

**Anna Paul Hrabovská**  
(zostavovateľka)

**Pokroky vo farmakológii  
v Slovenskej republike XVIII**



**Univerzita Komenského v Bratislave**

**Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave**



**Anna Paul Hrabovská**  
(zostavovateľka)

**Pokroky vo farmakológii  
v Slovenskej republike XVIII**

**2023**  
**Univerzita Komenského v Bratislave**

Zostavovateľka

doc. PharmDr. Anna Paul Hrabovská, PhD.

Recenzentky:

prof. RNDr. Soňa Fraňová, PhD.

prof. MUDr. Martina Šutovská PhD.



Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BY-SA 4.0

Viac informácií o licencií a použití diela:

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



[https://stella.uniba.sk/texty/FAF\\_pokroky vo\\_famakologii\\_18.pdf](https://stella.uniba.sk/texty/FAF_pokroky vo_famakologii_18.pdf)

Vydavateľ

Univerzita Komenského v Bratislave, 2023

**ISBN 978-80-223-5698-5 (tlač)**

**ISBN 978-80-223-5699-2 (online)**

**Slovenská farmakologická spoločnosť  
Slovenskej lekárskej spoločnosti  
a  
Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta  
Univerzita Komenského v Bratislave**

**s podporou  
Slovenskej lekárskej komory**

**Venované spomienke na priekopníkov slovenskej  
experimentálnej a klinickej farmakológie**

**prof. MUDr. Františka Šveca, DrSc.  
a prof. MUDr. Pavla Šveca, DrSc.**



**prof. MUDr. František Švec, DrSc.  
28. 8. 1906 – 16. 3. 1976**



**prof. MUDr. Pavel Švec, DrSc.  
30. 8. 1940 – 22. 11. 2015**

## OBSAH

PREDSLOV <i>Paul Hrabovská, A.</i> .....	5
TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL OVPLYVNENIA VÁPNIKOVEJ SIGNALIZÁCIE V KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENIACH <i>Rajtík, T.</i> .....	6
RELATÍVNA EXPRESIA GÉNOV ZODPOVEDNÝCH ZA TRANSPORT SODÍKA A VODY CEZ ALVEOLÁRNY EPITEL V MONOKROTALÍNOVOM MODELI PEŤUCNEJ HYPERTENZIE <i>Lelková, K., Kmecová, Z., Vetešková, J., Podžubanová, M., Babál, P., Křenek, P., Klimas, J.</i> .....	15
VPLYV KYNURENÍNOVEJ KYSELINY NA JEDNOTLIVÉ VETVY FIBROTICKEJ KASKÁDY V <i>IN VITRO</i> MODELI FIBRÓZY <i>Sýkorová, S., Vavrínek, P., Vavřincová-Yaghi, D.</i> .....	23
PIOGLITAZÓN MODULUJE GÉNY REGULUJÚCE METABOLIZMUS GLUKÓZY A ZÁPÁL V KOSTROVOM SVALE U POTKANOV S EXPERIMENTÁLNYM DIABETOM MELLITUS TYPU I <i>Čináková, A., Kráľová, E., Křenek, P., Klimas, J.</i> .....	31
FARMAKOGENETICKÉ TESTOVANIE PACIENTOV S KARDIOPULMONÁLNYMI OCHORENIAMI <i>Stollárová, N., Bies Piváčková, L., Klimas, J., Křenek, P., Goncalvesová, E., Luknár, M., Dóka, G.</i> .....	38
ADOLESCENTI A UŽÍVANIE LIEKOV VYDÁVANÝCH BEZ LEKÁRSKEHO PREDPISU <i>Urbánková, J., Kosírová, S.</i> .....	49

## **Predslov**

*Vážené čitateľky a čitatelia,*

*recenzovaný zborník vedeckých prác mladých farmakológov je tradične venovaný dvom významným osobnostiam slovenskej farmakológie. Rada konštatujem, že mladí farmakológovia zaslali na publikovanie viacero zaujímavých rukopisov, ktorých prezentácie odznali online na Dni mladých farmakológov SR XXVII (Memoriál prof. F. Šveca a prof. P. Šveca) dňa 10. 11. 2022. To naznačuje, že tradičný zborník Pokroky vo farmakológii v Slovenskej republike, ktorého 18. edíciu máte možnosť listovať, má pevné základy a dobrú reputáciu.*

*Spolu s recenzentami sme radi, že hoci ide v mnohých prípadoch o autorské prvotiny, všetky príspevky uvedené v tomto zborníku sú na vysokej vedeckej úrovni a odrážajú výnimočnú úroveň farmakologického výskumu na Slovensku. Súbor originálnych prác je navyše doplnený vyžiadaným prehľadovým článkom, ktorý pojednáva o terapeutickom potenciáli ovplyvnenia vápnikovej signalizácie v kardiovaskulárnych ochoreniach.*

*Všetky práce prešli recenzným konaním s dôrazom na vedeckú a formálnu stránku príspevkov, pretože prísny recenzný proces neprispieva len k ich skvalitneniu, ale najmä k získaniu skúseností a zručností mladých autorov.*

*Zborník vychádza pod záštitou Slovenskej farmakologickej spoločnosti a Katedry farmakológie a toxikológie Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, a s podporou Slovenskej lekárskej komory. Prajem Vám príjemné čítanie a možno nájdete v nasledujúcich článkoch inšpiráciu aj pre vlastný výskum.*

*V Bratislave 5. 10. 2023*

*doc. PharmDr. Anna Paul Hrabovská, PhD.  
zostavovateľka*

# TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL OVPLYVNENIA VÁPNIKOVEJ SIGNALIZÁCIE V KARDIOVASKULÁRNYCH OCHORENIACH

## THERAPEUTIC POTENTIAL OF INFLUENCING CALCIUM SIGNALING IN CARDIOVASCULAR DISEASES

Rajtík, T.

*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika*

**Abstrakt:** Vápnik zohráva kritickú úlohu v regulácii excitačno-kontrakčného ako aj excitačno-transkripčného prepojenia v myokarde a podieľa sa na vzniku či progresii mnohých vážnych patológií od ischemicko-reperfúzneho poškodenia, cez arytmiogézu až po chronické srdcové zlyhávanie. Napriek tomu, sú však liečivá zasahujúce do  $\text{Ca}^{2+}$  obratu a metabolizmu vo farmakoterapii zastúpené iba minimálne, ako blokátory vápnikových kanálov či senzitivizátory vápnika. Preto je potrebné hľadať nové možnosti využitia týchto mechanizmov a jedny z takých môžu predstavovať látky ovplyvňujúce vápnik/kalmodulín-dependentnú proteínkinázu 2, ako regulátora cyklovania vápnika či pre  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabilné iónové TRPV kanály, ktoré sa podieľajú na mnohých procesoch od vzniku akčného potenciálu, cez plnenie sarkoplazmatického retikula až po vznik reaktívnych foriem kyslíka. Obidva ciele sú dnes aktívne skúmané a predstavujú sľubný potenciál príchodu nových terapeutík v bližšej budúcnosti.

**Summary:** Calcium plays a critical role in the regulation of excitation-contraction as well as excitation-transcriptional coupling in the myocardium and participates in the development or progression of many serious pathologies from ischemia-reperfusion injury, through arrhythmogenesis to chronic heart failure. Despite this, drugs interfering with  $\text{Ca}^{2+}$  turnover or metabolism are only minimally present in the pharmacotherapy, e.g. calcium channel blockers or calcium sensitizers. Therefore, it is necessary to identify new possibilities of utilizing these mechanisms, and one of them can be substances affecting calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2, as a regulator of calcium cycling or  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable ionic TRPV channels, which are involved in many processes from the generation of the action potential, through the filling of the sarcoplasmic reticulum to the formation of reactive oxygen species. Both targets are actively researched today and represent a promising potential for the arrival of new therapeutics in the near future.

**Kľúčové slová:** vápnikové hospodárenie, inhibitory CaMKII, modulácia TRPV

**Keywords:** calcium handling, CaMKII inhibitors, TRPV modulators

## ÚVOD

Vápnik je kritickým elementom zúčastňujúcim sa regulácie funkcií kardiovaskulárneho systému (KVS) na viacerých úrovniach od depolarizácie v bunkách sino-atriálneho uzla prevodového systému srdca, cez reguláciu kontrakcie vplyvom na kontraktilné proteíny a ich regulátory, až po metabolické procesy súvisiace s funkciou mitochondrií a transkripciou. Napriek tomu, že jeho úloha je známa v mnohých patológiách KVS, od vzniku arytmií, porúch kontraktility, vápnikového preťaženia spojeného s poškodením mitochondrií a bunkovou smrťou až po patologickú remodeláciu (1), sú možnosti jeho farmakologickej modulácie značne limitované. Prakticky sú dnes liečivá priamo zasahujúce od regulácie vápnikových tokov a hospodárenia zastúpené iba v skupinách blokátorov vápnikových kanálov na terapiu arytmií či hypertenzie a v liečivách v terapii srdcového zlyhávania akými sú digitalisové alkaloidy či senzitivizátory vápnika ako napr. levosimendan. Z uvedených informácií je teda zrejmé, že praktické využitie modulácie vápnika má zásadný potenciál v budúcej terapii KVS patológií na mnohých úrovniach (2). Do skupín novo vyvíjaných liečiv, ktoré majú budúci terapeutický potenciál môžeme zaradiť látky ovplyvňujúce vápnik-dependentnú proteínkinázu 2 (CaMKII) (3) či tzv. TRP receptory (receptory s prechodným potenciálom), konkrétne ich vaniloidnú podskupinu nazývanú TRPV kanály (4). V oboch prípadoch sa jedná o látky, ktoré sa už dostali do pokročilejších fáz predklinického skúšania a teda je pravdepodobné, že v bližšej budúcnosti sa s nimi budeme môcť stretnúť aj klinickou praxou, čím by sa po dlhšom období opäť rozšíril zástup liečiv ovplyvňujúcich vápnikové hospodárstvo v KVS.

### **Farmakologické potenciál ovplyvnenia CaMKII v kardiovaskulárnych patológiách**

Vápnik/kalmodulín-dependentná proteínkináza 2 zohráva dôležitú úlohu v regulácii vnútrobunkového vápnikového obratu, keďže je priamo aktivovaná komplexom vápnik/kalmodulín (Ca/CaM), ktorý je súčasťou vnútrobunkovej vápnikovej transdukčnej kaskády (5). Po iniciálnej aktivácii CaMKII môže kináza nadobudnúť tzv. autofosforylačnú aktivitu, teda schopnosť ďalej udržiavať enzým v aktivite aj v prípade, že priama aktivácia komplexom Ca/CaM poklesla (6). Práve táto autofosforylácia však môže byť problematickým elementom, keďže nadmerná aktivita kinázy vedie k hyperfosforylácii substrátov akými sú L-typ vápnikových kanálov (LTCC), ryanodínových receptorov (RyR2) či fosfolambánu (PLN) (tzv. triády, resp. SERCA regulatému) (7). V týchto podmienkach dochádza najčastejšie k podnieteniu vzniku srdcových arytmií, v spojitosti s CaMKII najmä k tzv. skorých (early) alebo neskorých (delayed) afterdepolarizácií (8, 9). Klinicky už bolo preukázané, že tieto typy arytmií spojených s nadmernou aktivitou kinázy sa vyskytujú v patológiách, akými sú atriálne fibrilácie, dysfunkcia sínusového uzla či ventrikulárne fibrilácie na rôznych podkladoch (10, 11, 12). Práve preto môže látky s inhibičnou aktivitou pre CaMKII predstavovať potenciálne liečivá pre farmakoterapiu uvedených arytmií. Samozrejme škodlivá aktivita kinázy nie je ohraničená len jej absolútnou nadmernou aktiváciou. Situácia sa komplikuje najmä v kontexte možností jej regulácie cez rôzne posttranslačné modifikácie. Ukázalo sa totiž, že aktivita CaMKII je ovplyvniteľná aj oxidáciou (13), glykáciou (14) či nitrozyláciou jej domén (15). To navyše aj s ohľadom na fakt, že CaMKII je lokalizovaná vo všetkých bunkových kompartmentoch vrátane jadra a mitochondrií, preto jej aktivita je rôzne regulovaná v kontexte lokalizácie ako aj aktivačných/inhibičných stimulov



a neovplyvňuje iba vápnikový obrat na úrovni triády, ale aj bunkový metabolizmus a transkripciu (16, 17). Preto je už dnes zrejmé že viaceré potenciálne liečivá budú musieť zohľadňovať aj tieto aspekty a cielene ovplyvňovať kinázu v správnom čase na správnom mieste. Preto sú aktuálne vyvíjané aj selektívne liečivá na báze peptidov či nukleotidov, ktoré by dokázali špecificky ovplyvniť konkrétnu izoformu enzýmu či ju selektívne zacieliť, tam kde je v danom čase potrebné, napr. pri patologickej remodelácii v srdcovom zlyhávaní.

## Inhibícia a modulácia aktivity CaMKII

V prípade inhibície CaMKII je potrebné zohľadniť typ patológie, pretože sa ukazuje, že v nie každej patológii je žiaduce inhibovať jej aktivitu *en bloc*, ako napríklad v pokročilom srdcovom zlyhávaní (13) či kardiotoxicite indukovanej antracyklínmi (18). Každopádne viaceré patológie ako napríklad srdcové arytmie sa ukazujú ako vhodný kandidáti na použitie inhibítorov CaMKII. Túto skupinu látok môžeme rozdeliť do dvoch hlavných skupín a to malomolekulové inhibítory CaMKII a peptidy/nukleotidy, pričom každá z týchto skupín má svoje pozitíva aj negatíva, každopádne najbližšie reálnemu klinickému využitiu sa zatiaľ priblížila skupina malomolekulových inhibítorov (obrázok 1).

Modulácia CaMKII			
<b>Malé molekuly</b>	<b>Peptidy</b>	<b>Antisense oligonukleotid</b>	<b>Nepriame modulátory</b>
<b>Výhody</b>	<b>Výhody</b>	<b>Výhody</b>	<b>Výhody</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rýchlosť nástupu účinku</li> <li>• Biodostupnosť</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Špecifické pre CaMKII</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Špecifita pre izoformy CaMKII</li> <li>• Dlhý plazmaický polčas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eliminácia off-target efektov</li> </ul>
<b>Nevýhody</b>	<b>Nevýhody</b>	<b>Nevýhody</b>	<b>Nevýhody</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibícia extrakardiálnej CaMKII</li> <li>• Znížená kinázová špecifita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zhoršená biologická dostupnosť</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pomalý nástup účinku</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pravdepodobne nekompletná blokáda CaMKII</li> </ul>
KN-93 GS-680 SMP-114 NP202	CN21 CN19o AAV9		

Obrázok 1/Figure 1

Prehľad rôznych skupín modulátorov CaMKII

Jednou z najpodrobnejšie preskúmaných látok v skupine malomolekulových inhibítorov CaMKII je určite látka známa pod označením KN-93, ktorá bola pôvodne popísaná ako látka inhibujúca katalytickú doménu CaMKII. Napriek tomu, v poslednom výskume sa o nej uvažuje ako látke, ktorá v skutočnosti antagonizuje kalmodulín (19) a teda nezabraňuje nadmernej autofosforylácii ako bolo pôvodne navrhované. Každopádne, bez ohľadu na tento fakt, kombinácia pomerne nízkej inhibičnej koncentrácie a relatívne vysokého množstva popísaných „off-target“ efektov (LTCC, napätovo-závislé K<sup>+</sup> kanály, etc.) (20, 21), zabraňuje jej potenciálnemu klinickému použitiu napriek tomu, že v mnohých animálnych modeloch bola úspešne testovaná napr. v prípade výskytu komorových arytmií či bunkovej smrti (22, 23).

V prípade ďalších malomolekulových inhibítorov s vyššou inhibičnou koncentráciou boli, hoci zatiaľ bez klinického skúšania, vyvinuté látky GS680 či RA608, ktoré sa vo viacerých KVS patológiách ukázali ako prospešné pre obnovenie srdcovej funkcie či na redukciiu patologickej remodelácie (24, 25). Každopádne, najbližšie ku klinickému využitiu sa doposiaľ dostala látka s názvom NP202, ktorá mala byť určená na redukciiu patologickej remodelácie myokardu v post-infarktovom myokarde s ľavokomorovou dysfunkciou (26). Napriek tomu, že sa nedostala cez 3. fázu klinického skúšania, jedná sa zatiaľ o najväčšie priblíženie k reálnemu využitiu inhibítorov CaMKII v terapii závažných KVS ochorení. Preto azda môžeme hovoriť o reálnom klinickom potenciáli inhibície CaMKII v budúcej farmakoterapii.

Najnovšou a menej prebádanou skupinou látok ovplyvňujúcich CaMKII sú peptidy (AIP či AC3-I) (12, 27) a nukleotidy (DNA/RNA protismerné oligonukleotidy) (28), ktorých výhodou je potenciál vyššieho zacielenia jednotlivých izoform CaMKII (CNS dominantná forma  $\alpha$  vs. KVS dominantná forma  $\delta$ ), v prípade nukleotidov dokonca aj detailného zacielenia ich splice (zostrihaných) variantov – jadrová vs. cytoplazmatická izoforma. Toto môže predstavovať terapeutický potenciál napr. v scenároch kedy nie je vhodné inhibovať celkovú aktivitu CaMKII na zachovanie vápnikového obratu v cytoplazme, ale zároveň na utlmenie jej nadmernej aktivity v jadre spojenej so zvýšenou transkripciou a remodeláciou (29). Peptidy okrem toho ponúkajú aj možnosť zacielenia špecifického aminokyselinového zvyšku na katalytickej doméne (napríklad takému, ktorý podlieha oxidácii či glykácii) a teda aj selektívnejšieho ovplyvnenia dynamiky CaMKII, napr. v prítomnosti diabetu (30). Samozrejme tento typ látok je ďalej od klinického využitia ako malomolekulové inhibítory, no napriek tomu predstavuje solídnu bázu pre výskum do budúcnosti.

### **TRPV modulátory a ich implikácia v patologických modeloch kardiálnych patológií**

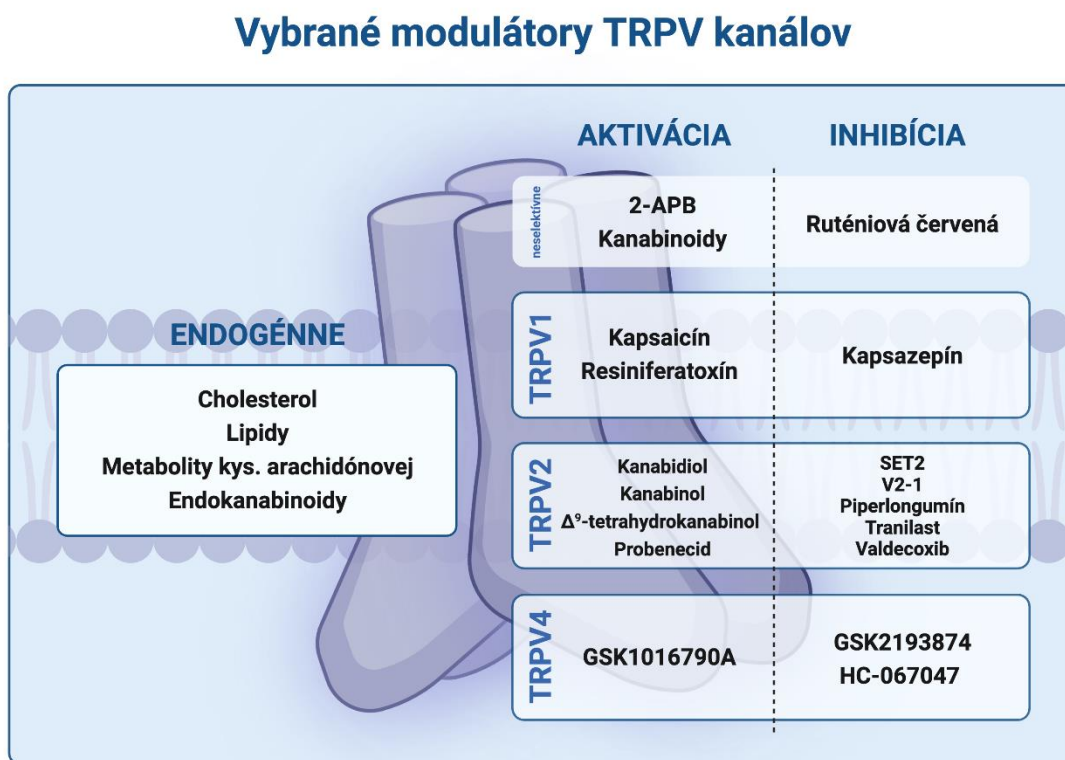
Vaniloidné TRP kanály sú vo všeobecnosti polymodálnou skupinou vápnik-senzitívnych kanálov, ktoré reagujú – aktivujú/inhibujú sa ako odpoveď na fyzikálne zmeny prostredia – mechanické osmotické alebo teplotné zmeny, nociceptívne stimuly ako aj vplyvom endogénnych a exogénnych modulátorov (4). Podobne ako v prípade CaMKII, ani modulácia aktivity TRPV kanálov zatiaľ nie je terapeuticky využívaná napriek tomu, že ovplyvňujú celú plejádu procesov v KVS od tvorby akčného potenciálu, oxidačného stresu až po patologickú remodeláciu (31). Navyše, na rozdiel od vápnikového vstupu cez LTCC, vstup  $\text{Ca}^{2+}$  cez TRPV nemá taký významný dopad na kontraktilitu a uvoľnenie vápnika z RyR2 receptorov, čo môže poskytnúť „jemnejšiu“ alternatívu v scenároch kedy tieto procesy nechceme výrazne ovplyvniť.

