaný za najtoxickjší kyslíkový radikál, len krátkodobo kontrahuje hladký sval trachey (ak bol epitel intaktný) a to tiež len v prípade, ak bol generovaný systémom $H_2O_2/FeSO_4$. Trachea sa voči kontrakčným účinkom $O_2^{\cdot-}$, a z veľkej časti aj kontrakčným účinkom $\cdot OH$ a H_2O_2 , zdá byť chránená intaktným epitelom.

Možno preto predpokladať, že akútnym dráždením dýchacích ciest aktivované biele krvinky okrem iných látok produkujú aj ROS na lýzu a odstránenie partikulárneho iritantu. Ako prvý metabolit kyslíka vzniká $O_2^{\cdot-}$. Ten pri intaktnom epiteli nemá vplyv na tonus trachey, pretože je rýchle eliminovaný SOD a inými antioxidantmi epitelových buniek. Vplyvom SOD sa $O_2^{\cdot-}$ metabolizuje na H_2O_2 , ktorý prechodne kontrahuje tracheu. Táto často záporne hodnotená kontrakcia spojená s kašľom a zúžením lúmenu dýchacích ciest by mohla byť fyziologickým obranným mechanizmom zabraňujúcim prenikaniu iritantov hlbšie do dýchacích ciest. Po odstránení iritantu kašľom sa postupne rozvinú relaxačné mechanizmy a tonus trachey sa vráti do pôvodného stavu. Relaxácia sa urýchli pri premene H_2O_2 za prítomnosti dvojmocného železa na $\cdot OH$. Zdá sa teda, že

príroda koná v zmysle "menšieho zla". ROS vyvolajú lýzu epiteliálnych buniek, uvoľňujú antioxidantné látky, obohatia tým antioxidantné vybavenie mukusu a mechanizmom spätnej väzby regulujú koncentráciu ROS a ich ďalšie pôsobenie na epitel a hladký sval dýchacích ciest.

Situácia sa výrazne zmení, ak iritant pôsobí dlhodobo a poškodí epitel. Poklesne tak antioxidantná kapacita dýchacích ciest. Na takto patologicky zmenenom teréne už i samotný O_2^{\bullet} dokáže kontrahovať tracheu. Z neho vznikajúci H_2O_2 a následne generovaný $^{\bullet}OH$ vyvolávajú dlhotrvajúcu kontrakciu až pretrvávajúce zúženie lúmenu trachey. V zhode s týmito výsledkami je nami popísaný výrazne znížený relaxačný účinok ROS na deepitelizovanej trachei v porovnaní s intaktnými preparátmi (Mátyás et al., 2002). Z týchto úvah vyplýva, že pôsobenie ROS počas ataku iritantu na dýchacie cesty zdravých jedincov je "úspechom" prírody, a až keď je epitel dýchacích ciest dlhodobými, alebo opakovanými atakmi poškodený, nahromadenie ROS sa stáva "omylom" prírody.

Záver

Pôsobenie ROS môže byť jednou z príčin poškodenia hladko-svalového tkaniva, alebo orgánu. Ako súčasťou patofyziologických mechanizmov zodpovedajú za vznik ochorenia, alebo len doprevádzajú a sú sekundárnym prejavom ochorenia alebo zmenenej reaktivity hladkého svala. Intaktné epitélium a endotélium môžu efektívne ochrániť hladký sval od nežiaduceho pôsobenia ROS.

Podporené grantom VEGA 2/0031/12.

Zoznam použitej literatúry

1. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012; Article ID 936486, 14 pages ([Epub ahead of print]).
2. Ayars GH, Altman LC, McManus MM. Injurious effect of the eosinophil peroxide-

- halide system and major basic protein on human nasal epithelium in vitro. *Am Rev Resp Dis* 1989; 140: 125-31.
3. Barnes PJ. Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev* 2011; 242: 31-50.
4. Bauer V. Distribution and types of adrenoceptors in the guinea-pig ileum: The action of alpha- and beta-adrenoceptor agonists. *Br J Pharmacol* 1981; 72: 201-10.
5. Bauer V, Bauer F. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury. *Gen Physiol Biophys* 1999; 18: 7-14.
6. Bauer V, Oike M, Tanaka H, Inoue R, Ito Y. Hydrogen peroxide induced responses of cat tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 867- 74.
7. Bauer V, Sotníková R, Machová J, Mátyás S, Pucovský V, Štefek M. Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine, vessels and airways and the effect of antioxidants. *Life Sci* 1999; 65: 1909-17.
8. Bauer V, Sotníková R, Drábiková K. Effects of activated neutrophils on isolated rings of rat thoracic aorta. *J Physiol Pharmacol* 2011a; 62: 513-20.
9. Bauer V, Sotníková R, Drábiková K. Effects of reactive oxygen species and neutrophils on endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta. *Interdisc Toxicol* 2011b; 4: 101-7.
10. Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47:372-81.
11. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen poisoning and x-irradiation: A mechanism in common. *Science* 1954; 119: 623-6.
12. Gomberg M. An incidence of trivalent carbon trimethylphenyl. *J Am Chem Soc.* 1900; 22: 757-71.
13. Henricks PA, Nijkamp FP. Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 2001; 14: 409-20.
14. Maghzal G, Krause KH, Stocker R, Jaquet V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2012; [Epub ahead of print]
15. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 669-702.
16. Mátyás Š, Pucovský V, Bauer V. Role of epithelium and metabolites of arachidonic cas-

- cade in the action of reactive oxygen species on the guinea pig trachea. *Jap J Pharmacol* 2002; 88: 270-8.
17. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-55.
 18. Repine JE. Oxidant-antioxidant balance: Some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Med* 1991; 91(suppl.): 45S-53S.
 19. Thomas S, Balasubramanian KA. Role of intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 745-56.
 20. Verbon EH, Post JA, Boonstra J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2012; [Epub ahead of print]
 21. Weiss EB, Bellino JR. Leucotriene-associated toxic oxygen metabolites induced airway hyperreactivity. *Chest* 1986; 89: 709-16.
 22. Zhang QL, Du JB, Tang CS. Hydrogen and oxidative stress injury - from an inert gas to a medical gas. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2011; 43: 315-9.

Prepojenie procesov oxidačného stresu a rozvoja zápalu zapojeného do etiopatogenézy reumatoidnej artritídy

**Katarína Bauerová, Viera Kuncírová, František Dráfi,
Danica Mihalová, Silvester Poništ**

Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Bratislava
email: katarina.bauerova@savba.sk

Úvod

Reumatoidná artritída (RA) je multifaktoriálne ochorenie, na ktorého etiopatogenéze sa podieľajú genetická dispozícia, životné prostredie, ale aj rozmanité stochastické procesy. Redoxná nerovnováha (často nazývaná oxidačný stres) je významnou mierou zahrnutá v patogenéze tohto ochorenia. Oxidačný stres (OS) je výsledkom zvýšenej produkcie reaktívnych foriem kyslíka (RFK) a reaktívnych foriem dusíka (RFD) pri súčasnej redukcii fyziologických obranných antioxidantných systémov. RFK/RFD modulujú signálne procesy kontrolujúce expresiu génov a ovplyvňujú intracelulárne procesy podieľajúce sa na rozvoji chronického zápalu. Odpoveďou na OS je nadprodukcia proinflamačných cytokínov, ktorá následne spôsobí OS v cieľových bunkách. V priebehu oxidačného stresu sa mnohé proinflamačné cytokíny, ako napr. TNF- α a interleukíny IL-1 β , IL-2, IL-6 a IL-12, produkujú vo zvýšenej miere ako reakcia na aktiváciu NF- κ B, faktora citlivého na zmeny redoxného stavu buniek. Pôsobením proinflamačných cytokínov sa následne vo zvýšenej miere tvoria RFK, ktoré opäťovne aktivujú NF- κ B, čo má za následok nadprodukciu týchto cytokínov kľúčových pre zápal. Tento „zачarovaný kruh“ môže prerušiť aktivácia súčastí antioxidantnej odpovede. Berúc do úvahy úlohu OS v patogenéze RA, zistilo mnoho predklinických i klinických štúdií koreláciu medzi zvýšenou intenzitou OS, zníženými hladinami endogénnych antioxidantov a mierou rozvoja ochorenia. Tieto

štúdie poukázali na možnosť a dôležitosť terapeutickú intervenciu RA založenú na redukcii OS.

Úloha oxidačného stresu v patogenéze reumatoidnej artritídy

Metabolizmus kyslíka má dôležitú úlohu v patogenéze RA. Oxidačný stres v organizme vzniká vtedy, keď produkcia RFK v bunkách počas oxidatívnej fosforylácie a počas oxidačného vzplanutia aktivovaných fagocytov prekročí ich pufrovaciu schopnosť. Nadmerná produkcia RFK môže poškodiť proteíny, lipidy, DNA a komponenty medzibunkového matrix. RFK sú aj dôležitými signálnymi molekulami, ktoré zosilňujú synoviálnu zápalovo-proliferatívnu odozvu. Opakované striedanie hypoxie a reoxygénácie v spojení so zmenami synoviálnej perfúzie aktivuje faktor-1 α indukovaný hypoxiou (HIF-1 α) a NF κ B. Tieto transkripčné faktory sú regulované bunkovou oxygenáciou a stimuláciou cytokínmi, a následne spúšťajú expresiu mnohých génov zodpovedných za pretrvávanie synovitídy. Porozumenie komplexným interakciám v týchto signálnych dráhach by mohlo priniesť nové terapeutické stratégie pre RA (Hitchon a El-Gabalawy 2004). V etiopatogenéze RA sú primárne a dominantné imunologické mechanizmy úzko spojené s redoxnou nerovnováhou v organizme, ktorá môže potencovať chronické zápalové procesy (Kunsch et al. 2005). Produkcia reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (RFK a RFD) neutrofilmi a makrofágmi v zápalovom tkanive priamo

poškodzuje štruktúru a funkčnosť tkaniva. Naše práce, ako aj štúdie iných autorov, poukazujú na dôležitú úlohu OS v patogeneze RA (Bauerová a Bezek 1998; Bauerová a Bezek 1999; Bohanec et al. 2009; Strosova et al. 2009).

Patogenéza RA je spojená s účasťou imunitných mechanizmov vo všetkých štádiách choroby. Dôležitú úlohu zohrávajú T-lymfocyty. OS indukuje hyporeaktivitu T-buniek (Cemerski 2003). Ukazuje sa, že dysregulácia produkcie cytokínov zodpovedá za imunopatologické zmeny. Počas RA sa v synóviu vytvárajú zárodočné centrá typické pre lymfatické uzliny, v ktorých sa vytvárajú imunokomplexy. Tieto následne indukujú zápalový proces, na ktorom sa podieľajú najmä polymorfonukleárne leukocyty (PMNL) (Buc a Rovensky 1999). Zápalové procesy sa rozvíjajú najmä v synóviu kĺbov. Leukocyty, chemotakticky priťahované do synóvia, sú primárnym zdrojom RFK. RFK môžu byť produkované aktivovanými makrofágmi v synoviálnej membráne a neutrofilmi v synoviálnej kavitě (Bauerova et al. 2009a; Firestein 2003). Pri RA dochádza k progresívnej degradácii polysacharidov kĺbových štruktúr ako sú chrupky, synoviálna tekutina a synoviálna membrána. Degradácia hyaluronanu (HA), kľúčového polysacharidu, je pre RA charakteristická. Pri RA sa veľké množstvo neutrofilov akumuluje v synoviálnej tekutine pacientov. Tieto bunky menia oxidačnú homeostázu a ich produkty, predovšetkým RFK a RFD, prispievajú k deštrukcii kĺbových štruktúr do takej miery, že kĺb stráca funkčnosť (Henrotin et al. 2003). Pozmenené bielkoviny a nukleové kyseliny sú rozpoznávané ako „cudzie“ a následne autoimúnne reakcie spôsobujú vývoj ochorenia a z RA sa stáva systémové ochorenie postihujúce celý organizmus.

Funkcie lymfocytov a neutrofilov sú modulované špecifickými receptormi, ktorých expresia je kontrolovaná rôznymi

humorálnymi faktormi. Nedávno sa preukázalo (Boldyrev 2009), že jeden z týchto receptorov – glutamátový receptor aktivovaný NMDA je integrujúcou štruktúrou, ktorá spája nervový a imunitný systém. Zistilo sa že, receptory NMDA regulujú produkciu cytokínov aktivovanými T-lymfocytmi v podmienkach *in vitro*. Doteraz sa však neidentifikovali prirodzené ligandy tohto receptora v periférnej krvi. Neutrofile sú kľúčovými bunkami zápalového procesu pri RA. Majú silnú cytotoxickú aktivitu, a neutrofile aktivované zápalom produkujú množstvo cytokínov a chemokínov, ktoré majú priamy vplyv na progres zápalového procesu. Infiltrujúce neutrofile v synóviu udržiavajú lokálny zápal a uvoľnením veľkého množstva proteáz, RFK/RFD a aktiváciou enzýmu myeloperoxidázy vyvolávajú poškodenie chrupky kĺbu (Cascao et al. 2010; Lefkowitz DL a Lefkowitz SS 2001; 2008; Podrez et al. 2000).

Makrofágy významne participujú na patogeneze RA, vzhľadom na ich nadmernú početnosť v zápalovej synoviálnej tekutine, synoviálnej membráne a granulačnom tkanive. Okrem produkcie prozápalových cytokínov a chemokínov, prispievajú k deštrukcii kostného tkaniva a chrupky prostredníctvom rôznorodých mechanizmov. Viacero faktov naznačuje, že makrofágy môžu predstavovať jeden z kľúčových terapeutických cieľov pri RA (Kinne et al. 2000). Predpokladá sa, že *toll-like* receptory (TLR) týchto buniek zohrávajú komplexnú úlohu v patogeneze RA, ako aj v experimentálnej artritíde. Výsledky autorov Huang et al. (2007) poukázali na zvýšenú expresiu TLR-2 a TLR-4 v CD14⁺ makrofágoch v RA. Aktivácia TLR-4 sa spája s produkciou cytokínov (napr. TNF- α , IL-6), (Huang et al. 2007; Poltorak et al. 1998). Aktivácia TLR-4 indukuje aktiváciu MyD88-závislej a nezávislej dráhy, čo vedie k aktivácii ďalších proteínov, ku ktorým patria MAP kinázy (Kawai et al. 1999).

Chondrocytovú odpoveď na rastové faktory zhoršujú RFK počas migrácie do miesta poškodenia v chrupke. Do vzájomného pôsobenia medzi chondrocytmi a extracelulárnou matrix zasahujú RFD, najmä NO (Clancy et al. 1997), ktorý môže zvýšiť aj apoptózu chondrocytov. Obe reaktívne formy, RFK a RFD, inhibujú syntézu matrixových komponentov, vrátane syntézy proteoglykánov chondrocytmi. Kyslíkové radikály fragmentujú hyalurónan a chondroitínsulfát (Ress et al. 2003; 2004) a poškadzujú aj oblasti proteoglykánového jadra proteínu viažuce hyalurónan, čím prekážajú interakcii proteoglykánu s hyalurónanom (Panasyuk et al. 1994). Okrem toho môžu RFK a RFD poškodiť súčasti extracelulárnej matrix aj nepriamo cez aktiváciu matrixových metaloproteináz.

Výsledky klinických štúdií

Niektoré epidemiologické štúdie ukazujú na nepriamu závislosť medzi príjmom antioxidantov v potrave a výskytom RA (Bae et al. 2003; Cerhan et al. 2003; Hagfors et al. 2003; Heliovaara et al. 1994), ako aj na nepriamu závislosť medzi hladinou antioxidantov a zápalom (Mulherin et al. 1996). Pacienti s RA majú zvýšenú aktivitu oxidačných enzýmov súčasne so zníženými hladinami antioxidantov v sére a v synoviálnej tekutine (Cimen et al. 2000; De Leo et al. 2002; Marklund et al. 1986; Ozturk et al. 1999; Taysi et al. 2002; Chapman et al. 1999; Miyata et al. 1998). Analýzou synoviálnej tekutiny a tkaniva sa dokázalo oxidačné poškodenie kyseliny hyalurónovej (Grootveld et al. 1991), zvýšené hladiny produktov lipidovej peroxidácie (Rowley et al. 1984; Taysi et al. 2002), i zvýšené množstvo karbonylov proteínov (Dai et al. 2000; Dalle-Donne 2003). Výsledky epidemiologických štúdií však nie sú jednoznačné. Tradičná stredomorská diéta s vysokým obsahom antioxidantov zmiernila po 3 mesiacoch príznaky RA a zlepšila funkčný status v porovnaní

s klasickou západnou diétou, hoci zlepšenie klinických symptómov nebolo priamo spojené so signifikantnými zmenami hladín antioxidantov v plazme (Heliovaara et al. 1994; Skoldstam et al. 2003). V inej štúdii sa po suplementácii pacientov vitamínmi A, C a E zvyšovali hladiny antioxidantov v plazme a znižovala sa hladina MDA, dôležitého markera OS, nepozorovalo sa však žiadne zlepšenie klinických symptómov (Jaswal et al. 2003). Suplementácia vitamínom E, hlavným liposolubilným antioxidantom v plazme, erytrocytoch a tkanivách, nemala vplyv na aktivitu choroby a na zápalové ukazovatele, ale znižovala bolesti pacientov, čo naznačuje uplatnenie v centrálnych mechanizmoch analgézy (Edmonds et al. 1997).

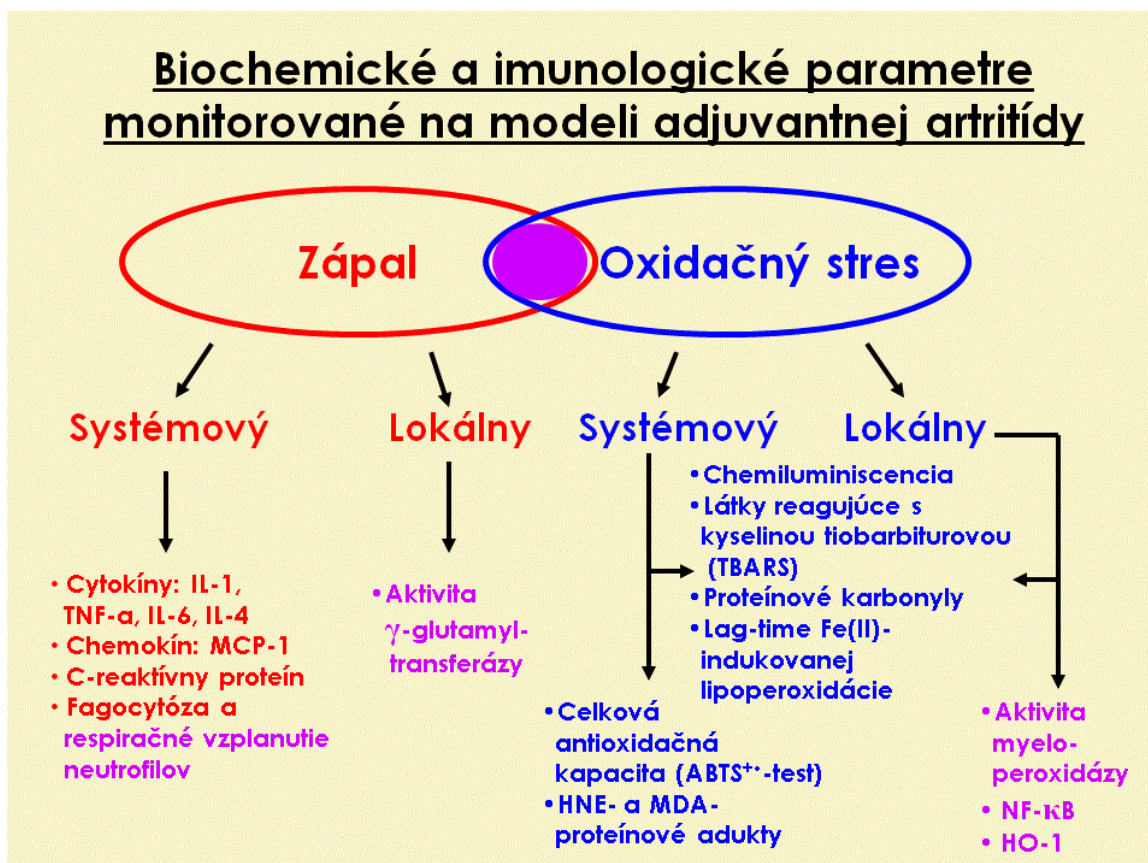
Podľa Babiora (2000) sú reaktívne oxidanty esenciálnymi nástrojmi patogenezy RA. Voľné radikály, pochádzajúce z kyslíkového metabolizmu, poškadzujú fyziologické antioxidantné systémy (Harris 1993). Výskumníci ako Heliovaara et al. (1994) naznačujú, že v RA sú poškodené nielen neenzýmové, ale aj enzýmové antioxidantné systémy. Pacienti s RA sú preto vystavení OS na viacerých úrovniach (Harris 1993). Ovplyvnenie rôznych antioxidantne aktívnych enzýmov, ako sú superoxid-dizmutáza, glutatiónpoxidáza, glutatión-reduktáza a kataláza, sa ukázalo ako kľúčové v liečbe RA (Blake et al. 1981; Mazetti et al. 1996; Shah a Vohora 2002). Niektorí autori zistili, že pacienti s RA sú náchylnejší aj na peroxidáciu lipidov práve pre poškodenie celkovej antioxidantnej kapacity organizmu (Gambhir et al. 1997; Rowley et al. 1984).

Predklinické štúdium patologických mechanizmov RA pomocou modelu adjuvantnej artritídy u potkanov kmeňa Lewis so zameraním na oxidačný stres

Redoxná signalizácia je komplexnou sieťou, ktorá špecificky mení expresiu génov a fenotyp buniek. RFK a RFD slúžia

aj ako sekundárni poslovia, a majú teda aj fyziologické funkcie, nielen toxické účinky (Giustarini et al. 2004; Poli et al. 2004). Po zvážení týchto skutočností sme sa rozhodli monitorovať na modeli adjuvantnej artritídy (AA) u potkanov kmena Lewis predovšetkým vybrané parametre oxidačného

stresu spolu s klasickými zápalovými a imunologickými ukazovateľmi (obr. 1). Väčšina parametrov sa merala v priebehu experimentu 14. resp. 21. a 28. experimentálny deň.



Obr. 1: Hlavné laboratórne parametre monitorované v modeli AA, publikované v prácach Bauerovej et al. , a ich vzájomné prepojenie. Legenda: IL – interleukín, TNF- α – tumor nekrotizujúci faktor alfa, MCP-1 – monocytový chemotaktický proteín 1, HNE – 4-hydroxynonenal, MDA – malóndialdehyd, NF- κ B – nukleárny faktor kappa B, HO-1 – hemoxygenáza 1.

Hladiny C-reaktívneho proteínu (CRP), podobne ako opuch zadných končatín (OZK), boli u artritických potkanov signifikantne zvýšené už 14. deň po indukcii AA (Bauerova et al. 2010). Aktivita γ -glutamyltransferázy (GGT), nešpecifický marker zápalu a OS, sa už merala v rôznych bunkách a tkanivách lymfatického systému: T-lymfocytoch, makrofágoch, týmuse a slezine (Koner et al. 1997). Ektoforma enzýmu GGT nie je prítomná na neaktivovaných periférnych T-lymfocytoch, ale jej expresia sa zvyšuje po aktivácii natívnych T-lymfocytov.

V mnohých tkanivách je GGT esenciálna pre vychytávanie a transport metabolitov glutatiónu (GSH), hlavne γ -glutamylu, do buniek, kde sa GSH syntetizuje *de novo* (Carlisle et al. 2003). GGT je dôležitou súčasťou zápalových procesov, lebo jej aktivita je úzko spojená aj s celkovým antioxidačným statusom organizmu. V našich experimentoch sme aktivitu GGT stanovili v kĺbe zadných končatín (chrupka a mäkké tkanivo bez kosti) a v tkanive sleziny na konci experimentu, 28. deň. Zistili sme, že aktivita GGT v slezine u artritických zvierat bola 3- až 6-krát vyššia v porovnaní so

zdravými kontrolami a o 40 až 130 % vyššia v kĺboch artritických zvierat (Bauerova et al. 2006; 2008b; 2009a; Sotnikova et al. 2009). Predpokladáme, že zvýšená aktivita GGT je dôsledkom zvýšeného systémového OS v AA. Naše výsledky týkajúce sa zvýšenej aktivity GGT v kĺbe, sú v dobrej zhode s výsledkami klinickej štúdie pacientov s RA, v ktorej sa okrem zvýšenej aktivity GGT v plazme a v moči stanovila aj zvýšená aktivita GGT v synoviálnej tekutine (Rambabu et al. 1990). V jednej z našich štúdií sme poukázali na dobrú koreláciu medzi aktivitou GGT v kĺbe a OZK artritických zvierat (Bauerova et al. 2006). V RA sa zistila zvýšená expresia GGT v aktivovaných lymfocytoch, ktoré sa kumulujú na miestach zápalu. Ishizuka et al. (2007) zistili, že protilátky neutralizujúce GGT mali terapeutický efekt a zmiernovali deštrukciu chrupky a kĺbov myši s artritídou indukovanou kolagénom. Zvýšená aktivita a expresia GGT v tkanive kĺbu je dobrým markerom synoviálneho zápalu a resorpcie kosti. Látky schopné redukovať aktivitu a/alebo expresiu GGT by sa mohli stať dôležitou súčasťou terapie RA.

Často používaným markerom peroxidácie lipidov je malondialdehyd (MDA), ktorý sa stanovuje ako adukt s kyselinou tiobarbiturovou (Brown a Kelly 1996). Klinické štúdie zistili zvýšené hladiny TBARS v plazme pacientov s RA (Baskol et al. 2005; 2006; Sarban et al. 2005). Podobne bola hladina TBARS zvýšená aj v plazme zvierat s AA (Bauerova et al. 2008b; 2009b; He et al. 2006; Sotnikova et al. 2009; Strosova et al. 2008; 2009; Tastekin et al. 2007). Na stanovenie RFK, RFD a peroxidov lipidov sa v súčasnosti často používajú metódy založené na chemiluminiscencii a fluorescencii. Fluorescenčné adukty proteínov sú deriváty, ktoré vznikajú reakciou sekundárnych produktov peroxidácie lipidov (hlavne MDA a HNE) s voľnými aminoskupinami proteínov (Aldini et al. 2007; Requena et al. 1996). Al-

bumínová proteínová frakcia v sérach myši a ľudí sa identifikovala ako najviac fluoreskujúca frakcia proteínov (Tsuchida et al. 1985). Niektorí autori naznačujú, že proteínové adukty so sekundárnymi produktmi peroxidácie lipidov majú aj imunogénne vlastnosti a môžu zohrávať dôležitú úlohu v patogenéze autoimunitných chorôb vrátane RA (Kurien et al. 2006; Tuma et al. 2002). Tieto zistenia vyzdvihujú dôležitosť stanovenia aduktov proteínov v autoimunitných, chronických zápalových ochoreniach. Oxidačné poškodenie plazmy sme v našich experimentoch stanovili pomocou fluorescenčných aduktov proteínov. Stanovili sa dva typy aduktov: s HNE a MDA. Naše laboratórium po prvý krát stanovilo hladiny HNE- a MDA-aduktov proteínov v plazme potkanov s AA (Ponist et al. 2010) podľa (Biasi et al. 1995; Tsuchida et al. 1985). Hladina HNE-aduktov bola mierne zvýšená už na 7. deň. Maximálnu hladinu dosiahli HNE-adukty na 14. deň pokusu a potom hladina postupne klesala ku kontrolným hodnotám (28. deň). Podobný priebeh sa stanovil aj pre MDA-adukty, ich hladina však bola signifikantne zvýšená ešte aj 21. deň (Ponist et al. 2010).

Časový priebeh peroxidácie lipidov meranej pomocou MDA-aduktov proteínov sa podobá časovému priebehu produkcie RFK neutrofilmi, ktoré boli stimulované forbolmyristátacetátom (PMA), meranej v plnej krvi artritických zvierat chemiluminometricky s maximálnymi hladinami na 14. a 21. deň (Nosal et al. 2007). Súčasné skúsenosti so zvieracími modelmi RA zdôrazňujú dôležitosť neutrofilov v iniciácii a progresii AA (Cross et al. 2006). Existuje viacero štúdií venovaných chemiluminiscencii generovanej neutrofilmi v plnej krvi (Arnhold et al. 1994; Cedergren et al. 2007; Miesel et al. 1996) a v synoviálnej tekutine (Arnhold et al. 1994; Cedergren et al. 2007) u pacientov s RA v závislosti od závažnosti tohto och-

renia. U pacientov s RA bol stanovený 2- až 8-násobný nárast chemiluminiscencie v plnej krvi v porovnaní so zdravými dobrovoľníkmi (Miesel et al. 1996). Výsledky publikované Nosálom et al. (2007) sú v dobrej zhode s týmto zistením. Zvieratá s AA mali signifikantne zvýšenú spontánnu chemiluminiscenciu už od 7. experimentálneho dňa až do konca experimentu (28. deň). Neutrofily v plnej krvi artritických zvierat reagovali nadmerne na stimuláciu PMA a produkovali 6- až 9-krát viac RFK. Počas rozvoja AA zvierat sa stanovili aj zvýšené počty neutrofilov v plnej krvi (Nosál et al. 2007). Oxidatívne poškodenie tkanív sa prejavilo zvýšenými hladinami RFK v kĺboch a slezinách artritických zvierat, meranými pomocou chemiluminiscencie (Drabikova et al. 2009).

Tieto merania boli doplnené o spektrofotometrické stanovenie aktivity myeloperoxidázy (MPO) v experimente zameranom na hodnotenie terapeutického účinku dvoch stilbenoidov v AA (Macicova et al. 2010). V tejto štúdii bola aktivita MPO v homogenáte kĺbu približne 3-krát vyššia ako u zdravých kontrol. Tento poznatok je dôležitý, keďže MPO je najviac zastúpeným enzýmom neutrofilov. MPO je markerom OS a produkcie RFK a môže vyčerpávať zásoby NO v cievnom endotele (Brennan a Hazen 2003). MPO zvyšuje príľnavosť leukocytov, vrátane monocytov a neutrofilov, na endotel ciev (Johansson et al. 1997). Cievne endotelové bunky sú tiež schopné produkovať množstvo cytokínov, ktoré pôsobia ako chemoatraktanty pre neutrofily. MPO aj cytokíny participujú na chemotaxii buniek na miesta zápalu. Lefkowitz et al. (1999) naznačujú, že MPO môže byť dôležitým mediátorom zápalovej odpovede.

S cieľom obohatiť spektrum monitorovaných parametrov OS sme v prípade neutrofilov stanovili aj ich fagocytózu, oxidačné vzplanutie a metabolickú aktivitu. Použila sa prietoková cytometrická metó-

da podľa autorov Kronek et al. (2010), modifikovaná pre model AA (Bauerova et al. 2010). Zaujímavý poznatok o zvýšenej produkcii RFK neutrofilmi v plnej krvi, meranej chemiluminometricky, už na 7. deň priebehu AA sme sa rozhodli podrobnejšie preskúmať aj pomocou prietokovej cytometrickej metódy. Ďalším dôvodom na výber 7. dňa bola skutočnosť, že zmeny v reaktivite neutrofilov sa pozorujú ešte pred nástupom klinických parametrov (14. deň). Fagocytová aktivita a oxidačné vzplanutie neutrofilov boli zvýšené už na 7. deň. Metabolická aktivita neutrofilov, definovaná ako percento dvojito pozitívnych buniek (súčasne fagocytujúcich a oxidačne vzplanutých), bola znížená. Tento výsledok možno vysvetliť nárastom „artritických“ neutrofilov, ktoré sú pozitívne iba na oxidačné vzplanutie a preto nie sú započítané medzi dvojito pozitívne bunky (Bauerova et al. 2010).

V plazme sa stanovila aj koncentrácia jedného z najdôležitejších endogénnych antioxidantov u potkanov – koenzýmu Q₉ (CoQ₉). Signifikantné zmeny v hladinách CoQ₉ a CoQ₁₀ sa stanovili pri viacerých ochoreniach ľudí aj zvierat. Tieto zmeny môžu byť spôsobené poruchou v syntéze CoQ alebo nadmernou spotrebou CoQ v tele, alebo kombináciou týchto procesov (Bauerova et al. 2008; Littarru et al. 1991). V našich experimentoch sme sa zamerali na stanovenie hladiny CoQ₉ ako dominantnej formy CoQ u potkanov. Jeho koncentrácia je asi 10-násobne vyššia ako CoQ₁₀ (Dallner a Sindelar 2000). V AA sa plazmatická hladina CoQ₉ signifikantne zvyšuje v porovnaní so zdravými kontrolami. Procesy spojené s AA evidentne stimulujú syntézu a transport CoQ₉ do plazmy (Bauerova et al. 2010).

V plazme potkanov s AA sa okrem monitorovania peroxidácie lipidov stanovilo aj oxidačné poškodenie proteínov. Artritída, podobne ako iné ochorenia,

je sprevádzaná aj oxidačným poškodením proteínov plazmy pôsobením voľných radikálov. Karbonyly proteínov (aldehydy a ketóny) vznikajú priamou oxidáciou, alebo reakciou s inými reaktívnymi molekulami vznikajúcimi počas oxidácie. Stanovenie karbonylov proteínov, markera OS, sa výhodne používa v diagnostike rôznych chorôb, lebo sa dajú relatívne skoro merať už v počiatočných štádiách ochorenia a sú stabilné (Dalle-Donne et al. 2003). Schopnosť niektorých zlúčenín redukovať karbonyly proteínov sa považuje za jeden z nepriamych dôkazov ich antioxidantnej aktivity. Prvá aplikácia stanovenia karbonylov proteínov v našich experimentoch s AA bolo v štúdiu s karboxymetyl-(1,3)- β -D-glukánom izolovanom zo *Saccharomyces cerevisiae* (Kogan et al. 2005). V tomto experimente sme zistili signifikantne zvýšené plazmatické hladiny karbonylov proteínov u artritických zvierat v porovnaní so zdravými kontrolami. Aj v ďalších našich experimentoch sme zistili zvýšené poškodenie proteínov zapríčinené OS, ktorý je prítomný v AA (Bauerova et al. 2005; Bauerova et al. 2010; Strosova et al. 2009). Okrem karbonylov proteínov v plazme zvierat s AA sme stanovili aj karbonyly proteínov v mozgu, v experimente, v ktorom sme sledovali antioxidantné vlastnosti karnozínu (Ponist et al. 2011). Karbonyly proteínov v homogenáte mozgu zvierat boli signifikantne zvýšené, podobne ako v plazme. Tento nový poznatok zdôrazňuje celkové systémové pôsobenie OS v chronických zápalových ochoreniach, akým je AA, s oxidačne poškodenými proteínmi, nielen priamo v postihnutých tkanivách (chrupka, kosť a sval).

OS bol pre chronický zápal, prítomný v AA, významne zvýšený už 14. deň, kedy súčasne nastupujú aj klinické symptómy ochorenia. OS zvyšoval spotrebu endogénnych antioxidantov v plazme, čo spôsobilo zníženie celkovej antioxidantnej

kapacity plazmy (Bauerova et al. 2009a; Mihalova et al. 2007).

Protizápalová a antioxidantná aktivita sa pripisuje aj hemoxygenáze (HO-1). Naše dáta poukazujú na signifikantný pokles (okolo 40%) v pľúcach artritických zvierat v porovnaní so zdravou kontrolou. Hladinu HO-1 v pečeni však adjuvantná artritída neovplyvnila. Dôležitú úlohu pri expresii proinflamačných génov hrá aj aktivovaný NF- κ B. V našom modeli sme zistili signifikantný nárast NF- κ B v pľúcnom tkanive a v tkanive pečene artritických zvierat (Acquaviva et al. 2011; Vecchio et al. 2011) Uvedený poznatok plánujeme ešte overiť aj v iných tkanivách relevantných pri štúdiu artritídy, napr. v kĺbe a slezine.

Záverom môžeme konštatovať, že náš výskum prispel k objasneniu úzkeho prepojenia imunitných mechanizmov a redoxnej regulácie v organizme a poukázal na dôležitosť terapeutickú intervenciu založenú na antioxidantnom účinku v kombinácii s klasickou imunosupresívnou a protizápalovou liečbou RA.

Táto práca bola podporená projektom VEGA 2/0045/11 a APVV-0052-10.

Zoznam použitej literatúry

1. Acquaviva A, Drafi F, Vecchio D, Ponist S, Arezzeni B, Mihalova D, Gardi C, Nosal R, Bauerova, K. Pinosylvin administered in monotherapy and in combination with methotrexate reduces oxidative stress in adjuvant arthritis rat model. Second International Conference on environmental stressors in biology and medicine. October 5-7, 2011, Siena (Italy), 58.
2. Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation derived reactive carbonyls. *Med Res Rev.* 2007; 27: 817–868.
3. Arnhold J, Sonntag K, Sauer H, Häntzschel H, Arnold K. Increased native chemiluminescence in granulocytes isolated from synovial fluid and peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *J Biolumin Chemilumin.* 1994; 9: 79–86.
4. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109: 33-44.

5. Bae SC, Kim SJ, Sung MK. Inadequate antioxidant nutrient intake and altered plasma antioxidant status of rheumatoid arthritis patients. *J Am Coll Nutr.* 2003; 22: 311-315.
6. Bauerova K, Bezek S. Etiopatogenéza reumatoidnej artritídy a jej farmakologické ovplyvnenie (Etiopathogenesis of rheumatoid arthritis and its potential pharmacotherapy). *Farmaceutický obzor.* 1998; 67: 269-274.
7. Bauerova K, Bezek S. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys.* 1999; 18: 15-20.
8. Bauerova K, Valentova J, Ponist S, Navarova J, Komendova D, Mihalova D. Effect of copper complexes on the development of adjuvant arthritis: therapeutic and toxicological aspects. *Biologia.* 2005; 60: 1767-1770.
9. Bauerova K, Ponist S, Ondrejickova O, Komendova D, Mihalova D. Association between tissue gamma-glutamyl-transferase and clinical markers of adjuvant arthritis in Lewis rats. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006; 27: 172-175.
10. Bauerova K, Kucharska J, Ponist S, Gvozdjakova A. Coenzyme Q10 supplementation in adjuvant arthritis (pre-clinical study). In: *Mitochondrial medicine: mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy.* Gvozdjakova A. (eds), Springer, Netherlands. 2008a; 340-342.
11. Bauerova K, Ponist S, Navarova J, Dubnickova M, Paulovicova E, Pajtinka M, Kogan G, Mihalova D. Glucosaminan in prevention of oxidative stress and inflammation occurring in adjuvant arthritis. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008b; 29: 691-696.
12. Bauerova K, Paulovicova E, Mihalova D, Svik K, Ponist S. Study of new ways of supplementary and combinatory therapy of rheumatoid arthritis with immunomodulators. Glucosaminan and Imunoglukán in adjuvant arthritis. *Toxicol Ind Health.* 2009a; 25: 329-335.
13. Bauerova K, Ponist S, Paulovicova E, Mihalova D, Tomekova V, Kovacs-Strosova M, Biasi F, Mascia C, Poli G. Methotrexate-based combinatory therapy of adjuvant arthritis. Effect of coenzyme Q10 supplementation. *Free Radic Res.* 2009b; 43: 92.
14. Bauerova K, Paulovicova E, Mihalova D, Drafi F, Strosova M, Mascia C, Biasi F, Rovensky J, Kucharska J, Gvozdjakova A, Ponist S. Combined methotrexate and coenzyme Q₁₀ therapy in adjuvant-induced arthritis evaluated using parameters of inflammation and oxidative stress. *Acta Biochim Pol.* 2010; 57: 347-354.
15. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Kocer D, Muhtaroglu S. Assessment of paraoxonase 1 activity and malondialdehyde levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry* 2005; 38(10): 951-5.
16. Baskol G, Demir H, Baskol M, Kilic E, Ates F, Karakukcu C, Ustidal M. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24(4): 307-11.
17. Biasi F, Bosco M, Lanfranco G, Poli G. Cytolysis does not per se induce lipid peroxidation: Evidence in man. *Free Radi Biol Med.* 1995; 18: 909-912.
18. Blake DR, Hall ND, Treby DA, Halliwell B, Guttridge JM. Protection against superoxide and hydrogen peroxide in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci (Lond).* 1981; 61: 483-486.
19. Bohanec GP, Logar D, Tomsic M, Rozman B, Dolzan V. Genetic polymorphisms modifying oxidative stress are associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Dis Markers.* 2009; 26: 41-48.
20. Boldyrev, AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochemistry (Mosc).* 2009; 74: 589-598.
21. Brennan ML, Hazen SL. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin Lipidol.* 2003; 14: 353-359.
22. Brown RK, Kelly FJ. Peroxides and other products. In: *Free Radicals a Practical Approach.* Punched NA; Kelly FJ, (eds) Oxford University Press, Oxford. 1996; 119-131.
23. Buc M, Rovensky J. Imunopatogenéza reumatoidnej artritídy. *Rheumatol.* 1999; 13: 51-55.
24. Carlisle ML, King MR, Karp DR. Gamma-glutamyl transpeptidase activity alters the T cell response to oxidative stress and Fas-induced apoptosis. *Int Immunol.* 2003; 15: 17-27.
25. Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev.* 2010; 9: 531-535.
26. Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol.* 2007; 34: 2162-2170.
27. Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol.* 2003; 33: 2178-2185.
28. Cerhan JR, Saag KG, Merlino LA, Mikuls TR, Criswell LA. Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *Am J Epidemiol.* 2003; 157: 345-354.

29. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I. Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 2000; 19: 275-277.
30. Clancy RM, Rediske J, Tang XY, Nijher N, Frenkel S, Philips M, Abramson SB. Outside-in signaling in the chondrocyte. Nitric oxide disrupts fibronectin-induced assembly of a subplasmalemmal actin/rho A focal adhesion kinase signaling complex. *J Clin Invest.* 1997; 100: 1789-1796.
31. Cross A, Barnes T, Bucknall RC, Edwards SW, Moots RJ. Neutrophil apoptosis in rheumatoid arthritis is regulated by local oxygen tensions within joints. *J Leu Biol.* 2006; 80: 521-528.
32. Dai L, Lamb DJ, Leake DS, Kus ML, Jones HW, Morris CJ, Winyard PG. Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radic Res.* 2000; 32: 479-486.
33. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: 23-38.
34. Dallner G, Sindelar PJ. Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radical Biology and Medicine.* 2000; 29: 285-294.
35. De Leo ME, Tringhese A, Passantino M, Mor-dente A, Lizzio MM, Galeotti T, Zoli A. Manganese superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and total radical trapping antioxidant capacity in active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2002; 29: 2245-2246.
36. Drabikova K, Perecko T, Nosal R, Bauerova K, Ponist S, Mihalova D, Kogan G, Jancinova, V. Glucosaminan reduces neutrophil free radical production in vitro and in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol Res.* 2009; 59: 399-403.
37. Edmonds SE, Winyard PG, Guo R, Kidd B, Merry P, Langrish-Smith A, Hansen C, Ramm S, Blake DR. Putative analgesic activity of repeated oral doses of vitamin E in the treatment of rheumatoid arthritis. Results of a prospective placebo controlled double blind trial. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56: 649-655.
38. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003; 423: 356-361.
39. Gambhir JK, Lali P, Jain AK. Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem.* 1997; 30: 351-355.
40. Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I. S-glutathionylation: from redox regulation of protein functions to human diseases. *J Cell Mol Med.* 2004; 8: 201-12.
41. Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem J.* 1991; 273: 459-467.
42. Hagfors L, Leanderson P, Skoldstam L, Andersson J, Johansson G. Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr J.* 2003; 2: 5.
43. Harris, ED. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Textbook of rheumatology*, Kelley, W.N., Harris, E.D., Ruddy, S., Sledge, C.B. (Ed.), WB Saunders, Philadelphia, 1993; 833-873.
44. He YH, Zhou J, Wang YS, Xiao C, Tong Y, Tang JC, Chan AS, Lu AP. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of cherries on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Scand J Rheumatol.* 2006; 35: 356-358.
45. Heliövaara M, Knekt P, Aho K, Aaran RK, Alftan G, Aromaa A. Serum antioxidants and risk of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994; 53: 51-53.
46. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003; 11: 747-755.
47. Hitchon CA, El-Gabalawy HS. Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6: 265-278.
48. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56(7): 2192-201.
49. Chapman AP, Antoniw P, Spitali M, West S, Stephens S, King DJ. Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat Biotechnol.* 1999; 17: 780-783.
50. Ishizuka Y, Moriwaki S, Kawahara-Hanaoka M, Uemura Y, Serizawa I, Miyauchi M, Shibata S, Kanaya T, Takata T, Taniguchi N, Niida S. Treatment with anti-gamma-glutamyl transpeptidase antibody attenuates osteolysis in collagen-induced arthritis mice. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1933-1942.
51. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, Kaur J. Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. *Clin Chim Acta.* 2003; 338: 123-129.
52. Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, Nilsson K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J Cell Sci.* 1997; 110: 1133-1139.

53. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 1999; 11: 115-122.
54. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombokinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000; 2: 189-202.
55. Kogan G, Stasko A, Bauerova K, Polovka M, Soltes L, Brezova V, Navarova J, Mihalova D. Antioxidant properties of yeast (1/3)- β -D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in adjuvant arthritis. *Carbohydr Polym*. 2005; 61: 18–28.
56. Koner BC, Banerjee BD, Ray A. Effects of stress on gamma glutamyl transpeptidase (GGT) activity in lymphoid system of rats: modulation by drugs. *Indian J Exp Biol*. 1997; 35: 222–224.
57. Kronek J, Luston J, Kronekova Z, Paulovicova E, Farkas P, Petrencikova N, Paulovicova L, Janigov I. Synthesis and bioimmunological efficiency of poly(2-oxazolines) containing a free amino group. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21: 879-86.
58. Kunsch Ch, Sikorski JA, Sundel CL. Oxidative stress and the use of antioxidants for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Med Chem Immun Endoc Metab Agents*. 2005; 5: 249-258.
59. Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 41: 549–556.
60. Lefkowitz DL, Gelderman MP, Fuhrmann SR, Graham S, Starnes JD 3rd, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguevsky N.SS, Bollen A, Moguevsky N. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clin Immunol*. 1999; 91: 145–155.
61. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Macrophage-neutrophil interaction: a paradigm for chronic inflammation revisited. *Immunol Cell Biol*. 2001; 79: 502.
62. Lefkowitz DL, Lefkowitz SS. Microglia and myeloperoxidase: a deadly partnership in neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*. 2008; 45: 726-731.
63. Littarru GP, Lippa S, Oradei A, Fiorni RM, Mazzanti L. Metabolic and diagnostic implications of blood CoQ10 levels. In: *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*. Folkers, K., Yamagami, T. & Littarru, G.P.,(eds), Elsevier Science, Amsterdam. 1991; 167–178.
64. Macickova T, Drabikova K, Nosal R, Bauerova K, Mihalova D, Harmatha J, Pecivova J. In vivo effect of pinosylvin and pterostilbene in the animal model of adjuvant arthritis. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010; 31: 91–95.
65. Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG. Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and inreactive arthritides. *Ann Rheum Dis*. 1986; 45: 847-851.
66. Mazetti I, Grigolo B, Borzi RM, Meliconi R, Facchini A. Serum copper/zinc superoxide dismutase levels in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Lab Res*. 1996; 26: 245–249.
67. Miesel R, Hartung R, Kroeger H. Priming of NADPH oxidase by tumor necrosis factor alpha in patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Infammation*. 1996; 20: 427–438.
68. Mihalova D, Ponist S, Kucharska J, Komendova D, Bauerova K. Total antioxidant status-systemic marker of oxidative stress in adjuvant arthritis. *Chem listy*. 2007; 101: 225-226.
69. Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Comm*. 1998; 244: 45–49.
70. Mulherin DM, Thurnham DI, Situnayake RD. Glutathione reductase activity, riboflavin status, and disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 1996; 55: 837-840.
71. Nosal R, Jancinova V, Petrikova M, Ponist S, Bauerova K. Suppression of oxidative burst of neutrophils with methotrexate in rat adjuvant arthritis. *Chemické Listy*. 2007; 101: 243–244.
72. Ozturk HS, Cimen MYB, Cimen OB, Kacmaz M, Durak I. Oxidant/antioxidant status of plasma samples from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 1999; 19: 35-37.
73. Panasyuk A, Frati E, Ribault D, Mitrovic D. Effect of reactiveoxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radic Biol Med*. 1994; 16: 157-167.
74. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 1717-1725.
75. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004; 11: 1163–1182.
76. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. 1998; 282: 2085-2088.
77. Ponist S, Mihalova D, Jancinova V, Snirc V, Ondrejickova O, Mascia C, Poli G, Stancikova M, Nosal R, Bauerova K. Reduction of oxidative stress in adjuvant arthritis. Comparison of efficacy of two pyridoindoles: stobadine dipalmita-

- te and SMe1.2HCl. *Acta Biochim Pol.* 2010; 57: 223–228.
78. Ponist S, Drafi F, Kuncirova V, Mihalova D, Ondrejickova O, Trunova O, Fedorova T, Boldyrev A, Bauerova K. Anti-inflammatory effect of carnosine on rat adjuvant arthritis. *International Congress on Carnosine in Exercise and Disease, July 10-12, 2011 Ghent (Belgium), Programme and abstract book* p. 41.
 79. Rambabu K, Ansari AA, Shaafe IA, Chelvam AP, Ziu MM. Gamma-glutamyl transpeptidase in synovial fluid, serum, and urine of patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Med Metab Biol.* 1990; 43: 183–192.
 80. Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-mediated fragmentation of hyaluronan, chondroitin sulfates, and related N-acetyl glycosamines: evidence for chloramide intermediates, free radical transfer reactions, and site-specific fragmentation. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 13719-13733.
 81. Rees MD, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite and superoxideradicals can act synergistically to induce fragmentation of hyaluronan and chondroitin sulfates. *Biochem J.* 2004; 381: 175-184.
 82. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11: 48–53.
 83. Rowley D, Gutteridge JM, Blake D, Farr M, Halliwell B. Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci (Lond).* 1984; 66: 691-695.
 84. Sarban A, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2005; 38: 981–986.
 85. Shah ZA, Vohora SB. Antioxidant/restorative effect of calcined gold preparations used in Indian systems of medicine against global and focal models of ischaemia. *Pharmacol Tox.* 2002; 90: 254–259.
 86. Skoldstam L, Hagfors L, Johansson G. An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 208-214.
 87. Sotnikova R, Ponist S, Navarova J, Mihalova D, Tomekova V, Strosova M, Bauerova K. Effects of sesame oil in the model of adjuvant arthritis. *Neuro Endocrinol Lett.* 2009; 30: 22–24.
 88. Strosova M, Tomaskova I, Ponist S, Bauerova K, Karlovska J, Spickett CM, Horakova L. Oxidative impairment of plasma and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum in rats with adjuvant arthritis – effects of pyridoindole antioxidants. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29: 706–711.
 89. Strosova M, Karlovska J, Spickett CM, Orszaghova Z, Ponist S, Bauerova K, Mihalova D, Horakova L. Modulation of SERCA in the chronic phase of adjuvant arthritis as a possible adaptation mechanism of redox imbalance. *Free Radic Res.* 2009; 43: 852–864.
 90. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, Ture M. Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharm Res.* 2007; 56: 303–310.
 91. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2002; 21: 200-204.
 92. Tsuchida M, Miura T, Mizutani K, Aibara K. Fluorescent substances in mouse and human sera as a parameter of in vivo lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 834: 196–204.
 93. Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 2002; 32: 303–308.
 94. Vecchio D, Acquaviva A, Arezzini B, Gardi C, Ponist S, Drafi F, Mihalova D, Nosal R, Bauerova K. Activity of pinosylvin administered in monotherapy and in combination with methotrexate on the development of rat adjuvant arthritis. In *4eme Symposium International Nutrition, Biologie de l'Oxygene et Médecine : radicaux libres et vieillissement: des aspects fondamentaux aux applications cliniques.* 15 - 17 Juin 2011, Paris, France. - Paris : Oxygen Club of California, 2011, p. P14.

Rozdiely v aktivácii nodózných a jugulárnych nociceptívnych vlákien v pažeráku cez TRPA1 receptor

Mariana Brozmanová, Lenka Mazúrová, Miloš Tatár

Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin
e-mail: brozmanova@ifmed.uniba.sk

Úvod

Pyróza spojená s nekardiálnou bolesťou na hrudníku, ktorá je veľa krát rezistentná na inhibítory protónovej pumpy, je častým klinickým problémom u pacientov s gastroezofágovou refluxnou chorobou (Fass and Sifrim, 2009; Page and Blackshaw, 2009). Mechanizmus vysvetľujúci funkčnú pyrózu a bolesť na hrudníku v týchto podmienkach vrátane neerozívnej ezofagitídy nie je kompletne objasnený, ale s najväčšou pravdepodobnosťou zahŕňa aktiváciu nociceptorov (aferentných vlákien citlivých na noxické stimuly) v pažeráku.

