Farmaceutická fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Ján Klimas
(zostavovateľ)

Pokroky vo farmakológii v Slovenskej republike XVII

2022
Univerzita Komenského v Bratislave

Zostavovateľ
prof. PharmDr. Ján Klimas, PhD., MPH

Recenzenti
doc. PharmDr. Stanislava Kosírová, PhD.
doc. PharmDr. Marek Máťuš, PhD.

Publikácia je šírená pod licenciou Creative Commons CC BY-SA 4.0
Viac informácií o licencii a použití diela:
https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/

https://stella.uniba.sk/texty/FAF_pokroky_vo_farmakologii_sk_17.pdf

Vydavateľ
Univerzita Komenského v Bratislave, 2022

ISBN 978-80-223-5483-7 (tlač)
ISBN 978-80-223-5484-4 (online)

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

s podporou
Slovenskej lekárnickej 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. 08. 1940 – 22. 11. 2015

OBSAH

PREDSLOV
Křenek, P. *3*

FARMAKOVIGILANCIA A TOXIKOVIGILANCIA V PREVENCII A LIEČBE AKÚTNYCH INTOXIKÁCIÍ
Cagáňová, B. *4*

ÚČINOK PIOGLITAZÓNU NA FUNKCIU ENDOTELU U POTKANOV S EXPERIMENTÁLNYM DIABETOM MELLITUS
Čináková, A., Guteková, K., Kráľová, E., Křenek, P. *11*

RELATÍVNA EXPRESIA GÉNOV PODIEĽAJÚCICH SA NA EXPORTE A METABOLIZÁCII cAMP PRI SRDCOVOM ZLYHÁVANÍ V MONOKROTALÍNOM INDUKOVANOM MODELI PĽÚCNEJ HYPERTENZIE
Lelková, K., Kmecová, Z., Vetešková, J., Veľasová, E., Bies Piváčková, L., Dóka, G., Křenek, P. *18*

INHIBÍCIA O-6-METYLGUANÍN-DNA METYLTRANSFERÁZY VEDIE K BUNKOVEJ SENESCENCII VASKULÁRNYCH HLADKOSVALOVÝCH BUNIEK CEZ MTORC1 SIGNÁLNU KASKÁDU
Púchovská, M., Vavrincová, D., Vavrinec, P. *25*

ÚLOHA BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZY V ETIOPATOGENÉZE OBEZITY
Hodbod, T., Szmicseková, K., Trojčáková, D., Dingová, D., Paul Hrabovská, A. *32*

ANALÝZA VPLYVU EDUKÁCIE NA VEDOMOSTI ADOLESCENTOV O LIEKOCH
Urbánková, J., Kuželová, M. *39*

Predslov

Vážený čitateľ,

recenzovaný zborník vedeckých prác mladých farmakológov je tradične venovaný dvom významným osobnostiam slovenskej farmakológie. Rád konštatujem, že mladí farmakológovia zaslali na publikovanie viacero zaujímavých rukopisov, ktorých prezentácie odzneli online na Dni mladých farmakológov SR XXVI (Memoriál prof. F. Šveca a prof. P. Šveca) dňa 11. 11. 2021. To naznačuje, že tradičný zborník Pokroky vo farmakológii v Slovenskej republike, ktorého 17. 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 farmakovigilancii a toxikovigilancii v prevencii a liečbe akútnych intoxikácií.

Všetky práce prešli prísnym recenzným konaním kolektívom recenzentov 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 lekárnickej komory. Prajem Vám príjemné čítanie a možno nájdete v nasledujúcich článkoch inšpiráciu aj pre vlastný výskum.

V Bratislave 30. 9. 2022

prof.. PharmDr. Ján Klimas, PhD., MPH
zostavovateľ

FARMAKOVIGILANCIA A TOXIKOVIGILANCIA V PREVENCII A LIEČBE AKÚTNYCH INTOXIKÁCIÍ

PHARMACOVIGILANCE AND TOXICOVIGILANCE IN THE PREVENTION AND TREATMENT OF ACUTE INTOXICATIONS

Cagáňová, B.

Národné toxikologické informačné centrum, Klinika pracovného lekárstva a toxikológie Univerzitnej nemocnice Bratislava a Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Slovenská republika

Abstrakt: Akútne intoxikácie patria medzi závažné stavy, ktoré bezprostredne ohrozujú zdravie a život postihnutého pacienta. Sú súčasťou preventabilnej morbidity a mortality. Analýza intoxikácií je dôležitým nástrojom na sledovanie toxických účinkov xenobiotík na ľudský organizmus. V procese identifikácie rizík zohrávajú dôležitú úlohu toxikologické centrá, pretože dokumentujú počet, priebeh a závažnosť intoxikácií v jednotlivých krajinách. Tieto údaje napomáhajú zhodnotiť jednotlivé xenobiotiká z hľadiska orgánovej toxicity, identifikovať rizikové faktory intoxikácie a zhodnotiť efektívnosť a bezpečnosť liečby. Najviac zdokumentovanými xenobiotikami sú liečivá, chemikálie a psychotropné látky. Informácie o bezpečnostnom profile xenobiotík, získané na základe farmakovigilancie a toxikovigilancie, majú veľký význam pre správny manažment intoxikovaného pacienta.

Summary: Acute intoxications are among the serious conditions that directly endanger health and life of the affected patients and are a part of preventable morbidity and mortality. The analysis of intoxications is an important tool for monitoring the toxic effects of xenobiotics on the human body. Poison centres play a key role in the process of identifying risks via documentation of number, course and severity of intoxications in individual countries. These data help to evaluate selected xenobiotics in terms of organ toxicity, identifying risk factors for intoxication, and evaluating the effectiveness and safety of treatment. The best documented xenobiotics are medicines, chemicals and psychotropic substances. Information about the safety profile of xenobiotics obtained on the basis of pharmacovigilance and toxicovigilance is of great importance for the proper management of an intoxicated patient.

Kľúčové slová: farmakovigilancia, toxikovigilancia, antipsychotiká, paracetamol, psychotropné látky, korozívne látky

Keywords: pharmacovigilance, toxicovigilance, antipsychotics, paracetamol, psychotropic substances, corrosive substances

ÚVOD

Akútna intoxikácia je náhle vzniknutý stav vyvolaný vstupom xenobiotika (cudzorodej látky) do živého organizmu. K poškodeniu zdravia dochádza rýchlo, v priebehu minút, či hodín od expozície, zvyčajne do 24 hodín. Je to závažný stav, ktorý môže bezprostredne ohroziť zdravie a život postihnutého pacienta. Príčiny intoxikácií sú rôzne. Najčastejšie je to náhoda alebo omyl, terapeutické pochybenie, samoliečiteľstvo, abúzus alebo suicidálny úmysel.

V ére medicíny založenej na dôkazoch získava farmakovigilancia a toxikovigilancia založená na veľkom počte prípadov intoxikácií registrovaných toxikologickými centrami čoraz väčší význam. Činnosť toxikologických informačných centier spočíva nielen v poskytovaní konzultácií pri akútnych intoxikáciách, ale aj v hodnotení bezpečnosti a rizika jednotlivých skupín xenobiotík a k odhaľovaniu rizikových faktorov, ktoré prispievajú k zhoršeniu prognózy intoxikácie. Na základe analýzy toxikologických konzultácií a lekárskych správ intoxikovaných pacientov tieto údaje ďalej spracovávajú. Na základe štatistického vyhodnotenia výsledkov vykonávajú potrebné preventívne opatrenia. Na prijímaní opatrení v oblasti toxikovigilancie a farmakovigilancie spolupracujú vzájomne mnohé inštitúcie a to na národnej ale aj medzinárodnej úrovni (1). Cieľom je znížiť počet a závažnosť akútnych intoxikácií v populácii, identifikovať zraniteľné skupiny pacientov, rizikové faktory intoxikácie, neobvyklé vzorce závislostí alebo neočakávané užitie xenobiotika.

TOXIKOVIGILANCIA A FARMAKOVIGILANCIA

Toxikovigilancia a farmakovigilancia sú činnosti podieľajúce sa na ochrane zdravia pacientov a verejného zdravia. Toxikovigilancia, dohľad nad bezpečnosťou xenobiotík, je podľa definície WHO aktívnym procesom identifikácie, sledovania a hodnotenia toxikologických rizík súvisiacich s expozíciou ľudského organizmu toxickým účinkom xenobiotík (2). Farmakovigilancia, dohľad nad bezpečnosťou liekov, je vedná oblasť a aktivity spojené s detekciou, posúdením, poznaním a prevenciou nežiaducich účinkov alebo iných liekových problémov (3).

Farmakovigilancia sa od toxikovigilancie odlišuje v niekoľkých aspektoch. Farmakovigilancia sleduje humánne lieky po ich uvedení na trh, zatiaľ čo toxikovigilancia zohľadňuje všetky látky (lieky, chemikálie, chemické prípravky, pesticídy, návykové látky atď.) bez ohľadu na to, či majú alebo nemajú povolenie na uvedenie na trh. Farmakovigilancia sleduje predovšetkým nežiaduce účinky alebo iné liekové problémy, zatiaľ čo toxikovigilancia sa týka toxických účinkov všetkých xenobiotík. Cieľom je znížiť výskyt intoxikácií identifikáciou nových toxikologických rizík (4, 5).

HODNOTENIE TOXIKOLOGICKÉHO RIZIKA NA ZÁKLADE ORGÁNOVEJ TOXICITY XENOBIOTÍK

Dôležitým nástrojom na monitorovanie bezpečnosti xenobiotík je skóre závažnosti intoxikácie (Poisoning severity score, PSS). PSS je päťbodová štandardizovaná stupnica, ktorá hodnotí intoxikácie na základe orgánovej toxicity. Umožňuje kvalitatívne vyhodnotenie chorobnosti spôsobenej intoxikáciou, lepšiu identifikácia skutočných rizík a porovnateľnosť údajov (Tabuľka 1). PSS sa využíva na hodnotenie akútnych intoxikácií bez ohľadu na typ a množstvo požitej noxy. Stupeň intoxikácie berie do úvahy celý klinický priebeh intoxikácie. PSS pomáha identifikovať látky, ktoré spôsobujú významnú chorobnosť a úmrtnosť alebo majú špecifické účinky

na cieľové orgány (predĺženie QT intervalu, hepatotoxicita, nefrotoxicita a iné). PSS bolo vypracované Európskou asociáciou toxikologických centier a klinických toxikológov v spolupráci s Medzinárodným programom pre chemickú bezpečnosť a Európskou komisiou (1, 6).

Tabuľka 1/Table 1
Stupne závažnosti intoxikácie/Poisoning severity score (6)

STUPEŇ 0	Asymptomatická intoxikácia: požitie toxickej látky bez subjektívnych alebo objektívnych prejavov
STUPEŇ 1	Mierna intoxikácia: mierne, krátkodobé a spontánne odznievajúce symptómy
STUPEŇ 2	Závažná intoxikácia: výrazné alebo dlhodobo pretrvávajúce symptómy
STUPEŇ 3	Ťažká intoxikácia: život ohrozujúce symptómy
STUPEŇ 4	Smrteľná intoxikácia

HODNOTENIE TOXIKOLOGICKÉHO RIZIKA NA ZÁKLADE KONCENTRÁCIE XENOBIOTIKA V KRVI

Znalosť sérovej koncentrácie požitej látky v mnohých prípadoch umožňuje lepšie predikovať závažnosť intoxikácie ako samotná informácia o požitom množstve. Stanovenie sérovej koncentrácie xenobiotika je obzvlášť dôležité pri liečivách s úzkou terapeutickou šírkou, teda pri látkach s malým rozdielom medzi terapeutickou a toxickou dávkou. Medzi takéto liečivá patria napríklad karbamazepín, lítium, teofylín, digoxín (7). U pacientov s nedostatočnou funkciou obličiek hrozí riziko kumulácie liečiva aj pri terapeutickom dávkovaní. Často ide o pacientov v staršom veku. Aby sa predišlo toxickému poškodeniu organizmu je stanovenie sérovej koncentrácie dôležité najmä pri liečivách, ktoré sa vylučujú obličkami (lítium, digoxín). K prípadom, kedy sa môžu prejaviť toxické účinky xenobiotika napriek terapeutickému dávkovaniu patria aj pacienti s genetickým polymorfizmom. Napríklad genetický polymorfizmus CYP2D6 ovplyvňuje biotransformáciu tramadolu, kodeínu, amitriptylínu, venlafaxínu, fluoxetínu a metamfetamínu a tým zvyšuje citlivosť voči ich toxickým účinkom (7, 8).

Na posúdenie závažnosti intoxikácie je dôležité poznať vzťah medzi sérovou koncentráciou a toxickými príznakmi predávkovania xenobiotikom. Na základe zdokumentovaných intoxikácií boli vypracované odporúčania o toxických sérových koncentráciách pre viac než 1100 xenobiotík. Tieto údaje boli vložené do toxikologických databáz a využívajú sa pri poskytovaní konzultácií pri akútnych intoxikáciách a pri liečbe intoxikovaných pacientov (7).

HODNOTENIE TOXIKOLOGICKÉHO RIZIKA NA ZÁKLADE POŽITEJ DÁVKY

Nie vždy je možné stanoviť sérovú koncentráciu xenobiotika, alebo táto koncentrácia nekoreluje so závažnosťou intoxikácie. V týchto prípadoch sa posudzuje toxikologické riziko podľa veľkosti požitej dávky. Na základe veľkého počtu zdokumentovaných prípadov intoxikácií v rámci farmakovigilancie a toxikovigilancie boli zozbierané údaje o potenciálnych toxických dávkach (minimálne toxické a maximálne tolerované dávky) a letálnych dávkach. Tieto údaje boli implementované do toxikologických databáz a v prípade liekov aj do súhrnu charakteristických vlastností

lieku (SmPC) a využívajú sa pri poskytovaní konzultácií pri akútnych intoxikáciách (9 – 11).

FARMAKOVIGILANCIA A ZNEUŽÍVANIE LIEKOV

Dextrometorfán (DXM) je syntetický opioid, ktorý je aktívnou zložkou mnohých liekov proti kašľu. Liečivo sa v tele metabolizuje na dextrofán, ktorý pôsobí ako antagonista N-metyl-D-aspartát (NMDA) receptorov. Vo vyšších dávkach látka pôsobí ako disociatívny halucinogén. Dextrometorfán podlieha polymorfnému metabolizmu CYP 2D6 čo môže viesť k veľkej interindividuálnej variabilite v odpovedi na jeho podanie. Pomalí metabolizátori majú vyššiu incidenciu nežiaducich účinkov a nižšiu tendenciu k abúzu DXM. Rýchli metabolizátori zažívajú viac euforických účinkov a je u nich vyššia pravdepodobnosť k abúzu DXM (12).

Dextrometorfán je rekreačnou drogou a je zneužívaný mladistvými najmä na Slovensku a v Čechách. Od roku 2008 bol zaznamenaný na Slovensku zvýšený výskyt predávkovania DXM v súvislosti s jeho rekreačným zneužívaním. Priemerný vek užívateľov bol 15 rokov. Častá bola kombinácia s alkoholom. Najčastejšie príznaky predávkovania boli tachykardia, hypertenzia, dvojité videnie, agitovanosť a eufória, tremor a kóma. Dvaja pacienti zomreli (13). Na základe zdokumentovaných prípadov zneužívania DXM Štátny ústav pre kontrolu liečiv v SR vydal rozhodnutie o zmene spôsobu výdaja liekov s obsahom dextrometorfánu a rozhodol o ich zatriedení do skupiny liekov, ktorých výdaj je viazaný na lekársky predpis. V dôsledku tohto opatrenia počet intoxikácií klesol, aj keď nevymizli úplne. V Európe podobné opatrenia doposiaľ prijali: Dánsko, Grécko, Maďarsko, Švédsko a Česko (12 – 14).

HODNOTENIE BEZPEČNOSTI ANTIPSYCHOTÍK PRI PREDÁVKOVANÍ

Stúpajúca preskripcia antipsychotík koreluje so zvýšeným počtom intoxikácií. Závažnosť klinických príznakov, ktoré intoxikácia týmito liečivami vyvoláva, často vyžaduje hospitalizáciu pacienta a prináša so sebou vážne zdravotné riziká. Atypické antipsychotiká celosvetovo vo veľkej miere nahradili klasické antipsychotiká, ktoré majú vyšší výskyt nežiaducich účinkov, najmä extrapyramídových. Spolu so zvyšujúcou sa preskripciou počet intoxikácií atypickými antipsychotikami každoročne stúpa (15, 16).