V súvislosti s cieľným ovplyvnením aktivity TRPV kanálov a nimi sprostredkovaných vápnikových prúdov sa opierame o pomerne úzku skupinu chemických látok. Najväčšou limitáciou je v tomto smere obmedzený počet selektívnych agonistov a antagonistov, ktoré by umožňovali cieľnú farmakologickú moduláciu konkrétnych izoform TRPV, a spolu s tým podrobnejšie objasnenie ich presnej funkcie v kardiovaskulárnom systéme ako aj ich multiorgánovú funkciu. Medzi endogénne látky regulujúce aktivitu TRPV zaraďujeme napríklad endokanabinoidy (anandamid) (4) a skupiny lipidov (napr. metabolity fosfolipázy C, fosfolipázy A<sub>2</sub>) (32) spolu s cholesterolom (33), ktoré interagujú s TRPV priamo alebo prostredníctvom zmien na úrovni cytoplazmatickej membrány a lipidových raftov. Aktiváciou TRPV1 metabolitom kyseliny arachidónovej

alebo N-oleoyldopamínom sa pozorovalo zmiernenie srdcového poškodenia indukovaného myokardiálnym I/R (34, 35).

### Látky ovplyvňujúce TRPV kanály a ich terapeutický potenciál

V rámci exogénnych agonistov/antagonistov rozoznávame viacero neselektívnych zlúčenín, ktoré môžu vykazovať afinitu aj k iným off-target receptorom ako sú zástupcovia TRPV. Patrí sem univerzálny TRP blokátor ruténiová červená alebo 2-aminoetoxydifenyl borát (2-APB), ktorý je najčastejšie implikovaný ako aktivátor TRPV2 (36, 37). Jeho efekt môže byť potencovaný ďalším neselektívnym agonistom kanabidiolom, patriacim do skupiny kanabionoidov, ktorých zástupcovia sa podieľajú na neselektívnej modulácii viacerých TRPV1-4 kanálov (37, 38). Viac neselektívnych modulátorov TRPV je uvedených na obrázku 2.



Obrázok 2/Figure 2

Prehľad aktivátorov a inhibítorov vybraných TRPV kanálov

Vzhľadom na to, že TRPV2 kanály predstavujú významný cieľ najmä v súvislosti s potlačením ich aktivity/ovplyvnením subcelulárnej lokalizácie v KVS pri liečbe dilatovanej kardiomyopatie asociovannej s Duchennovou muskulárnou dystrofiou (39) alebo pri inhibícii progresie nádorových ochorení (40), dôraz je primárne kladený na skrining selektívnych antagonistov TRPV2. Prvou takouto zlúčeninou je inhibítor TRPV2 SET2 (41), ku ktorému sa v tomto roku pripojila aj zlúčenina V2-1 (42), avšak na ich prvé *in vivo* využitie sa stále čaká. Ďalší selektívny blokátor TRPV4 – GSK2193874 sa ukázal

byť efektívnou intervenciou pri redukcii pľúcneho edému navodeného srdcovým zlyháváním alebo ischemicko/reperfúznym poškodením pľúc (43, 44). Aj keď v súčasnosti existuje hneď niekoľko špecifických modulátorov pre samostatné izoformy TRPV (valdecoxib, piperlongumín, tranilast a.i.) (45, 46, 47), ktoré hoci vykazujú selektivitu pre konkrétnu izoformu TRPV, avšak naďalej disponujú afinitou aj k iným receptorom, čo nie je v súčasnej dobe dostačujúce pre detailné objasnenie presnej funkcie týchto kanálov.

## ZÁVER

Modulácia vápnika či už cez ovplyvnením aktivity CaMKII či TRPV kanálov predstavuje životaschopnú alternatívu výskumu nových liečiv zasahujúcich do vápnikového obratu a metabolizmu. O to viac, že napriek ubikvitnosti vápnikového systému v KVS je doposiaľ využívaný len okrajovo a nové, účinné terapeutiká závažných kardiálnych fenotypov sú stále nedostatkovým klinickým tovarom. Aj systém pôsobenia CaMKII ako aj TRPV kanálov predstavujú zaujímavé alternatívy liečby rôznych kardiálnych patológií, od reperfúzných arytmií až po rozvoj post-infarktovej patologickej remodelácie a preto ich výskum predstavuje dôležitý element v budúcej terapii KVS ochorení.

## POĎAKOVANIE

Chcel by som poďakovať za finančnú podporu grantovej agentúre VEGA 1/0775/21 a za technickú pomoc Mgr. Linde Bartošovej.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1080:165-77.
2. Njegic A, Wilson C, Cartwright EJ. Targeting Ca(2+) Handling Proteins for the Treatment of Heart Failure and Arrhythmias. *Front Physiol.* 2020;11:1068.
3. Reyes Gaido OE, Nkashama LJ, Schole KL, Wang Q, Umapathi P, Mesubi OO, et al. CaMKII as a Therapeutic Target in Cardiovascular Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2023;63:249-72.
4. Seebohm G, Schreiber JA. Beyond Hot and Spicy: TRPV Channels and their Pharmacological Modulation. *Cell Physiol Biochem.* 2021;55(S3):108-30.
5. Mattiazzi A, Bassani RA, Escobar AL, Palomeque J, Valverde CA, Vila Petroff M, et al. Chasing cardiac physiology and pathology down the CaMKII cascade. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(10):H1177-91.
6. Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science.* 1992;256(5060):1199-202.
7. Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;51(4):468-73.
8. Belardinelli L, Giles WR, Rajamani S, Karagueuzian HS, Shryock JC. Cardiac late Na<sup>+</sup> current: proarrhythmic effects, roles in long QT syndromes, and pathological relationship to CaMKII and oxidative stress. *Heart Rhythm.* 2015;12(2):440-8.

9. Xie LH, Chen F, Karagueuzian HS, Weiss JN. Oxidative-stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling. *Circ Res.* 2009;104(1):79-86.
10. Grueter CE, Colbran RJ, Anderson ME. CaMKII, an emerging molecular driver for calcium homeostasis, arrhythmias, and cardiac dysfunction. *J Mol Med (Berl).* 2007;85(1):5-14.
11. Hund TJ, Mohler PJ. Role of CaMKII in cardiac arrhythmias. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25(5):392-7.
12. Bezzerides VJ, Caballero A, Wang S, Ai Y, Hyland RJ, Lu F, et al. Gene Therapy for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia by Inhibition of Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Kinase II. *Circulation.* 2019;140(5):405-19.
13. Rajtik T, Goncalvesova E, Varga ZV, Leszek P, Kusmierczyk M, Hulman M, et al. Posttranslational modifications of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$  and its downstream signaling in human failing hearts. *Am J Transl Res.* 2017;9(8):3573-85.
14. Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, Ferguson A, Dao K, et al. Diabetic hyperglycaemia activates CaMKII and arrhythmias by O-linked glycosylation. *Nature.* 2013;502(7471):372-6.
15. Coultrap SJ, Bayer KU. Nitric oxide induces Ca<sup>2+</sup>-independent activity of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). *J Biol Chem.* 2014;289(28):19458-65.
16. Bugger H, Pfeil K. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(7):165768.
17. Singh MV, Swaminathan PD, Luczak ED, Kutschke W, Weiss RM, Anderson ME. MyD88 mediated inflammatory signaling leads to CaMKII oxidation, cardiac hypertrophy and death after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;52(5):1135-44.
18. Galis P, Bartosova L, Farkasova V, Szobi A, Horvath C, Kovacova D, et al. Intermittent Hypoxic Preconditioning Plays a Cardioprotective Role in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol.* 2023;23(5-6):185-97.
19. Wong MH, Samal AB, Lee M, Vlach J, Novikov N, Niedziela-Majka A, et al. The KN-93 Molecule Inhibits Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) Activity by Binding to Ca(2+)/CaM. *J Mol Biol.* 2019;431(7):1440-59.
20. Ledoux J, Chartier D, Leblanc N. Inhibitors of calmodulin-dependent protein kinase are nonspecific blockers of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in vascular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;290(3):1165-74.
21. Rezazadeh S, Claydon TW, Fedida D. KN-93 (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine), a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor, is a direct extracellular blocker of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(1):292-9.
22. Adameova A, Carnicka S, Rajtik T, Szobi A, Nemcekova M, Svec P, et al. Upregulation of CaMKII $\delta$  during ischaemia-reperfusion is associated with reperfusion-induced arrhythmias and mechanical dysfunction of the rat heart:

- involvement of sarcolemmal Ca<sup>2+</sup>-cycling proteins. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(8):1127-34.
23. Szobi A, Rajtik T, Carnicka S, Ravingerova T, Adameova A. Mitigation of postischemic cardiac contractile dysfunction by CaMKII inhibition: effects on programmed necrotic and apoptotic cell death. *Mol Cell Biochem*. 2014;388(1-2):269-76.
  24. Lebek S, Plöbl A, Baier M, Mustroph J, Tarnowski D, Lucht CM, et al. The novel CaMKII inhibitor GS-680 reduces diastolic SR Ca leak and prevents CaMKII-dependent pro-arrhythmic activity. *J Mol Cell Cardiol*. 2018;118:159-68.
  25. Mustroph J, Drzymalski M, Baier M, Pabel S, Biedermann A, Memmel B, et al. The oral Ca/calmodulin-dependent kinase II inhibitor RA608 improves contractile function and prevents arrhythmias in heart failure. *ESC Heart Fail*. 2020;7(5):2871-83.
  26. Boyle AJ, Schultz C, Selvanayagam JB, Moir S, Kovacs R, Dib N, et al. Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Delta Inhibition and Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2021;6(7):762-8.
  27. Meng Y, Ding P, Wang H, Yang X, Wang Z, Nie D, et al. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II inhibition reduces myocardial fatty acid uptake and oxidation after myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022;1867(6):159120.
  28. Yeh T-yT, Yeap XY, Mullick AE. Abstract 438: Downregulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent Protein Kinase Type II Delta in the Heart by Antisense Oligonucleotides Mitigates Development of Post-infarct Ventricular Arrhythmias. *Circulation Research*. 2020;127(Suppl\_1):A438-A.
  29. Kreusser MM, Lehmann LH, Keranov S, Hoting MO, Oehl U, Kohlhaas M, et al. Cardiac CaM Kinase II genes  $\delta$  and  $\gamma$  contribute to adverse remodeling but redundantly inhibit calcineurin-induced myocardial hypertrophy. *Circulation*. 2014;130(15):1262-73.
  30. Federico M, Portiansky EL, Sommese L, Alvarado FJ, Blanco PG, Zanuzzi CN, et al. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase mediates the intracellular signalling pathways of cardiac apoptosis in mice with impaired glucose tolerance. *J Physiol*. 2017;595(12):4089-108.
  31. Hof T, Chaigne S, Récalde A, Sallé L, Brette F, Guinamard R. Transient receptor potential channels in cardiac health and disease. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(6):344-60.
  32. Ciardo MG, Ferrer-Montiel A. Lipids as central modulators of sensory TRP channels. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2017;1859(9 Pt B):1615-28.
  33. Su N, Zhen W, Zhang H, Xu L, Jin Y, Chen X, et al. Structural mechanisms of TRPV2 modulation by endogenous and exogenous ligands. *Nat Chem Biol*. 2023;19(1):72-80.
  34. Sexton A, McDonald M, Cayla C, Thiemermann C, Ahluwalia A. 12-Lipoxygenase-derived eicosanoids protect against myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of neuronal TRPV1. *Faseb J*. 2007;21(11):2695-703.

35. Zhong B, Wang DH. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid, protects the heart against ischemia-reperfusion injury via activation of TRPV1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;295(2):H728-35.
36. Randhawa PK, Jaggi AS. Gadolinium and ruthenium red attenuate remote hind limb preconditioning-induced cardioprotection: possible role of TRP and especially TRPV channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2016;389(8):887-96.
37. Pumroy RA, Protopopova AD, Fricke TC, Lange IU, Haug FM, Nguyen PT, et al. Structural insights into TRPV2 activation by small molecules. *Nat Commun.* 2022;13(1):2334.
38. Gochman A, Tan X, Bae C, Chen H, Swartz KJ, Jara-Oseguera A. Cannabidiol sensitizes TRPV2 channels to activation by 2-APB. *bioRxiv.* 2023.
39. Aguetaz E, Lopez JJ, Krzesiak A, Lipskaia L, Adnot S, Hajjar RJ, et al. Axial stretch-dependent cation entry in dystrophic cardiomyopathy: Involvement of several TRPs channels. *Cell Calcium.* 2016;59(4):145-55.
40. Shoji KF, Bayet E, Leverrier-Penna S, Le Devedec D, Mallavialle A, Marionneau-Lambot S, et al. The mechanosensitive TRPV2 calcium channel promotes human melanoma invasiveness and metastatic potential. *EMBO Rep.* 2023;24(4):e55069.
41. Chai H, Cheng X, Zhou B, Zhao L, Lin X, Huang D, et al. Structure-Based Discovery of a Subtype-Selective Inhibitor Targeting a Transient Receptor Potential Vanilloid Channel. *J Med Chem.* 2019;62(3):1373-84.
42. Raudszus R, Paulig A, Urban N, Deckers A, Gräble S, Vanderheiden S, et al. Pharmacological inhibition of TRPV2 attenuates phagocytosis and lipopolysaccharide-induced migration of primary macrophages. *Br J Pharmacol.* 2023.
43. Thorneloe KS, Cheung M, Bao W, Alsaid H, Lenhard S, Jian MY, et al. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Sci Transl Med.* 2012;4(159):159ra48.
44. Haywood N, Ta HQ, Zhang A, Charles EJ, Rotar E, Noona St, et al. Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channels Mediate Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Thorac Surg.* 2022;113(4):1256-64.
45. Conde J, Pumroy RA, Baker C, Rodrigues T, Guerreiro A, Sousa BB, et al. Allosteric Antagonist Modulation of TRPV2 by Piperlongumine Impairs Glioblastoma Progression. *ACS Cent Sci.* 2021;7(5):868-81.
46. Bluhm Y, Raudszus R, Wagner A, Urban N, Schaefer M, Hill K. Valdecocix blocks rat TRPV2 channels. *Eur J Pharmacol.* 2022;915:174702.
47. Koch SE, Nieman ML, Robbins N, Slone S, Worley M, Green LC, et al. Tranilast Blunts the Hypertrophic and Fibrotic Response to Increased Afterload Independent of Cardiomyocyte Transient Receptor Potential Vanilloid 2 Channels. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2018;72(1):40-8.

**RELATÍVNA EXPRESIA GÉNOV ZODPOVEDNÝCH  
ZA TRANSPORT SODÍKA A VODY CEZ ALVEOLÁRNY EPITEL  
V MONOKROTALÍNOVOM MODELI PĽÚCNEJ HYPERTENZIE**  
RELATIVE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE TRANSPORT OF  
SODIUM AND WATER THROUGH THE ALVEOLAR EPITHELIUM  
IN MONOCROTALINE-INDUCED MODEL OF PULMONARY HYPERTENSION

Lelková, K.<sup>1</sup>, Kmecová, Z.<sup>1</sup>, Vetešková, J.<sup>1</sup>, Podžubanová, M.<sup>1</sup>, Babál, P.<sup>2</sup>,  
Křenek, P.<sup>1</sup>, Klimas, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta,  
Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika*  
<sup>2</sup> *Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta,  
Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika*

**Abstrakt:**

ÚVOD: V posledných rokoch bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré poukazujú na prítomnosť pleurálnych výpotkov (PLEF) u pacientov s rôznymi formami pľúcnej artériovej hypertenzie bez alternatívneho vysvetlenia ich prítomnosti okrem pravostranného srdcového zlyhania (RHF). Koincidencia PLEF a RHF významne zvyšovala mortalitu v sledovanom období. CIELE PRÁCE: Stanovenie relatívnej expresie transportérov zodpovedných za alveolárny klírens tekutín v monokrotalínovom (MCT) modeli, ktoré môžu prispievať ku kumulácii tekutiny v pľúcach a sekundárnej tvorbe PLEF. METÓDY: Samcom potkanov kmeňa Wistar bol subkutánne aplikovaný MCT alebo vehikulum (CON). Zvieratá boli utrácané jeden, dva, štyri týždne po aplikácii MCT a predčasne po akútnom zhoršení zdravotného stavu (ptMCT), kedy bola pozorovaná prítomnosť PLEF u niektorých jedincov. Expresia alpha (Scnn1a), beta (Scnn1b), gama (Scnn1g) podjednotky epiteliálneho sodíkového kanála (ENaC), transportéra neutrálnych aminokyselín viazaného na sodík (Snat2, Snat5), sodíkovo-glukózového transportéra (Sglt1) a akvaporínu 3 (Aqp3) bola stanovená metódou RT-qPCR v pľúcach. Vzorky pľúc boli podrobené histologickej analýze. VÝSLEDKY: Hmotnosť pľúc sa zvyšovala postupne od druhého týždňa po aplikácii MCT (MCT<sub>2T</sub> o 39 %, MCT<sub>4T</sub> o 37 %, ptMCT o 63 %,  $p \leq 0,05$  vs. CON). V MCT<sub>4T</sub> a ptMCT bola pozorovaná downregulácia Scnn1a podjednotky ENaC ( $p \leq 0,05$  vs. CON). V ptMCT bolo pozorované zníženie expresie Scnn1b, Scnn1g a Snat5 ( $p \leq 0,05$  vs. CON). V prípade Aqp3 bolo pozorované 15,5-násobné zvýšenie expresie v ptMCT. Histologická analýza potvrdila prítomnosť tekutiny v alveolách. Záver: Downregulácia ENaC a Snat5 primárne v ptMCT v kombinácii so zvýšenou expresiou Aqp3 pravdepodobne prispieva ku kumulácii extravaskulárnej tekutiny v pľúcach a sekundárne k formovaniu PLEF.

**Summary:**

BACKGROUND: Several studies have investigated the incidence of pleural effusions (PLEF) in patients with different forms of pulmonary arterial hypertension (PAH) with no alternate explanation for their presence, except for



right heart failure (RHF). Coincidence of PLEF and RHF increased mortality rate during follow-up. AIM: Determination of the relative expression of transporters responsible for alveolar fluid clearance in the monocrotaline (MCT) model, which may contribute to fluid accumulation in the lungs and secondary formation of PLEF. METHODS: Male Wistar rats were subcutaneously injected with MCT or vehicle (CON). Animals were sacrificed one, two or four weeks after MCT application and prematurely after acute health deterioration (ptMCT), when the presence of PLEF was observed in some individuals. The expression of alpha (Scnn1a), beta (Scnn1b), gamma (Scnn1g) subunit of epithelial sodium channel (ENaC), sodium-coupled neutral amino acid transporter (Snat2, Snat5), sodium-glucose transporter (Sglt1) and aquaporin 3 (Aqp3) was determined by the RT-qPCR in the lungs. Lung samples were subjected to histological analysis. RESULTS: Lung weight increased gradually from the second week after MCT application (MCT<sub>2w</sub> by 39%, MCT<sub>4w</sub> by 37%, ptMCT by 63%,  $p \leq 0.05$  vs. CON). Downregulation of the Scnn1a subunit of ENaC was observed in MCT<sub>4w</sub> and ptMCT ( $p \leq 0.05$  vs. CON). Decreased expression of Scnn1b, Scnn1g and Snat5 was observed in ptMCT ( $p \leq 0.05$  vs. CON). For Aqp3, a 15.5-fold increase in expression was observed in ptMCT. Histological analysis confirmed the presence of fluid in the alveoli. CONCLUSION: Downregulation of ENaC and Snat5 primarily in ptMCT combined with increased expression of Aqp3 probably contributes to the accumulation of extravascular fluid in the lung and secondarily to the formation of PLEF.

**Kľúčové slová:** pľúcna hypertenzia, pleurálne výpotky, alveolárny klírens tekutín, transport sodíka

**Keywords:** pulmonary hypertension, pleural effusions, alveolar fluid clearance, sodium transport

## ÚVOD

Pľúcna artériová hypertenzia (PAH) je relatívne zriedkavé, chronické, progresívne prebiehajúce ochorenie (1), ktoré postihuje primárne pľúcne arterioly a sekundárne vedie k hypertrofii pravej komory a pravostrannému srdcovému zlyhávaniu (HF) (2).

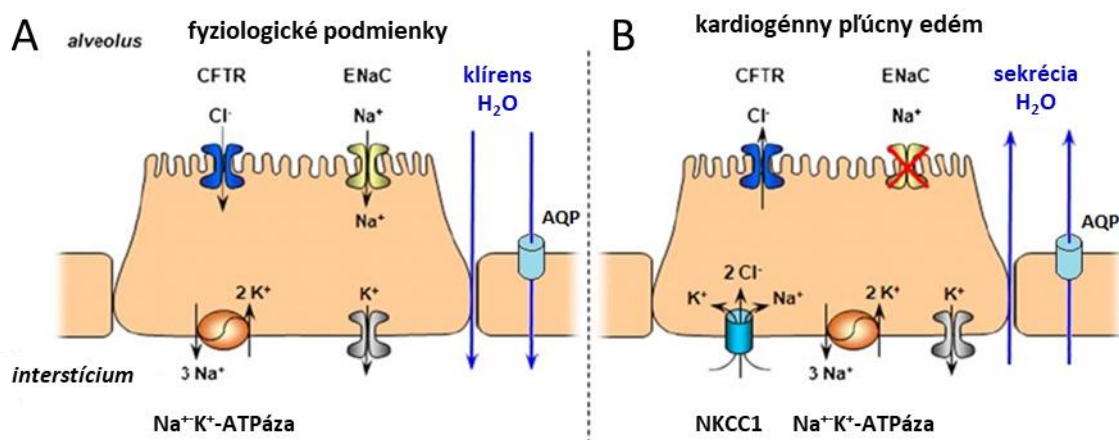
V posledných rokoch bolo publikovaných hneď niekoľko štúdií, ktoré poukazujú na prítomnosť pleurálnych výpotkov (PLEF) u pacientov s rôznymi formami PAH vrátane idiopatickej, hereditárnej formy (14 %) (3) a to aj napriek tomu, že PLEF sa v kontexte HF vo všeobecnosti skôr asociujú s ľavostranným HF (4). U väčšiny týchto pacientov s PLEF bolo taktiež diagnostikované izolované pravostranné HF (~ 90 %). Z údajov vyplývajúcich z 36-mesačného pozorovania bola mortalita pacientov diagnostikovaných nielen s pravostranným HF, ale aj PLEF, signifikantne vyššia ako u pacientov, u ktorých PLEF nebol prítomný (64,8 % vs. 27,6 %,  $p \leq 0,001$ ) (3).