TRPA1 (Transient receptor potential ankyrin 1) receptor je považovaný za jeden z hlavných cieľových molekúl pre liečbu viscerálnej bolesti (Patapoutian et al, 2009; Blackshaw et al, 2010). TRPA1 je 6-doménový transmembránový neselektívny iónový kanál, ktorý je preferenčne exprimovaný v periférnych nociceptoroch a je aktivovaný celým radom endogénnych molekúl súvisiacich so zápalom a tkanivovým poškodením. Endogénne aktivátory TRPA1 receptora zahŕňajú produkty oxidačného stresu vyskytujúce sa počas expozície pažeráka kyslým refluxom (Andersson et al, 2008). K ďalším aktivátorm TRPA1 receptora sa zaraďujú mnohé reaktívne molekuly bežne produkované imunitnými bunkami (napr. metabolity prostaglandínov PGE₂ a PGD₂), vyskytujúce sa v pažeráku za patologických podmienok (Taylor-Clark et al, 2008). Predchádzajúce štúdie ukázali, že TRPA1 prispieva k transdukcii a senzitivácii pažerákových

aferentných nervov (Brierley et al, 2009; Yu and Ouyang, 2009), ale aktivácia pažerákových nociceptívnych vlákien sprostredkovaná TRPA1 receptorom nebola kompletne analyzovaná.

Aferentná nociceptívna inervácia v pažeráku je komplexná (Kollarik et al, 2010). Veľká populácia pažerákových nociceptorov má embryologický pôvod z neurálnej lišty, tu sa zaraďujú spinálne DRG nociceptory, ktorých neuróny sú lokalizované v gangliách zadných rohov miechy a vágové jugulárne nociceptory s neurónmi vo vágových jugulárnych gangliách. Ďalšie nociceptory embryologicky pochádzajú z epibranchiálnych plakód a ich neuróny sú lokalizované vo vágových nodózných gangliách. Oba typy vágových nociceptorov sú zodpovedné za nocicepciu, sú schopné diskriminovať noxické mechanické stimuly, majú exprimovaný kapsaicínový receptor (TRPV1) (Yu et al, 2005), ale vyznačujú sa rozdielmi v aktivačných mechanizmoch, zjavne pri transdukcii signálu serotonínernými a purínernými receptormi (Kwong et al, 2008; Yu et al, 2008; Ru et al, 2011). S najväčšou pravdepodobnosťou tieto rozdielne typy nociceptorov v pažeráku regulujú rozdielne aspekty nocicepcie (Kollarik et al, 2010).

Naše predchádzajúce štúdie ukázali, že agonisty TRPA1 receptora boli relatívne neefektívne pri stimulácii vágových jugulárnych pažerákových nociceptorov. Iní autori zistili, že agonisty TRPA1 receptora prednostne aktivujú vágové nodózne bronchopulmonálne nociceptory (Taylor-

Clark et al, 2008a; Nassenstein et al, 2008). Na základe týchto zistení sme vyslovili hypotézu, že agonisty TRPA1 budú preferenčne aktivovať vágové nodózne (plakodálne) nociceptory v pažeráku.

Materiál a metodika

V našich štúdiách sme použili morčatá kmeňa Dunkin Hartley, samce s hmotnosťou 190-220g (Biotest, s. r.o., Konárovice, Česká republika). Experimentálne štúdie boli schválené Etickou komisiou JLF UK v Martine a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou v Bratislave.

Extracelulárne snímanie nervovej aktivity vágových nociceptorov

Extracelulárne snímanie nervovej aktivity vágových neurónov bolo detailne popísané v predchádzajúcich prácach (Yu et al, 2005; Yu et al, 2008; Ru et al, 2011). V skratke, extracelulárne snímanie nervovej aktivity z individuálnych vágových nodóznych a jugulárnych neurónov s mechanosenzitivnými nervovými terminálmi v pažeráku sme vykonali na izolovanom perfundovanom preparáte pažeráka morčata s intaktným vágovým nervovým systémom v podmienkach ex vivo. Tkaniwo spolu s príslušnými gangliami sme upevnili separátne do dvojkomorovej perfúznej komôrky, ktorá bola perfundovaná okysličeným Krebsovým roztokom (v mM: 118 NaCl, 5.4 KCl, 1 NaH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 1.9 CaCl₂, 25 NaHCO₃ a 11 dextróza, 95%O₂ - 5%CO₂, pH=7.4, 35°C) spolu s indometacínom (3 µM) s prietokom 4–6 ml/min. Aluminosilikátovú sklenenú mikroelektrodu (2 MΩ) vyplnenú NaCl (3 M) sme zaviedli do nodózneho alebo jugulárneho ganglia a pri súčasnej distenzii pažeráka (60mmHg) sme vyhľadávali vhodné vágové aferentné nervové vlákna z pažeráka. Nervovú aktivitu, resp. signál nervového vlákna, ktorý je vyjadrený výbojom akčných potenciálov bol zosilnený

(Microelectrode AC amplifier 1800, A-M Systems, Sequim, WA, USA), filtrovaný (low cut-off, 0.3k Hz; high cut-off, 1kHz), zaznamenávaný na osciloskope (TDS340; Tektronix) a analyzovaný na Apple počítači so softvérom TheNerveOfIt (vzorkovacia frekvencia 33 kHz, PHOCIS, Baltimore, MD, USA). Mechanosenzitivné vlastnosti individuálnych nervových vlákien sme študovali použitím izobarickej distenzie pažeráka s intraluminálnymi tlakmi 10–30–60–100 mmHg (generované gravitačným tlakovým systémom) v trvaní 20 s, ktorému predchádzala 20 s pokojová aktivita. Interval medzi jednotlivými distenziami bol 3 min.

Študované chemické látky boli rozpustené v Krebsovom roztoku a privádzané do pažeráka externou perfúziou po dobu 30 min. Nervovú aktivitu sme kontinuálne monitorovali a analyzovali v 1-s binoch (Hz). Odpoveď na farmakologické stimuly sme považovali za pozitívne, ak vyvolali výboj akčných potenciálov s maximálnou frekvenciou najmenej 3 Hz (u vlákien bez pokojovej aktivity alebo u vlákien s pokojovou aktivitou maximálna frekvencia bola najmenej 3x vyššia ako frekvencia bazálnej aktivity). Bazálna aktivita bola zaznamenávaná počas 30 min pred samotnou aplikáciou farmakologického stimulu. Výsledky sme hodnotili ako priemer ± SEM a zo štatistických analýz sme použili párový a nepárový t-test. Za štatisticky významný rozdiel sme považovali p<0,05.

Použitie farmakologické látky

V práci sme použili nasledujúce látky: agonistu TRPA1 allyl-izotiokyanát (AITC, 100 µM, Sigma, Sigma-Aldrich, zásobný roztok: 1M rozpustený v dimetylsulfoxide); ďalšieho agonistu TRPA1 cinnamonaldehyd (CIA, 300 µM, Sigma-Aldrich, zásobný roztok: 1M rozpustený v dimetylsulfoxide); agonistu vaniloidného TRPV1 receptora – kapsaicín (1 µM, Sigma-

Aldrich, zásobný roztok: 10 mM rozpustený v etanole) a selektívneho antagonistu TRPA1 AP18 (30 μ M, Tocris, zásobný roztok: 0,1 M, rozpustený v dimetylsulfoxide). Zásobné roztoky boli skladované v mrazničke pri teplote -20°C . Všetky testované chemikálie boli rozpustené v Krebsovom roztoku na stanovenú koncentráciu tesne pred použitím.

Experimentálny protokol

Testované farmakologické látky boli rozpustené v Krebsovom roztoku a dodávané do pažeráka v externej perfúzii počas 30 min. Nervová aktivita (výboj akčných potenciálov) bola monitorovaná kontinuálne a analyzovaná v 1 s binoch, ktorá bola porovnávaná s pokojovou – bazálnou aktivitou. Na konci každého experimentu bol použitý agonista TRPV1 receptora – kapsaicín na potvrdenie kapsaicín-pozitívnych nociceptívnych aferentných nervových vlákien.

Výsledky

V kontrolných pokusoch sme zistili, že použité rozpúšťadlo dimetylsulfoxid v maximálnej koncentrácii 0,03% nemalo žiadny efekt na aktivitu pažerákových nodózných a jugulárnych nervových vlákien. Selektívny agonista TRPA1 allylizotiokyanát (AITC, 100 μ M) vyvolal robustný výboj akčných potenciálov s maximálnou frekvenciou $33,5 \pm 4,5$ Hz v nodózných nociceptoroch ($n=9/11$) porovnaní s maximálnou frekvenciou v pokojových bazálnych podmienkach $1,9 \pm 1,3$ Hz ($p<0,01$, párový t-test) (Obr. 1A). Selektívny antagonist TRPA1 AP18 (30 μ M) zabránil aktivácii nervových vlákien indukovanej AITC ($n=5$) a odpoveď bola porovnateľná s kontrolnými bazálnymi hodnotami. Inhibičný efekt AP18 bol čiastočne reverzibilný. Po 60 – 90 min premývaní Krebsovým roztokom AITC vyvolal

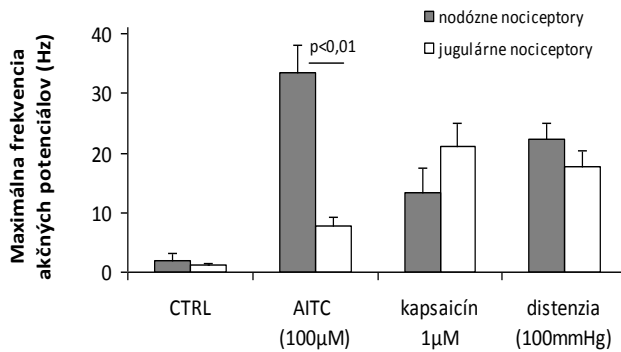
opäť robustnú aktiváciu (17 ± 3 Hz). Tieto výsledky dokazujú, že aktivácia nodózných vlákien AITC je sprostredkovaná cez TRPA1 receptor.

Pre porovnanie aktivity nodózných vlákien vyvolanej AITC a hodnotení odpovede nodózných nociceptorov na 2 efektívne noxické stimuly: podprahovú koncentráciu kapsaicínu (1 μ M) ($n=12$) a noxickú distenziu pažeráka intraluminálnym tlakom 100 mmHg ($n=23$) sme zistili, že nervová aktivita stimulovaná TRPA1 receptorom prostredníctvom AITC bola asi 2-násobne vyššia (Obr. 1A).

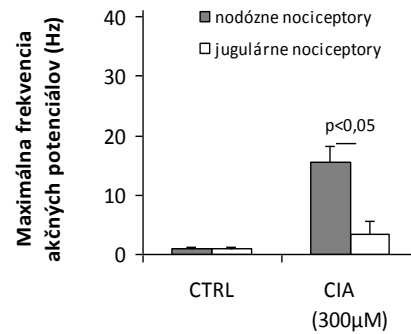
Na rozdiel od nodózných nociceptorov, AITC mal relatívne slabší aktivačný účinok na jugulárne nociceptory, maximálna frekvencia akčných potenciálov bola $7,3 \pm 1,6$ Hz ($n=7/10$) v porovnaní s bazálnymi hodnotami $1 \pm 0,4$ Hz ($p<0,01$, párový t-test). Odpoveď na expozíciu AITC v jugulárnych vláknach bola viac ako o polovicu nižšia ako odpoveď na noxické stimuly: kapsaicín (1 μ M) ($n=11$, $21,2 \pm 3,9$ Hz) a distenziu (100mmHg) ($n=20$, $17,8 \pm 2,6$).

Podobne ako AITC, aj ďalší selektívny agonista TRPA1 cinnamon-aldehyd (CIA, 300 μ M) bol zjavne efektívnejší v stimulácii nodózných než jugulárnych nociceptorov. CIA (300 μ M) vyvolal robustnú aktiváciu nodózných nociceptorov ($n=22/27$). Maximálna frekvencia akčných potenciálov bola $18,8 \pm 2,7$ Hz v porovnaní s bazálnymi hodnotami ($n=22$) $1,1 \pm 0,3$ Hz ($p<0,01$, párový t-test) (Obr. 1B). CIA aj napriek vyššej koncentrácii 300 μ M v porovnaní s AITC (100 μ M) mal zjavne nižší aktivačný účinok na jugulárne nociceptory $3,5 \pm 2$ Hz (Obr. 1B). Ďalšie zvyšovanie koncentrácie nemalo žiadny efekt na aktiváciu jugulárnych nervových vlákien.

A



B



Obr. 1 Agonisty TRPA1 sú efektívnejšie v aktivácii nodózných než jugulárnych nociceptorov (nervová aktivita vyjadrená v Hz) na agonistu TRPA1 AITC (allyl-izotiokyanát) v porovnaní s bazálnymi hodnotami (CTRL) a odpoveďou na nociceptívne stimuly: kapsaicín a distenziu pažeráka pri 100mmHg. B) Odpoveď nodózných a jugulárnych nociceptorov (nervová aktivita vyjadrená v Hz) na agonistu TRPA1 CIA (cinnamon-aldehyd) v porovnaní s bazálnymi hodnotami (CTRL).

Aj napriek tomu, že kvantitatívna analýza ukázala, že nodózne nociceptory sú excitované asi 3 - 4 krát intenzívnejšie ako jugulárne nociceptory na oba selektívne agonisty TRPA1, allyl-izotiokyanát a cinnamon-aldehyd, nodózne a jugulárne nociceptory reagovali na kontrolné stimuly agonistu TRPV1 - kapsaicín a distenziu pažeráka veľmi podobne.

Diskusia

V našej práci sme ukázali, že väčšina pažerákových nociceptorov pochádzajúcich z plakód a neurálnej lišty exprimuje TRPA1 iónový kanál, avšak agonisty TRPA1 majú signifikantne vyšší aktivačný účinok na nodózne vágové nociceptory než na populáciu nociceptorov z neurálnej lišty, kde patria vágové jugulárne ako aj spinálne nociceptory. Z toho vyplýva, že v tkanive pažeráka, ktorý je inervovaný oboma nociceptívnymi podtypmi, budú za aktiváciu TRPA1 receptorov preferenčne zodpovedné plakodálne nodózne nociceptory, ktoré sa exkluzívne vyskytujú vo vágových nervoch.

TRPA1 predstavuje senzor pre celú varietu endogénnych reaktívnych molekúl ako sú produkty oxidačného a nitračného stresu. V pažeráku najväčším zdrojom oxidačného stresu je refluxná tekutina vráta-

ne kyseliny, v prípade zápalu je to infiltrácia polymorfonukleárnymi leukocytmi (Farhadi et al, 2002). Produkty oxidačného stresu zahŕňajúce 4-hydroxynonenal, 4-oxo-nonenal a do určitej miery aj peroxid vodíka priamo aktivujú TRPA1 (Andersson et al, 2008; Taylor-Clark et al, 2008a; Bessac et al, 2008). Navyše bežné metabolity kyseliny arachidonovej (metabolity prostaglandínov PGE₂ a PGD₂) produkované aktivovanými imunitnými bunkami sú tiež efektívnymi aktivátormi TRPA1 (Taylor-Clark et al, 2008). Teda ukazuje sa, že mnoho typov endogénnych aktivátorov TRPA1 je produkovaných v pažeráku u pacientov s ochoreniami pažeráka.

Aferentné nervy v pažeráku morčáťa kódujú noxické stimuly (nociceptory) a embryologicky pochádzajú z dvoch odlišných zdrojov: epibranchiálnych plakód (vágové nodózne nociceptory) a neurálnej lišty (vágové jugulárne a spinálne DRG nociceptory). Oba podtypy kódujú mnohé noxické chemické stimuly relevantné pre pažerák ako je gastroezofágový refluxný mediátor, kyselina (Kollarik et al, 2007) alebo pažerákový mediátor bolesti adeno-zín (Ru et al, 2011), resp. zápalový mediátor ako je bradykinín (Yu and Quayang, 2009). Avšak nociceptory pochádzajúce z plakód a neurálnej lišty sa odlišujú

v sensorických transdukčných mechanizmoch. Na rozdiel od nociceptorov z neurálnej lišty, plakodálne (nodózne) nociceptory reagujú na serotonin (cez serotoninový 5-HT₃ receptor) (Yu et al, 2008). Podobne nociceptory, ktoré majú embryologický pôvod z plakód, ale nie z neurálnej lišty odpovedajú na purinergné agonisty P2X receptora pre ATP (Yu et al, 2005; Kwong et al, 2008). Rozdiely v aktivácii medzi nodóznymi a jugulárnymi nociceptormi s väčším spektrom pre nodózne nociceptívne vlákna boli pozorované aj pri aktivácii adenosínových receptorov (Ru et al, 2011). Prezentovaná štúdia ukazuje, že okrem kvalitatívnych rozdielov, nodózne a jugulárne nervové vlákna sa odlišujú aj v kvantitatívnych charakteristikách, nodózne nociceptory sa vyznačujú vyššou intenzitou aktivácie cez TRPA1 receptory.

Aj keď spinálne DRG nociceptory predstavujú hlavnú dráhu pre viscerálnu bolesť (Grundy 2002), vágové aferentné nervy sprostredkovávajú reflexnú reguláciu viscerálnych orgánov a môžu modulovať tiež bolesť. Presné dôsledky aktivácie nodózných a jugulárných nociceptívnych podtypov v pažeráku pre reflexnú reguláciu a vnímanie bolesti nie sú úplne známe. Na rozdiel od pažeráka aktivácia nodózných a jugulárných nociceptorov v pľúcach má opačný efekt na respiračné reflexy (Canning and Chou, 2009). Napríklad aktivácia nodózných nociceptorov zvyšuje frekvenciu dýchania a inhibuje kašľový reflex, zatiaľ čo aktivácia jugulárných vlákien inhibuje frekvenciu dýchania a zosilňuje kašeľ. Naše výsledky ukazujú, že v prítomnosti endogénnych agonistov TRPA1 v pažeráku dominantnú úlohu v aktivácii zohrávajú práve nodózne nociceptívne vlákna a táto aktivácia bola tak efektívna ako aktivácia vyvolaná známymi noxickými stimulmi ako je kapsaicín a noxická distenzia pažeráka (100mmHg).

V našej práci sme porovnávali pažerákové nociceptívne podtypy použitím nadprahových koncentrácií agonistov TRPA1 receptora. Avšak expozícia jugulárných nociceptorov agonistom TRPA1 nepreukázala významnú nervovú aktivitu. Naše výsledky tiež indikujú, že vyššia efektívnosť agonistov TRPA1, ktoré aktivujú nodózne nociceptory nie je spôsobená vyššou excitabilitou ich nervových terminálov, pretože nodózne a jugulárne nociceptory odpovedali veľmi podobne na kapsaicín nielen v extracelulárnych štúdiách, ale aj na izolovaných neurónoch v patch clamp štúdiách.

Mechanizmus vysvetľujúci kvantitatívne rozdiely v odpovediach sprostredkovaných TRPA1 medzi nodóznymi a jugulárnymi nociceptormi nie je známy. Jedným z možných mechanizmov by mohla byť vyššia expresia TRPA1 v nodózných nociceptívnych (TRPV1-pozitívnych) neurónoch než v jugulárných nociceptoroch. Avšak ďalšie publikované výsledky dokumentujú, že celková expresia TRPA1 nie je vyššia v nodózných v porovnaní so spinálnymi DRG neurónmi. Kvantitatívna analýza qRT-PCR u myší ukázala vyššiu expresiu TRPA1 v spinálnych DRG neurónoch v porovnaní s plakodálnymi (nodóznymi) neurónmi (Nassenstein et al, 2010).

V našom usporiadaní pokusov boli TRPA1 iónové kanály aktívnejšie v nodózných nociceptoroch. Celý rad intracelulárnych mechanizmov vrátane intracelulárneho kalcia, polyfosfátov a interakcia s TRPV1 môžu prispievať k regulácii aktivity TRPA1 v aferentných neurónoch. Ďalšie štúdie sú nevyhnutné na odhalenie presnejších mechanizmov vysvetľujúcich rozdielnu odpoveď nodózných a jugulárných vágových nociceptorov na agonisty TRPA1 receptorov.

Táto práca bola finančne podporená: Vega 1/0037/11, CEVYPET (EU).

Zoznam použitej literatúry

1. Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 2008; 28: 2485-94.
2. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 2008; 118: 1899-910.
3. Blackshaw LA, Brierley SM, Hughes PA. TRP channels: new targets for visceral pain. *Gut* 2010; 59: 126-35.
4. Brierley SM, Hughes PA, Page AJ et al. The ion channel TRPA1 is required for normal mechanosensation and is modulated by algescic stimuli. *Gastroenterology* 2009; 137: 2084-95.
5. Canning BJ, Chou YL. Cough sensor. I. Physiological and pharmacological properties of the afferent nerves regulating cough. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 187: 23-47.
6. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A: Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 22-6.
7. Fass R, Sifrim D. Management of heartburn not responding to proton pump inhibitors. *Gut* 2009; 58: 295-309.
8. Grundy D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 2002; 51(Suppl 1): i2-5.
9. Kollarik M, Ru F, Udem BJ. Acid-sensitive vagal sensory pathways and cough. *Pulm Pharmacol Ther* 2007; 20: 402-11.
10. Kollarik M, Ru F, Brozmanova M. Vagal afferent nerves with the properties of nociceptors. *Auton Neurosci* 2010; 153: 12-20.
11. Kwong K, Kollarik M, Nassenstein C, Ru F, Udem BJ. P2X2 receptors differentiate placodal vs. neuronal crest C-fibers phenotypes innervating guinea pig lungs and esophagus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295: L858-65.
12. Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T et al. Expression and function of the ion channel TRPA1 on vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol* 2008; 586: 1595-604.
13. Nassenstein C, Taylor-Clark T, Myers AC et al. Phenotypic distinction between neural crest and placodal derived vagal C-fibres in mouse lungs. *J Physiol* 2010; 588: 4769-83.
14. Page AJ, Blackshaw LA. Roles of gastro-oesophageal afferents in the mechanisms and symptoms of reflux disease. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 194: 227-57.
15. Patapoutian A, Tate S, Woolf CJ. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 55-68.
16. Ru F, Surdenikova L, Brozmanova M, Kollarik M. Adenosine-induced activation of esophageal nociceptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G485-93.
17. Taylor-Clark TE, Udem BJ, Macglashan DW Jr, Ghata S, Carr MJ, McAlexander MA. Prostaglandin-induced activation of nociceptive neurons via direct interaction with transient receptor potential A1 (TRPA1). *Mol Pharmacol* 2008; 73: 274-81.
18. Taylor-Clark TE, McAlexander MA, Nassenstein C et al. Relative contribution of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary C-fibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. *J Physiol* 2008a; 586: 3447-59.
19. Yu S, Udem BJ, Kollarik M. Vagal afferent nerves with nociceptive properties in Guinea-pig oesophagus. *J Physiol* 2005; 563: 831-42.
20. Yu S, Ru F, Ouyang A, Kollarik M. 5-Hydroxytryptamine selectively activates the vagal nodose C-fibre subtype in the guinea-pig oesophagus. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1042-50.
21. Yu S, Quyang A. TRPA1 in bradykinin-induced mechanical hypersensitivity of vagal C fibers in Guinea pig esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G255-65.

Pokroky vo farmakoterapii pľúcnej arteriálnej hypertenzie

Gertruda Čáповá, Viera Kristová, Martina Havlíková

Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, LF UK, Bratislava

e-mail: viera.kristova@fmed.uniba.sk

Úvod

Pľúcna arteriálna hypertenzia (PAH) je chronické, progresívne a potenciálne fatálne ochorenie pľúcneho obehu, charakterizované patologickým zvýšením pľúcnej cievnej rezistencie (PVR), progresívnym zlyhávaním pravého srdca, významne zhoršenou kvalitou života a predčasnou smrťou (Galié a kol., 2009). Z pohľadu hemodynamickej definície je charakterizovaná ako progredujúca prekapiálna pľúcna hypertenzia. Je to taká forma pľúcnej hypertenzie, kedy je zvýšený stredný tlak v arteria pulmonalis (≥ 25 mm Hg), súčasne je normálny tlak v zaklínení (PCWP ≤ 15 mm Hg) a pľúcna cievna rezistencia (PVR) je nad 3 Woodovej jednotky (W.j.) (Kamenský, Murín a kol., 2009; Jansa a kol., 2009).

PAH je vzácne ochorenie, minimálna prevalencia dospeljej európskej populácie je 15-50 prípadov na milión obyvateľov (Peakock a kol., 2007). Predstavuje heterogénnu skupinu chorôb. Predovšetkým sem patrí idiopatická a hereditárna PAH, ktorých výskyt predstavuje asi 43% populácie s PAH. Idiopatická PAH sa vyskytuje v populácii s ročnou incidenciou 2-5 % prípadov na milión obyvateľov, pričom častejšie bývajú postihnuté ženy. Hereditárna forma predstavuje 6-10% prípadov PAH. Výskyt PAH spojený s postihnutím spojivového tkaniva predstavuje 15-20% prípadov dospeljej populácie. Najčastejšou príčinou pri systémovom ochorení je systémová sklerodermia a systémový lupus erythematoses (Mukerjee a kol., 2003). Pomerne vzácne sa vyskytuje PAH pri reumatoidnej artritíde a pri dermatomyo-

sitíde. Faktor, zapríčiňujúci idiopatickú ako i hereditárnu PAH zostáva neznámy. Ochorenie sa dáva do súvislosti s mutáciou génov pre receptory niektorých rastových faktorov. Do skupiny PAH patrí i celý rad stavov, kde vyvolávajúcim faktorom je systémové ochorenie spojivového tkaniva, vrodená skratová srdcová vada (Eisenmengerov syndóm), portálna hypertenzia, abúzus návykových látok (kokaín, amfetamín), anorektík a iných toxických látok, HIV infekcia (Tab.1). Mechanizmus vzniku PAH spojenej s abúzom niektorých návykových látok a anorektík zrejme súvisí s interakciou s vnútrobunkovým prenosom serotonínu, dopamínu prípadne i noradrenalínu. PAH spojená s HIV infekciou sa vyskytuje v 0,5% infikovaných chorých. V patofyziológii zrejme hrá významnú úlohu pôsobenie cytokínov, rastových faktorov a endotelínu.

Prognóza PAH je nepriaznivá. Medián prežitia neliečenej PAH je 2,8 roka. Medián prežitia neliečenej PAH pri systémovej sklerodermii je 12 mesiacov. Rovnako nepriaznivú prognózu má i PAH spojená s HIV infekciou. Prognóza PAH spojenej s vrodenou srdcovou vadou je výrazne priaznivejšia (Jansa a kol., 2011). Príčina PAH spočíva v prestavbe pľúcneho riečiska. Jednotlivé nozologické jednotky PAH majú podobnú patogenézu. Zvyšovanie PVR ako ústredného faktora sa realizuje viacerými mechanizmami ako vazokonstrikcia, zápal, trombóza a najmä obštrukčná remodelácia pľúcnych artérií, pod ktorú zahŕňame procesy hypertrofie, proliferácie a fibrózy.

Tab.1 Klinická klasifikácia PAH (Galié a kol., 2011).

1. Pľúcna arteriálna hypertenzia (PAH)
1.1 Idiopatická
1.2 Hereditárna
- pri mutácii génu na BMPRII receptore (bone morphogenetic protein receptor type II) - pri mutácii génov na ALK1 receptore (A receptor type - II like 1) alebo endoglin (ENG) s hereditárnou hemoragickou hemangiopatiou alebo bez nej - mutácie na neznámom géne
1.3 Indukovaná liekmi alebo toxínmi
1.4 Asociovaná s inými stavmi (APAH)
1.4.1 ochorenie spojivového tkaniva
1.4.2 infekcia HIV
1.4.3 portálna hypertenzia
1.4.4 vrodené chyby srdca
1.4.5 schistozomiáza
1.4.6 chronická hemolytická anémia
1.5 Perzistujúca pľúcna hypertenzia novorodencov

Za kľúčový bod kaskády vedúcej k remodelácii sa považuje endotelová dysfunkcia, ktorá vedie k poruche rovnováhy humorálnych regulačných faktorov v prospech vazokonstrikčne, prokoagulačne a mitogénne pôsobiacich mediátorov ako sú endotelín, serotonin, tromboxán. Expresia týchto látok je nadmerná, na druhej strane produkcia látok priaznivo pôsobiacich na endotel ako prostacyklín, bradykinín a predovšetkým NO, je chronicky znížená. Rozvinutý patologicko - anatomický obraz pozostáva z hypertofie média, proliferácie a fibrózy intimy, in situ trombóz v arteriolách a v závere obrazu nekrotizujúcej arteritídy. Je to ireverzibilný proliferatívny a obliteratívny proces, ktorý vedie k obštrukcii a reštrikcii pľúcneho arteriálneho riečiska (Šimková, 2008). Podkladom všetkých typov PAH je teda dysfunkcia endotelu pľúcnych ciev u geneticky disponovaného jedinca. Dysfunkcia endotelu je navodená vyvolávajúcim faktorom, ktorým môže byť vaskulitída, infekcia (HIV) alebo abúzus toxických látok a niektorých liekov (anorektiká). Diagnóza PAH sa opiera o nasledujúce vyšetrenia: Echokardiografia, Bodyple-

tysmografia, difúzna kapacita pľúc, ventilačná a perfúzna scintigrafia pľúc. Katetri- zácia sa odporúča pri zhoršení stavu alebo zmene liečby. Stanovenie diagnózy PAH ako i nasadenie adekvátnej liečby patrí výhradne do špecializovaných centier.

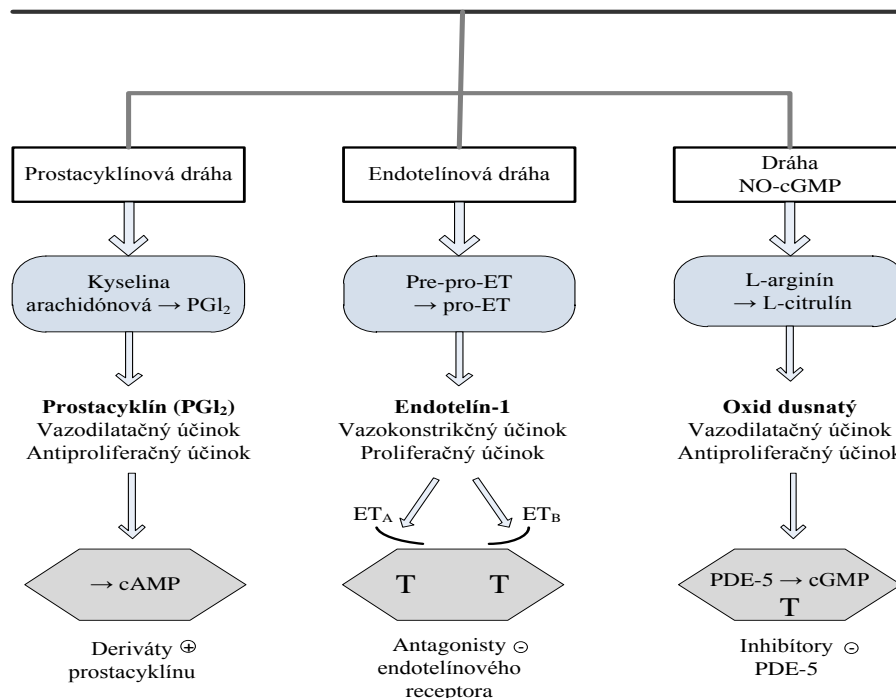
Liečba

V nadväznosti na završenú diagnostiku by mala nasledovať liečba zodpovedajúca úrovni súčasných medicínskych poznatkov (Šimková a Janeková, 2005).

Cieľom liečby je zasiahnuť do troch základných patofyziologických mechanizmov uplatňujúcich sa pri vzniku a rozvoji pľúcnej arteriálnej hypertenzie (vazokonstrikcia, proliferácia, prokoagulačný stav) (Jansa a kol., 2004) (Obr.1). Zároveň si súčasné terapeutické režimy kladú za cieľ ovplyvniť symptómy a prognózu chorých, zlepšiť ich kvalitu života a znížiť mortalitu (Ruan a kol., 2010). Cieľom liečby PAH je dosiahnutie funkčnej triedy NYHA II (Martinický, 2009). Terapeutické možnosti PAH zahŕňajú režimové opatrenia, farmakologickú liečbu konvenčnú podpor- nú, špecifickú (vazodilatačná liečba blokátormi kalciových kanálov, prostanoidmi,

antagonistami endotelínových receptorov, inhibítormi fosfodiesterázy typu 5), kombinovanú liečbu, ktorej koncept vychádza z patofyziologickej predstavy viacerých

dráh sprostredkujúcich patologické zmeny v pľúcnych cievach (Luknár a kol., 2010), ako i nefarmakologické opatrenia.



Obr.1 Ciele farmakoterapie (upravené podľa Callaghan a kol., 2011)

Režimové opatrenia

- Fyzická záťaž je u chorých s PAH vhodná podľa individuálnej tolerance. Optimálne je ľahké aeróbne cvičenie (chôdza).
- Nie je vhodný pobyt vo vysokých nadmorských výškach (nad 2000 m n. m.).
- Pri ceste lietadlom je nevyhnutná inhalácia kyslíka.
- Odporúča sa očkovanie proti chrípke a pneumokokovej infekcii.
- Zvážiť psychosociálnu podporu pacientov s PAH.
- Tehotenstvo je u PAH kontraindikované, materská mortalita počas gravidity a pôrodu dosahuje 30 – 50 %. Nutná je účinná antikoncepcia. Z hľadiska tromboembólie je akceptovateľná hormonálna antikoncepcia pri súčasnej antikoagulačnej liečbe.

- Chirurgické výkony s celkovou anestéziou trvajúce dlhšie než tri hodiny sú rizikové. Pri chirurgických výkonoch by sa mala podľa možnosti používať epidurálna anestéza namiesto celkovej anestézy (Jansa a kol., 2011; Galiè a kol., 2009).

Konvenčná podporná farmakoterapia

Diuretiká – zlepšujú symptómy v súvislosti s retenciou tekutín pri srdcovom zlyhaní

Antikoagulačná liečba - chronická antikoagulačná liečba warfarínom je indikovaná predovšetkým u idiopatickej, hereditárnej PAH a u PAH asociovanej s abúzmom anorektík, taktiež pri intravenózne liečbe prostanoidmi s cieľom znížiť riziko trombózy z katétru. Cieľové INR sa má pohybovať okolo 2,0 (Jansa a kol., 2011).

Kardiotoniká - digoxín nie je v súčasnej dobe bežnou súčasťou terapie pľúcnej arteriálnej hypertenzie (Jansa a kol., 2011).

Oxygenoterapia - vo forme dlhodoobej domácej oxygenoterapie za účelom zlepšenia okysličenia tkanív a indikuje sa podľa platných kritérií po kyslíkovom teste. Pacient inhaluje 15 – 16 hodín denne. Podáva sa 2 – 3 l kyslíka / min. (Šimková, 2008).

Špecifická farmakoterapia

Špecifická farmakoterapia moduluje abnormality prostacyklínovej, endotelínovej a NO cesty v patogenéze PAH, tým brzdí vlastné patogénne mechanizmy choroby (vazokonstrikciiu, obštrukčnú remodeláciu). (Šimková, 2008; Jansa a kol., 2011).

Blokátory kalciových kanálov

Blokátory vápníkových kanálov špecificky blokujú prienik iónov Ca^{2+} napäťovo riadenými kalciovými L – kanálmi do hladkosvalovej bunky arteriol, čím navodia vazodilatáciu v arteriálnom riečisku (Lincová a Farghali a kol., 2002). Majú priaznivý účinok na pľúcnu hemodynamiku a na zníženie hypertenzie v artéria pulmonalis. Na druhej strane však táto liečba súčasne vedie k zvýšenému prekrveniu hypoventilovaných alveol a k zhoršeniu ventilačno / perfúzných pomerov a k poklesu PaO_2 . Liečba vysokými dávkami blokátorov kalciových kanálov (nifedipín, diltiazem, amlodipín) je indikovaná len v prípade pozitívneho testu pľúcnej vazoreaktivity. Za kritériá positivity testu akútnej pľúcnej vazodilatácie sa považuje pokles stredného tlaku v a. pulmonalis aspoň o 10 mm Hg vstupných hodnôt, ale zároveň pod 40 mm Hg bez súčasného poklesu srdcového výdaja. Dlhodobou odpoveďou na vazodilatačnú liečbu blokátormi kalciových kanálov, ktorá je charakteristická zlepšením symptómov do štádia NYHA I a II, sa vy-

značuje asi len polovica akútnych respondentov. To je zároveň dôvod, prečo sú blokátory kalciových kanálov v súčasnosti zriedkavo používané v klinickej praxi (McLaughlin, Davis, Cornwell, 2011).

Liečba retardovaným nifedipínom sa zahajuje dávkou 30 mg dvakrát denne s titráciou dávky do 120 – 240 mg. Liečba diltiazemom začína dávkou 60 mg trikrát denne s cieľovou dávkou 240 – 720 mg denne. Amlodipín dávkujeme od 2,5 mg denne do cieľovej dávky viac než 20 mg denne. Liečba blokátormi kalciových kanálov nesmie byť náhle prerušená pre riziko „rebound“ fenoménu (Jansa a kol., 2011).

Prostanoidy

Prostanoidy sú autakoidy odvodené od kyseliny arachidónovej. Kľúčovým enzýmom v ich syntéze je cyklooxygenáza (COX) a prostacyklínsyntetáza.

Ich účinok v pľúcnej cirkulácii je sprostredkovaný špecifickými receptormi na povrchu bunky, ktoré boli objavené na povrchu trombocytov a na bunkách endotelu. Všetky prostanoidné receptory sú spojené s efektorovým mechanizmom G – regulačných proteínov, preto sa po naviazaní prostanoidu na receptor spustí aktivácia G – proteínu a zvýši sa intracelulárna koncentrácia cAMP, ktorá následne aktivuje proteínkinázu A. To zapríčini inhibíciu agregácie trombocytov, relaxáciu hladkého svalstva a vazodilatáciu v pľúcnych artériách (Ruan, 2010).

Prostacyklín (prostaglandín I₂) je metabolit arachidónovej kyseliny. Inhibuje agregáciu krvných doštičiek a prispieva k antitrombotickým vlastnostiam nepoškodenej steny ciev. Je silným vazodilatátorom, spôsobuje relaxáciu hladkého svalstva ciev a jeho i.v. podanie vedie k hypotenzii. Znižuje pľúcnu vaskulárnu rezistenciu (Lincová, Farghali a kol., 2002).

Jeho nevýhodou je však krátky biologický polčas, a preto sa pre klinické použitie hľadali jeho chemicky stabilnejšie

formy ako je napríklad epoprostenol (Ruan, 2010).

Epoprostenol je syntetický analóg prostacyklínu. Vzhľadom k jeho krátkemu biologickému polčasu (3 – 5 min) je nutné podávať ho formou dlhodobej kontinuálnej infúzie do centrálného žilového katétra. Roztok epoprostenolu je termolabilný, preto je nutné ho počas aplikácie chladiť. Zároveň sa musí chrániť pred svetlom, skladovať pri teplote 2 – 8 °C, pretože pri izbovej teplote zostáva stabilný 8 hodín. Epoprostenol zlepšuje symptómy, telesnú výkonnosť, hemodynamické parametre a prognózu pacientov s IPAH a FPAH, čo bolo dokázané v niekoľkých randomizovaných štúdiách (Galiè a kol., 2009). Liečba sa zahajuje dávkou 2 – 4 ng/kg/min s postupným zvyšovaním dávky liečiva v závislosti od tolerancie a nežiaducich účinkov (flush, bolesti hlavy, bolesti čelustí, bolesti na hrudníku, nauzea, hnačka, hypotenzia, tachykardia). Za optimálnu dávku pri dlhodobej liečbe sa považuje 20 – 40 ng/kg/min. Hlavným rizikom liečby sú lokálne a systémové infekčné komplikácie v dôsledku permanentného centrálného žilového katétra, riziko poruchy infúznej pumpy s vyvolaním „rebound“ fenoménu pri náhlom prerušení liečby. Intravenózne epoprostenol je liekom voľby u pacientov v klinickom štádiu NYHA III a IV (Galiè a kol., 2009).

Treprostinil je tricyklický benzidínový analóg epoprostenolu. Je termostabilný, čo dovoľuje podávanie liečiva pri izbovej teplote ako subkutánnu infúziu z malej prenosnej pumpy. U pacientov s PAH zlepšuje hemodynamiku, telesnú výkonnosť a prognózu. Liečba sa zahajuje dávkou 1 – 2 ng/kg/min. Za minimálne účinnú dávku sa považuje 10 ng/kg/min. Cieľová dávka kolíše medzi 20 – 80 ng/kg/min podľa individuálnej tolerancie. Najčastejším nežiaducim účinkom je lokálna bolestivá reakcia v mieste podkožnej infúzie. Pri porovnaní s epoprostenolom

odpadá nutnosť chladenia infúznej sústavy a hlavne riziko plynúce z náhleho prerušenia infúzie, pretože treprostinil má polčas 58 – 83 minút.

Subkutánnu treprostinil je v Európskej únii registrovaný pre liečbu PAH v štádiu NYHA III (Jansa a kol., 2011).

Iloprost je chemický stabilný analóg prostacyklínu s polčasom 20 – 30 minút schválený pre inhalačnú liečbu idiopatickej PAH. Pre navodenie dostatočného účinku v pľúcnej cirkulácii je potrebných minimálne 6 – 9 inhalácií dávky 2,5 – 5 µg denne. Po niekoľkomesačnej liečbe vedie ku zlepšeniu telesnej výkonnosti, hemodynamiky a funkčnej triedy podľa NYHA. Dlhodobý účinok monoterapie zostáva sporný (Galiè a kol., 2009). Časté nežiaduce účinky sú kašeľ, bolesť hlavy, flush, hypotenzia a bolesť čelustí. Inhalačný iloprost schválila FDA (Food and Drug Administration) v roku 2004 pre liečbu pacientov vo funkčnej triede NYHA III a IV (McLaughlin a McGoan, 2006).

Beraprost je prvý chemicky stabilný perorálny analóg prostacyklínu. Účinok spočívajúci v zlepšení vzdialenosti pri teste šesťminútovou chôdzou je potvrdený po 3 – 6 mesiacoch liečby, pri dlhotrvajúcej monoterapii však nie je presvedčivý. Najčastejšie nežiaduce účinky vyskytujúce sa v priebehu liečby sú bolesť hlavy, flush, bolesť čelustí a hnačka. Beraprost je pre liečbu PAH registrovaný v Japonsku a Kórei. V súčasnej dobe je testovaný beraprost s predĺženým uvoľňovaním (Galiè a kol., 2009; Jansa a kol., 2011).

Antagonisty endotelínových receptorov

Endotelín má v patogenéze PAH kľúčovú úlohu. Je produkovaný najmä v cievnom endoteli a jeho pôsobenie je zabezpečené prostredníctvom endotelínových receptorov:

ET_A receptor: jeho stimulácia vedie k pľúcnej vazokonstrikcii, podporuje proli-

feráciu buniek hladkej svaloviny v artéria pulmonalis a aktivuje zápalové procesy.

ET_B receptor: jeho stimulácia vedie k vazokonstrikcii a taktiež k vazodilatácii, podporuje bunkovú proliferáciu, aktivuje zápalové procesy, podlieha up – regulácii pri vaskulárnych ochoreniach.

Bosentan je duálny antagonist receptorov pre endotelín s výraznejšou afinitou k receptoru ET_A. Pôsobí antiproliferačne a vazodilatačne. Jeho vplyv na významné zlepšenie telesnej výkonnosti, hemodynamických parametrov a prežívanie chorých bol dokázaný vo viacerých klinických štúdiách, hlavne u idiopatickej PAH a u PAH asociovanej so systémovými chorobami spojiva vo funkčnom štádiu NYHA II. Podáva sa v dávke 62,5 mg dvakrát denne prvé štyri týždne, neskôr 125 mg dvakrát denne. K hlavným nežiaducim účinkom patrí reverzibilná a na dávke závislá hepatopatia. Vyskytuje sa asi u 10% liečených. Kontrola hepatálnych testov je nutná po dvoch týždňoch od zvýšenia dávky a ďalej sa pokračuje v mesačných intervaloch počas celého trvania liečby. K normalizácii testov vedie redukcia dávky alebo prerušenie liečby. Okrem toho môže spôsobovať anémiu, interaguje s metabolizmom warfarínu a je teratogénny. Môže znižovať účinnosť hormonálnej antikoncepcie. Je indikovaný u pacientov s PAH v štádiu NYHA II a III (Jansa a kol., 2011).

Ambrisentan je vysoko selektívny nesulfonamidový antagonist endotelínového receptora ET_A. Zlepšuje symptómy, telesnú výkonnosť, hemodynamické parametre a predlžuje dobu do klinického zhoršenia u pacientov s idiopatickou PAH. Liečba je zahajovaná dávkou 5 mg jedenkrát denne a v prípade znášanlivosti iniciálnej dávky je možné zvýšiť na 10 mg jedenkrát denne. Incidencia abnormálnych hepatálnych testov sa vyskytuje v rozmedzí 0,8 – 3 % liečených pacientov. Je schválený pre liečbu pacientov s PAH vo

funkčnej triede NYHA II a III (Galiè a kol., 2009).

Sitaxentan je selektívny antagonist endotelínového receptora ET_A. V roku 2010 bol z dôvodu bezpečnosti stiahnutý z trhu (Jansa a kol., 2011).

Inhibítory fosfodiesterázy typu 5

Účinok NO na cievy je závislý od zvýšenej koncentrácie cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) nachádzajúceho sa v bunkách hladkej svaloviny ciev. Účinok intracelulárneho cGMP je krátkodobý v dôsledku jeho rýchlej degradácie fosfodiesterázou typu 5, ktorá je produkovaná v pľúcnom tkanive. Génová expresia a aktivita fosfodiesterázy typu 5 je výrazne zvýšená pri chronickej pľúcnej hypertenzii. Inhibítory fosfodiesterázy sprostredkujú stúpanie hladiny cGMP a pôsobia vazodilatačne a antiproliferačne (Rubin, 2006).

Sildenafil je perorálny, selektívny inhibítor fosfodiesterázy typu 5. Početné ukončené štúdie potvrdzujú účinky sildenafilu zlepšujúce telesnú výkonnosť, symptómy a hemodynamiku, pretrvávajúce i po 12 mesiacoch. Liečba je indikovaná v dávke 20 mg trikrát denne. Vo väčšine prípadov je však nutné dávku zvýšiť na 80 mg trikrát denne. Najčastejšie nežiaduce účinky sildenafilu sú ľahkého až stredne ťažkého stupňa, vyplývajúce hlavne z vazodilatácie (bolesti hlavy, flush, dyspepsia a epistaxia). Boli zaznamenané vážnejšie nežiaduce účinky ako infarkt myokardu, náhla cievna mozgová príhoda v dôsledku subarachnoidálneho krvácania a náhla srdcová smrť následkom komorovej arytmie. Liek je zaregistrovaný pre liečbu PAH vo funkčnej triede NYHA II a III. (Galiè a kol., 2009).

Tadalafil je selektívny inhibítor fosfodiesterázy typu 5. V súčasnosti je schválený aj pre liečbu erektilnej dysfunkcie ako sildenafil. Podáva sa perorálne jedenkrát denne v dávke 40 mg. Profil nežiaducich

účinkov je podobný ako u sildenafilu (Galiè a kol., 2009).

NO je endogénna vazodilatačná látka. Inhalovaný NO pôsobí vysokoúčinne a selektívne v oblasti pľúcnej cirkulácie. Použitie je overené pri pľúcnej hypertenzii novorodencov, u detí s vrodenými srdcovými chybami alebo pri pľúcnej transplantácii. Okrem použitia pri akútnych situáciách sa NO využíva pri teste akútnej pľúcnej vazoreaktivity. Jeho využitie v chronickej liečbe ukáže budúcnosť. Suplementácia L-arginínu, ktorý je substrátom pre produkciu NO, viedla pri krátkodobej infúznej liečbe k poklesu pľúcnej cievnej rezistencie a stredného tlaku v artéria pulmonalis. Potenciálnou nevýhodou chronickej liečby by mohlo byť zvýšenie koncentrácie polyamínov, ktoré majú proliferatívne účinky (Šimková, 2008).

Kombinovaná farmakoterapia

Monoterapia PAH u mnohých pacientov nevedie k dosiahnutiu požadovaného liečebného cieľa. Je to dosiahnutie stupňa NYHA I-II, prejde vzdialenosti > 400 -500m pri 6-minútovom teste chôdze, kompenzované pravostranné zlyhanie. Kombinovaná liečba umožňuje zasiahnuť naraz do viacerých patogenetických mechanizmov.

Záver

PAH je progresívne ochorenie s mimoriadne zlou prognózou. Malé oneskorenie v diagnóze môže mať dramatický dopad na ďalší vývoj ochorenia. Prognóza PAH je porovnateľná s niektorými pokročilými karcinómami. Medián prežitia je u pacientov s PAH vo funkčnej triede NYHA/WHO IV 6 mesiacov, u pacientov vo funkčnej triede NYHA/WHO III 2,6 roka a u pacientov vo funkčnej triede NYHA/WHO I-II 4,9 roka (Martinický, 2009).

Pred nami je neľahká úloha vedieť vybrať najvhodnejšiu látku alebo ich kombináciu pre jednotlivých pacientov. Výber

iniciálnej terapie ovplyvňuje viacero medicínskych faktorov, ako je typ PAH, komorbidity pacienta, ale aj skúsenosti a možnosti jednotlivých centier s liečbou. Ak sa stanovené ciele nepodarí dosiahnuť pomocou monoterapie, odporúča sa liečbu stupňovať pridaním ďalšieho lieku. Kombinovaná farmakoterapia je považovaná za vhodnú u väčšiny pacientov. Avšak optimálne načasovanie a spôsob kombinácie liečiv a stratégií vyžaduje naďalej ich sledovanie.

Podporené grantom VEGA č. 1/0030/11. Práca bola podporená projektom "Dobudovanie centra experimentálnej a klinickej respirológie" spolufinancovaným zo zdrojov ES.

Zoznam použitej literatúry

1. GALIÉ, N. a kol. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. In: European Respiratory Journal. ISSN 0903-1936, 2009, roč.34, č.6, s.1219-1263
2. JANSÁ, P. a kol. Pulmonary arterial hypertension – contemporary management strategy. In: Bratislavské Lekárske Listy. ISSN 0006-9248, 2009, roč. 110, č. 10, s. 603-608.
3. JANSÁ, P. a kol. Chronická plicní hypertenze: Doporučený diagnostický a léčebný postup České kardiologické společnosti, 2010. In Cor et Vasa. ISSN 0010-8650, 2011, roč. 53, č. 3, s. 169-182.
4. KAMENSKÝ, G., MURÍN, J. a kol. Kardiovaskulárne ochorenia – najväčšia hrozba. Bratislava: AEPres, 2009. 222 s. ISBN 978-80-88880-86-8.
5. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. a kol. Základní a aplikovaná farmakologie. Praha: Galén, 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8.
6. LUKNÁR, M. a kol. Idiopatická pľúcna artériová hypertenzia: úspech kombinačnej liečby. In: Kardiológia. ISSN 1210-0048, 2010, roč. 19, č. 4, s. 279-286.
7. MARTINICKÝ, D. Pľúcna artériová hypertenzia a idiopatická pľúcna fibróza. In Medical Practice. ISSN 1336-8109, 2009, roč. 4, č. 6, s. 31-39.
8. McLAUGHLIN, V., V., McGOON, M. Pulmonary Arterial Hypertension [online]. In Circulation. 2006, roč. 114, s. 1417-1431. [cit. 2012-01-01].
9. MUKERJEE, D. a kol. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension: application of a registry

- approach. In: Ann Rheum Dis. 2003, roč.62, str. 1088-1093.
10. PEACOCK a kol. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. In: European Respiratory Journal 2007, roč.30, str. 104-109.
 11. RUAN, C. H. a kol. Prostacyclin Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. In Texas Heart Institute Journal. ISSN 1526-6702, 2010, roč. 37, č. 4, s. 391-399.
 12. RUBIN, L., J. Pulmonary Arterial Hypertension [online]. In: Proceeding of American Thoracic Society. 2006, roč. 3, s. 111-115. [cit. 2011-08-21]. <<http://atsjournals.org>>.
 13. ŠIMKOVÁ, I. Nové formy liečby pľúcnej hypertenzie. In: Via practica. 2008, roč. 5, č. 6, s. 252-255.

ACE inhibítory a kašeľ

Soňa Fraňová, Gabriela Nosáľová, Martina Šutovská

Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin
e-mail: franova@jfmed.uniba.sk

Inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (ACE) patria v súčasnosti k liekom prvej voľby v terapii chronického zlyhania srdca a hypertenzie. Opodstatnenie ich širokého klinického uplatnenia je spojené s minimálnym výskytom nežiaducich účinkov na centrálny nervový systém, kardiálne funkcie, metabolizmus lipidov, glukózy a kyseliny močovej.