Výsledky viacerých štúdií zameraných na intoxikácie antipsychotikami poukazujú na to, že pri závažnom predávkovaní nie je významný rozdiel v bezpečnostnom profile medzi atypickými a klasickými antipsychotikami. Výhodou atypických antipsychotík je väčšia terapeutická šírka v porovnaní s klasickými, čo sa prejavuje v nižšej závažnosti náhodných otráv. Po užití vysokých dávok predstavujú porovnateľné riziko ako klasické antipsychotiká (16 – 18). Predávkovanie antipsychotikami je spojené s významným kardiovaskulárnym rizikom. V prípadoch závažnej kardiotoxicity spôsobenej intoxikáciou lipofilnými antipsychotikami možno zvážiť liečbu lipidovou emulziou. Úspešne bola použitá pri predávkovaní olanzapínom, kvetiapínom a haloperidolom (19, 20).

FARMAKOVIGILANCIA A BEZPEČNÉ UŽÍVANIE PARACETAMOLU

Od prvého opisu intoxikácie v roku 1966 sa morbidita a mortalita v dôsledku predávkovania paracetamolom postupne zvyšuje. Intoxikácie paracetamolom patria medzi najčastejšie liekové intoxikácie konzultované toxikologickými centrami v Európe.

Paracetamol (tiež acetaminofén, 4-hydroxyacetanilid, p-acetaminophenol) je jedno z najčastejšie používaných analgetík a antipyretík. Na Slovensku je dostupných viac než 50 liekov (jedno aj viaczložkových) s týmto liečivom. Väčšina z nich je dostupná bez lekárskeho predpisu a ich výdaj je viazaný len na lekáreň. Paracetamol patrí medzi liečivá najčastejšie zneužívané pri suicídiách. V rámci EÚ nie je dostupnosť liekov s obsahom paracetamolu jednotne regulovaná a je vymedzená len zákonmi jednotlivých členských štátov. Vyššia miera intoxikácií je pozorovaná v krajinách, kde je paracetamol dostupný aj mimo lekáreň, prostredníctvom nezdravotníckych predajcov (21).

V prvých hodinách po akútnom predávkovaní je plazmatická koncentrácia paracetamolu dôležitým prediktorom hepatotoxicity. Podľa Rumackovho-Mathewovho nomogramu používaného vo väčšine krajín Európy, je indikáciou liečby N-acetylcysteínom (NAC) plazmatická koncentrácia 150 $mg.l^{-1}$ (pri rizikových pacientoch 100 $mg.l^{-1}$) v 4. hodine od požitia (22, 23). Vyššiu mieru rizika vykazujú pacienti súbežne užívajúci induktory CYP2E1 (napríklad izoniazid, rifampicin, fenytoín, karbamazepín, ľubovník bodkovaný), trpiaci malnutríciou, osoby s poškodením pečene alebo abúzom alkoholu (10, 23).

Viaceré štúdie preukázali, že pacienti po prekonaní intoxikácie paracetamolom sa vo väčšine prípadov úplne zotavili, pokiaľ bola zahájená včasná liečba N-acetylcysteínom (NAC). Fatálne intoxikácie boli zaznamenané najmä u pacientov, ktorí prišli do nemocnice neskoro, po viac ako 20 hodinách od intoxikácie (9, 10, 23, 24). Liečba antidotom NAC nie je nevyhnutná u pacientov s plazmatickou koncentráciou paracetamolu $\leq$ 150 $mg.l^{-1}$ pri absencii rizikových faktorov, kvôli veľmi nízkemu riziku hepatotoxicity na jednej strane a možnými vedľajšími účinkami NAC na strane druhej (23, 24).

Napriek tomu, že bolo analyzovaných množstvo intoxikácií mnohé otázky zostávajú nezodpovedané. Stále sa hľadá optimálna liečba pacientov, ktorí dlhodobo užívali supraterapeutické dávky paracetamolu, alebo ktorí boli predávkovaní liekovými formami s riadeným uvoľňovaním.

TOXIKOVIGILANCIA KOROZÍVNYCH LÁTOK

Riziko mortality pri akútnych intoxikáciách korozívnymi látkami je stále veľmi vysoké. Chemikálie a chemické výrobky, ktoré sa bežne vyskytujú v domácnostiach sú príčinou mnohých náhodných alebo úmyselných intoxikácií a sú pozorované u pacientov rôznych vekových kategórií. Korozívny potenciál majú nielen kyseliny a alkálie ale aj kvartérne amóniové zlúčeniny, manganistan draselný, dezinficienciá a bielidlá s obsahom chlórnanu sodného, niektoré herbicídy (napríklad glyfosát) a mnohé iné bežne dostupné látky. Intoxikácie korozívnymi látkami vyvolávajú u pacientov početné a závažné post korozívne komplikácie horného gastrointestinálneho traktu (GIT) a môžu tiež spôsobiť poškodenie respiračného systému. Medzi najčastejšie GIT komplikácie patrí krvácanie z tráviaceho traktu, perforácia, peritonitída a tvorba striktúr (25, 26).

Rozsah poškodenia po expozícii korozívnym látkam často nie je možné predvídať. Okrem hodnoty pH je potrebné brať do úvahy aj ďalšie faktory ako je množstvo, koncentrácia a viskozita požitej látky, dĺžka kontaktu s tkanivom, fyzikálna forma/skupenstvo, prítomnosť potravy v tráviacom trakte ale aj predchádzajúci stav sliznice GIT (9, 25). Medzi najdôležitejšie prediktory systémových komplikácií a rizikové faktory mortality po požití korozívnej látky patria: suicidálny úmysel, stupeň IIIb korozívneho poškodenia, požitie silnej kyseliny, najmä kyseliny chlorovodíkovej a vek nad 55 rokov (27).

Vek je jedným z významných rizikových faktorov mortality po požití korozívnych látok (28, 29). Starší pacienti (≥ 60 rokov) majú dvojnásobne vyššie riziko výskytu život ohrozujúcich komplikácií po požití korozívnych látok ako mladší dospelí (< 60 rokov). Signifikantne častejšie sa vyskytuje respiračné zlyhanie (s nutnosťou umelej pľúcnej ventilácie) a aspiračná pneumónia. Respiračné komplikácie významne korelujú so zvýšenou mierou úmrtnosti. U starších pacientov je aj významne dlhšia priemerná dĺžka hospitalizácie a častejšie použitie ATB liečby. Najvyšší výskyt komplikácií je pozorovaný u pacientov po požití kyseliny chlorovodíkovej (29).

ZÁVER

V Európskej únii je kladený veľký dôraz na monitorovanie bezpečnosti liekov a ostatných xenobiotík. Cieľom je zabezpečiť vysokú úroveň ochrany zdravia európskej populácie. Medzinárodná spolupráca v oblasti farmakovigilancie a toxikovigilancie je nevyhnutná. Štatistiky intoxikácií sú dôležitým nástrojom na sledovanie toxických účinkov xenobiotík na ľudský organizmus. Tieto údaje nie je možné získať v klinických štúdiách ani v pokusoch na zvieratách. Zber a spracovanie týchto údajov na medzinárodnej úrovni sú harmonizované. Významnú úlohu pri hodnotení bezpečnostného profilu xenobiotík majú klinickí farmaceuti, ktorí pomáhajú identifikovať príčinné súvislosti medzi patologickými stavmi a dokumentovanými toxickými expozíciami.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. World Health Organization: Guidelines for establishing a poison centre. Geneva : World Health Organization, 2020. 188 s.
2. World Health Organization: Toxicovigilance [online]. Dostupné na: https://www.who.int/publications/m/item/toxicovigilance. Updated 2020-04-23 [cit. 2021-11-03].
3. World Health Organization: Pharmacovigilance [online]. Dostupné na: https://www.who.int/teams/regulation-prequalification/regulation-and-safety/pharmacovigilance. Updated 2021-04-03 [cit. 2021-04-15].
4. European Medicines Agency: Guidelines on good pharmacovigilance practices [online]. Dostupné na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/guidelines-good-pharmacovigilance-practices-gvp-introductory-cover-note-last-updated-revision-3_en-0.pdf . Updated 2021-02-03 [cit. 2021-04-15].
5. Descotes J, Testud F: Toxicovigilance: a new approach for the hazard identification and risk assessment of toxicants in human beings. Toxicol Appl Pharmacol 207, s. 599 – 603, 2005
6. Persson HE, Sjöberg GK, Haines JA, Pronczuk de Garbino J: Poisoning Severity Score. Grading of Acute Poisoning. Clin Toxicol 36, s. 205 – 213, 1998
7. Schulz M, Schmoldt A, Andresen-Streichert H: Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 1100 drugs and other xenobiotics. Crit Care 24, s. 195 – 199, 2020
8. Haufroid V, Hantson P: CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants. Clin Toxicol 53, s. 501 – 510, 2015
9. Toxbase – National Poisons Information Service [online databáza]. Edinburgh, UK, ©2021. Dostupné na: www.toxbase.org . Updated 2021-04-03 [cit. 2021-04-21].
10. Poisindex, Micromedex Healthcare Series [databáza]. Greenwood Village, CO, USA, Volume 178, ©2021

11. United Nations. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). 6. vyd. New York and Geneva : United Nations, 2015. 521 s.
12. Silva AR, Dinis-Oliveira RJ: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dextromethorphan: clinical and forensic aspects. Drug Metabolism Reviews 52, s. 258 – 282, 2020
13. Cagáňová B, Plačková S, Bátora I: Fatalities related to dextromethorphan abuse. Clin Toxicol 56, s. 466 – 467, 2018
14. Lacinova E, Hlusicka J, Neuschlova L, Lischkova L, Zakharov S: Dangerous experiments with drugs against dry cough. Clin Toxicol 56, s. 453 – 608, 2018
15. Roberts R, Neasham A, Lambrinudi C, Khan A: A quantitative analysis of antipsychotic prescribing trends for the treatment of schizophrenia in England and Wales. JRSM 9, s. 208 – 214, 2018
16. Berling I, Gupta R, Bjorksten C, Prior F, Whyte IM: Cardiac arrhythmia deaths associated with inpatient psychiatric admission and antipsychotic medication. Clin Toxicol 58, s. 505 – 652, 2020
17. Berling I, Buckley NA, Isbister GK: The antipsychotic story: changes in prescriptions and overdose without better safety. Br J Clin Pharmacol 82, s. 249 – 254, 2016
18. Cagáňová B, Plačková S, Kresánek J, Ondriašová E, Luptáková N: Safety of antipsychotic drugs: a 16 year review. Clin Toxicol 54, s. 443 – 444, 2016
19. Plačková S, Cagáňová B: Intravenózna lipidová emulzia. In Šagát T, zost. Pediatria. Bratislava : Herba, 2019. 1499 s.
20. Bartos M, Knudsen K: Use of intravenous lipid emulsion in the resuscitation of a patient with cardiovascular collapse after a severe overdose of quetiapine. Clin Toxicol 51, s. 501 – 504, 2013
21. Morthorst BR, Erlangsen A, Nordentoft M, Hawton K, Hoegberg LCG, Dalhoff KP: Availability of Paracetamol Sold Over the Counter in Europe: A Descriptive Cross-Sectional International Survey of Pack Size Restriction. Basic Clin Pharmacol Toxicol 122, s. 643 – 649, 2018
22. Rumack BH: Acetaminophen misconceptions. Hepatology 40, s. 10 – 15, 2004
23. Bateman DN, Dear JW: Acetylcysteine in paracetamol poisoning: a perspective of 45 years of use. Toxicol Res 8, s. 489 – 498, 2019
24. Urban M, Cagáňová B, Plačková S, Kurcová I, Pelclova D: Paracetamol poisonings in the Czech and Slovak Republic and N-acetylcysteine treatment. Data analysis. Neuro Endocrinol Lett 35, s. 180 – 185, 2014
25. Chibishev A, Simonovska N, Bozinovska C, Pereska Z, Smokovski I, Glasnovic M: Respiratory Complication from Acute Corrosive Poisonings in Adults. Mater Sociomed 26, s. 80 – 83, 2014
26. Kluger Y, Ishay OB, Sartelli M, Katz A, Ansaloni L, Gomez CA, Biffl W, Catena F, Fraga GP, Di Saverio S, Goran A, Ghnnam W, Kashuk J, Leppäniemi A, Marwah S, Moore EE, Bala M, Massalou D, Mircea C, Bonavina L: Caustic ingestion management: World society of emergency surgery preliminary survey of expert opinion. World J Emerg Surg 48, s. 630 – 641, 2015
27. Caganova B, Foltanova T, Plackova S, Placha K, Bibza J, Puchon E, Ondriasova E, Batorta I: Caustic effects of chemicals: risk factors for complications and mortality in acute poisonings. Monatsh Chem 148, s. 497–503, 2017
28. Chibishev A, Glasnovic M, Miletic M, Smokovski I, Chitkushev L: Influence of Age on the Survival and Mortality Rate in Acute Caustic Poisonings. Mater Sociomed 26, s. 272 – 276, 2014

29. Caganova B, Foltanova T, Puchon E, Ondriasova E, Plackova S, Fazekas T, Kuzelova M: Caustic ingestion in the elderly: influence of age on clinical outcome. Molecules 22, s. 1726 – 1737, 2017

ÚČINOK PIOGLITAZÓNU NA FUNKCIU ENDOTELU U POTKANOV S EXPERIMENTÁLNYM DIABETOM MELLITUS

EFFECT OF PIOGLITAZONE ON ENDOTHELIAL FUNCTION IN RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Čináková, A., Guteková, K., Kráľová, E., Křenek, P.

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

Abstrakt: Hyperglykémia je jedným z hlavných faktorov, ktoré prispievajú k vzniku endotelovej dysfunkcie (ED) a následným diabetickým kardiovaskulárnym komplikáciám. Významným prejavom ED je znížená dostupnosť oxidu dusnatého (NO) a zvýšená syntéza endotelínu-1 (ET1), čím je obmedzená schopnosť vazodilatácie cievy. Cieľom práce bolo sledovať a zistiť, do akej miery ovplyvňuje pioglitazón (PIO) vaskulárnu reaktibillitu izolovanej aorty u potkanov s experimentálnym diabetom mellitus typu 1 (DM1T) a zároveň stanoviť v aorte expresiu endotelovej syntázy oxidu dusnatého (eNOS) a ET1. Na experiment boli použité trojmesačné samce potkanov kmeňa Wistar, ktorým bol vyvolaný diabetes mellitus podaním streptozotocínu 55 mg/kg i. p., kontrolným zvieratám (n = 10) bol aplikovaný citrátový tlmivý roztok. PIO (12 mg/kg, n = 10) bol podávaný diabetickým zvieratám vo forme krmiva po dobu 6 týždňov. Kontrolnej skupine a skupine s neliečeným diabetes mellitus (DM, n = 10) bolo podávané štandardné krmivo. Na experiment boli použité prstence torakálnej časti izolovanej aorty umiestnené do živného roztoku, v ktorom bola pozorovaná jej reaktivita po pridaní vazodilatačných látok (acetylcholín = ACH, nitroprusid sodný = NPS). Expresia génov eNOS a ET1 v aorte bola stanovená pomocou kvantitatívnej polymerázovej reakcie v reálnom čase. PIO signifikantne zlepšil relaxačnú odpoveď ciev navodenenej s ACH oproti neliečeným potkanom, po NPS bol pozorovaný iba trend k zníženiu. Expresia eNOS bola s PIO oproti DM skupine významne zvýšená, naopak, expresia génov pre ET1 bola signifikantne znížená. 6-týždňové podávanie PIO pozitívne ovplyvňuje reaktibilitu ciev, obnovuje rovnováhu medzi vazoaktívnym NO a ET1, čím prispieva k zmierneniu ED.

Summary: Hyperglycemia is one of the main factors contributing to endothelial dysfunction (ED) and subsequent diabetic cardiovascular complications. A significant manifestation of ED is reduced availability of nitric oxide (NO) and increased endothelin-1 (ET1) synthesis, which is associated with limited ability of

vasodilatation. The aim of the study was to observe and determine the effect of pioglitazone (PIO) on vascular reactivity of the isolated aorta of rats with experimental diabetes mellitus type 1 (DM1T). To determine the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and ET1 in rat aorta. Three-month-old male Wistar rats were used for the experiment. Diabetes mellitus was induced by streptozotocin 55 mg/kg i.p. The healthy control animals were treated with citrate buffer. Diabetic animals were fed with PIO (12 mg/kg, n = 10, rat chow) for 6 weeks. The control group and untreated diabetes mellitus group (DM, n = 10) were fed with standard chow. Rings of the thoracic part of the isolated aorta were used for the experiment. These were placed in a nutrient solution, where their reactivity was observed after the addition of vasodilators (acetylcholine = ACH, sodium nitroprusside = NPS). The expression of eNOS and ET1 genes was determined by a Real-Time quantitative polymerase chain reaction in the rat aorta. PIO significantly improved vascular relaxation response induced by ACH compared to untreated rats, only a decreasing trend was observed after NPS. Gene expression of eNOS was significantly increased with PIO in compare to the DM group, on the other hand, mRNA expression of ET1 was significantly decreased. 6-week administration of PIO positively affects vascular reactivity, and restores the balance between vasoactive NO and ET1, which contributes to the alleviation of ED.