Mechanizmus vzniku PLEF pri PAH avšak nie je jednoznačne determinovaný. Môžu sa na ňom podieľať napríklad dlhodobý zvýšený systémový venózný tlak krvi, dlhodobý zvýšený tlak v pľúcnom riečisku, zvýšená permeabilita endotelu pľúcného riečiska, klírense edematózneho tekutiny do pleurálneho priestoru, ascites, perikardiálny edém, poprípade kombinácia týchto a ďalších potencionálnych faktorov. Avšak podľa

autorov štúdie, zaoberajúcou sa incidenciou PLEF u pacientov s idiopatickou a hereditárnou PAH, s ohľadom na klinické dáta boli PLEF v sledovanej skupine pacientov s ascitom a perikardiálnym výpotkom spôsobené samotným pravostranným HF než ascitom alebo perikardiálnym výpotkom (3).

Z animálneho experimentu zaoberajúcom sa mechanizmom vzniku PLEF v dôsledku zvýšeného tlaku v ľavej predsieni je známe, že primárne dochádza ku kumulácii extravaskulárnej tekutiny v pľúcach/vzniku pľúcneho edému a sekundárne k formovaniu PLEF (5).

Podľa najnovších štúdií však kardiogénny pľúcny edém v dôsledku ľavostranného HF nevzniká nielen v dôsledku pasívnej filtrácie tekutín skrz alveokapilárnu membránu (v dôsledku zvýšeného hydrostatického tlaku), ale vo väčšej miere práve v dôsledku narušenia alveolárneho klirensu tekutín (AFC) (6), pričom táto tekutina predstavuje približne 70 % celkovej nahromadenej tekutiny (6,7). Hnacou silou AFC za fyziologických podmienok je práve aktívny transport sodíka cez amilorid senzitívne a nesenzitívne kanály poháňaný  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPázou}$  v smere z alveolárneho priestoru do interstícia sekundárne uľahčovaný absorpciou  $\text{Cl}^-$ , čo podmieňuje absorpciu tekutín z alveolárneho priestoru (6), ako je znázornené na obrázku 1. Pri HF dochádza či už v dôsledku zvýšeného hydrostatického tlaku, priamej alebo cGMP-dependentnej inhibícií epiteliálneho sodíkového kanála (ENaC) (7) k zmene transepiteliálneho toku iónov a teda aj tekutín cez alveokapilárnu membránu. Inhibícia vtoku sodíka vyvoláva transepiteliálnu sekréciu chloridových iónov cez CFTR chloridový kanál a NKCC1 kotransportér, čo by vysvetľovalo extrarenálne účinky furosemidu na pľúcny edém (6).



**Obrázok 1/Figure 1**

Alveolárny klirens tekutín za fyziologických podmienok, (A) a v prípade kardiogénneho edému pľúc (B) (6).

Alveolar fluid clearance under physiological conditions (A) and in case of cardiogenic pulmonary edema (B) (6).

Vysv./Abb.: **AQP** – angl. *aquaporin*;

**CFTR** – angl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*;

**ENaC** – angl. *epithelial sodium channel*;

**$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáza}$**  – angl. *sodium-potassium pump*;

**NKCC1** – angl.  *$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  cotransporter*.

## CIEĽ

Cieľom tohto projektu bolo študovať zmeny expresie kľúčových transportných proteínov alveolárneho epitelu zodpovedných za transport sodíka a vody v súvislosti s kumuláciou tekutín v pľúcach a s progresiou pľúcnej hypertenzie v MCT modeli PH v nadväznosti na histologické zmeny pozorované v pľúcnom tkanive, keďže AFC je možné farmakologicky ovplyvniť.

## MATERIÁL A METÓDY

V tomto experimente boli použité vzorky tkanív z animálneho monokrotalínom-indukovaného modelu PH. Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 10-12 týždňov (dodávateľ - UEFT SAV Dobrá Voda) boli rozdelené do dvoch skupín - na kontrolnú skupinu (CON) a skupinu s indukovanou PH. PH bola pokusným zvieratám vyvolaná subkutánnym podaním monokrotalínu (MCT) v dávke 60 mg/kg, resp. vehikula (0,9 % NaCl). Zvieratám boli vitálne funkcie merané prístrojom MouseOx Plus (Starr Life Sciences, USA) cca 24 hodín pred plánovaným utratením. Jedince boli utrácané v komore s CO<sub>2</sub> jeden (MCT<sub>1T</sub>), dva (MCT<sub>2T</sub>), štyri týždne (MCT<sub>4T</sub>) po subkutánnej aplikácii MCT, resp. vehikula, a v prípade potreby predčasne (ptMCT – z angl. *prematurely terminated MCT*) pri akútnom zhoršení zdravotného stavu (prejavujúcim sa zježenou srstou, apatiou, stratou hmotnosti o viac ako 10 g počas 24 hodín, zníženou teplotou akrálnych častí, dyspnoe), kedy u niektorých jedincov bola pozorovaná prítomnosť PLEF. Následne bola zvieratám odobratá krv, zvážené jednotlivé orgány a odobraté vzorky sa okamžite zmrazili a uchovávali pri teplote -80°C do ďalšieho spracovania. Ľavé pľúca boli okamžite fixované v 10% roztoku formalínu pri laboratórnej teplote minimálne po dobu 24 hodín a následne zaliate do parafínu. Všetky experimenty boli vopred schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (Ro-108/18-221/3) a Etickou komisiou FaFUK v Bratislave.

Relatívna expresia génov zodpovedných za transport sodíka a vody cez alveolárny epitel bola stanovená metódou RT-qPCR. Sekvencie použitých primerov sú uvedené v tabuľke 1. Relatívna expresia sledovaných génov bola počítaná Pfafflovou metódou (8) s použitím normalizácie na referenčný gén (*Hprt1* - hypoxantín-fosforibozyltransferáza 1). Všetky dáta boli podrobené štatistickému hodnoteniu v programe GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA). Hodnoty  $p \leq 0,05$  sa považovali za štatisticky významné.

Tabuľka 1/ Table 1

Sekvencie primerov použitých na RT-qPCR.

Sequences of primers used for RT-qPCR.

Gén	Referenčné číslo	Sekvencia primerov (5'-3')	
<i>Aqp3</i>	NM_031703.1	Forward	TCCTTGTGATGTTCCGGCTGT
		Reverse	CAAGTTGATGGTGAGGAAGCC
<i>Hprt1</i> <sup>(9)</sup>	NM_012583.2	Forward	CAGCTTCCTCCTCAGACCGCTTT
		Reverse	TACTAATCACGACGCTGGGACTG
<i>Nppb</i> <sup>(9)</sup>	NM_031545.1	Forward	GACCGGATCGGCGCAGTCAGT
		Reverse	GGAGTCTGCAGCCAGGAGGTCT
<i>Scnn1a</i>	NM_031548.2	Forward	GTCGGAAGCCTTGTAGTGTGA
		Reverse	GCAAGGACAGCATCTCGAAG
<i>Scnn1b</i>	NM_012648.1	Forward	CCCTGCAGTCATCGGAAGCTT
		Reverse	AGTGCCTTCTCTGTCATGCC

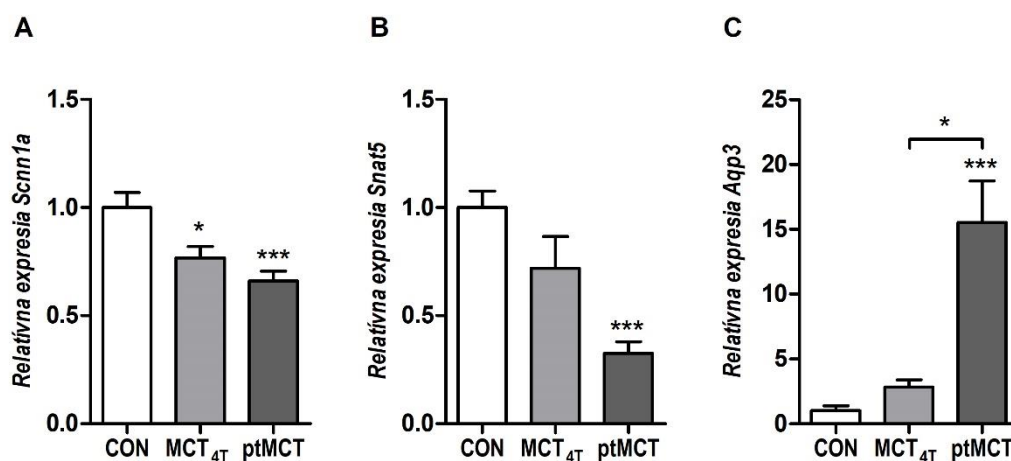
<i>Scnn1g</i>	NM_017046.2	Forward	GGAGCCAAGGTGCTTATCCA
		Reverse	GGATTCTGTCAGGTGCATTCC
<i>Sglt1</i>	NM_013033.2	Forward	ATCCGAGACCCCATTACGG
		Reverse	ACAATGACCTGATCCGTACACC
<i>Snat2</i>	NM_181090.2	Forward	ATCCTTGGGCTTTCTTATGCC
		Reverse	TTCGTATAATAAAGACCCTCCTTCG
<i>Snat5</i>	NM_138854.1	Forward	GACGCTTCAATTTGCTTCGGT
		Reverse	CCTGCATTTCCATCCGCTTTTA

Vzorky tkaniva pľúc určené na histologickú analýzu boli spracované v Ústave patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Vzorky fixované vo formalíne boli následne zaliate do parafínu a narezané na rezy s hrúbkou 5 µm, ktoré boli zafarbené hematoxylínom a eozínom. Popísané histologické zmeny predstavujú charakteristické znaky skúmaných preparátov v rámci jednotlivých skupín.

## VÝSLEDKY

V experimentálnom modeli dochádza k rozvoju PH približne tri týždne po podaní MCT, kedy u zvierat boli pozorované prvé príznaky ochorenia (dyspnoe, kachexia, zníženie príjmu potravy), čo je možné tvrdiť aj na základe signifikantne zvýšeného tlaku v pravej komore (vs. CON) (10). Hmotnosť pľúc sa zvyšovala postupne od druhého týždňa po aplikácii MCT (MCT<sub>2T</sub> o 39 %, MCT<sub>4T</sub> o 37 %, ptMCT o 63 %,  $p \leq 0,05$  vs. CON). Hmotnosť pravej komory (RV), ako aj Fultonov index boli signifikantne zvýšené v MCT<sub>4T</sub>, v ptMCT, ako aj medzi týmito skupinami navzájom, kým hmotnosť ľavej komory (LV) ostala nezmená. V týchto dvoch skupinách bolo taktiež pozorované signifikantné zvýšenie srdcovej frekvencie a pokles saturácie hemoglobínu kyslíkom (9). Od druhého týždňa po aplikácii MCT dochádzalo k postupnému zvyšovaniu expresie Nppb v RV na mRNA úrovni (11), pričom na proteínovej úrovni neboli pozorované žiadne signifikantné zmeny plazmatických hladín NT-proBNP (12).

V prvých dvoch týždňoch po aplikácii MCT nedochádzalo k žiadnym signifikantným zmenám relatívnej expresie študovaných génov v pľúcnom tkanive na mRNA úrovni. Štyri týždne po aplikácii MCT a u predčasne utratených zvierat bola pozorovaná downregulácia *Scnn1a* podjednotky ENaC (obrázok 2A) na úrovni 23,3 % a 33,9 % v príslušných skupinách ( $p \leq 0,05$  vs. CON). Taktiež bolo pozorované zníženie expresie *Scnn1b* a *Scnn1g* podjednotky ENaC v ptMCT o 19,7 % a 26,4 % ( $p \leq 0,05$  vs. CON). U predčasne utratených zvierat bola pozorovaná downregulácia *Snat5* izofomy transportéra neutrálnych aminokyselín viazaného na sodík (obrázok 2B), kým v prípade *Snat2* izofomy nedochádzalo k žiadnym zmenám expresie. Relatívnu expresiu sodíkovo-glukózového transportéra 1 (*Sglt1*) nebolo možné pre nízku expresiu stanoviť. V prípade akvaporínu 3 (*Aqp3*) bolo pozorované 15,5-násobné zvýšenie relatívnej expresie v ptMCT (obrázok 2C).



**Obrázok 2/Figure 2**

Relatívna expresia Scnn1a (A), Snat5 (B) a Aqp3 (C) v pľúcnom tkanive vo štvrtom týždni po subkutánnej aplikácii MCT, resp. vehikula, a v ptMCT. Dáta vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM (n=10/skupina; \* p  $\leq$  0,05 vs. CON, \*\*\*P<0.001 vs. CON).

Relative expression of Scnn1a (A), Snat5 (B) and Aqp3 (C) in lungs at the fourth week after subcutaneous application of MCT, or vehicle, and in ptMCT. Data expressed as mean  $\pm$  SEM (n=10/group; \* p  $\leq$  0.05 vs. CON, \*\*\*P<0.001 vs. CON).

Histologická analýza pľúcného tkaniva okrem iného preukázala prítomnosť edému v MCT skupinách. V alveolárnom epiteli boli pozorované morfológické zmeny v porovnaní s CON na úrovni zmeny typu epitelu zo skvamózneho na kuboidálny.

## DISKUSIA A ZÁVER

V rámci klinickej charakterizácie experimentálnych skupín s indukovanou PH je dôležité zdôrazniť funkciu RV ako dôležitého determinantu prognózy tohto ochorenia. S progresiou ochorenia dochádza už štyri týždne po aplikácii MCT k signifikantnému zvyšovaniu hmotnosti RV a Fultonovho indexu, ktorý odráža mieru hypertrofiu RV, a zároveň dochádza aj k signifikantnému zvýšeniu expresie BNP na mRNA úrovni (Nppb) v RV ako markera poškodenia srdcového tkaniva, čo nám umožňuje bližšie charakterizovať experimentálne skupiny zvierat s ohľadom na progresiu ochorenia a to konkrétne na skupinu s kompenzovaným rozvinutým priebehom (MCT<sub>4T</sub>) a skupinu v terminálnom štádiu ochorenia (ptMCT).

Apikálna absorpcia sodíka je primárne sprostredkovaná amilorid-senzitívnym ENaC (6), v malej miere aj amilorid-nesenzitívnymi transportérmi, konkrétne Snat2, Sna5 (13) a SglT1 (14). V terminálnom štádiu ochorenia dochádza k downregulácii všetkých troch pórtovných podjednotiek ENaC a taktiež k downregulácii Snat5. Je dôležité podotknúť, že k zmene transepiteliálneho toku iónov a teda aj tekutín cez alveokapilárnu membránu, ktorá bola pozorovaná nielen pri kardiogénnom, ale aj nekardiogénnom pľúcnom edéme, dochádza aj v dôsledku inhibície ENaC amiloridom a to za fyziologických tlakových podmienok (6). V dôsledku inhibície apikálnej absorpcie sodíka dochádza k transepiteliálnej sekrécii chloridových sprostredkovanej CFTR, pričom smer toku iónov cez tento kanál závisí od aktuálneho transepiteliálneho elektrochemického gradientu (15). Z výpočtu alveolárneho membránového potenciálu na základe publikovaných iónových koncentrácií alveolárnych buniek typu II a pomeru bazálnej vodivosti sodíkových a draslíkových iónov (gNa<sup>+</sup>/gK<sup>+</sup>) je možné predikovať

smer chloridového prúdu. K zmene smeru toku chloridových iónov a teda aj tekutín cez alveokapilárnu membránu dochádza pri redukcii vtoku sodíkových iónov už o 26,4 % (vypočítané na základe (6) – Supporting Information). Z tohto dôvodu je možné predpokladať, že zmeny expresie spomínaných transportérov podieľajúcich sa na AFC sa do určitej miery premietajú aj do zmien transepiteliálneho toku iónov, a teda aj tekutín, čo môže prispievať ku kumulácii tekutín v pľúcnom tkanive a teda k vzniku pľúcneho edému, ktorý bol taktiež pozorovaný v tomto modeli. Tento predpoklad dopĺňa aj rapídne zvýšenie expresie Aqp3.

V tejto práci sa nám podarilo poukázať na zmeny expresie transportérov zodpovedných za apikálnu absorpciu sodíka a transport vody cez alveokapilárnu membránu, ktoré môžu potenciálne súvisieť s rozvojom pľúcneho edému a sekundárne pleurálnych výpotkov, ktoré boli pozorované v experimentálnom modeli.

## POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantom APVV-19-0458.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoepfer MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1 Suppl):S55-S66.
2. Chen EP, Akhter SA, Bittner HB, Koch WJ, Davis RD, Van Trigt P 3rd. Molecular and functional mechanisms of right ventricular adaptation in chronic pulmonary hypertension. *Ann Thorac Surg*. 1999;67(4):1053-8.
3. Tang KJ, Robbins IM, Light RW. Incidence of pleural effusions in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension patients. *Chest*. 2009;136(3):688-693.
4. Wiener-Kronish JP, Matthay MA, Callen PW, Filly RA, Gamsu G, Staub NC. Relationship of pleural effusions to pulmonary hemodynamics in patients with congestive heart failure. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(6):1253-6.
5. Allen S, Gabel J, Drake R. Left atrial hypertension causes pleural effusion formation in unanesthetized sheep. *Am J Physiol*. 1989;257(2 Pt 2):H690-2.
6. Solymosi EA, Kaestle-Gembardt SM, Vadász I, Wang L, Neye N, Chupin CJ, Rozowsky S, Ruehl R, Tabuchi A, Schulz H, Kapus A, Morty RE, Kuebler WM. Chloride transport-driven alveolar fluid secretion is a major contributor to cardiogenic lung edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(25):E2308-16.
7. Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J, Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(4):L859-69.
8. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
9. Kmecova Z, Veteskova J, Lelkova-Zirova K, Bies Pivackova L, Doka G, Malikova E, Paulis L, Krenek P, Klimas J. Disease severity-related alterations of cardiac microRNAs in experimental pulmonary hypertension. *J Cell Mol Med*. 2020;24(12):6943-6951.
10. Malikova E, Galkova K, Vavrincova P, Vavrincova-Yaghi D, Kmecova Z, Krenek P, Klimas J. Local and systemic renin-angiotensin system participates in

- cardiopulmonary-renal interactions in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat. *Mol Cell Biochem.* 2016;418(1-2):147-57.
11. Radik M, Kmecova Z, Veteskova J, Malikova E, Doka G, Krenek P, Klimas J. Hepatocyte growth factor plays a particular role in progression of overall cardiac damage in experimental pulmonary hypertension. *Int J Med Sci.* 2019;16(6):854-863.
  12. Jarabíková I, Horváth C, Veřasová E, Bies Piváčková L, Vetešková J, Klimas J, Křenek P, Adameová A. Analysis of necroptosis and its association with pyroptosis in organ damage in experimental pulmonary arterial hypertension. *J Cell Mol Med.* 2022;26(9):2633-2645.
  13. de Prost N, Saumon G. Glucose transport in the lung and its role in liquid movement. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;159(3):331-7.
  14. Weidenfeld S, Kuebler WM. Cytokine-Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter 1 and Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Potential Role in Pulmonary Inflammation and Edema Formation. *Front Immunol.* 2017;8:393.
  15. Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:701-18.

**VPLYV KYNURENÍNOVEJ KYSELINY NA JEDNOTLIVÉ VETVY  
FIBROTICKEJ KASKÁDY V *IN VITRO* MODELI FIBRÓZY**  
THE EFFECT OF KYNURENIC ACID ON INDIVIDUAL BRANCHES OF THE  
FIBROTIC CASCADE IN AN *IN VITRO* MODEL OF FIBROSIS

Sýkorová, S.<sup>1</sup>, Vavrínek, P.<sup>1</sup>, Vavřincová-Yaghi, D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra farmakológie a toxikológie,  
Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského, Bratislava*

**Abstrakt:** ÚVOD. Ischemicko-reperfúzne poškodenie (IRI) je jednou z komplikácií pri renálnej transplantácii. IRI spôsobuje aktiváciu a uvoľňovanie transformujúceho rastového faktora (TGF- $\beta$ ), ktorý je považovaný za hlavný profibrogénny faktor. Funkčným dôsledkom aktivácie TGF- $\beta$  je rozvoj fibrotického poškodenia obličky s charakteristickým vylučovaním profibrotického  $\alpha$ -hladkosvalového aktínu ( $\alpha$ -SMA) a tranzícia tubulárnych epiteliálnych buniek (TECs) na mezenchymálny fenotyp (EMT). CIELE. Cieľom našej práce bolo zistiť, či kynurenín (KYN) a kyselina kynurenínová (KYNA) interferujú s TGF- $\beta$  signalizáciou, čím by potenciálne došlo k zastaveniu fibrotických procesov. METÓDY. Imortalizované myšie embryonálne fibroblasty (NIH/3T3) sme rozdelili do 6 skupín. Jedna slúžila ako kontrolná, druhá bola stimulovaná TGF- $\beta$  (5 ng/ml). Zvyšné štyri skupiny boli stimulované s TGF- $\beta$  a zároveň liečené KYN v koncentráciách 3  $\mu$ mol/l (TK3) a 10  $\mu$ mol/l (TK10) a KYNA v koncentráciách 50  $\mu$ mol/l (TKa50) a 150  $\mu$ mol/l (TKa150). Terapiu sme podávali v čase 0h a +24h. Po 48h inkubácii sme bunky zozbierali a izolovali proteíny. Ich expresiu sme sledovali metódou Western blot. VÝSLEDKY. Zistili sme, že po podaní liečby s KYN a KYNA došlo k zníženiu expresie  $\alpha$ -SMA, pričom signifikantný pokles bol zaznamenaný v skupine TKa150. Expresia proteínov fibrotickej kaskády – pSMAD2, pP38, pERK1/2 sa vplyvom podania liečby signifikantne znižovala, a tak je možné predpokladať interferenciu liečby KYN a KYNA s fibrotickou kaskádou. Markery EMT neboli po stimulácii s TGF- $\beta$  či s KYN a KYNA významne ovplyvnené. ZÁVER. Naša štúdia tak prináša nové zistenia o potenciálnom antifibrotickom pôsobení KYN a KYNA, ktoré sa javia ako sľubný nástroj na liečbu fibrózy, na ktorú v súčasnosti neexistuje efektívna terapia.