Aj keď majú ACE-inhibítory pomerne nízky výskyt nežiaducich účinkov, najfrekvencovanejším je negatívne ovplyvnenie respiračného systému s výskytom suchého dráždivého kašľa, dyspnoe a sipotu. Incidencia výskytu kašľa po enalapriľe môže dosiahnuť až 20%. Výskyt kašľa následkom terapie inhibítormi ACE je nezávislý od typu základného ochorenia, akým môže byť esenciálna, renovaskulárna hypertenzia, alebo chronické zlyhanie srdca (Chan et al, 2010).

Kašeľ vyvolaný dlhodobým podávaním látok zo skupiny ACE-inhibítorov spadá do skupiny suchého neproduktívneho kašľa, často sa zhoršujúceho v noci. Kašeľ sa môže objaviť po niekoľkých dňoch, ale aj mesiacoch liečby. Po vysadení ACE-inhibítora sa stráca v priebehu niekoľkých dní. Neexistuje presný diagnostický prvok, ktorým by sa dal odlíšiť kašeľ vyvolaný podávaním ACE-inhibítorov od bežného kašľa vyvolaného napr. vírusovým ochorením. Jediným riešením na rozpoznanie príčiny kašľa počas podávania ACE-inhibítorov je prerušenie liečby uvedeným typom liečiva. Ak bol kašeľ vyvolaný podávaním ACE-inhibítora vymizne v priebehu niekoľkých dní (Kastelik et al., 2005).

Jedným z faktorov, ktoré môžu ovplyvniť výskyt respiračných nežiaducich účinkov ACE inhibítorov je dávka liečiva. Podľa niektorých klinických štúdií je kašeľ pravdepodobne nezávislý na dávke podaného ACE-inhibítora. Podľa iných autorov sa však v praxi dosiahlo znížením dávky čiastočné odstránenie respiračných príznakov počas terapie ACE – inhibítormi (Korpáš et al., 2006).

Široko diskutovanou otázkou je aj vzťah chemickej štruktúry ACE-inhibítora a kašľa. Podľa starších prác bolo všeobecne používaným záverom tvrdenie, že výskyt kašľa je nezávislý od chemickej štruktúry ACE-inhibítora. Napriek tomu mierne zvýšená incidencia kašľa bola pozorovaná po ACE-inhibítoroch obsahujúcich v molekule sulfhydrilovú skupinu, ako je napr. kaptopril. Výskyt kašľa je frekvencovanejší podávaním dlhodobou účinkujúcich foriem ACE-inhibítorov, ako je napr. prodrug-forma enalaprilu. Niektorí autori popisujú nižší výskyt kašľa po ACE-inhibítoroch selektívnych pre N-doménu ACE ako je napr. imidapril. Tieto ACE-inhibítory majú nižšiu afinitu k N - doméne ACE, ktorá je zodpovedná za odbúravanie bradykinínu. V praxi sa však tieto tvrdenia nepotvrdili. Príčinou môže byť malé množstvo klinických štúdií týkajúcich sa respiračných nežiaducich účinkov po aplikácii novších ACE-inhibítorov (Morice, 2004).

Otázka výskytu kašľa a pohlavia je nedoriešenou otázkou. Výsledky jednotlivých klinických štúdií sa líšia závermi týkajúcimi sa kašľa a ženského pohlavia. Zvýšený výskyt kašľa u žien môže súvisieť s hladinou pohlavných hormónov, pretože

častočné zvýšenie incidencie tohto respiračného nežiaduceho účinku sa pozorovalo u žien v menopauze. Podľa niektorých prác podanie danazolu, látky, ktorá znižuje hladinu estrogénov, vyvolalo u samičiek morčata zvýšenie incidencie kašľa indukovaného 4-týždňovým podávaním cilazaprilu. Zníženie hladiny estrogénov môže byť additívnym faktorom pri potenciácii kašľa u žien liečených ACE- inhibítormi v menopauze, alebo postmenopauzálnom období. Na druhej strane množstvo záverov klinických štúdií uzatvorilo túto otázku vyššou ochotou zo strany žien spolupracovať v štúdiách týkajúcich sa epidemiológie kašľa a terapie ACE-inhibítormi (Nicolls a Gilrist, 2005).

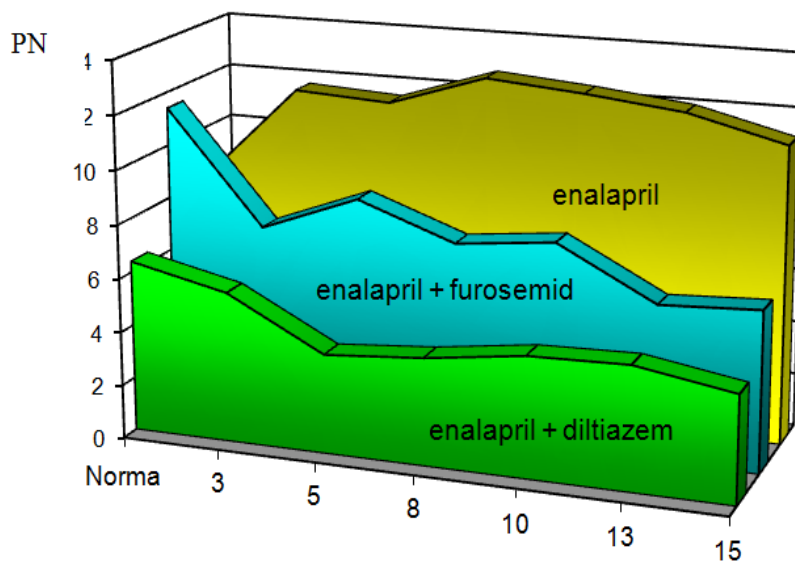
Zaujímavou otázkou je aj vzťah fajčenia a výskytu nežiadúcich účinkov po ACE-inhibítormi. Zistil sa znížený výskyt kašľa u fajčiarov liečených ACE-inhibítormi. Príčinou môže byť znížená citlivosť bronchiálnych a pulmonálnych C - vlákien u fajčiacich jedincov. Dlhodobou expozíciou C-vlákien nikotínu, môže dôjsť k deplécii senzitivných neuropeptidov. Uvedené tvrdenia, však nie sú podložené priamymi experimentálnymi dôkazmi.

Aj keď frekvencia výskytu dyspnoe a sypotu, ako nežiaduceho účinku pri liečbe inhibítormi ACE dosahuje len 3%, je nebezpečným prvkom u pacientov so zvýšenou bronchiálnou reaktivitou. V klinických podmienkach takúto skupinu reprezentujú najmä pacienti s astmou bronchiale. Niektorí autori uvádzajú, že bronchiálna obštrukcia bola zaznamenaná aj u pacientov liečených ACE-inhibítormi, u ktorých nebola pred podaním ACE-inhibítora zistená zvýšená bronchiálna reaktivita.

Nežiaduce účinky enalaprilu na dýchací systém sú spojené s inhibíciou ACE a následnou kumuláciou bradykinínu, SP a ďalších neuropeptidov v dýchacích cestách. Bradykinín v dýchacom systéme spôsobuje proliferáciu neutrofilov a eozinofilov, uvoľňovanie histamínu mastocytmi. Bradykinín zvyšuje sekréciu hlienu pôsobením na submukózne žľazy, alebo aktiváciou C-vlákien a cholinergických nervov. Tieto prozápalové účinky bradykinínu, ako aj priame pôsobenie na hladkú svalovinu, môžu vyústiť do bronchokonstrikcie. Bradykinín zvyšuje vyplavovanie SP ovplyvnením citlivosti aferentných senzitivných nervových zakončení (Malini et al., 1999). Zvýšená lokálna koncentrácia bradykinínu, SP a ďalších neuropeptidov sa podieľa na vzniku kašľa. Mechanizmus jeho vzniku súvisí so zvýšením citlivosti nemyelinizovaných aferentných senzitivných nervových zakončení - C vlákien a dráždením rýchlo sa adaptujúcich (irritant) kašľových receptorov (RARs) myelinizovaných aferentných nervových vlákien.

V našich experimentálnych podmienkach podávanie enalaprilu vyvolalo signifikantné zvýšenie sledovaných parametrov kašľa vyvolaného mechanickou stimuláciou dýchacích ciest. Tento fakt potvrdil zvýšenú citlivosť kašľového reflexu a participáciu RARs pri tvorbe kašľa počas terapie ACE-inhibítormi (Fraňová a Nosáľová, 1999).

Z hľadiska farmakologickej modulácie respiračných nežiaducich účinkov inhibítormi ACE sme zaznamenali signifikantné zníženie parametrov kašľa po kombinácii enalaprilu s inhalačne podaným furosemi-dom.



Obr. 1 Provanie počtu nárazov (PN) mechanicky vyvolaného kašľa z tracheobronchiálnej oblasti dýchacích ciest pred podaním farmaka (Norma) a po 15 dňovom podávaní enalaprilu, a kombinácie enalaprilu s diltiazemom, enalaprilu s furosemidom

Furosemid je kľúčové diuretikum, ktoré po inhalačnom podaní má výrazný antitusický a bronchodilatačný účinok. Mechanizmus uvedených účinkov furosemidu je pravdepodobne komplexným javom, ktorý nie je zatiaľ presne definovaný. Furosemid je inhibítorom $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransportu epiteliálnych buniek dýchacích ciest, čím môže ovplyvňovať zloženie periciliárnej tekutiny. V protektívnom účinku inhalačného furosemidu na dýchací systém sa môže uplatniť inhibícia degranulácie mastocytov a vyplavovania histamínu, zvýšenie syntézy PGE_2 a PGI_2 , zníženie hladiny LTD_4 , proliferácie eozinofilov a neutrofilov, a pravdepodobne aj zásah do metabolismu ďalších zápalových buniek (Nakagawa, 2004).

Pri ovplyvnení kašľa, ktorý bol potencionovaný dlhodobým podávaním enalaprilu sme zistili, že inhalačne podávaný furosemid znížil výskyt kašľa, ktorý bol potencionovaný podávaním enalaprilu. 15-dňové podanie furosemidu a enalaprilu v porovnaní s monoterapiou enalaprilom vyvolalo signifikantný pokles počtu nárazov kašľa z laryngofaryngálnej aj tracheob-

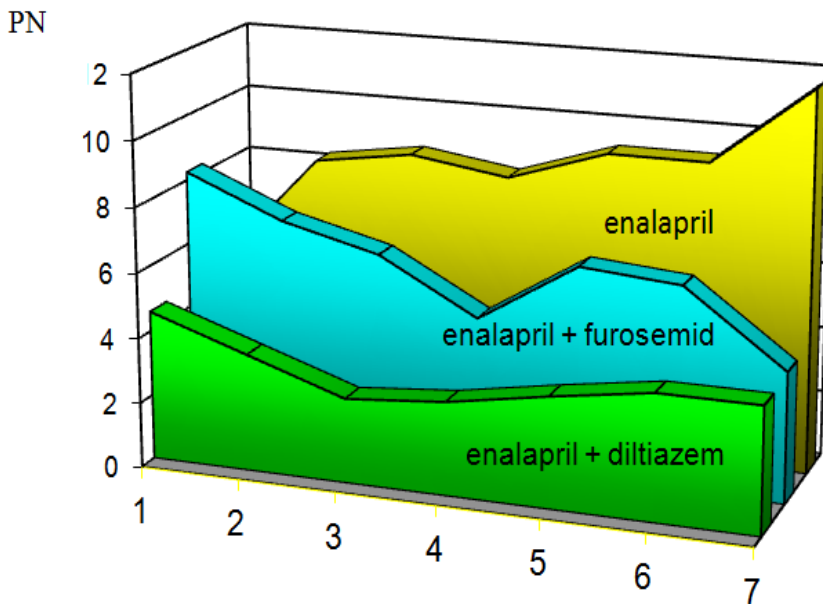
ronchiálnej oblasti dýchacích ciest (Obr. 1, Obr. 2).

Na základe uvedených výsledkov môžeme konštatovať, že inhalačne podaný furosemid by mohol byť potenciálnou látkou, ktorá by sa mohla uplatniť v minimalizácii respiračných nežiaducich účinkov pozorovaných po podaní inhibítorov ACE (Fraňová, 2001).

Z ďalších farmakologických skupín látok, ktoré by sa mohli uplatniť na zníženie respiračných nežiaducich účinkov ACE-inhibítorov sme sa zamerali na skupinu antagonistov napäťovo-riadených kalciových kanálov typu L. Táto voľba vychádzala z toho, že blokátory kalciových kanálov sú v liečbe kardiovaskulárnych ochorení primárnou antihypertenzívne pôsobiacou farmakologickou skupinou, ktorá sa často kombinuje s inhibítormi ACE. Uvedená kombinácia je podložená synergickými hemodynamickými profilmi. ACE-inhibítory blokujú transformáciu angiotenzínu I na angiotenzín II a inhibujú degradáciu bradykinínu. Bradykinín stimuluje tvorbu NO a syntézu prostacyklínu. Antagonisti kalciových kanálov inhibujú účinok angiotenzínu I a endotelínu I na úrovni

vaskulárnych hladkých svalov, redukciov vstupu vápnika a facilitáciu vazodilatačného efektu NO. Kombinácia ACE-inhibítorov s antagonistami Ca^{2+} -kanálov okrem pozitívnych hemodynamických, antiproliferatívnych, antitrombotických

a antiaterogénnych vlastností, umožňuje zníženie dávky uvedených antihypertenzív a tým znižuje pravdepodobnosť výskytu nežiaducich účinkov (Ruschitzka et al., 2005).



Obr. 2 Provanie počtu nárazov (PN) mechanicky vyvolaného kašľa z laryngofaryngálnej oblasti dýchacích ciest pred podaním farmaka (Norma) a po 15 dňovom podávaní enalaprilu, a kombinácie enalaprilu s diltiazemom, enalaprilu s furosemidom.

Pri ovplyvnení kašľového reflexu sledovaného počas 15-dňového simultánneho podávania enalaprilu s diltiazemom sme zistili, že došlo k štatisticky významnému poklesu počtu nárazov kašľa (PN) hlavne z tracheobronchiálnej oblasti dýchacích ciest (Obr. 1).

Počet nárazov kašľa z laryngofaryngálnej oblasti v porovnaní s normou nebol štatisticky významne znížený, ale priebeh kašľovej odpovede nedosiahol zvýšenie pozorované po podaní samotného enalaprilu (Obr.1). Nami získaný výsledok považujeme za mimoriadne významný, nakoľko kombinovaná terapia zahrňujúca simultánne podávanie enalaprilu s diltiazemom by mohla čiastočne znížiť výskyt kašľa vyvolaného podávaním enalaprilu, pri zachovaní hemodynamickej aktivity (Fraňová a Nosáľová, 2004).

Ďalšou látkou, ktorá by mohla znížiť, alebo eliminovať kašeľ po ACE-inhibítoroch, je kromoglykát sodný. Kromoglykát sodný patrí do skupiny tzv. chromónov, využívajúcich sa v liečbe širokej škály alergických ochorení. Mechanizmus účinku kromoglykátu je založený na stabilizácii membrány mastocytov a následnej supresii uvoľňovania zápalových mediátorov a cytokínov (Sadeshi –Hashjin, 2002). Kromoglykát dosahuje uvedený efekt inhibíciou Cl^- kanálov mastocytov a znížením vodivosti Ca^{2+} iónov membrány mastocytov. Nemenej dôležitým účinkom kromoglykátu, ktorým by mohol ovplyvniť obranné reflexy dýchacích ciest je neselektívna inhibícia tachykíninových receptorov a stabilizácia C –vlákien (Hargreaves a Benson, 2005).

Podľa našich výsledkov 15-dňové podávanie enalaprilu s inhalačnou aplikáciou kro-

moglykátu sodného v porovnaní s monoterapiou enalaprilom dosiahlo presvedčivé zníženie počtu nárazov mechanicky vyvolávaného kašľa len z laryngofaryngálnej oblasti dýchacích ciest. Počet nárazov kašľa z tracheobronchiálnej oblasti, v porovnaní s podávaním samotného enalaprilu, nebol kombinovanou liečbou enalaprilu s kromoglykátom sigifikantne ovplyvnený. Opäť sa potvrdila rôzna ovplyvniteľnosť kašľa z laryngofaryngálnej a tracheobronchiálnej oblasti dýchacích ciest. Príčinou môžu byť rozdiely v zastúpení kašľových receptorov v laryngu a trachee.

Záverom je možné konštatovať, že chronický, dráždivý kašeľ je častým sprievodným javom vyskytujúcim sa počas liečby inhibítormi ACE. Výsledky našich experimentov však potvrdili, že je možné tento negatívny efekt eliminovať farmakologickým zásahom a tým prispieť k benefitu liečby inhibítormi ACE. Na základe dosiahnutých výsledkov charakterizujúcich potenciú jednotlivých látok minimalizovať nežiaduce účinky enalaprilu v dýchacom systéme je možné zostaviť poradie: inhalačne furosemid > diltiazem > inhalačne kromoglykát.

Práca bola realizovaná za podpory „Centra experimentálnej a klinickej respirológie II“ spolu-financované z EÚ zdrojov.

Zoznam použitej literatúry

1. Hargreaves MR, Benson MK. Inhaled sodium cromoglycate in angiotensin-converting enzyme inhibitor cough. *Lancet* 1995; 345: 13 – 16.
2. Fraňová S, Nosáľová G. ACE-inhibitors and defence reflexes of the airways. *Acta Physiologica Hungarica* 1999; 85: 359-366.
3. Fraňová S. The influence of inhaled furosemide on adverse affects of ACE-inhibitors in airways. *Bratislavské lekárske listy* 2001; 102: 309-313.
4. Fraňová S, Nosáľová G. Antitussive effect of diltiazem in experimental Conditions. *Bratislavské lekárske listy* 2004; 105: 203-206.
5. Fraňová S, Nosáľová G, Antošová M, Nosáľ S. Enalapril and diltiazem Co-administration and respiratory side effects of enalapril. *Physiological Research* 2005, 54: 515-520.
6. Chan KKY, Ing AJ, Laks L, Cossa G, Rogers P, Birring SS. Chronic cough in patients with sleep-disordered breathing. *Eur Respir J* 2010; 35: 368 - 372.
7. Kastelik JA, Aziz I, Ojoo J C., Thompson RH, Redington AE, Morice AH. Investigation and management of chronic cough using a probability-based algorithm *Eur Respir J* 2005; 235 – 243.
8. Korpáš J, Paintal S, Anand A et al. Cough: from lab to clinic. New Delhi: Ane Books India 2006; 1st ed: 348 p.
9. Malini PL, Strocchi E, Zanardi M, Milani M, Ambrosioni E. Thromboxane antagonism and cough induced by angiotensin converting - enzyme inhibitor. *Lancet* 1997; 350: 15 – 17.
10. Morice AH and committee members. The diagnosis and management of chronic cough. *Eur Respir J* 2004; 24: 481 - 492.
11. Nakagawa NK, Donato-Júnior F, Kondo CS, King M, Auler-Júnior JOC, Saldiva PHN, Lorenzi-Filho G. Effects of acute hypovolaemia by furosemide on tracheal transepithelial potential difference and mucus in dogs. *Eur Respir J* 2004; 24: 805 - 810.
12. Nicholls GM, Gilchrist NL. Cough with ACE Inhibitors: A Bigger Problem in Some Racial Groups? *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2005; 19: 173–175.
13. Riccio MM, Myers AC, Udem BJ. Immunomodulation of afferent neurons in guinea pig isolated airways. *J Physiol* 1996; 491: 499 – 501.
14. Ruschitzka FT, Noll G, Luscher TF. Combination of ACE inhibitors and calcium antagonists: a logical approach. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31 Suppl. 2: S5 – 16.
15. Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP, Henricks PAJ, Folkerts G. Sodium cromoglycate and doxantrazole are oxygen radical scavengers. *Eur Respir J* 2002; 20: 867 - 872.

Antidepressíva a štrukturálne zmeny v mozgu sprevádzajúce depresiu

Igor Hrtánek^{1,2}, Igor Ondrejka², Gabriela Nosáľová¹

¹Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

²Psychiatrická klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK a Univerzitná nemocnica Martin

e-mail: hrtanek@ifmed.uniba.sk

V posledných desaťročiach sa neurobiologický výskum čoraz intenzívnejšie venuje hľadaniu štrukturálneho alebo funkčného vzťahu medzi depresiou a mozgovou dysfunkciou. Toto hľadanie vychádza z uznávanej paradigmy, na základe ktorej sa depresia považuje za ochorenie mozgu (1). Samozrejme, že sa v prípade primárnej depresie nejedná o hrubé organické poškodenie mozgu, ale o jemnú, diskretnú, klinicky ťažko detegovateľnú poruchu štruktúry či funkcie mozgu. Napriek intenzívnym snahám neurovedcov o nájdenie optimálneho opisu vzťahu medzi depresiou a zmenami na mozgu, presná kauzalita a podrobný popis štrukturálnych alebo funkčných porúch mozgu, ktoré by mohli viesť k manifestácii depresie doposiaľ nejestvuje. Existuje celý rad hypotéz, objasňujúcich depresiu a jej prejavy. Výskyt viacerých hypotéz naznačuje, že depresia nie je ochorenie, ktoré by sa dalo uchopiť pomocou jednej vysvetľujúcej teórie. Každá hypotéza, ktorá si nárokuje objasniť vznik depresívnej epizódy, sa pokúša vysvetliť toto ochorenie na základe určitej špecifickej neurobiologickej paradigmy, v súlade s Kuhnovým nazeraním na vedu ako na súboj hypotéz, z ktorých každá je platná v určitom ohraničenom myšlienkovom modeli (2). Depresia z tohto pohľadu sa na prvý pohľad javí ako ochorenie, ku ktorému vedú rôzne patomechanizmy, ústiace do podobného konzistentného obrazu. Jedno však majú tieto hypotézy spoločné. Ide o nazeranie na depresiu ako na duševné ochorenie, pri ktorom dochádza k narušeniu prenosu signálu

v CNS a to predovšetkým na úrovni chemických synáps (3). Kľúčovú úlohu v týchto procesoch hrá G-proteín, ktorý slúži ako transdukčný prvok, ktorý prenáša signál na efektorový systém (iónový kanál alebo enzýmový mechanizmus). Porucha prenosu signálu, vedie k dlhodobému ovplyvneniu neurónovej aktivity v určitých oblastiach mozgu, zodpovedných za vznik pocitov typických pre depresiu. V zásade môže byť porucha reprezentovaná narušením dostupnosti neurotransmitterov, receptorov, prenášačov ako aj vnútrobunkových procesov súvisiacich s prenosom nervového signálu. Z pohľadu neurochemických hypotéz najväčšia pozornosť je venovaná serotonínovému prenášaču (3). Ten je zodpovedný za prenos serotonínu do vnútra bunky. Okrem toho aj zmeny v dostupnosti ďalších neurotransmitterov, ako sú noradrenalín a dopamín, sa tiež považujú za významný faktor sprevádzajúci vznik a liečbu porúch nálady. V poslednom období sa však ťažisko výskumu patogenézy depresie presúva čoraz viac k snahám zachytiť okrem zmien v neurotransmisii aj zmeny v štruktúre jednotlivých mozgových štruktúrach.

Štrukturálne zmeny na mozgu pri depresii

Výsledok volumetrických meraní naznačuje, že pri depresii sa redukuje najmä objem v regionálnych oblastiach CNS, sprevádzaný znížením počtu buniek alebo ich objemu. Vysvetlenie takejto zmeny nie je jednoduché. Súčasné hypotézy hovoria o troch možných príčinách:

- neurovývojové abnormality,

- progresia ochorenia mozgu, zahrňujúca stratu, prípadne atrofiu glie a neurónov,
- následok biochemických zmien (napr. v hladine glukokortikoidov).

Objemové zmeny v regionálnych oblastiach CNS môžu pomôcť aj pri riešení otázky, čo stojí za depresívnou symptomatológiou. V zásade sa vysvetlenie depresívnej symptomatológie ponúka na základe narušenia normálnej funkcie neurálnych okruhov v mozgu, do ktorých sú zapojené hipokampus a frontálna kôra ako aj ďalšie časti mozgu (ncl. accumbens, amygdala a hypotalamus). Neokortex a hipokampus sú s najväčšou pravdepodobnosťou zodpovedné za kognitívne aspekty depresie. Striatum a amygdala sa podieľajú na emočných prejavoch, hypotalamus hrá zase úlohu v rozvoji neurovegetatívnych symptómov depresie (4). Poukazuje na to, ako z jednotlivých „kúskov“ vzniká homogénna „mozaika“ depresívnej symptomatiky. Okrem toho to nasvedčuje, že depresia je ochorenie so zložitým neurobiologickým pozadím, ktoré nemožno zjednodušovať, na jednotnú, celostnú a všetko vysvetľujúcu patofyziologickú hypotézu.

Vznik depresie sa dáva aj do kauzálneho súvisu so stresom. Biochemické vysvetlenie vzniku depresie pri strese je vysvetľované aktiváciou osi hypotalamus - hypofýza – nadobličky (HHN). Na túto skutočnosť upozornil Board (5) už pred viac ako 50 rokmi. Akútny stres a aktivácia osy hypotalamus–hypofýza–nadobličky (HHN) zvyšuje koncentráciu určitých neurosteroidov v CNS, ktoré podporujú syntézu kortikoliberínu (CRF) a funkciu GABA_A receptorov. To v konečnom dôsledku spôsobuje atrofiu hipokampálnych neurónov, na ktorú má vplyv aj vysoká koncentrácia glukokortikoidov ako aj glutamátu. Glukokortikoidy a glutamát totižto redukovujú bunkovú odolnosť a zvyšujú citlivosť neurónov v hipokampe na negatívne vplyvy, čím je

narušená hipokampálna neurogenéza. Neuróny hypotalamu uvoľňujú pri depresii CRF, ktorý sa dostáva krvnou cestou do adenohipofýzy a stimuluje uvoľňovanie ACTH. ACTH stimuluje uvoľňovanie glukokortikoidov (najmä kortizolu a kortikosterónu) z kôry nadobličiek (6). Kortizol pôsobí na neuróny hipokampu toxicky, čo sa prejavuje ich atrofiou. U depresívnych pacientov je narušená os HHN, v dôsledku čoho je vyradená spätná väzba vyššej koncentrácie ACTH a kortizolu na kôru nadobličky (4). Aktivuje sa tzv. bludný kruh. Koncentrácia kortizolu teda neúmerne stúpa. Štúdia Parienteho a Lightmana (7) dokázala, že zmeny v regulácii osi HHN v podmienkach chronického stresu alebo veľkej depresívnej poruchy sa prejavujú aj v zmenenej koncentracii kortizolu v periférnej krvi a v slinách. Rubinow ešte v roku 1984 naopak prezentoval pozitívnu koreláciu medzi hladinou voľného kortizolu v moči a závažnosťou kognitívneho deficitu (8). V inej štúdii sa pri depresii preukázala hyperkortizolémia ako aj hypoaktivita glukokortikoidných receptorov nielen v limbickom systéme, ale aj v imunitných bunkách, čo sa prejavilo hypersekréciou prozápalových cytokínov u pacientov s depresiou (9). Tieto výskumy teda Boardovu hypotézu jednoznačne potvrdzujú.

Novšie hypotézy vplyvu antidepresív

Najnovšie výskumy študujú vnútrobunkové procesy a ich patológiu, ktorá vyúsťuje do narušenia štruktúrálnej plasticity a bunkovej odolnosti mozgových buniek. Podľa Dumanovej neurotrofnej hypotézy (10) dochádza pod vplyvom stresu u depresívnych pacientov k atrofii neurónov alebo k bunkovej smrti. Napriek tomu, že v súčasnosti detailné mechanizmy nie sú plne objasnené, predpokladá sa, že dôležitú úlohu zohrávajú signálne transdukčné cesty pre cAMP a neurotrofne faktory. Pozoruhodné je, že sa jedná o rovnaké

cesty, aké zohrávajú úlohu v bunkových modeloch plasticity neurónov. Z toho vyplýva, že atrofia neurónov a ich smrť môže byť výsledkom narušenia mechanizmov podmieňujúcich neuronálnu plasticitu.

Podľa Dumanovej teórie dochádza okrem neurotrofie aj k významnej proliferácii a maturácii neurónov v určitých oblastiach dospelého mozgu, vrátane hipokampu (10). Neurogenéza je extrémne dynamickým procesom a má vplyv na učenie a pamäť, ktoré sú pri depresii narušené. A práve liečba určitými psychofarmakami iniciuje neurogenézu, čo sa prakticky využíva pri terapii depresie. Existujú dôkazy, že SSRI antidepresíva, TCA, IMAO, tiapentín a lithium stimulujú neurogenézu rovnako ako ECT a repetitívna transkraniálna magnetická stimulácia. Ako uvádza Manji et al. (11) Dumanova teória poskytuje úplne nový pohľad na mechanizmy účinku antidepresív. Podľa uvedených autorov prostredníctvom cAMP dochádza k zvýšenej expresii a funkcii transkripčného faktora CREB, čo vedie k up-regulácii špecifických cieľových génov, vrátane génu pre neurotrofný faktor BDNF. BDNF patrí medzi mozgové rastové faktory, ktoré sú potrebné nielen pre rozvoj a diferenciáciu mnohých neurónov vo vývoji mozgu, ale aj na udržiavanie a prežitie neurónov v dospelom mozgu (9). BDNF podporuje rast serotonergných a noradrenergických vlákien a chráni ich pred neurotoxickým vplyvom kortikosteroidov (12). Manji et al. (11) uvádzajú zvýšenú koncentráciu BDNF a jeho receptora TrkB v hipokampe pacientov, ktorí užívali antidepresíva alebo prekonalí elektrokonvulzívnu terapiu. Dnes už vieme, že nie je vylúčená expresia BDNF aj pri transkraniálnej magnetickej stimulácii. Ako však celý proces ochranného pôsobenia antidepresív funguje?

Chronické podávanie antidepresív ako aj ECT zvyšuje expresiu BDNF v hipokampe a v kortikálnych neurónoch

a môžu tak brániť stresom indukovanému zníženiu produkcie BDNF. Tento faktor pôsobí ako antagonista NMDA receptorov. NMDA receptor je zodpovedný za zvýšenú dostupnosť glutamátu. Glutamát otvára kalciové kanály, vďaka čomu dochádza k intracelulárnej autolýze, ktorá sa v konečnom dôsledku prejaví na volumetrickej zmene hipokampu. Zmenu objemu hipokampu vidieť hlavne v jeho apikálnej oblasti, inervovanej gabaergnými vláknami z gyrus dentatus (13). BDNF ako antagonista NMDA receptorov dokáže neurotoxickú kaskádu blokať, vďaka čomu je centrom záujmu neurotrofnej hypotézy. Jeho úloha je zrejme kľúčová, o čom svedčí nález zníženej expresie BDNF a jeho receptora TrkB v hipokampe depresívnych suicidujúcich osôb. BDNF však nemá vplyv len na hipokampus. V poslednej dobe sa študuje aj ako ochranný faktor amygdaly pred toxickým vplyvom glukokortikoidov (14).

Naznačená biochemická kaskáda by nebola úplná, pokiaľ by sme neuviedli napojenie Dumanovej hypotézy na receptorové a neurotransmiterové hypotézy. Terapeutický efekt moderných antidepresív totiž spočíva vo zvýšení funkcie serotonergného a noradrenergného systému. A práve zmeny v týchto systémoch spôsobujú zvýšenie aktivity transkripčného faktora CREB, čím dôjde k expresii neutrofinu BDNF a jeho receptora TrkB, čo v konečnom dôsledku vedie k zvýšenej plasticite neurónov a k obnove ich bunkových funkcií (15). Duman tak podal excellentné vysvetlenie účinkovania antidepresív a ich ochranný vplyv na neuróny v CNS. Zároveň naznačil aj akým smerom sa má uberať štúdium procesov atrofie niektorých mozgových štruktúr u pacientov s depresiou.

Z Dumanovej hypotézy vyplýva, že za procesmi vedúcimi k atrofii neurónov sa skrývajú deje ako chronický stres, dlhodobé zvýšenie hladín glukokortikoidov, hy-

poglykémia, ischémia, neurotoxíny ako aj niektoré vírusové infekcie. Podobne ako pri ochrannom pôsobení antidepresív, aj pri procesoch atrofie neurónov hrá kľúčovú úlohu BDNF. Expresia BDNF je v stresových situáciách znížená, čo dokázal výskum vplyvu imobilizačného stresu na krysy hipokampus (9). S veľkou pravdepodobnosťou pôsobí podobne, ak nie rovnako, psychosociálny stres na ľudí (12). A dodajme, že rovnaký efekt malo dlhodobé podávanie kortizolu, ktoré sa prejavilo atrofiou či dokonca smrťou vulnerabilných neurónov v hipokampe, hlavne v oblasti C3.

Dumanova hypotéza má zásadný vplyv na ponímanie antidepresívnej liečby. Od prístupov k psychofarmakám ako liekom, ktoré zasahujú len na úrovni neurotransmiterov, receptorov a membrán, k pohľadu na psychofarmaká, ktoré majú okrem tejto funkcie aj schopnosť modulovať proces plasticity neurónov a ovplyvnenie ich bunkových funkcií.

Na Dumanovu hypotézu nadviazala v roku 2002 neurogénna hypotéza. Tá podobne ako neurotrofná hypotéza znamenala úplne nový pohľad na depresiu, ktorú do určitej miery vnímala ako neurovývojovú poruchu dospelých. Depresia je podľa tejto teórie spojená so zníženou neurogenézou v hipokampe, pričom antidepresíva umožňujú túto neurogenézu stimulovať. Tu treba podotknúť, že pre formulovanie takejto hypotézy bolo potrebné zmeniť názor na vznik nových nervových buniek nakoľko sa ich vznik počas života človeka nepredpokladal (16). Až v roku 1998 sa objavili prvé správy o možnej neurogenéze v dospelom mozgu (17). Eriksson a spolupracovníci vtedy dokázali, že v ľudskom mozgu dochádza k bunkovej genéze a že si tento potenciál mozog udržuje po celý život. Zdroj týchto buniek je práve v oblasti gyrus dentatus hippocampi, pričom bunky z tejto oblasti sa môžu diferencovať s morfológickými a fenotypo-

vými charakteristikami neurónov. Gyrus dentatus hippocampi sa považuje za zatiaľ jedinú dokázanú lokalitu mozgu, v ktorej bola zaznamenaná neurogenéza granulórných buniek (12). V roku 2003 totiž publikovali Santarelli a spolupracovníci štúdiu, v ktorej popísali úlohu kmeňových buniek pri antidepresívnej terapii (18). Napriek príťažlivosti a elegantnosti neurogénnej hypotézy, nebolo kauzálne spojenie neurogenézy a depresie doposiaľ dostatočne preukázané. Väčšina vedcov zaoberajúca sa touto problematikou pripúšťa, že táto hypotéza prispieva k objasneniu hipokampálnych aspektov pri depresii, zároveň však dodáva, že nedostatočná hipokampálna neurogenéza v dospelosti sama o sebe zrejme nemôže vysvetliť depresiu. Vývoj však pokračoval ďalej a v roku 2003 bola formulovaná hypotéza bunkovej plasticity, ktorá spája neurotrofnú a neurogénnu hypotézu do tvrdenia, že depresia môže byť spôsobená narušenou bunkovou plasticitou, ktorá vedie k neprimeraným vzťahom medzi štruktúrou a funkciou. Neuroplasticita je definovaná ako schopnosť mozgovej kapacity modifikovať svoju štruktúru alebo funkciu ako odpoveď na učenie a poškodenie mozgu (16). Je to schopnosť organizmu získať informáciu a vytvoriť primerané odpovede pre rovnaké alebo príbuzné podnety aj v budúcnosti (19). Tento pojem je však zatiaľ veľmi menlivý a nejednoznačný, keďže zastrešuje zmeny od úrovne nervovej bunky a jej časti až po adaptačnú schopnosť organizmu ako celku (16).

Neuroplasticita je vysvetľovaná pomocou hypotézy, ktorá na neuróny v mozgu nazerá ako na súčasť dynamického procesu. Počas vnútromaternicového obdobia sa neuróny vyvíjajú z pluripotentných embryonálnych kmeňových buniek, neskôr sa diferencujú, vytvárajú synapsy a nakoniec odumierajú. Dôležité je zistenie, že nervové kmeňové bunky

zostávajú aj v dospelom mozgu človeka a sú potenciálnym zdrojom nových buniek (16). Tu je teda súvis medzi neurogénou hypotézou a plasticitou mozgu. Na plasticitu však treba nazerať aj z pohľadu vytvárania nových synáps a neustáleho prepojenia neuronálnej siete (16).

Je samozrejmé, že tak ako v prípade neurochemických hypotéz, ani táto hypotéza, ani Dumanova hypotéza nevystihujú depresiu ako ochorenie „en block“. Zaostrenie pozornosti na hipokampus a limbický systém ako aj výskum neurochemických a štrukturálnych zmien v týchto anatomických oblastiach mozgu umožňujú kvalitatívne nové nazeranie na toto komplikované ochorenie. Zároveň poukazujú na ďalšie doteraz málo prebádané aspekty antidepresívnej liečby, ktorej efekt podľa najnovších výskumov nie je len na úrovni biochemickej harmonizácie neurotransmisie, ale aj na štrukturálnych a objemových zmenách niektorých oblastí CNS.

Zoznam použitej literatúry

- Insel, T., Quirion, R.: Psychiatry as a Clinical Neuroscience Discipline. *Journal of the American Medical Association*. 2005; 17: 2221 – 2224.
- Kuhn, T.: *Struktura vědeckých revolucí*. Praha : Oikoymenth, 1997, ISBN 80-86005-54-2
- Dušek, K., Večeřová-Procházková, A.: *Diagnostika a terapie duševních poruch*. Praha, Grada, 2010, ISBN 978-80-247-1620-6, s. 402
- Videbach, P., Ravnkilde, B.: Hippocampal Volume and Depression : A Meta-Analysis of MRI Studies. *American Journal of Psychiatry*, 2004; 161: 1957-.
- Board, F.: Blood Levels of Adrenocortical and Thyroid Hormones in Acutely Disturbed Patients. *Psychosomatic medicine*, 1956; 18: 35-43.
- Hautzinger, M.: *Depresia*. Trenčín, 2000, ISBN 80-88952-05-0, s.34.
- Pariante, C.M., Lightman, S.L.: The HPA axis in major depression : classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*. 2008; 9: 464-468.
- Rubinov, D. a kol.: Cortisol hypersecretion and cognitive impairment in depression. *Archives of General Psychiatry*, 1984; 41: 280-.
- Hoschl, C., Libiger, J., Švestka, J.: *Psychiatrie*. Praha : Tigris, 2004, ISBN 80-900130-7-4, s.433.
- Duman, R.S, Heninger, G.R., Nestler, E.J.: A Molecular and Cellular Theory of Depression. : *Archives of General Psychiatry*.1997; 54: 597 – 606.
- Manji, H.K., a kol.: Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Molecular Psychiatry*, 2000; 5: 578 – 593.
- Hoschl, C.: Neurotrofni účinky antidepresiv. *Farmakoterapie*, 2005; 1: 223-.
- Hájek, T.: Poškození hipokampu glukokortikoidy – klíčový patogenetický faktor v psychiatrii ? *Psychiatrie*, 2001; 5: 25-.
- Hamilton, J.P., Siemer, M., Gotlib, I.H.: Amygdala volume in major depressive disorder : a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Molecular Psychiatry*, 2008; 13: 993 – 1000.
- O'Brien, J.T.: The glucocorticoid cascade hypothesis in man. Prolonged stress may cause permanent brain damage. *British journal of Psychiatry*. 1997; 170: 199-201.
- Kulišťák, P.: *Neuropsychiatrie*. Praha, Portál, 2003, ISBN 80-7178-554-7, s. 75.
- Eriksson, P.S a kol.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*. 1998; 4: 1313-1317.
- Santarelli L. a kol.: Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 2003; 301: 805 – 809.
- VAVRUŠOVÁ, Livia. Depresia – spúšťací faktor narušenia neuroplasticity ? In: *Psychiatrie pro praxi*. 2004, č. 1, s. 20

Chronické ochorenia a mukociliárny transport

Marta Jošková¹, Vladimíra Sadloňová¹, Dušan Koniar², Libor Hargaš²,
Miroslav Hrianka², Soňa Fraňová¹

¹ Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

² Katedra mechatroniky a elektroniky, Žilinská univerzita, Žilina

e-mail: joskova@jfmcd.uniba.sk

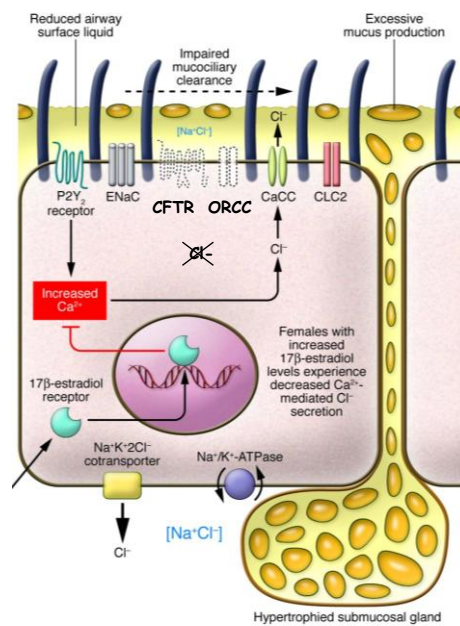
Dýchací systém je neustále exponovaný respiračným patogénom, alergénom a toxínom. Je to jeden z dôvodov, prečo si vyvinul účinný spôsob obrany, nazývaný mukociliárny transport (MCT). Účinnosť tohto obranného reflexu dýchacích ciest (DC) je závislá od koordinovanej činnosti ciliárnych buniek, ktoré dokážu svojím rytmickým kmitavým pohybom odstrániť z DC denne cca 10 ml hlienu. Energiu bunky získavajú z ATP mechanizmom, na ktorom participuje intracelulárny kalcium-kalmodulínový komplex (Korngraven a Priel, 1996). Funkčnosť ciliárneho aparátu môže byť ovplyvnená teplotou (Jorissen a Bessems, 1995), pH (Clary-Meinesz et al., 1998), viskoelastickými vlastnosťami a objemom hlienovej vrstvy, ako aj objemom tekutej vrstvy povrchu DC (airway surface liquid; ASL) (Tarran, 2004).

Dostatočná hydratácia povrchu DC je výsledkom vzájomnej činnosti amilorid-senzitívnych Na⁺ kanálov (ENaC), transmembranového regulátora vodivosti pre cystickú fibrózu (CFTR) a Ca²⁺ aktivovaných Cl⁻ kanálov (CaCC) (Gallietta et al., 2004; Mall, 2008). Narušením rovnováhy v dôsledku poruchy absorpcie Na⁺ a sekrécie Cl⁻ iónov dochádza k dehydratácii povrchu DC, ktorá je charakteristickou črtou chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOCHP) (Mall et al., 2008; Clunes et al., 2012) a cystickej fibrózy (CF) (Boucher, 2007).

Je dokázané, že cigaretový dym, ako jedna z príčin CHOCHP, moduláciou činnosti CFTR, poškodzuje sekréciu Cl⁻ ió-

nov. Nedostatočný objem ASL inhibuje funkciu cílií, čím zhoršuje odstraňovanie hlienu z DC, napomáha obštrukcii DC hlienom, vedie k metaplázii pohárikových buniek a uľahčuje vývoj neutrofilného zápalu s bakteriálnou kolonizáciou a emfyzémom pľúc. V konečnom dôsledku kolaps steny DC znižuje účinnosť mukociliárneho transportu a kašľa (Clunes et al., 2012).

CF je genetické ochorenie, ktoré je pravdepodobne spojené so zlyhaním lokálnej obrany DC. Niektoré štúdie potvrdili, že v priebehu tohto ochorenia baktérie ľahšie adherujú k epiteliálnym bunkám v dôsledku zvýšenej bunkovej expresie gangliozidu (asialoGM1) Saiman a Prince, 1993), zlyhaniu antimikróbnej funkcie (Ganz, 2002) alebo fagocytózy neutrofilov (Berger et al., 1989). Patofyziológia ochorenia je však výsledkom neschopnosti epitelu vylučovať Cl⁻ ióny a regulovať absorbciu Na⁺. Nedostatok periciliárnej tekutiny vedie ku akumulácii hyperviskózneho hlienu, ktorý sa nedá odstrániť MCT alebo kašľom. Perzistentná prítomnosť baktérií v DC a zápal sú príčinou remodelácie steny DC s hyperpláziou a metapláziou hlienotvorných žliazok, zmnožením bronchiálnej cirkulácie, bronchiektáziami a tvorbou parenchýmových cýst, ktoré môžu progredovať až do fibrózy pľúc (Boucher, 2007; Livraghi a Randell, 2007).



Obr. 1 Poškodenie regulácie hydratácie povrchu dýchacích ciest v patologických podmienkach cystickej fibrózy. V dôsledku neprítomnosti alebo poškodenia funkcie CFTR je znížená sekrécia Cl^- iónov a sekundárne zvýšená reabsorpcia Na^+ iónov v epitely dýchacích ciest. ENaC - amilorid-senzitívne Na^+ kanály; CFTR - transmembranový regulátor vodivosti pre cystickú fibrózu; CaCC, ORCC a CLC2 – chloridové kanály (upravené podľa Zeitlin, 2008).

Menej častým genetickým ochorením v porovnaní s CF je primárna ciliárna dyskinéza (PCD). Jej klinický obraz je veľmi rôznorodý. Kartagenerov syndróm je klinickým prejavom poškodenia respiračného traktu. V patofyziológii ochorenia zohráva dôležitú úlohu abnormálna funkcia motilných cilií. Funkčné zmeny sú spojené so zmenami frekvencie kmitania, smeru, sily a koordinácie pohybov cilií. V niektorých prípadoch ide o apláziu, kompletnú neprítomnosť cilií (Livraghi a Randell 2007). Veľká časť pacientov s PCD má v dôsledku mutácií niektorých génov poškodený proteín cilií dyneín, ktorý spoločne s mikrotubulmi vytvára funkčnú jednotku pohybu cilií (Mitchison et al., 2012).

Ciliárna dysfunkcia sa častejšie vyskytuje v súvislosti s expozíciou respiračného epitelu mikrobiálnym patogénom napr. *Pseudomonas aeruginosa* a *Haemophilus influenzae*, ktoré produkujú toxíny, poškodzujúce funkciu mukociliárneho aparátu. Navyše je pravdepodobné, že zápalové mediátory, dokázané u pacientov

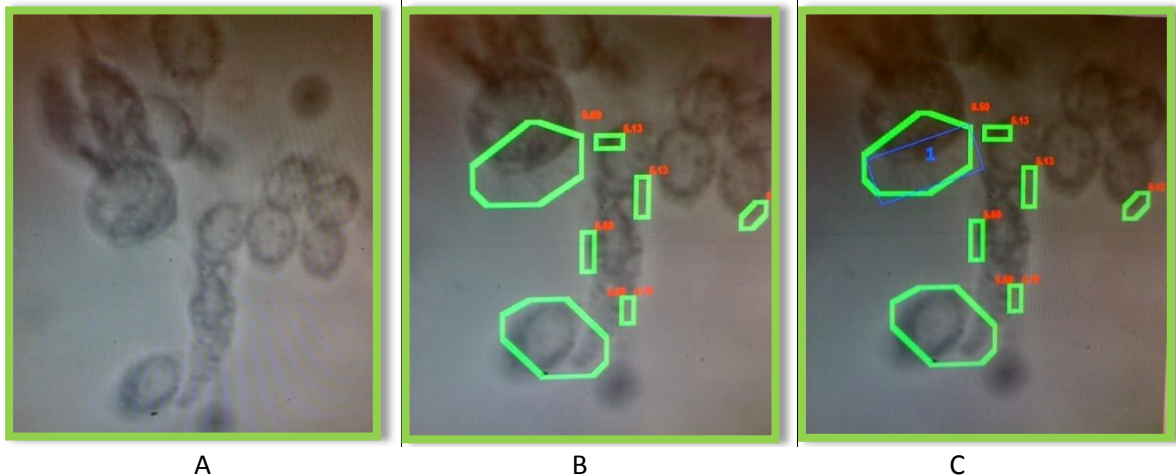
s chronic-kou rhinosinuitídou, sú príčinou sekundárneho poškodenia MCT (Gudis et al., 2012)

Ďalším chronickým ochorením, ktoré je spojené so zmenami MCT je bronchiálna astma. Ide o imunoalergické ochorenie, počas ktorého sa mení nielen kvantita, ale aj kvalita produkovaného hlienu. Charakteristickou črtou astmy je hypersekrecia hlienu v dôsledku 2,5- násobne zvýšeného počtu pohárikových buniek, nadmernej expresie génov pre glykoproteíny hlienu, degranulácie pohárikových buniek a zvýšenej bronchovaskulárnej permeability so zvýšením množstva plazmatických proteínov. Všetky spomenuté faktory spoločne s bunkovým detritom menia kvalitu hlienu, čím dochádza k jeho sťaženej expektorácii. Taktiež sa môžu spájať s poškodením funkcie cilií. Ciliárna dysfunkcia sprevádza stredne ťažký až ťažký stupeň astmy, kedy dochádza aj k abnormalitám v ultraštruktúre bronchiálneho epitelu, spojených s redukciou ciliárnych buniek, defektom mikrotubulov, poškodením mitochondrií a vakuolizáciou cytoplazmy

(Thomas et al., 2010). Hlien v DC je preto akumulovaný a je príčinou obštrukcie DC.

Keďže náš ústav má nové prístrojové vybavenie na sledovanie pohybu cílií v dýchacom systéme, zahájili sme sériu experimentov, venovaných spomenutej problematike, t.j. MCT. Zavádzanie nových

metodík do praxe je vždy spojené s množstvom problémov, ktoré je treba odstrániť, aby daná metodika bola naozaj optimálna. Softvér na monitoring a analýzu kinematiky cílií bol pripravený kolegami zo Žilinskej univerzity, my sme sa orientovali na jej praktickú časť.



Obr. 2 A. Mikroskopický obraz ciliárneho epitelu trachey zdravých morčiat (zväčšenie 600x); B. Analýza frekvencie kmitania cílií za fyziologických podmienok pomocou softvéra Ciliary analysis. Oblasti záujmu (ROI) sú vyznačené zelenou farbou, príslušná hodnota mediánu frekvencie kmitania je vyjadrená v Hz červenou farbou; C. Postanalýza frekvencie kmitania cílií za fyziologických podmienok pomocou softvéru Ciliary analysis. Manuálne označenie ROI, obsahujúcej funkčné cílie, modrou farbou.

V priebehu odberu biologických vzoriek z oblasti trachey experimentálnych zvierat sme sa snažili o zachovanie štandardných podmienok (teplota *in vitro* laboratória 20 - 24 °C, vlhkosť vzduchu 55 ± 10 %, teplota fyziologického roztoku a teplota podložného sklíčka 37,5 - 39 °C). Materiál, ster sliznice trachey, bol cytologickou kefkou nanášaný na podložné sklíčko, za účelom prípravy mikroskopického preparátu, vloženého do svetelného mikroskopu. Z každej vzorky bolo zaznamenaných 10 krátkych videosekvencií pomocou vysokorýchlostnej kamery Basler 540KC napojenej na počítač (obr. 2A). V priebehu vyhodnocovania experimentu sme pomocou softvéru Ciliary analysis získali tzv. oblasti záujmu (ROI). Výstupom každej ROI bola maximálna (max), minimálna (min), priemerná (mean) a najčastejšie sa vyskytujúca hodnota (median) frekvencie kmitania cílií. Pri konfrontácii výsledkov so

zodpovedajúcim videozáznamom sme však dospeli k záveru, že program, ktorým získame ROI, bude musieť byť ešte modifikovaný. V mnohých prípadoch sa stalo, že ROI neobsahovala miesta s prítomnosťou funkčných cílií (obr. 2B), alebo spomínané oblasti boli zbytočne veľké a obsahovali okrem cílií aj veľkú časť epitelu DC. Niekedy boli zaznamenané ROI obsahujúce pohyblivé krvné elementy. Tým mohli byť skreslené naše konečné výsledky. Nový program postanalýzy, v priebehu ktorého si mohol výskumný pracovník manuálne označiť ROI (obr. 2C), odstránil niektoré spomínané nedostatky. Každá postanalýza bola realizovaná po predchádzajúcej vizualizácii príslušného videozáznamu, a tak vypočítané hodnoty skutočne zodpovedali frekvencii kmitania funkčných cílií v získanom biologickom materiáli.

Naše získané výsledky budú základom pre budúce experimenty, venované

problematike MCT, čím rozšírime experimentálne možnosti nášho ústavu v oblasti sledovania obranných reflexov DC.