Kľúčové slová: endotelová dysfunkcia, potkan, pioglitazón, diabetes mellitus typu 1, izolovaná aorta
Keywords: endothelial dysfunction, rat, pioglitazone, type 1 diabetes mellitus, isolated aorta

ÚVOD

Endotel tvorí vnútornú výstelku ciev a vytvára transportnú bariéru pre látky, ktoré sa nachádzajú v krvi. Jeho bunky aktívne a dynamicky participujú pri hemokoagulácii, zápalovom procese, ovplyvňujú rast buniek cievnej steny, zohrávajú dôležitú úlohu pri metabolizme glukózy a lipidov a syntetizujú vazoaktívne látky, ktorými modulujú cievny tonus (1). Oxid dusnatý (NO) je najvýznamnejší vazodilatátor hladkého svalstva ciev v endoteli, okrem toho má aj významný vazoprotektívny charakter. V cievach je primárne tvorený endotelovou syntázou NO (eNOS) z aminokyseliny L-arginín. Endotelín-1 je produkovaný primárne v endoteli a predstavuje prirodzenú protiváhu vazotilatačnému NO. Pôsobí prostredníctvom endotelínových receptorov typu A a B. Pri zvýšenej expresii má v cievach prozápalové a profibrotické vlastnosti (2).

Ak je endotel dlhodobo vystavený v dôsledku ochorenia diabetes mellitus (DM) hyperglykemickému prostrediu, dochádza k jeho poškodeniu a vzniku endotelovej dysfunkcie (ED), ktorá je počiatkom kardiovaskulárnych komplikácií ochorenia DM. ED sa primárne vyznačuje zníženou dostupnosťou NO, zvýšenou expresiou endotelínu a ďalších vazokonstrikčných látok, a tým zníženou schopnosťou endotelom navodenej vazodilatácie, tiež hemodynamickou deregulaciou, zhoršenou fibrinolýzou, nadprodukciou rastových faktorov, zvýšenou expresiou adhéznych molekúl a prozápalových génov, nadmernou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka, oxidačným stresom a zvýšenou cievnou permeabilitou (3).

Pioglitazón (PIO) je agonistom jadrových PPARγ receptorov, čím zasahuje do regulácie génov zodpovedných za metabolizmus lipidov a glukózy a zvyšuje citlivosť na prítomný inzulín. V praxi je používaný na terapiu DM typu 2 (DM2). U pacientov s týmto typom diabetu bol však preukázaný aj jeho významný vaskuloprotektívny charakter. Pozitívne ovplyvňoval expresiu eNOS a jeho antioxidačné a antiflogistické pôsobenie v cievach sa prejavilo už v subterapeutických dávkach (4). Štúdia Bhat R a kol. (5) preukázala význam PIO v podpornej terapii DM typu1 (DM1T). Po šiestich mesiacoch užívania tohto liečiva pri súčasnom užívaní inzulínu preukázal PIO oproti placebu u postpubertálnych pacientov s DM1T signifikantné zlepšenie postprandiálnych hladín glukózy v plazme. Pozorované bolo tiež významné zlepšenie hodnôt glykovaného hemoglobínu bez zmeny hmotnosti, či zmeny dávkovania inzulínu. Z toho dôvodu sme v našom experimente sledovali, do akej miery má PIO schopnosť spomaliť vznik a progresiu ED pri experimentálnom DM typu 1.

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 diabetické boli považované zvieratá s hladinou glukózy nad 12 mmol/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 boli zvieratá utratené a následne bola vyizolovaná aorta. 3 mm prstence vypreparovanej aorty boli umiestnené do živného roztoku, kde bola hodnotená ich vazoreaktivita. Relaxácia ciev závislá od endotelu bola hodnotená pri kumulatívnom pridávaní acetylcholínu (ACH; 10^{-9} mol/l – 10^{-5} mol/l). Relaxácii predchádzala kontrakcia vyvolaná jednorazovým podaním fenylefrínu (FE; 10^{-5} mol/l). Po premývaní bola sledovaná vazoreaktivita nezávislá od endotelu. K aortálnym prúžkom prekontrahovaným s FE (10^{-5} mol/l) bol v prostredí L-NAME (L-NG-Nitroarginín metyl ester, inhibítor eNOS) pridávaný nitroprusid sodný vo vzrastajúcej koncentrácii (NPS; 10^{-9} mol/l – 10^{-5} mol/l).

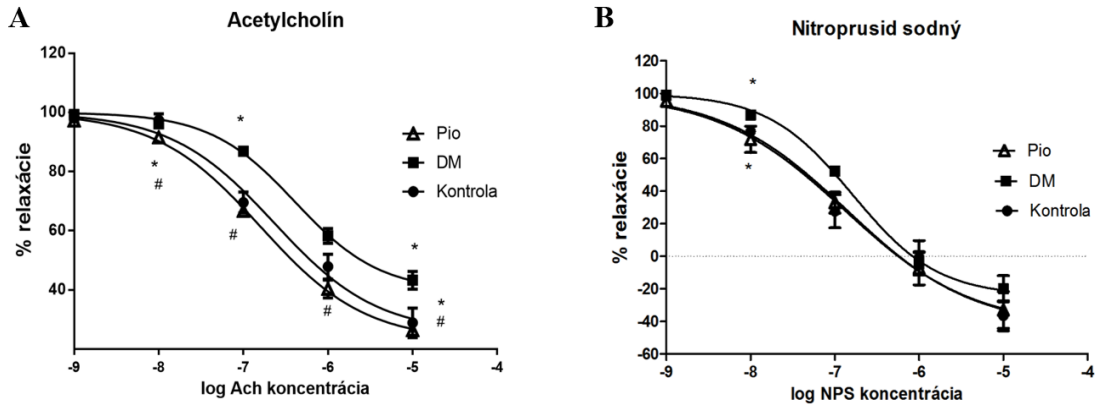
Na stanovenie génovej expresie pre eNOS a ET1 v aorte bola použitá metóda RT-PCR. Mieru génovej expresie sme vyjadrili pomerom CT hodnôt génu a endogénneho referenčného génu beta-2-mikroglobulínu (B2m). Sekvencia primerov bola nasledovná (5'-, 3'-): eNOS – *Forward*: GGGTGATGAGCTCTGCGGCC, *Reverse*: TGGCGTTTCCAGCTGCGCTT; ET1 – *Forward:* AACTCCGAGCCCAAAGTACC *Reverse*: CTTGATGCTGTTGCTGATGG, B2m – *Forward*: ATGGAGCTCTGAATCATCTGG, *Reverse:* AGAAGATGGTGTGCTCATTGC.
Výsledky sme vyjadrili ako aritmetický priemer ± stredná chyba priemeru (SEM). Pre posúdenie štatistickej významnosti vplyvu skúmaných faktorov sme použili ANOVA test s následným LSD post hoc testom. Relaxačné a kontrakčné odpovede artérií sú zobrazené ako % pre-konstrikcie alebo % základných hodnôt či hodnôt KCl. Hodnoty Emax boli počítané pomocou PC a softwaru Graph Pad Prism. Hodnoty sme považovali za štatisticky významné, ak $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Výsledky reaktibility izolovanej aorty preukázali výrazne zvýšenú citlivosť na FE v DM skupine, v skupine PIO bol zaznamenaný signifikantný pokles kontraktilnej odpovede oproti DM aj kontrolnej skupine. Aplikácia ACH kontrolnej skupine vo vzrastajúcej koncentrácii (10^{-9} – 10^{-5} mol/l) indukovala koncentračne závislú relaxáciu aorty (Emax: 74,61 ± 8,81 %). V DM skupine bola relaxačná odpoveď signifikantne zhoršená ($p < 0,05$, Emax: 60,52 ± 2,14 %). Významná relaxačná odpoveď na podaný ACH nastala až pri koncentráciách 10^{-6} a 10^{-5}mol/l, avšak k úplnej relaxácii nedošlo ani pri najvyššej koncentrácii ACH. V skupine PIO bola relaxačná odpoveď signifikantne zlepšená oproti DM zvieratám ($p < 0,05$, Emax: 77,31 ± 2,19 %), pričom bola významná reakcia ciev zaznamenaná už pri koncentráciách 10^{-8} – 10^{-5} mol/l ($p < 0,05$) (Obrázok 1A).

Aplikácia NPS (10^{-9} – 10^{-5} mol/l) vyvolala v kontrolnej skupine koncentračne závislú relaxáciu aorty nezávislú od endotelu, pričom maximálna odozva dosahovala hodnotu 143,64 ± 8,88 %. V DM skupine bola sledovaná významne zhoršená vazodilatácia v porovnaní s kontrolnou skupinou (Emax: 124,46 ± 3,78 %). V skupine PIO sme zaznamenali iba klesajúci trend relaxačnej vaskulárnej odpovede oproti DM zvieratám (Emax: 143,17 ± 6,09 %) (Obrázok 1B).

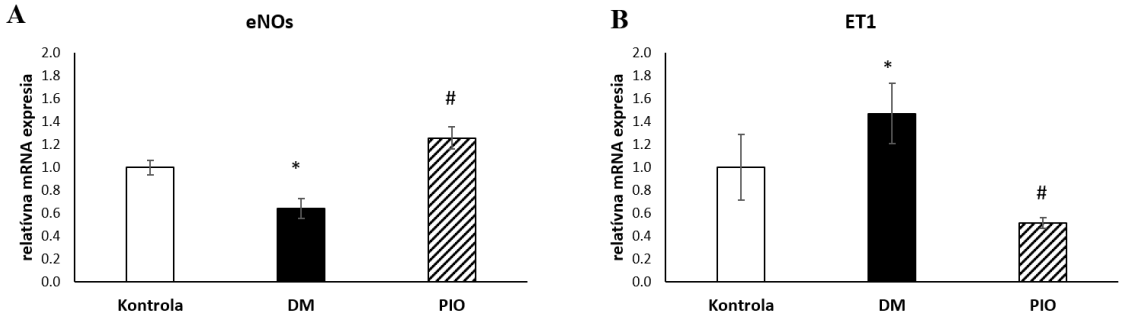
Nerovnováha medzi vazodilatačnými a vazokonstrikčnými faktormi prispieva k vzniku ED. Expresia génov eNOS a ET1 v torakálnej aorte je znázornená na obrázku 2. Pri DM zvieratách bola expresia eNOS oproti kontrole signifikantne znížená. V PIO skupine bola pozorovaná signifikantne zvýšená génová expresia tohto enzýmu oproti DM skupine ($p < 0,05$) (Obrázok 2A). Naopak, expresia génu pre vazostrikčný ET1 bola v prípade neliečených zvierat oproti kontrole signifikantne zvýšená a terapia s PIO priniesla jej významné zníženie oproti DM skupine ($p < 0,05$) (Obrázok 2B).



Obrázok 1/Figure 1

Reakcia prúžkov aorty na podaný acetylcholín (ACH; 10^{-9} – 10^{-5} mol/l) (A) a nitroprusid sodný (NPS; 10^{-9} – 10^{-5} mol/l) (B) u kontrolných, diabetických neliečených (DM) a diabetických potkanov liečených pioglitazónom (PIO). Namerané hodnoty sú vyjadrené percentuálne ako priemer ± SEM. *$p < 0,05$ vs kontrola, #$p < 0,05$ vs. DM.

Reaction of aortic rings to administered acytylcholine (ACH; 10^{-9} – 10^{-5} mol/l) (A) and sodium nitroprusside (NPS; 10^{-9} – 10^{-5} mol/l) (B) in the control group, the diabetic untreated group (DM) and diabetic rats treated with pioglitazone (PIO). Measured values are expressed in % as mean ± SEM. *$p < 0,05$ vs control group, #$p < 0,05$ vs. DM.



Obrázok 2/Figure 2
Expresia mRNA endotelovej NO syntázy (eNOS) (A) a endotelínu (ET1) (B) v aorte u kontrolných, diabetických neliečených (DM) a diabetických potkanov liečených pioglitazónom (PIO). Namerané hodnoty sú vyjadrené percentuálne ako priemer ± SEM. *p < 0,05 vs kontrola, #p < 0,05 vs. DM.
Expression of endothelial NO synthase (eNOS) mRNA (A) and endothelin (ET1) mRNA (B) in rat aorta in control group, diebatic untreated group (DM) and diabetic rats treated with pioglitazone (PIO). Measured values are expressed in % as mean ± SEM. *p < 0,05 vs control group, #p < 0,05 vs. DM.

DISKUSIA A ZÁVER

Ochorenie DM je sprevádzané niekoľkonásobne zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom, ktoré je spájané s nepriaznivým účinkom hyperglykémie, s oxidačným stresom a pridruženou ED. Pri ED strácajú cievy svoje fyziologické vlastnosti, pričom je pozorovaný výrazný pokles schopnosti vazodilatácie ciev (6).
Cieľom tejto práce bolo sledovať, do akej miery môže spomaliť vznik a progres ED antidiabetikum PIO pri experimentálnom DM1T, pričom sme sa zamerali na sledovanie vazoreaktivity a expresie vazoaktívnych faktorov.

Od endotelu závislú vazodilatáciu sme sledovali použitím ACH, kedy reagovali cievy neliečených diabetických potkanov výrazne zhoršenou vazodilatáciou v porovnaní s cievami kontrolnej skupiny. PIO však priniesol signifikantné zlepšenie reaktibility ciev. Obdobné výsledky boli sledované v štúdii Majithiya J a kol. (7), kedy boli preukázané priaznivé účinky tohto liečiva na prúžkoch aorty na streptozotocínovom modeli. Zlepšená reaktibilita na prítomné vazodilatanciá bola spájaná so signifikantne zredukovaným oxidačným stresom a zvýšenou dostupnosťou NO.

Zhoršená od endotelu nezávislá vazodilatácia bola preukázaná v aorte diabetických potkanov (8) aj u diabetických pacientov (9). Terapia s PIO nepriniesla v našom experimente pri vazodilatácii navodenej s NPS signifikantné zlepšenie reaktibility ciev. Naše zistenia boli v súlade s výsledkami štúdie Kunasegaran T a kol. (4), kde prúžky aorty potkanov streptozotocínového modelu reagovali na podaný NPS len miernou vazodilatáciou. Usudzujeme, že PIO má len slabú schopnosť ovplyvniť vazodilatáciu nezávislú od endotelu, teda navodenú donorom NO. Jeho účinok v ovplyvnení ED sa pravdepodobne zakladá predovšetkým na uvoľňovaní NO v závislosti od endotelu, ako sme mohli pozorovať pri ACH, a nie v zmene citlivosti efektorových buniek na NO.

Nerovnováha medzi vazokonstrikčnými a vazodilatačnými látkami produkovanými endotelom významne prispieva k vzniku a progresii ED. V hyperglykemickom organizme dochádza k zvýšenej tvorbe ROS, ktoré sa významne podieľajú na zníženej biodostupnosti NO (10). Okrem toho ROS vykazujú schopnosť stimulovať syntézu a uvoľňovanie vazokonstrikčných látok, ktoré vedú v konečnom dôsledku k vaskulárnej prestavbe a zvýšenej citlivosti na vazokonstrikčné látky (8). Aktivácia PPARγ receptorov vedie k zvýšeniu expresie eNOS, čoho dôsledkom je zvýšená biodostupnosť vaskulárneho NO

(11). Tieto zistenia sú v súlade s našimi výsledkami, kedy dochádzalo u zvierat, ktoré podstúpili terapiu s PIO, k signifikantne zvýšenej expresii eNOS a tým zvýšenej dostupnosti NO a zároveň zníženej expresii vazokonstrikčného ET1. Viaceré štúdie tiež preukázali, že k zvýšenej biodostupnosti NO môže PIO prispievať prostredníctvom antioxidačného účinku (7, 12).

Nomura H a kol. (13) uvádza, že za zlepšenie vazodilatácie pri liečbe s PIO môže byť zodpovedný aj mechanizmus nezávislý od PPARγ receptorov, a síce vazodilatácia navodená otváraním hladkosvalových K_v a K_{IR} (inward rectifying K^+) draslíkových kanálov. Zmiernenie zápalu na endoteli predstavuje ďalší mechanizmus, ako PIO ovplyvňuje ED. Heliövaara MK a kol. (14) vo svojej štúdii preukázali, že toto liečivo má priamy vplyv na zníženie hladiny prozápalových markerov. Okrem toho inhibuje aj proliferáciu a migráciu hladkosvalových buniek, čím zabraňuje ďalšiemu rozvoju aterosklerotického plátu a po ruptúre plátu zas znižuje riziko trombózy (15).