**Summary:** BACKGROUND. Ischemia-reperfusion injury (IRI) is one of the complications of renal transplantation (tx). IRI causes the activation and release of transforming growth factor (TGF- $\beta$ ), which is considered a major profibrogenic factor. The functional effect of TGF- $\beta$  activation is the development of fibrotic kidney damage with the characteristic manifestation of profibrotic  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and tubular epithelial cells (TECs) transition to a mesenchymal phenotype (EMT). AIMS. The aim of our work was to find out whether kynurenine (KYN) and kynurenic acid (KYNA) interfere with TGF- $\beta$  signaling, which would eventually inhibit fibrotic processes. METHODS. We



divided immortalized mouse embryonic fibroblasts (NIH/3T3) into 6 groups. One served as control, one was stimulated with fibrogenic TGF- $\beta$  (5 ng/ml). The remaining four groups were stimulated with TGF- $\beta$  and simultaneously treated with KYN at concentrations of 3  $\mu$ mol/l (TK3) and 10  $\mu$ mol/l (TK10) and KYNA at concentrations of 50  $\mu$ mol/l (TKa50) and 150  $\mu$ mol/l (TKa150). We administered therapy at 0h and +24h. After 48 h of incubation, cells were harvested, proteins were isolated and their expression was assessed by Western blot. **RESULTS.** We found that  $\alpha$ -SMA expression decreased after KYN and KYNA treatment, while a significant decrease was observed in the TKa150 group. The expression of proteins in the fibrotic cascade – pSMAD2, pP38, pERK1/2 – was decreased significantly due to treatment, so we may assume interference of KYN and KYNA treatment with the fibrotic cascade. EMT markers were not significantly affected after stimulation with TGF- $\beta$  or KYN and KYNA treatment. **CONCLUSIONS.** Therefore, our study provides new findings on the potential antifibrotic action of KYN and KYNA, which appear to be a promising tool for the treatment of fibrosis, for which there is currently no effective therapy.

**Kľúčové slová:** IRI, fibróza, kynureníny, transformujúci rastový faktor  $\beta$

**Keywords:** IRI, fibrosis, kynurenines, transforming growth factor  $\beta$

## ÚVOD

Transplantácia obličky je v súčasnej dobe najefektívnejšia liečba chronických renálnych ochorení v terminálnom štádiu. Okrem množstva benefitov ako je zvýšenie kvality života či predĺženie prežívania pacienta však so sebou prináša aj množstvo komplikácií (9). Pri renálnej transplantácii dochádza k hemodynamickým zmenám a následne k IRI, ktoré vyúsťujú do poškodenia tkaniva obličky. IRI často vedie do vzniku akútnej a chronickej rejeckie štetu. Zatiaľ čo akútna rejeckia je dostatočne potlačená imunosupresívnou liečbou, chronická rejeckia obličky, prejavujúca sa ako chronická transplantáčna dysfunkcia (CTD), je stále otázkou výskumu. CTD je charakterizovaná zhoršením renálnej funkcie ako aj rozvojom fibrózy, ktorá môže viesť až k zlyhaniu transplantovaného štetu. Na renálnu fibrózu však v súčasnosti neexistuje efektívna terapia (12).

Na vzniku fibrózy obličky sa podieľa viacero komplexných mechanizmov. Pri IRI dochádza k vzniku zápalu, čo aktivuje TGF- $\beta$ , ktorý je považovaný za hlavný profibrogénny faktor. Po interakcii TGF- $\beta$  s receptorom sa aktivujú jednotlivé signálne kaskády, ktoré premieňajú extracelulárny stimul na intracelulárnu odpoveď bunky a vyúsťujú do fibrogenézy. Výsledkom tohto procesu je infiltrácia obličky zápalovými bunkami, zvýšená tvorba extracelulárnej matrix (ECM), ktorá spôsobuje porušenie mikroarchitektúry a vznik fibrotického zjazvenia obličky. Okrem toho dochádza k proliferácii myofibroblastov exprimujúcich  $\alpha$ SMA – marker prefibrózy a tranzícii diferencovaných TECs na mezenchmálny fenotyp (EMT) (4). Pri EMT dochádza k zníženiu expresie epiteliálneho markeru E-kadherínu a naopak k nárastu mezenchymálnych markerov N-kadherínu, vimentínu či  $\alpha$ SMA. V konečnom dôsledku je teda možné povedať, že rola TGF- $\beta$  je úzko prepojená so vznikom a rozvojom fibrotického poškodenia (5).

V súčasnej dobe sú v centre záujmu liečby fibrózy aj metabolity tryptofánu (trp). Trp je enzýmom indolamín-2,3-dioxygenáza degradovaný na produkty súhrnne nazývané kynureníny. Štúdie poukazujú, že zlúčeniny kynurenínu majú silnú antifibrotickú aktivitu prostredníctvom antagonizmu diferenciácie fibroblastov a podpory degradácie kolagénu, čím vykazujú svoj terapeutický potenciál (3). V tejto súvislosti bola publikovaná aj štúdia z I. fázy klinického skúšania topického podania kyseliny kynurenínovej (KYNA) na králičom modeli (známa ako FS2), kde sa preukázalo, že KYNA zvyšuje aktivitu matricovej metaloproteinázy-1 a následne znižuje ukladanie kolagénu. Okrem toho bola demonštrovaná aj bezpečnosť a znášanlivosť lokálnej aplikácie KYNA (10). Štúdie tiež popisujú, že KYN potláča expresiu  $\alpha$ -SMA a znižuje počet  $\alpha$ -SMA+ myofibroblastov v rane, ktoré sú významným zdrojom profibrogénneho TGF- $\beta$  (11).

Na základe štúdií a nášho výskumu je možné predpokladať interferenciu kynurenínov s TGF- $\beta$  signalizáciou, čo by mohlo byť aj podstatou antifibrotického účinku týchto molekúl. Z tohto dôvodu sme sa rozhodli túto hypotézu otestovať na kultúre embryonálnych myších fibroblastov NIH/3T3.

Cieľom našej práce bolo teda stimulovať NIH/3T3 fibroblasty rekombinantným TGF- $\beta$  a podávať im „liečbu“ s KYN v koncentráciách 3  $\mu$ mol/l a 10  $\mu$ mol/l a KYNA v koncentráciách 50  $\mu$ mol/l a 150  $\mu$ mol/l. Terapiu sme podávali v čase 0h a +24h. Po 48h inkubácii a následnej izolácii proteínov bolo našim cieľom stanoviť relatívnu expresiu  $\alpha$ -SMA a expresiu resp. fosforyláciu proteínov TGF- $\beta$  mediovanej kaskády – SMAD2, P38, ERK1/2 a taktiež markerov EMT.

## MATERIÁL A METÓDY

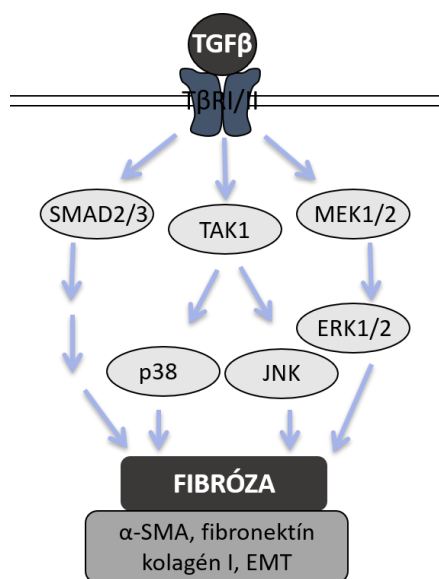
V našom modeli bola použitá komerčne dostupná línia imortalizovaných myších embryonálnych fibroblastov NIH/3T3. Tie boli kultivované za štandardných podmienok (humidifikovaný inkubátor 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) v DMEM médiu (Dulbecco's modified Eagle's medium) s obsahom 4,5 g/L glukózy doplnenom 1000  $\mu$ g/ml streptomycínom a 1000 U/mL penicilínom a 10% fetálnym teľacím sérom (FBS). Bunky kultivované v 6-jamkových platničkách boli rozdelené do šiestich skupín (n=6): C – kontrolná skupina; TGF – bunky stimulované fibrotickým faktorom TGF- $\beta$ ; TK3 – bunky stimulované TGF- $\beta$ , liečené KYN v koncentrácii 3  $\mu$ mol/l; TK10 – bunky stimulované TGF- $\beta$ , liečené KYN v koncentrácii 10  $\mu$ mol/l; TKa50 – bunky stimulované TGF- $\beta$ , liečené KYNA v koncentrácii 50  $\mu$ mol/l; Tka150 – bunky stimulované TGF- $\beta$ , liečené KYNA v koncentrácii 150  $\mu$ mol/l. Liečba s KYN resp. KYNA bola pridaná pri stimulácii s TGF- $\beta$  a následne opäť po 24 h. Po 48 h sme bunky zozbierali a izolovali proteíny na analýzu. Expresia proteínov  $\alpha$ -SMA, pP38, pSMAD2, pERK 1/2, ERK1/2, N-kadherín a E-kadherín bola stanovená metódou Western blot s normalizáciou na aktín. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené metódou ANOVA s LSD *post-hoc* testom.

## VÝSLEDKY

Zistili sme, že stimuláciou buniek s rekombinantným TGF- $\beta$  došlo k významnému zvýšeniu relatívnej expresie  $\alpha$ -SMA oproti kontrolnej skupine (obrázok 2A;  $p < 0,05$ ). Liečba s KYN v oboch koncentráciách a s KYNA v koncentrácii 50  $\mu$ mol/l naznačila trend poklesu expresie  $\alpha$ -SMA. Štatisticky významné zníženie hladín  $\alpha$ -SMA oproti skupine TGF sme zaznamenali pri podaní liečby s obsahom KYNA v koncentrácii 150  $\mu$ mol/l (obrázok 2A;  $p < 0,05$ ).

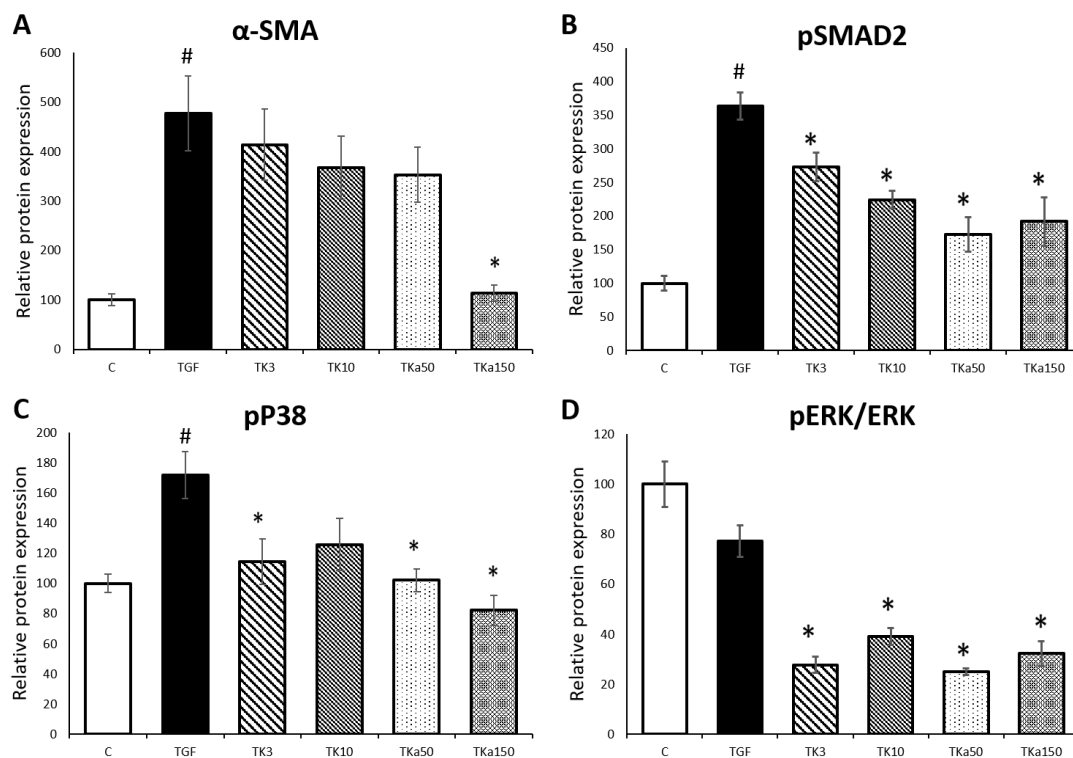
Stanovili sme relatívnu expresiu (resp. fosforyláciu) proteínov zapojených do TGF- $\beta$  mediovanej kaskády, ktorej aktiváciou dochádza k rozvoju fibrózy. Fosforylácia

SMAD2 proteínu bola signifikantne zvýšená v TGF skupine oproti skupine C (obrázok 2B;  $p < 0,05$ ). KYN aj KYNA vo všetkých použitých koncentráciách signifikantne znižovali fosforyláciu SMAD2 (obrázok 2B;  $p < 0,05$ ). Ako ďalšiu sme stanovili fosforyláciu proteínu P38, pričom sme zistili, že v TGF skupine došlo k štatisticky významnému zvýšeniu fosforylácie P38 oproti kontrolnej skupine (obrázok 2C;  $p < 0,05$ ). Pridaním KYN v koncentrácii  $10 \mu\text{mol/l}$  sme zaznamenali iba trend poklesu expzie pP38. Liečba s  $3 \mu\text{mol/l}$  KYN a KYNA v oboch koncentráciách však dokázali signifikantne znížiť fosforyláciu P38 oproti TGF skupine (obrázok 2C;  $p < 0,05$ ). Fosforylácia proteínu ERK1/2 v TGF skupine sa oproti kontrole významne nemenila avšak v skupinách liečených s KYN aj KYNA v oboch koncentráciách došlo k signifikantnému zníženiu fosforylácie tohto proteínu oproti TGF skupine (obrázok 2D;  $p < 0,05$ ).



**Obrázok 1/Figure 1**

TGF- $\beta$  mediovaná kaskáda – jednoduchá schéma. TGF- $\beta$  – transformujúci rastový faktor  $\beta$ ,  
 T $\beta$ RI/II – receptor pre TGF- $\beta$ , SMAD2/3, TAK1, p38, JNK, MEK1/2,  
 ERK1/2 – fosforylované a nefosforylované formy proteínov MAPK kináz,  $\alpha$ -SMA.  
 TGF- $\beta$  mediated cascade – a simple scheme. TGF- $\beta$  – transforming growth factor  $\beta$ ,  
 T $\beta$ RI/II – receptor for TGF-  $\beta$ , SMAD2/3, TAK1, p38, JNK, MEK1/2,  
 ERK1/2 – phosphorylated and non-phosphorylated forms of MAPK kinase proteins,  $\alpha$ -SMA.



**Obrázok 2/ Figure 2**

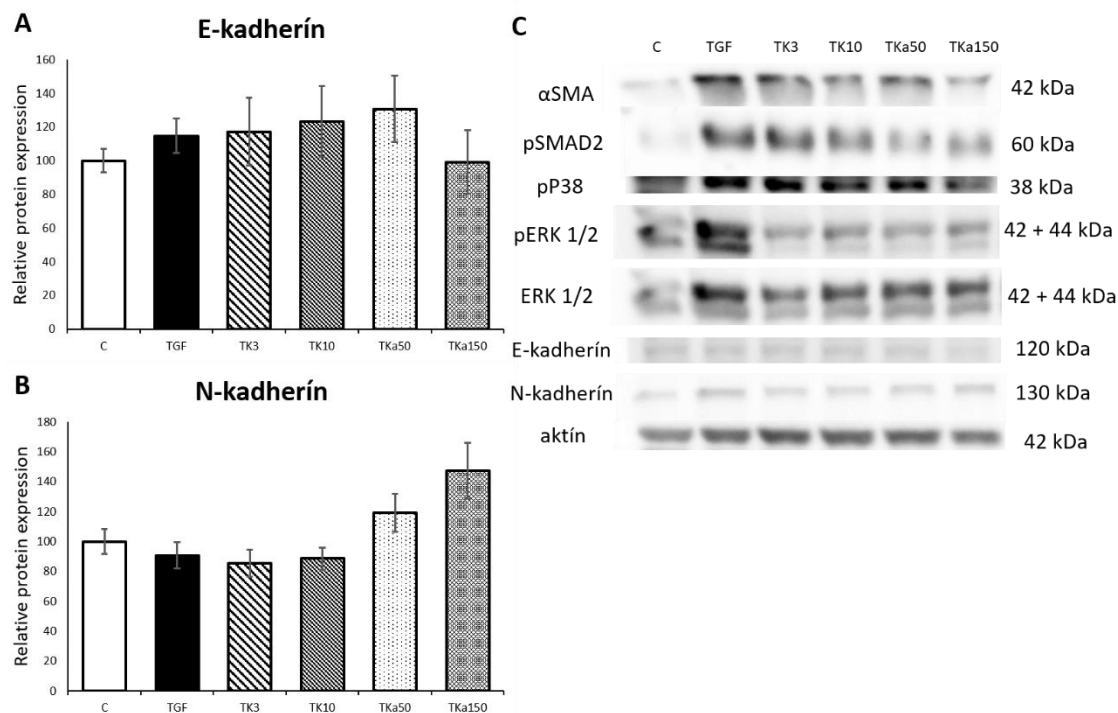
Relatívna expresia (fosforylácia) proteínov  $\alpha$ -SMA (A), pSMAD2 (B), pP38 (C) a pERK/ERK (D) v kontrolnej skupine, po stimulácii s TGF- $\beta$  (TGF skupina) a v skupinách s TGF- stimuláciou a liečených s kynurenínom (KYN) a kyselinou kynurenínovou (KYNA).

#  $p < 0,05$  vs. kontrola, \*  $p < 0,05$  vs. TGF skupina.

Relative protein expression (phosphorylation) of  $\alpha$ -SMA (A), pSMAD2 (B), pP38 (C) a pERK/ERK (D) in control group, after stimulation with TGF-  $\beta$  (TGF group) and in groups with TGF stimulation and treated with kynurenine (KYN) and kynurenine acid (KYNA).

#  $p < 0,05$  vs. C group, \*  $p < 0,05$  vs. TGF group.

Zároveň sme sledovali expresiu markerov EMT – E-kadherínu a N-kadherínu. Stimulácia fibroblastov s TGF- $\beta$  ani liečba s KYN a KYNA nemala štatisticky významný vplyv na relatívnu expresiu týchto markerov (obrázok 3A; 3B). Zaznamenaný bol iba trend zvýšenia expresie N-kadherínu po pridaní KYN vo vyššej koncentrácii.



**Obrázok 3/Figure 3**

Relatívna expresia E-kadherínu (A) a N-kadherínu (B).  
 Reprezentatívne snímky membrán z Western blotu (C).  
 Relative expression of E-cadherin (A) and N-cadherin (B).  
 Representative membrane photos from Western blot (C).

## DISKUSIA

Výsledky našej práce preukázali, že kynurenín a kyselina kynurenínová majú potenciálny antifibrotický účinok v modeli NIH/3T3 fibroblastov stimulovaných s rekombinantným TGF- $\beta$ . Túto skutočnosť sme preukázali stanovením relatívnej proteínovej expresie  $\alpha$ -SMA, ktorý je považovaný za marker prefibrózy. Signifikantné zvýšenie expresie tohto proteínu v skupine TGF možno považovať za výber vhodného fibrotického stimulu. V skupinách liečených s KYN a KYNA sme zaznamenali trend poklesu expresie  $\alpha$ -SMA. Výsledky tiež preukázali, že pri liečbe s KYNA vo vyššej koncentrácii došlo k signifikantnému zníženiu expresie  $\alpha$ -SMA. Uvedené dáta tak korelujú s našimi predchádzajúcimi zisteniami (2), a teda nami použitá liečba zasahuje do TGF- $\beta$  mediovanej kaskády.

V rámci tohto pokusu sme sa preto zamerali aj na objasnenie účinku metabolitov trp na jednotlivé časti TGF- $\beta$  kaskády, ktoré je možné rozdeliť na SMAD a non-SMAD dependentné dráhy. Sledovaná bola predovšetkým fosforylovaná, teda aktivovaná forma týchto proteínov.