Práca bola podporená nasledovnými projektami: „Dobudovanie centra experimentálnej a klinickej respirológie II (CEKR II)“, „Meranie kinetiky cilií respiračného traktu“ a „Podpora rozvoja ľudských zdrojov s využitím najmodernejších postupov a foriem vzdelávania na JLF UK v Martine“ podporené EU a ESF.

Zoznam použitej literatúry

- Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG a Doring G. Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the Pseudomonas-infected lung in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1302–1313.
- Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *TRENDS in Molecular Medicine* 2007; 13: 231-240.
- Clary-Meinesz C, Mouroux J, Cosson J, Huitorel P, Blaive B. Influence of external pH on ciliary beat frequency in human bronchi and bronchioles. *Eur Respir J* 1998; 11: 330-333.
- Clunes LA, Davies CM, Coakley RD, Aleksandrov AA, Henderson AG, Zeman KL, Worthington EN, Gentzsch M, Kreda SM, Cholon D, Bennett WD, Riordan JR, Boucher RC, Tarran R. Cigarette smoke exposure induces CFTR internalization and insolubility, leading to airway surface liquid dehydration. *FASEB* 2012; 26. doi: 10.1096/fj.11-192377.
- Galietta LJV, Folli Ch, Caci E, Pedemonte N, Taddei A, Ravazzolo R, Zegarra M. Effect of inflammatory stimuli on airway ion transport. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 62-65.
- Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* 2002; 109: 693–697.
- Gudis D, Zhao K, Cohen NA. Acquired cilia dysfunction in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol & Allergy* 2012; 26: 1-6.
- Jorissen M, Bessems A. Influence of culture duration and ciliogenesis on the relationship between ciliary beat frequency and temperature in nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995; 252: 451-454.
- Kornegreen A, Priel Z. Purinergic stimulation of rabbit ciliated airway epithelia: control by multiple calcium sources. *J Physiol* 1996; 497: 53-66.
- Livraghi A, Randell SH. Cystic fibrosis and other respiratory diseases of impaired mucus clearance. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 116-129.
- Mall MA, Harkema JR, Trojanek JB, Treis D, Livraghi A, Schubert S, Zhou Z, Kreda SM, Tilley SL, Hudson EJ, O'Neal WK, Boucher RC. Development of chronic bronchitis and emphysema in β -epithelial Na⁺ channel-overexpressing mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 730-742.
- Mall MA. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2008; 21: 13-24.
- Mitchison HM, Schmidts M, Loges NT, Freshour J, Dritsoula A, Hirst RA, O'Callaghan C, Blau H, Dabbagh AIM, Olbrich H, Beales PL, Yagi T, Mussaffi H, Chung EM, Omran H, Mitchell DR. Mutations in axonemal dynein assembly factor DNAAF3 cause primary ciliary dyskinesia. *Nat Gen* 2012 Mar 4;44(4):381-9, S1-2. doi: 10.1038/ng.1106.
- Saiman L a Prince A. Pseudomonas aeruginosa pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 1875–1880.
- Tarran R. Regulation of airway surface liquid volume and mucus transport by active ion transport. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 42-46.
- Thomas B, Rutman A, Hirst RA, Halder P, Wardlaw AJ, Bankart J, Brightling ChE, O'Callaghan Ch. Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 126: 722-729.
- Zeitlin PL. Cystic fibrosis and estrogens: a perfect storm. *J Clin Invest.* 2008; 118: 3841-3844.

Flavonoidy a chalkóny ako potenciálne inhibítory nádorovej angiogenézy

Ján Mojžiš¹, Gabriela Mojžišová², Lenka Varinská¹

¹Ústav farmakológie, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

²Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

e-mail: jan.mojzis@upjs.sk

Základom prežitia a zabezpečenia fyziologickej funkcie buniek v organizme cicavcov je ich adekvátna saturácia kyslíkom a výživnými látkami. Z toho dôvodu sú lokalizované vo vzdialenosti maximálne 100-200 μm od kapilár, čo je vzdialenosť, do ktorej je schopný kyslík difundovať. Pre vyššie organizmy je teda nevyhnutné vytvárať nové krvné zásobenie procesmi známymi ako vaskulogenéza (tvorba ciev z prekursorových buniek) alebo angiogenéza (tvorba ciev z preexistujúcich ciev) (Axnick and Lammert 2012). Tvorba ciev je proces primárne sa vyskytujúci počas intrauterinného vývoja plodu a je limitovaný počas postnatálneho života, kedy, s výnimkou ženského reprodukčného systému, je väčšinou spojený s patologickými procesmi, ktoré môžu byť žiaduce (hojenie rán, srdcová ischemia) alebo nežiaduce (diabetická retinopatia, rast nádorov) (Potente et al. 2011).

Angiogenéza je stupňovitý proces ovplyvňovaný početnými pozitívnymi a negatívnymi regulátormi angiogenézy, pričom za fyziologických podmienok je ovplyvňovaný hlavne negatívnymi regulátormi. V prípade porušenia jemnej rovnováhy medzi pozitívnymi a negatívnymi regulátormi angiogenézy môže dôjsť buď k zníženej alebo zvýšenej tvorbe nových ciev.

V poslednej dobe narastá počet prác zaoberajúcich sa vzťahom angiogenéza-rast nádorov-metastázovanie. Pretože inhibícia angiogenézy sa javí ako perspektívny smer v terapii/prevencii nádorov, výskum v tejto oblasti sa nevyhol ani prí-

rodným látkam vrátane flavonoidov a chalkónov.

Základné kroky angiogenézy

Ako už bolo povedané, neovaskularizácia je zložitý proces, ktorý je ovplyvňovaný mnohými faktormi a nie je cieľom tejto práce sa zapodievať detailami, ktoré častokrát ešte nie sú celkom jasné. Z tohto dôvodu sú v nasledujúcej časti spomenuté iba základné kroky vedúce k tvorbe nových ciev. Nádorové bunky prijímajú kyslík a výživu pasívnou difúziou. Pri dosiahnutí veľkosti asi 2 mm^3 tento spôsob výživy začína byť nedostatočný a nádor si potrebuje vytvoriť kapilárnu sieť, aby mohol pokračovať v raste. Proces angiogenézy začína degradáciou extracelulárnej matrice (resp. bazálnej membrány) proteázami, ktoré sú sekretované aktivovanými endoteliálnymi bunkami. Endotelové bunky proliferujú, čo vedie k vytváraniu výbežkov endoteliálnych ciev do okolitého tkaniva. Neskôr sa endotelové bunky formujú a vytvárajú nové rúrkovité štruktúry, na ktoré pevne nasadá novovytvorená bazálna membrána. V prípade normálnej aj patologickej angiogenézy hlavným spúšťačom tohoto procesu je hypoxia. Táto indukuje expresiu vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF) a jeho receptorov cez expresiu tzv. hypoxiou-indukovateľného faktora (HIF), ktorý kontroluje expresiu niektorých génov ako napr. génov VEGF, syntázy oxidu dusnatého (NOS), doštičkového rastového faktora (PDGF), angiopoietínu 2 a iných (Carmeliet and Jain 2011). VEGF a príbuzné molekuly

služi ako endoteliotropný induktor angiogenézy. Aktivácia angiogenézy cez špecifické pleiotropné angiogénne faktory vedie ku komplexnej aktivácii endotelových buniek vrátane aktivácie autokrinného rastového regulačného systému, expresie cytokínov a receptorov pre rastové faktory, tvorby adhézných molekúl. Na rozdiel od fyziologickej angiogenézy, nádorová angiogenéza je takmer vždy spojená so zápalovou reakciou a zápalové bunky ako napr. monocyty, makrofágy, trombocyty, mastocyty uvoľňujú veľké množstvo angiogénnych faktorov, ktoré sa môžu zúčastniť v procese angiogenézy (Carmi et al. 2009).

Flavonoidy

Mechanizmus antiproliferatívneho resp. protinádorového účinku flavonoidov je relatívne známy a okrem priameho cytotoxického účinku zahŕňa aj moduláciu širokého spektra transdukčných systémov, ktoré v konečnom dôsledku vedú k inhibícii rastu nádorovej bunky/nádoru. Jednou z posledných oblastí, na ktoré sa zamerá výskum potenciálne protinádorových vlastností flavonoidov je ich potenciálne antiangiogénny účinok.

Jako už bolo spomínané, VEGF je jeden zo základných pro-angiogénnych faktorov. Liu et al. (2005) vo svojej práci zistili, že apigenín, jeden z často sa vyskytujúcich prírodných flavonoidov inhiboval transkripciu VEGF u buniek pľúcneho nádoru. Inhibícia aktivácie transkripcie VEGF bola sprostredkovaná zníženou expresiou HIF-1 α , ktorý zohráva esenciálnu úlohu v počiatkových krokoch neovaskularizácie. Autori tieto výsledky potvrdili aj v *in vivo* experimentoch, kde u myšiek po aplikácii apigenínu došlo k zníženiu tvorby ciev. Apigenín inhiboval tvorbu VEGF a HIF-1 α aj u buniek izolovaných z nádoru ovárií. Taktiež inhiboval expresiu obidvoch faktorov cez PI3K/AKT/p70S6K1 a HDM2/p53 transdukčný systém. Jedným z ďalších me-

chanizmov, ktorým apigenín môže inhibovať tvorbu nových ciev je supresia aktivácie nukleárneho faktora kapaB (NF- κ B), ktorý reguluje expresiu antiapoptotických génov regulujúcich prežívanie buniek. Inhibícia aktivácie NF- κ B viedla k zníženej expresii NF- κ B-regulovaných génov, z ktorých sa niektoré podieľajú na angiogenéze (VEGF, matrixová metaloproteináza-MMP, NO-syntáza) (Shukla and Gupta, 2004).

Flavopiridol, syntetický flavonoid, výrazný inhibítor cyklín-dependentných kináz je v súčasnosti v klinickom skúšaní ako nádejná protinádorová látka. Okrem priameho účinku na nádorové bunky bolo zistené, že flavopiridol aj inhibuje angiogenézu. Newcomb et al. (2005) preukázali schopnosť flavopiridolu inhibovať expresiu VEGF a HIF-1 α u gliómových buniek. Flavopiridol zároveň inhiboval migráciu nádorových buniek. Tieto *in vitro* údaje korelovali aj s redukciovou vaskularitou u myší s gliómami, ktorým bol aplikovaný flavopiridol (Gupta et al. 2010). Humánne neuroblastómy produkujú angiogénne peptidy a zvýšená angiogenéza koreluje s ich agresívnym správaním sa, so schopnosťou metastázovať a so slabou klinickou odpoveďou. Rapella et al. (2002) študovali schopnosť flavopiridolu inhibovať expresiu VEGF indukovanú hypoxiou u buniek neuroblastómu a zistili výraznú schopnosť flavopiridolu znížiť expresiu VEGF, čo by mohlo mať význam pri použití v klinickej praxi.

Protinádorové účinky zeleného čaju (ZČ) a jeho účinných látok (katechíny) bol preukázaný v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach. V posledných rokoch sa výskum zaoberajúci týmto populárnym nápojom zamerá aj na štúdium schopnosti ZČ zasahovať do procesu angiogenézy. jeden z možných mechanizmov ako katechíny propagujú svoj antiangiogénny účinok je ich schopnosť zabrániť tvorbe komplexu VEGF s jeho receptorom a tak zabrániť

signálnej ceste tohto proangiogénneho faktora. Aplikácia epigalokatechín galátu (EGCG) viedla už k spomínanému efektu, následkom čoho bola inhibovaná fosfatidylinositol-3 kináza (PI3-kináza) ako aj aktivita NF- κ B a inhibovaná celá signálna cesta, čo malo za následok zásah do procesu angiogenézy (Rodriquez et al. 2006). Schopnosť katechínov inhibovať angiogénézu študovali aj početní ďalší autori. Oak a kol. (2005) zistili, že extrakt ZČ inhiboval základné kroky angiogenézy ako napr. migráciu a proliferáciu endotelových buniek ale aj expresiu niektorých angiogénnych faktorov (MMP-2, VEGF). Antiangiogénne účinky boli zistené aj *in vivo*, keď EGCG inhiboval rast nádorov pankreasu u myší (Shankar et al. 2012).

Protinádorové účinky katechínov zaujali do tej miery, že sa začala študovať aj možnosť ich chemickej modifikácie so zámerom zvýšenia ich biologického účinku. Matsubara et al. (2006) sledovali vplyv konjugácie s mastnými kyselinami na účinnok katechínov. Acyl-katechín a katechín konjugovaný s kyselinou steárovou inhibovali DNA polymerázu a zároveň aj proces angiogenézy. O preventívnom účinku ZČ, jeho mechanizmoch účinku ako aj o význame pre ľudské zdravie širšie pojednáva vo svojej práci Yang a spoluautori (2009).

V poslednej dobe je venovaná veľká pozornosť sóji a jej potenciálne protinádorovým účinkom. Bolo dokázané, že v tomto smere zohráva najvýznamnejšiu úlohu izoflavonoid genisteín. Okrem už vyššie spomínaného protinádorového efektu bolo preukázané, že časť týchto účinkov môže byť sprostredkovaná schopnosťou inhibovať neovaskularizáciu.

Su a spoluautori (2005) študovali vplyv genisteínu a ďalších izoflavonoidov zo sóje na pro- a antiangiogénne faktory. Zistili, že genisteín v závislosti na dávke znižoval expresiu/uvoľňovanie VEGF, MMP-2 a MMP-9, trombocytami uvoľňo-

vaného rastového faktora. Na druhej strane zvyšoval aktivitu antiangiogénnych faktorov ako napr. endostatín, angiostatín, trombospondín-1. tento účinok preukázali *in vitro* ako aj *in vivo* podmienkach. Účinok genisteínu však zahŕňa aj ďalšie mechanizmy. Ako sa domnievajú Buchler et al. (2004), antiangiogénny účinok genisteínu by mohol byť sprostredkovaný inhibíciou tvorby hypoxiou-indukovaného HIF, ktorý je hlavným regulátorom aktivity VEGF. Vo svojej práci sledovali vplyv genisteínu na sekréciu VEGF za hypoxických podmienok u buniek nádoru z pankreasu. Zistili, že genisteín v dávkovej závislosti inhiboval aktivitu HIF-1, čo viedlo k zníženej sekrécii VEGF.

Genisteín, ako bolo zistené, priamo ovplyvňuje transkripciu niektorých génov, ktoré majú súvis s nádorovou angiogénézou. U buniek z nádora prostaty bolo zistené, že genisteín znižuje transkripciu génov pre MMP-9, VEGF, TGF a iných, čím zasahuje do nádorovej angiogenézy ale aj do metastázovania a invazivity nádoru. Na základe týchto výsledkov sa autori práce domnievajú, že genisteín môže zohrávať vážnu úlohu v prevencii nádorov prostaty (Li a Sarkar, 2002). Najnovšie výskumy poukázali na ďalšie možné mechanizmy antiangiogénneho účinku genisteínu. Genisteín indukoval apoptózu endotelialných buniek stimulovaných VEGF-om a taktiež inhiboval produkciu a aktivitu MMP. Zároveň inhiboval aktiváciu niektorých signálnych dráh (JNK, MAPK) ako aj aktiváciu proteín kináz (Yu et al. 2010).

Štúdium potenciálneho antiangiogénneho účinku sa samozrejme týkalo aj celého spektra ďalších flavonoidov. Pri štúdiu vzťahu antiangiogénny účinok-štruktúra Kim et al. (2006) zistili, že schopnosť inhibovať angiogénézu ako aj schopnosť inhibovať expresiu adhézných molekúl aktivovanými endotelovými bunkami nemá priamy súvis s počtom -OH skupín

ako to je pri antioxidačnom účinku flavonoidov.

Jedným z možných cieľov pri antiangiogénnom účinku flavonoidov môže byť HIF. Flavonoidy ako napr. izoramnetín, luteolín alebo kvercetín inhibovali jeho expresiu v mikrogramových množstvách (Hasebe et al. 2003). Antiangiogénny potenciál kvercetínu potvrdili aj Tan et al. (2003). Zistili, že kvercetín inhiboval základné kroky angiogenézy ako je proliferácia endotelových buniek, ich migrácia, formovanie mikrokapiár pri použití HUVEC. Antiangiogénny účinok kvercetínu bol potvrdený aj v *in vivo* štúdiách, kde kvercetín efektívne inhiboval tvorbu kapiár na chorioallantoidnej membráne kuracích embryí. Okrem toho kvercetín inhiboval aj jeden z ďalších proangiogénnych faktorov –MMP-2.

Pre kvercetín bude platiť tá istá skutočnosť ako pre mnohé iné flavonoidy: jeho antiangiogénny účinok bude pozostávať z ovplyvnenia viacerých kľúčových krokov angiogenézy. Potvrdením tohto tvrdenia je aj skutočnosť, že kvercetín zasahom do signalizačnej cesty sprostredkovanej aktiváciou receptora pre epidermálny rastový faktor (EGFR) inhiboval tyrozínkinázu, následkom čoho bola znížená sekrecia MMP (Lee et al. 2004).

Prísľubom do budúcnosti môže byť aj skutočnosť, že kvercetín môže potencovať účinok látok používaných v súčasnej terapii nádorových ochorení. Ma et al. (2004) kombinovali tamoxifén s kvercetínom u myší, ktorým boli aplikované bunky nádorov prostaty. Zistili, že kombinácia oboch látok mala lepší terapeutický účinok ako bol pozorovaný u jednotlivých látok. Okrem samotného antiproliferatívneho účinku autori zistili znížený expresiu VEGF ako aj zníženú densitu mikrokapiár, čo svedčí o antiangiogénnom účinku vyššie spomínanej kombinácie.

V našich experimentoch s flavonoidmi sme zistili, že zmes flavonoidov signifikantne inhibovala niektoré kroky angiogenézy ako napríklad migráciu endotelových buniek, tvorbu mikrokapiár alebo expresiu MMP (Mojžiš et al. 2008). Pri porovnávaní antiangiogénneho účinku rôznych flavonoidov sme zistili, že kvercetín v porovnaní s chryzínom a 3-hydroxyflavónom vykazoval signifikantne výraznejší účinok na endotelové bunky (Pilátová et al. 2010).

Chalkóny

Chalkóny sú metabolické prekurzory flavonoidov vo vyšších rastlinách a podobne ako flavonoidy majú široké spektrum biologických účinkov vrátane protinádorových (Repanas et al. 2012).

Jedným z možných mechanizmov protinádorového účinku chalkónov môže byť aj ich antiangiogénny účinok. Nam et al. (2003) študovali antiangiogénny účinok novosyntetizovaných 2',5'-dihydroxychalkónov. Niektoré z nich vykazovali výrazný cytotoxický účinok u buniek HUVEC. Najvýraznejší účinok bol popísaný u 2-chloro-2',5'-dihydroxychalkónu, ktorý okrem cytotoxického účinku tiež inhiboval tvorbu mikrokapiár *in vitro*. Neskôr Bertl a spoluautori (2004) študovali potenciálne antiangiogénny účinok xantohumolu a izoxantohumolu, chalkónov prítomných v chmeli, a zistili, že v *in vitro* podmienkach xantohumol inhiboval tvorbu mikrokapiár (IC₅₀ = 2,2 μmol.l⁻¹). Inhibičný účinok izoxantohumolu bol slabší. Obeva chalkóny taktiež inhibovali migráciu endotelových buniek v koncentráciách 0,03 resp. 0,6 μmol.l⁻¹. Xantohumol blokoval angiogenézu aj v *in vivo* podmienkach. Subkutánná aplikácia tohto chalkónu počas 7 a 14 dní viedla k inhibícii rastu nádorov mliečnej žľazy o 46% resp. 83% v porovnaní s neliečenou skupinou. Súčasne 14 dňová aplikácia xantohumolu viedla k zníženiu neovaskularizácie o 33% v porov-

naní s kontrolnou skupinou (Gerhauser 2005). Neskôr bolo zistené, že xantohumul ovplyvňoval NFκB a Akt signálnu transdukciu u endotelálnych buniek, čo poukazuje na skutočnosť, že komponenty týchto bunkových signálnych ciest by mohli byť cieľové molekuly v mechanizme účinku xantohumolu. Tento chalkón taktiež interferuje s ďalšími krokmi angiogenézy ako napr. invazivita a migrácia endotelových buniek, rast a formovanie mikrokapilár (Albini et al. 2006). Xantohumul taktiež redukoval sekréciu VEGF a znižoval invazivitu a produkciu MMP u leukemických bunkových línií, čo (ako sa autori domnievajú) by mohlo znížiť riziko život ohrozujúcich komplikácií ako sú leukostáza alebo tkanivová infiltrácia u leukemických pacientov (Dell'Eva et al. 2007).

Likochalkón E, retrochalkón izolovaný z koreňov *Glycyrrhiza inflata*, bol popísaný ako mohutný induktor apoptózy u endotelových buniek. Aj keď presný mechanizmus tohto účinku nie je známy, autori sa domnievajú, že môže byť výsledkom modulácie NF-kappaB a proteínov Bcl-2 rodiny (Chang et al. 2007). Antiangiogénny účinok chalkónov v *in vitro* ako aj *in vivo* podmienkach potvrdili aj Lee et al. (2006). 2'-hydroxy-4'-metoxychalkón potláčal angiogenézu na chorioallantoidnej membráne kuracích embryí ako aj u myši. Podobne 2',4'-dihydroxy-6'-metoxy-3',5'-dimetylchalkón extrahovaný zo suchých kvetov *Cleistocalyx operculatus* používaných v tradičnej čínskej medicíne blokoval angiogenézu *in vitro* aj *in vivo*. V *in vitro* podmienkach reverzibilne inhiboval fosforyláciu tyrozínkináz VEGF receptora. Taktiež inhiboval aktiváciu signálnych ciest MAPK and Akt. Systémová aplikácie tohto chalkónu viedla k inhibícii rastu subkutánných nádorov u experimentálnych zvierat so súčasným poklesom denzity ciev v nádoroch (Zhu a kol., 2005).

Naše výsledky taktiež potvrdzujú antiangiogénny účinok chalkónov. Zistili

sme, že syntetický analóg chalkónu (E-2-(40-metoxybenzylidén)-1-benzosuberón v netoxických koncentráciách inhiboval migráciu endotelových buniek, expresiu MMP-9 a sekréciu VEGF (Pilátová et al. 2010). Výrazný *in vitro* a *in vivo* antiangiogénny účinok sme zistili aj u 4-hydroxychalkónu, ktorý potláčal početné kroky angiogenézy vrátane proliferácie endotelových ciev, migrácie a tvorby mikrokapilár. Okrem toho 4-hydroxychalkón inhiboval fosforyláciu (ERK)-1/-2 a Akt kináz indukovanú rastovými faktormi. Výrazný antiangiogénny účinok tohto chalkónu bol potvrdený aj v *in vivo* podmienkach, keď signifikantne inhiboval tvorbu mikrokapilár na chorioalantoickej membráne kurčiat (Varinská et al. 2012).

Práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0325-07 a SEPO-II (ITMS kód: 26220120039).

Zoznam použitej literatúry

1. Albini A, Dell'Eva R, Vene R, Ferrari N, Buhler DR, Noonan DM, Fassina G. Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF-kappaB and Akt as targets. *FASEB J* 2006; 20: 20527-9.
2. Axnick J, Lammert E. Vascular lumen formation. *Curr Opin Hematol* 2012; 19: 192-8.
3. Bertl E, Becker H, Eicher T, Herhaus C, Kapadia G, Bartsch H, Gerhauser C. Inhibition of endothelial cell functions by novel potential cancer chemopreventive agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 287-95.
4. Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Lavey RS, Hines OJ. Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down-regulation of VEGF gene expression. *Cancer* 2004; 100: 201-10.
5. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011; 473: 298-307.
6. Carmi Y, Voronov E, Dotan S, Lahat N, Rahat MA, Fogel M, Huszar M, White MR, Dinarello CA, Apte RN The Role of Macrophage-Derived IL-1 in Induction and Maintenance of Angio-

- genesis. *J Immunol.* 2009, doi: 10.1161/01.RES.0000259562.63718.35
7. Dell'Eva R, Ambrosini C, Vannini N, Piaggio G, Albini A, Ferrari N. AKT/NF-kappaB inhibitor xanthohumol targets cell growth and angiogenesis in hematologic malignancies. *Cancer* 2007; 110: 2007-11.
 8. Gerhauser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1941-54.
 9. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29: 405-34.
 10. Hasebe Y, Egawa K, Yamazaki Y, Kunimoto S, Hirai Y, Ida Y, Nose K. Specific inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha activation and of vascular endothelial growth factor (VEGF) production by flavonoids. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1379-83.
 11. Chang HJ, Yoon G, Park JS, Kim MH, Baek MK, Kim NH, Shin BA, Ahn BW, Cheon SH, Jung YD. Induction of apoptosis by the licochalcone E in endothelial cells via modulation of NF-kappaB and Bcl-2 Family. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 2290-3.
 12. Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee AY, Ke FC, Huang CJ, Kandaswami C, Lee PP, Lee MT. Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 2103-14.
 13. Lee YS, Lim SS, Shin KH, Kim YS, Ohuchi K, Jung SH. Anti-angiogenic and anti-tumor activities of 2'-hydroxy-4'-methoxychalcone. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1028-31.
 14. Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Lett* 2002; 186: 157-64.
 15. Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 635-43.
 16. Ma ZS, Huynh TH, Ng CP, Do PT, Nguyen TH, Huynh H. Reduction of CWR22 prostate tumor xenograft growth by combined tamoxifen-querceetin treatment is associated with inhibition of angiogenesis and cellular proliferation. *Int J Oncol* 2004; 24: 1297-104.
 17. Matsubara K, Saito A, Tanaka A, Nakajima N, Akagi R, Mori M, Mizushina Y. Catechin conjugated with fatty acid inhibits DNA polymerase and angiogenesis. *DNA Cell Biol* 2006; 25: 95-103.
 18. Mojžiš J, Šarišský M, Pilátová M, Voharová V, Varinská L, Mojžišová G, Ostró A, Urdzík P, Dankovčík R, Mirossay L. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of Flavin7. *Physiol Res* 2008; 3: 413-20.
 19. Nam NH, Kim Y, You YJ, Hong DH, Kim HM, Ahn BZ. Cytotoxic 2',5'-dihydroxychalcones with unexpected antiangiogenic activity. *Eur J Med Chem* 2003; 38: 179-87.
 20. Newcomb EW, Ali MA, Schnee T, Lan L, Lukanov Y, Fowkes M, Miller DC, Zagzag D. Flavopiridol downregulates hypoxia-mediated hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human glioma cells by a proteasome-independent pathway: implications for in vivo therapy. *Neuro-oncol* 2005; 7: 225-35.
 21. Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 1-8.
 22. Pilátová M, Stupáková V, Varinská L, Sarisský M, Mirossay L, Mirossay A, Gál P, Kraus V, Dianisková K, Mojzís J. Effect of selected flavones on cancer and endothelial cells. *Gen Physiol Biophys* 2010; 29: 134-43.
 23. Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, Ostro A, Mojzís J. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol In Vitro* 2010; 24: 1347-55.
 24. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 2011; 146: 873-87.
 25. Rapella A, Negrioli A, Melillo G, Pastorino S, Varesio L, Bosco MC. Flavopiridol inhibits vascular endothelial growth factor production induced by hypoxia or picolinic acid in human neuroblastoma. *Int J Cancer* 2002; 99: 658-64.
 26. Repanas A, Katsori AM, Hadjipavlou-Litina D. Chalcones in Cancer: Understanding their Role in terms of QSAR. II part. *Mini Rev Med Chem.* 2012 [Epub ahead of print]
 27. Rodriguez SK, Guo W, Liu L, Band MA, Paulson EK, Meydani M. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int J Cancer* 2006; 118: 1635-44.
 28. Shankar S, Marsh L, Srivastava RK. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in Balb C nude mice through modulation of FKHRL1/FOXO3a and

- neuropilin. *Mol Cell Biochem.* 2012 [Epub ahead of print]
29. Shukla S, Gupta S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3169-78.
 30. Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HL, Hsu PY, Chow NH. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 307-18.
 31. Tan WF, Lin LP, Li MH, Zhang YX, Tong YG, Xiao D, Ding J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. *Eur J Pharmacol* 2003; 459: 255-62.
 32. Varinska L, van Wijhe M, Belleri M, Mitola S, Perjesi P, Presta M, Koolwijk P, Ivanova L, Mojzis J. : Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. *Eur J Pharmacol* 2012; 691: 125-33.
 33. Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat Rev Cancer* 2009; 6: 429-39.
 34. Yu X, Zhu J, Mi M, Chen W, Pan Q, Wei M.: Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med Oncol* 2012; 29: 349-57.
 35. Zhu XF, Xie BF, Zhou JM, Feng GK, Liu ZC, Wei XY, Zhang FX, Liu MF, Zeng YX. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor signal pathway and antitumor activity of ON-III (2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone), a component from Chinese herbal medicine. *Mol Pharmacol* 2005; 67: 1444-50.

Perspektívy podania inhibítorov fosfodiesteráz v liečbe syndrómu aspirácie mekónia novorodencov

Daniela Mokr¹, Juraj Mokry²

¹Ústav fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

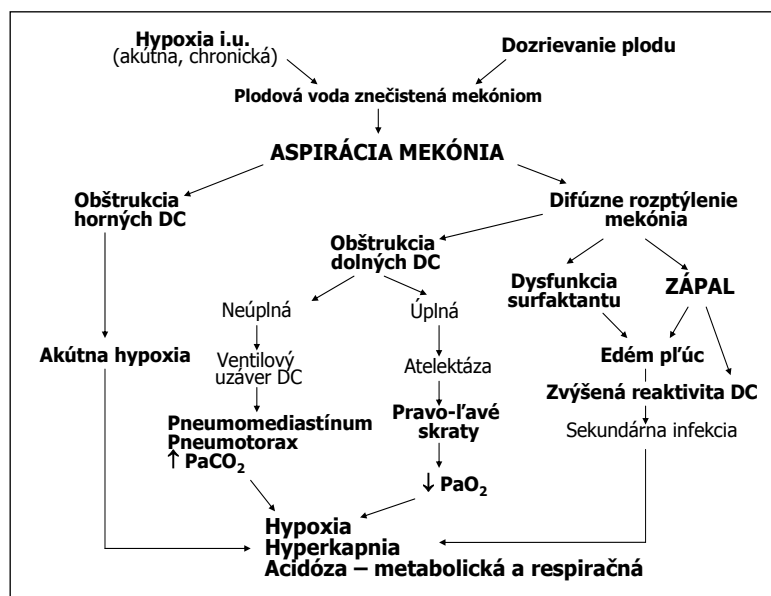
²Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

E-mail: mokra@ifmed.uniba.sk

Syndróm aspirácie mekónia (MAS)

MAS je jednou z najčastejších príčin respiračného zlyhávania novorodencov narodených v termíne alebo po termíne. Prvá stolica novorodenca (mekónium) sa môže dostať do pľúc počas prvých vdychov novorodenca, ale k aspirácii môže dôjsť aj intrauterinne, napr. ako reakcia na stres spojený s fetálnou asfyxiou [4]. Na vzniku

MAS sa podieľa viacero patomechanizmov (Obr. 1): obštrukcia dýchacích ciest (DC), neinfekčná pneumónia, inaktivácia surfaktantu, pľúcna vazokonstrikcia, či porucha samočistiacich mechanizmov pľúc, pričom ich podiel ako aj otázka iniciálneho mechanizmu zodpovedného za spustenie MAS sú predmetom diskusií.



Obr. 1 Prehľad patomechanizmov MAS

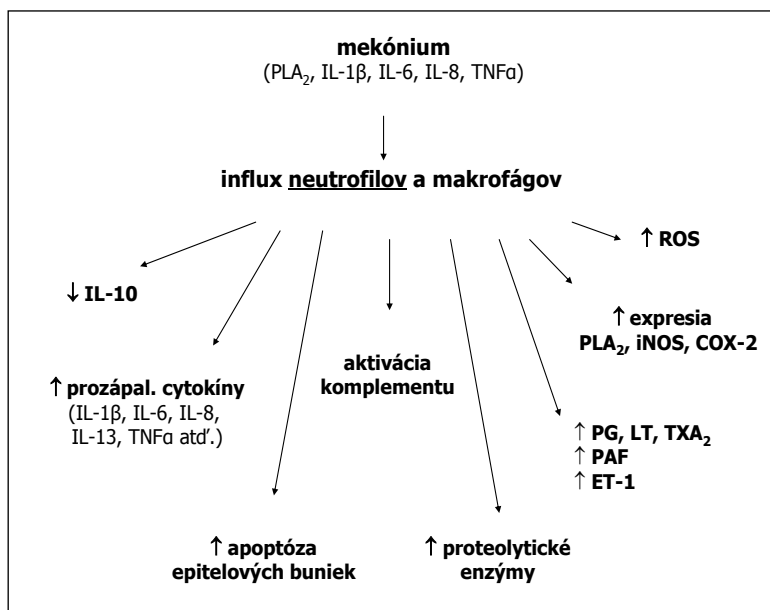
Sled dejov pri MAS je možné z časového hľadiska rozdeliť na 2 fázy. Včasné zmeny vyplývajú z obštrukcie veľkých dýchacích ciest, čo vedie ku zvýšeniu odporu pľúc a funkčnej reziduálnej kapacity, zníženiu poddajnosti pľúc, hypoxémii, hyperkapnii a acidóze. Neskoré zmeny sú spôsobené postupom mekónia do stred-

ných a malých dýchacích ciest [32]. Rozvíjajú sa zápalové zmeny a inaktivácia pľúcneho surfaktantu a nastupuje kolaps dýchacích ciest a alveol [6, 22].

V samotnom mekóniu sa nachádzajú látky, ako napr. interleukíny (IL)-1 β , -6, -8 a TNF α [7], ktoré zvyšujú chemotaxiu neutrofilov a podporujú ich prestup cez

alveolokapilárnu membránu. Okrem toho môžu látky prítomné v mekóniu (PLA₂, soli žlčových kyselín, bilirubín, cholesterol, voľné mastné kyseliny, hém atď.) zintenzívniť zápalovú reakciu stimuláciou tvorby bioaktívnych látok vrátane cytokínov a ROS v neutrofiloch [28] a makrofágoch [5], ale aj v endotelových a epitelových bunkách (Obr. 2). Uvoľnenie prozápalových

látok (TNF α , interleukínov, prostaglandínov, leukotriénov, PAF atď.) z aktivovaných buniek, aktivácia komplementu, aktivácia koagulácie a iné vedú k deštrukcii bazálnych membrán endotelu a epitelu, prieniku tekutiny, bielkovín a buniek z krvi do alveol a k aktivácii ďalších mechanizmov podieľajúcich sa na poškodení pľúc.



Obr. 2 Schéma zápalovej odpovede na prítomnosť mekónia v pľúcach.

Z uvedeného vyplýva, že zápal, pľúcny edém, pľúcna vazokonstrikcia a bronchokonstrikcia ako kľúčové patomechanizmy MAS predstavujú vhodný cieľ pre podanie protizápalových látok, ako sú napr. inhibítory fosfodiesteráz.

Farmakologické vlastnosti inhibítorov fosfodiesteráz

Fosfodiesterázy (PDE) predstavujú rodinu enzýmov – fosfohydroláz, ktoré sú schopné katalyzovať hydrolýzu 3`cyklických fosfátových väzieb cyklického 3`,5`adenozín (cAMP) a/alebo guanozín monofosfátu (cGMP). Keďže každý typ buniek dokáže produkovať viacero rôznych podtypov fosfodiesteráz, ich pôvod

a lokalizácia je považovaná za hlavný regulačný mechanizmus koncentrácie cyklických nukleotidov v príslušných bunkách. Prehľad účinkov jednotlivých fosfodiesteráz a ich inhibítorov je uvedený v Tab. 1.

Neselektívne PDE inhibítory

Predstaviteľmi neselektívnych PDE inhibítorov sú xantínové deriváty alebo metylxantíny (MTX). MTX sa ako prirodzené purínové alkaloidy nachádzajú v niektorých rastlinách. Najznámejšie sú trimetylxantín **kofeín**, u ktorého prevažujú centrálné (psychostimulačné) účinky a dimetylxantíny **teofylín** a **teobromín**, u ktorých prevládajú periférne účinky (bronchodilatačné a kardiostimulačné).

Tab. 1. Funkcie jednotlivých rodín PDE (upravené podľa [3]).

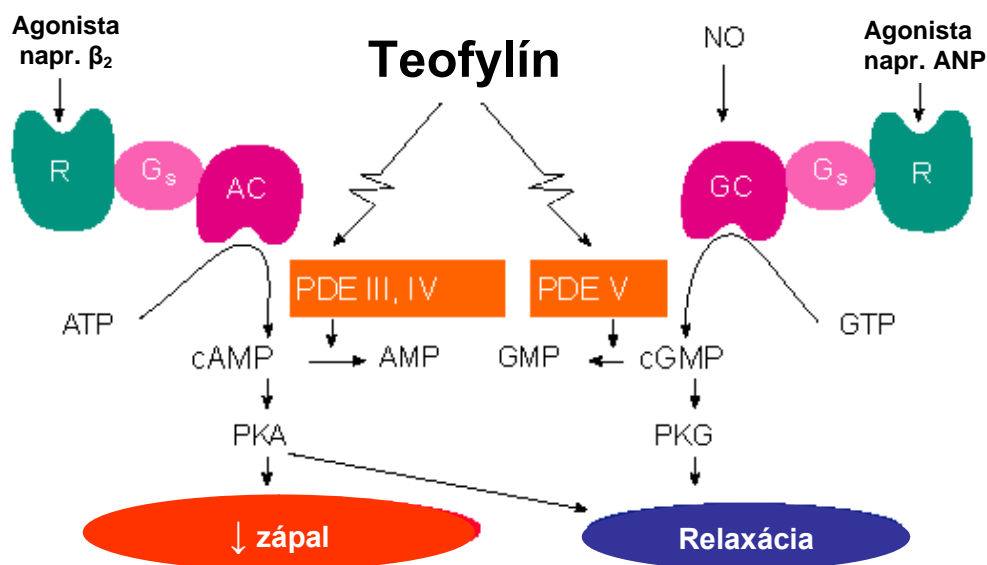
PDE rodina	Funkcia
PDE1	PDE1A - regulácia kontrakcie cievneho hladkého svalu, funkcia spermíí PDE1B - zapojenie do dopamínergnej transmisie, vplyv na prežívanie a aktiváciu imunitných buniek PDE1C - nevyhnutná na proliferáciu cievnej hladkej svaloviny, regulácia funkcie spermíí a neurónov
PDE2	PDE2 - sprostredkovanie prepojenia medzi metabolizmom cGMP a cAMP, regulácia sekrécie aldosterónu z nadobličky, fosforylácie Ca ²⁺ kanálov v srdci prostredníctvom cAMP a PKA, cGMP v neurónoch, dlhodobej pamäti a bariérovej funkcie endotelových buniek v podmienkach zápalu
PDE3	PDE3A - regulácia kontraktility myokardu, agregácie doštičiek, kontrakcie hladkej svaloviny ciev a dýchacích ciest , dozrievania oocyty a uvoľňovania renínu PDE3B - mediácia odpovede na inzulín (najmä antilipolytického účinku), regulácia bunkového cyklu, mediácia inhibičného účinku leptínu a iných vplyvov na uvoľňovanie inzulínu a renínu
PDE4	PDE4 - úloha v rôznych procesoch takmer vo všetkých tkanivách, vrátane mozgových funkcií, aktivácie monocytov a makrofágov, infiltrácie neutrofilov , proliferácie buniek hladkej svaloviny ciev, fertility, vazodilatácie a kontraktility myokardu
PDE5	PDE5 - regulátor hladkej svaloviny ciev , najmä penisu a pľúc , zapojenie do mediácie NO-cGMP v doštičkách (kontrola zrážania krvi), úloha v regulácii cGMP mediácie v mozgu
PDE6	PDE6 - zapojenie do signálnych prenosov a fotoreakcií v oku, regulácia uvoľňovania melatonínu
PDE7	PDE7 - úloha pravdepodobne v aktivácii T-buniek a ďalších zápalových buniek
PDE8	PDE8 - úloha v aktivácii T-buniek a vo funkcii spermíí a Leydigových buniek
PDE9	PDE9 - úloha zatiaľ neznáma, vplyv na signálnu dráhu NO-cGMP v mozgu
PDE10	PDE10A - regulácia cGMP v mozgu, úloha v procesoch učenia a pamäti (?)
PDE11	PDE11 - úloha pravdepodobne vo vývoji funkcii spermíí

Teofylín má relatívne malú terapeutickú šírku, pričom za bezpečnú sa považuje dávka, ktorá zabezpečí plazmatické hladiny v rozmedzí 10-15 mg/l. Bronchodilatačný efekt sa dostavuje pri vysokých koncentráciách teofylínu v plazme (>10 mg/l), kým protizápalový účinok je možné pozorovať pri nižších koncentráciách (5-10 mg/l). V súčasnosti sa teofylín používa najmä v liečbe chronickej obštrukčnej bronchopulmonálnej choroby (COPD) a astmy [1].

Presný mechanizmus pôsobenia xantínových derivátov je stále predmetom diskusií. Teofylín ako neselektívny PDE inhibítor zvyšuje hladiny cAMP a cGMP v bunkách, čo vedie ku bronchodilatácii a vazodilatácii (Obr. 3).

Okrem toho teofylín znižuje množstvo vápnika, acetylcholínu a monoamínov v bunkách a znižuje uvoľňovanie a účinok rôznych mediátorov zápalu a bronchokon-

strikcie vrátane prostaglandínov. Vďaka podobnej štruktúre sú teofylín a ostatné MTX deriváty aj antagonistami adenosínových (purínergických) receptorov. Adenosín je signálny nukleozid s rôznorodými účinkami. V dýchacích cestách spôsobuje bronchokonstrikciu a chronický zápal a moduluje činnosť neutrofilov, eozinofilov, lymfocytov a makrofágov. Keďže adenosín je aj silný bronchokonstriktor, ktorý uvoľňuje histamín a leukotriény pri astme, ale napr. aj pri hypoxémii, teofylín ako kompetitívny inhibítor adenosínových receptorov spôsobuje bronchodilatáciu. Okrem toho teofylín podporuje aktivitu mastocytov a bazofilov, zvyšuje tvorbu surfaktantu a mukociliárny transport a zlepšuje vychytávanie ROS [1, 29]. Blokáda adenosínových receptorov sa považuje za jeden z najdôležitejších mechanizmov pôsobenia teofylínu.



Obr. 3 Schéma pôsobenia teofylínu na fosfodiesterázy. R: receptor, Gs: stimulačný G proteín, AC: adenylát-cykláza, GC: guanylátcykláza, PK: fosfokináza.

Aminofylín je zmesou teofylínu a etyléndiamínu v pomere 2:1. Ako už bolo uvedené vyššie, teofylín ako neselektívny PDE inhibítor zvyšuje vnútrobunkové hladiny cAMP a cGMP, čo vedie k bronchodilatácii a pľúcnej vazodilatácii ako aj k niektorým protizápalovým účinkom. Ďalšia časť molekuly aminofylínu, etyléndiamín, zvyšuje účinnosť teofylínu zvýšením jeho rozpustnosti. Etyléndiamín je zároveň aj vysoko účinnou antioxidantnou látkou schopnou vychytávať hydroxylové radikály ($\text{OH}\cdot$) a kyselinu chlórnu (HOCl) *in vivo*, a tak znížiť oxidačné poškodenie tkanív [13]. V klinickej praxi sa aminofylín používa najmä pre svoje bronchorelaxačné a protizápalové účinky ako aj pre schopnosť stimulovať dýchanie [1, 24].

Pentoxifylín tiež patrí do skupiny dimetylxantínov. Keďže má výborné hemoreologické vlastnosti, znižuje agregáciu trombocytov a tvorbu trombov a zlepšuje prietok periférnymi cievami, používa sa v liečbe intermitentných klaudikácií a vaskulárnej demencie. Podobne ako teofylín, aj pentoxifylín funguje ako neselektívny PDE inhibítor (zvyšuje cAMP) a antagonista adenosínových receptorov. Aktivuje

tiež PKA, inhibuje syntézu $\text{TNF}\alpha$ a leukotriénov a redukuje zápal [8, 23].

Vlastnosti MTX derivátov sa môžu líšiť podľa schopnosti ovplyvniť jednotlivé skupiny fosfodiesteráz či podľa stupňa interakcie s adenosínovými receptormi. Napríklad **pentoxifylín** a **aminofylín** vykazujú značnú antioxidantnú kapacitu. Aminofylín redukoval nahromadenie neutrofilov v pľúcach, znížil peroxidáciu lipidov, hladiny IL-8 a $\text{TNF}\alpha$ a zlepšil oxygenáciu u pacientov počas náhrady srdcovej chlopne [14]. Pentoxifylín znížil tvorbu oxidantov neutrofilmi po expozícii $\text{TNF}\alpha$ *in vitro* podmienkach [33].

Systémové podanie metyloxantínov však môže byť spojené aj s nežiaducimi účinkami na kardiovaskulárne parametre, ako je hypertenzia, tachykardia a riziko vzniku arytmií [9, 15].

Selektívne PDE inhibítory

Rôzne formy (podtypy) PDE sú spojené s rozličnými bunkami, a teda aj funkciami organizmu ako aj s patologickými stavmi. Na základe toho sa predpokladá, že selektívne inhibítory jednotlivých izoform PDE dokážu cielene ovplyvniť rôzne funkcie a patologické stavy bez výraznej-

ších nešpecifických vedľajších účinkov. V ovplyvnení ochorení dýchacích ciest sa skúmajú najmä inhibítory PDE-4 a PDE-5 podtypov, menej PDE-3 a PDE-7 podtypov.

PDE-4 inhibítory špecificky hydrolyzujú cAMP. Exprimujú sa napr. v T- a B-lymfocytoch, eozinofiloch, neutrofiloch, epitelových bunkách dýchacích ciest a endotelových bunkách [10], z čoho vyplýva ich protizápalový a imunomodulačný efekt [25].

PDE-5 inhibítory sú degradačnými enzýmami cGMP o.i. aj v hladkej svalovine pľúcnych ciev a dýchacích ciest, čo vedie k redukcii pľúcnej vaskulárnej rezistencie, poklesu pľúcnej hypertenzie a potlačeniu cievnej remodelácie [26]. Okrem toho majú PDE-5 inhibítory aj protizápalové pôsobenie podobné PDE-4 inhibítorm [31].

PDE-3 hydrolyzuje cAMP. V klinike sa **PDE-3 inhibítory** používajú najmä ako neglykozidové kardiotoniká, majú však aj priamy relaxačný účinok na hladkú svalovinu dýchacích ciest, pôsobia na alveolárne makrofágy a trombocyty a majú antitusické [21] a protizápalové [11] účinky.

Použitie PDE inhibítorov v liečbe MAS

Keďže izoformy PDE-3, PDE-4 a PDE-5 môžu vzhľadom na svoje prozápalové vlastnosti zohrávať určitú úlohu aj v patogenéze MAS, dá sa predpokladať, že použitie neselektívnych, ale aj selektívnych PDE inhibítorov by mohlo byť prospešné aj v liečbe MAS.

Neselektívne PDE inhibítory v liečbe MAS

Pri *in vitro* inkubácii s mekóniom podanie **pentoxifylínu** inhibovalo degranuláciu polymorfonukleárov a znížilo produkciu TNF α [30]. V *in vivo* experimentoch u prasiatok s MAS pentoxifylín zlepšil lokálne ventilačno-perfúzne pomery a zabránil zvýšeniu TNF α , proteínov a alveolárnych makrofágov v BAL tekutine, ale neo-

vplyvnil akumuláciu neutrofilov v pľúcach [12].

Liečba **aminofylínom** v našich experimentoch výrazne zlepšila respiračné parametre v porovnaní s neliečenou skupinou zvierat. Aminofylín znížil pľúcnu vaskulárnu rezistenciu vyjadrenú percentom pravo-ľavých pľúcnych skratov a centrálnym venóznym tlakom a zlepšil oxygenáciu. Okrem toho zmiernil pľúcny zápal a edém, znížil reaktivitu tracheálneho hladkého svalu na histamín a znížil počet neutrofilov v pľúcach ako aj oxidačné poškodenie pľúc v porovnaní s neliečenými zvieratami s MAS [19]. Významné zlepšenie niektorých pľúcnych funkcií bolo pritom možné pozorovať už 30 min. od podania liečby.

Okrem priaznivých účinkov na pľúcne funkcie a zápal sme u králikov s MAS pozorovali aj pomerne závažné kardiovaskulárne účinky aminofylínu. Už počas podávania, ale najmä v priebehu 5 min. po i.v. podaní aminofylínu králikom s MAS sme zistili zvýšenie tlaku krvi a frekvencie srdca spolu so zvýšením niektorých parametrov variability frekvencie srdca (VFS) charakterizujúcich predovšetkým parasimpatikóvu aktivitu [20].

Existuje niekoľko možností, ako znížiť výskyt nežiaducich účinkov aminofylínu resp. teofylínu. Prvou možnosťou je použiť nižšie dávky liečiva. V našich experimentoch sme porovnávali terapeutický efekt vysokej (2 mg/kg) a nízkej (1 mg/kg) dávky aminofylínu na pľúcne funkcie. Zistili sme, že zlepšenie niektorých respiračných parametrov (oxygenácia, redukcia pľúcneho edému, zníženie pravo-ľavých skratov) bolo výraznejšie po podaní vyššej dávky, na druhej strane pokles niektorých markerov oxidačného stresu (markerov oxidácie proteínov) a tiež ovplyvnenie reaktivity pľúcneho tkaniva na bronchokonstrikčné mediátory boli výraznejšie po podaní nízkej dávky aminofylínu [17]. Pri porovnaní kardiovaskulárnych účinkov sme ale vý-

raznejšie rozdiely medzi podaním vysokej a nízkej dávky aminofylínu u zvierat s MAS nepozorovali (Mokrá et al. v tlači).

Ďalšou možnosťou je použiť aminofylín v kombinácii s vhodným liečivom, napr. s glukokortikoidom. Aditívny účinok oboch podaných liečiv by umožnil podať nižšie dávky a tým znížiť aj výskyt nežiaducich účinkov. V našich experimentoch sme porovnávali efekt podania aminofylínu a kombinácie aminofylínu s i.t. podaným glukokortikoidom budezonidom. Zistili sme, že uvedená kombinácia výraznejšie zlepšila pľúcne funkcie zvierat s MAS, zmiernila zápal, pľúcny edém a oxidačný stres ako samotný aminofylín. Navyše na rozdiel od aminofylínu kombinácia aminofylínu s budezonidom mala len minimálne nežiaduce účinky na kardiovaskulárny systém [16].

Znížiť možný výskyt nežiaducich účinkov na KVS parametre by mohlo aj podanie selektívnych PDE inhibítorov namiesto neselektívnych, ktoré by teoreticky mohli mať menej nežiaducich účinkov. Tento predpoklad sa ale nepotvrdil v prípade i.v. podania PDE-3 inhibítora olprinonu v našich pokusoch, kde aminofylín aj olprinon vykazovali podobné účinky na kardiovaskulárne parametre (Mokrá et al. v tlači).

Selektívne PDE inhibítory v liečbe MAS

V liečbe MAS boli zatiaľ testované len niektoré PDE-5 a PDE-3 inhibítory. Liečba **sildenafilom** u prasiatok s MAS zvrátila zvýšenie tlaku v a. pulmonalis už 1 hod. po podaní liečby, a to bez ovplyvnenia systémovej cirkulácie [27]. Podanie **milrinonu**, selektívneho PDE-3 inhibítora, zlepšilo oxigenačný index a prežívanie u 4 pacientov s MAS [2].

Iný PDE-3 inhibítor – **olprinon** - zlepšil pľúcne funkcie zvierat s MAS, zmiernil pľúcny edém, znížil počet neutrofilov prenikajúcich do pľúc a znížil tiež percento pravo-ľavých pľúcnych skratov

(Mokrá et al. v tlači). Pri analýze markerov oxidačného stresu v mitochondriách pľúc sme po liečbe olprinonom zistili signifikantný pokles koncentrácií väčšiny sledovaných markerov oxidácie lipidov i proteínov v homogenáte pľúcneho tkaniva, ako aj v izolovaných mitochondriách pľúc [18].

Záver

Vzhľadom na kľúčovú úlohu zápalu, oxidačného stresu, edému a pľúcnej vazokonstrikcie v patogenéze MAS predstavujú PDE inhibítory perspektívnu farmakologickú skupinu. Úlohou ďalších štúdií v budúcnosti bude preskúmať vhodnosť, dávkovanie a tiež možné nežiaduce účinky jednotlivých neselektívnych, ale aj selektívnych PDE inhibítorov a zvážiť ich možné použitie v rámci liečby MAS.

Podporené grantom VEGA č. 1/0030/11 a 1/0057/11. Práca bola podporená projektom "Dobudovanie centra experimentálnej a klinickej respirológie" spolufinancovaným zo zdrojov ES.