Náš experiment preukázal, že terapia s PIO viedla k zlepšeniu reaktibility endotelu u potkanov s experimentálnym DM1T a chránila ho pred ďalším poškodením. V dôsledku liečby sa zvýšila expresia eNOS. Tým sa zvýšila produkcia vazodilatačného a vazoprotektívneho NO. Zároveň došlo k zníženej expresii prozápalového a profibrotického ET1. Preto môžeme konštatovať, že liečba s antidiabetikom PIO výrazne prispela k obnoveniu rovnováhy medzi týmito 2 vazoaktívnymi faktormi u zvierat s DM1T.

Poďakovanie:
Táto práca vznikla s podporou grantu VEGA SR 1/0004/18.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Rokyta R: Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi. Praha : Grada, 2015.
2. Sandoo A, Veldhuijzen van Zanten JJCS, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD: The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. Open Cardiovasc Med J 4, s. 302 – 12
3. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J: Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. Vasc Health Risk Manag 3, s. 183 – 98, 2005
4. Kunasegaran T, Mustafa MR, Achike FI, Murugan DD: Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats. Eur J Pharmacol 799, s. 160 – 70, 2017
5. Bhat R, Bhansali A, Bhadada S, Sialy R: Effect of pioglitazone therapy in lean type1 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract 78, s. 349 – 54, 2007
6. Avogaro A, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg S, Fadini GP: Endothelial Dysfunction in Diabetes. Diabetes Care 34, Supplement 2, s. 285 – 90, 2011
7. Majithiya J, Paramar A, Balaraman R: Pioglitazone, a PPARgamma agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. Cardiovasc Res 66, s. 150 – 61, 2005
8. Yakubu MA, Sofola OA, Igbo I, Oyekan AO: Impaired endothelium-dependent and -independent relaxation of aorta from diabetic rats. Bratisl Lek Listy 113, s. 59 – 63, 2012
9. Okon EB, Chung AWY, Rauniyar P, Padilla E, Tejerina T, McManus BM et al.: Compromised Arterial Function in Human Type 2 Diabetic Patients. Diabetes 54, s. 2415 – 23, 2005

10. Basha B, Samuel SM, Triggle CR, Ding H: Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus: Possible Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress? Exp Diabetes Res 2012, s. 1 – 14, 2012
11. Balakumar P, Kathuria S: Submaximal PPARγ activation and endothelial dysfunction: new perspectives for the management of cardiovascular disorders: Regulatory role of PPARγ on endothelial function. Br J Pharmacol 166, s. 1981 – 92, 2012
12. Huang P-H, Sata M, Nishimatsu H, Sumi M, Hirata Y, Nagai R: Pioglitazone ameliorates endothelial dysfunction and restores ischemia-induced angiogenesis in diabetic mice. Biomed Pharmacother 62, s. 46 – 52, 2008
13. Nomura H, Yamawaki H, Mukohda M, Okada M, Hara Y: Mechanisms Underlying Pioglitazone-Mediated Relaxation in Isolated Blood Vessel. J Pharmacol Sci 108, s. 258 – 65, 2008
14. Heliövaara MK, Herz M, Teppo AM, Leinonen E, Ebeling P: Pioglitazone has anti-inflammatory effects in patients with Type 2 diabetes. J Endocrinol Invest 30, s. 292 – 7, 2007
15. Carrillo-Jimenez R, Lamas GA, Hennekens CH: Thiazolidinediones Could Improve Endothelial Dysfunction and Risk of Premature Coronary Heart Disease in HIV-Infected Patients. J Cardiovasc Pharmacol Ther 7, s. 207 – 10, 2002

RELATÍVNA EXPRESIA GÉNOV PODIEĽAJÚCICH SA NA EXPORTE A METABOLIZÁCII cAMP PRI SRDCOVOM ZLYHÁVANÍ V MONOKROTALÍNOM INDUKOVANOM MODELI PĽÚCNEJ HYPERTENZIE

RELATIVE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN THE EXPORT AND METABOLIZATION OF cAMP IN HEART FAILURE IN MONOCROTALINE-INDUCED MODEL OF PULMONARY HYPERTENSION

Lelková, K., Kmecová, Z., Vetešková, J., Veľasová, E., Bies Piváčková, L., Dóka, G., Křenek, P.

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

Abstrakt:

Úvod: Nedávne štúdie poukazujú na kardioprotektívny efekt signalizačnej kaskády extracelulárneho cAMP (SC e-cAMP). Kontinuálna infúzia cAMP sprostredkovaná implantáciou mikroosmotickej pumpy inhibovala pľúcnu a srdcovú remodeláciu spojenú s pľúcnou hypertenziou (PH) v monokrotalínovom (MCT) modeli. Ciele práce: Stanovenie relatívnej expresie génov podieľajúcich sa na SC e-cAMP pri srdcovom zlyhávaní na u potkanov s MCT navodenou PH v rôznych štádiách ochorenia a na základe týchto zmien vytýčiť nový potenciálny terapeutický cieľ vhodný na ďalšie skúmanie. Metódy: 12-týždňovým samcom potkanov kmeňa Wistar bol subkutánne aplikovaný MCT (60 mg/kg) alebo vehikulum (CON). Relatívna expresia génov podieľajúcich sa na SC e-cAMP pri srdcovom zlyhaní (Abcc4, Enpp1, Nt5e, Adora1, Adora2a) bola stanovená metódou RT-qPCR jeden, dva, štyri týždne po aplikácii MCT a u predčasne utratených zvierat po akútnom zhoršení zdravotného stavu (~ 4 týždne po aplikácii MCT, ptMCT) v pravej (RV) a ľavej komore (LV). Výsledky: Štyri týždne po aplikácii MCT (MCT_{4T}) a v ptMCT, dochádza k zvyšovaniu miery hypertrofie RV. Taktiež v týchto štádiách dochádza k upregulácii Abcc4, Enpp1, Nt5e a Adora2a v RV ($p \leq 0,05$ vs. CON), zatiaľ čo expresia Adora1 ostáva nezmenená. V LV bolo pozorované signifikantné zvýšenie relatívnej expresie v prípade Enpp1 a Nt5e iba v ptMCT, pričom v prípade Enpp1 existuje signifikantný rozdiel v expresii medzi RV a LV. Záver: Na základe zvýšenej expresie génov podieľajúcich sa na SC e-cAMP primárne v RV v MCT_{4T} a v ptMCT môžeme predpokladať, že s progresiou ochorenia a so zvyšujúcou sa mierou hypertrofie RV dochádza k aktivácii tejto kaskády. S ohľadom na tieto výsledky a údaje z literatúry by adenozínový A_{2A} receptor mohol predstavovať nový terapeutický cieľ v terapii PH.

Summary:

Background: Recent studies evaluated the cardioprotective effect of the extracellular cAMP signalling cascade (e-cAMP SC). Continuous infusion of cAMP by a microosmotic pump inhibited pulmonary and cardiac remodelling associated with pulmonary hypertension (PH) in the monocrotaline (MCT) model. Aim: To determine the relative expression of genes involved in e-cAMP SC in heart failure

in rats with MCT-induced PH at different stages of the disease and, based on these changes, to identify a new potential therapeutic target. Methods: 12-weeks old male Wistar rats were subcutaneously injected with MCT (60 mg/kg) or vehicle (CON). The relative expression of genes involved in the e-cAMP SC in heart failure (Abcc4, Enpp1, Nt5e, Adora1, Adora2a) were determined by RT-qPCR in the first, second, and fourth week after MCT application and also in prematurely sacrificed animals after acute health deterioration (~ 4 weeks after application of MCT, ptMCT) in the right (RV) and left ventricle (LV). Results: Four weeks after MCT (MCT_{4T}) and in ptMCT, an increase in the rate of RV hypertrophy occurred. Abcc4, Enpp1, Nt5e and Adora2a are upregulated in the RV at these stages as well ($p \leq 0.05$ vs. CON), while Adora1 expression remains unchanged. In the LV, a significant increase in relative expression was observed for Enpp1 and Nt5e in ptMCT, with a significant difference in expression between RV and LV for Enpp1. Conclusion: Based on the increased expression of genes involved in the e-cAMP SC primarily in the RV in MCT_{4T} and in ptMCT, we can assume that this cascade is activated with the progression of the disease and the increasing degree of RV hypertrophy. Considering these results and data from the literature, the adenosine A_{2A} receptor could represent a new therapeutic target in PH.

Kľúčové slová: pľúcna hypertenzia, extracelulárne cAMP, srdcové zlyhávanie
Keywords: pulmonary hypertension, extracellular cAMP, heart failure

ÚVOD

Pľúcna hypertenzia PH je chronické, zriedkavé, progresívne prebiehajúce ochorenie postihujúce primárne pľúcne arterioly (1), ktoré sekundárne vedie ku kompenzačným zmenám v pravej komore, k jej hypertrofii a z dlhodobého hľadiska k pravostrannému srdcovému zlyhaniu (HF) (2).

Nedávne štúdie poukazujú na protektívnu úlohu extracelulárneho cAMP exportovaného zo srdcových myocytov v reakcii na srdcový stres, keďže intracelulárna tvorba cAMP predstavuje nielen mechanizmus zvyšovania srdcovej frekvencie, ale sekundárne je zodpovedná za progresiu (HF), hypertrofiu myokardu a fibrózu. Na základe výsledkov série experimentov sa predpokladá, že cAMP je exportovaný z kardiomyocytov pomocou Abcc4 transportéra. V extracelulárnom priestore je cAMP metabolizovaný prostredníctvom Enpp1 na AMP a prostredníctvom Nt5e na adenozín, ktorý sekundárne ovplyvňuje vývoj srdcovej hypertrofie a fibrózy tým, že aktivuje adenozínový A_1 receptor. Týmto inhibuje tvorbu intracelulárneho cAMP v kardiomyocytoch a súčasne dodáva antifibrotický signál do srdcových fibroblastov aktiváciou A_{2A} receptora (3).

Z experimentov vykonaných na *in vivo* modeli PH je známe, že kontinuálna infúzia cAMP sprostredkovaná implantáciou mikroosmotickej pumpy (tri týždne po aplikácii monokrotalínu – MCT, resp. vehikula) inhibovala pľúcnu a srdcovú remodeláciu spojenú s PH u týchto zvierat – čiastočne znižovala systolický tlak v pravej komore, Fultonov index a tlak v *a. pulmonalis* v porovnaní s neliečenou skupinou, čo potvrdzuje kardioprotektívny účinok tejto signalizačnej kaskády. Dlhodobé podávanie cAMP však môže mať škodlivé účinky na ostatné orgány (4) zvyšujúce z dlhodobého hľadiska riziko ich poškodenia a teda nepredstavuje perspektívny terapeutický cieľ. Na základe týchto dôvodov vyplýva potreba

identifikácie nového terapeutického cieľa, u ktorého by boli tieto nežiaduce účinky eliminované.

CIEĽ

Cieľom tohto projektu bolo stanoviť zmeny relatívnej expresie génov zodpovedných za export, metabolizáciu a sekundárne aj účinky cAMP v pravej a v ľavej komore v MCT-indukovanom modeli PH s progresiou ochorenia a zároveň na základe týchto výsledkov a údajov z literatúry vytýčiť nový potenciálny terapeutický cieľ vhodný na ďalšie skúmanie.

MATERIÁL A METÓDY

V rámci tohto experimentu boli použité vzorky tkanív z animálneho MCT-indukovaného modelu PH. Samce potkanov kmeňa Wistar (dodávateľ – UEFT SAV Dobrá Voda) vo veku 10 – 12 týždňov boli rozdelené do dvoch skupín, a to kontrolnú skupinu (CON) a skupinu s indukovanou PH. PH bola pokusným zvieratám vyvolaná subkutánnym podaním MCT v dávke 60 mg/kg, resp. vehikula (0,9 % NaCl) v prípade CON. Vitálne funkcie boli zvieratám zmerané prístrojom MouseOx Plus (Starr Life Sciences, USA) približne 24 hodín pred utratením. Zvieratá boli utrácané v komore s CO_2 v prvom (MCT_{1T}), v druhom (MCT_{2T}), vo štvrtom týždni (MCT_{4T}) po subkutánnej aplikácii MCT, resp. vehikula, a v prípade potreby predčasne (ptMCT – z angl. *prematurely terminated MCT*) po akútnom zhoršení zdravotného stavu (prejavujúcom sa stratou hmotnosti o viac ako 10 g v priebehu 24 hodín, zježenou srsťou, apatiou, zníženou teplotou akrálnych častí tela, či dyspnoe a to tesne pred ukončením štvrtého týždňa). Následne im bola odobratá krv, zvážené jednotlivé orgány a odobraté vzorky, ktoré sa okamžite zmrazili a boli uchovávané pri -80 °C do ďalšieho spracovania. Všetky experimenty boli vopred schválené Etickou komisiou FaF UK v Bratislave a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky (Ro-108/18-221/3).

Relatívna expresia génov podieľajúcich sa na signalizačnej kaskáde extracelulárneho cAMP (e-cAMP) pri HF na mRNA úrovni bola stanovená metódou RT-qPCR. Sekvencie primerov sú uvedené v tabuľke 1. Relatívna expresia sledovaných génov bola počítaná Pfafflovou metódou (14) 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).

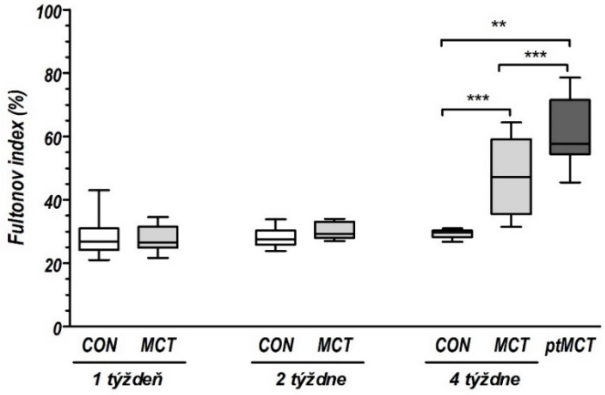
Tabuľka 1/Table 1
Sekvencie primerov použitých na RT-qPCR.
Sequences of primers used for RT-qPCR.

Gén	**Referenčné číslo**	**Sekvencia primerov** (5‘-3‘)	
Abcc4	NM_133411.1	Forward	TTGCACACAGCTTACGGCTA
		Reverse	CGGAGAGCCTTCCGGTAAAT
Enpp1	NM_053535.1	Forward	TGACCACCGATGCTGTAGAGG
		Reverse	CCAGGCTGTACCCAGTCAAA
Nt5e	NM_021576.2	Forward	CAAGTGTCGAGTGCCCATCT
		Reverse	TCTTGGTCACCAGAGTCATGTT
Adora1	NM_017155.2	Forward	TCCGAGTCAAGATCCCTCTCC
		Reverse	GTCAGGCCTACCACAAGGGA
Adora2a	NM_001357942.1	Forward	GCTAGTTTCGAAGTCGCCTG
		Reverse	CGGCTTCAGGGTTCTGAGAT
Hprt1[5]	NM_012583.2	Forward	CAGCTTCCTCCTCAGACCGCTTT
		Reverse	TCACTAATCACGACGCTGGGACTG

VÝSLEDKY

K rozvoju PH v experimentálnom modeli dochádza približne tri týždne po aplikácii MCT, kedy boli u zvierat pozorované prvé príznaky ochorenia (dyspnoe, zníženie príjmu potravy, kachexia). Rýchlosť rozvoja týchto príznakov bola individuálna. V tejto fáze experimentu bol taktiež nameraný signifikantne zvýšený tlak v pravej komore (vs. CON) (6). K zvyšovaniu hmotnosti pľúc dochádzalo postupne už od druhého týždňa po aplikácii MCT (MCT_{2T} o 39 %, MCT_{4T} o 37 %, ptMCT o 63 %, $p \leq 0{,}05$ vs. CON). PH sa u pokusných zvierat prejavila signifikantným zvýšením hmotnosti pravej komory (RV), ako aj Fultonovho indexu (obrázok 1), pričom hmotnosť ľavej komory (LV) ostala nezmenená a to v MCT_{4T}, v ptMCT, ako aj medzi týmito skupinami navzájom. Taktiež bolo pozorované signifikantné zvýšenie srdcovej frekvencie a pokles saturácie krvi kyslíkom v týchto dvoch skupinách (5). Relatívna expresia Nppb v RV na mRNA úrovni sa postupne zvyšovala od druhého týždňa po apl. MCT (7), pričom na proteínovej úrovni neboli pozorované signifikantné zmeny plazmatických koncentrácii NT-proBNP (8).