SMAD-dependentná signalizácia je považovaná za hlavnú dráhu rozvoja fibrózy (7). V prvom kroku je nutný vznik fosforylovaného komplexu SMAD2 so SMAD3. V našom modeli sme teda stanovili relatívnu fosforyláciu SMAD2, pričom sme zaznamenali signifikantné zvýšenie fosforylácie v TGF skupine oproti C. Zároveň sme po podaní liečby KYN a KYNA vo všetkých koncentráciách zaznamenali štatisticky významne zníženie hladín pSMAD2. Je teda možné predpokladať, že zabránením fosforylácie tohto proteínu nemôže dôjsť k vzniku funkčného komplexu potrebného na

d'alší postup vo fibrotickej kaskáde. Avšak publikácia od Meng et al. poukazuje, že hoci sú SMAD2 a SMAD3 aktivované pri fibróze obličiek, ich úlohy sú odlišné. Výsledky štúdie hovoria, že v dôsledku podmienenej delécie a *in vitro* knockdownu SMAD2 došlo k rozvoju renálnej fibrózy. Nedostatok SMAD2 totiž indukoval nadmernú fosforyláciu SMAD3, čo viedlo k väzbe SMAD3 na kolagénový promótor a autoindukcii TGF- $\beta$ . Naopak, nadmerná expresia SMAD2 inhibovala TGF- $\beta$  -indukovanú fosforyláciu SMAD3, ako aj expresiu kolagénu typu I v TECs. Na základe týchto zistení je možné povedať, že SMAD2 pôsobí proti signalizácii TGF- $\beta$ /SMAD3, a tým reguluje účinok prefibrotického SMAD3. Z tohto dôvodu je nutné zamerať sa aj na stanovenie expisie proteínu SMAD3 a objasniť účinok SMAD komplexu z hľadiska rozvoja fibrózy (7).

Pozornosť sme venovali aj relatívnej expresii/fosforylácii non-SMAD proteínov a to konkrétne mitogén-aktivovaným proteínkinázam (MAPK) P38 a ERK1/2. Fosforylácia stresom aktivovanej proteín-kinázy P38 sa významne zvýšila v TGF skupine oproti C. Po podaní liečby KYN v koncentrácii 3  $\mu\text{mol/l}$  a KYNA v oboch koncentráciách došlo k štatisticky významnému zníženiu expisie fosforylovaného P38, a teda je možné predpokladať spomalenie rozvoja fibrózy v nami zvolenom modeli. Tieto výsledky podporuje aj štúdia Lee et al., v ktorej skúmali vzťah P38 MAPK a intersticiálnej fibrózy obličiek na myšacom modeli unilaterálnej obštrukcie uretry (UUO) a u pacientov s ľudskou IgA nefropatiou. Ich závery hovoria, že fibróza je spojená so zvýšenou fosforyláciou P38, a teda prostredníctvom inhibície P38 MAPK možno zmierniť progresiu fibrózy (6). Okrem toho Walczak et al. sledovali vplyv KYNA na proliferáciu nádorových buniek. Výsledky preukázali jej antiproliferačný účinok v dôsledku zníženia fosforylácie kináz p38, ERK1/2 a Akt(13). Naše zistenia tak korelujú s týmto experimentom, nakoľko aj v nami použitom modeli došlo po podaní KYN a KYNA vo všetkých koncentráciách k významnému zníženiu expisie pERK1/2.

Na základe predložených zistení je teda možné predpokladať interferenciu kynurenínov s MAPK vetvou fibrotickej kaskády. Je však nutné zanalyzovať aj tretiu z MAP-kináz a to c-jun N-terminálnu kinázu (JNK; vid'.obr.1).

V rámci nášho pokusu sme sa tiež zamerali na stanovenie relatívnej expisie markerov EMT. Aj keď rola EMT počas fibrotického poškodenia ostáva stále nejasná, výsledky štúdie hovoria, že dochádza k downregulácii epiteliálnych markerov (E-kadherín) a zároveň k upregulácii mezenchymálnych markerov (N-kadherín,  $\alpha$ -SMA) (1). Keďže liečba s KYN a KYNA v našom experimente znižovala expresiu fibrotických proteínov, predpokladali sme, že by mala pozitívne ovplyvniť aj EMT. Moretti et al. však publikovali štúdiu, v ktorej skúmali efekt KYN na línii nádorových buniek štítnej žľazy. Pri analýze EMT markerov preukázali, že po podaní KYN došlo k zníženiu expisie mRNA E-kadherínu a zvýšeniu hladín N-kadherínu a fibronektínu. Výsledky tak potvrdili, že KYN spôsobuje prechod k nežiaducemu mezenchymálnemu fenotypu a podporuje tak bunkovú invazivnosť (8). Zistenia z našej práce hovoria, že ani samotná stimulácia s TGF- $\beta$  či s KYN a KYNA významne neovplyvnila expresiu E-kadherínu a N-kadherínu. Aj z tohto dôvodu je potrebné objasniť úlohu KYN a KYNA v EMT a taktiež vykonať analýzu markerov EMT po dlhodobej stimulácii NIH/3T3 s TGF- $\beta$  a kynurenínmi.

Mechanizmus pôsobenia KYN a KYNA je v súčasnosti predmetom nášho ďalšieho výskumu. V našej práci prezentujeme potenciálny antifibrotický účinok

kynurenínov a to predovšetkým KYNA vo vyšších koncentráciách. Je však nutné vykonať podrobnejšie analýzy a to aj na živočíšnych fibrotických modeloch.

## POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/0121/22 .

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Agarwal SK. Integrins and cadherins as therapeutic targets in fibrosis. *Front Pharmacol.* 2014;5:131.
2. ČEPCOVÁ, D. Úloha indolamín 2,3-dioxygenázy v obličkových ochoreniach (online). Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, 2021.
3. Dolivo DM, Larson SA, Dominko T. Tryptophan metabolites kynurenine and serotonin regulate fibroblast activation and fibrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(20):3663-3681.
4. Gu YY, Liu XS, Huang XR, Yu XQ, Lan HY. Diverse Role of TGF- $\beta$  in Kidney Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:123
5. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11):2767.
6. Lee J, An JN, Hwang JH, Lee H, Lee JP, Kim SG. p38 MAPK activity is associated with the histological degree of interstitial fibrosis in IgA nephropathy patients. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213981.
7. Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF- $\beta$ /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015;6:82.
8. Moretti S, Nucci N, Menicali E, Morelli S, Bini V, Colella R, Mandarano M, Sidoni A, Puxeddu E. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Expressed in Thyroid Carcinoma and Appears to Mediate Epithelial-Mesenchymal-Transition. *Cancers (Basel).* 2020;12(1):145.
9. Naik RH, Shawar SH. Renal Transplantation Rejection. 2023 Feb 9. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023
10. Papp A, Hartwell R, Evans M, Ghahary A. The Safety and Tolerability of Topically Delivered Kynurenic Acid in Humans. A Phase 1 Randomized Double-Blind Clinical Trial. *J Pharm Sci.* 2018;107(6):1572-1576.
11. Poormasjedi-Meibod MS, Salimi Elizei S, Leung V, Baradar Jalili R, Ko F, Ghahary A. Kynurenine Modulates MMP-1 and Type-I Collagen Expression Via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation in Dermal Fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2016;231(12):2749-60.
12. Vavrincova-Yaghi D, Deelman LE, van Goor H, Seelen MA, Vavrinc P, Kema IP, Gomolcak P, Benigni A, Henning RH, Sandovici M. Local gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase protects against development of transplant vasculopathy in chronic kidney transplant dysfunction. *Gene Ther.* 2016;23(11):797-806.
13. Walczak K, Turski WA, Rajtar G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways. *Amino Acids.* 2014;46(10):2393-401.

**PIOGLITAZÓN MODULUJE GÉNY REGULUJÚCE METABOLIZMUS  
GLUKÓZY A ZÁPÁL V KOSTROVOM SVALE U POTKANOV  
S EXPERIMENTÁLNYM DIABETOM MELLITUS TYPU I**  
PIOGLITAZONE MODULATES GENES REGULATING GLUCOSE  
METABOLISM AND INFLAMMATION IN SKELETAL MUSCLE IN RATS WITH  
EXPERIMENTAL TYPE I DIABETES MELLITUS

Čináková, A., Kráľová, E., Křenek, P., Klimas, J.

*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta,  
Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika*

**Abstrakt:** ÚVOD: V rámci ochorenia diabetes mellitus (DM) je nepriaznivým spôsobom ovplyvnené aj kostrové svalstvo. K rizikovým faktorom diabetickej myopatie zaraďujeme zápalové procesy ako aj inzulínovú rezistenciu. Liečivo pioglitazón (Pio) preukázalo významný protektívny charakter na úrovni viacerých orgánových systémov pri oboch typoch diabetu. CIELE PRÁCE: Cieľom tejto práce bolo sledovať, do akej miery moduluje Pio inzulínovú rezistenciu a zápalové procesy v kostrovom svale u potkanov s experimentálnym DM1. Metódy: Na experiment boli použité trojmesačné samce potkanov kmeňa Wistar, ktorým bol vyvolaný diabetes mellitus podaním streptozotocínu (55 mg/kg *i.p.*). Pio (12mg/kg, n = 10) bol podávaný diabetickým zvieratám vo forme krmiva. Kontrolnej skupine (n=10) a skupine s neliečeným diabetes mellitus (DM, n = 10) bolo podávané štandardné krmivo. Po šiestich týždňoch terapie boli zvieratá utratené. V kostrovom svale sme sledovali génovú expresiu proteínov súvisiacich s metabolizmom glukózy (Glut1, Glut4, Insr, HkII) a rovnako expresiu prozápalových markerov (IL-1 $\beta$ , IL-6 TNF- $\alpha$ ). VÝSLEDKY: Po 6 týždňoch sme u DM zvierat nezaznamenali významné zmeny v expresii génov asociovaných s metabolizmom glukózy, zatiaľ čo génová expresia prozápalových cytokínov IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  bola signifikantne zvýšená (vs kontrola;  $p < 0.05$ ). Po terapii s Pio sme zaznamenali upreguláciu glukózových transportérov Glut1, Glut4 a hexokinázy II (vs DM,  $p < 0.05$ ). Pri expresii prozápalových cytokínov sme pozorovali iba trend k zníženiu. ZÁVER: 6-týždňové podávanie Pio pri experimentálnom T1DM redukuje inzulínovú rezistenciu, avšak na zápalové procesy v kostrovom svale má minimálny vplyv.

**Summary:** BACKGROUND: Diabetic conditions negatively affect skeletal muscles, too. Inflammatory processes as well as insulin resistance are considered risk factors for diabetic myopathy. Pioglitazone (Pio) exerts a significant protective character in several organ systems in both-type 1 (T1DM) and type 2 diabetes mellitus. AIMS: The aim of this work was to determine to what extent Pio modulates insulin resistance and inflammatory processes in skeletal muscle in rats with experimental T1DM. METHODS: Three-month-old male Wistar rats were used for the experiment. Diabetes mellitus was induced with streptozotocin (55



mg/kg, *i.p.*). Diabetic animals received chow containing Pio (12 mg/kg,  $n = 10$ ) for 6 weeks. The control group and group with untreated diabetes mellitus (DM,  $n = 10$ ) were fed on standard chow. After six weeks of the therapy, the animals were sacrificed. In skeletal muscle, we monitored the gene expression of proteins related to glucose metabolism (Glut1, Glut4, Insr, HkII) and also the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ). RESULTS: In the skeletal muscle of DM animals, we did not detect significant changes in the gene expression of the proteins associated with glucose metabolism, while the gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was markedly increased (vs control,  $p < 0.05$ ). After Pio therapy, we observed an upregulation of glucose transporters Glut1, Glut4 and hexokinase II (vs DM,  $p < 0.05$ ). There was only a tendency of pro-inflammatory cytokines downregulation after Pio administration, but the decrease was not statistically significant. CONCLUSION: 6-week administration of Pio reduces insulin resistance in experimental T1DM, however, its effect on inflammatory processes in skeletal muscle is minimal.

**Kľúčové slová:** diabetická myopatia, pioglitazón, diabetes mellitus typu 1, kostrový sval  
**Keywords:** diabetic myopathy, pioglitazone, type 1 diabetes mellitus, skeletal muscle

## ÚVOD

Hoci je diabetes primárne spájaný s komplikáciami kardiovaskulárneho systému, nefropatiou, neuropatiou či retinopatiou, patologické procesy v dôsledku hyperglykemických podmienok zasahujú aj kostrové svalstvo. Výsledkom je zhoršenie funkcie kostrového svalstva označovaného ako diabetická myopatia (DMP). DMP je manifestovaná úbytkom svalovej hmoty, zníženým svalovým výkonom a redukovanou pracovnou kapacitou. K rizikovým faktorom DMP pri oboch typoch diabetu zaraďujeme aj inzulínovú rezistenciu a zápalové procesy (1). Bolo preukázané, že zápal spojený s dlhodobou zvýšenými glykemickými hodnotami negatívne ovplyvňuje fyziologický stav kostrového svalstva a prispieva k jeho atrofickému poškodeniu. Úbytok svalovej hmoty pri diabete pozitívne koreluje so zvýšenou hladinou prozápalových cytokínov ako interleukín 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 a faktor nekrotizujúci tumor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (2). Za fyziologických podmienok interaguje inzulín s inzulínovým receptorom (INSR) a následne dochádza k fosforylácii substrátu pre INSR. Fosforylácia vedie k aktivácii signalizačných dráh, ktorých výsledkom je translokácia glukózového transportéra GLUT4 v zásobných vezikulách na plazmatickú membránu. V myocytoch sa nachádza aj GLUT1 transportér, ktorý je zodpovedný za bazálne vychytávanie glukózy. Glukóza, ktorá vstupuje do myocytov po stimulácii inzulínom podlieha glykolýze alebo je využitá na syntézu glykogénu. Prvým krokom v metabolizme glukózy je jej fosforylácia pomocou hexokinázy II (HkII) za vzniku glukóza-6-fosfátu. V stave inzulínovej rezistencie však dochádza k významným zmenám v inzulínovej signalizácii ako aj v expresii proteínov zapojených do metabolizmu glukózy (3). Pioglitazón (PIO) je agonistom jadrových PPAR $\gamma$  receptorov, čím zasahuje do regulácie génov zodpovedných za metabolizmus lipidov a glukózy. Pioglitazón vykazuje inzulín senzitivizujúci účinok a v rámci jeho mechanizmu účinku bol preukázaný aj výrazné antiflogistické pôsobenie (4). Našou hypotézou bolo, že by Pio mohol zvyšovať senzitivitu na inzulín v kostrovom

svale pri experimentálnom T1DM ako aj redukovať zápal, čo by v konečnom dôsledku mohlo prispieť k spomaleniu progresie diabetickej myopatie.

## MATERIÁL A METÓDY

Na experiment boli použité trojmesačné potkany – samce kmeňa Wistar (Dobrá Voda, SR). Experimenty na zvieratách boli schválené Etickou komisiou Farmaceutickej fakulty UK v Bratislave a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky. Zvieratá mali počas celého trvania pokusu prístup k vode a krmivu *ad libitum*. Po randomizácii boli rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina (n = 10), diabetická neliečená skupina (DM; n = 10) a diabetická skupina, ktorá podstúpila liečbu s Pio (n = 10). Diabetes bol indukovaný jednorazovým podaním streptozotocínu (STZ; 55 mg/kg, *i.p.*). Za dostačujúcu bola považovaná hladina glukózy nad 12mmol/l. Pio bol podávaný vo forme krmiva v dávke 12 mg/kg. Kontrolnej skupine a skupine s neliečeným diabetom bolo podávané štandardné krmivo. Po šiestich týždňoch trvania experimentu boli zvieratá utratené. Vzorky kostrového svalu (*musculus vastus lateralis*) boli použité na analýzu expresie génov asociovaných s metabolizmom glukózy (Glut1, Glut4, Insr, HkII) a rovnako génov vybraných prozápalových cytokínov (Il-1 $\beta$ , Il-6, Tnf- $\alpha$ ) prostredníctvom metódy RT-qPCR. Mieru génovej expresie sme vyjadrili pomerom CT hodnôt génu a endogénneho referenčného génu beta-2-mikroglobulínu (B2m). Sekvencie použitých primerov boli nasledovná:

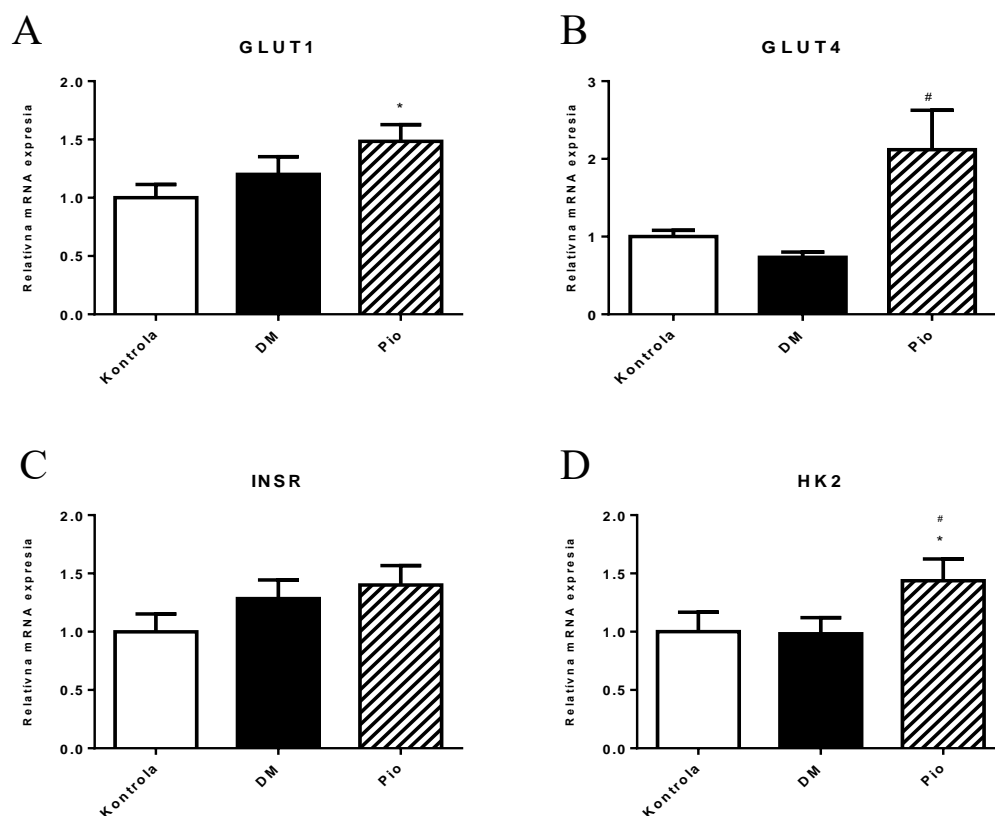
Actb: *Forward*:CCGCGAGTACAACCTTCTTG,  
*Reverse*:GCAGCGATATCGTCATCCA;  
B2m: *Forward*: ATGGAGCTCTGAATCATCTGG,  
*Reverse*:AGAAGATGGTGTGCTCATTGC;  
Il1b: *Forward*: AATCCCTGTGGCCTTGGGCCTC,  
*Reverse*: GGATCCACACTCTCCAGCTGCAGG;  
Il6: *Forward*: TCTCTCCGCAAGAGACTTCC,  
*Reverse*: GTCTCCTCTCCGGAAGTGTG;  
Insr: *Forward*:CTTCTCTGATGAACGCCGGA,  
*Reverse*: GAACGGAAGGATTGGTGGC;  
Glut1: *Forward*: TGGTGTGGCATGTGGTCTA,  
*Reverse*: ATGTTGCTGGCGAACAGAGA;  
Glut4: *Forward*: GACCCGCCCTTTGCACACCA,  
*Reverse*: TCACTCGCTGCTGGGGGGT;  
HkII: *Forward*:GATGGGACAGAACATGGGG,  
*Reverse*:TTCGGCGATGTGGTCAAACA;  
Tnfa: *Forward*: AACTTCGGGGTGATCGGTCCCA,  
*Reverse*: TACGACGTGGGCTACGGGCTT

## VÝSLEDKY

Po šiestich týždňoch trvania experimentu sme u diabetických neliečených zvierat nezaznamenali významný pokles v génovej expresii glukózových transportérov Glut1 a Glut4 oproti kontrole (obrázok 1A, B). K zmenám rovnako nedošlo ani na úrovni expresie receptora pre inzulín či hexokinázy II (obrázok 1C, D). Terapia s Pio však signifikantne zvýšila expresiu Glut1 v porovnaní s kontrolnou skupinou (p<0.05) a tiež zvýšila expresiu Glut4 o viac ako 100 % oproti diabetickej neliečenej skupine (p<0.05) (obrázok 1A, B). Na expresiu inzulínového receptora Pio nemal významný vplyv, avšak

jeho účinok viedol k signifikantnej upregulácii HkII oproti kontrolnej aj DM skupine ( $p < 0.05$ ) (obrázok 1C, D).

V kostrovom svalu diabetických neliečených potkanov sme sledovali významne zvýšenú expresiu prozápalových cytokínov IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$  oproti kontrolnej skupine ( $p < 0.05$ ) (obrázok 2A, C). Pri IL-6 nešlo signifikantné zvýšenie expresie (obrázok 2B). Terapia s Pio neviedla k významnej downregulácii pri žiadnom z uvedených cytokínov, zaznamenaný bol iba trend k zníženiu (obrázok 2).