Zoznam použitej literatúry

1. Barnes PJ. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease. New horizons. Proc Am Thorac Soc 2005; 2: 334-9.
2. Bassler D, Choong K, McNamara P, Kirpalani H. Neonatal persistent pulmonary hypertension treated with milrinone: four case report. Biol Neonate 2006; 89: 1-5.
3. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular regulation to clinical use. Pharmacol Rev 2006; 58: 488-520.
4. Co E, Vidyasagar D. Meconium aspiration syndrome. Compr Ther 1990; 16: 34-9.
5. Craig S, Lopez A, Hoskin D, Markham F. Meconium inhibits phagocytosis and stimulates respiratory burst in alveolar macrophages. Pediatr Res 2005; 57: 813-8.
6. Davey AM, Becker JD, Davis JM. Meconium aspiration syndrome: physiological and inflammatory changes in a newborn piglet model. Pediatr Pulmonol 1993; 16: 101-8.
7. de Beaufort AJ, Pelikan DM, Elferink JG, Berger HM. Effect of interleukin 8 in meconium

- on in-vitro neutrophil chemotaxis. *Lancet* 1998; 352: 102-5.
8. Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. Insights into the Regulation of TNF- α Production in Human Mononuclear Cells: The Effects of Non-Specific Phosphodiesterase Inhibition. *Clinics (Sao Paulo)* 2008; 63: 321-8.
 9. Fakioglu H, Gelvez J, Torbati D, Glover ML, Olarte JL, Camacho MT, Wolfsdorf J. Aminophylline therapy during endotoxemia in anesthetized spontaneously breathing rats. *Pharm Res* 2004; 49: 45-50.
 10. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterase: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 2003; 370: 1-18.
 11. Koike T, Nadeen Qutab M, Tsuchida M, Takekubo M, Saito M, Hayashi J. Pretreatment with olprinone hydrochloride, a phosphodiesterase III inhibitor, attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury via and anti-inflammatory effect. *Pulm Pharmacol Ther* 2008; 21: 161-77.
 12. Korhonen K, Kiuru A, Svedstrom E, Kaapa P. Pentoxifylline reduces regional inflammatory and ventilatory disturbances in meconium-exposed piglet lungs. *Pediatr Res* 2004; 56: 901-6.
 13. Lapenna D, De Gioia S, Mezzetti A, Ciofani G, Festi D, Cuccurullo F. Aminophylline: could it act as an antioxidant in vivo? *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 464-70.
 14. Luo WJ, Ling X, Huang RM. Effects of aminophylline on cytokines and pulmonary functions undergoing valve replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 766-71.
 15. Minton NA, Henry JA. Acute and chronic human toxicity of theophylline. *Hum Exp Toxicol* 1996; 15: 471-81.
 16. Mokra D, Drgova A, Mokry J, Bulikova J, Pullmann R, Durdik P, Petraskova M, Calkovska A. Combination of budesonide and aminophylline diminished acute lung injury in animal model of meconium aspiration syndrome. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 6: 461-71.
 17. Mokra D, Drgova A, Mokry J, Pullmann R, Redfors B, Petraskova M, Calkovska A. Comparison of the effects of low-dose vs. high-dose aminophylline on lung function in experimental meconium aspiration syndrome. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 6: 449-59.
 18. Mokra D, Drgova A, Pullmann R Sr, Calkovska A. Selective phosphodiesterase 3 inhibitor olprinone attenuates meconium-induced oxidative lung injury. *Pulm Pharmacol Ther* 2012; 25: 216-22.
 19. Mokra D, Mokry J, Tatarkova Z, Redfors B, Petraskova M, Calkovska A. Aminophylline treatment in meconium-induced acute lung injury in a rabbit model. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58 (Suppl 5): 399-407.
 20. Mokra D, Tonhajzerova I, Mokry J, Petraskova M, Hutko M, Calkovska A. Cardiovascular side effects of aminophylline in meconium-induced acute lung injury. *Adv Exp Med Biol* 2013; 756: 341-7.
 21. Mokry J, Mokra D, Nosalova G, Beharkova M, Feherova Z. Influence of selective inhibitors of phosphodiesterase 3 and 4 on cough and airway reactivity. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 (Suppl 6): 473-82.
 22. Moses D, Holm BA, Spitale P, Liu M, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by meconium. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 477-81.
 23. Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J Immunol* 2005; 174: 589-94.
 24. Salari P, Mojtahedzadeh M, Najafi A, Sadraie S, Bahaadini K, Moharreri M, Hadavand N, Abdollahi M. Comparison of the effect of aminophylline and low PEEP vs. high PEEP on EGF concentration in critically ill patients with ALI/ARDS. *J Clin Pharmacy Therapeutics* 2005; 30: 139-44.
 25. Sanz MJ, Cortijo J, Morcillo EJ. PDE4 inhibitors as new antiinflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacol Ther* 2005; 106: 269-97.
 26. Sebkhi A, Strange JW, Phillips SC, Wharton J, Wilkins MR. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2003; 107: 3230-5.
 27. Shekerdemian LS, Ravn HB, Penny DJ. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1098-102.
 28. Soukka HR, Ahotupa M, Ruutu M, Kääpä PO. Meconium stimulates neutrophil oxidative burst. *Am J Perinatol* 2002; 19: 279-84.
 29. Spicuzza L, Di Maria G, Polosa R. Adenosine in the airways: Implications and applications. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 77-88.
 30. Tegtmeyer FK, Heilemann A, Reiss I, Fischer T. Inhibition of meconium induced activation of granulocytes from neonates and adults by pentoxifylline. *Klin Pädiatr* 2002; 214: 347-52.

Nové trendy vo farmakoterapii IV.

31. Toward TJ, Smith N, Broadley KJ. Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil (Viagra), in animal models of airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169: 227-34.
32. Tran N, Lowe C, Sivieri EM, Shaffer TH. Sequential effects of acute meconium obstruction on pulmonary function. *Pediatr Res* 1980; 14: 34-8.
33. Zheng H, Crowley JJ, Chan JC, Hoffmann H, Hatherill JR, Ishizaka A, Raffin TA. Attenuation of tumor necrosis factor-induced endothelial cell cytotoxicity and neutrophil chemiluminescence. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1073-8.

K mechanizmu inhibície oxidačného vzplanutia neutrofilných leukocytov prírodnými polyfenolmi

Rado Nosál¹, Katarína Drábiková¹, Viera Jančinová¹, Tomáš Perečko¹, Juraj Harmatha²

¹Ústav experimentálnej farmakológie a toxikológie SAV, Bratislava

² Ústav organickej chémie a biochémie AV ČR, Praha

E-mail: radomir.nosal@savba.sk

Úvod

Oxidačný stres (OS) je súčasťou mnohých patofyziologických porúch a doprevádza klinické stavy akými sú zápal, ischemicko-reperfúzne poškodenie, diabetes, malígny rast a iné (Droge 2002). Dôležitú úlohu v OS hrajú profesionálne fagocyty s prevahou polymorfonukleárných leukocytov produkujúcich reaktívne metabolity kyslíka (RMK) a to ako pri fagocytóze, tak aj pri poškodení tkanív a orgánov (Valko et al. 2007). Napriek tomu, že poznáme prirodzené aj farmakologické antioxidanty, stále nepoznáme príčiny a podstatu OS a terapeuticky skôr ovplyvňujeme dôsledky ako jeho príčiny.

V ostatnom čase sa venuje pozornosť prírodným antioxidantom, z ktorých mnohé sú jednak súčasťou dennej stravy, jednak sa vyznačujú nízkou toxicitou (Rahman et al. 2006). Z nich dôležitú skupinu tvoria prírodné polyfenoly, medzi ktoré patrí napr. resveratrol a kurkumín (Rahman 2008).

Napriek tomu, že existujú stovky vedeckých prác *in vitro* potvrdzujúce priaznivý účinok polyfenolov, nie je dostatok dôkazov o ich pôsobení *in vivo*. Ukázali sme významné pôsobenie mnohých prírodných polyfenolov na oxidatívne vzplanutie ľudských neutrofilných leukocytov, ako aj ich priaznivé pôsobenie na modeli adjuvantnej artritídy (Perečko et al. 2011).

V tejto štúdii sme sa zaoberali pôsobením kurkumínu, n-feruloylsérotonínu, pinosylvínu a pterostilbénu na mechanizmus tvorby reaktívnych foriem

kyslíka v plnej ľudskej krvi a na izolovaných neutrofilných leukocytoch.

Metódy a materiál

Použili sme luminol, izoluminol, PMA (4 β -phorbol-12 β -myristate- α 13-acetate), dextran (priemerná m.h. 464,000): Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen, Nemecko), HRP (horseradish peroxidase) superoxidizmutáza a kataláza: Merck (Darmstadt, Nemecko), Lymphoprep (densita 1,077 g/mL): Nyco-med Pharma AS (Oslo, Nórsko).

Fosfátový tlmivý roztok (PBS) s obsahom: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 1,8 mM CaCl₂; a 0,5 mM MgCl₂·6H₂O; pH 7,4; Tyrodeho roztok s obsahom: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 11,9 mM NaH₂CO₃; 0,4 mM NaH₂PO₄·2H₂O; 1 mM, MgCl₂·6H₂O a 5,6 mM glukóza; pH 7,4.

Použitie prírodné látky

Kurkumín (KUR: diferuloylmetán - Sigma-Aldrich Chemie Deisenhofen, Nemecko), N-feruloylsérotonín (N-f-5HT), pinosylvín (PIN: 3,5-dihydroxy-transstilben) a pterostilbén (PTE: 3,5-dimetoxi-4-hydroxystilben) boli syntetizované Ing. Harmathom na Ústave organickej chémie a biochémie Akadémie vied Českej republiky v Prahe.

Získanie krvi a separácia neutrofilov

Čerstvú krv sme získali od dobrovoľníkov-mužov (vek 20-50 rokov) bez medikácie 7 dní, v krvnej banke

venepunkciou do 3,8% roztoku trojsodného citrátu (pomer krv:citát = 9:1) na základe povolenia etickej komisie NTS-KRA/2011/SM. Neutrofilné leukocyty sme izolovali diferenciálnou centrifugáciou v 3% dextrane s následnou separáciou cez Lymphoprep. Po hypotonickej hemolýze, premytí v PBS a spočítaní (Coulter Counter, Electronics) sme suspenziu buniek nariedili na 10^4 neutrofilov/ μ L. Pracovná suspenzia obsahovala viac ako 96% živých buniek (stanovené mikroskopicky ofarbením trypanovou modrou – Drábiková et al. 2006, 2007).

Stanovanie chemiluminiscencie (CHL) plnej krvi a izolovaných neutrofilov.

Oxidatívne vzplanutie profesionálnych fagocytov v krvi (vzorky riedené 50 x – Nosál et al. 2011) sme stanovili po stimulácii PMA ($0,05 \mu\text{M}$) v $250 \mu\text{L}$ vzorkách (Drábiková et al. 2007). Extra- a intracelulárnu tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka (RMK) v izolovaných neutrofiloch sme stanovili pomocou lumino-*lolum*/izoluminolom zosilnenej CHL opísanej v predošlých prácach (Jančinová et al. 2006a,b). CHL v plnej krvi a izolovaných neutrofiloch sme merali v mikrodoštičkovom luminometri Immunotech LM-01T (Česká Republika) pri 37°C (Jančinová et al. 2006b).

Stanovanie aktivácie proteinkinázy C (PKC)

Fosforyláciu protein kinázy C sme stanovili metódou podľa Jančinovej et al. (2009). Izolované neutrofilové bunky inkubovali pri 37°C so skúmanými látkami 1 min a následne stimulovali PMA ($0,15 \mu\text{M}$, 1 min). Po lýze buniek, následnej sonikácii

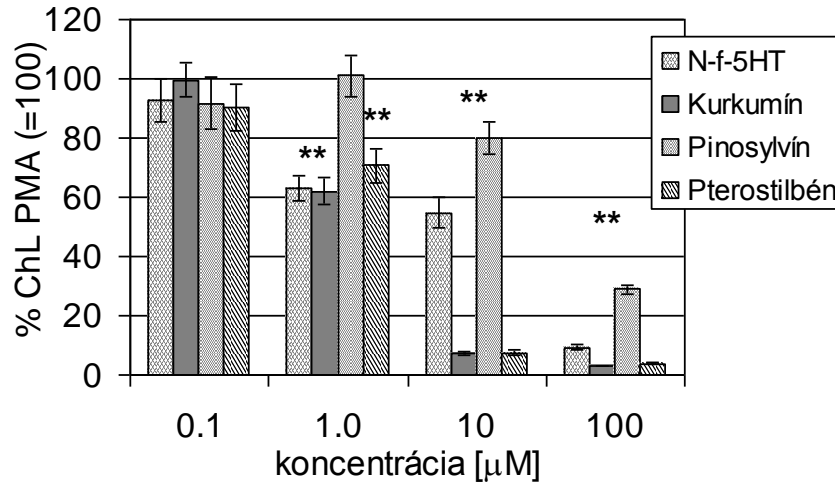
a centrifugácii supernatant varili 5 min v ústojnom roztoku a vzorky naniesli na SDS polyakrylamidový gél. Proteíny separovali elektroforézou a naniesli na Imobilon-P Transfer Membrane (Milipore USA). V jednom z pásikov sa stanovila aktivita PKC, druhý slúžil ako kontrola (α -aktín). Po spracovaní pásikov sa prvý pásik inkuboval v prítomnosti Fosfo-PKC protilátkou a po ďalšom spracovaní sa vizualizoval pomocou Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection Reagents (Amersham,UK) a analyzoval autorádiograficky. Optická denzita pásikov PKC sa korigovala odpovedajúcou denzitou aktínového prúžku.

Spracovanie výsledkov

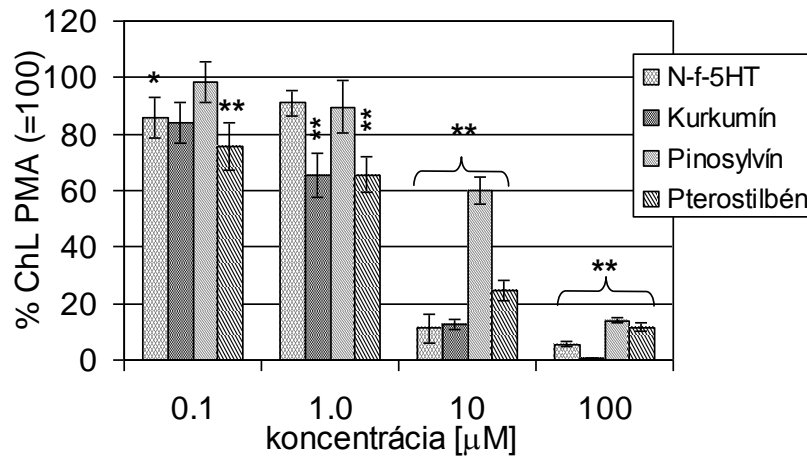
Číselné hodnoty merania sa získali z plochy pod krivkou chemiluminiscenčných kriviek počas inkubácie 5 min pri 37°C , počítačovým programom a sú vyjadrené ako percento stimulovanej chemiluminiscencie forbolmyristátacetátom (PMA kontrola = 100%). Získané numerické údaje výsledkov meraní boli spracované štatisticky programom ANOVA a významnosť výsledkov bola hodnotená na hranici významnosti pre $p \leq 0,05$ a $0,01$.

Výsledky

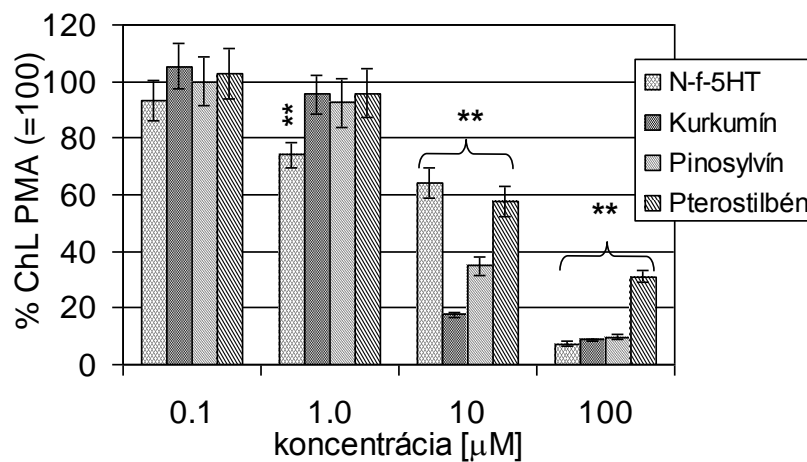
Účinok kurkumínu, N-f-5HT, pino-sylvínu a pterostilbénu na tvorbu RMK meraní v plnej ľudskej krvi stimulovanej PMA demonštruje obrázok 1. V koncentračnej závislosti všetky skúmané látky znižovali CHL, pričom v koncentrácii $1 \mu\text{M}$ významne kurkumín, N-f-5HT a pterostilbén na 63 a 70% stimulácie. V koncentrácii $100 \mu\text{M}$ inhibícia predstavovala 3 až 29% stimulácie.



Obr. 1 Účinok N-feruloylsérotonínu(N-f-5HT), kurkumínu, pinosylvínu a pterostilbénu v koncentračnej závislosti na chemiluminiscencii plnej ľudskej krvi stimulovanej PMA (0,05 µM) pri 37°C vyjadrenú ako % stimulácie PMA. n=6-8, x±SEM, *p≤0,05, **p≤0,01



Obr. 2 Účinok N-feruloylsérotonínu(N-f-5HT), kurkumínu, pinosylvínu a pterostilbénu v koncentračnej závislosti na extracelulárnu chemiluminiscenciu izolovaných neutrofilov stimulovaných PMA (0,05 µM) pri 37°C vyjadrenú ako % stimulácie PMA. n=6-8, x±SEM, *p≤0,05, **p≤0,01



Obr. 3 Účinok N-feruloylsérotonínu(N-f-5HT), kurkumínu, pinosylvínu a pterostilbénu v koncentračnej závislosti na intracelulárnu chemiluminiscenciu izolovaných neutrofilov stimulovaných PMA (0,05 µM) pri 37°C vyjadrenú ako % stimulácie PMA. n=6-8, x±SEM, *p≤0,05, **p≤0,01

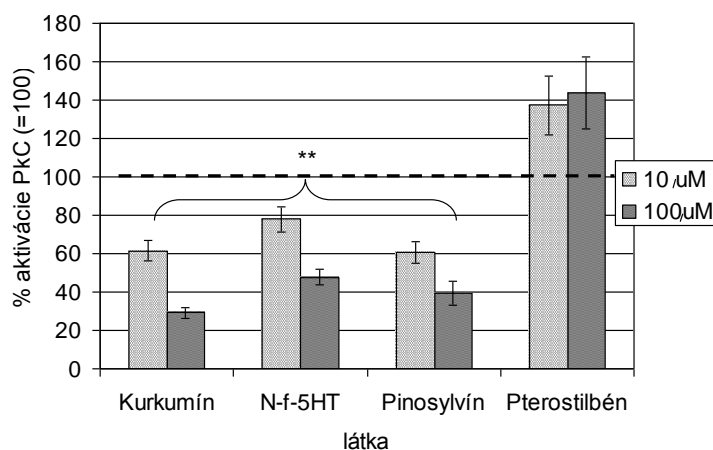
Obrázok 2 znázorňuje účinok polyfenolov na extracelulárnu chemiluminiscenciu izolovaných neutrofilov. V koncentrácii 1 μM významne znížili tvorbu RMK N-f-5HT, kurkumín a prerostilbén. Zvýšením koncentrácie látok na 10 a 100 μM sa vysoko významne zvýšil účinok všetkých polyfenolov na obsah RMK extracelulárne, ktorý bol koncentračne závislý.

Pôsobenie študovaných polyfenolov na intracelulárnu tvorbu RMK predstavuje obrázok 3. V koncentrácii 1 μM bol významne účinný N-f-5HT, v koncentráciách 10 a 100 μM všetky testované látky významne znížili intracelulárnu tvorbu RMK.

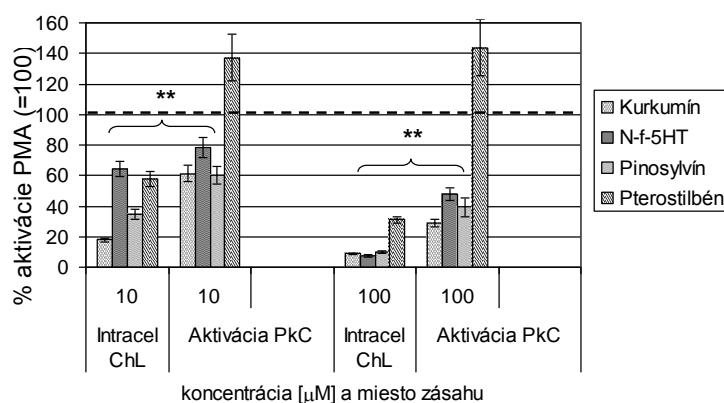
Účinok polyfenolov na aktiváciu proteinkinázy C (Pkc) v izolovaných ľudských neutrofiloch znázorňuje obrázok 4.

Kurkumín, N-f-5HT a pinosylvín v koncentračnej závislosti (10 a 100 μM) znížili aktiváciu Pkc stimulovanú PMA (=100%) nasledovne: Kurkumín na 61,4 a 29,1%, N-f-5HT na 78,1 a 47,7% a pinosylvín na 60,4 a 39,4%. Pterostilbén zvýšil významne aktiváciu Pkc na 137,3 a 143,8%.

Vzťah medzi inhibíciou intracelulárnej chemiluminiscencie a aktivácie Pkc polyfenolov v koncentrácii 10 a 100 μM predstavuje obrázok 5. Z obrázka vyplýva priamy, dávkovo závislý vzťah medzi potlačením tvorby intracelulárnych RMK a inhibíciou aktivácie Pkc pre kurkumín, N-f-5HT a pinosylvín. Pterostilbén, ktorý inhiboval tvorbu intracelulárnych RMK stimuloval tvorbu Pkc v izolovaných neutrofiloch.



Obr. 4 Účinok kurkumínu, N-feruloilsérotonínu, pinosylvínu a pterostilbénu v koncentráciách 10 a 100 μM pri 37°C na aktiváciu proteinkinázy C (Pkc) v izolovaných neutrofiloch stimulovaných PMA (0,15 μM). n=4, $x \pm \text{SEM}$, **p<0,01



Obr. 5 Vzťah účinku N-feruloilsérotonínu(N-f-5HT), kurkumínu, pinosylvínu a pterostilbénu v koncentračnej závislosti na intracelulárnu chemiluminiscenciu izolovaných neutrofilov a aktiváciu Pkc stimulované PMA (0,05 μM a 0,01 μM) pri 37°C vyjadrenú ako % stimulácie PMA. n=6-8, $x \pm \text{SEM}$, *p<0,05, **p<0,01

Diskusia

Tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka profesionálnych fagocytov v plnej krvi a izolovaných neutrofiloch možno generovať rôznymi stimulmi, z ktorých popri kalciovom jonofore A23187 a opsonizovanom zymosane je najúčinnnejším forbolmyristátacetát (PMA) aktivujúci fosforyláciu regulačných enzýmov (Nosál et al.2011). Študované prírodné polyfenoly N-feruloylsérotonín, kurkumín, pinosylvín a pterostilbén znižujú chemiluminiscenciu v plnej ľudskej krvi. Inhibičný účinok na tvorbu RMK bol koncentračne závislý a v prípade pinosylvínu popísaný aj pre tvorbu reaktívnych metabolitov dusíka v kultúrach makrofágov (Jančinová et al. 2010). Inhibícia oxidatívneho vzplanutia plnej ľudskej krvi bola opísaná aj pre syntetické kumarínové deriváty a resveratrol (Drábiková et al. 2010, Cavallaro et al. 2003). S výnimkou pinosylvínu všetky ostatné polyfenoly významne znižovali oxidatívne vzplanutie neutrofilov extracelulárne v koncentrácii 1 μM , ďalším zvýšením ich koncentrácie sa účinok výrazne zvyšoval pre všetky testované polyfenoly (obrázok 2). Tento účinok je v súlade s pôsobením polyfenolov v plnej krvi a pravdepodobne súvisí s ich zhášacím mechanizmom na uvoľnené RMK podobne ako je tomu v bezbunkových systémoch (Perečko et al.2010).

Potlačenie oxidatívneho vzplanutia študovanými polyfenolmi poukazuje na interakciu s mechanizmami aktivácie neutrofilov intracelulárne. Chemiluminiscencia je výsledkom generácie superoxidu NADPH-oxidázou závislej od fosforylácie proteínov (regulačných enzýmov) proteínkinázou C (Arnhold et al.1999).

Za pozornosť slúži účinok študovaných polyfenolov na intracelulárnu chemiluminiscenciu (obrázok 3). V 1 μM koncentrácii bol významne účinný N-f-5HT, zvýšením koncentrácie polyfenolov na 10 a 100 μM sa významne zvýšila ich schop-

nosť inhibovať tvorbu RMK v poradí N-f-5HT>PTE>PIN>KUR.

Štúdie s rezveratrolom, piceatanolom, pinosylvínom a pterostilbénom ukázali, že tieto polyfenoly ani v koncentrácii 100 μM nepoškodzujú izolované neutrofilové a nezvyšujú aktivitu kaspázy-3, ktorá je indikátorom ich apoptózy (Perečko et al. 2012).

Mnohé polyfenoly inhibujú aktiváciu proteínkinázy C v izolovaných neutrofiloch v koncentračnej závislosti, čo veľmi pravdepodobne súvisí s ich schopnosťou potláčať-inhibovať tvorbu RMK intracelulárne (Jančinová et al. 2010, Nosál et al. 2011, Perečko et al. 2010). Zo vzájomného porovnania účinku kurkumínu, N-f-5HT a pinosylvínu na potlačenie intracelulárnej chemiluminiscencie a aktivácie proteínkinázy C (obrázok 5) vyplýva, že existuje priamy vzťah medzi potlačením intracelulárnej chemiluminiscencie a inhibíciou aktivácie proteínkinázy C, čo sa potvrdilo aj v koncentračnej závislosti účinku látok.

Pretože izoformy PKC α a $\beta 2$ sa priamo zúčastňujú na aktivácii NADPH oxidázy (Fontayne et al. 2002), ich úplná, alebo čiastočná blokáda môže mať za následok redukciu oxidatívneho vzplanutia a tak vysvetliť zníženie chemiluminiscencie v prítomnosti skúmaných látok.

Výnimkou je pterostilbén, ktorý inhiboval intracelulárnu chemiluminiscenciu, ale stimuloval tvorbu proteínkinázy C. Je pravdepodobné, že tento rozdiel môže byť spôsobený ovplyvnením iných regulačných systémov pterostilbénom intracelulárne (napr. mobilizácia vnútrobunkového Ca^{2+}).

Práca vznikla s podporou projektov APVV-0052-10 a VEGA 2/0003/10

Zoznam použitej literatúry

1. Arnhold BS, Kilian U, Reichl S, Shiller J, Arnhold J. Modulation of luminol chemiluminescence of f Met-Leu-Phe stimulated neutrophils by affecting dephosphorylation of the metabolism of phosphatidic acid. *Luminescence* 1999; 14, 123-9

2. Cavallaro A, Ainis T, Bottari C, Fimiani V. Effect of Resveratrol on Some Activities of Isolated and in Whole Blood Human Neutrophils *Physiol Res* 2003; 52: 555-62.
3. Drábiková K, Jančinová V, Nosál R, Pečivová J, Mačičková T. Extra- and intracellular oxidant production in phorbolmyristate acetate stimulated human polymorphonuclear leukocytes: modulation by histamine and H₁-antagonist loratadine. *Inflamm Res* 2006; 55, 19-20.
4. Drábiková K, Jančinová V, Nosál R, Pečivová J, Mačičková T. Extra- and intracellular oxidant production in phorbolmyristate acetate stimulated human polymorphonuclear leukocytes: modulation by histamine and H₁-antagonist loratadine. *Inflamm Res* 2006; 55, 19-20.
5. Drábiková K, Perečko T, Nosál R, Račková L, Ambrožová G, Lojek A, Šmidrkal J, Harmatha J, Jančinová V. Different effect of two synthetic coumarine-stilbene hybrid compounds on phagocyte activity. *Neuroendocrino Lett* 2010; 31, 73-9.
6. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
7. Fontayne A, Dang PMC, Gougerod-Pocidallo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC α , β II, δ and ζ and z effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*, 2002; 41, 7743-50.
8. Jančinová V, Drábiková K, Nosál R, Holomáňová D. Extra- and intracellular formation of reactive oxygen species by human neutrophils in the presence of pheniramine, chlorpheniramine and brompheniramine. *Neuroendocrinol Lett* 27, 2006a; 27, 141-3.
9. Jančinová V, Drábiková K, Nosál R., Račková L, Májeková, M., Holomáňová, D. The combined luminol-isoluminol chemiluminescence method for differentiation between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils. *Redox Rep* 2006b; 11, s.110-6.
10. Jančinová V, Perečko T, Nosál R, Košťálová D, Bauerová K, Drábiková K. Decreased activity of neutrophils in the presence diferuloylmethane (Curcumin) involves protein kinase C inhibition. *Eur J Pharmacol* 2009; 612, 161-6.
11. Jančinová V, Nosál R, Lojek A, Číž M, Ambrožová G, Mihalová D, Bauerová K, Harmatha J, Perečko T. Formation of reactive oxygen and nitrogen species in the presence of pinosylvin – an analogue of resveratrol. *Neuroendocrinol Lett* 2010; 31 79-83.
12. Nosál R, Perečko T, Jančinová V, Drábiková K, Harmatha J, Svitekova K. Naturally appearing N-feruloylserotonin isomers suppress oxidative burst of human neutrophils at the protein kinase C level. *Pharmacol Rep* 2011; 63, 790-8.
13. Perečko P, Drábiková K, Nosál R, Harmatha J, Jančinová V. Pharmacological modulation of activated neutrophils by natural polyphenols. *Recent Res. Devel. Pharmacol., Research Signpost* 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, 2011; 2, 27-67.
14. Perečko T, Drábiková K, Nosál R, Harmatha J, Jančinová, V. Effect of stilbene derivatives on human neutrophil viability. *Drugs: Their Action in Pharmacology and Toxicology. Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology*, ISBN 978-80-971042-0-7, 2012; s. 109-117.
15. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 2006; 72, 1439-52.
16. Rahman I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation. *Nutr Rev.* 2008; 66, S42-5.
17. Suzuki K, Kori S, Morikawa M, Takagi, Namik H. Oxidative stress-mediated bimodal regulation of polymorphonuclear leukocyte spreading by polyphenolic compounds. *Inter Immunopharmacol* 2010; 10,1448-55.
18. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Inter J Biochem Cell Biol* 2007; 39,44-84.

Terapeutická intervencia osteoporózy u pacientov s chronickou obštrukčnou chorobou pľúc

Gabriela Nosáľová

Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin
e-mail: nosalova@jfmmed.uniba.sk

Chronická obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) je často sprevádzaná rôznymi komorbiditami, ktoré u pacienta zhoršujú funkčný stav dýchacích ciest, znižujú kvalitu života a zvyšujú mortalitu. Jednou z nežiaducich komorbíd je aj osteoporóza, ktorej prevalencia je u pacientov s CHOCHP vyššia ako u zdravej populácie. Okrem toho Ferguson et al. (1) ukázali, že zníženie FEV1 je dokázateľne sprevádzané zvýšeným rizikom osteoporózy. Dnes vieme, že osteoporóza je systémové ochorenie kostného tkaniva. Typickým znakom pre toto ochorenie je znižovanie sily a odolnosti kosti s následným zvýšením rizika fraktúr (2). Charakteristickou črtou pre tieto zlomeniny je fakt, že ide o zlomeniny vznikajúce na podklade neadekvátne nízkej sily úrazu. Toto sa potvrdilo aj u pacientov s CHOCHP u ktorých sa zistili kompresívne fraktúry stavcov a to dokonca aj v kľudovom štádiu ochorenia teda u asymptomatických pacientov. Ukázalo sa, že vertebrálne kompresívne fraktúry spôsobia zväčšenie kyfózy, čo vedie k redukcii pohybov hrudníka s následným zhoršením pľúcnych funkcií. Okrem toho, pacienti s fraktúrami rebier hypoventilujú a následne dochádza k redukcii evakuácie spúta, čo môže agravovať exacerbácie CHOCHP. Na závažnosť a potrebu venovať sa tejto problematike poukazuje aj fakt, že u pacientov s CHOCHP prevalencia kompresívnych fraktúr stavcov, ako aj fraktúr bedrového kĺbu varíruje od 24 % do 63 % (3). Podľa Walsh et al.(4) príčinou tohto stavu je nízka denzita kostných minerálov, čo môže súvisieť so systémovým zápalom,

užívaním kortikosteroidov, vekom, pohlavím, hospitalizáciou, zvýšením BMI a fajčením.

Patogenéza osteoporózy a CHOCHP

Kosti sú vo všeobecnosti rozdelené na kortikálne a trabekulárne. **Kortikálna kosť** je hustá a silná kosť nachádzajúca sa predovšetkým v strednej časti dlhých kostí. **Trabekulárna kosť** je viac pôrovitá a typicky lokalizovaná na konci dlhých kostí a vo vnútri stavcov a plochých kostí. Kostné tkanivo je počas života jedinec kontinuálne obnovované. Zistilo sa, že u dospelého človeka je za rok nahradených až 25 % trabekulárnych kostí a 3 % kortikálnych kostí. Po dosiahnutí vrcholu kostnej masy v 25 až 30 roku života, remodeling kosti je spojený s nerovnováhou medzi tvorbou a rezorbciou. Výsledkom toho je priemerná 0,5 – 1 % ročná strata kostného tkaniva, ktorá závisí na pohlaví, mieste kostí a veku.

Na celulárnej úrovni remodeling kosti je komplex súhier v ktorých osteoblasty, osteoklasty a osteocyty pracujú spolu. Osteoklasty zabezpečujú odbúravanie a osteoblasty novotvorbu kosti. Osteoblasty na svojom povrchu kontinuálne exprimujú receptorový aktivátor nukleárneho faktora kappa B ligandu (**RANKL**). Po naviazaní na príslušný receptor označený ako **RANK** (receptor activator of nuclear factor- κ B), ktorý sa nachádza na povrchu proosteoklastových buniek, sa tieto postupne menia na zrelé a aktivované osteoklasty s následnou rezorbciou kosti (5). Tieto procesy sú regulované množstvom

humorálnych faktorov, ako sú hormóny, rastové a cytokíny. Najdôležitejšiu úlohu zohrávajú estrogény, ktoré zabezpečujú rovnováhu kostného obratu.

Na lokálnej tkanivovej regulácie kostného obratu hrá významnú úlohu **osteoprotegerín** (OPG). Ide o signálny proteín zo skupiny TNF-alfa, ktorý potláča odbúravanie kostí. Osteoprotegerín blokuje interakciu RANKL/RANK a týmto účinkuje ako fyziologický regulátor obratu kosti (6). Nevyrovnanosť (nepomer) medzi RANKL a OPG vyvolá excesívnu aktivitu osteoklastov a je považovaná za hlavnú príčinu osteoporózy. Hofbauer et al. (7) poukázali na nevýhodnosť farmakologickej vlastnosti rekombinantného osteoprotegerínu ako aj rekombinantného RANK.

Iná, menej prebádaná cesta ide cez **Wnt/ β -catenín** signálnu kaskádu. Zvýšená aktivita osteoblastov cez zvýšenie Wnt/ β -catenín signálnej kaskády zvyšuje tvorbu kosti, zatiaľ čo redukovanie Wnt signálov môžu viesť k osteoporóze (8). Dnes poznáme viaceré faktory, ktoré ovplyvňujú obidve cesty regulujúce remodeling kosti. Zaujímavé pritom je, že niektoré faktory sú často popisované u pacientov CHOCHP. Ide predovšetkým o systémový zápal, používanie kortikosteroidov a deficiencia vitamínu D (obr. 1).

Systémový zápal

Systémový zápal, ktorý je hlavným patogenetickým faktorom chronickej obštrukčnej choroby pľúc, hrá dôležitú úlohu aj vo vývoji osteoporózy u pacientov s týmto ochorením (9). Svedčí pre to fakt, že kľúčové zápalové cytokíny, ako je TNF-alfa a IL-6, vedú k indukcii expresie RANKL a jeho naviazania na RANK, čím ovplyvňujú kostnú rezorpciu. Okrem toho sa ukázalo, že zápalové cytokíny redukujú aktivitu Wnt/ β -catenínovej signálnej kaskády, ktorá tiež zasahuje do remodelingu kosti (10, 11).

Kortikosteroidy a osteoporóza

Glukokortikoidmi indukovaná osteoporóza predstavuje najčastejšiu a najzávažnejšiu formu sekundárnej osteoporózy. Je známe, že glukokortikoidy preferenčne ovplyvňujú trabekulárne kosti, pretože majú vyššiu metabolickú aktivitu. Pri chronickej liečbe glukokortikoidmi sú tiež ovplyvnené aj kortikálne kosti (10, 11). Akcelerácia kostných zmien je najväčšia počas prvých mesiacov glukokortikoidného pôsobenia.

Mechanizmus tohto nepriaznivého pôsobenia glukokortikoidov súvisí so zvýšením expresie RANKL a makrofágy-stimulujúceho faktora, čím znižujú expresiu OPG. Zároveň redukujú apoptózu zreých osteoklastov, zvyšujú a predlžujú rezorpciu. V ďalšej fáze inhibícia proliferácie, diferenciácie a zrenia osteoblastov vedie k dlhotrvajúcemu poškodeniu tvorby kosti (12). V týchto procesoch je pravdepodobne zahrnutá aj inhibícia Wnt/ β -catenínovej cesty. Negatívny efekt glukokortikoidov na osteocyty modifikuje ich mikro-environment, čo môže alterovať ich mechanosenzorovú funkciu a kosť sa tak stáva fragilnejšia a senzibilnejšia k fraktúram.

Z uvedeného vyplýva, že mechanizmus vzniku kostných zmien vyvolaných glukokortikoidmi je komplexný. Najdôležitejším je tlmivý vplyv glukokortikoidov na maturáciu a funkčnú schopnosť osteoblastu.

Úloha vitamínu D

Vitamín D hrá kľúčovú úlohu v regulácii kalcia a kostnej homeostázy (13). Nízke hladiny vitamínu D stimulujú parathyreoidnú žľazu k zvýšenej sekrécii parathyreoidného hormónu (PTH), čo kompenzuje nízku bioavailable kalcia. Oveľa dôležitejšie je, že PTH vyvoláva expresiu renálnej 1-alfa-hydroxylázy, s následnou produkciou aktívneho 1,25-dihydroxyvitamínu D₃ (kalcitriolu). Tento

zabezpečuje klasický endokrinný účinok vitamínu D, teda reguluje homeostázu vápnika a fosfátov v čreve, prištítných teľieskach a v kostiach. V kostnom tkanive ovplyvňuje nezrelé osteoblastické bunky a vedie k stimulácii osteoklastogenézy cez RANKL/RANK regulačný systém. Finálne vyvoláva zvýšenie kostnej rezorbcie a mobilizáciu kalcia z kostných kompartmentov. Zvýšenie hladín vápnika a 1,25-dihydroxyvitamínu D₃ má za následok zníženie sekrécie PTH a tým sa zabráni neobmedzenej rezorbcií kosti. Niektorí autori (14) poukazujú, že 1,25-dihydroxyvitamín D₃ zvyšuje OPG expresiu v zreľých osteoblastoch, čo prispieva k ďalšej redukcii osteoklastogenézy in vivo.

Okrem endokrinného efektu vitamínu D sa potvrdil aj jeho autokrinný/parakrinný účinok (15). Zistilo sa tiež, že jeho nedostatok predstavuje nový rizikový faktor pre mnohé extraskeletálne ochorenia vrátane respiračného systému, ako aj celkovú mortalitu súčasnej populácie.

Zameranie liečby osteoporózy u pacientov s CHOCHP

U pacientov s CHOCHP pri vývoji osteoporózy, okrem dôležitých a neodmysliteľných rizikových faktorov ako sú vek, pohlavie a genetická výbava, sa môže uplatniť niekoľko iných faktorov (obr. 2), ktoré môžu byť cieľom pre intervenciu. Ide o:

- a) optimalizáciu statusu vitamínu D,
- b) limitáciu použitia kortikosteroidov,
- c) substitúciu sexuálnych steroidov a
- d) aplikácia denosumabu.

Deficiencia vitamínu D

Bolo popísané významne pozitívne spojenie medzi hladinami 25-hydroxyvitamínu D₃ a denzitou kostných minerálov pri rôznych patologických stavoch, zahrňujúc do toho aj pacientov s CHOCHP (16). Je zaujímavé, že až 77%

pacientov s CHOCHP vykazuje deficienciu vitamínu D. Nižšie hladiny 25-hydroxyvitamínu D₃ sa tiež spájajú so svalovou slabosťou a zvýšeným rizikom pádov.

Dnes je jasne deklarované, že v súčasnej populácii je zvýšená prevalencia deficiencie vitamínu D (15). Štatistické údaje ukázali, že za posledných 15 rokov v populácii USA sa priemerné hladiny 25-hydroxyvitamínu D₃ znížili z 30 ng/ml na 24 ng/ml. U starších pacientov sa odhaduje deficiencia vitamínu D od 40 % do 70 % populácie (17).

Napriek tomu, že existuje kontroverzný pohľad na optimálnu hladinu vitamínu D, sa dnes väčšina expertov prikláňa k názoru, že hladiny cirkulujúceho 25-hydroxyvitamínu D₃ pod 20 ng/ml sú nízke. Je zaujímavé, že až 77 % pacientov s CHOCHP (GOLD I-IV) vykazuje deficienciu vitamínu D, čo podporuje myšlienku štandardnej suplementácie u väčšiny pacientov s CHOCHP (18, 19).

Aká je suplementačná dávka vitamínu D?

Podľa Lincovej a Farghalihho (13) účinnou prevenciou hypovitaminózy D je pravidelné denné podávanie vitamínu D v dávke 400 m.j., či už ako ergakalciferol alebo cholekalciferol. Liečba osteomalácie a krivice si vyžaduje aplikáciu vyšších dávok (1 500 – 4 000 m.j.).

V súčasnej dobe odporúčaná suplementačná dávka je 800 m.j./deň a to najmä pre starších pacientov, ktorých hladiny 25-hydroxyvitamínu D₃ sú 30 ng/ml. Takto dosiahnuté sérové koncentrácie nielenže zastavia deficienciu vitamínu D, ale tiež poskytujú dostatočnú ochranu fragility kostí.

Predsa len, veľkosť efektívnej dávky pre individuálneho pacienta varíruje v závislosti od iniciálnej hladiny deficiencie, denzity kostných minerálov, expozícií slnka, genetických a iných neidentifikovateľných faktorov. Je tiež všeobecne známe,

že každá dávka veľkosti 100 m.j./deň zvyšuje sérovú hladinu 25-hydroxyvitamínu D₃ o 1,0 ng/mL.

Vitamín D je na farmaceutickom trhu dostupný v dvoch formách a to ako ergokalciferol (vitamín D₂) alebo cholekalciferol (vitamín D₃). Z hľadiska účinnosti sa javí efektívnejší vitamín D₃. Na tabuľke 1 sú uvedené prípravky vitamínu D dostupné na Slovenskom trhu.

Použitie kortikosteroidov

Systémové glukokortikoidy sa používajú ako základná liečba exacerbácií CHOCHP a to aj napriek ich známemu nepriaznivému vplyvu na denzitu kostných minerálov a výskyt fraktúr. Meta analýza van Staa et al. (17) ukázala silnú inverznú koreláciu medzi denzitou kosti a celkovou kumulatívnou dávkou glukokortikoidov. Okrem toho bola tiež zistená významná korelácia medzi veľkosťou dennej **orálnej dávky** glukokortikoidov a rizikom fraktúr. Už nízke orálne dávky a to 2,5 - 5,0 mg prednisonu denne sa spájajú so zvýšeným rizikom fraktúr. Riziko fraktúr sa rapídne zvýšilo v priebehu 3 až 6 mesiacov od začiatku orálnej kortikoidnej liečby, ale najväčšie riziko fraktúr sa objavilo až 1 rok po ukončení liečby.

Menej známy je účinok **inhalovaných kortikosteroidov** na stratu kostného tkaniva a riziko fraktúr. Niektoré štúdie ukázali (20), že inhalačné kortikosteroidy majú oveľa miernejší účinok na obrat kosti. Naproti tomu, Drummond et al. (21) nezistili rozdiely medzi nežiaducimi účinkami orálnych a inhalačných kortikosteroidov. Výsledky štúdie TOWARDS Revolution in COPD Health (TORCH) získané na súbore 658 pacientoch nepotvrdili významné zmeny denzity kostných minerálov po viac ako trojročnej liečbe inhalačnými kortikosteroidmi.

Pohlavné steroidy

17β-estradiol sa spája s obratom kosti, úbytkom kosti a dokonca s rizikom fraktúry u postmenopauzálnych žien a starších mužov. Testosterón môže mať priamy účinok na kosti cez androgénové receptory, ale môže účinkovať tiež na estrogénové receptory po aromatizácii na estradiol in vivo. Hypogonadizmus u mužov je akceptovaný ako rizikový faktor pre osteoporózu, ale sú aj konfliktné výsledky (22). U pacientiek s CHOCHP sa nízke hladiny 17β-estradiolu spájajú so zvýšeným rizikom osteoporózy (23, 24). Laghi et al. (25) zistili, že muži s CHOCHP majú redukované hladiny testosterónu, ale intervencia s androgénmi mala len mierny vplyv na svalovú masu a silu. Naproti tomu niektorí autori uvádzajú, že testosterón zvýšil denzitu kostných minerálov.

Prevenia a liečba osteoporózy u pacientov s CHOCHP

Fyzická inaktivita, fajčenie a na ži-viny chudobná diéta sú akceptované ako dôležité domény pre intervenciu kostí u pacientov s CHOCHP.

Napriek tomu, že u zdravej populácie určité tréningové metódy majú na denzitu kosti pozitívny efekt, chýbajú dôkazy o ich vplyve u pacientov s CHOCHP.

K definitívnemu stanovisku, ktoré tréningové modality sú pre skelet perspektívne a sú účinné aj u pacientov s CHOCHP sú potrebné randomizované, kontrolné štúdie. Okrem vylúčenia fajčenia je potrebné aj zdravé stravovanie.

Suplementácia kalcia a vitamínu D.

Suplementácia kalcia a vitamínu D zvyšuje denzitu kosti, potláča kostný remodeling a redukuje riziko fraktúr u starších pacientov. Bischoff-Ferrari et al. (22) sledovali účinnosť orálneho aplikovaného vitamínu D na neverte-brálne fraktúry u pacientov starších ako 65 rokov. Zhrnuli, že v porovnaní s kalcium alebo

placebom, **vitamín D redukoval riziko fraktúr a tento účinok bol dávkovo-závislý**. Vyššie dávky vitamínu D t.j. **800 m.j./deň redukovali riziko** nevertebrálnych fraktúr približne o 20 % a bedrových o cca 18 %, **zatiaľ čo dávka 400 m.j./deň nebola účinná**. Uvedení autori tiež ukázali, že vitamín D po perorálnom podaní v dávke 800 m.j./deň redukoval riziko pádov u starších ľudí o 19 %. Nevyžadovalo si to však podanie kalcia, ale iba aplikácia vitamínu D zlepšila funkciu svalov a posturálnu stabilitu. Naopak, Boonen et al. (26) zistili, že riziko fraktúr bedra bolo redukované iba vtedy, keď sa kalcium pridalo k vitamínu D. Výsledky meta-analýzy z roku 2007 poukázali, že denná suplementácia 1200 mg vápnika a 800 m.j. vitamínu D mierne zvýšila denzitu kosti a redukovala výskyt fraktúr. Čiastočne sa potvrdilo, že kalcium spolu s vitamínom D redukuje aj počet pádov (15).

Špecifické údaje týkajúce sa deficiencie vitamínu D u pacientov s CHOCHP chýbajú. Napriek tomu vieme, že majoritu pacientov s CHOCHP tvoria starší ľudia, u ktorých je zvýšené riziko osteoporózy a teda je oveľa pravdepodobnejšie, že je u nich určitý stupeň deficiencie vitamínu D a tak vystáva potreba štandardnej suplementácie (800 m.j./deň).

Okrem toho sa predpokladá, že účinok vysokých dávok vitamínu D môže nielen značne ochrániť kostné tkanivo pred rezorbciou, ale môže tiež priamo ovplyvniť zápal a interferovať s inými komorbiditami (27).

Využitie farmakologickej aktivity denosulabu

V súčasnosti k liečbe patologických fraktúr vyvolaných rôznymi príčinami sa používa denosumab. Z farmakologického hľadiska ide o ľudskú monoklonálnu protilátku, ktorá obsahuje výhradne ľudské proteíny, čo prispieva k výhodnému bezpečnostnému profilu. Látka vykazuje vyso-

kú selektivitu a špecificitu voči ľudskému RANKL. Výsledkom ich vzájomnej väzby je vyviazanie a pokles dostupnosti RANKL pre receptory RANK na povrchu osteoklastov a ich prekursorov (28). Následná redukcia počtu zrelých a funkčných osteoklastov vedie k výraznému poklesu odbúrania kosti (obr. 3).

Denosumab po podkožnej aplikácii vykazuje nelineárnu farmakokinetiku (29). Profil je možné rozdeliť do troch fáz:

1. Absorbčná fáza s maximom sérovej koncentrácie na úrovni 5. – 21. dňa po podaní.
2. Prolongovaná fáza beta charakterizovaná plazmatickým polčasom až 32 dní.
3. Terminálna fáza s plazmatickým polčasom 5-10 dní.

Práve na základe výhodnej farmakokinetiky je možné podávanie s frekvenciou raz za 6 mesiacov v dávke 60 mg subkutánne. Štúdia FREEDOM (multicentrická, randomizovaná, placebom kontrovaná), ktorá zahŕňala 7808 pacientiek so stredne závažnou osteoporózou (T-skóre v rozmedzí -2,5 a -4,0) poukázala na efektivitu denosumabu aplikovaného v uvedenej dávke. Farmakodynamická aktivita liečiva, ktorá sa sledovala počas 36. mesiacov ukázala, že denosumab znížoval riziko zlomenín stavcov voči placebo o 68%, zlomenín v oblasti bedra o 40% a nevertebrálnych zlomenín (najmä v oblasti dolnej tretiny vretennej kosti) o 20%.

Popri vysokej terapeutickú účinnosti podanie 60 mg denosumabu vo forme jednej podkožnej injekcie raz za 6 mesiacov bolo veľmi dobre tolerované a celkový výskyt nežiaducich účinkov bol podobný ako po aplikácii placeba (30).

Európska lieková agentúra (EMA) udelila v máji 2010 registráciu lieku Prolia (denosumab) v indikácii PMO a osteoporózy v súvislosti hormonálnou abláciou u mužov s karcinómom prostaty.

V Slovenskej republike je denosumab (Prolia) indikovaný v liečbe:

- a) postmenopauzálny osteoporóze u žien (pri denzitometricky zistenom T-skóre menšom ako $-2,5$ pri použití centrálnej denzitometrie),
- b) úbytku kostnej hmoty v súvislosti s hormonálnou abláciou u mužov s karcinómom prostaty (pri denzitometricky zistenom T-skóre menšom ako $-1,0$ pri použití centrálnej denzitometrie),
- c) a iných patologických zlomeninách, kde príčinou je osteoporóza.

Liečba osteoporózy denosumabom je dlhodobá a vyžaduje priebežnú denzitometrickú kontrolu s použitím centrálnej denzitometrie v odstupe 12 až 24 mesiacov. Na základe odborného usmernenia Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (31) sa vo všeobecnosti odporúča minimálne 3 ročné trvanie liečby, pričom horná hranica dĺžky trvania liečby osteoporózy nebola doteraz definovaná.

Záver

U pacientov s CHOCHP je dôležitá rýchla diagnóza osteoporózy a to ešte v štádiu bez zjavných symptómov deficiencie vitamínu D. U týchto pacientov musíme rádiograficky sledovať vertebrálne kompresívne fraktúry, merať hladiny 25-hydroxyvitamínu D₃ a starostlivo sledovať denzitu kostných minerálov.

Štandardná suplementácia vitamínom D a kalcium musí byť dôkladne zvažovaná. Pacienti s CHOCHP, ktorí sú liečení glukokortikoidmi mali by začať s antirezorbčnou liečbou nielen vtedy, keď sú osteoporotický (T skóre $< -2,5$ alebo existujúcou fragilitnou fraktúrou), ale už keď majú definovanú osteopéniu (T skóre < -1).