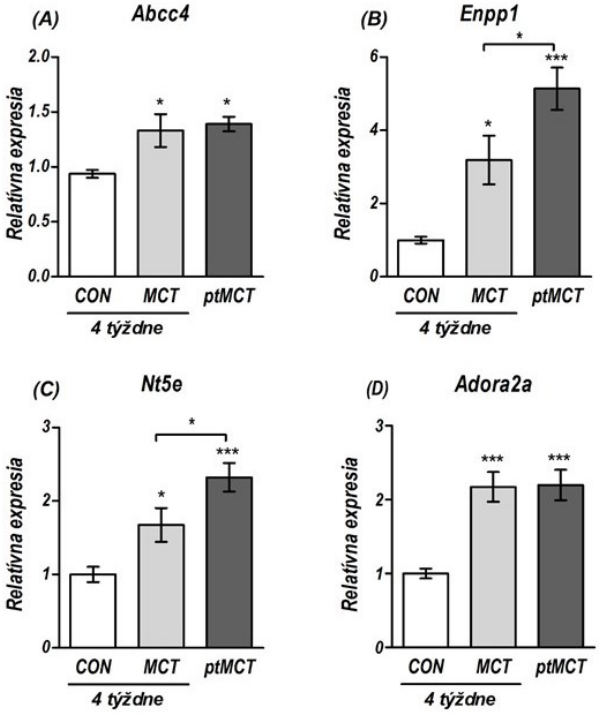
V prvých dvoch týždňoch po aplikácii MCT nedochádzalo k žiadnym signifikantným zmenám relatívnej expresie génov podieľajúcich sa na signalizačnej kaskáde e-cAMP v RV a LV na mRNA úrovni. Štyri týždne po aplikácii MCT a u predčasne utratených zvierat bolo pozorovaná upregulácia génu pre Abcc4 transportér v RV (obrázok 2A). Zvýšenie relatívnej expresie génov pre Enpp1 a Nt5e enzýmy bolo pozorované v RV v MCT_{4T}, v ptMCT, ako aj medzi týmito skupinami navzájom (obrázok 2B, 2C). V LV bolo pozorované signifikantné zvýšenie relatívnej expresie v oboch prípadoch iba v ptMCT, pričom v prípade Enpp1 existuje signifikantný rozdiel v expresii medzi RV a LV. V MCT_{4T} a v ptMCT bolo pozorovaná upregulácia génu pre adenozínový A_{2A} receptor Adora2a (obrázok 2D).



Obrázok 1/Figure 1

Fultonov index v prvom, v druhom, vo štvrtom týždni po subkutánnej aplikácii MCT, resp. vehikula, a v ptMCT. Dáta vyjadrené ako priemer ± SEM (n = 9 – 10/skupina; ** *p < 0,01;* *** *p < 0.001*).

Fulton's index in the first, second, fourth week after subcutaneous application of MCT, or vehicle, and in ptMCT. Data expressed as mean ± SEM (n = 9 – 10/group; * p < 0.05 vs. CON).



Obrázok 2/Figure 2

Relatívna expresia Abcc4 (A), Enpp1 (B), Nt5e (C) a Adora2a (D) v RV vo štvrtom týždni po subkutánnej aplikácii MCT, resp. vehikula, a v ptMCT. Dáta vyjadrené ako priemer ± SEM (n=9-10/skupina; * *p < 0,05* vs. CON, *** p<0,001 vs. CON).

Relative expression of Abcc4 (A), Enpp1 (B), Nt5e (C) and Adora2a (D) in RV at the fourth week after subcutaneous application of MCT, or vehicle, and in ptMCT. Data expressed as mean ± SEM (n=9-10/group; * p < 0.05 vs. CON, *** p<0,001 vs. CON).

DISKUSIA A ZÁVER

Funkcia RV je dôležitým determinantom prognózy PH, pričom zvýšené riziko mortality úzko súvisí okrem iného práve so zvýšenou veľkosťou RV (9). S progresiou ochorenia dochádza štyri týždne po aplikácii MCT k signifikantnému zvyšovaniu Fultonovho indexu, ktorý odráža mieru hypertrofie RV a zároveň aj k signifikantnému zvýšeniu expresie BNP na mRNA úrovni (Nppb) v RV ako markera poškodenia srdcového tkaniva. Na základe týchto informácii možno bližšie charakterizovať experimentálne skupiny s ohľadom na progresiu ochorenia a to na skupinu s kompenzovaným rozvinutým priebehom (MCT_{4T}) a skupinu v terminálnom štádiu ochorenia (ptMCT).

V MCT_{4T} a v ptMCT dochádza k upregulácii génov podieľajúcich sa na exporte, metabolizácii cAMP a sekundárne aj na jeho účinkoch, čo poukazuje na aktiváciu tejto signalizačnej kaskády v závislosti od progresie ochorenia a miery hypertrofie RV. Kardioprotektívne účinky tejto signalizačnej kaskády vyplývajú z aktivácie adenozínových receptorov (AR) na kardiomyocytoch a kardiofibroblastoch (3). Hlavným problémom použitia neselektívneho agonistu AR, ako je napríklad adenozín, resp. prodrug cAMP, v takýchto indikáciách je široké fyziologické spektrum srdcových účinkov, ako je bradykardia až po atrioventrikulárny blok (AV blok), negatívny inotropný a dromotropný efekt po aktivácii A_1 receptora a extrakardiálnych účinkov, ako je inhibícia uvoľňovania transmiterov a lokomócie, sedácia a antikonvulzívne účinky v CNS, zníženie rýchlosti glomerulárnej filtrácie, inhibícia uvoľňovania renínu, antidiuréza a vazokonstrikcia aferentných artérií v obličkách a či ovplyvnenie metabolizmu lipidov a glukózy (10). Za antiproliferatívne účinky tejto signalizačnej kaskády však primárne zodpovedá aktivácia A_{2A} receptora na kardiofibroblastoch. Agonista, prípadne parciálny agonista tohto receptora by teda potenciálne mohol minimalizovať nežiaduce účinky kontinuálnej infúzie cAMP, ktorá inhibovala rozvoj PH v MCT modeli (4). Čo sa týka expresie týchto receptorov v MCT modeli, podobná situácia bola popísaná u pacientov s chronickým srdcovým zlyhávaním v dôsledku dilatačnej kardiomyopatie, kedy bola pozorovaná upregulácia A_{2A} receptora o 60 % oproti zdravým jedincom, zatiaľ čo expresia A_1 receptora sa nemenila (11).

Taktiež s ohľadom na kardioprotektívnu úlohu upregulácie Nt5e (alias CD73), preukázanú na myšacích modeloch srdcového zlyhávania (12) a taktiež pozorovanú upreguláciu v našom experimente, je dôležité starostlivo zvážiť dopad systémovej liečby anti-CD73 na srdce pre nekardiálne indikácie, ako je napríklad rakovina (13), a teda aj pri PH.

V tejto práci sa nám podarilo poukázať na pravdepodobnú aktiváciu signalizačnej kaskády extracelulárneho cAMP v RV na základe zvýšenej expresie génov podieľajúcej sa na nej. Okrem toho sa nám podarilo poukázať na potenciálne riziko anti-CD73 terapie na srdce, ktorá by negovala efekt upregulácie Nt5e pozorovanom pri PH a vytýčiť nový terapeutický cieľ pre ďalšie bádanie.

Poďakovanie: Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0203/19 a APVV-19-0458.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Badesch DB, Champion HC, Gomez Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A: Diagnosis and

Assessment of Pulmonary Arterial Hypertension. Pulm Arter Hypertens Diagnosis Evidence-Based Treat 54, s.7 – 46, 2008
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 67, s. 1053 – 58, 1999
3. Sassi Y, Ahles A, Truong DJ, Baqi Y, Lee SY, Husse B, Hulot JS, Foinquinos A, Thum T, Müller CE, Dendorfer A, Laggerbauer B, Engelhardt S: Cardiac myocyte – secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. J Clin Invest 124, s. 5385 – 97, 2014
4. Jacobson KA, Tosh DK, Jain S, Gao ZG: Historical and current adenosine receptor agonists in preclinical and clinical development. Front Cell Neurosci 13, s. 124, 2019
5. 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 24, 6943-51, 2020
6 Malikova E, Galkova K, Vavrinec 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 418, s. 147 – 57, 2016
7. 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 16, s. 854 – 63, 2019
8. Jarabicová I, Horváth C, Veľasová 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 26, s. 2633 – 45, 2022
9. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL: Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. BMJ 360, s. j5492, 2018
10. Albrecht-Küpper BE, Leineweber K, Nell PG: Partial adenosine A1 receptor agonists for cardiovascular therapies. Purinergic Signal 8(Suppl 1), s. 91 – 9, 2012
11. Stein, B, Kiehn, J, Neumann, J: "Regulation of adenosine receptor subtypes and dysfunction in human heart failure," in Cardiovascular biology of purines 1998. Editors J. G. Burnstock, G. Dobsonjr, B. T. Liang, and J. Linden. Dordrecht, Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 108 – 125.
12. Quast C, Alter C, Ding Z, Borg N, Schrader J: Adenosine formed by CD73 on T cells inhibits cardiac inflammation and fibrosis and preserves contractile function in transverse aortic constriction-induced heart failure. Circ Heart Fail 10: e003346, 2017.
13. Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT: Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). Am J Physiol Cell Physiol 317, C1079-92, 2019
14. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, s. e45, 2001

INHIBÍCIA O-6-METYLGUANÍN-DNA METYLTRANSFERÁZY VEDIE K BUNKOVEJ SENESCENCII VASKULÁRNYCH HLADKOSVALOVÝCH BUNIEK CEZ MTORC1 SIGNÁLNU KASKÁDU

INHIBITION OF O-6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE LEADS TO CELLULAR SENESCENCE IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS THROUGH MTORC1 SIGNALING PATHWAY

Púchovská, M., Vavrincová, D., Vavrinec, P.

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

Abstrakt: Úvod: Bunková senescencia je permanentný stav zastavenia bunkového cyklu. Má fyziologické úlohy, no prispieva aj k rozvoju ochorení spojených s vekom. Senescencia vaskulárnych hladkosvalových buniek (VSMCs) je spojená s rizikom rozvoja hypertenzie, či aterosklerózy. O^6-metylguanín-DNA metyltransferáza (MGMT) opravuje poškodenie DNA alkylačnými látkami. Antineoplastikum O^6-benzylguanín (BG) inhibuje MGMT a jeho použitie bolo navrhnuté spolu s alkylačnými látkami. Úloha MGMT pri bunkovej senescencii nie je preskúmaná. V minulosti sme ukázali, že inhibícia MGMT liečivom BG viedla k senescencii VSMCs. Ciele práce: Chceli sme preskúmať zapojenie mTOR do senescencie VSMCs. Metódy: VSMCs izolované z potkanej aorty boli kultivované s BG v koncentrácii 100 µM počas 72 hodín. Následne sme stanovili expresiu proteínov $p27^{Kip1,}$ mTOR, p-mTOR Ser2448, p-mTOR Ser2481, Raptor, Rictor a GβL metódou SDS-PAGE a Western Blot. Výsledky: Senescencia VSMCs vyvolaná inhibíciou MGMT bola potvrdená signifikantne zvýšenou expresiou $p27^{Kip1}$. Expresia proteínu mTOR a proteínov, ktoré sú súčasťou mTOR komplexu 1 (mTORC1), vrátane p-mTOR Ser2448, Raptor a GβL, bola signifikantne zvýšená v bunkách liečených BG. Zmeny expresie mTOR komplexu 2 (mTORC2), p-mTOR Ser2481 a Rictor neboli pozorované. Záver: Výsledky naznačujú, že proteíny mTORC1 vrátane fosforylácie mTOR na Ser2448 boli vo VSMCs zvýšené po pôsobení BG. mTORC2 nebol BG aktivovaný. Aktivácia mTORC1 môže prispievať k bunkovej senescencii. Ďalšie skúmanie by mohlo objasniť úlohy mTORC1 v bunkovej senescencii vyvolanej inhibíciou MGMT. Objasnenie signálnych dráh zapojených do vzniku bunkovej senescencie vyvolanej inhibíciou MGMT by mohlo viesť k lepšiemu pochopeniu vzniku nežiaducich účinkov BG na kardiovaskulárny systém.

Summary: Background: Cellular senescence is a permanent state of cell cycle arrest. It has physiological roles, but it also contributes to the development of age-releated diseases. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) senescence is associated with the risk of the development of hypertension or atherosclerosis. O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) repairs DNA damage caused by alkylating agents. Antineoplastic agent O^6-benzylguanine (BG) inhibits MGMT.

It was proposed to be used together with alkylating agents. The role of MGMT in cellular senescence has not been described. In the past, we showed, that inhibition of MGMT by BG led to VSMC senescence. Aims: To investigate the involvement of mTOR pathway in VSMC senescence. Methods: VSMCs isolated from rat aorta were cultured with BG at a concentration of 100 μM for 72 hours. We analysed the expression of $p27^{Kip1,}$ mTOR, p-mTOR Ser2448, p-mTOR Ser2481, Raptor, Rictor and GβL proteins by SDS-PAGE and Western blot. Results: VSMCs senescence induced by BG was confirmed by increased expression of $p27^{Kip1}$. Expression of mTOR and of proteins that are involved in mTOR complex 1 (mTORC1), including mTOR Ser2448, Raptor a GβL, was significantly increased by BG. No changes in mTOR complex 2 (mTORC2), p-mTOR Ser2481 and Rictor were observed. Conclusions: These results suggest, that mTORC1 proteins, including phosphorylation of mTOR at Ser2448, were increased in VSMCs after inhibition of MGMT by BG. mTORC2 was not activated by the effect of BG. mTORC1 activation may contribute to the development of cellular senescence. Further investigation may help elucidate the role of mTORC1 in cellular senescence induced by BG. Exploration of the signalling pathways involved could contribute to a better understanding of the adverse effects of MGMT inhibition on the cardiovascular system.

Kľúčové slová: bunková senescencia, O^6-benzylguanín, mTORC1, vaskulárne hladkosvalové bunky, O^6-metylguanín-DNA metyltransferáza
Keywords: cellular senescence, O^6-benzylguanine, mTORC1, vascular smooth muscle cells, O^6-metylguanine-DNA methyltransferase,

ÚVOD

Bunková senescencia predstavuje permanentný stav zastavenia bunkového cyklu, ktorý môže prispievať k poklesu regeneračného potenciálu a funkcie tkanív, chronickému zápalu a tumorigenéze v starnúcom organizme (1). Senescencia bola prvýkrát popísaná ako zastavenie bunkového cyklu v dôsledku replikačného vyčerpania buniek a momentálne je chápaná ako odpoveď bunky na stres vyvolaný viacerými faktormi vrátane poškodenia telomér, oxidačného stresu, poškodenia DNA, mitochondriálnej dysfunkcie a genotoxického stresu (2, 3). Bunková senescencia zohráva fyziologickú úlohu pri embryogenéze, hojení rán, reparácii tkaniva a supresii tumorov (4, 5). Akumulácia senescentných buniek v organizme vekom je však spojená so vznikom kardiovaskulárnych ochorení (6). Senescencia VSMCs je asociovaná s vznikom a rozvojom ochorení spojených s vekom ako je hypertenzia, ateroskleróza a diabetes (7).

Senescentné bunky sú charakterizované zväčšenou a plochou morfológiou, rezistenciou voči apoptóze, zmenou mitochondriálneho oxidačného metabolizmu, zvýšenou tvorbou reaktívnych foriem kyslíka (ROS), zvýšenou syntézou proteínov, zmenami organizácie chromatínu, zmenami génovej expresie a sekréciou so senescenciou asociovaného sekrečného fenotypu (SASP) (8, 9, 10). Kľúčovými dráhami zastavenia bunkového cyklu pri senescencii sú dráhy p53/p21 a p16/Rb tumor-supresorové dráhy (11). Inhibítory cyklín-dependentných kináz (iCDK), vrátane $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ a $p16^{Ink4a}$ sú akumulované v senescentných bunkách a ich aktivita vedie k inaktivácii cyklín-dependentných kináz (CDK), čo zabraňuje tranzícii z G1 do S fázy, alebo z G2 do M fázy bunkového cyklu (12, 13, 14).

O^6-metylguanín-DNA metyltransferáza (MGMT) je DNA opravný enzým, ktorý hrá významnú úlohu v obrane proti O^6-alkylačným činidlám, ktorých pôsobením vzniká O^6-alkylguanín na DNA (15). MGMT opravuje O^6-alkylácie DNA prenosom alkylovej skupiny na cysteín na svojom katalytickom mieste, čím zabraňuje spusteniu odpovede na poškodenie DNA (DDR) (15, 16). O^6-benzylguanín (BG) je inhibítorom MGMT. Benzylová skupina BG sa pri reakcii MGMT s BG presúva na cysteín v aktívnom mieste MGMT, čo spôsobuje jeho ireverzibilnú inaktiváciu. BG patrí medzi antineoplastiká a používa sa v kombinácii s alkylačnými látkami pretože zvyšuje cytotoxicitu metylačných a chlóretylačných činidiel (17, 18).