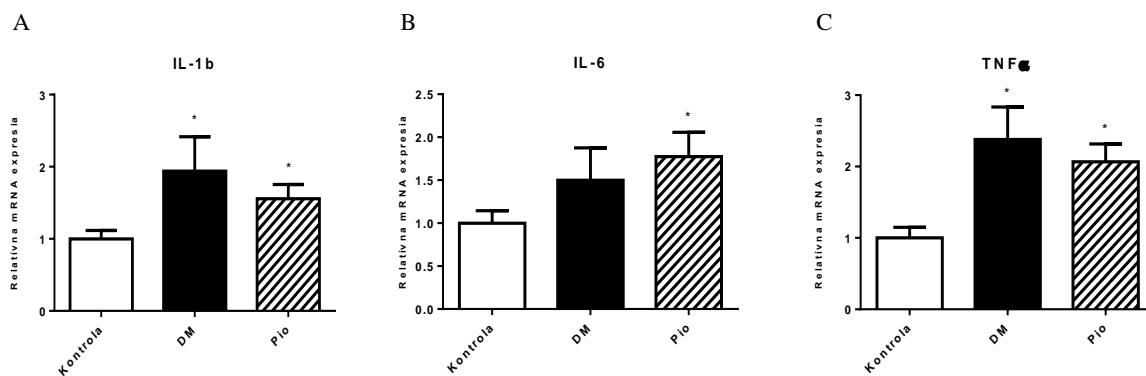


**Obrázok 1/Figure 1**

Génová expresia glukózových transportérov GLUT1 (A), GLUT4 (B), inzulínového receptora (INSR) (C) a hexokinázy II (HK2) (D) v kostrovom svalu u kontrolných, diabetických neliečených (DM) a diabetických potkanov liečených pioglitazónom (Pio). Namerané hodnoty sú vyjadrené percentuálne ako priemer  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs kontrola, # $p < 0,05$  vs DM.

Gene expression of glucose transporters GLUT1 (A), GLUT4 (B), insulin receptor (INSR) (C) and hexokinase II (HK2) (D) in skeletal muscle in the control group, diabetic untreated group (DM) and diabetic rats treated with pioglitazone (Pio). Measured values are expressed in percent as mean  $\pm$  SEM.

\* $p < 0,05$  vs control group, # $p < 0,05$  vs DM.



**Obrázok 2/Figure 2**

Génová expresia prozápalových cytokínov interleukín-1b (IL-1b) (A), interleukín-6 (IL-6) (B) a tumor nekrotizujúci faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (C) v kostrovom svale u kontrolných, diabetických neliečených (DM) a diabetických potkanov liečených pioglitazónom (Pio). Namerané hodnoty sú vyjadrené percentuálne ako priemer  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs kontrola, # $p < 0,05$  vs DM.

Gene expression of inflammatory cytokines interleukin-1b (IL-1b) (A), interleukin-6 (IL-6) (B) a tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (C) in skeletal muscle in the control group, diabetic untreated group (DM) and diabetic rats treated with pioglitazone (Pio). Measured values are expressed in percent as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs control group, # $p < 0,05$  vs DM.

## DISKUSIA

V rámci ochorenia diabetes mellitus dochádza k patologickým zmenám aj v kostrovom svalstve. Jedným z rizikových faktorov diabetickej myopatie je znížená senzitivita na inzulín a to pri oboch typoch diabetu (5). V kostrovom svale potkanov s experimentálnym T1DM, ktoré podstúpili liečbu s Pio, sme zaznamenali zvýšenú expresiu génov asociovaných s metabolizmom glukózy (Glut4, Glut1, HkII) v porovnaní s diabetickými či kontrolnými zvieratami. Naše výsledky sú v súlade s nedávnou štúdiou, v ktorej viedla monoterapia s Pio pri STZ-indukovanom T2DM k štatisticky nevýznamným zmenám v hladinách glykémie, avšak inzulínová rezistencia bola na základe preprandiálnych glykemických hodnôt a inzulínémie (HOMA-IR index) výrazne redukovaná (6). Obdobné výsledky boli dosiahnuté aj v štúdiu Irudayraj et al., kde bola aktivácia PPAR- $\gamma$  receptorov asociovaná so zvýšenou expresiou GLUT4 transportérov v kostrovom svale a zároveň bola pozorovaná aj zvýšená expresia adenoínmonofosfát-aktivovanej proteínkinázy (AMPK) (7). Bolo preukázané, že aktivácia AMPK môže upregulovať translokáciu GLUT4 na membránu aj nezávisle od inzulínu (8). Okrem GLUT4 sme sa zamerali aj na expresiu GLUT1 transportéra, ktorá bola po liečbe s Pio signifikantne zvýšená oproti kontrolnej skupine. V štúdiách sú uvádzané protichodné výsledky týkajúce sa účinku Pio na expresiu tohto typu glukózového transportéra. Expresia sa pravdepodobne líši v závislosti od použitého animálneho druhu ako aj použitého modelu diabetu (9,1). V našich experimentoch nevykazovali zvieratá, ktoré podstúpili terapiu s Pio, zvýšenú expresiu INSR. Pio má pravdepodobne minimálny vplyv na expresiu INSR, a to v nediabetických podmienkach, ako aj v podmienkach experimentálneho T2DM. Pio však významným spôsobom ovplyvňuje samotné procesy po interakcii inzulínu s jeho receptorom, vrátane zvýšenia autofosforylácie INSR či zvýšenia expresie substrátu pre INSR (11). Terpia s Pio viedla v našich experimentoch k zvýšeniu expresie aj na úrovni hexokinázy II, ktorá je zodpovedná za prvotný krok glykolýzy. Jej aktivita v svale je závislá a podmienená prítomnosťou a aktivitou GLUT4

transportérov (12). Ako už bolo spomínané vyššie, Pio zvyšoval génovú expresiu GLUT4 transportérov, čo by mohlo mať súvis s upreguláciou HKII.

Viacere štúdie preukázali významnú regulačnú úlohu  $PAR\gamma$  v modulácii imunitnej odpovede. Aktiváciou spomínaných receptorov v rámci tkaniva, ale aj imunitných buniek dochádza k downregulácii zápalovej reakcie, vrátane zníženej sekrécie cytokínov a chemokínov (1). V našom experimente však Pio nevedol k významnému zníženiu expresie prozápalových cytokínov v kostrovom svalu. Vysvetlením môže byť fakt, že v našom experimente vykazoval Pio minimálny vplyv na glykemické hodnoty (Pio  $10,97\pm 0,51$  mol/ml; STZ  $13,83\pm 0,80$ ). Hyperglykémia je totiž úzko prepojená s generovaním ROS, ktoré priamym spôsobom zvyšujú expresiu prozápalových a adhézných faktorov. Keďže v našej štúdii boli glykemické hodnoty liečbou s Pio ovplyvnené len minimálnym spôsobom, produkcia ROS ostávala pravdepodobne aj naďalej vysoká a preto nemuselo prísť k významnému ovplyvneniu zápalu (14). Avšak v štúdii Toblli et al. 2011 aj subterapeutické dávky tohto liečiva, ktorými nie je dosiahnutá normoglykémia, vykazovali v obličkách potkanov s experimentálnym T2DM významný antiflogistický (downregulácia TNF- $\alpha$ , IL-6, MC-1) a antioxidantný účinok (15). Jeho antiflogistický účinok pravdepodobne závisí od typu a charakteru tkaniva, prípadne by mohla na úrovni kostrového svalu pri T1DM zohrávať zásadnú úlohu dĺžka terapie, či kombinovaná terapia s inzulínom.

Hlavným výsledkom našej práce bolo zaznamenanie významného účinku Pio na inzulínovú rezistenciu pri experimentálnom T1DM, čo by mohlo mať pozitívny vplyv v rámci kombinovanej terapie s inzulínom. Zároveň šlo o minimalizovanie jedného z rizikových faktorov prispievajúcich k diabetickej myopatii. Pio však nedokázal dostatočne redukovať zápalové procesy prebiehajúce v kostrovom svalu.

## POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory grantu VEGA SR 2/00910/21.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Coleman SK, Rebalka IA, D'Souza DM, Hawke TJ. Skeletal muscle as a therapeutic target for delaying type 1 diabetic complications. *World J Diabetes*. 2015;6(17):1323–36.
2. Molanouri Shamsi M, Hassan ZH, Gharakhanlou R, Quinn LS, Azadmanesh K, Baghersad L, Isanejad A, Mahdavi M. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: effect of resistance exercise training. *Endocrine*. 2014;46(1):60-9.
3. Mann CJ, Ayuso E, Anguela XM, Bosch F. Skeletal muscle metabolism in the pathology and treatment of type 1 diabetes. *Curr Pharm Des*. 2010;16(8):1002–20.
4. Al-Muzafar HM, Alshehri FS, Amin KA. The role of pioglitazone in antioxidant, anti-inflammatory, and insulin sensitivit in a high fat-carbohydrate diet-induced rat model of insulin resistance. *Braz J Med Biol Res*. 2021;54(8):e10782.
5. D'Souza DM, Al-Sajee D, Hawke TJ. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. *Front Physiol*. 2013;4:379.
6. Zakaraya ZZ, Altamimi L, Hailat M, Ahmad MN, Qinna NA, Ghanim BY, et al. Ameliorative effect of selenium yeast in combination with pioglitazone on diabetes

- outcomes in streptozotocin-induced. *J Popul Ther Clin Pharmacol*. 2022;29(4):e202–10.
7. Irudayaraj SS, Jincy J, Sunil C, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S, Chandramohan G, et al. Antidiabetic with antilipidemic and antioxidant effects of flindersine by enhanced glucose uptake through GLUT4 translocation and PPAR $\gamma$  agonism in type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2022;285:114883.
  8. Vargas E, Podder V, Carrillo Sepulveda MA. Physiology, Glucose Transporter Type 4. V: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cit 21. február 2023]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537322/>
  9. Suagee JK, Corl BA, Hulver MW, McCutcheon LJ, Geor RJ. Effects of hyperinsulinemia on glucose and lipid transporter expression in insulin-sensitive horses. *Domest Anim Endocrinol*. 2011;40(3):173–81.
  10. Stuart CA, Howell MEA, Yin D. Overexpression of GLUT5 in Diabetic Muscle Is Reversed by Pioglitazone. *Diabetes Care*. 2007;30(4):925–31.
  11. Gesing A, Bartke A, Masternak MM. Pioglitazone does not improve insulin signaling in mice with GH over-expression. *J Endocrinol*. 2013;219(2):109-17.
  12. Kong X, Manchester J, Salmons S, Lawrence JC Jr. Glucose transporters in single skeletal muscle fibers. Relationship to hexokinase and regulation by contractile activity. *J Biol Chem*. 1994;269(17):12963-7.
  13. Straus DS, Glass CK. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*. 2007;28(12):551-8.
  14. Yuan T, Yang T, Chen H, Fu D, Hu Y, Wang J, Yuan Q, Yu H, Xu W, Xie X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol*. 2019;20:247-260.
  15. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Angerosa M, Dominici FP, Gonzalez-Cadavid NF. Antifibrotic effects of pioglitazone at low doses on the diabetic rat kidney are associated with the improvement of markers of cell turnover, tubular and endothelial integrity, and angiogenesis. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34(1):20-33.

**FARMAKOGENETICKÉ TESTOVANIE PACIENTOV  
S KARDIOPULMONÁLNYMI OCHORENIAMI**  
PHARMACOGENETIC TESTING OF PATIENTS WITH  
CARDIOPULMONARY DISEASES

Stollárová, N.<sup>1</sup>, Bies Piváčková, L.<sup>1</sup>, Klimas, J.<sup>1</sup>, Křenek, P.<sup>1</sup>, Goncalvesová, E.<sup>2</sup>,  
Luknár, M.<sup>2</sup>, Dóka, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra farmakológie a toxikológie, FaF UK, Bratislava*

<sup>2</sup>*Oddelenie zlyhávania a transplantácie srdca, NÚSCH a.s., Bratislava*

**ABSTRAKT: ÚVOD:** Snahou personalizovanej medicíny je optimalizovať liečbu vzhľadom na predispozície a potreby pacienta. Účinným nástrojom k naplneniu týchto vízií môže byť práve farmakogenetické testovanie, ktoré môže prísť k zlepšeniu terapie pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami ako sú pľúcna artériová hypertenzia či srdcové zlyhávanie. **CIELE:** Cieľom našej štúdie bolo stanovenie klinicky významných jednonukleotidových polymorfizmov CYP450 u pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami a prepojenie farmakogenetického testovania s liekovou anamnézou. **METÓDY:** Celkovo 59 pacientom bola odobratá krv počas katetrizácie srdca, ktorá bola súčasťou diagnostického vyšetrenia na NÚSCH, a.s. Bratislava. Genomická DNA bola izolovaná zo vzoriek krvi a jednonukleotidové polymorfizmy variantov CYP2D6\*4, CYP2D6\*41, CYP2C19\*17, CYP2C19\*2 a CYP2C9\*2 boli detegované použitím qPCR. Štatistická analýza zahrňovala chí-kvadrátový test, jednovýberový Z-test proporcií a test súladu pozorovaného počtu genotypov s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou. **VÝSLEDKY:** Medzi pacientmi sme identifikovali heterozygotov i homozygotov pre variantné alely a taktiež liečivá, u ktorých by bola možná aplikácia farmakogenetických odporúčaní. Pacienti užívali 70 % liečiv metabolizovaných cez enzýmy CYP450, pričom najčastejšie užívali furosemid (79,6 %), eplerenón (54,2 %), pantoprazol (45,8 %) a warfarín (39,0 %). Výskyt jednotlivých alel v našej kohorte sa neodlišoval od výskytu vo všeobecnej európskej populácii. **ZÁVER.** Enzýmy CYP450 sa vo významnej miere podieľajú na biotransformácii liečiv pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami, a preto poznanie genotypu týchto pacientov a následná úprava farmakoterapie by mohla mať potenciál zlepšenia terapie.

**SUMMARY: BACKGROUND.** Personalized medicine aims to optimize treatment based on the predispositions and needs of the patient. An effective tool to meet these visions may be pharmacogenetic testing, which can contribute to the

improvement of the therapy of patients with cardiopulmonary diseases such as pulmonary arterial hypertension or heart failure. AIMS. The aim of our study was determine clinically actionable single nucleotide polymorphisms of CYP450 enzymes in patients with cardiopulmonary diseases and to link pharmacogenetic testing with their drug history. METHODS. A total of 59 patients had their blood taken during cardiac catheterization, which was part of the diagnostic examination at NÚSCH, a.s. Bratislava. Genomic DNA was isolated from blood samples, and single nucleotide polymorphisms of CYP2D6\*4, CYP2D6\*41, CYP2C19\*17, CYP2C19\*2, and CYP2C9\*2 variants were detected using qPCR. Statistical analysis included the chi-square test, the one-sample Z-test of proportions, and Hardy-Weinberg equilibrium. RESULTS. Heterozygotes and homozygotes for variant alleles were identified among the patients, as well as drugs for which the pharmacogenetic recommendations could be applied. 70% of drugs were metabolized by CYP450 enzymes, with furosemide (79.6%), eplerenone (54.2%), pantoprazole (45.8%), and warfarin (39.0%) being the most frequently used by patients. Allele frequency in our cohort did not differ from allele frequency in general European population. CONCLUSION. CYP450 enzymes are significantly involved in the biotransformation of drugs taken by patients with cardiopulmonary diseases, and therefore knowledge of the genotype of these patients and subsequent adjustment of pharmacotherapy may have the potential to improve therapy outcomes.

**Kľúčové slová:** farmakogenetika, genetický polymorfizmus, CYP450, pľúcna artériová hypertenzia, srdcové zlyhávanie

**Keywords:** pharmacogenetics, genetic polymorphism, CYP450, pulmonary arterial hypertension, heart failure

## ÚVOD

V klinickej praxi sa stretávame s interindividuálnou variabilitou v odpovediach pacientov na rovnakú liečbu, za ktorú môže byť v mnohých prípadoch zodpovedný genetický polymorfizmus enzýmov metabolizujúcich liečivá – cytochrómov P450 (CYP450) (1). Neoddeliteľnou súčasťou personalizovaného prístupu pri manažmente liečby by preto mohlo byť aj farmakogenetické testovanie. Prístup k výsledkom testovania umožňuje informovať zdravotníckych pracovníkov (lekárov či farmaceutov) o prítomnosti špecifických variantov, na ktoré môže liek nepriaznivo reagovať, a teda môže pomôcť predpísať správny liek v správnej dávke správne pacientovi a zlepšiť jeho liečbu (2).

Jedny z najfrekvencovanejších sa vyskytujúcich a zároveň aj finančne najnákladnejších chronických ochorení sú práve kardiovaskulárne ochorenia. Terapia zohľadňujúca genotyp pacienta má potenciál zohrávať dôležitú úlohu pri znižovaní tejto



záťaže prevenciou nežiaducich účinkov súvisiacich s liekmi a optimalizáciou účinnosti liečby (3). Medzi kardiovaskulárne ochorenia s náročnou liečbou patrí pľúcna artériová hypertenzia (PAH), ako aj srdcové zlyhávanie (SZ). I keď títo pacienti užívajú liečivá metabolizované enzýmami CYP450, súčasné terapeutické stratégie nezohľadňujú diverzitu v genotype a fenotype medzi pacientmi, ktoré môžu spôsobiť rôzne odpovede na liečbu(4). Súčasný výskum sa zameriava najmä na klinicky významné farmakogény CYP2C9, CYP2C19 a CYP2D6, metabolizujúce približne 40 % liečiv (5).

## CIELE PRÁCE

Cieľom našej štúdie bolo stanovenie klinicky významných jednonukleotidových polymorfizmov CYP450 u pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami a prepojenie výsledkov farmakogenetického testovania s klinickými údajmi pacientov s dôrazom na liekovú anamnézu.

## MATERIÁL A METÓDY

Do výskumu boli zaradení pacienti nad 18 rokov, ktorí podstúpili pravokomorovú katetrizáciu srdca s cieľom potvrdenia alebo vyvrátenia diagnózy I27.0 – primárnej pľúcnej hypertenzie alebo posúdenia zdravotného stavu na Oddelení zlyhávania a transplantácie srdca Národného ústavu srdcových a cievnych chorôb (NÚSCH a.s.) v Bratislave v období apríl 2018 až máj 2022. Štúdia bola schválená etickou komisiou NÚSCH EK 1829/22. Vzorka krvi bola pacientom odobratá z *a. pulmonalis* počas katetrizácie srdca do skúmaviek obsahujúcich K<sub>2</sub>EDTA. Z krvných buniek bola izolovaná celková DNA kolónkovou metódou pomocou QIAamp® DNA Blood Mini Kitu (QIAGEN). Kvantifikácia množstva izolovanej DNA a jej kvalitatívne stanovenie prebiehalo spektrofotometricky pomocou NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific). Stanovenie jednonukleotidových polymorfizmov (*single nucleotide polymorphisms* – SNPs) bolo realizované pomocou metódy kvantitatívnej polymerázovej reťazovej reakcie v reálnom čase (qPCR) použitím TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, USA) pre gény CYP2D6\*4 (rs3892097; NG\_008376.4:g.6866G>A), CYP2D6\*41 (rs28371725; NG\_008376.4G>A) CYP2C19\*17 (rs12248560; NG\_008384.3:g.4220C>T), CYP2C19\*2 (rs4244285; NG\_008384.3G>A), CYP2C9\*2 (rs1799853; NG\_008385.2:g.9133C>T). Vyhodnotenie výsledkov genotypizácie spočívalo v zostrojení grafu alelickej diskriminácie, pričom boli použité softvéry StepOne Software 2.3. a TaqMan Genotyper Software. Dáta boli spracované v programe Excel (percentuálne zastúpenia, medián veku, smerodajná odchýlka SD a pod). Použitý bol exaktný test súladu pozorovaného počtu genotypov s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou s korekciou na „mid P“ (6). Výpočet alelovej frekvencie vo vzorke bol vypočítaný ako počet detegovaných alel/ 2\*počet pacientov Porovnanie alelovej frekvencie v našej vzorke vs. očakávaný odhad frekvencie v európskej populácii podľa databázy gnomAD (v2.1.1) (7) bol vypočítaný jednovýberovým Z-testom pre proporcie (8). Klinické údaje o pacientoch boli získané retrospektívne odpisom z chorobopisu z času vykonania pravokomorovej katetrizácie.

Lieková anamnéza pred a po hospitalizácii bola analyzovaná z hľadiska odporúčaní farmakogenetických databáz *The Pharmacogenomics Knowledge Base* (PharmGKB), *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium – CPIC* a *The Dutch Pharmacogenetics Working Group – DPWG*. Metabolizmus liečiv bol vyhodnotený zjednotením údajov zo súhrnu charakteristických vlastností lieku (SPC) a databázy Drugbank (Wishart et al. 2018). Za štatisticky významné boli považované hodnoty  $p \leq 0,05$ .

### VÝSLEDKY:

V rámci demografických parametrov (Tabuľka 1) sme u pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami sledovali všeobecné charakteristiky, diagnózy, klinické charakteristiky pľúcnej hypertenzie, funkčnú skupinu NYHA, liekovú anamnézu, a ďalšie základné kardiopulmonálne a biochemické parametre.

Pacientov sme genotypizovali na prítomnosť variantov:

1. S nulovou funkciou enzýmu:
  - CYP2D6\*4, pri ktorom sme identifikovali 15 (25,4 %) heterozygotných pacientov
  - CYP2C19\*2, pri ktorom sme identifikovali 14 (23,7 %) heterozygotných pacientov
2. So zníženou funkciou enzýmu:
  - CYP2D6\*41, pri ktorom sme identifikovali 9 (15,3 %) heterozygotných pacientov a jedného homozygota pre variantnú alelu (1,7 %)
  - CYP2C9\*2, pri ktorom sme identifikovali 12 (20,3 %) heterozygotných pacientov a jedného homozygota pre variantnú alelu (1,7 %)
3. So zvýšenou funkciou enzýmu:
  - CYP2D19\*17, pri ktorom sme identifikovali 20 (33,9 %) heterozygotných pacientov a jedného homozygota pre variantnú alelu (1,7 %)

**Tabuľka 1/Table 1**

Všeobecná charakteristika pacientov (n = 59) s kardiopulmonálnymi ochoreniami. Dáta sú vyjadrené v percentuálnom zastúpení (%) alebo ako priemer ± smerodajná odchýlka (SD), vek a počet užívaných liečiv je vyjadrený mediánom s použitím rozpätia.