Denosumab predstavuje unikátnu alternatívu liečby osteoporózy s mechanizmom účinku na úrovni kauzálneho ovplyvnenia lokálnej regulácie kostného

obratu systémom RANK/RANKL. Rýchla a absolútna odozva markerov kostného obratu potvrdzuje kľúčovú a temer výlučnú úlohu RANKL v regulácii. Výsledky klinických štúdií poukazujú na unikátnu účinnosť jednak v rámci celého skeletu a jednak na úrovni trabekulárnej i kortikálnej kosti s dôkazom štatisticky významne vyššieho efektu voči referenčnému bifosfonátu. Dávkovací režim vo forme subkutánnej injekcie raz za 6 mesiacov a výhodný bezpečnostný profil poskytuje solídne predpoklady pre vysokú adhérenciu k liečbe v bežnej klinickej praxi.

Publikácia vznikla s podporou spoločnosti AMGEN.

Zoznam použitej literatúry

1. Ferguson, G.T., Calverley, P.M.A., Anderson, J.A. at al.: Prevalence and progression of osteoporosis in patients with COPD: Results from the towards a revolution in COPD health study. *Chest*. 2009; 136: 1456-1465.
2. Kanis, J.A.: WHO study group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. *Osteoporos Int*. 1994; 4: 368-381.
3. Nuti, R., Siviero, P., Maggi, S. et al.: Vertebral fractures in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the EOLO Study. *Osteoporos Int*. 2009; 20: 989-998.
4. Walsh, L.J., Wong, C.A., Osborne, J. at al.: Adverse effects of oral corticosteroids in relation to dose in patients with lung disease. *Thorax*. 2001;56: 279-284.
5. Sambrook, P., Cooper, C.: Osteoporosis. *Lancet*. 2006; 367: 2010-2018.
6. Boyle, W.J., Simonett, W.S., Lacey, D.L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423: 337-342.
7. Hofbauer, L.C., Schoppet, M.: Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*. 2004; 292: 490-495.
8. Patel, M.S. Karsenty, G.: Regulation of bone formation and vision by LRP5. *N. Engl. J. Med*. 2002; 346: 1572-1574.
9. Biskobing, D.M.: COPD and osteoporosis. *Chest*. 2002; 121: 609-620.
10. Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K. et al.: Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med*. 2007; 13: 156-163.

11. Canalis, E., Mazziotti, G., Giustina, A., Bilezikian, J.P.: Glucocorticoid-induced osteoporosis pathophysiology and therapy. 2007; 18: 1319-1328.
12. Eijken, M., Hewison, M., Cooper, M.S. et al.: 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase expression and glucocorticoid synthesis are directed by a molecular switch during osteoblast differentiation. *Mol. Endocrinol.* 2005; 19: 621-631.
13. Lincová, D., Farghalli, H. et al.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galen Praha, 2002, 601 s.
14. Baldock, P.A., Thomas, G.P., Hodge, J.M., et al.: Vitamin D action and regulation of bone remodeling suppression of osteoclastogenesis by the mature osteoblast. *J. Bone Miner. Res.* 2006; 21: 1618-1626.
15. Spustová, V., Štefíková, K., Okša, A.: Vitamín D a kalcium: klinické účinky, diagnostika, prevencia a liečba hypovitaminózy D. *Interná medicína.* 2012; 3: 101-105.
16. Graat-Verboom, L., Wouters, E.F., Smeenk, F.W., van den Borne, B.E., Lunde, R., Spruit, M.A.: Current status of research on osteoporosis in COPD: a systematic review. *Eur. Respir. J.* 2009; 34: 209-218.
17. van Staa, T.P., Leufkens, H.G., Cooper, C.: The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2002; 13: 777-787.
18. Franco, C.B., Paz-Filho, G., Gomes, P.E. et al.: Chronic obstructive pulmonary disease is associated with osteoporosis and low levels of vitamin D. *Osteoporos Int.* 2009; 20: 1881-1887.
19. Lehouck, A., Boonen, S., Decramer, M., Janssens, W.: COPD, bone metabolism, and osteoporosis. *Chest.* 2011; 139: 648-657.
20. Langhammer, A., Forsmo, S., Syversen, U.: long-term therapy in COPD: any evidence of adverse effect on bone? *Int. J. of COPD.* 2009; 4: 365-380.
21. Drummond, M.B., Dasenbrook, E.C., Pitz, M.W., Murphy, D.J., Fan, E.: inhaled corticosteroid in patients with stable chronic obstructive pulmonary diseases: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2008; 300: 20407-2416.
22. Bischoff-Ferrari, H.A., Dawson-Hughes, B., Stachelin, H.B. et al.: Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ.* 2009; 339: 1-11.
23. Holick, M.F.: Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 266-281.
24. Iqbal, F., Michaelson, J., Thaler, L. et al.: Declining bone mass in men with chronic pulmonary disease: contribution of glucocorticoid treatment, body mass index, and gonadal function. *Chest.* 1999; 116 : 1616-1624.
25. Laghi, F.: Low testosterone in chronic obstructive pulmonary disease: does it really matter? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2005; 172: 1069-1070.
26. Boonen, S., Lips, P., Bouillon, R., Bischoff-Ferrari, H.A. et al.: Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence from a comparative meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: 1415-1423.
27. Janssen, W., Lehouck, A., Carremans, C. et al.: Vitamin D beyond bones in chronic obstructive pulmonary disease: time to act. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 179: 630-636.
28. Elliott, R., Kostenuik, P., Chen, C.: Denosumab is a selective inhibitor of human receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) that blocks osteoclast formation and function. *Osteoporos Int.* 2007; 18: S:54, 149-.
29. Bekker, P.J., Holloway, D.L., Rasmussen, A.S., Murphy, R., Martin, S.W., Leese, P.T., Holmes, G.B., Dunstan, C.R., DePaoli, A.M: A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J. Bone Miner Res.* 2004; 19: 1059-1066.
30. Cummings, S.R., San Martin, J., McClung, M.R., Siris, E.S., Eastell, R., Reid, I.R., Delmas, P., Zoog, H.B., Austin, M., Wang, A., Kutilek, S., Adami, S., Zanchetta, J. Libanati, C., Siddhanti, S., Christiansen, C.: Denosumab FOR PREVENTION OF FRACTURES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN WITH OSTEOPOROSIS. *N. Engl J. Med.* 2009; 361: 756-765.
31. Odborné usmernenie Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky pre diagnostiku a liečbu osteoporózy. *Vestník MZd SR,* 2006, 54, 9-16.

Objektívne hodnotenie chronického kašľa a efektívnosti jeho liečby

Renata Péčová, Miloš Tatár

Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

e-mail: pecova@ifmed.uniba.sk

V období posledných štyroch dekád sa v odbornej literatúre nachádza veľa informácií týkajúcich sa diagnostiky a liečby kašľa (Irwin a Madison, 2001). Aby sa vo výskume pokročilo ďalej, bolo potrebné vytvoriť platné a spoľahlivé metodiky, ktoré by pomohli objektívne identifikovať kašeľ, posúdiť jeho účinok a vplyv liečby na kašeľ. Pretože takéto metodiky boli v klinickej praxi používané, bolo potrebné posúdiť prínos týchto metodík v rámci klinického výskumu (Irwin, 2006).

Kašeľ môže byť ľahko rozpoznateľný vďaka jeho charakteristickému zvuku. Zvukové záznamy aj zdravých dobrovoľníkov poukazujú na to, že prítomnosť kašľa nie je nezvyčajná a vyskytuje sa častejšie počas zimných mesiacov v porovnaní s letnými (Loudon R, 1967), počas bdenia častejšie ako počas spánku (Phillipson, 1978) a častejšie u mužov v porovnaní so ženami (Loudon R, 1967). Hoci počas tohto monitorovania muži kašľali častejšie ako ženy, tieto nálezy neboli vysvetlené pomocou výsledkov kašľových testov (Irwin, 2006). Kašľové testy poukázali na skutočnosť, že zdravé ženy (Fujimura et al., 1990) a ženy s chronickým kašľom (Kastelik et al., 2002) majú nižší kašľový prah (vyššiu citlivosť kašľového reflexu) v porovnaní so zdravými mužmi a mužmi s chronickým kašľom. Náchylnosť na kašeľ je redukovaná zvyšujúcim sa vekom (Newham a Hamilton, 1997).

Na dosiahnutie väčšej presnosti a porovnateľnosti kašľových testov a na poukázanie ich úlohy v diagnostike a liečbe kašľa boli vypracované štandardizované odporúčania (Morice et al, 2007),

ktoré sú používané aj na našom pracovisku v rámci klinicko-fyziologických štúdií.

Efekt liečby kašľa môže byť posudzovaný pomocou subjektívnych alebo objektívnych metód. Medzi subjektívne metodiky patrí denný záznamník pacienta, vizuálne analógové škály, veľké množstvo rôznych skórovacích systémov na posúdenie kašľa, symptómových škál (napr. BCSS –breathlessness, cough and sputum scale) (Leidy et al., 2003) a dotazníkov týkajúcich sa kvality života pacientov s kašľom (napr. CQLQ - cough quality-of-life questionnaire (French et al., 2002), LCQ – Leicester cough questionnaire (Birring et al., 2003), HCQ – Hull cough questionnaire (Morice et al., 2011)). Všetky tieto metodiky môžu byť užitočné v rámci štúdií, avšak iba BCSS, CQLQ, LCQ a HCQ majú požadovanú validitu a reliabilitu.

Objektívne metodiky na posúdenie kašľa súvisia predovšetkým s rozvojom digitálnych technológií a umožňujú ambulantné nahrávanie zvuku a tak poskytujú prostriedok na presnú kvantifikáciu frekvencie kašľa. Úroveň objektívneho posúdenia frekvencie kašľa poukazuje aj na to, že zmena frekvencie kašľa nekoreluje so zmenami subjektívneho skórovania kašľa u jednotlivých pacientov (Kelsall et al., 2011), čo poukazuje na potrebu objektivizácie kašľa hlavne na úrovni klinických štúdií zameraných na posúdenie vplyvu liečby na kašeľ. Kontinuálne sledovanie frekvencie kašľa počas 24 hodín poskytuje objektívnu informáciu, ktorá môže slúžiť aj na posúdenie účinnosti antitusickej terapie.

S ohľadom na posúdenie užitočnosti ďalších objektívnych metód na posúdenie kašľa, kapsaicín a kyselina citrónová sú dve najpoužívanejšie tusigénne látky vhodné na vyvolanie kašľa u ľudí v klinických podmienkach podľa súčasných platných odporúčaní (Morice et al., 2007). Zmena reaktivity aferentných nervových zakončení zodpovedných za vznik kašľa je ďalšou metodikou objektívneho posúdenia vplyvu liečby na kašeľ. Kašľová reaktivita by mala byť zisťovaná pred a po liečbe s cieľom zistiť jej vplyv na zmenu reaktivity aferentných nervových zakončení dýchacích ciest. Táto objektívna metodika môže pomôcť v situáciách, kedy kašľová reaktivita je zvýšená.

Podľa názoru niektorých autorov (Irwin, 2006; Kelsall et al., 2011) je vhodné v rámci hľadania a optimalizácie metodík na zisťovanie účinku kašeľ ovplyvňujúcich agensov použiť objektívne i subjektívne metodiky hodnotenia kašľa, pretože majú možnosť zisťovať odlišné parametre.

Publikované odporúčania liečby chronického kašľa (Morice et al., 2006; Pratter et al., 2006) uvádzajú diagnostický algoritmus a systematickú liečbu triády vyvolávajúcich príčin chronického kašľa u dospelých, ktorú tvorí bronchiálna astma, refluxná choroba gastroezofágu (GORD) a kašľový syndróm z horných dýchacích ciest (predtým známy ako syndróm zatekania hlienu do hypofaryngu - PNDS). Za posledné desaťročia bolo publikovaných mnoho prác, ktoré pripisujú výskyt chronického kašľa týmto príčinám a popisujú 98% odpoveď na špecifickú liečbu týchto príčin (Irwin et al., 1990). Avšak nedávne štúdie poukazujú na zvyšujúci sa počet pacientov s chronickým kašľom, ktorí sú rezistentní na liečbu (McGarvey et al., 1998; Birring et al., 2004; Haque et al., 2005). V práci Woodcock a spolupracovníci (2010) popisujú možnosť identifikácie ďalších špecifických príčin (zvyčajne viac ako jednej) u pacientov

s chronickým kašľom, ale dve tretiny pacientov s chronickým kašľom sú úplne alebo čiastočne rezistentní na špecifickú liečbu zistených príčin. Naopak pacienti s triádou príčin astma, GORD, PNDS sa na kašeľ nestážujú vôbec. Autori sa pýtajú, prečo sú spúšťačmi chronického kašľa u pacientov minoritné príčiny a prečo sa chronický kašeľ nezlepší po ich liečbe. Upozorňujú tiež na potrebu revízie simplifikovaného názoru spred dvadsiatich rokov, že sú tri liečiteľné príčiny chronického kašľa.

Súčasný pochopenie neurofyziológie kašľového reflexu vychádza z experimentálnych prác na zvieracích modeloch s limitovaným množstvom údajov u ľudí. Vychádzajúc z analógie s chronickou bolesťou, periférna a centrálna senzitivácia môže byť dôležitým mechanizmom chronického kašľa, čo je v súčasnosti zdrojom aktívneho výskumu. Je potrebné pochopiť mechanizmy, ktoré sú podkladom senzitivácie, ako tieto mechanizmy vzájomne reagujú na spúšťače kašľa a ich vzájomný vzťah so senzitiváciou, ktorá vedie k tzv. núteniu na kašeľ (urge to cough) s následnou kašľovou odpoveďou v rámci chronického kašľa (Woodcock et al., 2010). Iba na základe porozumenia týmto vzťahom zistíme efektívnu liečbu chronického kašľa. Tu je aj vysvetlenie opodstatnenia používania subjektívnych a objektívnych metodík.

Účinnosť voľne predajných liekov ovplyvňujúcich kašeľ zostáva neoverená (Smith et al., 2008). Úspešný vývoj liekov závisí od lepšieho pochopenia mechanizmov, ktoré sú zodpovedné za vznik chronického kašľa a lepšej identifikácie potenciálnych terapeutických cieľov.

Uvedené možnosti objektívneho posúdenia kašľa sú v súčasnosti vhodné a používané pri realizácii klinických štúdií posudzujúcich efektivitu liečby chronického kašľa u presne definovaných skupín pacientov.

Podporené grantom MZ SR 2007/50-UK-14.

Zoznam použitej literatúry

1. Birring S, Proudou B, Carr AJ et al. Development of a symptom specific health status measure for patients with chronic cough – Leicester Cough Questionnaire (LCQ). *Thorax* 2003; 58: 339-43.
2. Birring SS, Murphy AC, Scullion JE et al. Idiopathic chronic cough and organ-specific autoimmune diseases: a case-control study. *Respir Med* 2004; 98: 242-6.
3. French C, Irwin RS, Fletcher KE et al. Evaluation of a cough-specific quality-of-life questionnaire. *Chest* 2002; 121: 1123-31.
4. Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y et al. Sex differences in the inhaled tartaric acid cough threshold in non-atopic healthy subjects. *Thorax* 1990; 45: 633-34.
5. Haque RA, Usmani OS, Barnes PJ. Chronic idiopathic cough: a discrete clinical entity? *Chest* 2005; 127: 1710-13.
6. Irwin RS, Curley FJ, French CL. Chronic cough. The spectrum and frequency of causes, key components of the diagnostic evaluation, and outcome of specific therapy. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 640-7.
7. Irwin R, Madison, JM. Symptom research on chronic cough: a historical perspective. *Ann Intern Med* 2001; 134: 809-14.
8. Irwin R. Assessing Cough Severity and Efficacy of Therapy in Clinical Research. *Chest* 2006; 129: 232-37.
9. Kastelik J, Thompson RH, Aziz I et al. Sex-related differences in cough reflex sensitivity in patients with chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 961-64.
10. Kelsall A, Houghton LA, Jones H, Decalmer S, McGuinness K, Smith JA. A Novel Approach to Studying the Relationship Between Subjective and Objective Measures of Cough. *Chest* 2011; 139: 569-75.
11. Leidy N, Rennard SI, Scmier J et al. The breathlessness, cough and sputum scale: the development of empirically based guidelines for interpretation. *Chest* 2003; 124: 2182-91.
12. Loudon R. Cough in health and disease. In: *Current proceedings in chronic obstructive lung disease: proceedings tenth Aspen Conference*. Arlington, VA: National Center for Diseases Control Program, 1967; Public Health Service Publication No 1787; 41-53.
13. McGarvey LPA, Heaney LG, Lawson JT et al. Evaluation and outcome of patients with chronic non-productive cough using a comprehensive diagnostic protocol. *Thorax* 1998; 53: 738-43.
14. Morice AH, McGarvey L, Pavord I. Recommendations for the management of cough in adults. *Thorax* 2006 (Suppl 1): i1-24.
15. Morice AH, Fontana GA, Belvisi MG, Birring SS, Chung KF, Dicpinigaitis PV, Kastelik JA, McGarvey LP, Smith JA, Tatar M, Widdicombe J. ERS guidelines on the assessment of cough. *Eur Respir J*. 2007; 29: 1256-76.
16. Morice AH, Faruqi S, Wright CE, Thompson R, Bland JM. Cough hypersensitivity syndrome: a distinct clinical entity. *Lung* 2011; 189: 73-9.
17. Newnham D, Hamilton SJ. Sensitivity of the cough reflex in young and elderly subjects. *Age Ageing* 1997; 26: 185-88.
18. Phillipson E. Control of breathing during sleep. *Am Rev Respir Dis* 1978; 118: 909-39.
19. Pratter MR, Brightling CE, Boulet LP et al. An empiric integrative approach to the management of cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129(Suppl1): 222S-31S.
20. Smith SM, Schroeder K, Fahey T. Over-the-counter (OTC) medications for acute cough in children and adults in ambulatory settings. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 1. Art. No.: CD001831. DOI: 10.1002/14651858.CD001831.pub3.
21. Woodcock A, Young EC, Smith JA. New insights in cough. *Br Med Bulletin* 2010; 96: 61-73.

Farmakologické ovplyvnenie funkcie endotelu

Miriam Petrová, Viera Kristová, Radoslav Villáris, Róbert Vojtko

Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta UK, Bratislava

e-mail: miriam.petrova@fmed.uniba.sk

Úvod

Za fyziologických podmienok má endotel viacero funkcií, ktorými reguluje lokálne pomery v cirkulácii. Dôležitá je jeho úloha pri vplyve na cievny tonus, prietok a tlak krvi. V dôsledku pôsobenia rôznych patologických činiteľov (ateroskleróza, hypertenzia, hypercholesterolémia) môže dôjsť k poškodeniu funkcie endotelu. Pri endotelovej dysfunkcii je nadmerne zvýšená expresia adhezívnych molekúl pre leukocyty, zvýšená produkcia cytokínov (najmä s prozápalovými účinkami a rastovými aktivitami), zmenená priepustnosť pre plazmatické proteíny a lipoproteíny, zmeny v rovnováhe medzi prokoagulačnými/fibrinolytickými procesmi a vazodilatačnými/vazokonstrikčnými procesmi. Tieto zmeny sa pri jednotlivých patofyziologických stavoch uplatňujú v rôznej miere. Z pohľadu farmakológa, hlavnou zmenou charakterizujúcou vznik endotelovej dysfunkcie je posunutie rovnováhy v smere zvýšenej tvorby vazokonstrikčných faktorov, a tým vyvolanie nefyziologickej cievnej konstriktie. Z hľadiska vzniku zápalovej reakcie má hlavný význam nadmerná adhezivita endotelu pre leukocyty a produkcia prozápalových cytokínov. Porušenú vazodilatačnú schopnosť a ostatné prejavy endotelovej dysfunkcie môžeme priaznivo ovplyvniť farmakami s endotelovo-protéktívnym účinkom.

Vybrané farmaká vplyvajúce na funkciu endotelu

Sulodexid je prírodný sulfónovaný glykozaminoglykán zložený z heparánsulfátu a dermatánsulfátu, ktorého antitrom-

botická aktivita spočíva v inhibícii viacerých koagulačných faktorov (zvlášť faktora X), inhibícii adhézie doštičiek a aktivácii fibrinolytického systému. Redukuje hladinu fibrinogénu a tým vplyva na viskozitu krvi a aktiváciou lipoproteinovej lipázy normalizuje koncentráciu krvných lipidov. Sulodexid je indikovaný ako venofarmakum, antivarikózum, antitrombotikum. Má antikoagulačné (Cosmi et al., 2003), antitrombotické, fybrinolytické, hemoreologické a lipolytické vlastnosti (Penka, 1996). Je považovaný za liečivo s potenciálne endotelovo-protéktívnym účinkom. Jeho endotelovo-protéktívny účinok je zatiaľ iba čiastočne objasnený v rôznych experimentálnych modeloch endotelovej dysfunkcie. V niektorých klinických štúdiách 10-týždňová liečba sulodexidom na modele streptozotocínom-indukovaného diabetes mellitus viedla k zlepšeniu acetylcholínovej relaxácie závislej od endotelu na malých cievach a znižovala počet cirkulujúcich endotelových buniek (Kristová et al., 2008).

Heparíny (nefrakcionovaný heparín a nízkomolekulárne heparíny) sú glykozaminoglykány používané sa na liečbu a prevenciu trombotických stavov. Fyziologicky má endotel antitrombotické vlastnosti, ktoré v prítomnosti bakteriálnych produktov a zápalových cytokínov môžu vyústiť do protrombotického stavu. Heparíny pravdepodobne zohrávajú dôležitú úlohu pri modulácii funkcií endotelu, a to pri procesoch ako je hemostáza, zápalová reakcia, angiogenéza a metastázovanie tumorov (Cines et al., 1998).

Statíny inhibujú enzým HMG-CoA-reduktázu, čím sa znižuje intracelulárna syntéza nového cholesterolu a znižuje sa koncentrácia LDL. Účinky statínov nie sú len výsledkom ich pôsobenia na aterogénne lipidy, ale majú aj nelipidové, tzv. pleiotropné účinky. Najdôležitejšími spomedzi pozitívnych pleiotropných účinkov statínov sú protizápalové, antiproliferačné, anti-trombotické vlastnosti a zmiernenie endotelovej dysfunkcie (Pella et al., 2007). Statíny majú schopnosť zvýšiť syntézu oxidu dusnatého (NO) a zlepšovať krvný prietok závislý od endotelu (Marchesi et al., 2000; Forgione et al., 2000). Zlepšenie funkcie endotelu môže byť jedným z mechanizmov, ktorými je pri hypolipidemickej liečbe zabezpečovaná stabilita aterosklerotických plakov a znížené riziko trombózy.

Z negatívnych pleiotropných účinkov treba spomenúť zníženie syntézy geranylpyrofosfátu, s čím je spojená znížená hladina koenzýmu Q₁₀. Pri jeho deficite sú vlákna kostrových svalov náchylnejšie na poškodenie (myopatia, myozitída, až rabdomyolýza) (Singh et al., 2004). Táto problematika je predmetom aktuálne prebiehajúcich štúdií. Otázkou je klinická významnosť tohto javu, pretože nízka tvorba koenzýmu Q₁₀ ešte nemusí znamenať jeho klinicky významný nedostatok v plazme a zvlášť nie v cieľových tkanivách (Pella et al., 2007).

Napriek pozitívnemu vplyvu na hladinu lipidov v krvi, v roku 2012 FDA upozornila na fakt, že statíny môžu zvýšiť glykémiu a podiel glykozylovaného hemoglobínu v krvi. Nedávne štúdie (JUPITER, PROVE-IT TIMI 22) poukázali na zvýšené riziko diabetu pri vysokodávkovej terapii statínmi.

Inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu (ACEI) zasahujú do systému renín-angiotenzín-aldosterón, tým že inhibujú premenu angiotenzínu I na angiotenzín II. Angiotenzín II je jedna z najsilnej-

ších vazokonstrikčných látok cirkulujúcich v tele. Účinkuje ako na artérie, tak aj na vény a zvyšuje tlak krvi. Angiotenzín II zároveň zvyšuje hladinu aldosterónu, ktorý potencuje renálnu reabsorpciu sodíka. Inhibícia ACE znižuje tvorbu angiotenzínu II a odbúravanie bradykinínu, ktorý má výrazný vazodilatačný efekt. Angiotenzín II blokuje tvorbu oxidu dusnatého, podporuje tvorbu prooxidačných látok, zvyšuje uvoľňovanie noradrenalínu, zvyšuje tvorbu endotelínu-1 a koncentráciu aldosterónu (Karetová a Bultas, 2003). Zdá sa, že ACEI zlepšujú funkciu endotelu v subkutánnej, epikardiálnej, brachiálnej a renálnej cirkulácii, ale nevplyvajú na oslabenú relaxačnú odpoveď ciev predlaktia na acetylcholíu u pacientov s esenciálnou hypertenziou (Taddei et al., 2002).

Estrogény majú významný účinok na cievnu fyziológiu a patofyziológiu, napriek tomu vplyv estrogénov na prevenciu a liečbu kardiovaskulárnych chorôb je kontroverzný (Miller a Duckles, 2008). Ženy pred menopauzou majú nižší výskyt kardiovaskulárnych ochorení v porovnaní s rovnako starými mužmi (Lloyd-Jones et al., 2010). Napriek tomu viaceré klinické štúdie zaoberajúce sa hormonálnou substitučnou terapiou nepreukázali kardiovaskulárny benefit (Hulley et al., 1998; Manson et al., 2003; Anderson et al., 2004). Miller a Duckles (2008) v prospektívnej štúdií rozdelili ženy podľa veku od menopauzy a zistili, že vazodilatácia ciev predlaktia, ako indikácia funkcie endotelu, sa zosilnila po 3-mesačnej perorálnej estrogénovej terapii. Avšak Vitale et al. (2008) pozorovali, že miera zlepšenia vazodilatácie sa znížila v korelácii s počtom rokov po menopauze. Sú potrebné ďalšie prospektívne štúdie, ktoré by poskytli dodatočné údaje týkajúce sa rýchlosti zmien endotelových funkcií po menopauze a ich ovplyvnenia estrogénmi.

Z perorálnych antidiabetík **metformín** priaznivo pôsobí na endotel a dokázalo sa, že účinky tejto látky znižujú kardiovaskulárne riziko u pacientov s DM2. Preukazuje pozitívny vplyv na produkty oxidačného stresu, formovanie koncových produktov pokročilej glykácie, aktivitu endotelovej NO-syntázy, expresiu adhezívnych molekúl a prozápalových cytokínov (Drobná et al., 2011).

Flavonoidy sa podieľajú sa na svetle závislej fáze fotosyntézy, počas ktorej katalyzujú prenos elektrónov. Okrem štandardnej terapie pri chronickej venózne insuficiencii sa aplikujú pri diabetickej retinopatii, pri hemoroidoch a metrorágii (Štvrtinová, 2005). Opakovane sa potvrdili priaznivé účinky flavonoidov v diéte na kardiovaskulárny systém (Mojžišová a Kuchta 2001; Zenebe et al. 2001). Flavonoidy vplyvajú pozitívne na koronárne a ostatné cievy tým, že znižujú oxidáciu LDL, zvyšujú hladinu HDL. Okrem toho znižujú vylučovanie mediátorov mastocytmi a potláčajú zápalovú reakciu.

Melatonín je epifyzárnny hormón vylučovaný v noci vplyvajúci na cirkadiánne a sezónne rytmy. Pri dlhodobom podávaní spontánne hypertenzným potkanom mal pozitívny vplyv na krvný tlak a endotelovú funkciu aorty (Török et al., 2005). Melatonín zmenšoval kontrakčné odpovede mezenterálnych artérií vyvolané stimuláciou nervových zakončení v stene cievy ako u potkanov kmeňa Wistar-Kyoto, tak aj u spontánne hypertenzných potkanov. Melatonín vyvolával dávkovo-závislú relaxáciu a. pulmonalis a truncus pulmonalis, ak bol bazálny tonus zvýšený fenylefrínom (Líšková et al., 2006).

Záver

Farmaká ako sulodexid, heparín, statíny, inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu a metformín popri

ovplyvňovaní základného ochorenia vplyvajú priaznivo na endotelovú dysfunkciu. Ich potenciálny dosah na funkciu endotelu by mal byť v budúcnosti zhodnotený v ďalších klinických a experimentálnych štúdiách, a to najmä u látok s nejednoznačne potvrdeným protektívnym účinkom. Zároveň je dôležité preskúmať, do akej miery sa ovplyvnenie dysfunkcie endotelu prejavuje v zmenách mortality a morbidita pacientov.

Práca vznikla za pomoci grantov VEGA MŠ 1/0501/11 a 1/0583/13.

Zoznam použitej literatúry

1. Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, et al. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: The Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291: 1701-1712.
2. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91: 3527-61.
3. Cosmi B, Cini M, Legnani C, Pancani C, Calanni F, Coccheri S. Additive thrombin inhibition by fast moving heparin and dermatan sulfate explains the anticoagulant effect of sulodexide, a natural mixture of glycosaminoglycans. *Thromb Res* 2003; 109: 333-339.
4. Drobná V, Jankyová S, Tisoňová J, Dukát A, Kristová V, Mačugová A, Kostková L, Wawruch M. Perorálne antidiabetiká a ich vplyv na endotelovú dysfunkciu. *Klinická farmakologie a farmácie* 2011; 25: 1.
5. Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J. Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15: 409 – 415.
6. Hulley S, Grady D., Bush T, et al. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study Research Group. *JAMA* 1998; 280: 605-613.
7. Karetová D, Bultas J. Inhibicí angiotenzin konvertujúceho enzýmu k priaznivému ovplyvneniu funkcie endotelu a sníženiu kardiovaskulárnej

- morbidity a mortality. Interní medicína pro praxi 2003; 4: 190 – 194.
8. Kristová V, Líšková S, Sotníková R, Vojtko R, Kurtanský A. Sulodexide improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Physiol Res* 2008; 57: 491-494.
 9. Líšková S, Török J, Kristová V. Ovpływňovanie reactivity ciev kráľika melatonínom, Recenzovaný zborník prác k príležitosti 10. výročia Švecovho memoriálu 2006; 22-26.
 10. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics – 2010 update a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010; 121: e46-e215.
 11. Manson JE, Hsia J, Johnson KC, et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003; 349: 523-534.
 12. Marchesi S, Lupattelli G, Schillaci G, et al. Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 36: 617 – 621.
 13. Miller V.M., Duckles S.P.: Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. *Pharmacological Reviews*, 2008, 60/2, p. 210-241.
 14. Mojžišová G, Kuchta M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol Res* 2001; 50: 529-535.
 15. Pella D, Vargová V, Fedačko J, Raši R. Statíny – majú dominantné miesto v kardiovaskulárnej prevencii? Lipidy znižujúce pleiotropné účinky statínov. *Via pract* 2007; 4/1: 22–28.
 16. Penka M.: Sulodexidum. *Remedia* 1996; 6/4: 206-211.
 17. Singh RB, Rastogi SS, Mechírová V. Significance of coenzyme Q10 in statin intoxication. *Intern. J Cardiol* 2004; 97/2: 18.
 18. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs* 2002; 62/2: 265-284.
 19. Štvrtinová V. Venofarmaká v liečbe chronickej žilovej insuficiencie. *Via Pract* 2005; 2/9: 337-341.
 20. Török J, Líšková S, Paulis L, Krajčirovičová K, Pecháňová O, Šimko F. Cardiovascular effect of melatonin in rats with experimental hypertension. *Physiol Res* 2005; 54: 46.
 21. Vitale C., Mercurio G., Cerquetani E., Marazzi G., Patrizi R., Volterrani M., Fini M., Collins P., and Rosano G.M.: Time since menopause influences the acute and chronic effect of estrogens on endothelial function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, 28, p. 348-352.
 22. Zenebe W, Pecháňová O, Bernátová I. Protective effects of red wine polyphenolic compounds on the cardiovascular system. *Exp Clin Cardiol* 2001; 6: 153-158.

Vplyvy nosovej sliznice v „up“ a „down“ regulácii kašľa – možnosti terapeutického využitia

Jana Plevková, Mariana Brozmanová, Renáta Péčová, Silvia Gavliaková, Zuzana Biringerová, Tomáš Buday, Miloš Tatár

Ústav patologickej fyziológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin
e-mail: jplevkova@gmail.com, plevkova@jfmmed.uniba.sk

Úvod do problematiky

Dýchací systém komunikuje s atmosférickým vzduchom, ktorý okrem fyziologických zložiek obsahuje aj látky, ktoré môžu mať škodlivý vplyv na dýchací systém a organizmus ako celok. Práve preto je dýchací systém vybavený radom obranných a ochranných mechanizmov, ktorých hlavnou úlohou je zabránenie vniknutia škodliviny do dýchacieho systému alebo jej odstránenie z dýchacích ciest. Reflexné a nereflexné obranné mechanizmy navzájom spolupracujú a dopĺňajú sa. Najdôležitejším obranným reflexným mechanizmom dýchacích ciest je kašeľ (Widdicombe, 1995).

Kašeľ je polysynaptický reflexný dej, ktorý vzniká podráždením aferentných nervových zakončení v dýchacích cestách v tzv. tusigénnych oblastiach a primárne je možné identifikovať jednotlivé populácie neurónov, ktoré sa podieľajú na jeho vzniku a modulácii. Ide o neuróny vágového systému, ktorých telá sú lokalizované v nodózných a jugulárnych gangliách a ich periférne zakončenia sú distribuované v dýchacích cestách. Kašeľ je exkluzívne vágový reflex (Canning a Mori, 2011). Reflex je definovaný ako stereotypná reakcia sprostredkovaná reflexným oblúkom po adekvátnom nadprahovom podráždení príslušných receptorov. Hoci by sa zdalo, že kašľový reflex a jeho oblúk ako také sú rigidné štruktúry, nie je tomu celkom tak. Posledná dekáda výskumu kašľa sa venuje jeho plasticite – možnostiam jeho modu-

lácie tak na periférnej ako aj centrálnej úrovni (McAlexander a Carr, 2009).

Tak ako každý proces v organizme, aj kašeľ je regulovaný. Hoci nie je presne definované čo znamená „fyziologický“ kašľový reflex, vychádzajúc z jeho úlohy je možné konštatovať, že adekvátne regulovaný kašľový reflex zabezpečuje dostatočnú obranu dýchacích ciest pričom nepoškodzuje tkanivá, nespôsobuje vznik nežiaducich reakcií a neovplyvňuje kvalitu života pacienta. Dysregulácia v prípade kašľového reflexu môže mať dve podoby. Ako prvá je to up-regulácia kašľa kedy je kašeľ príliš silný, trvá viac ako 3-8 týždňov, vzniká aj na podnety, ktoré u iných subjektov nemajú tusigénny potenciál, poškodzuje tkanivá, ovplyvňuje kvalitu života pacienta (Woodcock et al., 2010). Vyskytuje sa pri chronických ochoreniach dýchacieho systému, gastroezofágovom refluxe či rinosinopatiách. Na druhej strane down-regulácia kašľa – jeho oslabenie, môže viesť k nedostatočnej ochrane dýchacieho systému a následnému vzniku ochorení, ako príklad je možné uviesť pacientov po transplantácii, s neurologickými poruchami, svalovými atrofiami alebo v bezvedomí, kde oslabenie kašľa môže viesť k aspiračnej pneumónii (Widdicombe & Singh, 2009).

Štúdium up-regulácie kašľa pomáha identifikovať mechanizmy, ktoré sa môžu potenciálne podieľať na patogenéze syndrómu chronického kašľa, či hypersenzitívneho kašľového syndrómu. Na druhej strane môžu napomáhať pri hľadaní tera-

apeutických intervencií, ktoré môžu byť použité u pacientov s oslabeným kašľovým reflexom, ako sú seniori, alebo pacienti po cievnej mozgovej príhode. Štúdie down – regulácie kašľa, predovšetkým farmakologické štúdie majú význam pri identifikácii nových cieľov, ktoré by mohli mať potenciálne klinické využitie. Ako príklad je možné uviesť, že identifikácia TRPV1 kanála, ako „receptora relevantného pre vznik kašľa viedla k príprave TRPV1 antagonistov a ich klinickému testovaniu (Smith et al., 2012). Tieto však spôsobujú problémy s reguláciou telesnej teploty a preto sa pozornosť upriamuje na TRPA1 antagonistov, keďže TRPA1 kanál je tiež jedným z potenciálne využiteľných cieľov pri liečbe kašľa (Birrel et al., 2009).

Kašeľ a rinosinopatie

Veľmi častou príčinou up regulácie kašľa sú ochorenia nosovej dutiny a prínosových dutín – rinosinopatie. Kašeľ v tomto prípade vzniká aj za podmienok, že patologický proces je lokalizovaný v horných dýchacích cestách (nosovej dutine), pričom dolné dýchacie cesty nie sú týmto patologickým procesom postihnuté. Napriek značnému pokroku v štúdiách zameraných práve na túto problematiku, nie sú všetky mechanizmy vzniku a pretrvávania kašľa pri rinosinopatiách dostatočne vysvetlené.

V minulosti sa kašeľ pri rinosinopatiách považoval za dôsledok zatekania hlienu z nosovej dutiny do faryngu a laryngu s následným dráždením štruktúr laryngálneho vstupu so vznikom kašľa – post nasal drip syndróm (Irwin et al., 1998). Keďže tento fenomén nie je presne definovaný a nie vždy je jediným mechanizmom, ktorý prispieva k modulácii kašľa pri rinosinopatiách došlo na základe nových poznatkov k zmene terminológie a termín post nasal drip syndróm sa dnes nazýva ako „kašeľ asociovaný ochoreniam horných dýchacích ciest“. Tento termín

pochádza z anglosaskej literatúry a bežne sa používa jeho skratka UACS – upper airway cough syndrome (Pratter et al., 2006).

Up- regulácia kašľa

Staršie práce Irwina a iných klinických pracovníkov predpokladali, že kašeľ vzniká priamo stimuláciou aferentných nervových zakončení v sliznici nosovej dutiny, a/ alebo sinusov, pričom táto hypotéza nebola nikdy dokázaná. Neskôr sa vedci prikláňali k názoru, že výskyt kašľa pri rinosinopatiách je dôsledkom iných mechanizmov, ktoré by ovplyvňovali reflexný oblúk kašľa. Tieto mechanizmy zahŕňajú už spomínané zatekanie hlienu po zadnej stene hltana, nasobronchiálny reflex, neadekvátnu úpravu vdychovaného vzduchu, mikroaspiráciu zápalového aerosólu, propagáciu zápalu cestou systémovej cirkulácie a mechanizmy centrálnej a periférnej neuroplasticity (Tatar et al., 2009).

Pacienti s ochorením horných dýchacích ciest rôznej etiológie majú zvýšenú citlivosť kašľového reflexu – to znamená, že na vyvolanie kašľa sú potrebné menej intenzívne stimuly v porovnaní s ostatnou zdravou populáciou (O’Connel et al., 1996, Péčová et al., 2001). Podnety, na ktoré kašú pacienti s rinosinopatiou sú pre zdravých jedincov podprahové.

Nosová dutina je prvou časťou dýchacieho systému, ktorá komunikuje s vdychovaným vzduchom a časticami, či chemikáliami v ňom obsiahnutými. V prípade, že dôjde k detekcii potenciálne škodlivých látok prostredníctvom trigemínálnych ale aj olfaktorických zakončení, dochádza k iniciovaniu ochranných mechanizmov (apnoe), alebo obranných mechanizmov (kýchanie, sniffing). Úlohou týchto dejov je zabezpečiť ochranu a obranu dolných dýchacích ciest tak, aby príslušná noxa do nich nevnikla. Na základe týchto skutočností sme postulovali hypotézu, ktorú sme neskôr overovali v experimentálnych ako aj klinicko-

patofyziologických štúdiách. Predpokladali sme, že stimulácia aferentných nervových zakončení v nosovej dutine môže modulovať kašeľ a síce, že pri stimulácii nazálnych nociceptorov dochádza k up regulácii kašľa. Zmyslom up regulácie obranných mechanizmov pri rinosinopatiách je posilniť ich tak, aby sa minimalizovala možnosť šírenia patologického procesu z nosovej dutiny do ďalších častí dýchacích ciest. V prípade rinosinopatií, alebo v prípade prítomnosti vzdušných polutantov dráždiacich trigeminálne zakončenia má táto facilitácia opodstatnenie a svoj logický význam.

V experimentálnych prácach bolo dokázané, že stimulácia trigeminálnych nociceptorov kapsaicínom a histamínom nevedie k vzniku kašľa u laboratórných zvierat. Avšak počas stimulácie nazálnych nociceptorov kapsaicínom dochádza k facilitácii mechanicky vyvolaného kašľa u anestézovaných mačiek. Podanie kapsaicínu facilituje kašeľ vyvolaný inhaláciou kyseliny citrónovej u bdelych morčiat a kašeľ vyvolaný mechanickou stimuláciou dýchacích ciest u anestézovaných morčiat. Súčasne v tomto experimentálnom usporiadaní u bdelych morčiat došlo po stimulácii nazálnych nociceptorov k vzostupu špecifického odporu dýchacích ciest meraného Pennockovou metódou (Plevkova et al., 2004a). Tento fenomén je popisovaný ako nasobronchiálny reflex, a hoci kašeľ a bronchokonstrikcia sú rozdielne regulované, k ich vzájomným interakciám, ktoré či už na periférnej úrovni (mechanosenzitívne vlákna aktivované pri zúžení dýchacích ciest), alebo centrálnej úrovni (konvergencii vlákien zodpovedných za kašeľ a bronchokonstrikciu do nTs) (Mazzone a Canning, 2002).

Zosilnenie kašľovej odpovede sme zistili aj počas intranazálneho podania kapsaicínu u zdravých dobrovoľníkov a histamínu u zdravých dobrovoľníkov

a pacientov s alergickou rinitídou (Plevkova et al., 2004b, 2005, 2006).

Facilitácia obranných reflexov sa netýkala len kašľa, ale aj expiračného reflexu. Expiračný reflex je mechanizmus vyvolaný dráždením mediálneho okraja hlasiviek, pričom dochádza iba k expiračnému úsiliu, ktoré nie je predchádzané inšpiriou. U zvierat s experimentálne alergickou rinitídou ako aj v modeli intranazálneho podania agonistu TRPV1 kanálov kapsaicínom došlo k zvýšeniu intenzity expiračného reflexu. Keďže expiračný reflex je zvyčajne nasledovaný niekoľkými kašľovými expulziami, zaznamenali sme aj zvýšenie intenzity kašľa po expiračnom reflexe. Výsledky histologických vyšetrení tak pri rinitíde, ako aj intranazálnom podaní kapsaicínu ukázali, že zatiaľ čo v nosovej sliznici bol prítomný buď eozinofilný zápal alebo vazodilatácia a edém, sliznica laryngu nevykazovala žiadne zmeny v porovnaní s kontrolnými skupinami zvierat (Plevkova et al., 2009).

V našich experimentoch sme dokázali, že stimulácia aferentných nervových zakončení kapsaicínom a histamínom facilituje kašeľ. Ako pravdepodobný mechanizmus sa tu môže uplatňovať centrálna senzibilizácia – ovplyvnenie neurogenézy kašľového vzoru na úrovni mozgového kmeňa. Konvergencia jednotlivých aferentných vstupov na úrovni mozgového kmeňa tak vytvára možnosti pre anatomicke a funkčné interakcie jednotlivých neurónov participujúcich na neurogenéze dýchania a kašľa. Predpokladá sa, že zvýšený tok aferentných impulzov z nociceptorov privádzaných cez trigeminálne zakončenia do oblasti mozgového kmeňa môže modulovať aktivitu neurónov druhého a vyšších rádov v nTs (nucleus tractus solitarii). NTs je miestom, kde dochádza k interpolovaniu neurónov prvého rádu – primárnych aferentov z dýchacích ciest, včítane „kašľových“ a následne ak intenzita podnetov je dostatočne silná,

dochádza k vzniku kašľa aktiváciou jeho generátora v centrálnom nervovom systéme (Canning a Mori, 2009). Hoci primárne senzitivne vlákna z nosovej dutiny sú interpolované na neuróny vyšších rádov v senzitivnom jadre n. V. tieto aferenty majú spoje aj do chemosenzitivných oblastí ako area postrema, ale aj mediálneho nTs (Wallois a s pol., 1991). Pomocou detekcie c-fos génu a jeho génového produktu sme ukázali, že intranazálne podanie látok s nocifenzívnym potenciálom vyvoláva aktiváciu neurónov v trigeminálnom senzitivnom jadre a okrem neho aj v nTs, čím môže zasahovať do modulácie vstupov do „kašľového generátora“. Zvýšená fos pozitivita bola detegovaná aj vo VRG – ventrálnej respiračnej skupine, (nc. ambiguus a retroambigus), ktoré obsahujú primárne premotorické a motorické expiračné neuróny. Touto aktiváciou je možné hypoteticky vysvetliť zvýšenú silu expírií pri kašli vyvolanom počas nociceptívnej stimulácie nosovej sliznice. Podobná distribúcia fos pozitivity bola detegovaná aj v mozgovom kmeni morčiat s modelom experimentálnej alergickej rinitídy – teda senzibilizovaných jedincov, kde sa predpokladá prítomnosť nervovej hypersenzitivity a hyperreaktivity spôsobená zápalom (Plevkova et al., 2010, 2011).

Modely zápalových ochorení u morčiat jednoznačne dokazuje, že citlivosť kašľového reflexu je pri rininíde zvýšená (Brozmanová et al., 2008) a táto modulácia sa vracia k normálnym hodnotám pri lokálnej liečbe kortikosteroidmi i antagonistami leukotriénových receptorov (Brozmanová et al., 2005). Tento mechanizmus má korelát aj v klinických podmienkach, kde citlivosť kašľového reflexu u pacientov s alergickou rinitídou je zvýšená už mimo peľovej sezóny a signifikantne sa zvyšuje v čase, kedy sú jedinci exponovaní alergénu. Táto modulácia taktiež reaguje na liečbu lokálnymi kortikosteroidmi (Péčová et al., 2005).

Down regulácia kašľa

V biologických systémoch sú regulácie zabezpečované prostredníctvom slučiek negatívnych a pozitívnych spätných väzieb, ale aj antagonisticky pôsobiacich systémov. Ako príklad je možné uviesť sympatikový vs parasympatikový systém či nociceptívny vs antinociceptívny systém. Ak existuje nervová dráha, vychádzajúca primárne z trigeminálnych nervových zakončení ktorá facilituje kašeľ, môže existovať aj dráha, ktorá ho dokáže inhibovať. V našich prácach sme sa zamerali na štúdium rôznych populácií trigeminálnych neurónov a na základe analýzy relevantných informácií z literatúry, sme sa zamerali na populáciu exprimujúcu TRPM8 kanál a jeho agonistu mentol.

Mentol je látka prírodného pôvodu, ktorú je možné získať z výťažku rastlín rodu mäta, ale je možné ho pripraviť aj synteticky. Ide terpén, ktorý má anestetické, upokojujúce a chladivé účinky po aplikácii na kožu a sliznice. Dlhé stáročia bol súčasťou tradičných východných medicín a do Európy sa dostal v 17. – 18. storočí. Využíva sa empiricky pri symptomatickej liečbe ochorení dýchacích ciest a je súčasne pridávaný do rôznych kozmetických prípravkov, pastiliek, cukríkov a podobne. Identifikácia molekulárneho mechanizmu účinku posúva túto látku z oblasti herbálnej medicíny do spektra záujmu molekulárnej farmakológie. Receptor pre mentol – TRPM8 kanál je súčasne aj termosenzorom a reaguje na teploty v intervale tzv „mierneho chladenia“ (McKemy 2002).

Je známe, že inhalácia mentolu vedie k supresii kašľa, ako to ukázali Morice a jeho kolegovia na modeli u morčiat, ale aj dobrovoľníkoch. Existujú však aj práce, ktoré nepotvrdzujú tento výsledok, a síce ide o štúdie kašľa u detí a štúdiu supresie kašľa pri bronchoskopii v prípade predliečenia 1% mentolom (Laude et al., 1994, Morice et al., 1998, Haidl et al., 2001, Kenia et al., 2008). Otázka je, aké mecha-

nizmy sa podieľajú na antitusickej aktivite mentolu.

Zo štúdií u morčiat je známe, že expresia TRPM8 je vysoká v horných dýchacích cestách a že len 8-16% vágových vlákien v dolných dýchacích cestách exprimuje TRPM8. Zamerali sme sa na štúdium značených trigeminálnych neurónov, ktoré sme nazbierali z disociovaných neurálnym retrográdnym tracerom označených ganglií po 7 dňoch od podania farbiva. Metodikou single cell-rt PCR sme dokázali, že až 60% trigeminálnych neurónov exprimuje TRPM8, v porovnaní s nízkym percentom v dolných dýchacích cestách a že existuje špecifická subpopulácia neurónov, ktoré nie sú nociceptory – ide o TRPV1-/TRPM8+ pozitívne neuróny, ktoré by práve mohli byť relevantné pre down reguláciu kašľa. Distribúciu TRPM8+ pozitívnych neurónov sme dokázali aj selektívnym podaním mentolu do horných dýchacích ciest, trachey a dolných dýchacích, kde sme zaznamenali signifikantný antitusický efekt len v prípade intranazálneho podania mentolu.

Zamerali sme sa na sériu experimentov s intranazálnou aplikáciou studeného vzduchu a dvoch izomérov mentolu u anestézovaných morčiat a zistili sme, že intranazálne podanie mentolu, ako aj aplikácia studeného vzduchu ~ 20 °C má antitusický účinok na kašeľ vyvolaný kyselinou citrónovou u anestézovaných morčiat aj bdelych jedincov v porovnaní s vehikulom a (+) mentolom, čo je izomér s nižším biologickým účinkom (Plevková et al., 2011). Sú známe práce, kde po intranazálnom podaní vody bola tiež dokumentovaná znížená intenzita kašľa – respektíve inhibícia kašľa (Poussel et al., 2012). Tento mechanizmus sa dáva predovšetkým do súvislosti s reguláciou dýchania a síce je všeobecne akceptované, že dýchanie a kašeľ sú regulované rovnakým smerom –

to znamená že podnety spôsobujúce supresiu dýchania suprimujú aj kašeľ a naopak. Tieto výsledky vyplývajú z prác Tatára et al. (2002). Mentol po intranazálnej aplikácii taktiež spôsobuje zníženie frekvencie dýchania, a tento vplyv nie je možné úplne vylúčiť – čiže nie je jednoznačne dokázané, že tento modulačný vplyv je špecifický len pre TRPM8 relevantné podnety, pravdepodobne akýkoľvek podnet dostatočne silný na supresiu dýchania môže inhibovať kašeľ.

V translačnej štúdiu u zdravých dobrovoľníkov sme postup modifikovali, a podali sme intranazálne vehikulum, a oba izoméry mentolu – (+) mentol aj (-) mentol. Zistili sme že intranazálna aplikácia mentolu signifikantne zvyšuje kašľový prah, redukuje nutkanie na kašeľ ako aj kumulatívnu kašľovú odpoveď u dobrovoľníkov. Prekvapivé boli výsledky, ktoré ukazujú, že (+) mentol dosiahol vyššiu účinnosť než (-) biologicky efektívnejší izomér. Analýzou subjektívnych pocitov dobrovoľníkov sme zistili, že išlo predovšetkým o fenomén „vône“ podanej látky, pričom (+) mentol má príjemnejšiu vôňu (Plevková et al., 2012). Testovali sme následne ako negatívnu kontrolu thymol – látku s príjemnou vôňou (pôvodom z rastliny *Thymus vulgaris*). Thymol patrí medzi fenoly, a má antimikrobiálne, antioxidantné a fungicídne vlastnosti. Jeho molekulárny mechanizmus účinku je zabezpečený prostredníctvom TRPV3 kanála, ktorý je bohato exprimovaný na koži, jazyku a neurónoch pôvodom z DRG, vrátane trigeminálneho systému (Haoxing et al., 2002). Zistili sme, že po intranazálnom podaní tymolu dochádza k supresii kašľa a výraznej eliminácii nutkania na kašeľ (Gavliakova et al., zatiaľ neublikované). Súčasne v klinicko – patofyziologických štúdiách sme zistili, že podanie látok s nepríjemným zápachom – napríklad allylthiocyanát facilituje nutkanie na kašeľ. Postulovali sme hypotézu, že do tejto re-

gulácie sa zapája aj olfaktorický systém a následne kôrové mechanizmy, ktoré ovplyvňujú nutkanie na kašeľ. Je známe, že kašeľ, je okrem aferentných vstupov a reflexných mechanizmov modulovaný aj kortikálnymi - psychickými a behaviorálnymi mechanizmami a o jeho supramedulárnych reguláciách je známe len málo. Do úvahy prichádza aj mechanizmus placebo účinku pri aplikácii čuchových podnetov (Prof. Eccles, osobná komunikácia). Okrem toho je potrebné zvážiť aj trigemino-olfaktorické interakcie.