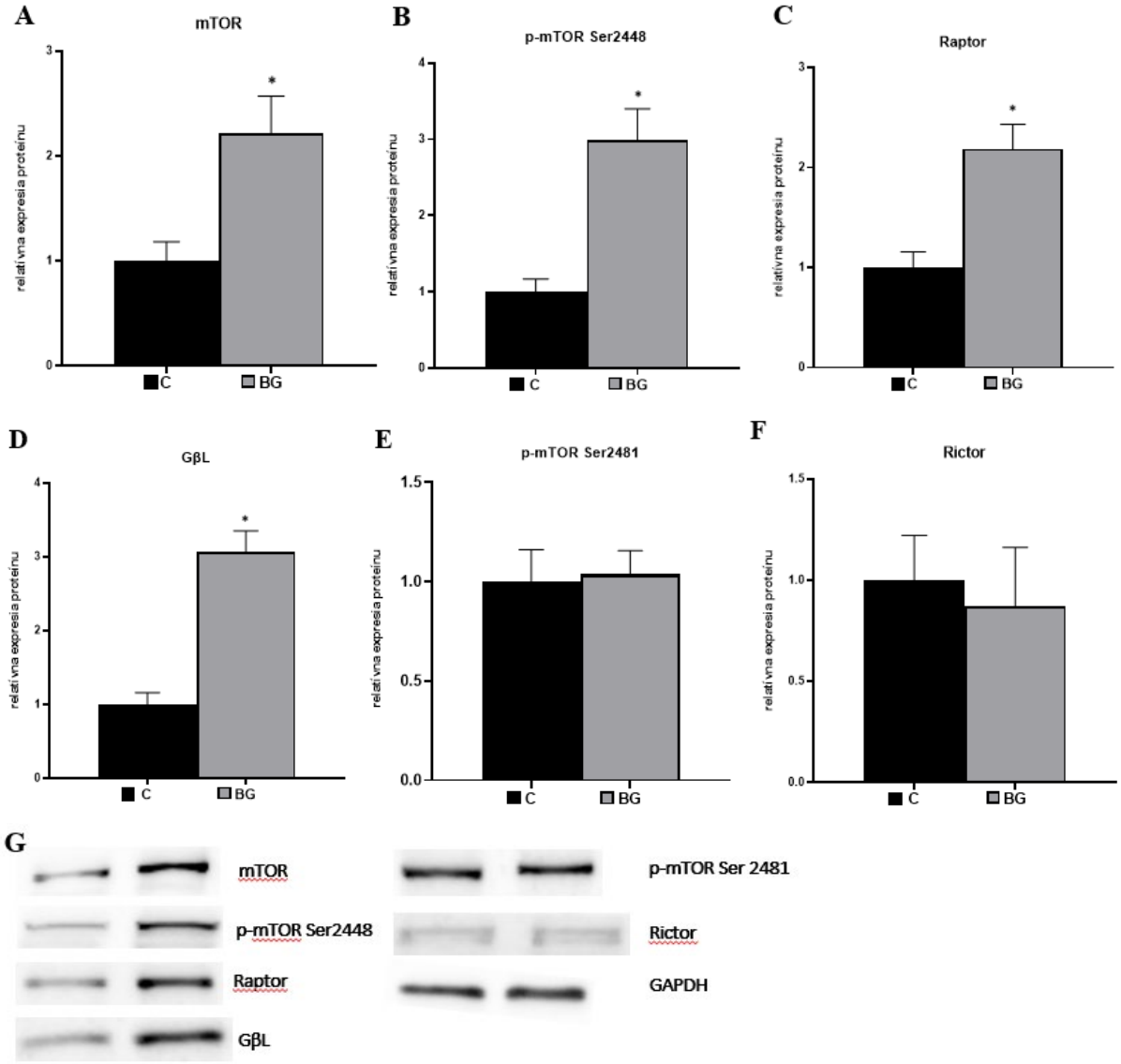
Viacero štúdii poukazuje na dôležitú úlohu signálnej dráhy mTOR pri vzniku a rozvoji bunkovej senescencie (19, 20). Proteín kináza mTOR je hlavným regulátorom rastu a proliferácie buniek a reguluje väčšinu anabolických a katabolických dráh. mTOR tvorí katalytickú podjednotku komplexov mTORC1 a mTORC2 (21, 22).

MATERIÁL A METÓDY

Na náš experiment bol použitý potkan kmeňa Wistar. Vaskulárne hladkosvalové bunky boli izolované za aseptických podmienok z potkanej aorty. VSMCs boli kultivované v kultivačnom médiu DMEM s 10 % teľacím fetálnym sérom a 1 % zmesou antibiotík penicilín a streptomycín. VSMCs boli kultivované v inkubátore v 5 % CO_2 pri 37 °C. K bunkám bol následne pridaný na 72 hodín inhibítor MGMT O^6-benzylguanín (BG) v koncentrácií 100 µM. VSMCs boli spracované na stanovenie proteínov a vybrané proteíny boli stanovené pomocou metódy SDS-PAGE a Western blot. Výsledky expresie vybraných proteínov boli porovnávané v skupine buniek liečených s BG s kontrolnou skupinou VSMCs. Relatívna expresia proteínov bola vyjadrená ako aritmetický priemer ± stredná chyba priemeru. Na posúdenie štatistickej významnosti vplyvu pozorovaných faktorov bol použitý Studentov t-test a výsledky boli považované za signifikantné v prípade $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Bunkovú senescenciu VSMCs liečených BG sme potvrdili signifikantne zvýšenou expresiou iCDK $p27^{Kip1}$. Vo VSMCs, v ktorých sme indukovali bunkovú senescenciu inhibíciou MGMT pomocou BG sme pozorovali signifikantný nárast relatívnej expresie proteínov mTORC1 komplexu, fosforylovanej formy mTOR na Ser2448, Raptoru a GβL. Relatívna expresia nefosforylovaného proteínu mTOR bola taktiež signifikantne zvýšená v bunkách liečených BG. V prípade proteínov komplexu mTORC2, fosforylovanej formy mTORC Ser 2481 a Rictoru, nebola pozorovaná signifikantná zmena expresie proteínov pri porovnaní buniek liečených s BG a kontrolných buniek.



Obrázok 1/Figure 1. Relatívna expresia proteínu mTOR (A); relatívna expresia proteínov mTOR komplexu 1: p-mTOR Ser2448 (B), Raptor (C), GβL (D); relatívna expresia proteínov mTOR komplexu 2: p-mTOR Ser 2481 (E), Rictor (F); snímky membrány (G). * $p < 0,05$ vs C.
Relative expresion of mTOR protein (A); relative expressionof mTOR complex 1 proteins: p-mTOR Ser2448 (B), Raptor (C), GβL (D); relative expression of mTOR complex 2 proteins: p-mTOR Ser 2481 (E), Rictor (F); membrane photos (G). * $p < 0,05$ vs C.

DISKUSIA A ZÁVER

Bunková senescencia predstavuje ireverzibilné zastavenie bunkového cyklu, ktoré môže byť vyvolané faktormi ako je poškodenie DNA, genotoxický a oxidačný stres a poškodenie telomér (2, 3). Senescentné bunky sa vyznačujú viacerými zmenami v morfológii a metabolizme, vrátane zvýšenej tvorby ROS, mitochondriálnej dysfunkcie a zvýšenej expresie inhibítorov cyklín dependentných kináz (iCDK) (8, 9, 10). Bunková senescencia je dôležitá pri viacerých fyziologických funkciách, no akumulácia týchto buniek vekom je spojená s vznikom kardiovaskulárnych ochorení (4, 6). V prípade senescencie vaskulárnych hladkosvalových buniek (VSMCs) môžu tieto bunky prispievať k vzniku a rozvoju hypertenzie, aterosklerózy a diabetu (7).

DNA opravný enzým MGMT odstraňuje O^6-alkylácie z O^6-alkylguanínu na DNA, čím zabraňuje spusteniu odpovede na poškodenie DNA (DDR) (15, 16). BG je ireverzibilným inhibítorom MGMT a používa sa ako antineoplastikum v kombinácii s alkylačnými činidlami, pretože zvyšuje cytotoxicitu týchto látok (17, 18). V našom výskume sme sa venovali skúmaniu mechanizmu, ktorým inhibícia MGMT vyvoláva bunkovú senescenciu VSMCs. VSMCs boli po izolácii z potkanej aorty kultivované s BG v koncentrácii 100 µl počas 72 hodín. Z VSMCs boli izolované proteíny, a následne sme stanovili expresiu vybraných proteínov pomocou imunoblottingu metódou Western blot. Zamerali sme sa na skúmanie expresie proteínov komplexu mTOR 1 (mTORC1) a komplexu mTOR 2 (mTORC2).

Početné štúdie poukazujú na úlohu signálnej dráhy mTOR pri vzniku a rozvoji bunkovej senescencie (19, 20). Proteín mTOR je proteín kináza, ktorá tvorí katalytickú podjednotku komplexov mTORC1 a mTORC2. Reguluje väčšinu anabolických a katabolických dráh v bunke a jeho aktivácia podporuje rast a proliferáciu buniek (21, 22). Komplexy mTORC1 a mTORC2 sa líšia asociovanými proteínmi a miestom fosforylácie mTOR. mTOR v komplexe mTORC1 je fosforylovaný prevažne na Ser2448 a je asociovaný s Raptorom a mTOR v mTORC2 prevažne na Ser2481 a je asociovaný s Rictorom (23). Proteín GβL sa viaže na kinázovú doménu mTOR a stabilizuje interakciu Raptor a mTOR (24). Viaceré štúdie naznačujú, že aktivácia mTORC1 je významná pri vzniku a rozvoji bunkovej senescencie a môže vznikať ako odpoveď na DDR (25). Bolo preukázané, že inhibícia mTORC1 pomocou rapamycínu predĺžila život myšiam a taktiež mala pozitívny vplyv na kardiovaskulárny systém (26). V prípade bunkových kultúr fibroblastov liečba rapamycínom viedla k potlačeniu vzniku a rozvoja bunkovej senescencie indukovanej liečbou doxorubicínom (27).

Naše výsledky poukazujú na aktiváciu mTORC1 signálnej dráhy v dôsledku inhibície MGMT pomocou BG. Celková expresia proteínu mTOR bola po liečbe BG zvýšená. Množstvo fosforylovaného proteínu mTOR na Ser2481, ktorý je predominantne súčasťou mTORC2 komplexu a asociuje sa s Rictorom, nebolo zmenené. Ani expresia proteínu Rictor nebola po liečbe BG zmenená. Zaznamenali sme však signifikantne zvýšenú fosforyláciu mTOR na Ser2448, ktorý je súčasťou mTORC1 a asociuje sa s Raptorom, ktorého expresia bola taktiež výrazne zvýšená v bunkách liečených BG. Expresia proteínu GβL, ktorý stabilizuje väzbu mTOR a Raptor, bola taktiež signifikantne zvýšená.

Zväčšená morfológia a zvýšená syntéza proteínov v senescentných bunkách je v súlade s vplyvom mTOR na rast a proteosyntézu (28). K progresu bunkovej senescencie môže prispievať aj vďaka negatívnej regulácii autofágie prostredníctvom mTORC1, ktorá spolu so zvýšenou proteosyntézou vedie k akumulácii poškodených proteínov a organel, ktorá môže prehlbovať bunkovú senescenciu (19, 29). Keďže mTORC1 potláča mitofágiu, v bunkách sa akumulujú poškodené mitochondrie, ktoré sa vyznačujú zvýšenou tvorbou ROS, ktorá môže viesť k indukcii senescencie (20).

Podarilo sa nám preukázať, že inhibícia MGMT pomocou BG vyvolala bunkovú senescenciu so zvýšenou expresiou proteínov mTORC1 komplexu, ktorého zvýšená aktivita môže viesť k vzniku a rozvoju bunkovej senescencie. Náš ďalší výskum môže viesť k objasneniu signálnych dráh zapojených do vzniku bunkovej senescencie buniek kardiovaskulárneho systému, ktoré sú častokrát ohrozené negatívnym vplyvom terapie antineoplastikami. Naše poznatky môžu viesť k lepšiemu pochopeniu signálnych dráh zapojených do vzniku senescencie a hľadaniu možností, ako ich ovplyvňovať.

Poďakovanie: Táto práca bola sčasti financovaná grantom VEGA 1/0027/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hernandez-Segura A, Nehme J, Demaria M: Hallmarks of cellular senescence. Trends in Cell Biology 28, s. 436 – 53, 2018
2. Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp Cell Res 37, s. 614 – 36, 1965
3. Rodier F, Campisi J: Four faces of cellular senescence. J Cell Biol 192, 547 – 56, 2011
4. Herranz N, Gil J: Mechanisms and functions of cellular senescence. J Clin Invest 128, s. 1238 – 46, 2018
5. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, et al: An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. Dev Cell 31, s. 722 – 33, 2014
6. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, Laberge RM, Marquess D, Dananberg J, et al: Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. Nat Rev Drug Discov 16, s. 718 v 35, 2017
7. Chi C, Li DJ, Jiang YJ, Tong J, Fu H, Wu YH, Shen FM: Vascular smooth muscle cell senescence and age-related diseases: State of the art. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1865, s. 1810 – 21, 2019
8. Kirkland JL, Tchkonia T: Cellular Senescence: A Translational Perspective. EbioMedicine 21, s. 21 – 28, 2017
9. Dookun E, Passos JF, Arthur HM, Richardson GD: Therapeutic Potential of Senolytics in Cardiovascular Disease. Cardiovasc Drugs Ther 36, s. 187 – 96, 2022
10. Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, MartinRuiz C, Von Zglinicki T: A senescent cell bystander efect: senescence-induced senescence. Aging Cell 11, s. 345 – 49, 2012
11. Kumari R, Jat P: Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. Front Cell Dev Biol 9, s. 645, 2021
12. Di Micco R, Krizhanovsky V, Baker D, et al: Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. Nat Rev Mol Cell Biol 22, s. 75 – 95, 2021
13. Collado M, Medema RH, Garcia-Cao I, et al: Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27Kip1. J Biol Chem 275, s. 21960 – 8, 2000
14. Valentijn FA, Falke LL, Nguyen TQ, Goldschmeding R: Cellular senescence in the aging and diseased kidney. Cell Communication and Signaling 12, s. 69 – 82, 2018
15. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP: MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair 6, s. 1079 – 1099, 2012
16. Jackson SP, Bartek J: The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 461, s. 1071 – 78, 2009
17. Konduri SD, Ticku J, Bobustuc GC, Sutphin RM, Colon J, Isley B, Bhakat KK, Kalkunte SS, Baker CH: Blockade of MGMT Expression by O6 Benzyl Guanine Leads to Inhibition of Pancreatic Cancer Growth and Induction of Apoptosis. Clin Cancer Res 15, s. 6087 – 95, 2009

18. Bobola MS: O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase, O6-Benzylguanine, and Resistance to Clinical Alkylators in Pediatric Primary Brain Tumor Cell Lines. Clin Cancer Res 11, s. 2747 – 2755, 2005
19. Xu S, Cai Y, Wei Y: mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging. Aging Dis 5, s. 263 – 73, 2013
20. Papadopoli D, Boulay K, Kazak L, et al: mTOR as a central regulator of lifespan and aging. F1000Res 8, s. 998, 2019
21. Kennedy BK, Lamming DW: The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging. Cell Metab 23, s. 990 – 1003, 2016.
22. Yip CK, Murata K, Walz T, Sabatini DM, Kang SA: Structure of the Human mTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition. Mol Cell 38, s. 768 – 74, 2010
23. Copp J, Manning G, Hunter T: TORC-Specific Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Phospho-Ser2481 Is a Marker for Intact mTOR Signaling Complex 2. Cancer Res 69, s. 1821 – 27, 2009
24. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM et al.: GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. Mol Cell 11, s. 895 – 904, 2003
25. Ma Y, Vassetzky Y, Dokudovskaya S: mTORC1 pathway in DNA damage response. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1865, s. 1293 – 1311, 2018
26. Selvarani R, Mohammed S, Richardson A: Effect of rapamycin on aging and age-related diseases – past and future. GeroScience 43, s. 1135 – 1158, 2021
27. Demidenko ZN, Blagosklonny MV: Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle 7, s. 3355 – 61, 2008
28. Laplante M, Sabatini DM: mTOR signaling in growth control and disease. Cell 149, s. 274 – 93, 2012
29. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH: ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. Mol Biol Cell 20, s. 1992 – 2003, 2009

ÚLOHA BUTYRYLCHOLÍNESTERÁZY V ETIOPATOGENÉZE OBEZITY
ROLE OF BUTYRYLCHOLINESTERASE IN ETIOPATHOGENESIS OF OBESITY

Hodbod, T., Szmicseková, K., Trojčáková, D., Dingová, D., Paul Hrabovská, A.