Characteristics of patients with cardiopulmonary diseases (n = 59). Data represent counts with percentage (%) of the total in each group or means ± standard deviation (SD). Age and Number of prescribed medications were summarized by median with range.

<b>Všeobecné charakteristiky</b>	<i>Spolu (n = 59)</i>	<i>Chýbajúce údaje</i>
Vek (roky medián; rozpätie)	55 (21 - 80)	
<b>Pohlavie</b>		
Ženy	22 (37 %)	
Muži	37 (63 %)	
<b>Diagnózy</b>		
Zlyhanie ľavej komory (I50.1)	38 (64 %)	
Primárna pľúcna hypertenzia (I27.0)	14 (24 %)	
Iné špecifikované formy pľúcneho srdca (I27.8)	4 (7 %)	
Dýchavica (R06.0)	2 (3 %)	
Iná akútna myokarditída (I40.8)	1 (2 %)	
<b>Klinické charakteristiky pľúcnej hypertenzie (PH)</b>		
Prekapilárna PH	14 (24 %)	
Izolovaná postkapilárna PH	14 (24 %)	
Kombinovaná post- & prekapilárna PH	15 (25 %)	
Nedefinovaná PH	2 (3 %)	
Bez známkov pľúcnej hypertenzie	14 (24 %)	
<b>NYHA funkčná skupina</b>		
II	11 (19 %)	
III	29 (49 %)	
IV	11 (19 %)	
Neurčené	8 (14 %)	
<b>Počet predpisovaných liekov</b>		
pred hospitalizáciou (medián; rozpätie)	9 (0 - 14)	
po hospitalizácii (medián; rozpätie)	8 (0 - 15)	
<b>Základné charakteristiky</b>		
Index telesnej hmotnosti (BMI; kg/m <sup>2</sup> )	27,6 ± 4,7	1
Plocha povrchu tela (BSA - Du Bois; m <sup>2</sup> )	1,98 ± 0,24	1
Systolický krvný tlak (SBP; mmHg)	114 ± 18	1
Diastolický krvný tlak (DBP; mmHg)	73 ± 10	1
<b>Kardiopulmonálne a katetrizačné parametre</b>		
NT-proBNP (ng/l)	3269 ± 4737	
Kardiálny troponín T (ng/l)	28,3 ± 26,4	3
Ejekčná frakcia ľavej komory (%)	38 ± 20	5
Stredný tlak v pľúcnej artérii (mPAP; mmHg)	35 ± 16	
Pľúcny kapilárny tlak v zaklínení (PCWP; mmHg)	18 ± 9	
Transpulmonálny gradient (TPG; mmHg)	17 ± 15	
Pľúcna cievna rezistencia (PVR; Wood units)	4,2 ± 4,1	
Srdcový index (CI; l/min/m <sup>2</sup> )	2,2 ± 0,5	1
<b>Základné biochemické parametre</b>		
Na (mmol/l)	140 ± 3	
K (mmol/l)	4,0 ± 0,4	
Kyselina močová (mmol/l)	6,8 ± 2,9	
Močovina (μmol/l)	428 ± 143	4

*Prekapilárna PH: mPAP > 20; PCWP ≤ 15; PVR ≥ 3 Izolovaná postkapilárna PH: mPAP > 20; PCWP > 15; PVR < 3; Kombinovaná post- & prekapilárna PH: mPAP > 20; PCWP > 15; PVR ≥ 3 Bez známkov pľúcnej hypertenzie: mPAP ≤ 20*

Výsledky genotypizácie sú zobrazené v Tabuľke 2.

**Tabuľka 2/Table 2**

Distribúcia genotypov vo vzorke pre jednotlivé varianty enzýmov CYP450.

Genotype distribution in sample for each variant of CYP450 enzymes.

<b>Genotyp</b>	<b>Frekvencia n (%)</b>
<b>CYP2D6*4 (rs3892097 G&gt;A)</b>	
G/G	44 (74,6%)
A/G	15 (25,4%)
A/A	0 (0%)
<b>CYP2D6*41 (rs28371725 G&gt;A)</b>	
G/G	49 (83,0%)
A/G	9 (15,3%)
A/A	1 (1,7%)
<b>CYP2C9*2 (rs1799853 C&gt;T)</b>	
C/C	46 (78,3%)
C/T	12 (20,3%)
T/T	1 (1,7%)
<b>CYP2C19*2 (rs4244285 G&gt;A)</b>	
G/G	45 (76,3%)
A/G	14 (23,7%)
A/A	0 (0%)
<b>CYP2C19*17 (rs12248560 C&gt;T)</b>	
C/C	38 (64,4%)
C/T	20 (33,9%)
T/T	1 (1,7%)

Z databázy gnomAD (v2.1.1), ktorá zahŕňala vzorky od Európanov s výnimkou Fínov, sme identifikovali frekvenciu jednotlivých alel a porovnali ich s frekvenciou v našej vzorke – Tabuľka 3. Výsledky genotypizácie sú v súlade s Hardyho-Weinbergovou rovnováhou (HWE,  $p \geq 0,05$ ).

**Tabuľka 3/Table 3**

Frekvencia vybraných alel enzýmu CYP450 vo vzorke vs. Európskej populácii s výnimkou Fínov podľa databázy gnomAD (v2.1.1).

Frequency of specific alleles of CYP450 enzymes in sample vs. European (non-Finnish) population according to gnomAD (v2.1.1).

<b>Alela</b>	<b>Frekvencia alely v európskej populácii<sup>§</sup></b>	<b>Frekvencia alely vo vzorke (n =59)</b>	<b>p-hodnota</b>
CYP2D6*4 (rs3892097)	19,6%	12,7%	0,1818
CYP2D6*41 (rs6435156)	9,3%	9,3%	1,000
CYP2C9*2 (rs1799853)	12,6%	11,8%	0,8530
CYP2C19*17 (rs12248560)	23,1%	18,6%	0,4122
CYP2C19*2 (rs4244285)	14,7%	11,8%	0,5293

<sup>§</sup> Alelová frekvencia v európskej populácii, s výnimkou Fínov získaná z databázy gnomAD (v2.1.1), \* $p < 0,05$  alelová frekvencia vo vzorke vs. európskej populácii.

Celkový súbor pacientov užíval až 111 rôznych liečiv. Najfrekvencovanejšie zastúpeným liečivom bolo diuretikum furosemid (79,6 %), nasledované liečivami eplerenón (54,2 %), pantoprazol (45,8 %) a warfarín (39,0 %) – Tabuľka 4. Pre liečbu pľúcnej artériovej hypertenzie bol najčastejšie indikovaným liečivom sildenafil – 15,3 % v celkovej vzorke čo predstavuje 64,3 % pacientov s Dg. I27.0.

**Tabuľka 4/Table 4**

20 najčastejšie užívaných liečiv vo vzorke, ich biotransformácia enzýmami CYP450 a priradená existencia farmakogenetických odporúčaní spoločností CPIC/DPWG.

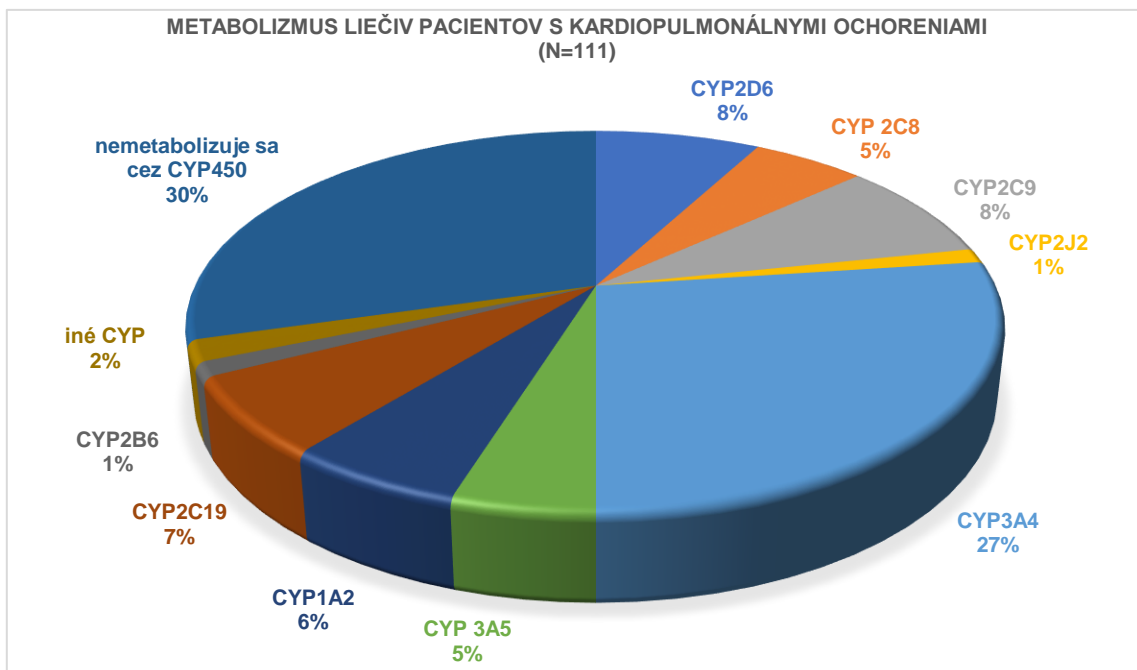
20 most frequently used drugs in the sample, their biotransformation by CYP450 enzymes, and the associated existence of CPIC/DPWG pharmacogenetic recommendations.

Predpísané liečivo	Frekvencia (n = 59)	CYP metabolizmus	Farmakogenetické odporúčania
furosemid	47 (79,6 %)	-	-
eplerenón	32 (54,2 %)	CYP3A4	-
pantoprazol	27 (45,8 %)	CYP2C19, CYP3A4	CPIC, DPWG
warfarín	23 (39,0 %)	CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2	CPIC, DPWG
alopurinol	22 (37,3 %)	-	-
kyselina acetylsalicylová	20 (33,9 %)	-	-
metoprolol	20 (33,9 %)	CYP2D6	DPWG
atorvastatín	17 (28,8 %)	CYP3A4	CPIC, DPWG
amiodarón	16 (27,1 %)	CYP3A4, CYP2C8	-
horčík	15 (25,4 %)	-	-
vitamín K	15 (25,4 %)	-	-
bisoprolol	14 (23,7 %)	CYP3A4	-
ivabradín	14 (23,7 %)	CYP3A4	-
ramipril	14 (23,7 %)	-	-
valsartan	12 (20,3 %)	-	-
digoxín	11 (18,6 %)	-	-
sakubitril	11 (18,6 %)	-	-
železo	10 (16,9 %)	-	-
sildenafil	9 (15,3 %)	CYP3A4, CYP2C9	-
spironolaktón	9 (15,3 %)	-	-

*CPIC – The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

*DPWG – The Dutch Pharmacogenetics Working Group*

Až 70 % liečiv užívaných pacientmi vo vzorke bolo metabolizovaných enzýmami CYP450 (obrázok 1). Najčastejšie išlo o enzýmy CYP3A4 (27 %), CYP2C9/2D6 (8 %) a CYP2C19 (7 %).



**Obrázok 1/Figure 1**

Graf zobrazujúci metabolizmus liečiv pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami prostredníctvom enzýmov CYP450 (n = 111).

Graph representing drug metabolism of patients with cardiopulmonary diseases via CYP450 enzymes (n = 111).

## **DISKUSIA A ZÁVER**

Farmakogenetické testovanie je v klinickej praxi implementované v zahraničí v niektorých európskych krajinách (9), či Spojených štátoch amerických (10), pričom vedecké dôkazy podporujú použitie farmakogenomiky aj pre vybrané liečivá používané v kardiológii (2). Hoci v kardiológii nie je potenciál farmakogenetického testovania natoľko preskúmaný ako napríklad v psychiatrickej či onkologickej oblasti, farmakogeneticky riadená liečba môže aj tu zohrávať dôležitú úlohu pri znižovaní terapeutickú a finančnú záťaž prevenciou nežiaducich účinkov súvisiacich s liekmi a optimalizáciou účinnosti liečby (3).

Závažným a doposiaľ nevyliciteľným kardiovaskulárnym ochorením je aj pľúcna artérová hypertenzia charakteristická proliferáciou pľúcnych vaskulárných buniek, progredujúca do pravostranného srdcového zlyhaniu až predčasnej smrti pacientov (11). V liečbe PAH je využívaných primárne päť skupín liečiv a to antagonisy endotelínových receptorov (ERA), syntetický prostacyklín a analógy prostacyklínu, agonisy prostacyklínového receptora, inhibitory fosfodiesterázy typu 5 (iPDE5) a solubilné stimulatory guanylátcyklázy (sGC)(12), pričom často ide o liečivá biotransformované enzýmami CYP450. Okrem toho, títo pacienti užívajú aj množstvo iných liečiv ako sú antikoagulanty, inhibitory protónovej pumpy, diuretiká a pod. (13),

pre ktoré máme k dispozícii farmakogenetické odporúčania autorít zohľadňujúce úpravu liečby na základe genotypu/fenotypu individuálneho jednotlivca (14,15).

Ďalšou skupinou pacientov, užívajúcich liečivá metabolizované vysoko polymorfnými enzýmami CYP450 sú pacienti so srdcovým zlyhávaním (SZ) užívajúcich napr. betablokátoary (metoprolol) či antikoagulanciá (warfarín) (16) a modifikácia farmakoterapie s ohľadom na genetickú výbavu pacientov by mohla aj v tomto smere optimalizovať ich liečbu.

Našou prácou sme poukázali na to, že pacienti s kardiopulmonálnymi ochoreniami ako sú SZ a PAH užívajú až 70 % liečiv metabolizovaných enzýmami CYP450 a predovšetkým sú to enzýmy CYP3A4 (27 %), CYP2C9/2D6 (8 %) a CYP2C19 (7 %). Medzi liečivá užívané vzorkou pacientov, ku ktorým existujú farmakogenetické odporúčania môžeme zaradiť páry liečivo-gén: warfarín + CYP2C9, pantoprazol/omeprazol + CYP2C19 a metoprolol + CYP2D6. Vzhľadom na to, že sme vo vzorke našich pacientov identifikovali nielen viacerých heterozygotov, ale aj homozygotov alel CYP2C9\*2/\*2 (fenotyp pomalý metabolizér – PM), CYP2D6\*41/\*41 (fenotyp stredný metabolizér – IM) a CYP2C19\*17/\*17 (fenotyp ultrarýchly metabolizér – UM) môže dochádzať napríklad pri liečive warfarín k zníženému metabolizmu, a teda zvýšenému riziku krvácania, či v prípade pantoprazolu zrýchlenému metabolizmu liečiv, a teda ku riziku zlyhania terapie. Pri mnohých liečivách metabolizovaných enzýmami CYP450 absentuje dostatok dôkazov podporujúcich úpravu farmakoterapie pacientov. Ako príklad si môžeme vziať pomalých metabolizérov CYP enzýmov a liečivá zo skupiny ERA (ambrisentan), u ktorých bolo zaznamenané zvýšenie plazmatickej koncentrácie až o 43 % (17), či v prípade sildenafilu o 20 % (18), no údaje o vhodnosti úpravy dávkovania alebo zmeny liečby nie sú k dispozícii.

V nedávnej štúdií od Petrović, J., et al., 2020 (19) sa autori venovali frekvenciám klinicky významných polymorfizmov CYP2C19 a CYP2D6 v Európe. Ich výsledky poukázali na to, že výskyt alely CYP2C19\*17 je najvyšší na Slovensku, a to 33 %, pričom výskyt alely je 23,1 % v európskej populácii s výnimkou Fínov (gnomAD (v2.1.1)). Do štúdie bolo však zahrnutých len 26 pacientov zo Slovenska, preto nás zaujímala frekvencia daných alel aj v našej početnejšej vzorke 59 pacientov, v ktorej sme napokon nezaznamenali odlišnosti vo výskyte alel v porovnaní s európskou populáciou.

Záverom hodnotíme, že jednonukleotidové polymorfizmy CYP450 enzýmov sú frekventovane zastúpené u pacientov s kardiopulmonálnymi ochoreniami a farmakogenetické testovanie môže mať potenciál optimalizovať ich liečbu.

## **POĎAKOVANIE**

Štúdia bola podporená grantom APVV-19-0458, FaF/16/2022.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(11):689-723.
2. Dávila-Fajardo CL, Díaz-Villamarín X, Antúnez-Rodríguez A, Fernández-Gómez AE, García-Navas P, Martínez-González LJ, Dávila-Fajardo JA, Barrera JC. Pharmacogenetics in the Treatment of Cardiovascular Diseases and Its Current Progress Regarding Implementation in the Clinical Routine. *Genes (Basel).* 2019;10(4):261.
3. Zhu Y, Moriarty JP, Swanson KM, Takahashi PY, Bielinski SJ, Weinshilboum R, Wang L, Borah BJ. A model-based cost-effectiveness analysis of pharmacogenomic panel testing in cardiovascular disease management: preemptive, reactive, or none? *Genet Med.* 2021;23(3):461-470.
4. Ling Y, Johnson MK, Kiely DG, Condliffe R, Elliot CA, Gibbs JS, Howard LS, Pepke-Zaba J, Sheares KK, Corris PA, Fisher AJ, Lordan JL, Gaine S, Coghlan JG, Wort SJ, Gatzoulis MA, Peacock AJ. Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(8):790-6.
5. Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004;369(1):89-104.
6. Hardy-Weinberg equilibrium exact test. (2020). Cog-Genomics. Retrieved March 3, 2023 from: <https://www.cog-genomics.org/software/stats>.
7. Karczewski, K.J., Francioli, L.C., Tiao, G., et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434–443.
8. Z., & posts by Zach, V. A. (2020, April 23). One Proportion Z-Test Calculator - Statology. Statology. <https://www.statology.org/one-proportion-z-test-calculator/>
9. Cecchin E, Roncato R, Guchelaar HJ, Toffoli G; Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium. Ubiquitous Pharmacogenomics (U-PGx): The Time for Implementation is Now. An Horizon2020 Program to Drive Pharmacogenomics into Clinical Practice. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(3):204-209.
10. Anderson HD, Crooks KR, Kao DP, Aquilante CL. The landscape of pharmacogenetic testing in a US managed care population. *Genet Med.* 2020;22(7):1247-1253.
11. Humbert M, Lau EM, Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2014;130(24):2189-208.
12. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, et al.; ESC Scientific Document Group. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and



- Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016 Jan 1;37(1):67-119.
13. Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, Badagliacca R, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2022;43(38):3618-3731.
  14. Zhang G, Zhang Y, Ling Y, Jia J. Web resources for pharmacogenomics. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):51-4.
  15. KNMP. (2022). Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guidelines (September 2022 update). Retrieved March 3, 2023 from: <https://www.knmp.nl/media/1058>.
  16. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, et al.; ESC Scientific Document Group. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021;42(36):3599-3726.
  17. Markert C, Kastner IM, Hellwig R, Kalafut P, Schweizer Y, Hoffmann MM, Burhenne J, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE. The effect of induction of CYP3A4 by St John's wort on ambrisentan plasma pharmacokinetics in volunteers of known CYP2C19 genotype. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015;116(5):423-8.
  18. Tang PF, Zheng X, Hu XX, Yang CC, Chen Z, Qian JC, Cai JP, Hu GX. Functional Measurement of CYP2C9 and CYP3A4 Allelic Polymorphism on Sildenafil Metabolism. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:5129-5141.
  19. Petrović J, Pešić V, Lauschke VM. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *Eur J Hum Genet*. 2020;28(1):88-94.

## ADOLESCENTI A UŽÍVANIE LIEKOV VYDÁVANÝCH BEZ LEKÁRSKEHO PREDPISU

### ADOLESCENTS AND THEIR USE OF OVER-THE-COUNTER MEDICINES

Urbánková, J., Kosírová, S.

*Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika*

**Abstrakt:** ÚVOD: Samoliečba liekmi vydávanými bez lekárskeho predpisu (OTC liekmi) je u adolescentov rozšíreným trendom. Štúdie však poukazujú na nedostatok vedomostí adolescentov o liekoch a používanie nerelevantných zdrojov na získavanie informácií o liekoch. CIELE PRÁCE: Analyzovať užívanie OTC liekov u slovenských adolescentov. Zhodnotiť efekt edukácie farmaceutom na postoje adolescentov k účinnosti a bezpečnosti OTC liekov a tiež na výber zdrojov na získavanie informácií o liekoch. METÓDY: Prieskum bol uskutočnený dotazníkovou metódou pred a po edukácii a vyhodnotený párovým Studentovým t-testom. Dotazníky boli validované v predchádzajúcej štúdií (Klimaszová a kol., 2016). Vyplnilo ich 122 adolescentov vo veku 15 – 18 rokov zo 4 rôznych škôl v Bratislave. VÝSLEDKY: Priemerný vek adolescentov bol  $16,7 \pm 0,95$  roka, prevažovali dievčatá (51,6 %). Až 89,3 % adolescentov užilo za posledný polrok aspoň jeden OTC liek. Miera dôvery adolescentov k účinnosti OTC liekov sa po edukácii významne zvýšila ( $p < 0,001$ ). Pred edukáciou získavali adolescenti najčastejšie informácie o liekoch z príbalovej informácie pre pacienta (68,9 %), od rodičov (64,8 %) a od lekára (62,3 %). ZÁVER: Adolescenti užívali OTC lieky vo veľkej miere a považovali ich za bezpečné a účinné. Po edukácii si adolescenti lepšie uvedomili, že najrelevantnejšie informácie o liekoch im môže poskytnúť lekárnik a lekár. Edukáciu považujeme za účinný nástroj na šírenie poznatkov o liekoch, ktoré môžu pomôcť znížiť riziko farmakoterapie u adolescentov a zároveň zabezpečiť správne návyky pri užívaní liekov aj v dospelosti.