Farmakologické aplikácie poznatkov pri kašli asociovanom s rinosinopatiami

V prípade rinosinopatií zápalovej etiológie je kašeľ efektívne kontrolovaný zvládaním zápalového procesu v horných dýchacích cestách. Preto je vhodné podávanie lokálnych prípravkov s protizápalovým účinkom – kortikosteroidov, antihistaminík a antagonistov leukotriénov, ktoré ovplyvňujú primárny patologický proces – zápal a redukujú jeho sekundárne dôsledky - produkcia hlienu, opuch sliznice a pod, ktoré následne ovplyvňujú dolné dýchacie cesty. Na zváženie je podanie prípravkov obsahujúcich lokálne anestetiká. Ďalej je vhodné aplikovať aromatické látky mentol, thymol, eucalyptol, ktoré majú dokázaný antitusický účinok aj ako izolované látky podané lokálne na sliznicu nosa, avšak aj ako súčasť výťažkov rastlín (nikdy nie je možné do detailov definovať ich zloženie). Pretože mnohé z týchto výťažkov majú bronchodilatačný a sekretomotorický účinok, čím napomáhajú obrane dýchacích ciest, kašľová odpoveď sa môže znížiť. Nezanedbateľný je účinok placebo, ktorý ako vyplýva z niektorých štúdií predstavuje až 80% účinku bežne dostupných antitusických liečiv (Eccles 2006).

Zoznam použitej literatúry

1. Birrell MA, Belvisi MG, Grace M, Sadofsky L, Faruqi S, Hele DJ, Maher SA, Freund-Michel V, Morice AH. TRPA1 agonists evoke coughing in

- guinea pig and human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(11): 1042-7.
2. Brozmanova M, Plevkova J, Bartos V, Plank L, Tatar M. Antileukotriene treatment and allergic rhinitis – related cough in guinea pigs. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(4): 21-30.
3. Brozmanova M, Plevkova J, Tatar M, Kollarik M. Cough reflex sensitivity is increased in the guinea pig model of allergic rhinitis. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59(6): 153-61.
4. Canning BJ, Mori N. Encoding of the cough reflex in anaesthetized guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300(2): 369-77.
5. Eccles R. Mechanisms of the placebo effect of sweet cough syrups. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 152(3): 340-8.
6. Haidl P, Kemper P, Butnarson SJ, Klanke M, Wehde H, Kohles D. Does the inhalation of 1% l - menthol solution in the premedication of fiberoptic bronchoscopy affect coughing and the sensation of dyspnoe? *Pneumologie* 2001; 55(3): 115-119.
7. Irwin RS, Boulet LP, Clouter MM. Managing cough as a defense mechanism and as a symptom. A consensus panel report of the American College of Chest physicians. *Chest* 1998; 144: 133-181.
8. Kenia P, Houghton T, Beardsmore C. Does inhaling menthol affect nasal patency and cough? *Pediatr Pulmonol* 2008; 43(6): 532-537.
9. Lande EA, Morice AH, Grattan TJ. The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious GP. *Pulm Pharmacol* 1994; 7(3): 179-184.
10. Mazzone SB, Canning BJ. Synergistic interactions between airway afferent nerve subtypes mediating reflex bronchospasm in guinea pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R86-R98.
11. McAlexander MA, Carr MJ. Peripheral mechanisms I: plasticity of peripheral pathways. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 187: 129-54.
12. McKemy DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 2005; 1: 16.
13. Morice AH, Marshal AE, Higgins KS, Grattan TJ. Effect of inhaled menthol on citric acid induced cough in normal subjects. *Thorax* 1999; 49: 1024-1026.
14. O'Connel F, Thomas VE, Studham JM, Pride NB, Fuller RW. Capsaicine cough sensitivity increases during upper respiratory infection. *Respir Med* 1996; 90: 279-286.
15. Pecova R, Vrlik M, Tatar M. Cough sensitivity in allergic rhinitis. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57(4): 289-296.

16. Plevkova J, Antosiewicz J, Varechova S, Poliacek I, Jakus J, Svirlochova K, Tatar M. Intranasal TRPV1 agonist capsaicin challenge and its effect on c fos expression in the guinea pig brainstem. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 173: 11-15.
17. Plevkova J, Brozmanova M, Gavliakova S, Calkovsky V, Poliacek I. Bidirectional modulation of urge to cough by nasal TRPA1 and TRPM8 agonists in healthy human subjects. *ERS Vienna 2012; Annual Congress*. 388 p.
18. Plevkova J, Brozmanova M, Pecova R, Tatar M. Effects of intranasal histamine on the cough reflex in subjects with allergic rhinitis. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(4):185-95.
19. Plevkova J, Brozmanova M, Pecova R, Tatar M. The effects of nasal histamine challenge on cough reflex in healthy volunteers. *Pulm Pharmacol Ther* 2006; 19(2): 120-7.
20. Plevkova J, Brozmanova M, Pecova R, Tatar M. Effects of intranasal capsaicin challenge on cough reflex in healthy human volunteers. *J Physiol & Pharmacol* 2004b; 55(3): 101-106.
21. Plevkova J, Kollarik M, Brozmanova M, Revallo M, Varechova S, Tatar M. Modulation of experimentally-induced cough by stimulation of nasal mucosa in cats and guinea pigs. *Respir Physiol & Neurobiol* 2004a; 142: 225-235.
22. Plevkova J, Poliacek I, Adamkov M, Svirlochova K, Varga I. Brainstem neuronal populations activated in the model of ovalbumine induced allergic rhinitis in guinea pigs. *Biologia* 2011; 66: 922-927.
23. Plevkova J, Svirlochova K, Adamkov M, Poliacek I, Jakus J, Tatar M. Expiration reflex from the vocal folds in a model of allergic rhinitis in guinea pigs. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60(5): 93-7.
24. Plevkova, J, Canning BJ, Poliacek I, Tatar M, Brozmanova M. Antitussive effect of (-) menthol – the role of nasal trigeminal TRPM8 afferents. 3rd American Cough Conference. New York 2011; [S.1].
25. Poussel M, Varechova S, Demoulin B, Chalon B, Schweitzer C, Marchal F, Chenuel B. Nasal stimulation by water down-regulates cough in anesthetized rabbits. *Respir Physiol Neurobiol* 2012; 183(1): 20-5.
26. Prater MR: Chronic upper airway cough syndrome secondary to rhinosinus diseases /previously referred to as postnasal drip syndrome/ ACCP – evidence based clinical practice guidelines. *Chest* 2006; 129: 72-74.
27. Smith JA, Mudroch R, Newlands A, Khalid S, Smart K, Kelsall A, Holt K, Dockry R, Woodcock A. The Impact of selective oral TRPV1 antagonist in patients with chronic cough. *Seventh International Symposium on Cough* 2012; abstract book: 76 p.
28. Tatar M, Plevkova J, Brozmanova M, Pecova R, Kollarik M. Mechanisms of cough associated with rhinosinusitis. *Pulm Pharmacol Ther* 2009; 22(2): 121–126.
29. Wallois F, Macron JM, Jounieaux V, Duron B. Trigeminal nasal receptors related to respiration and to various stimuli in cats. *Respir Physiol* 1991; 85: 11-125.
30. Widdicombe JG, Singh V. Physiological and pathophysiological down regulation of cough. *Respir physiol neurobiol* 2006; 150(2–3): 105–117.
31. Widdicombe JG. Neurophysiology of the cough reflex. *Eur Respir J* 1995; 8: 1193-1202.
32. Woodcock A, Young EC, Smith JA. New insights in cough. *Br Med Bull* 2010; 96 (1): 61-73.
33. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 2002; 418(6894): 181-6.

Vzťah glutamátergického a nitrergického systému v podmienkach bronchiálnej hyperreaktivity

Anna Strapková, Martina Antošová

Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

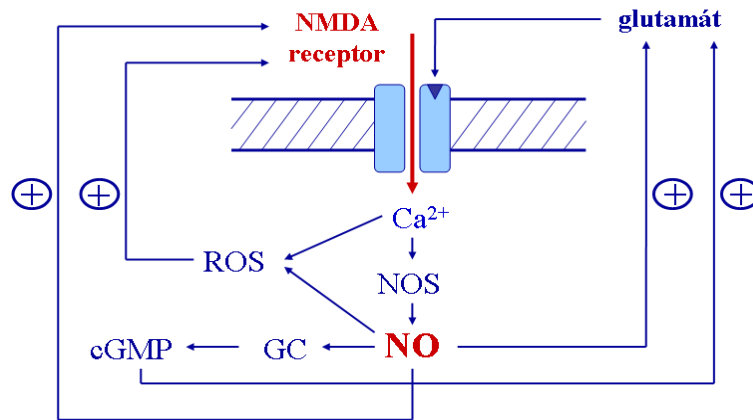
e-mail: astrapkova@jfmf.uniba.sk

Bronchiálna hyperreaktivita (BHR) je dôležitým príznakom rôznych respiračných ochorení (astma, chronická obštrukčná choroba pľúc, atď). Neustálu snahu o detailné objasnenie jej patogenézy rozšíril Hoang et al. (2006) o novú zaujímavú hypotézu, ktorá predpokladá v mechanizme vzniku astmy a jej symptómov (BHR) hyperexcitabilitu bunkovej membrány a nadmernú aktiváciu glutamátových NMDA receptorov (NMDAR). Výsledkom toho je excitotoxicita, poškodenie buniek, zápal a bronchokonstrikcia. Dôležitým excitačným neurotransmitterom je pritom glutamát, ktorý pôsobí prostredníctvom metabotropných (mGluR) a ionotropných (iGluR) glutamátových receptorov. Skupina ionotropných receptorov zahŕňa kationové kanály s väzbovými miestami pre rôzne ligandy. Je rozdelená do 3 subtypov: NMDA (N-metyl-D-aspartátové), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionátové) a kainátové receptory (Dickman et al., 2004). Prítomnosť NMDAR v respiračnom systéme zistili Said et al. (1999), ktorí poukázali aj na ich možnú úlohu v patogenéze akútneho poškodenia pľúc a bronchiálnej astmy.

Prítomnosť nadmerných množstiev glutamátu a nadmerná dlhodobější aktivácia NMDAR pôsobí na neuróny nepriaznivo a môže dokonca viesť k apoptóze buniek. Toto súvisí s influxom veľkého množstva vápnika do bunky, čo spúšťa aktiváciu niekoľkých enzýmových systémov (proteínkinázy, fosfolipázy, lipoxygenázu, cyklooxygenázy, proteázy, NO syntázy) a kaskád dejov vedúcich k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS). ROS opäť

aktivujú glutamátový receptor a vedú k poškodeniu tkaniva oxidatívnym stresom (Said et al., 2000). Vyvolávajú peroxidáciu lipidov, DNA, aktiváciu kaspáz, depléciu energetických zdrojov, čo v konečnom dôsledku vedie k bunkovej smrti. Tieto pochody sú zodpovedné napr. za vznik rôznych akútnych a chronických neurologických ochorení, na patogenéze ktorých sa podieľa glutamát (epilepsia, Parkinsonova, Alzheimerova choroba a pod).

Na regulácii funkcií respiračného systému sa podieľa aj nitrergický systém, kde pôsobí ako dôležitý inhibičný neurotransmitter oxid dusnatý (NO). V literatúre je veľmi málo údajov sledujúcich vzťah excitačného glutamátergického a inhibičného nitrergického systému. Na úrovni centrálného nervového systému stimulácia NMDAR má za následok zvýšenie tvorby NO ale aj jeho radikálu – peroxyinitritu (obr. 1). Obidva produkty pôsobia na NMDA receptory avšak rozdielnym mechanizmom. Kým NO zvyšuje stimuláciu NMDA receptorov, peroxyinitrit zvyšuje ich senzitivitu k rôznym stimulom (Pall, 2005, Hirooka et al., 2011). Nie je však doposiaľ jasné, či k podobným interakciám dochádza aj v oblasti respiračného systému a ako sa tieto interakcie uplatňujú pri vzniku niektorých respiračných ochorení a ich symptómov. To bol dôvod, pre ktorý sme sa snažili v našich experimentoch získať nové informácie o možnej účasti resp. interakcii obidvoch systémov v podmienkach experimentálne vyvolanej hyperreaktivity dýchacích ciest. Pokiaľ je nám známe z literárnych údajov, toto je prvá štúdia sledujúca uvedený vzťah.



Obr. 1 Interakcia glutamatergického a nitrergického systému (upravené podľa Hirooka et al., 2011).

Aktivita obidvoch systémov môže byť modulovaná zásahom na rôznych úrovniach. V našich podmienkach sme použili agonistu NMDA receptorov a inhibítor NO syntáz (NOS) samostatne alebo v kombinácii. Hodnotili sme zmeny reaktivity dýchacích ciest ako aj zmeny hladín vydychovaného NO (eNO) v experimentálnom modeli hyperreaktivity dýchacích ciest vyvolanej ovalbumínom. Detekcia eNO patrí totiž v súčasnosti medzi najmodernejšie neinvazívne metódy na detekciu a kontrolu zápalového procesu v dýchacích cestách.

Materiál a metódy

Na experimenty sme použili morčatá o hmotnosti 200-250 g. Zvieratá boli chované v centrálnom zverinci samostatne v klietkach. Pred i počas trvania experimentov dostávali plnohodnotnú potravu a vodu *ad libitum*. Použili sme 6 skupín zvierat ($n=8$), ktorým sme podávali buď agonistu NMDA receptorov – sodnú soľ glutamátu (MSG) v dávke 1g/kg intraperitoneálne (i.p.) alebo nešpecifický inhibítor NO syntáz - metylester N⁰-nitro-L-arginínu (L-NAME) v dávke 40 mg/kg i.p alebo kombináciu MSG s L-NAME. Látky sme podávali 14 dní jednak skupinám zvierat senzibilizovaných ovalbumínom (OVA) a jednak nesenzibilizovaným kontrolným skupinám (fyziol. roztok namiesto ovalbu-

mínu). V deň senzibilizácie (1., 3. a 14. deň experimentu) sme látky aplikovali 30 minút pred podaním ovalbumínu resp. fyziologického roztoku, v dňoch mimo senzibilizácie dostali zvieratá látky každý deň v rovnakom čase. Všetky substancie sme získali od firmy Sigma Aldrich®. Realizácia štúdie bola schválená Etickou komisiou JLF UK v Martine.

Vyvolanie hyperreaktivity dýchacích ciest

Hyperreaktivitu dýchacích ciest sme u morčiat vyvolali ovalbumínom (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ vo fyziologickom roztoku), ktorý bol zvieratám aplikovaný v stanovených časových intervaloch – v 1. deň 0.5 ml i.p. a 0.5 ml s.c., na 3. deň 1 ml i.p. a na 14. deň 1 ml inhalačne. Na inhaláciu ovalbumínu sme použili celotelový pletyzmograf (Hugo Sachs Electronic, type 885, Nemecoko) pre potkany a malé zvieratá.

Sledovanie reaktivity dýchacích ciest

Zmeny reaktivity dýchacích ciest sme sledovali v podmienkach *in vitro*. Zvieratá sme usmrtili 24 hodín po poslednej aplikácii ovalbumínu. Preparáty pripravené z trachey a pľúcneho tkaniva boli inkubované v orgánovom kúpeli s Krebsovým-Henseleitovým roztokom (110.0 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ NaCl, 4.8 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ KCl, 2.35 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ CaCl₂, 1.20 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ MgSO₄, 1.20 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ KHPO₄, 25.0 $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ Na-

HCO₃ a glukóza 10.00 mmol.ml⁻¹ v destilovanej vode) počas jednej hodiny. Roztok bol saturovaný pneumoxidom (95 % O₂ + 5% CO₂) pri teplote 37 ± 0,5 °C a pH 7,5 ± 0,1 a vymieňaný každých 10 minút. Na sledovanie zmien reaktivity sme použili „In vitro Isolated Tissue Bath System“ (Experimetria Ltd., Maďarsko), ktorým sme zaznamenávali zmeny amplitúdy kontrakcie preparátov hladkých svalov na kumulatívne dávky (10⁻⁸ – 10⁻³ mol.l⁻¹) histamínu alebo acetylcholínu (Sigma Aldrich®).

Analýza vydychovaného NO (eNO)

Na analýzu eNO sme použili chemiluminiscenčnú metódu založenú na detekcii žiarenia vznikajúceho chemickou reakciou NO a ozónu, ktorý je vytváraný v chemiluminiscenčnom analyzátore. Výsledný výstupný signál zodpovedá koncentrácii NO vo vstupnej vzorke. Vydýchnutý NO sme u spontánne dýchajúcich zvierat analyzovali pomocou štandardného klinického analyzátora NIOX® (Aerocrine, Švédsko), ktorý bol upravený na sledovanie eNO u malých laboratórnych zvierat zkomponovaním špeciálnej vzduchotesnej komory k analyzátoru (MR Diagnostic, Česká Republika). Každé zviera s možnosťou spontánneho dýchania bolo samostatne umiestnené v tejto komore po dobu 5 minút. Vzduch v komore bol privádzaný a odvádzaný cez regulačný dvojcestný ventil. Pre analýzu eNO sme vytvorili časový harmonogram korešpondujúci s procesom senzibilizácie. Zmeny eNO sme sledovali v presných časových intervaloch - 1., 3., 14. a 15. deň (24 hodín po poslednej inhalácii ovalbumínu).

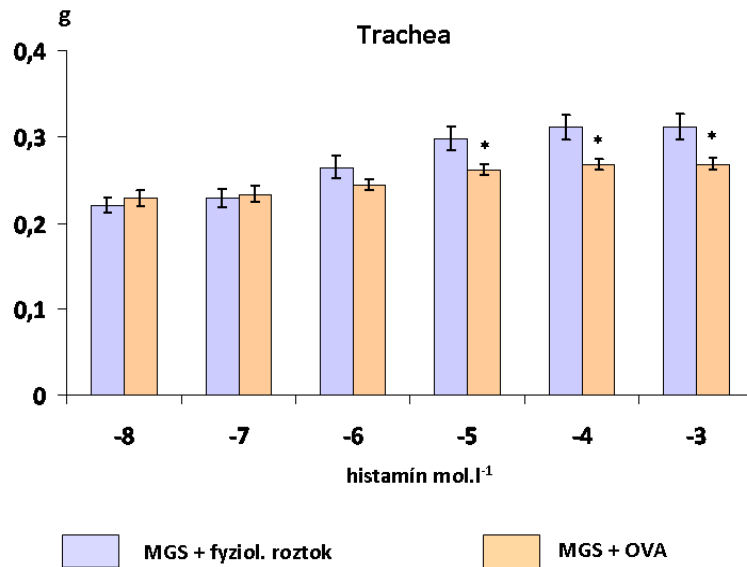
Štatistické spracovanie výsledkov

Výsledky sme štatisticky vyhodnotili pomocou štatistického softvéru programu Microsoft Excel. Rozdiely v odpovedi boli hodnotené Studentovým t-testom pre

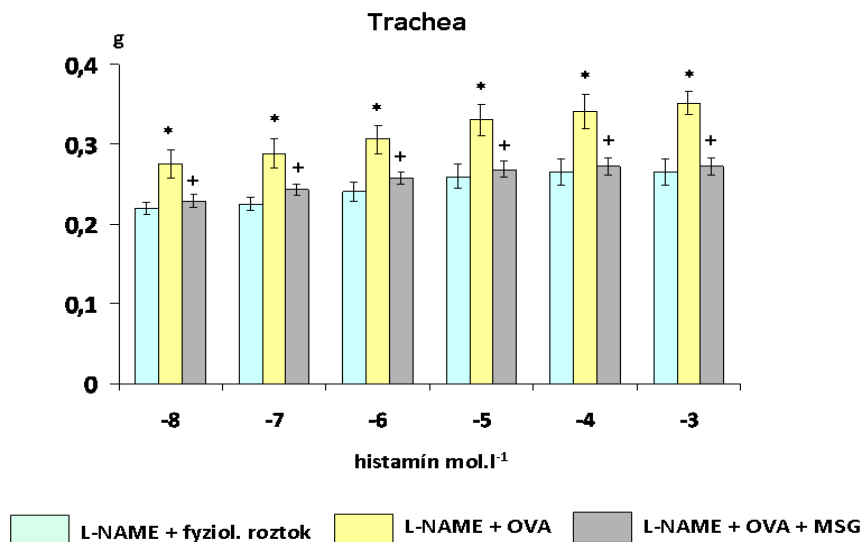
nerovnako veľké skupiny zvierat. Za štatisticky významne rozdielne boli považované hodnoty p<0.05.

Výsledky

Na obr. 2 sú znázornené zmeny reaktivity hladkého svalu trachey na histamín u morčiat senzibilizovaných ovalbumínom (oranžové stĺpce) v porovnaní s kontrolou – fyziologický roztok (modré stĺpce). Obidve skupiny dostávali agonistu NMDA receptorov – sodnú soľ glutamátu (MSG) v dávke 1g/kg i.p. počas celej doby senzibilizácie (14 dní), pričom na 1., 3. a 14 deň bola látka aplikovaná 30 minút pred ovalbumínom alebo fyziologickým roztokom. Podanie MSG mierne znížilo reaktivitu tracheálneho hladkého svalu na histamín u senzibilizovaných zvierat, štatisticky významne (p<0.05) v koncentráciách 10⁻⁵ až 10⁻³ mol.l⁻¹. V nižších koncentráciách sa odpoveď nemenila. Obr. 3 ukazuje zmeny reaktivity na histamín u kontrolnej skupiny zvierat, ktorá dostávala 14 dní L-NAME v dávke 40 mg/kg i.p. a v stanovené dni fyziologický roztok (zelené stĺpce), u skupiny, ktorá dostávala L-NAME v rovnakej dávke počas 14-dňovej senzibilizácie ovalbumínom (žlté stĺpce) a u skupiny senzibilizovanej ovalbumínom a liečenej 14 dní kombináciou L-NAME s MSG v rovnakých dávkach (šedé stĺpce). Pri porovnaní kontrolnej skupiny so skupinou senzibilizovanou ovalbumínom zvýšila inhibícia NO syntáz L-NAME štatisticky významne (p<0.05) odpoveď tracheálneho hladkého svalu na všetky koncentrácie histamínu (10⁻⁸ až 10⁻³ mol.l⁻¹). Simultánne podanie agonistu NMDA receptorov – MSG s L-NAME senzibilizovaným zvieratám vyvolalo pokles amplitúdy kontrakcie na všetky koncentrácie histamínu ku hodnotám, aké boli zaznamenané u kontrolnej skupiny.



Obr. 2 Zmeny amplitúdy kontrakcie hladkého svalu trachey na histamín po aplikácii MSG počas 14 dní u kontrolnej skupiny (MSG + fyziol. roztok - modré stĺpce) a u skupiny senzibilizovaných zvierat (MSG + OVA - oranžové stĺpce). Stĺpce predstavujú priemerné hodnoty amplitúdy kontrakcie so strednou chybou priemeru \pm S.E.M. Os x – koncentrácie histamínu v log mol.l⁻¹, os y – amplitúda kontrakcie v gramoch. * $p < 0.05$.



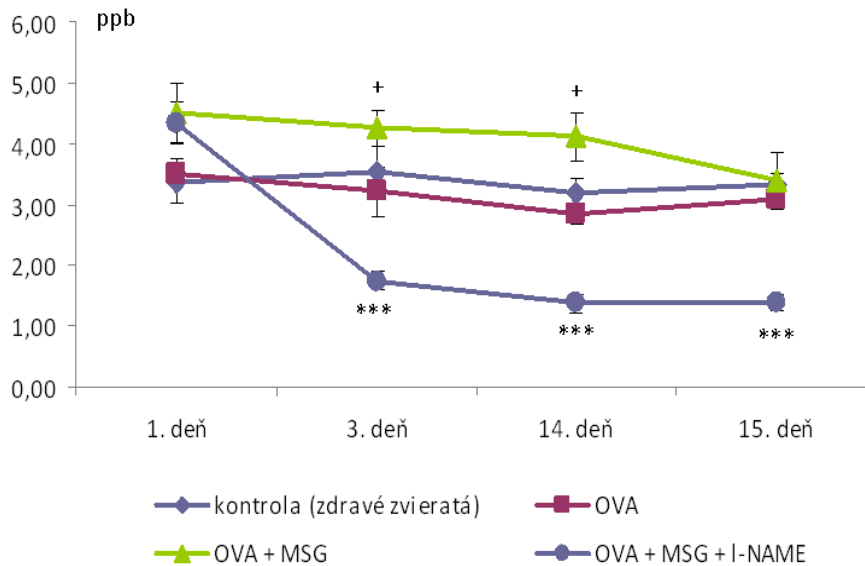
Obr. 3 Porovnanie zmien amplitúdy kontrakcie hladkého svalu trachey na histamín po aplikácii L-NAME kontrolnej skupine (zelené stĺpce), senzibilizovanej skupine (žlté stĺpce) a L-NAME + MSG senzibilizovanej skupine (šedé stĺpce). * porovnanie L-NAME - fyziol. roztok s L-NAME - OVA, + porovnanie L-NAME - OVA s L-NAME + MSG + OVA. Stĺpce predstavujú priemerné hodnoty amplitúdy kontrakcie so strednou chybou priemeru \pm S.E.M. Os x – koncentrácie histamínu v log mol.l⁻¹, os y – amplitúda kontrakcie v gramoch. * + $p < 0.05$.

Na obr. 4 sú znázornené zmeny hladín eNO. Pri porovnaní hodnôt eNO u zdravých zvierat (◆) a u zvierat senzibilizovaných OVA (■) sme výraznejšie štatisticky významné zmeny nepozorovali. U

zvierat, ktorým bol počas 14 dní senzibilizácie OVA aplikovaný MSG (▲) došlo k štatisticky významnému zvýšeniu hladín eNO na 3. a 14. deň v porovnaní so zvieratami skupiny OVA ($p < 0.05$). Podávanie

kombinácie MSG+L-NAME v priebehu senzibilizácie (●) vyvolalo štatisticky významné zníženie hodnôt eNO (p<0.001) na 3., 14.

a 15. deň v porovnaní so skupinou, ktorej nebol podaný inhibitor NOS.



Obr. 4 Porovnanie zmien eNO na 1., 3., 14 a 15. deň u zdravých zvierat (◆), u zvierat senzibilizovaných ovalbumínom (OVA - ■), u senzibilizovaných zvierat po aplikácii MSG (OVA + MSG - ▲) a u senzibilizovaných zvierat po aplikácii MSG + L-NAME (●). Os x – dni senzibilizácie, os y – hodnoty eNO v ppb. + p<0.05 – OVA vs. OVA + MSG, *** p<0.001 – OVA + MSG vs. OVA + MSG + L-NAME.

Diskusia

Prevalencia respiračných zápalových ochorení má zvyšujúcu sa tendenciu. Je teda samozrejmom snahou získať nové informácie o patogenéze týchto ochorení a následne určiť orientáciu adekvátnej farmakoterapie. Hoang et al. (2006) vyslovili zaujímavú hypotézu "bronchiálnej epilepsie", ktorá je v respirológii relatívne nová. Táto teória predpokladá, že astma je výsledkom hyperreaktivity NMDA receptorov v dýchacích cestách. V patogenéze astmy však pôsobí ako dôležitý neurotransmitter aj oxid dusnatý (Nijkamp a Folkerts, 1994, Ricciardolo, 2003). Obidva systémy tak výrazne prispievajú ku kontrole funkcií respiračného systému (Kc a Martin, 2010). Z tohto faktu vyplýva preto logická otázka možnej vzájomnej interakcie oboch nervových systémov. Väčšina prác rieši tento problém na úrovni centrálného nervového systému (Smith a Ogonowski, 2003, Llan-sola a Felipo, 2010). Len veľmi málo sa zaoberá možnou interakciou v oblasti res-

piračného systému (Scher a Scher, 1992). Preto sme v našej práci sledovali, ako bude zásah do homeostázy oboch systémov ovplyvňovať experimentálnu hyperreaktivitu dýchacích ciest vyvolanú u morčiat ovalbumínom na jednej strane a hladiny eNO na strane druhej.

Na aktiváciu NMDA receptorov sme použili sodnú soľ glutamátu (MSG). Je to jedna zo solí kyseliny glutámovej, ktorá sa používa ako potravinové aditívum zodpovedné za piatu - tzv. „umami“ chuť typickú pre čínsku či inú ázijskú kuchyňu (Jinab a Hajeb, 2010). S požitím tejto látky sa popisuje riziko vzniku komplexu reakcií, pre ktoré sa v súčasnosti používa výraz „glutamátová intolerancia“ alebo „precitlivenosť na glutamát sodný“. Manifestuje sa okrem iného vznikom alergických reakcií (urtikária, angioedém, rinitída, anafylaktická reakcia). Niektoré práce poukazujú aj na možnosť vzniku astmatického záchvatu podmieneného práve podaním MSG (Kwok, 1968, Allen et al., 1987). Vali-

dita týchto prác je však značne limitovaná rôznymi faktormi (počet pacientov, hodnotené parametre, použité metódy hodnotenia a štatistického spracovania). Výsledky ďalších prác nepotvrdili jasný a konzistentný vzťah medzi MSG a vznikom astmatického bronchospazmu (Woods et al., 1998, Woessner et al., 1999). Nepotvrdil sa dokonca ani vznik nežiaducich účinkov po požití MSG u astmatických pacientov (Williams a Woessner, 2009).

Yoneda et al. (2011) sledovali pôsobenie MSG v respiračnom systéme na myšacom modeli astmy. Látka počas senzitivizácie ovalbumínom nemenila hodnoty odporu dýchacích ciest na metacholín, neovplyvňovala nepriaznivo respiračné funkcie alebo vývoj zápalu či hyperreaktivity u astmatických myší, hoci podané dávky MSG výrazne presahovali dávky používané vo všeobecnosti u ľudí. Bezpečnosť MSG potvrdili autori aj histologickými a cytologickými vyšetreniami. Aplikácia tejto látky morčatám počas senzibilizácie ovalbumínom v našich podmienkach vyvolala mierny pokles amplitúdy kontrakcie hladkého svalu trachey najmä na histamín. Možno teda predpokladať, že aktivácia NMDAR podaním MSG zvyšuje aktivitu NOS a zvyšuje tvorbu NO, pôsobením ktorého dôjde k takejto odpovedi? Vynárajú sa však ďalšie otázky - ktoré izoformy NOS sa podieľajú na tomto efekte, akú úlohu zohrávajú ROS resp. aká je aktivita antioxidantných mechanizmov a pod. Nguyen-Duong (2010) získali podobné výsledky na preparátoch cievneho hladkého svalu, ktorý relaxoval po podaní agonistov NMDAR. Vazodilatačný efekt glutamátu sa tiež podieľa na tzv. syndróme čínskych reštaurácií, ktorý sa manifestuje okrem iného bolesťou hlavy a sčervenáním, ktoré vyplývajú z vazodilatácie tejto oblasti (O'Leary, 1990).

Zmeny reaktivity v našich podmienkach boli sprevádzané zmenami hod-

nôt eNO. Aktivácia NMDA receptorov podaním MSG vyvolala pri znížení reaktivity zvýšenie hodnôt eNO. Vystáva preto otázka, či sa aj na úrovni respiračného systému uplatňuje interakcia, ktorú popísali Pall (2005) a Hirooka et al. (2011) v centrálnom nervovom systéme. O možnej interakcii svedčí aj to, že inhibícia NOS aplikáciou L-NAME zvýšila amplitúdu kontrakcie hladkého svalu trachey u senzibilizovaných zvierat na histamín. Podanie kombinácie tohto inhibítora NOS s agonistom NMDA receptorov (MSG + L-NAME) sa prejavilo návratom hodnôt amplitúdy kontrakcie k hodnotám zaznamenaných u kontrolnej skupiny.

Obidve zistenia (zmeny hyperreaktivity, zmeny hodnôt eNO) potvrdili závery práce Said et al. (2001), ktorí ukázali na možný vzťah glutamátergického a nitrergického systému. Rovnako Pall (2005) popisuje v modeli viacnásobnej chemickej senzitivity možnú interakciu oboch systémov. Po stimulácii NMDA systému zistil autor zvýšenú produkciu NO ako retrográdneho neurotransmiteru cez mechanizmus zahŕňajúci zvýšený influx Ca^{2+} do bunky, následnú zvýšenú koncentráciu intracelulárneho Ca^{2+} so stimuláciou NO syntáz. Takto sa vytvorí circulus vitiosus – nadmerná aktivita NMDA vedie k nadmernej produkcii NO, čo vedie k nadmernej aktivite NMDA atď. Pri stimulácii NMDA receptorov však dochádza aj k tvorbe oxidačného produktu NO – peroxynitritu. Tento môže tiež vyvolať spomenutý bludný kruh depléciou energetických zdrojov (ATP) bunky. Je možné, že sa podobné mechanizmy môžu uplatňovať aj pri respiračných zápalových ochoreniach spojených s hyperreaktivitou. Potvrdenie účasti glutamátergickej neurotransmisie nielen vo fyziologických ale aj patologických podmienkach by tak mohol byť jedným z doposiaľ nepoznaných mechanizmov zápalu a hyperreaktivity dýchacích ciest (Hoang et al., 2010).

Záverom môžeme konštatovať, že aktivácia NMDA receptorov podaním sodnej soli glutamátu mierne znížila reaktivitu hladkého svalu trachey na histamín v modeli hyperreaktivity vyvolanej ovalbumínom. Zásah do homeostázy nitregického systému inhibíciou NO syntáz podaním L-NAME zvýšil odpoveď tracheálneho hladkého svalu na histamín. MSG takejto reakcii zabránil. Zaznamenali sme aj zmeny hladín eNO. Aktivácia NMDA receptorov aplikáciou MSG zvýšila hladinu eNO. Inhibíciou NO syntáz podaním L-NAME hodnoty eNO výrazne poklesli. Hoci na základe našich experimentov nemožno robiť jednoznačné závery, ich výsledky naznačujú možnosť vzájomnej interakcie glutamatergického a nitregického systému v podmienkach experimentálnej hyperreaktivity. Pritom samozrejme nie je možné vylúčiť aj účasť ďalších systémov. Riešenie tejto otázky si preto vyžaduje ďalšie štúdie.

Práca bola podporená projektom "Dobudovanie Centra experimentálnej a klinickej respirológie (CEKR II)" spolufinancovaným zo zdrojov EÚ.

Zoznam použitej literatúry

1. Allen DH, Delohery J, Baker GJ. Monosodium L-glutamate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80: 530-537.
2. Dickman KG, Youssef JG, Mathew SM, Said SI: Ionotropic Glutamate Receptors in Lung and Airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 139-144.
3. Hoang BaX, Levine SA, Shaw DG, Pham P, Hoang C: Bronchial epilepsy or bronchopulmonary hyper-excitability as a model of asthma pathogenesis. *Med Hypothes* 2006; 67: 1042-1051.
4. Hirooka Y, Kishi T, Sakai K, Takeshita A, Sunagawa K. Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300: R818-R826.
5. Hoang BX, Shaw DG, Pham P, Levine SA. Treating asthma as neuroelectrical disorder. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2010; 9: 130-134.
6. Jinap S, Hajeb P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite* 2010; 55: 1-10.
7. Kc P, Martin RJ: Role of central neurotransmission and chemoreception on airway control. *Respir Physiol Neurobiol* 2010; 173: 213-222.
8. Kwok RHM. Chinese-restaurant syndrome. *N Engl J Med* 1968; 278:796.
9. Llansola M, Felipe V. Metabotropic glutamate receptor 5, but not 1, modulates NMDA receptor-mediated activation of neuronal nitric oxide synthase. *Neurochem Internat* 2010; 56: 535-545.
10. Nguyen-Duong H: Effects of glutamate and zinc ions on the contractility of vascular smooth muscle preparations. *J. Elementol* 2010; 15: 559-572.
11. Nijkamp FP, Folkerts P: Nitric oxide and bronchial reactivity. *Clin Exp Allergy* 1994; 24: 905-914.
12. Olney JW: Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 47-71.
13. Pall ML: NMDA sensitization and stimulation by peroxynitrite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. *FASEB J* 2005; 16: 1407-1417.
14. Ricciardolo FLM: Multiple role of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.
15. Said SI: Glutamate receptors and asthmatic airway disease. *TIPS* 1999; 20: 132-135.
16. Said SI, Pakbaz H, Berisha HI Raza S: NMDA receptor activation: critical role in oxidant tissue injury. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1300-1302.
17. Said SI, Dey RD, Dickman K: Glutamate signaling in the lung. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 344-345.
18. Scher W, Scher BM. A possible role for nitric oxide in glutamate (MSG)-induced Chinese restaurant syndrome, glutamate-induced asthma, 'hot-dog headache', pugilistic Alzheimer's disease, and other disorders. *Med Hypotheses* 1992; 38:185-188.
19. Smith JB, Ogonowski AA. Behavioral effects of NMDA receptor agonists and antagonists in combination with nitric oxide-related compounds. *Eur J Pharmacol* 2003; 471: 121-128.
20. Williams AN, Woessner KM. Monosodium glutamate „allergy“: menace or myth? *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 640-646.
21. Woessner KM, Simon RA, Stevenson DD. Monosodium glutamate sensitivity in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 305-310.

22. Woods RK, Weiner JM, Thien F, Abramson M, Walters EH. The effects of monosodium glutamate in adults with asthma who perceive themselves to be monosodium glutamate-intolerant. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101: 762-771.
23. Yoneda J, Chin K, Torii K, Sakai R. Effects of oral monosodium glutamate in mouse models of asthma. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 299-304.

Atomoxetín - účinná voľba v liečbe hyperkinetickej poruchy

Eva Šnircová^{1,2}, Tomáš Kulhan^{1,2}, Igor Ondrejka², Gabriela Nosáľová¹

¹Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

²Psychiatrická klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK a UN Martin

e-mail: snircova@jfmed.uniba.sk

Hyperkinetická porucha (HKP) je najčastejšia neurobehaviorálna porucha detského veku postihujúca 3-5% detí v školskom veku. Podľa Medzinárodnej klasifikácie chorôb (MKCH-10) je hyperkinetická porucha definovaná prítomnosťou 3 jadrových symptómov, a to nepozornosti, hyperaktivity a impulzivity. Uvedené príznaky sa objavujú pred 7 rokom života, trvajú minimálne 6 mesiacov a sú spojené so zhoršeným sociálnym fungovaním dieťaťa minimálne v dvoch oblastiach života. Na stanovenie diagnózy je však potrebná prítomnosť všetkých troch symptomových okruhov.

Z patofyziologickej stránky pri HKP ide o alteráciu mozgových dráh, ktoré kontrolujú úroveň exekutívy, motoricky, pozornosti, správania, reagovania, vôľového konania a rozhodovacieho procesu. Podľa Konrada et al. (1) nejde o anatomické zmeny, ale o dysfunkciu funkčných dráh príslušných mozgových oblastí. Dysfunkcia neuronálnych dráh v súčinnosti s dysreguláciou neurotransmitterových mechanizmov potvrdzujú biologickú bázu HKP. Z tohto pohľadu sa farmakoterapia hyperkinetickej poruchy stáva bazálnou. Dnes sa v liečbe HKP uplatňujú hlavne látky modulujúce dopaminergný a noradrenergický systém.

Atomoxetín patrí do skupiny centrálnych pôsobiacich sympatikomimetík. V mechanizme účinku sa uplatňuje selektívna inhibícia spätného vychytávania (re-uptake) noradrenalínu v oblasti prefrontálneho kortexu, čo má za následok zvýšenú noradrenergickú transmisiu potrebnú

pre pozornosť, pamäť a učenie (2). Uvedené farmakologické vlastnosti ho favorizujú k liečbe ochorení s deficitom noradrenergickej transmisie. Podľa viacerých autorov (3, 4) jeho indikačnou oblasťou je HKP a ADHD (attention deficit-hyperactivity disorder, v americkom klasifikačnom systéme). Atomoxetín je liečivo, ktoré je bez priameho ovplyvnenia ďalších transportérov v CNS a to sérotonínu a dopamínu. Pre ostatné transportéry ako acetylcholín, GABA a adenosín má atomoxetín výrazne nižšiu afinitu.

Farmakokinetické parametre

Z farmakokinetického pohľadu je dôležité, že po perorálnej aplikácii sa atomoxetín rýchle a takmer úplne vstrebáva, pričom priemernú maximálne pozorovanú koncentráciu v plazme (C_{max}) dosahuje približne za 1 až 2 hodiny po podaní. Absolútna biologická dostupnosť atomoxetínu sa po perorálnom podaní pohybuje od 63 % do 94 %, v závislosti od individuálnych rozdielov v miernom „first pass“ metabolizme. Jeho absorpcia sa môže predĺžiť v súvislosti so súčasným požívaním jedla. Atomoxetín sa až v deväťdesiatich percentách viaže na bielkoviny plazmy, konkrétne na albumíny. Biotransformácia atomoxetínu prebieha v pečeni. Atomoxetín prechádza biotransformáciou predovšetkým prostredníctvom enzymatickej cesty cytochrómu P450 2D6 (CYP2D6). Jedinci s obmedzenou aktivitou tejto cesty (slabí metabolizéri) predstavujú asi 7 % belochov a majú v porovnaní s ľuďmi s normálnou aktivitou (extenzívni

metabolizéri) vyššie plazmatické koncentrácie atomoxetínu. Atomoxetín má dva hlavné oxidačné metabolity: 4-hydroxyatomoxetín and N-desmetylatomoxetín. 4-hydroxyatomoxetín je rovnako účinný ako atomoxetín v úlohe inhibítora transportéra noradrenalínu, ale na rozdiel od atomoxetínu tento metabolit tiež vykazuje určitú inhibičnú aktivitu na sérotonínový transportér. Tento účinok je však minimálny, pretože väčšina 4-hydroxyatomoxetínu je ďalej metabolizovaná, takže v plazme cirkuluje v oveľa menších koncentráciách (1 % koncentrácia atomoxetínu u extenzívnych metabolizérov a 0,1 % koncentrácia atomoxetínu u slabých metabolizérov). N-desmetyl-atomoxetín má podstatne nižšiu farmakologickú aktivitu ako atomoxetín. V ustálenom stave cirkuluje v plazme u extenzívnych metabolizérov v nižších koncentráciách a u slabých metabolizérov v koncentráciách porovnateľných s mater-skou látkou. Priemerný polčas vylučovania atomoxetínu po perorálnom podaní je 3,6 hodín u extenzívnych metabolizérov a 21 hodín u slabých metabolizérov. Atomoxetín sa vylučuje predovšetkým ako 4-hydroxyatomoxetín-O-glukuronid, najmä močom. Poškodenie pečene rovnako ako ochorenie obličiek spôsobuje znížený klírens atomoxetínu.

Dávkovací režim

Vo farmakoterapeutickej praxi sa atomoxetín užíva v podobe tvrdých perorálnych kapsúl, pričom každá kapsula obsahuje hydrochlorid atomoxetínu zodpovedajúci 10 mg, 18 mg, 25 mg, 40 mg, 60 mg, 80 mg alebo 100 mg atomoxetínu. Kapsula sa podáva v jednej dávke denne ráno s jedlom alebo bez jedla. U pacientov, ktorí pri užívaní lieku v jednorazovej dennej dávke nedosiahli uspokojujúcu klinickú odpoveď (znášanlivosť alebo účinnosť), môže byť užitočné rozdelenie tejto dávky do dvoch rovnakých dávok užívaných dvakrát denne, ráno a neskoro popo-

ludní alebo podvečer, pričom v niektorých prípadoch pomôže jednorázové podanie lieku v jednej večernej dávke.

Liečba atomoxetínom sa má začať celkovou dennou dávkou približne 0,5 mg/kg. Počiatočná dávka sa má užívať minimálne 7 dní pred vzostupnou titráciou dávky podľa klinickej odpovede a znášanlivosti. Odporúčaná udržiavacia dávka je asi 1,2 mg/kg/deň (v závislosti od telesnej hmotnosti pacienta a dostupných silách atomoxetínu). U dávok prevyšujúcich 1,2 mg/kg/deň sa nepreukázal žiadny ďalší prínos. Bezpečnosť jednorazovej dávky prevyšujúcej 1,8 mg/kg/deň a celkovej dennej dávky prevyšujúcej 1,8 mg/kg sa systematicky nehodnotila. V niektorých prípadoch môže byť vhodné v liečbe pokračovať do dospelosti.

Nežiaduce prejavy

U niektorých detí s diagnózou ADHD sa v súvislosti s užívaním atomoxetínu pozorovali nežiaduce prejavy na kardiovaskulárnom systéme. Vyskytol sa postupný nárast frekvencie srdca a stredného tlaku krvi, pričom efekt na diastolický tlak krvi bol výraznejší oproti systolickému tlaku krvi, ktorý bol zanedbateľný. Tieto zmeny boli prechodné a objavovali sa skôr v krátkodobejšej terapii užívania počas deviatich týždňov. Je zaujímavé, že pri terapii dlhšej ako 1 rok boli zmeny klinicky takmer nemerateľné. Z tohto dôvodu je dôležitá anamnéza kardiovaskulárneho stavu dieťaťa ako i rodinných príslušníkov, konzultácia s kardiológom pred nastavením na liečbu atomoxetínom rovnako ako aj pri náleze závažných kardiovaskulárnych štrukturálnych abnormalít, či iných dôležitých porúch srdca, ktoré by mohli mať potenciálny vplyv na zmenu kardiovaskulárnych funkcií v súvislosti s užívaním atomoxetínu. Zvýšenú pozornosť treba venovať aj pacientom s kongenitálne predĺženým QT intervalom, so získaným predĺženým QT

intervalom, alebo pacientom, ktorí majú v rodinnej anamnéze zmienku o predĺženom QT intervale. Nezanedbateľné sú aj nálezy tachykardie, hypertenzie, stavy s náhlymi zmenami frekvencie srdca, tlaku krvi, či nálezy kardiovaskulárnych a cerebrovaskulárnych ochorení v anamnéze, ktoré môžu byť taktiež potencionálnymi kontraindikáciami v užívaní atomoxetínu. Podľa súčasných odporúčaní FDA na začiatku terapie a periodicky v jej priebehu by sa mala sledovať jednak frekvencia srdca ako aj krvný tlak.. Práve tieto opatrenia prispievajú k identifikácii skupiny detí so zvýšeným rizikom kardiovaskulárnych komplikácií.

U pediatrických pacientov s diagnózou ADHD k nežiaducim prejavom liečby atomoxetínom patrí tiež počiatočný úbytok na hmotnosti ako aj zníženie rastu v priebehu pätnástich až osemnástich mesiacov. Tieto zmeny sa dlhodobejším užívaním počas dvadsiatich štyroch až tridsiatich šiestich mesiacov upravili k norme. Zmeny pretrvávali iba u tých pacientov, ktorí mali vyššiu hmotnosť a výšku ako u pacientov s priemernými hodnotami ešte pred užívaním lieku.

Interakcie

Monoterapia atomoxetínu nie je asociovaná s predĺžením QT intervalu. Do pozornosti sa dáva efekt atomoxetínu v kombinácii s inými druhmi liekov, ktoré môžu potencovať jeho účinky na kardiovaskulárny systém. Netypické predĺženie QT intervalu pri polyfarmakoterapii sa môže zmeniť v kombinácii s liekmi ako sú napr. tiazidy a iné diuretiká, ktoré majú vplyv na elektrolytový a minerálny dysbalanc, alebo s inhibítorom cytochrómu P450 2D6 - paroxetínom.

Kontraindikovaná je kombinácia atomoxetínu s inhibítormi monoaminoxidázy. Súvisí to s ich synergickým pôsobením a následným zvýšeným koncentracie

monoamínov v mozgovom tkanive, čo by mohlo viesť k fatálnej reakcii organizmu.

Dôraz na opatrnosť pri polyfarmakoterapii sa kladie pri užívaní liekov, ktorých mechanizmus účinku má vplyv na zvýšenie tlaku krvi a frekvencie srdca. Do tejto kategórie spadajú lieky ako β_2 agonisty (salbutamol).

Atomoxetín neovplyvňuje reakcie organizmu sprevádzajúce intoxikáciu etanolom ani kardiovaskulárne prejavy metylfenidátu.

Kontraindikácia nie je potrebná v kombinácii s warfarínom, kyslinou acetylsalicylovou, phenytoínom či diazepamom, ktoré sa vo zvýšenom percente viažu na bielkoviny plazmy.

Antacída neovplyvňujú biologickú dostupnosť a vstrebávanie atomoxetínu.

Terapeutická účinnosť

Terapeutická účinnosť perorálne podávaného atomoxetínu bola potvrdená viacerými medzinárodnými, rôzne dlhými, placebom kontrolovanými, randomizovanými, dvojito-zaslepenými, multicentrickými klinickými štúdiami u detí a adolescentov s ADHD. Dizajn klinických štúdií a výsledky svedčiace pre klinickú účinnosť atomoxetínu sú uvedené v tabuľke 1.

Primárnym výstupom krátkodobých, placebom kontrolovaných štúdií boli zmeny skóre v škále ADHD-RS (v rodičovskej i učiteľskej verzii) vykonávaných výskumným pracovníkom. Zistila sa pozitívna odpoveď v porovnaní s placebom a to po jednorázovej dávke atomoxetínu podanej ráno na symptómy v čase poobednom a večera. Dáta zozbierané zo 4 randomizovaných, PLC- kontrolovaných štúdií potvrdili v prípade slabých metabolizérov signifikantne vyššiu redukciu symptómov v ADHD-RS. Ukázalo sa tiež, že prerušenie užívania atomoxetínu nevedie k rebound fenoménu. Výsledky uvedených dlhodobých štúdií jednoznačne poukazujú na

účinnosť atomoxetínu v liečbe ADHD u detí a adolescentov. Atomoxetín bol spojený so signifikantne dlhším časom vedúcim k relapsu v porovnaní s placebom v období 6 aj 9-mesiach. Výskyt relapsu bol 22% a 38% v 9 mesačno období, a 3% až 12% v období 6 mesiacov. Atomoxetín preukázal účinnosť po dobu 2 rokov, bez toho, aby viedol k vzniku tolerancie. Liečivo je účinné aj u pacientov bez predošlej terapie psychostimulanciami. Efektivita atomoxetínu v liečbe ADHD u detí a adolescentov bola porovnávaná s účinnosťou jemu podobných liečiv. Aktívny komparátori zahŕňali rýchlo sa uvoľňujúci, osmoticky uvoľňovaný metylfenidát, postupne sa uvoľňujúce amfetamínové soli, štandardnú terapiu (okrem atomoxetínu) a behaviorálne poradenstvo. Atomoxetín nepreukázal signifikantný rozdiel

v porovnaní s terapiou rýchlo sa uvoľňujúcim metylfenidátom. Atomoxetín bol signifikantne menej účinný v porovnaní osmoticky uvoľňovaným metylfenidátom a postupne sa uvoľňujúcimi amfetamínovými soľami. Vykonané štúdie sa zaujímali aj o efekt atomoxetínu na liečbu komorbídnych porúch u ADHD, rovnako ako i jeho účinnosť na jadrové symptómy ADHD v ich prítomnosti. Účinnosť atomoxetínu sa nezdá byť ovplyvnená prítomnosťou komorbídnych porúch, a symptómy týchto porúch sa liečbou atomoxetínom nezhoršujú. V porovnaní s placebom bol atomoxetín účinnejší v liečbe ADHD s komorbídnou úzkostnou poruchou, veľkou depresívnou epizódou, tikovou poruchou, spektrom autistických porúch a ODD.

Tab. 1 Účinnosť orálne aplikovaného atomoxetínu u detí a adolescentov s ADHD.

Štúdia	Dĺžka liečby (v týždňoch)	Vek pacientov (v rokoch)	Dávkovanie (mg/kg/deň)	Počet pacientov	Skóre v ADHD-RS na začiatku liečby	Percento pacientov odpovedajúcich na liečbu
Brown et al. (5)	7	8-12	ATO 0.8-1.8 PL	99 51	65.6 64.4	66 36
Gau et al. (6)	6	6-16	ATO ≤1.8 PL	69 29	36.7 37.1	
Kalsey et al. (7)	8	6-12	ATO 1.2 PL	126 60	37.1 42.1	66 33
Michelson et al. (8)	8	8-18	ATO 1.3 ATO 1.8 PL	84 82 83	39.2 39.7 38.3	
Michelson et al. (9)	6	6-16	ATO 1.0 PL	84 83	37.6 36.7	60 31
Spencer et al. (10)	9	7-12	ATO ≤2.0 PL	64 61	41.2 41.4	25 59
Spencer et al. (11)	9	7-12	ATO ≤2.0 PL	61 63	37.8 37.6	59 40
Weiss et al. (12)	7	8-12	ATO 1.2 PL	100 51	38.9 36.7	69 43

Z výsledkov prác uvedených v tabuľke 1 vyplýva, že atomoxetín bol vo všeobecnosti dobre znášaný, pričom k

najčastejším nežiaducim účinkom patrili: cefalea, abdominalgia, znížený apetít, zvracanie, somnolencia a nauzea. Intenzita

nežiaducich účinkov bola hodnotená ako ľahká až stredne ťažká. Z celkového množstva respondérov v krátkodobých štúdiách prerušili liečbu atomoxetínom celkom 3% detí v porovnaní s 1% detí, ktorým bolo podávané placebo. Atomoxetín bol lepšie znášaný u rýchlych metabolizérov.