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

Abstrakt: Úvod: Najnovšie výskumy ukázali, že butyrylcholínesteráza (BChE) zohráva úlohu v regulácii hladiny grelínu a v rozvoji obezity. Cieľom nášho projektu bolo preskúmať vplyv vysokotukovej diéty na aktivitu BChE a hladiny grelínu u obéznych potkanov. Metódy: Ako experimentálne zvieratá sme zvolili samce potkanov Wistar, ktoré sme kŕmili štandardnou alebo vysokotukovou stravou s alebo bez súčasného podávania inhibítora BChE počas 13 týždňov. Na stanovenie aktivity BChE v sére sme použili Ellmanovou metódu a plazmatické hladiny aktívneho a celkového grelínu sme stanovili metódou ELISA. Výsledky: U potkanov kŕmených potravou s vysokým obsahom tuku sme pozorovali vyšší nárast telesnej hmotnosti, hmotnosti tukového tkaniva a aktivity BChE v porovnaní s kontrolnou skupinou. Systémová inhibícia BChE u potkanov so štandardnou potravou viedla k zvýšeniu telesnej hmotnosti porovnateľnému s tým, ktoré sme pozorovali u potkanov na vysokotukovej diéte. Kombinácia vysokotukovej stravy s inhibítorom BChE spôsobila len parciálnu inhibíciu enzýmu. Záver: Naše výsledky potvrdzujú vzájomný vzťah medzi sérovou aktivitou BChE a obezitou. Zvýšený príjem tukov u potkanov viedol k nárastu aktivity BChE v sére a naopak jej inhibícia spôsobila nárast hmotnosti zvierat.

Summary: Background: The latest research showed that butyrylcholinesterase (BChE) plays role in the regulation of ghrelin levels and the development of obesity. The aim of our study was to investigate the effect of a high-fat diet on BChE activity and ghrelin levels in obese rats. Methods: As experimental animals, we chose Wistar male rats fed with a standard or high-fat diet, with or without parallel treatment with BChE inhibitor for 13 weeks. We measured BChE activity in serum by Ellman‘s assay and plasmatic levels of active and total ghrelin were assessed by ELISA method. Results: In rats fed with the high-fat diet, we observed higher body weight gain, increased adipose tissue weight and higher BChE activity compared to control group. Systemic inhibition of BChE in rats with a standard diet led to an increase in body weight comparable to that observed in rats on the high-fat diet. The combination of the high-fat diet with BChE inhibitor caused only partial inhibition of the enzyme. Conclusion: Our results suggest a reciprocal relationship between serum BChE activity and obesity. Higher fat intake in Wistar rats led to an increase BChE activity in serum and *vice-versa* inhibition of BChE activity induced their weight gain.

Kľúčové slová: butyrylcholínesteráza, vysokotuková strava, grelín, leptín, obezita
Keywords: butyrylcholinesterase, high-fat diet, ghrelin, leptin, obesity

ÚVOD

Obezita predstavuje celosvetový zdravotný problém, ktorého prevalencia z roka na rok stúpa (1). Vyznačuje sa nadmerným ukladaním tuku spojeným s nárastom telesnej hmotnosti a je významným rizikovým faktorom mnohých závažných ochorení (2). Najčastejšou príčinou vzniku a rozvoja obezity je nevyvážený príjem a výdaj energie, pričom v prípade nadmerného kalorického príjmu dochádza k vytváraniu zásobných zdrojov vo forme tukov.

Za reguláciu kalorického príjmu zodopovedá hypotalamus, ktorý spracúva signály z periférie prostredníctvom receptorov, najmä pre grelín a leptín, čo sú hormóny, ktoré regulujú pocity hladu a nasýtenia (3).

Syntéza grelínu prebieha vo veľkej miere v žalúdku. Ide o proteín ktorý sa vyskytuje v aktívnej – acylovanej a inaktívnej – deacylovanej forme. S pretrvávajúcim hladovaním koncentrácia jeho aktívnej formy v krvi stúpa, čo organizmus vníma ako pocit hladu. Ihneď po jedle je aktívny grelín enzymaticky inaktivovaný a jeho koncentrácia prudko klesá. Za odštiepenie oktanoylového fragmentu z grelínu je zodpovedná butyrylcholínesteráza (BChE) (4, 5).

Opačným účinkom ako grelín pôsobí na reguláciu príjmu potravy leptín, ktorý je syntetizovaný predovšetkým v tukom tkanive. Ak množstvo tukového tkaniva rastie, rastie aj koncentrácia leptínu v krvi. Väzbou na leptínové receptory v hypotalame mozog dostáva signál z periférie, že nie je potrebné ďalej prijímať potravu ako zdroj energie, čo vedie k potlačeniu pocitu hladu (3,6).

V prípade obéznych jedincov sa však stretávame s leptínovou rezistenciou, pri ktorej nadmerná syntéza leptínu v tukovom tkanive vedie k zvýšeniu jeho koncentrácie v krvnom riečisku a dochádza tak k desenzibilizácii leptínových receptorov, čím klesá schopnosť organizmu a regulačného centra adekvátne reagovať na podnet z periférie (7).

MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité 12-týždňové samce potkanov kmeňa Wistar, ktoré boli umiestnené do vaníc po dvoch. Vanice boli doplnené o predeľovaciu mriežku, vďaka čomu bolo možné sledovať individuálnu spotrebu potravy a vody. Súčasne bol umožnený kontakt medzi jedincami, čím sme zamedzili nežiaducemu stresu z úplnej izolácie. Zvieratá boli chované v miestnosti s konštantnou vlhkosťou a teplotou vzduchu (50% vzdušná vlhkosť, 20 – 24 °C teplota vzduchu), v ktorej bol zabezpečený stály svetelný režim (denný cyklus: 12 h svetlo a 12 h tma). Prístup k jedlu a vode bol *ad libitum*.

Na ovplyvnenie farmakologických vlastností v priebehu experimentu bol použitý selektívny inhibítor BChE, tetraizopropyl pyrofosforamid (isoOMPA, Sigma-Aldrich, kat. # T1505). Ostatné chemikálie použité pri analýze boli analytickej kvality.

Na stanovenie hladín hormónov boli použité komerčne dostupné ELISA kity, a to na stanovenie celkového grelínu (Merck Millipore, kat. # EZRGRT-91K), aktívneho grelínu (Merck Millipore, kat. # EZRGRA-90K) a leptínu (Merck Millipore, kat. # EZRL-83K) v plazme.

Zvieratá boli na začiatku experimentu náhodne rozdelené do skupín po 6 zvierat. V závislosti na skupine bola zvieratám podávaná štandardná potrava (SD, 3227 kcal/kg krmiva) alebo vysokotuková strava (HFD, 4497 kcal/kg krmiva) a pitná voda alebo pitná voda s prídavkom selektívneho inhibítora BChE, isoOMPA.

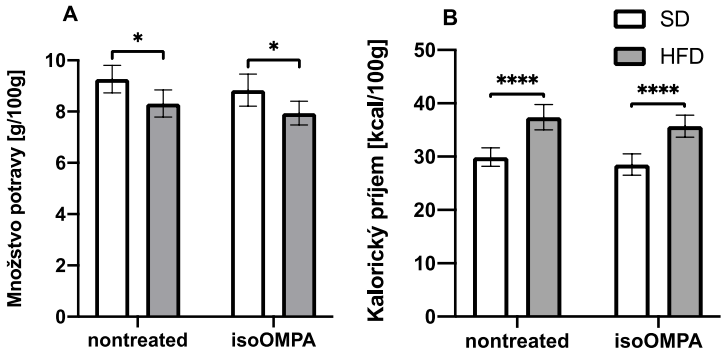
Zvýšená kalorická hodnota HFD bola dosiahnutá nahradením škrobu v štandardných peletách bravčovou masťou v množstve 20 % z celkovej hmotnosti krmiva. Množstvo spotrebovanej potravy bolo zaznamenávané každých 48 hodín.

Na základe dostupných publikácií bola isoOMPA podávaná v dávke 3 mg/kg/deň. Počas prvých 3 dní experimentu bola sledovaná spotreba vody každého zvieraťa. Z takto zistenej spotreby vody bolo vyrátané množstvo inhibítora potrebné na dosiahnutie zvolenej koncentrácie a presná koncentrácia bola spätne vyrátaná na základe skutočnej spotreby. Spotreba vody bola sledovaná na dennej báze.
Na konci experimentu boli zvieratá humánne usmrtené v CO_2 komore. Aby sme predišli neželanému stresu z nedostatku potravy, zvieratám nebol pred usmrtením odobratý prístup k jedlu. Krv bola odobratá z dolnej dutej žily do odberových skúmaviek Sarstedt (Monovette® Sérum-Gél a Li-Heparin) a odobraná krv bola scentrifugovaná podľa pokynov výrobcu. Pripravené sérum, resp. plazma, boli odpipetované do čistej skúmavky, zmrazené v tekutom dusíku a skladované pri -80 °C.

Živá váha bola zaznamenávaná raz týždenne a následne bol zo zozbieraných dát vyrátaný celkový nárast hmotnosti.
Na stanovenie aktivity BChE v sére sme použili Ellmanovu metódu modifikovanú podľa *Dingová et al.* (8).
Hladiny hormónov v plazme boli stanovené metódou ELISA podľa pokynov výrobcu pre konkrétne použité ELISA kity.

VÝSLEDKY

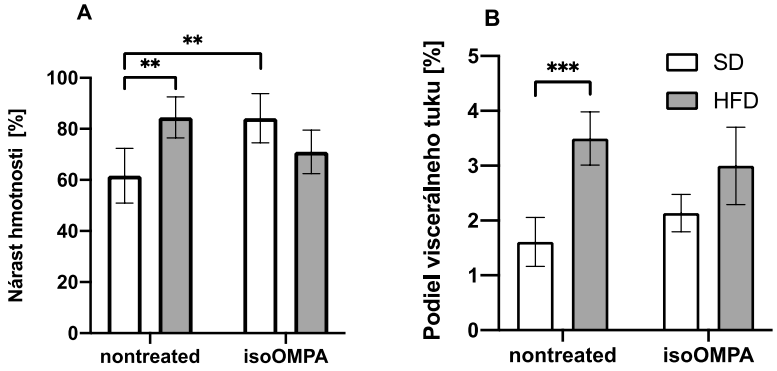
Konzumácia potravy bola u potkanov na HFD signifikantne nižšia v porovnaní so skupinou potkanov na SD (Obrázok 1A), avšak aj napriek poklesu množstva potravy, ich kaloricky denný príjem bol výrazne vyšší (Obrázok 1B).



Obrázok 1/Figure 1 Denný príjem potravy / Daily food intake
Množstvo prijatej potravy v gramoch (A) a množstvo prijatých kalórií v kilokalóriach (B) sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka jednotlivých experimentálnych skupín prepočítané na 100 g živej váhy zvieraťa. SD – štandardná strava, HFD – vysokotuková strava, $p < 0.05$ (*), $p < 0.0001$ (****).
Daily food intake in grams (A) and caloric intake in kilocalories (B). Values are represented by the mean ± standard deviation of experimental groups related to 100 g of body weight. SD – standard diet, HFD – high fat diet, $p < 0.05$ (*), $p < 0.0001$ (****).

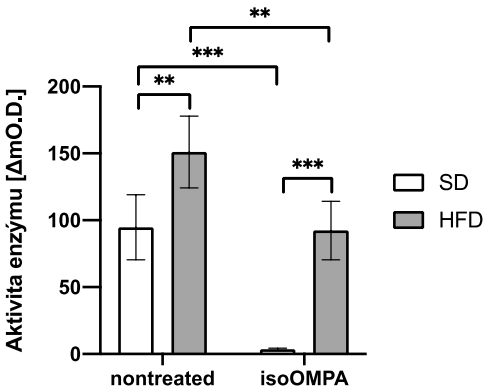
Zvýšený kalorický príjem u HFD zvierat spôsobil výrazný nárast hmotnosti v porovnaní s kontrolnou skupinou. Systémová inhibícia BChE v prípade SD skupiny spôsobila nárast hmotnosti porovnateľný s HFD skupinou, avšak kombinácia HFD a systémovej inhibície neviedla k signifikantnej zmene hmotnosti (Obrázok 2A).

Zvýšené množstvo viscerálneho tukového tkaniva v pomere k hmotnosti tela sme zaznamenali rovnako u HFD skupiny, avšak samotná inhibícia BChE nemala vplyv na zmenu množstva viscerálneho tuku (Obrázok 2B).



Obrázok 2/Figure 2. Biometrické parametre/Biometric parameters
Nárast živej váhy zvierat bol vyjadrený percentuálne k počiatočnej váhe (A) a viscerálne tukové tkanivo bolo kvantifikované ako pomer hmotnosti viscerálneho tuku a živej váhy (B). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka jednotlivých experimentálnych skupín prepočítané na 100 g živej váhy zvieraťa. SD – štandardná strava, HFD – vysokotuková strava, $p < 0{,}01$ (**), $p < 0{,}001$ (***)
Weight gain (A) and visceral adipose tissue weight to body weight ratio (B). Values are represented by the mean ± standard deviation of experimental groups. SD – standard diet, HFD – high fat diet, $p < 0.01$ (**), $p < 0{,}001$ (***)

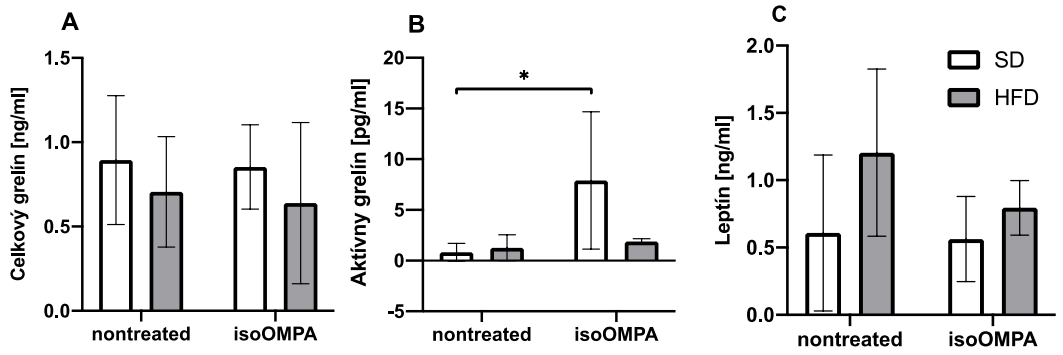
Podávaním vysokotukovej stravy v priebehu 13 týždňov došlo k zvýšeniu sérovej aktivity BChE. V prípade podávania selektívneho inhibítora BChE sme pozorovali v skupine so SD úplné vymiznutie jej aktivity a v skupine s HFD došlo len k parciálnej inihibícii na úroveň aktivít kontrolnej skupiny (Obrázok 3).



Obrázok 3/Figure 3. Aktivita BChE v sére/BChE activity in serum.
Aktivita BChE bola stanovená modifikovanou Ellmanovou metódou. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka jednotlivých experimentálnych skupín. SD – štandardná strava, HFD – vysokotuková strava, $p < 0{,}01$ (**), $p < 0{,}001$ (***)
BChE activity was assessed by modified Ellman‘s assay. Values are represented by the mean ± standard deviation of experimental groups. SD – standard diet, HFD – high fat diet, $p < 0{,}01$ (**), $p < 0{,}001$ (***)

V prípade stanovenia hladín celkového grelínu v plazme sme nezaznamenali zmeny spôsobené typom potravy ani podávaním selektívneho inhibítora BChE (Obrázok 4A). Plazmatické koncentrácie aktívneho grelínu boli pod detekčným rozsahom použitého kitu u všetkých zvierat, s výnimkou skupiny na SD s prídavkom isoOMPA (Obrázok 4B). Pozorovali sme negatívnu koreláciu medzi aktivitou BChE a aktívnym grelínom ($p = 0{,}0207$).

Koncentrácie leptínu v plazme neboli ovplyvnené typom potravy ani inhibíciou BChE (Obrázok 4C), avšak po štatistickej analýze dát sme zaznamenali negatívnu koreláciu s množstvom prijatej potravy (p = 0,008) a množstvom tukového tkaniva (p = 0,002).