**Summary:** BACKGROUND: Self-medication with over-the-counter (OTC) medicines in adolescents is a widespread trend. However, studies point to a lack of knowledge among adolescents about medicines, as well as the use of irrelevant sources for obtaining information about medicines. AIMS: To analyse the use of OTC medicines among Slovak adolescents and to evaluate the effect of a pharmacist-led education on adolescents' attitudes towards the efficacy and safety of OTC medicines and also on the choice of sources for obtaining information about medicines. METHODS: The survey was conducted by questionnaire method before and after education and evaluated by paired Student's t-test. The questionnaires were validated in a previous study (Klimaszová et al., 2016). They were filled by 122 adolescents aged 15-18 years from 4 different schools in Bratislava. RESULTS: the mean age of the adolescents was 16.7 years, with a predominance of girls (51.6%). Up to 89.3% of the adolescents had taken an over-the-counter medicine in the last six months. Adolescents' level of confidence in the efficacy of OTC medicines increased significantly after education ( $p < 0.001$ ).

Before education, they most frequently sought information about medicines from the patient information leaflet (68.9%), from parents (64.8%) and from the physician (62.3%). **CONCLUSION:** Adolescents used OTC medicines extensively and considered them safe and effective. After education, adolescents became more aware that the most relevant information about medicines can be provided by pharmacists and physicians. We consider education to be an effective tool for disseminating knowledge about medicines that can help decrease the risk of pharmacotherapy in adolescents, while also ensuring good medication habits in adulthood.

**Kľúčové slová:** adolescenti, OTC lieky, bezpečná farmakoterapia, edukácia  
**Key words:** adolescents, OTC medicines, safe pharmacotherapy, education

## ÚVOD

Adolescenti sú ako súčasť detskej populácie rizikovou skupinou z pohľadu užívania liekov. Okrem stúpajúceho trendu užívania liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu (OTC liekov) adolescentmi (1), bol vo viacerých štúdiách zistený aj nedostatok ich vedomostí o liekoch a samoliečbe (2, 3). Problémom u adolescentov je aj nedostatočné vnímanie rizika spojeného s užívaním OTC liekov (4), ktoré môže viesť k intoxikáciám (5), či zvýšenej miere zneužívania liekov (6, 7).

Zdrojom informácií o liekoch pre adolescentov bývajú často rodičia (2), ktorí však častokrát tiež nemajú dostatočné vedomosti o liekoch a ich rizikách (8). Veľké množstvo adolescentov čerpá informácie o liekoch z internetu a rôznych patientskych fór (9). Takéto získavanie informácií z nerelevantných zdrojov alebo konanie na základe dezinformácií môže negatívne ovplyvniť zdravie adolescentov, či spôsobiť vznik nežiaducich účinkov. Napriek tomu však adolescenti svoje vedomosti o liekoch často považujú za dostatočné (10) a v mnohých prípadoch ani neinformujú rodiča, že lieky užívajú (11).

V niektorých krajinách (USA, Fínsko, Japonsko) preto vznikli iniciatívy zamerané na edukáciu adolescentov o liekoch a ich správnom užívaní (12, 13). Po absolvovaní takýchto edukačných programov bolo u adolescentov zistené zlepšenie vo vedomostiach, medicínskej gramotnosti a sebavedomí (14).

Keďže sa adolescenti v procese dospievania osamostatňujú aj pri užívaní liekov, je dôležité poskytnúť im relevantné informácie, aby si vytvorili správne postoje a návyky k liekom, ktoré si zachovávajú až do dospelosti. Na Slovensku však zatiaľ neprebíha systematické vzdelávanie v tejto oblasti.

Cieľom našej práce bolo dotazníkovým prieskumom v školách overiť aktuálny stav informovanosti adolescentov o účinnosti a bezpečnosti liekov a zistiť informácie o užívaní OTC liekov adolescentmi. Následne adolescentov formou interaktívnej prezentácie edukovať o liekoch, ich bezpečnom a správnom užívaní a o vhodných zdrojoch na vyhľadávanie informácií o liekoch. Na záver bolo cieľom kvantitatívne vyhodnotiť efekt edukácie.

## SÚBOR RESPONDENTOV A METÓDY

Výskum bol realizovaný na adolescentoch vo veku 15 až 18 rokov zo 4 rôznych škôl v Bratislave v období od februára 2021 do marca 2021. Z 210 študentov zúčastnených na výskume spĺňalo 122 (58,09 %) kritériá nášho výskumu. Exklúzne

kritériá predstavovali nevyplnenie identifikačného čísla a tým znemožnenie spárovania dotazníkov, vek pod 14 alebo nad 19 rokov a tiež duplicitné vyplnenie dotazníka.

Vplyv edukácie sme analyzovali z online dotazníkov vyplnených adolescentmi v aplikácii Microsoft Forms pred a po edukácii. Použili sme validované dotazníky z predchádzajúceho výskumu (15), ktoré obsahovali otvorené a uzavreté otázky a otázky s použitím päťstupňovej Likertovej škály. Dotazníky obsahovali otázky, ktoré charakterizovali respondentov a otázky, ktoré skúmali užívanie OTC liekov, postoje k liekom a zdroje používané na vyhľadávanie informácií o liekoch. Edukácia prebehla formou interaktívnej prezentácie cez virtuálne platformy MS Teams, Google Meet alebo Zoom pod vedením farmaceuta. Skúšobnú edukáciu sme uskutočnili na vzorke 3 študentov a potom sme oslovovali pedagógov jednotlivých škôl. Na vyhodnotenie vplyvu edukácie sme použili párový Studentov t-test. Porovnávali sme priemerné skóre odpovedí z Likertovej škály pred a po edukácii s nasledovným párovaním hodnôt: 1 = áno, 2 = skôr áno, 3 = neviem posúdiť, 4 = skôr nie, 5 = nie.

## VÝSLEDKY

*Charakteristika adolescentov.* Zo 122 adolescentov vo veku 15 – 18 rokov zúčastnených na výskume bolo 51,6 % dievčat. Vekový priemer respondentov bol  $16,7 \pm 0,95$  roka. Najviac respondentov hodnotilo svoj zdravotný stav ako dobrý (45,1 %) a veľmi dobrý (40,2 %).

*Užívanie OTC liekov.* Za posledných 6 mesiacov užívalo 89,3 % (109/122) adolescentov OTC lieky s frekvenciou viackrát (60 %), raz (18 %), dvakrát (14 %). Ani raz neužilo OTC lieky za posledných 6 mesiacov iba 8 % z opýtaných adolescentov.

Najviac užívanými boli liečivá z ATC skupín M01 – antiflogistiká a antireumatiká (ibuprofén – 37,6 %), N02 – analgetiká (paracetamol – 23,5 %) a R02 – laryngologiká (amylmetakrezol s dichlórbenzén-metanolom – 5,4 %). Ďalšie liečivá z menej zastúpených ATC skupín užívané adolescentmi sú uvedené na obrázku 1.



**Obrázok 1/Figure 1**

Najpoužívanejšie OTC liečivá podľa ATC skupín užívané adolescentmi za posledných 6 mesiacov.  
Mostly used OTC medicines by adolescents in past 6 months listed by ATC group.

*Vedomosti adolescentov.* Sledovali sme aj schopnosť adolescentov uviesť, na aký zdravotný problém OTC liek užívali. Väčšina uviedla správne indikáciu lieku, iba v dvoch odpovediach bola indikácia diskutabilná. Prehľad odpovedí je podrobnejšie uvedený v tabuľke 1.

Takmer polovica adolescentov (48,78 %; 60/122) pred edukáciou uviedla, že svoje vedomosti o liekoch, ktoré užívajú, považujú za dostatočné. Po edukácii sa tento počet zvýšil na 85/122 (69,67 %).

**Tabuľka 1/Table 1**

Zdravotné problémy uvedené adolescentmi, na ktoré užívali OTC lieky.  
Adolescents' health problems for which they were taking OTC medications.

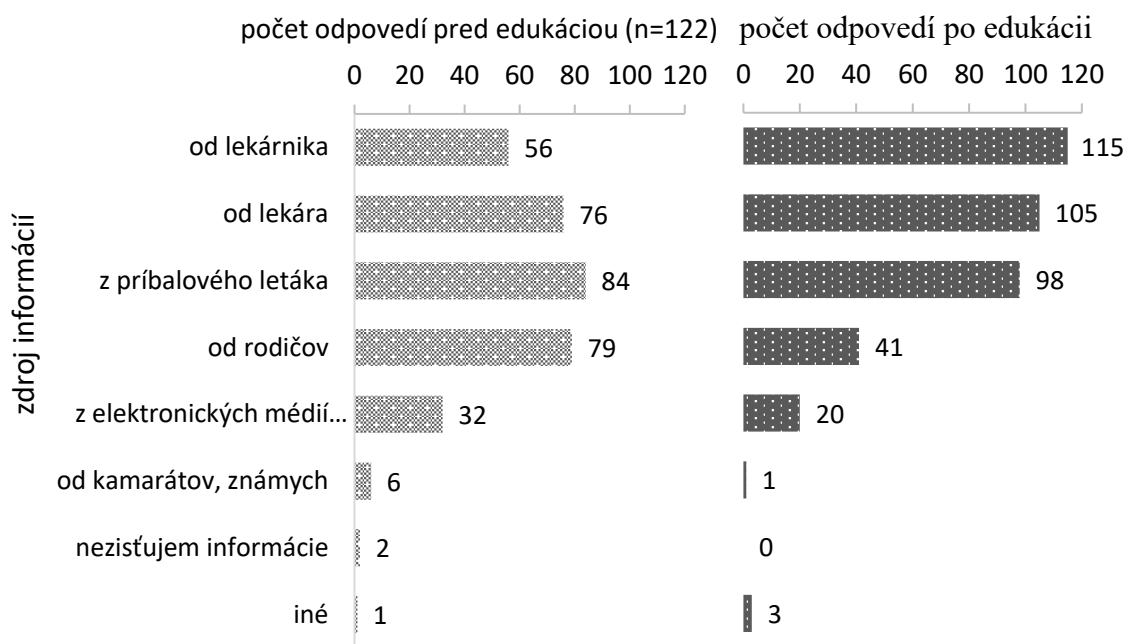
Liečivo	Podiel adolescentov [%]	Zdravotný problém
ibuprofén	37,6	kľče, menštruačné bolesti, bolesť hlavy, bolesť zubov
paracetamol	23,5	bolesť hlavy, horúčka, bolesť hrdla, bolesť zubov, menštruačné bolesti
amylmetakrezol s dichlórbenzénmetanolom	5,4	bolesť hrdla
ambroxol	4,0	upchatý nos, nádcha, kašeľ
aktívne uhlie	2,0	bolesť brucha

*Dohľad rodičov nad užívaním OTC liekov.* 34,4 % adolescentov uviedlo, že ich pri užívaní OTC liekov kontrolujú rodičia. U 50,0 % rodičia vedeli, že OTC lieky užívajú, ale nekontrolovali ich a u 15,6 % rodičia ani nevedeli, že OTC lieky užívajú.

*Vnímanie bezpečnosti a účinnosti OTC liekov adolescentmi.* Pred edukáciou uviedlo 78,86 % (97/122) adolescentov, že si myslia, že OTC lieky sú účinné. Po edukácii sa tento podiel zvýšil na 90,17 % (110/122). Za bezpečné považovalo OTC lieky pred edukáciou 66,66 % (82/122) a po edukácii 76,23 % (93/122) adolescentov. Rozdiel v odpovediach pred a po edukácii bol štatisticky významný pri tvrdení o účinnosti OTC liekov ( $p < 0,001$ ) na rozdiel od odpovedí pri tvrdení o bezpečnosti OTC liekov ( $p = 0,198$ ).

Po edukácii klesol počet odpovedí "neviem posúdiť" - v otázke účinnosti z 17,89 % na 9,02 % a v otázke bezpečnosti z 21,95 % na 12,30 %.

*Zdroje používané adolescentmi na získavanie informácií o liekoch.* Pred edukáciou adolescenti uviedli, že si zisťovali informácie o liekoch najmä z písomnej informácie pre používateľov lieku (68,9 %, 84/122). Z ľudských zdrojov čerpali informácie najčastejšie od rodičov (64,8 %, 79/122), a to dokonca viac ako od lekárov (62,3 %, 76/122) a lekárnikov (45,9 %, 56/122). Informácie o liekoch z elektronických médií čerpalo 32 adolescentov (26,2 %) a niektorí uviedli ako zdroj aj kamarátov a známych (4,9 %, 6/122).



**Obrázok 2/Figure 2**

Porovnanie adolescentmi používaných zdrojov na získavanie informácií o liekoch pred edukáciou so zdrojmi, ktoré plánujú využívať po edukácii.

Comparison of sources of information on medicines used by adolescents before the education with sources they are planning to use after the education.

Z údajov v obrázku 2 je zrejмый nárast počtu odpovedí v prospech relevantných zdrojov informácií o liekoch, akými sú lekárnik (+48,4 %), lekár (+23,8 %) a tiež písomná informácia pre používateľa (+11,5 %) po edukácii. Adolescenti po edukácii tiež uviedli, že budú menej využívať informácie od rodičov (-31,1 %), kamarátov a známych (-4,1 %) a z elektronických médií (-9,8 %).

## DISKUSIA A ZÁVER

Výsledkami bolo potvrdené, že adolescenti užívajú vo veľkej miere OTC lieky, čo koreluje s údajmi zahraničných štúdií (1, 2, 4).

Najčastejšie používanými OTC liekmi boli antiflogistiká a analgetiká, čo súhlasí s výsledkami mnohých zahraničných štúdií, ktoré to za posledných 30 rokov potvrdzujú, dokonca aj nedávna štúdia z roku 2022 (1). Adolescenti užívali OTC lieky väčšinou na správnu indikáciu a považovali ich za účinné a bezpečné. Po edukácii si významne viac adolescentov myslelo, že OTC lieky sú účinné. Názor na bezpečnosť OTC liekov sa však významne nezmenil. Relatívne vysoká informovanosť adolescentov o liekoch v našej štúdií však môže byť daná aj tým, že náš výskum bol realizovaný ako pilotná štúdia iba na adolescentoch z bratislavských škôl a nepredstavuje tak reprezentatívnu vzorku adolescentov na Slovensku, čo je jedna z limitácií štúdie. Do budúcnosti bude nutné tento súbor rozšíriť aj o adolescentov z iných krajov Slovenska, ako aj o adolescentov navštevujúcich školy na dedinách.

Vplyvom edukácie sa v našej štúdií znížil počet adolescentov, ktorí pred tým na otázky odpovedali možnosťou “neviem posúdiť”, z čoho môžeme usúdiť, že si na základe našej intervencie vo forme edukácie vedeli vytvoriť aspoň začiatočnú mienku o danej problematike. Adolescenti by mali byť podporovaní v tom, aby si zisťovali a overovali

informácie z viacerých zdrojov. Edukácia farmaceutom, ktorý je odborníkom na lieky, by mohla byť dobrým základom pre relevantné a pravdivé informácie, ktoré sú v tejto problematike dostupné. Rovnakú podporu tomuto formátu vyjadrili aj v štúdiu Recchiuti a kol.(2018), kde ponúkli na školy program zameraný na gramotnosť v oblasti OTC liekov (13), či fínska štúdia, kde takýto program implementovali do vzdelávacieho plánu škôl (12).

Najviac používanými zdrojmi na vyhľadávanie informácií o liekoch boli rodičia, čo koreluje s tým, čo zhrnul Dawood a kol. v štúdiu z roku 2014 (2).

Z odpovedí z dotazníkov môžeme predpokladať, že po edukácii si adolescenti uvedomili, že relevantné informácie o liekoch im poskytne lekárnik a lekár.

Svoje vedomosti o liekoch považujú adolescenti za dostatočné. Je pozitívne, že po našej edukácii toto sebedovetie nadobudlo viac adolescentov. Avšak bolo by potrebné, aby si uvedomili, že informácie o liekoch, ktoré nadobudnú aj z relevantných zdrojov (PIL) by si mali overiť a prekonzultovať s odborníkom - farmaceutom alebo lekárom - aby pochopili správne súvislosti a aby bola zabezpečená účinnosť a bezpečnosť farmakoterapie. Tento fenomén pocitu dostatočných vedomostí napriek ich objektívnemu nedostatku v oblasti užívania liekov potvrdzuje aj Shehnaz a kol. v prehľadovej štúdiu z roku 2014 (10).

Do budúcnosti je potrebná aj edukácia rodičov. Až 15,6 % adolescentov uviedlo, že neinformuje rodičov, keď užívajú OTC lieky. Môžeme predpokladať, že to je následkom postupného osamostatňovania sa. Rodičia by však mali vedieť o tom, aké lieky ich dieťa užíva. Keďže rodičia ostávajú častým zdrojom informácií o liekoch pre adolescentov, je potrebné, aby aj rodičia mali dobré vedomostné základy v tejto oblasti. Aj jedna slovenská štúdia (8) poukazuje na to, že názory detí a ich rodičov korelujú, lebo rodičia tieto informácie posúvajú svojim deťom. Je preto dôležité venovať sa aj edukácii rodičov a zdôrazniť, že pred začatím farmakoterapie je lepšie poradiť sa s odborníkom.

Z našich výsledkov tiež vyplýva, že adolescenti užívajú OTC lieky vo veľkej miere, považujú ich za bezpečné a účinné a väčšinou vedia, na aký zdravotný problém daný liek užívajú. Po edukácii dôvera adolescentov v účinnosť a bezpečnosť OTC liekov stúpla a adolescenti si uvedomili, že najrelevantnejšie informácie o liekoch im môže poskytnúť lekárnik a lekár. Edukáciu považujeme teda za účinný nástroj na šírenie poznatkov o liekoch a relevantných zdrojoch na zisťovanie informácií o nich.

Výsledky nášho výskumu by mohli byť podkladom pre zostavenie obsahu a formy edukácie adolescentov o liekoch, čo by mohlo prispieť k vyššej miere bezpečnosti a účinnosti akejkoľvek farmakoterapie v období adolescencie ale aj v dospelosti.

## **POĎAKOVANIE**

Táto práca bola podporená grantom UK č. 138/2023.

## **POUŽITÁ LITERATÚRA**

1. Herzig M, Bertsche A, Kiess W, Bertsche T, Neining MP. Medicine and supplement use in infants, children, and adolescents depends on sex, age, and socioeconomic status: results of a German longitudinal population-based cohort study (LIFE Child). *Eur J Pediatr.* 2022;181(8):2991-3003.
2. Dawood OT, Ibrahim MI, Abdullah AC. Familiarisation of Children with Medicines and their Sources of Information. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(1):329-30.

3. Klimaszova Z, Fazekas T, Kuzelova M. Adolescents' knowledge and perception of medicine risk. *Pediatr Int*. 2018;60(8):735-742.
4. Ylä-Rautio H, Siissalo S, Leikola S. Drug-related problems and pharmacy interventions in non-prescription medication, with a focus on high-risk over-the-counter medications. *Int J Clin Pharm*. 2020;42(2):786-795
5. Melo MTB, Santana GBA, Rocha MHA, Lima RKS, Silva TABD, Souza CDF, Rodrigues AKBF. Epidemiological profile and temporal trend of exogenous intoxications in children and adolescents. *Rev Paul Pediatr*. 2022;40:e2021004.
6. Abraham O, Chmielinski J. Adolescents' Misuse of Over-The-Counter Medications: The Need for Pharmacist-led Intervention. *Innov Pharm*. 2018;9(3):1-7.
7. Sakai C, Iguchi K, Tachi T, Noguchi Y, Katsuno S, Teramachi H. Factors Influencing Medicine Use Behavior in Adolescents in Japan Using a Bayesian Network Analysis. *Front Pharmacol*. 2019;10:494.
8. Klimaszova Z, Fazekas T, Kuzelova M. Relationship between adolescents' and their parents' attitudes toward medicines and awareness of the risk of medicines. *Int J Clin Pharm*. 2018;40(6):1501-1510.
9. Aston J, Wilson KA, Terry DRP. The treatment-related experiences of parents, children and young people with regular prescribed medication. *Int J Clin Pharm*. 2019;41(1):113-121.
10. Shehnaz SI, Agarwal AK, Khan N. A systematic review of self-medication practices among adolescents. *J Adolesc Health*. 2014;55(4):467-83.
11. Kelly T, Conn KM, Zak M. Evaluation of Over-the-Counter Medication Knowledge and Literacy in Adolescent Students. *Acad Pediatr*. 2018;18(5):556-562.
12. Siitonen P, Hämeen-Anttila K, Keinonen T, Vainio K. Medicine education as a part of health education: the implementation in Finnish comprehensive schools. *Int J Health Promot Educ*. 2014;52(2):90–104
13. Recchiuti K, Malone MK, Zimmerman B. School Program Improves Adolescents' Knowledge of Responsible Medicine Use. *Cent Eur J Public Health*. 2018;5(6):98–115
14. Guirguis LM, Singh RL, Fox LL, Neufeld SM, Bond I. Medication Education Provided to School-Aged Children: A Systematic Scoping Review. *J Sch Health*. 2020;90(11):887-897.
15. Klimaszová Z, Fazekas T, Kuželová M. Development and validation of novel self-report questionnaire about the assessment of adolescents' relation to medicines use and risk. *Eur Pharm J*. 2016;63:3 – 35



Anna Hrabovská  
(zostavovateľka)

POKROKY VO FARMAKOLÓGII  
V SLOVENSKEJ REPUBLIKE XVIII

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2023

Jazyková redakcia: autori

Tlač: DOLIS GOEN, s. r. o., Bratislava

Rozsah 53 strán, prvé vydanie

**ISBN 978-80-223-5698-5 (tlač)**  
**ISBN 978-80-223-5699-2 (online)**

**ISBN 978-80-223-5699-2 (online)**