Medzi najčastejšie nežiaduce účinky u pomalých metabolizérov patrilo: tvorba, depresia, obštipácia, strata hmotnosti a insomnie. V dlhodobej štúdii sa nežiaduce účinky spojené s užívaním atomoxetínu vyskytli u 3% respondérov, v porovnaní s 1%, ktorým sa podávalo placebo. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patrila cefalea a nasofaryngitída. Medzi špecifické nežiaduce účinky terapie atomoxetínom patria suicidálne úmysly. Frekvencia výskytu suicidálnych myšlienok bola u respondérov vyššia v porovnaní s placebom (0.37% vs 0%).

Kombinovaná liečba atomoxetínu so stimulanciami.

Pre prítomnosť reziduálnych symptómov ADHD po prvotnej liečbe, nežiaducich účinkov a psychických komorbidít, lekári často využívajú kombináciu liečiv pre mladistvých s ADHD (13). Nedávno bolo robených niekoľko klinických štúdií zaoberajúcich sa kombinovanou liečbou atomoxetínom so psychostimulanciami.

Carlson et al. (14) sledovali malú skupinu detí, u ktorých nedošlo k terapeutickému odpovedi po 4 týždňoch liečby atomoxetínom. Jednej skupine (n=9) aplikovali atomoxetín+OROS metylfenidát a druhej (n=12) atomoxetín+placebo za účelom pokračovania liečby po dobu ďalších 6 týždňov. Medzi týmito skupinami neboli zistené významné rozdiely.

Wilens et al. (15) realizovali podobný dizajn. Dvojfázovú otvorenú 7-týždňovú štúdiu u detí vo veku od 6 do 17 rokov. S rozdielom, že u detí neprebehla selekcia na základe predchádzajúcej ab-

sencie terapeutického odpovede na liečbu stimulanciami. Po monoterapii atomoxetínom počas 4 týždňov, bol parciálnym respondérom na atomoxetín pridovaný OROS metylfenidát (titrovaný do 54 mgv nasledujúcich 3 týždňoch). Z 50 subjektov liečebných kombinovanou terapiou, 41 subjektov ukončilo celý protokol. Došlo k 40% redukcii v ich ADHD-RS od začiatku kombinovanej liečby po koniec štúdie (z 21,14 ±9.9 na 12.8 ± 9.7, t = 6.5, p < 0,0001). Navyše došlo ku klinicky významnému zníženiu v klinickom globálnom indexe stupňa závažnosti ADHD zo závažného stupňa na mierny, ako aj k zlepšeniu exekutívnych funkcií.

Hammerness et al. (16) uviedli aj mieru tolerancie pri kombinovanej terapii, v porovnaní s terapiou samotným atomoxetínom. Podľa autorov pridanie OROS metylfenidátu významne zvýšilo výskyt insomnie, podráždenosti a straty chuti do jedla.

Potenciálne somatické riziká spojené s atomoxetínom

Atomoxetín a poškodenie pečene

Existuje veľmi málo záznamov svedčiacich o poškodení pečene v súvislosti s atomoxetínom. Zo 7962 pediatrických aj dospelých pacientov liečených atomoxetínom bolo identifikovaných 41 pacientov, ktorí vyžadovali ďalšiu analýzu. Z týchto 41 prípadov ani jeden neprogredoval do hepatálneho zlyhania pričom väčšina týchto prípadov bola spojená iba s miernym zvýšením hladín aminotransferáz (ALT) a aspartát aminotransferáz (AST). Etiologickou príčinou nepriaznivého vplyvu aplikácie atomoxetínu na pečeň môže byť metabolická idiosynkrázia, alebo indukovaná autoimunitná hepatitída (17). Vzhľadom na zriedkavosť podobných záznamov, v súčasnosti počas terapie atomoxetínom nie je odporúčané rutinné monitorovanie pečenej funkcie. Napriek tomu príbuzní by mali lekára infor-

movať, ak zistia príznaky poukazujúce na možné problémy s pečňou ako: svrbenie, bolesti na pravej strane brucha, tmavý moč, žltá pokožka, alebo oči, alebo inak nevysvetliteľné príznaky chrípky (18).

Atomoxetín a kardiovaskulárny systém

V súčasnosti nie sú dôkazy, liečba ADHD terapeutickými dávkami u zdravých detí spôsobuje závažné kardiovaskulárne zmeny, alebo náhlu smrť (19). Avšak u detí a adolescentov so štruktúrnymi srdcovými abnormalitami, alebo inými vážnymi srdcovými ochoreniami boli zaznamenané prípady náhleho úmrtia v súvislosti s liečbou atomoxetínom v bežných dávkach. Z uvedených dôvodov pri závažných srdcových abnormalitách, kardiomyopatii a poruchách srdcového rytmu by sa atomoxetín mal používať až na základe odporúčenia detského kardiológa (18).

Atomoxetín a CNS toxicita

Častosť výskytu záchvatov, ako vedľajšieho účinku pri liečbe atomoxetínom je odhadovaná v rozpätí od 0,1 do 0,2 %. Nie je jednoznačne dokázané, že aplikácia atomoxetínu nie je jednoznačným spúšťacím mechanizmom výskytu záchvatov i keď môže byť spolupôsobiacim faktorom (20).

Atomoxetín a predávkovanie

Početné štúdie boli venované situáciám, pri ktorých došlo u adolescentov k predávkovaniu atomoxetínom (21-24). Podľa autorov Stojanovski et al, (21) nežiaduce účinky nekorelovali s dávkou atomoxetínu. V iných záznamoch, výskyt závažnejších prípadov bol viazaný na vyššie maximálne dávky; > 2.8 mg/kg alebo >200mg alebo >4 tabletky (23). Autori Spiller et al, a Lovecchio et al, (22,23) neznamenali žiadne úmrtia v súvislosti s liečbou atomoxetínom. Pri predávkovaní autori pozorovali poruchy zo strany GITu, letargiu a záchvat, ktorý sa vyskytol

u jednej adolescentky, ktorá požila 2840 mg atomoxetínu v suicidálnom pokuse. Sérová hladina atomoxetínu v tomto prípade dosahovala hodnoty 1995 ng/mL (25).

Z kardiovaskulárneho okruhu bola prítomná sínusová tachykardia a zvýšený krvný tlak (21-24).

Okrem toho sa pozorovali poruchy nálady v zmysle agitovanosti, ktorá sa upravila aplikáciou benzodiazepínov (21,23).

Aj napriek pomerne bezpečnému terapeutickému profilu atomoxetínu, vyžaduje sa, aby lekár zdôraznil pacientovi aj rodinným príslušníkom dôležitosť užívania atomoxetínu v predpísaných dávkach.

Záver

Atomoxetín je účinným liečivom používaným pre akútnu, udržiavaciu ako aj dlhodobú liečbu ADHD u detí a adolescentov. V tejto vekovej skupine sa tiež dokázala takmer 50% účinnosť atomoxetínu, a to u tých pacientov, u ktorých psychostimulanciami nepriniesli očakávaný terapeutický efekt. Prispievajú k tomu jeho priaznivé farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti podporené priaznivým bezpečnostným profilom liečiva, dobrou tolerabilitou a to tak po krátkodobej ako aj dlhodobej aplikácii atomoxetínu. .

Tieto konštatovania sa opierajú o množstvo štúdií, ktoré boli vykonané u detí a adolescentov. Ich počet prevyšuje počty štúdií, ktoré boli v histórii pediatrickej praxe vykonané v súvislosti s aktivitami u ktorejkoľvek inej psychotropnej látky. Ukázalo sa, že plná účinnosť atomoxetínu sa objavuje až po mesiacoch jeho aplikácie.

Sme toho názoru, že atomoxetín nájde svoje uplatnenie najmä v liečbe komorbidít sprevádzajúcich ADHD. K potvrdeniu tohto faktu sú však potrebné ďalšie klinické pozorovania (26).

Zoznam použitej literatúry

1. Konrad, K. et al.: Dysfunctional Attentional Networks in Children with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: Evidence from an Event-Related Functional Magnetic Resonance Imaging Study. *Biol Psychiatry*, 2006; 59: 643–651.
2. Barton, J.: Atomoxetine: a new pharmacotherapeutic approach in the management of attention deficit/hyperactivity disorder. *Arch Dis Child*, 2005; 90 Suppl.1: 26-29.
3. Ledbetter, M.: Atomoxetine: a novel treatment for child and adult ADHD. *Neuropsych Dis Treat*, 2006; 2: 455-66.
4. Bymaster, F.P, Katner, J.S., Nelson, D.L., et al. Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, 2002; 27: 699-711.
5. Brown RT, Perwien A, Fades DE, et al. Atomoxetine in the management of children with ADHD: effects on quality of life and school functioning. *Clin Pediatr (Phila)*, 2006; 45: 819-27
6. Gau SS, Huang YS, Soong WT, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial on once-daily atomoxetine in Taiwanese children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2007 Aug; 17: 447-60
7. Kelsey DK, Sumner CR, Casat CD, et al. Once-daily atomoxetine treatment for children with attention-deficit/hyperactivity disorder, including an assessment of evening and morning behavior: a double-blind, placebo controlled trial. *Pediatrics* 2004; 114: e1-8
8. Michelson D, Faries D, Wernicke J, et al. Atomoxetine in the treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled, dose-response study. *Pediatrics* 2001; 108: E83-91
9. Michelson D, Allen AJ, Busner J, et al. Once-daily atomoxetine treatment for children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder: a randomized, placebo-controlled study. *Am J Psychiatry* 2002 Nov; 159 (11): 1896-901
10. Spencer et al. (Study 1) Spencer T, Heiligenstein JH, Biederman J, et al. Results from 2 proof-of-concept, placebo-controlled studies of atomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 2002 Dec; 63 (12): 1140-7
11. Spencer et al. (Study 2) Spencer T, Heiligenstein JH, Biederman J, et al. Results from 2 proof-of-concept, placebo-controlled studies of atomoxetine in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 2002 Dec; 63 (12): 1140-7
12. Weiss et al. Weiss M, Tannock R, Kratochvil C, et al. A randomized, placebo-controlled study of once-daily atomoxetine in the school setting in children with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2005 Jul; 44 (7): 647-55
13. Safer DJ, Zito JM, DosReis S. Concomitant psychotropic medication for youths. *Am J Psychiatry* 2003; 160 (3): 438-449
14. Carlson GA, Dunn D, Kelsey D, et al. A pilot study for augmenting atomoxetine with methylphenidate: safety of concomitant therapy in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 2007; 1(1) :10.
15. Wilens T, Hammerness P, Utzinger L, et al. An open study of adjunct OROS-methylphenidate in children who are atomoxetine partial responders: I. effectiveness. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. In press.
16. Hammerness P, Mick E, Doyle R, et al. Atomoxetine in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) with prior poor response to stimulant therapy: a prospective open label study. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2009; in revision.
17. Lim JR, Faight PR, Chalasani NP, et al. Severe liver injury after initiating therapy with atomoxetine in two children. *J Pediatr* 2006; 148 (6): 831–834.
18. Lilly, Informácie o produkte, Júl 2008.
19. Perrin JM, Friedman RA, Knilans TK. Cardiovascular monitoring and stimulant drugs for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 2008 ;122 (2) :451–453.
20. Wernicke JF, Holdridge KC, Jin L et al. Seizure risk in patients with attention-deficit-hyperactivity disorder treated with atomoxetine. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49 (7): 498–502.
21. Stojanovski SD, Robinson RF, Baker SD et al. Children and adolescent exposures to atomoxetine hydrochloride reported to a poison control center. *Clin Toxicol (Phila)* 2006; 44 (3): 243–247.
22. Spiller HA, Lintner CP, Winter ML. Atomoxetine ingestions in children: a report from poison centers. *Ann Pharmacother* 2005; 39 (6): 1045–1048.
23. Lovecchio F, Kashani J. Isolated atomoxetine (Strattera) ingestions commonly result in toxicity. *J Emerg Med* 2006; 31 (3): 267–268.

24. Forrester MB. Adult atomoxetine ingestions reported to Texas Poison ControlCenters, 2003–2005. *Ann Pharmacother* 2006; 40 (12): 2136–2141.
25. Kashani J, Ruha AM. Isolated atomoxetine overdose resulting in seizure. *J Emerg Med* 2007; 32 (2): 175–178.
26. Hammerness P, McCarthy K, Mancuso E, et al. Atomoxetine for the treatment of attention-deficit/ hyperactivity disorder in children and adolescents: a review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2009; 5 215–226.

CRAC iónové kanály a alergická astma

Martina Šutovská, Michaela Kocmálová, Soňa Fraňová

Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

e-mail: sutovska@jfmed.uniba.sk

Kontrakcia hladkej svaloviny dýchacích ciest (HSDC) je kľúčovým mechanizmom bronchokonstrikcie u astmatických pacientov. Bronchokonstrikcia je navyše veľmi úzko spätá s kašľovým reflexom. Podľa Widdicomba (2003), sú RARs (rýchlo sa adaptujúce kašľové receptory) u pacientov s astmou aktivované bronchospazmom. Metacholín alebo histamín, mediátory bežne v experimentoch používané na vyvolanie kontrakcie HSDC, sú schopné iniciovať kašľový reflex a takisto bol potvrdený antitusický účinok štandardných bronchodilatačných liečiv (Chung, 2005). Hoci je niekoľko desaťročí jasné, že v kontraktilnej odpovedi HSDC hrajú dominantnú úlohu intracelulárne vápnikové ióny (Ca^{2+}), mechanizmy homeostázy Ca^{2+} neboli detailne objasnené. Na rozdiel od hladkej svaloviny ciev, v ktorej sú VOCs najdôležitejším regulátorom Ca^{2+} , je kontrakčná odpoveď HSDC závislá na vnútrobunkových zásobách v endoplazmatickom retikule (ER) a vtoku Ca^{2+} prostredníctvom non-VOCs ciest. Hlavné kontraktilné agonisty, ako je napr. histamín, vytvárajú Ca^{2+} signály rýchlym uvoľnením zdrojov v ER, ktoré je nasledované stabilnejším vtokom Ca^{2+} cez ROCs a SOCy plazmatickej membrány.

Zo skupiny SOCy je najznámejší a najdetailnejšie popísaný CRAC kanál (calcium release-activated calcium channels). Ide o iónový kanál vysoko selektívny pre Ca^{2+} , ktorý bol po prvý raz identifikovaný v bunkách imunitného systému (T – lymfocytoch a mastocytoch). Neskôr bola zistená jeho expresia aj v humánných bunkách HSDC. Základnou funkciou CRAC kanála je zabezpečenie homeostázy kalciového me-

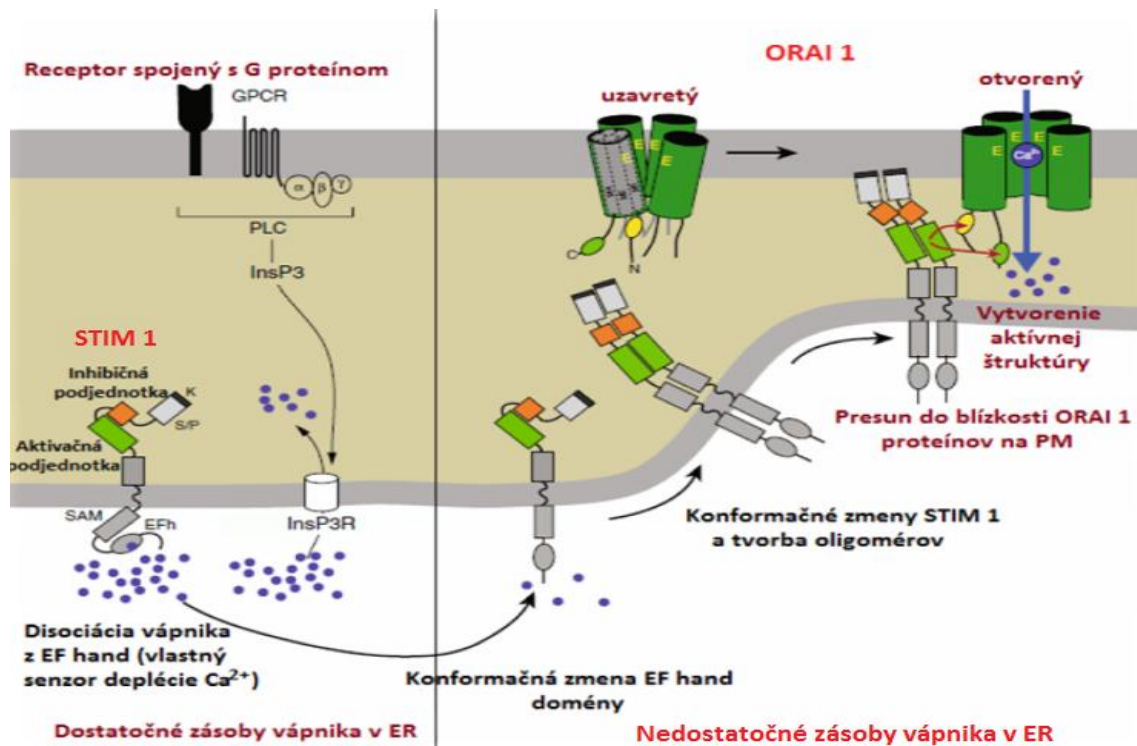
tabolizmu a regulácia dôležitých procesov ako je bunková aktivácia, diferenciácia, kontrakcia, expresia genetickej informácie a sekrécia zápalových mediátorov (Prakryia, 2009; Parekh, 2008). Mohutný pokrok v pochopení molekulových mechanizmov činnosti CRAC kanálov otvára možnosti pre farmakologické uplatnenie týchto poznatkov. Mnohé práce dokazujú, že porucha regulácie funkcií Ca^{2+} v bunkách imunitného systému hrá podstatnú úlohu v patogeneze autoimunitných a zápalových ochorení. Dôkazom nesmierne dôležitej funkcie CRAC sú závažné imunodeficitné stavy (Feske et al., 2010), autoimunitné ochorenia (napr. amelogenesis imperfecta) alebo myopatie zapríčinené mutáciami STIM1a Orai1 (Le Deist a Capiod, 2011). Mnohé experimentálne práce svedčia o kľúčovej úlohe CRAC kanálov v patogeneze alergických zápalových ochorení DC typu bronchiálnej astmy. Prezentovaný príspevok ponúka bližšiu charakteristiku CRAC kanálov a výsledky vlastných experimentálnych prác, pri ktorých bola potvrdená jeho úloha v kontraktilite HSDC, účasť pri vývoji alergického zápalu DC a pri patologickom kašli, ktoré reprezentujú dominantné patogenetické činitele a symptómy alergickej astmy.

Štruktúra CRAC kanálov

V r. 2005 sa podarilo identifikovať molekulu **STIM1** (stromal interaction molecule), ktorá predstavuje senzor endoplazmatického retikula (ER) pre nedostatok Ca^{2+} a v r. 2006 molekulu **Orai1** (CRACM1), ktorá je kľúčovou podjednotkou kanálového póru (Obr. 1).

STIM1 je transmembránový proteín veľkosti 77 kDa. Má mnoho funkčných domén, z ktorých má významné postave-

nie EF – hand doména zaznamenávajúca koncentráciu iónov kalcia v ER (Prakryia, 2009; Baba et al. 2006).



Obr. 1 Jednotlivé štrukturálne podjednotky CRAC kanála – proteíny STIM1 a Orai1, usporiadanie jednotlivých podjednotiek CRAC kanála v aktívnom a inaktívnom stave. Podrobnejšia charakterizácia v texte. Upravené podľa Feskeho et al., 2010.

V bunkách s dostatočnou zásobou Ca^{2+} je STIM1 rovnomerne distribuovaný v sieti ER, obklopený mikrotubulami (He et al., 2012). Nachádza sa v junkčnej oblasti medzi mikrotubulami a ER. Mikrotubuly sú čiastočne zodpovedné za štruktúru STIM1 proteínov a súčasne pri nedostatku Ca^{2+} priestorovo limitujú ich transport na určitý úsek ER (Baba a Kurosaki, 2008; Grigoriev et al., 2008). V bunkách s vyčerpanými zásobami kalciových iónov v ER sa STIM1 preskupuje do oligomérnych komplexov v blízkosti plazmatickej membrány, ktoré sa priestorovo asociujú s miestami lokalizácie Orai1 proteínov. Mutácie v oblasti EF – hand spôsobujú namiesto distribúcie v ER akumuláciu STIM1 v blízkosti plazmatickej membrány a permanentné otvorenie CRAC kanálov (Galli et al., 2005).

Orai1 je povrchový proteín plazmatickej membrány so štyrmi transmembránovými doménami a intracelulárnym N a C koncom. Podobne ako v prípade STIM1 platí, že v bunkách s nedostatkom Ca^{2+} sa zhlučuje v blízkosti miest, v ktorých sa kumuluje STIM1. Okrem Orai1 patrí do Orai rodiny aj proteín Orai2 a Orai3, ktoré však v porovnaní s Orai1 majú 2 až 3 krát menšiu permeabilitu pre Ca^{2+} ióny (Hansen et al., 2004).

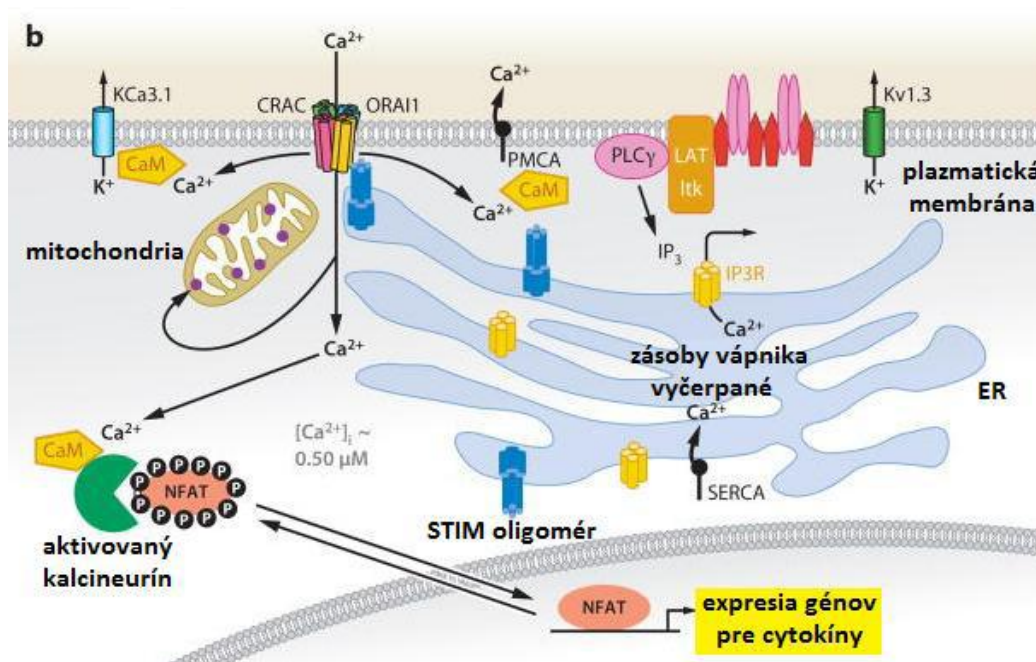
Biofyzikálne vlastnosti CRAC kanálov

CRAC kanál má veľmi malý priemer a je vysoko selektívny pre Ca^{2+} . Charakteristickou vlastnosťou CRAC kanálov je ich extrémne malá vodivosť, ktorá výrazne ovplyvňuje funkciu kanálov. I_{crac} celej bunky generuje len veľmi malý potenciálový rozdiel. Keďže aktivácia a deaktivácia ka-

nála trvá sekundy až desiatky sekúnd, vysoká efektivita influxu Ca^{2+} bez Na^+ zabraňuje depolarizácii membrány. Vtok Ca^{2+} cez niekoľko CRAC kanálov má minimálny efekt na celkovú cytoplazmatickú hladinu Ca^{2+} , rapídne však stúpne lokálna koncentrácia. Formujú sa teda mikrodomény niekoľkokrát vyššej koncentrácie Ca^{2+} ako je jeho celková koncentrácia v cytoplazme (Di Capite a Parekh, 2009). CRAC kanály sa koncentrujú na rôznych miestach plazmatickej membrány. To je dôvodom vždy špecifickej odpovede bunky na Ca^{2+} signál sprostredkovaný CRAC kanálmi (Metcalf a Boyce, 2006). Význam CRAC kanálov pre vnútrobunkovú signalizáciu signifikantne prevyšuje len zabezpečenie homeostázy Ca^{2+} v ER (Prakryia, 2009).

Mitochondrie a CRAC kanály

Mitochondrie fixované ku ER mitofúzií sú schopné uskladniť ióny Ca^{2+} , ktoré sa dostanú do bunky z extracelulárneho prostredia aj z intracelulárnych zásob (Quintana et al., 2007). Absorbcia Ca^{2+} uvoľneného z ER mitochondriami v mastocytoch (Obr. 2) spôsobí masívnejšiu aktiváciu CRAC kanálov. Vstupujúce Ca^{2+} navyše vedie ku presunu ďalších mitochondrií do blízkosti plazmatickej membrány. Mitochondrie teda **podporujú otvorenie kanálov a zároveň spomaľujú ich inaktiváciu**. Oboma spôsobmi predlžujú rozsah aj trvanie I_{crac} (Stathopoulos et al., 2006; Hogan et al., 2010).



Obr. 2 Úloha mitochondrií pri modulácii intracelulárnej hladiny kalcia a ich vplyv na aktivitu CRAC kanálov v imunokompetentnej bunke. Upravené podľa Hogana et al. (2010). V aktivovanej bunke dochádza prostredníctvom IP₃ receptorov na ER ku vyprázdneniu Ca²⁺ zásob, oligomerizácii STIM1 v blízkosti Orai a vtoku Ca²⁺. V aktivovanej bunke sa mitochondrie sústreďujú v blízkosti ER a vychytávajú Ca²⁺ z cytoplazmy, čím predlžujú aktiváciu CRAC kanálov.

Dôležitým dôsledkom absorpcie Ca^{2+} mitochondriami je stimulácia intermediárneho metabolizmu. Niektoré metabolity dokážu takisto ovplyvniť funkciu CRAC kanálov. Ide hlavne o pyruvát, kto-

rého vysoká koncentrácia dramaticky zníži mieru inaktivácie CRAC kanála. Účinok pyruvátu je podmienený priamym efektom metabolitu na Orai1, prípadne STIM1. CRAC kanál je prvým známym typom ióno-

vého kanála, ktorý môže byť regulovaný intermediárnym metabolitom. Rezultuje z toho ďalšia úloha CRAC kanálov – **zabezpečujú prepojenie medzi energetickým stavom bunky a influxom Ca^{2+}** (Di Capite a Parekh, 2009).

CRAC kanály mastocytov

Mastocyty hrajú kľúčovú úlohu pri okamžitých IgE podmienených hypersenzitívnych reakciách a pri reakciách podmienených funkciou Th_2 (Baba a Kurosaki, 2008). Ako integrujúce komponenty imunitného systému obsahujú množstvo mediátorov charakteru vazoaktívnych amínov (Hi, serotonin), ATP a produkujú tiež prozápalové leukotriény LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 a proteázy. Mediátory sa uvoľňujú po väzbe komplexu IgE-antigén na receptor na povrchu mastocytov (vysokoafinitný receptor pre IgE – FcεRI). Navyše, stimulácia mastocytov má za následok aj syntézu *de novo* prozápalových lipidových mediátorov (leukotriénov) a cytokínov (Feske, 2007). CRAC kanály na mastocytoch hrajú rozhodujúcu úlohu pri degranulácii, syntéze a uvoľnení leukotriénov a tvorbe intracelulárnych a extracelulárnych signálnych molekúl.

Nápadná mastocytárna infiltrácia medzi zväzkami HSDC u astmatických pacientov viedla v poslednom období k výraznej zmene pohľadu na úlohu žírnych buniek pri alergickej astme. V súčasnosti sa práve žirne bunky považujú za rozhodujúce efektorové elementy v patogenéze astmy na alergickej báze (Brightling et al., 2002). Mediátory mastocytov stimulujú aj populáciu leukocytov, vedú ku Th_2 diferenciácii, ktorá podporuje produkciu alergén-špecifických IgE v B bunkách. V konečnom dôsledku sú práve mastocyty zodpovedné za typický celulárny infiltrát pri alergickom zápale DC.

1. Charakteristika a funkcie CRAC kanálov mastocytov

Na povrchu mastocytov sa nachádzajú vysokoafinitné receptory pre IgE FcεRI, ktorých agonistom je IgE s naviazaným alergénom (Nilius et al., 2007). Obsadenie FcεRI receptorov alebo stimulácia receptorov spojených s G proteínom znižuje intracelulárne zásoby Ca^{2+} a stimulujú vtok Ca^{2+} cez CRAC kanály (Parekh a Putney, 2005; Prakriya, 2009). Touto spoločnou cestou pôsobia agonisty na rôznych častiach povrchu bunky. Vzhľadom k tomu, že aktiváciu CRAC kanála spôsobujú rôznorodé alergické aj nealergické stimuly, jeho farmakologické ovplyvnenie by mohlo byť účinnou cestou ako zabrániť neprimeranej aktivácii mastocytov (Di Capite et al., 2011).

2. CRAC kanál a degranulácia mastocytov

Degranulácia mastocytov jednoznačne závisí od influxu Ca^{2+} cez CRAC kanál, pretože počiatočné uvoľnenie Ca^{2+} zo zásob v ER nie je pre ňu dostatočným impulzom. Kalciové ióny sa podieľajú na stimulácii fúzie vezikúl a plazmatickej membrány. Exocytóza granúl mastocytov je sprostredkovaná proteínmi SNARE, ktoré však neviažu Ca^{2+} , ale ich činnosť je regulovaná **synaptotagmínmi** (ktoré sú závislé na Ca^{2+}) a **proteínkinázou C**.

3. CRAC kanály a expresia génov

Kalciové ióny regulujú širokú škálu fyziologických odpovedí organizmu. Vo väčšine prípadov je regulácia sprostredkovaná Ca^{2+} dependentnými molekulami. Jedným z cieľových proteínov pre ióny kalcia je **kalmodulín**. Komplex Ca^{2+} /kalmodulín aktivuje **Ca^{2+} /kalmodulín dependentné proteínkinázy** (CaMK), **kalcineurín** a **jadrový faktor aktivovaných T-lymfocytov** (NFAT) (Gilfillan a Metcalfe, 2011). Fosforylované **NFAT proteíny** sú v neaktívnych bunkách lokalizované v cytoplazme (Obr. 2). Aktivácia bunky vedie ku defosforylácii NFAT kalcineurínom a ku presunu molekuly do bunkového

jadra, kde indukuje transkripciu génov (Gwack et al., 2007). Transkripcia genómu vyžaduje kontinuálny nárast cytoplazmatického kalcia. Pri poruche aktivity STIM1 je účinok NFAT nedostatočný.

Dôsledkom aktivácie CRAC kanálov nastáva aj transkripcia a translácia *c-fos*. Aj v tomto prípade je **expresia *c-fos* špecifickou** odpoveďou na aktiváciu CRAC kanála a influx Ca^{2+} (Chang et al., 2006).

Úloha CRAC kanálov v intracelulárnych signálnych cestách a pri syntéze leukotriénov

Leukotriény sú agonistami receptorov CysLT1 a CysLT2 spojených s G_q -proteínom, PLC a IP_3 . Sú lokalizované na povrchu mastocytov, eozinofilov a endotelialných buniek. Leukotriény hrajú dôležitú úlohu tak vo včasnej ako aj neskorej fáze alergickej reakcie sprevádzajúcej hypersenzitivitu I. typu (Ng et al., 2012).

Aktivácia **cPLA₂** a sekrécia **LTC₄** sú procesy, ktoré sú výlučne závislé na influxe Ca^{2+} cez aktívny CRAC kanál. Ku aktivácii cPLA₂ dôjde len na základe vstupu Ca^{2+} do vnútra bunky z extracelulárneho prostredia, nikdy nie po uvoľnení intracelulárnych zásob. Enzým je citlivý práve na vzostup Ca^{2+} , ktorý sprevádza otvorenie CRAC kanálov a je lokalizovaný pod plazmatickou membránou (Di Capite a Parekh, 2009).

CRAC kanály a experimentálny model alergickej astmy

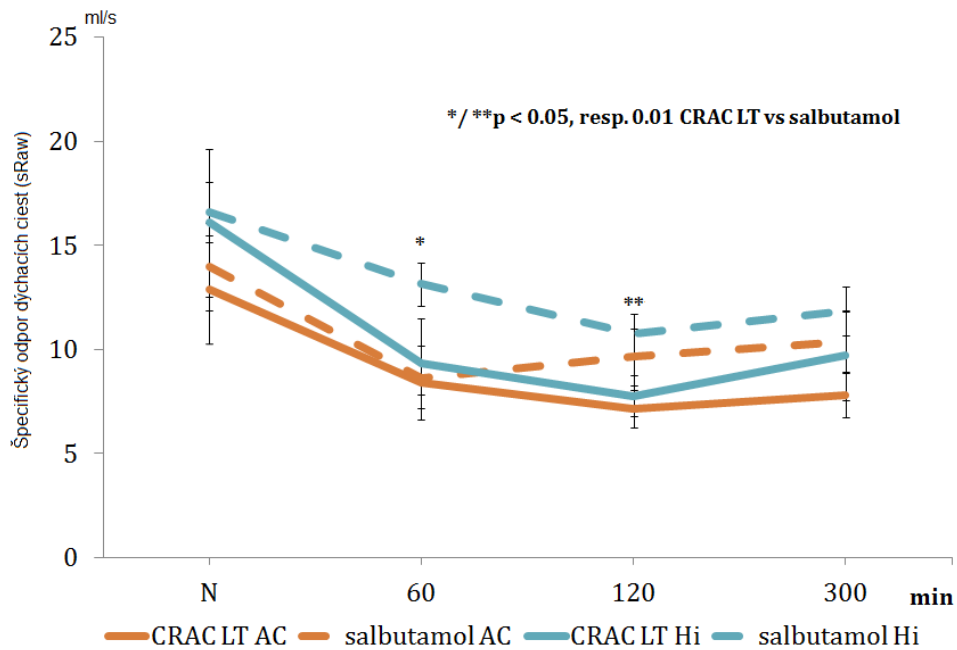
V našich experimentálnych podmienkach sme sledovali funkciu CRAC kanálov lokalizovaných na hladkej svalovine dýchacích ciest a ich zapojenie do patomechanizmu a symptomatológie alergickej astmy (Sutovska et al., 2013). V úvodnej fáze experimentov sme sa zamerali na akútny účinok antagonistu CRAC kanálov

(Orai 1 inhibítor, 3-fluoropyridín-4-karboxylát), t.j. potlačenie hlavných symptómov astmy – hyperreaktivity DC a patologického kašľa.

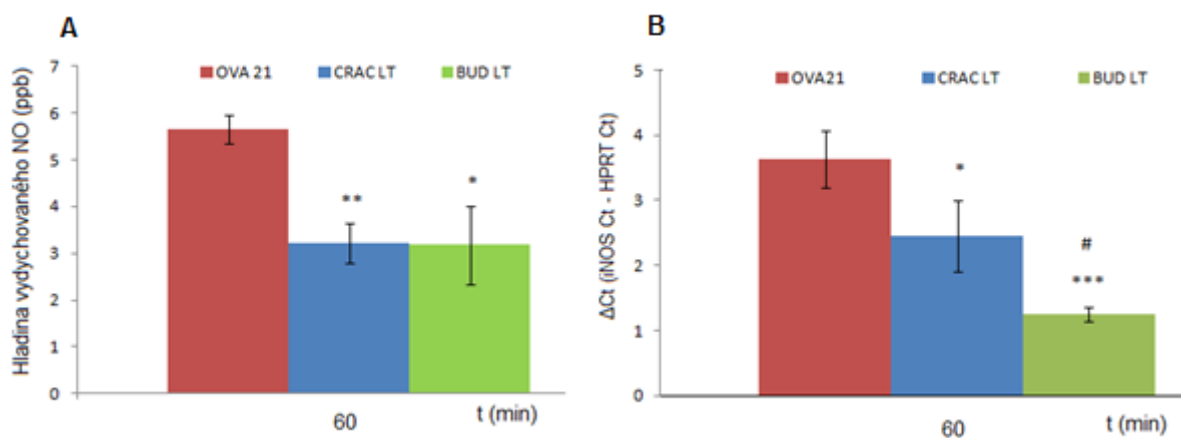
Zaznamenali sme pokles počtu zakašlaní u senzitizedovaných bdelých morčiat a pokles hodnôt sRaw, pričom v oboch prípadoch mal stupeň inhibície dávково – závislý charakter. Antitusický a bronchodilatačný účinok liečiva bol porovnateľný s efektom kontrolných liečiv, najvyššia použitá dávka dokonca prevyšovala účinok kodeínu a salbutamolu.

Dlhodobá aplikácia CRAC antagonistu viedla k prehĺbeniu antitusickej aktivity a ďalšiemu poklesu hodnôt sRaw ako odpoveď na iritáciu DC dvoma bronchokonstrikčnými substanciami, kyselinou citrónovou a histamínom (Obr. 3). Výsledky *in vitro* experimentov potvrdili zníženie amplitúdy kontrakcie izolovaných prúžkov hladkej svaloviny trachey a pľúc ako odpoveď na pôsobenie kumulatívnych dávok kontrakčných mediátorov Ach a H_1 , ktorý signifikantne prevyšoval efekt salbutamolu.

Na orientačné posúdenie protizápalového účinku CRAC antagonistu sme použili novozavedenú metodiku stanovenia hladín vydychovaného NO. Ide o neinvazívny spôsob monitorovania aktivity alergického zápalu, ktorý sa za týmto účelom bežne používa aj v klinickej praxi (Redington, 2006). Zaznamenali sme vysoko signifikantný, takmer dvojnásobný nárast hladín NO u zvierat po senzitizedácii a pokles až na východiskovú hodnotu po dlhodobej aplikácii antagonistu CRAC kanálov, pričom tento jeho efekt bol porovnateľný s účinkom budesonidu. Dôvodom poklesu vydychovaného NO je zmena expresie iNOS, ktorá má korešpondujúci charakter a na jej sledovanie sme použili RT-PCR (Obr. 4).



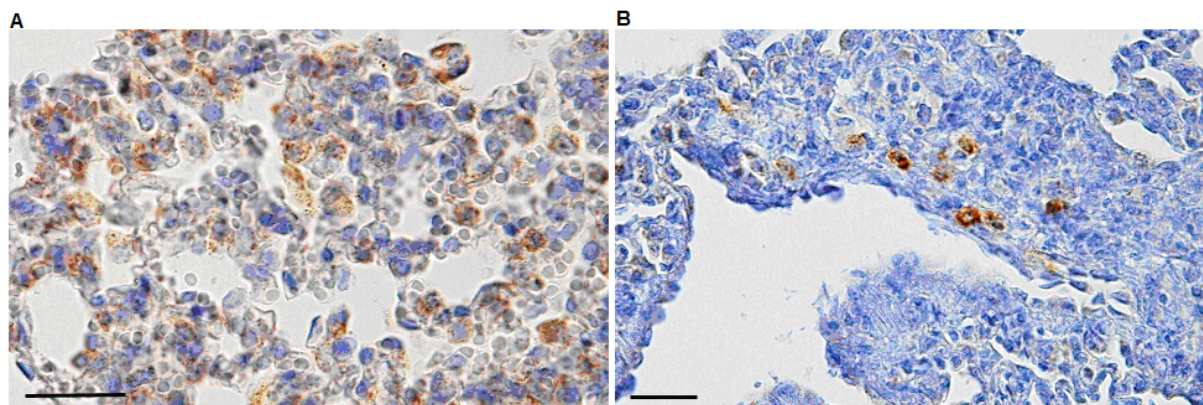
Obr. 3 Zmeny hodnôt špecifického odporu DC (sRaw, ml/s) vyvolané pôsobením 0.3 M kyseliny citrónovej (AC) a histamínu (Hi) a zaznamenané u senzitizedovaných morčiat, ktorým bol dlhodobo podávaný antagonist CRAC kanálov (CRAC LT AC, CRAC LT Hi) a kontrolné liečivo salbutamol (salbutamol AC, salbutamol Hi). *p<0.05; **p<0.01 skupiny CRAC LT vs salbutamol.



Obr. 4 A. Zmeny hladín vydychovaného NO u senzitizedovaných neliečených zvierat (OVA21) a senzitizedovaných morčiat, ktorým bol dlhodobo podávaný CRAC antagonist (CRAC LT) a kontrolné liečivo budesonid (BUD LT). Hodnoty vydychovaného NO boli zaznamenané 60 min po podaní poslednej dávky 3-fluoropyridín-4-karboxylátu a budesonidu. *p<0.05; **p<0.01 vs OVA21. **B.** Expresia iNOS u rovnakých skupín zvierat. Výsledné údaje expresie iNOS v danej vzorke (ΔCt) boli normalizované k expresii mRNA referenčného génu (HPRT, hypoxantín fosforibozyltransferáza) rovnakej vzorky. #p vs CRAC LT; **/ *** p vs OVA21.

Predpokladáme, že antagonist CRAC kanálov má protizápalový efekt. Túto myšlienku potvrdzujú aj výsledky imunohistochemického vyšetrenia, pri ktorom bol zistený signifikantný pokles mastocytárnej infiltrácie v pľúcnom (Obr. 5)

i tracheálnom tkanive. Naše zistenia sú v súlade so závermi autorov Yoshino et al. (2007), ktorí u senzitizedovaných potkanov potvrdili protizápalový efekt po podaní iného selektívneho inhibítora CRAC kanálov - YM-58483.



Obr. 5 Imunohistochemické vyšetrenie pľúcnych vzoriek zamerané na stupeň mastocytárnej infiltrácie – dôkaz mastocytárnej tryptázy. **A.** Zvýraznená difúzna mastocytárna infiltrácia pľúcneho parenchýmu u morčáťa zo senzitizedovanej neliečenej skupiny (mierka predstavuje 200 μm). **B.** Ojedinelá fokálna mastocytárna infiltrácia pľúcneho tkaniva potvrdená u senzitizedovaného zvierata, ktorému bol dlhodobo podávaný antagonist CRAC kanálov (mierka predstavuje 50 μm).

Antagonisty CRAC iónových kanálov v experimentálnych podmienkach preukázali signifikantný antitusický, bronchodilatačný a protizápalový efekt a pre schopnosť ovplyvniť viac štruktúr a mechanizmov participujúcich na patogenéze a symptomatológii alergickej astmy predstavujú veľmi perspektívnu skupinu liečiv, ktorá by v budúcnosti mohla výrazne zmeniť liečebnú stratégiu ochorenia.

Práca vznikla vďaka podpore projektu „Centrum experimentálnej a klinickej respirológie II“, ktorý je spolufinancovaný zo zdrojov ES – Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantov VEGA 1/0020/11, 1/0062/11 a UK 213/2012.

Zoznam použitej literatúry

1. Baba Y, Hayashi K, Fujii Y, Mizushima A, Watarai H, Wakamori M. Coupling of STIM1 to store-operated Ca^{2+} entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:16704–16709.
2. Baba Y, Kurosaki T. Physiological function and molecular basis of STIM1-mediated calcium entry in immune cells. *Immunol rev* 2009; 231: 174-188.
3. Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346: 1699–705.
4. Chang WCh, Nelson C, Parekh AB. Ca^{2+} influx through CRAC channels activates cytosolic phospholipase A_2 , leukotriene C_4 secretion, and expression of c-fos through ERK-dependent and -independent pathways in mast cells. *FASEB Journal* 2006; 20: 2381-2383.
5. Chung KF. Drugs to suppress cough. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14:19-27.
6. Di Capite J, Parekh AB. CRAC channels and Ca^{2+} signaling in mast cells. *Immunol rev* 2009; 231: 45-58.
7. Feske S, Picard C, Fischer A. Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clin Immunol* 2010; 135: 169-182.
8. Feske S. Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7:690–702.
9. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; 6:135–142.
10. Gilfillan AM, Metcalfe DD. *Mast Cell Biology: Contemporary and Emerging Topics*. Landes Bioscience and Springer Science Austin, USA, 2011, 716 pp.
11. Grigoriev I, Gouveia SM, Van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW, Jr, Hoogenraad CC, Akhmanova A. STIM1 is a MT-plus-endtracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr Biol* 2008; 18:177–182.
12. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: store-operated Ca^{2+} entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 2007; 42: 145-156.

13. Hansen I, Klimek L, Mosges R, Hormann K. Mediators of inflammation in the early and the late phase of allergic rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:159–163.
14. He J, Yu T, Pan J, Li H. Visualisation and identification of the interaction between STIM1s in resting cells. *PLoS One* 2012; 7:e33377.
15. Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 491-533.
16. Le Deist F, Capiod T. Immunodeficiencies and pathologies associated with mutations in STIM/ORAI, a membrane complex in the heart of calcium signalling. *Med Sci (Paris)* 2011; 27: 737-745.
17. Metcalfe DD, Boyce JA. Mast cell biology in evolution. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 1227–1229.
18. Ng SW, Bakowski D, Nelson C, Mehta R, Almeyda R, Bates G, Parekh AB. Cysteinyl leukotriene type I receptor desensitization sustains Ca²⁺-dependent gene expression. *Nature* 2012; 482: 111-115.
19. Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 2007; 87:165-217.
20. Parekh AB, Putney JW, Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005; 85:757–810.
21. Parekh AB. Local Ca²⁺ influx through CRAC channels activates temporally and spatially distinct cellular responses. *Acta Physiol* 2008; 195: 29-35.
22. Prakriya M. The molecular physiology of CRAC channels. *Immunol rev* 2009; 231: 88-98.
23. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *PNAS* 2007; 104: 14418-14423.
24. Redington AE. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 263–276.
25. Stathopoulos PB, Li GY, Plevin MJ, Ames JB, Ikura M. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of STIM1 via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 2006;281:35855–35862.
26. Sutovska M, Adamkov M, Kocmalova M, Mesarosova L, Oravec M, Franova S. CRAC Ion Channels and Airway Defence Reflexes in Experimental Allergic Inflammation. *Adv Exp Med Biol* 2013; 756: 39-48.
27. Widdicombe JG. Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *Anat Rec* 2003; 270A: 2-10.
28. Yoshino T, Ishikawa J, Ogha K, Morokata T, Takewaza R, Morio H, Okada A, Honda K, Yamada T. YM-58483, a selective CRAC channel inhibitor, prevents antigen-induced airway eosinophilia and late phase asthmatic responses via Th2 cytokine inhibition in animal models. *Eur J Pharmacol* 2007; 56: 225–233.



MUKOAKTIVÁTOR S **TETRADYNAMICKÝM** PÔSOBNÍM



- MUKOMODULAČNÝM**
- PROTIZÁPALOVÝM**
- ANTIOXIDAČNÝM**
- ANTIBAKTERIÁLNYM**

Skrátená informácia o lieku

Názov lieku: ERDOMED 300 mg kapsuly, ERDOMED 225 mg prášok na perorálny roztok (vrecká), ERDOMED 3,5 % prášok na perorálnu suspenziu. Kvalitatívne a kvantitatívne zloženie lieku: Erdosteín 300 mg v 1 kapsule, erdosteín 225 mg v 1 vrecku, erdosteín 3,5 g v 100 ml perorálnej suspenzie. Terapeutická indikácia: Erdosteín redukuje viskozitu bronchiálnych sekrétov a je indikovaný pri akútnej a chronickej ochorenia dýchacích ciest ako bronchitída, rinitída, sinusitída, laryngitída-faryngitída, exacerbácia chronickej bronchitídy; pre kapsuly a vrecká aj CHOPCH, hypersenzitívna astma bronchialis, bronchiektázie. Erdosteín tiež pôsobí protiekľvne proti zhoršeniu ochorenia dýchacích ciest a je indikovaný v preventívnej liečbe stabilných chronických bronchitíd u fajčiarov, v rekurentných infekčných epizódach, napr. počas zimnej sezóny a podobne. Je tiež indikovaný ako súčasť liečby s antibiotikami v prípade exacerbácie s bakteriálnou infekciou. Kapsuly a vrecká - Erdosteín sa ďalej používa na predchádzanie komplikácií po chirurgickom zákroku, ako je zápal pľúc alebo nevedúnosť časti pľúc. Erdomed je indikovaný u dospelých, dospievajúcich a detí s telesnou hmotnosťou: kapsuly a vrecká - vyššou ako 30 kg (nad 12 rokov), prášok na perorálnu suspenziu - vyššou ako 15 kg. Dávkovanie a spôsob podávania: Kapsuly: 1 kapsula 2-3 krát denne. Prášok na perorálny roztok: 1 vrecko (225 mg) 2-3 krát denne. Obsah vrecka sa rozpustí v pohári vody a vypije. Prášok na perorálnu suspenziu: Najvhodnejšia lieková forma pre deti. Dávka pre dospelých je 10 ml (350 mg) 2-krát denne. Dieťa Vo všeobecnosti dávka na kilogram telesnej hmotnosti je 10 mg/kg/deň podaná 2-krát denne: 15-19 kg (3-6 rokov): 2,5 ml 2-krát denne, 20-30 kg (7-12 rokov): 5 ml 2-krát denne, nad 30 kg (nad 12 rokov): 5 ml 3-krát denne. Terapeutický účinok sa prejaví po 3 dňoch liečby, priemerne dĺžka liečby pre dosiahnutie plného účinku je 7 dní. Pri chronickej ochorenia sa môže erdosteín používať aj dlhšiu dobu. Kontraindikácie: Precitlivenosť na liečivo alebo na ktorúkoľvek z pomocných látok lieku; deti s telesnou hmotnosťou nižšou ako 15 kg; hepatálna porucha alebo abnormality (napr. vzostup sérovej alkalického fosfatázy, transaminázy atď.); namáhaná insuficiencia (úhľasť krvotinu <35ml/min); homocysteinúria (liek je zdrojom homocysteínu a nasietú štádne údaj je týkajúca sa podávania erdosteínu v prípade kongenitálnych porúch metabolizmu aminokyselín, zvlášť u tých pacientov, ktorí majú dodržiavať diétu bez metionínu), u pacientov s hepatálnou chrbtú a pri deficencii enzýmu cystatín-syntáza je liek kontraindikovaný kvôli možnej interferencii metabolizom s metabolizmom metionínu, fenylketonúria. Osobitné upozornenia: Pri objavení sa príznakov a symptómov klasickej precitlivenosti liečba erdosteínom musí byť okamžite prerušená. Prášok na perorálny roztok a perorálnu suspenziu obsahuje zaspátam a sacharózu. Toto treba brať do úvahy v prípade cukrovky alebo nízko kalorickej diéty. Z dôvodu prítomnosti sacharózy, pacienti so zriedkavými dedičnými problémami intolerancie fruktózy, glukózo-galaktózy malabsorpcie alebo deficitu sacharózy a izomaltázy nesmú užívať tento liek. Vzhľadom na obsah nítiumbenzoátu, liek môže spôsobiť alergickú reakcie (s možným oneskorením). Liekové a iné interakcie: Neboli pozorované žiadne vážne interakcie s inými liečivami často používanými pri respiračných infekciách a chronickej obštrukčnej pľúcnych chorobách ako teofylín, bronchodilatancia, arytmických, amoxicilín alebo sulfatrimetoprim. Erdosteín zvyšuje účinok niektorých antibiotík (napr. amoxicilínu, ampicilínu), čo je možné využiť na terapeutické účely. Súbežné podávanie tých antibiotík nemá opodstatnenie a môže indukovať akumuláciu stafylokokného osrútu v bronchiálnom strome so zvyšovaním rizika superinfekcie alebo bronchospazmov. Gravidita: O použití lieku u gravidných žien nie sú dostatočné údaje. Preto sa Erdomed nemá podávať počas gravidity a laktácie. Nežiaduce účinky: Veľmi zriedkavé: bolesť hlavy, puchľavnutie, dýchavosť, zmena chuti, nevoľnosť, vracanie, hnačka, bolesť v epigastriu, šibľavka, začervenanie, edém. Veľkosť balenia: kapsuly: 10 alebo 20 x 300 mg kapsúl, prášok na perorálny roztok: 20 vreciek po 225 mg, suspenzia: 1 x 50 g prášku na prípravu 100 ml perorálnej suspenzie (3,5%). Spôsob vydávania: Liek je viazaný na lekársky predpis. Držiteľ rozhodnutia o registrácii: Medicom International s.r.o., Bmo. Dátum poslednej revízie textu: všetky formy: XI/2012.



30/2012 ERD, Iuz, chium, vydání nov 12



Júnová 33, 831 01 Bratislava 3
 tel: 02/5920 7320, fax: 02/5920 7384
 e-mail: office@csco-pharma.sk
 www.csco-pharma.sk

Dobudovanie centra experimentálnej a klinickej respirológie (CEKR II)



„Podporujeme výskumné aktivity na Slovensku/Projekt je spolufinancovaný zo zdrojov EÚ“