Obrázok 4/Figure 4. Hladiny hormónov regulujúcich príjem potravy v plazme/Plasma levels of hormones regulating food intake
Hodnoty plazmatickej koncentrácie celkového grelínu (A), aktívneho grelínu (B) a leptínu (C) sú vyjadrené ako priemer ± štandardná odchýlka jednotlivých experimentálnych skupín. Smerodajné odchýlky odzrkadľujú veľký rozptyl hodnôt z dôvodu voľného prístupu jedincov k potrave pred usmrtením. SD – štandardná strava, HFD – vysokotuková strava, $p < 0,05$ (*)
Plasma levels of total ghrelin (A), active ghrelin (B) and leptin (C). Values are represented by the mean ± standard deviation of experimental groups. Standard deviation values reflect free food access before sacrification. SD – standard diet, HFD – high-fat diet, $p < 0,05$ (*)

DISKUSIA

Najnovšie poznatky poukazujú na úlohu BChE v etiopatogenéze obezity. Experimenty s myšacími modelmi preukázali, že chýbanie aktivity BChE vedie k zvýšenému sklonu k vzniku obezity, zatiaľ čo zvýšenie aktivity tohto enzýmu má naopak anobezický účinok.

V tejto práci sme sa zamerali na overenie tohto vzťahu u potkana. Farmakologické zníženie aktivity BChE v našich experimentoch viedlo k zvýšeniu hmotnosti potkanov na SD o viac ako 20 %. Na rozdiel od nášho modelu, v prípade myší s absenciou génu pre BChE (BChE-/-), a teda nulovou aktivitou tohto enzýmu, nedochádza k žiadnym markantným zmenám vo fenotype, a chýbanie tohto proteínu od prenatálneho obdobia nevedie k vzniku obezity (9). To môže byť spôsobené adaptačnými zmenami, ku ktorým dochádza počas vývinu mutantných zvierat (10 – 12). Detailnejšie skúmanie tohto kmeňa myší však odhalilo, že BChE-/- myši kŕmené HFD mali približne o 20 % vyšší nárast hmotnosti ako ich súrodenci divokého kmeňa (13). *Vice versa*, génová terapia BChE-/- myší viedla nielen k zníženiu hmotnosti ale aj k jej dlhodobej stabilizácii na fyziologických hodnotách (14). Dalo by sa teda očakávať, že rovnako vo farmakologicky navodenom deficite BChE spôsobí HFD nárast hmotnosti tela. Zaujímavé však je, že v našich experimentoch kombinácia HFD a isoOMPA nemala žiaden aditívny efekt.

Vzťah medzi aktivitou BChE a obezitou je v literatúre vysvetlený schopnosťou BChE hydrolyzovať aktívny grelín na neaktívnu formu (5), a teda jeho schopnosťou regulovať hladinu aktívneho grelínu v plazme (4). To sa potvrdilo aj v našich výsledkoch. Zatiaľ čo inaktivácia BChE nemala žiaden dopad na hladinu celkového grelínu, pozorovali sme zmeny v plazmatickej koncentrácii jej acylovanej formy. Podľa očakávania sme v prípade neliečených skupín kŕmených SD alebo HFD s voľným

prístupom k jedlu pozorovali pokles plazmatických koncentrácii aktívneho grelínu, a to až pod úroveň detekcie. Plazmatické koncentrácie aktívneho grelínu u potkanov na SD liečených isoOMPA, a teda nulovou aktivitou BChE, však zostali zvýšené. Zaujímavé je, že tento posun rovnováhy smerom k aktívnej forme grelínu sa neodrazil v zmene množstva prijatej potravy, čo sa hmotnosti ani kalorického príjmu týka. Taktiež sa nárast hmotnosti neprejavil ani na zmenách v množstve viscerálneho tukového tkaniva u týchto potkanov, a preto môžeme predpokladať ukladanie tukového tkaniva do iných časti tela, napríklad do podkožia, popr. zmenu vo vylučovaní tekutín. U liečených potkanov na HFD, u ktorých sa nepodarilo docieliť úplnú inhibíciu BChE, hladina aktívneho grelínu klesla na hladinu detekcie.

Výsledky nášho projektu odkrývajú komplexnosť vzťahu medzi aktivitou BChE a obezitou. Okrem už popísaného dopadu zmeny aktivity BChE na vznik obezity sme pozorovali aj pozoruhodný vplyv obezity navodenej HFD na aktivitu sérovej BChE. V sére potkanov sme zaznamenali zvýšenie aktivity BChE približne o polovicu pôvodnej hodnoty. Vzhľadom na zvýšenie BChE aktivity môžeme predpokladať rýchlejšiu a zároveň dlhotrvajúcu deacyláciu aktívneho grelínu v krvi za účelom potlačenia pocitu hladu, ktorý sa odzrkadlil v poklese množstva prijatej potravy u skupiny na HFD. Aj napriek nižšiemu množstvu potravy bol kalorický príjem výrazne zvýšený v porovnaní so SD, čo sa odrazilo v náraste hmotnosti tela ako aj tukového tkaniva.

Zvýšená aktivita sérovej BChE u potkanov na HFD môže tiež poskytnúť vysvetlenie neúplnej inhibície tohto enzýmu po systémovom podaní isoOMPA. Možno totižto predpokladať, že koncentrácia postačujúca pre inhibíciu fyziologickej hladiny BChE v sére potkanov na SD nie je postačujúca na úplnú inhibíciu zvýšenej hladiny enzýmu v potkanoch na HFD. Ďalším dôvodom neúplnej inhibície a nižšieho nárastu hmotnosti v porovnaní so spomenutými skupinami, by mohla byť farmakokinetická interakcia na úrovni absorpcie, a to či už z dôvodu vytvorenia vzájomného nevstrebateľného komplexu, alebo vyčerpaním kapacity spoločných transportérov.

Záverom môžeme konštatovať, že sme potvrdili komplexný vzťah medzi BChE a obezitou a úlohu BChE v regulácii hladiny grelínu. Systémová inhibícia BChE v potkanoch na SD vedie ku zvýšeniu plazmatických hladín grelínu a ku zvýšeniu hmotnosti tela. Nárast hmotnosti je porovnateľný s hmotnosťou zvierat na HFD, avšak isoOMPA a HFD nemajú aditívny obezický účinok. Na druhej strane, obezita spôsobená HFD vedie k zvýšeniu sérovej aktivity BChE. Súčasné podávanie HFD a isoOMPA nevedie ku dosiahnutiu úplnej systémovej inhibície BChE.

Poďakovanie: Táto práca vznikla s podporou grantov VEGA 1/0283/22, 1/0815/21 a SK-FR-19-0005.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. WHO, "Obesity and overweight", 1. apríl 2020. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight
2. Wyatt SB, Winters KP, Dubbert PM: Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. Am J Med Sci 331, s. 166 – 74, 2006
3. Schwartz MW: Brain Pathways Controlling Food Intake and Body Weight. Exp Biol Med (Maywood) 226, s. 978 – 81, 2001
4. Chen VP, Gao Y, Geng L, Parks RJ, Pang YP, Brimijoin S: Plasma butyrylcholinesterase regulates ghrelin to control aggression. Proc Natl Acad Sci U S A 112, s. 2251 – 56, 2015
5. Schopfer LM, Lockridge O, Brimijoin S: Pure human butyrylcholinesterase hydrolyzes octanoyl ghrelin to desacyl ghrelin. Gen Comp Endocrinol 224, s. 61 – 68, 2015
6. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. Nat Med 2, s. 589 – 93, 1996
7. Obradovic M, Sudar-Milovanovic E, Soskic S, Essack M, Arya S, Stewart AJ, Gojobori T, Isenovic ER: Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication, Front Endocrinol 12, s. 585887, 2021
8. Dingova D, Leroy J, Check A, Garaj V, Krejci E, Hrabovska A: Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: modifications to the standard Ellman's assay. Anal Biochem 462, s. 67 – 75, 2014
9. Li B, Duysen EG, Lockridge O: The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. Chem Biol Interact 175, s. 88 – 91, 2008
10. Farar V, Hrabovska A, Krejci E, Myslivecek J: Developmental adaptation of central nervous system to extremely high acetylcholine levels. PLoS One 8, e6826511, 2013
11. Hrabovska A, Farar V, Bernard V, Duysen EG, Brabec J, Lockridge O, Myslivecek J: Drastic decrease in dopamine receptor levels in the striatum of acetylcholinesterase knock-out mouse. Chem Biol Interact 183, s. 194 – 201, 2010
12. Farar V, Mohr F, Legrand M, Lamotte D'Incamps B, Cendelin J, Leroy J, Abitbol M, Bernard V, Baud F, Fournet V, Houze P, Klein J, Plaud B, Tuma J, Zimmermann M, Ascher P, Hrabovska A, Myslivecek J, Krejci E: Near-complete adaptation of the PRiMA knockout to the lack of central acetylcholinesterase. J Neurochem 122, s. 1065 – 1080, 2012
13. Chen VP, Gao Y, Geng L, Stout MB, Jensen MD, Brimijoin S: Butyrylcholinesterase Deficiency Promotes Adipose Tissue Growth and Hepatic Lipid Accumulation in Male Mice on High-Fat Diet. Endocrinology 157, s. 3086 – 95, 2016
14. Chen VP, Gao Y, Geng L, Brimijoin S: Butyrylcholinesterase regulates central ghrelin signaling and has an impact on food intake and glucose homeostasis. Int J Obes (Lond) 41, s. 1413 – 19, 2017

ANALÝZA VPLYVU EDUKÁCIE NA VEDOMOSTI ADOLESCENTOV O LIEKOCH

ANALYSIS OF THE IMPACT OF EDUCATION ON ADOLESCENTS' KNOWLEDGE ABOUT MEDICINES

Urbánková, J., Kuželová, M.

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

Abstrakt: Úvod: Adolescenti užívajú často lieky bez dozoru dospelých ale nemajú dostatok vedomostí o ich správnom užívaní. Ciele práce: Analyzovať dotazníkovou metódou vplyv edukácie na postoje adolescentov k účinnosti a bezpečnosti liekov a na vedomosti o liekoch. Metódy: Výsledky boli spracované zo 122 online dotazníkov, ktoré vypĺňali 15- až 18-roční adolescenti zo 4 škôl v Bratislave pred a po edukácii. Výsledky: Lieky vydané bez lekárskeho predpisu užilo v sledovanom polroku 89,4 % adolescentov, najčastejšie ibuprofén (38,0 %) a paracetamol (23,3 %). Liek na lekársky predpis užilo 42,6 % adolescentov, najčastejšie desloratadín (16,9 %). Väčšina respondentov (66,4 %) uviedla, že sa rozprávajú s rodičmi o liekoch. Po edukácii sme zistili signifikantné zlepšenie odpovedí adolescentov, najmä na otázky o rizikách liekov na alergiu, liekov proti bolesti a proti kašľu, dlhodobom užívaní kvapiek do nosa a antibiotík ($p < 0,001$). Štatisticky významný rozdiel sme pozorovali aj pri otázkach o škodlivosti kombinovania liekov s alkoholom ($p = 0,001$) a o možnosti vzniku nežiaduceho účinku v prípade užitia väčšieho množstva tabliet ($p = 0,002$). Signifikantne sa zvýšila dôvera adolescentov v účinnosť liekov ako aj v bezpečnosť liekov vydávaných na lekársky predpis ($p < 0,001$). Záver: Edukácia je potrebný a účinný nástroj pre zlepšenie vedomostí adolescentov o užívaní liekov. Preto je dôležité vzdelávať adolescentov a ich rodičov o racionálnom užívaní liekov.

Summary: Introduction: Adolescents often take medicine without the supervision of an adult despite having very little knowledge about the proper use of medicines. Aim: To analyze the impact of education on attitudes of adolescents towards the efficacy and safety of medicines and on their knowledge about medicines using a self-reported questionnaire method. Methods: Results were processed from online questionnaires filled out by 122 adolescents aged 15 – 18 from 4 schools in Bratislava before and after the education. Results: In past 6 months, 89.4% of the adolescents took OTC medicine, mostly ibuprofen (38.0%) and paracetamol (23.3%). 42.6% had taken prescription medicine, mostly desloratadine (16.9%). The majority (66.4%) stated, that they talk about medicines with their parents. After the education, there was a significant improvement in adolescents' answers, mostly to questions about the risk of allergy medicines, painkillers, cough medicines, and long-term use of nasal drops and antibiotics ($p < 0.001$). A significant difference was also observed in answers to questions about the danger of combining alcohol with medicine ($p = 0.001$) and about the possibility of an

adverse effect when more than the recommended dose of medicines is taken ($p = 0.002$). There was also a significant improvement in adolescents' belief about the efficacy of medicines and about the safety of prescription medicines ($p < 0.001$). Conclusion: We can therefore regard the education as a needed and efficient tool for improving adolescents' knowledge regarding the use of medicines. Therefore, it is important to educate adolescents as well as their parents about the rational use of medicines.

Kľúčové slová: adolescenti, lieky, edukácia, Slovenská republika
Key words: adolescents, medicine, education, Slovak Republic

ÚVOD

Detská populácia je rizikovou skupinou z hľadiska užívania liekov. Každá veková skupina detí má svoje špecifiká. Pri adolescentoch štúdie poukazujú najmä na nedostatok vedomostí o liekoch (1, 2) a negatívne postoje k liekom, čoho príčinou môžu byť rodičia alebo nesprávne zdroje informácií (3). Narastajúcim problémom je aj rozšírený trend samoliečby (4) a non-adherencia (5).

V niektorých krajinách ako Fínsko a USA vznikli iniciatívy v snahe edukovať deti a adolescentov o liekoch a ich správnom užívaní (6, 7, 8) alebo zvýšenia medicínskej gramotnosti (9). Na Slovensku stále neprebieha systematické vzdelávanie detí a adolescentov o liekoch.

V našej práci sme uskutočnili analýzu vedomostí adolescentov o liekoch dotazníkovou metódou. Následne sme edukovali adolescentov o liekoch a zhodnotili účinnosť edukácie.

SÚBOR RESPONDENTOV A METÓDY

Výskum bol realizovaný s adolescentmi vo veku 15 až 18 rokov zo 4 rôznych škôl v Bratislave v období február 2021 − marec 2021. Vplyv edukácie sme analyzovali z online dotazníkov vyplnených adolescentmi v aplikácii Microsoft Forms pred a po edukácii. Použili sme validované dotazníky z predchádzajúceho výskumu (10), ktoré obsahovali uzavreté a otvorené otázky a otázky s využitím päťstupňovej Likertovej škály. Nakoniec sme vypočítali priemerné skóre odpovedí z Likertovej škály: 1 = áno, 2 = skôr áno, 3 = neviem posúdiť, 4 = skôr nie, 5 = nie.

Dotazníky obsahovali otázky, ktoré charakterizovali respondentov a otázky, ktoré skúmali vedomosti adolescentov o liekoch a ich postoje k liekom. Adolescenti vyjadrovali svoj postoj k predloženým tvrdeniam pred a po edukácii.

Pripravili sme ďalej interaktívnu prezentáciu v programe Microsoft PowerPoint a tiež informačný leták pre študentov o užívaní liekov. Skúšobnú edukáciu sme uskutočnili na vzorke 3 študentov a potom sme oslovovali pedagógov jednotlivých škôl. Online edukácia sa uskutočnila cez virtuálne platformy MS Teams, Google Meet alebo Zoom. Výskumu sa zúčastnilo 210 študentov, z toho 122 (58,09 %) spĺňalo kritériá výskumu.

Na zhodnotenie vplyvu edukácie sme použili párový Studentov t-test, porovnávali sme priemerné skóre odpovedí z Likertovej škály pred a po edukácii.

VÝSLEDKY

Charakteristika adolescentov. Vekový priemer skúmanej skupiny adolescentov bol 16,7 (15 – 18) rokov. Zastúpenie dievčat a chlapcov bolo vyvážené (51,6 vs. 48,4 %). Väčšina adolescentov hodnotila svoj zdravotný stav ako dobrý (45,1 %, 55/122) alebo veľmi dobrý (40,2 %, 49/122).

Najčastejším akútnym zdravotným problémom adolescentov za posledných 6 mesiacov bola bolesť hlavy (59,8 %, 73/122) a nervozita (42,6 %, 52/122). Alergie (26,2 %, 32/122) a kožné problémy (11,5 %, 14/122) boli najčastejšími chronickým ochoreniami.

Užívanie liekov adolescentmi. Za posledných 6 mesiacov užívalo lieky na lekársky predpis 42,6 % adolescentov, najčastejšie desloratadín (16,9 %) a 89,3 % užívalo lieky vydávané bez lekárskeho predpisu, najčastejšie ibuprofén (37,6 %) a paracetamol (23,5 %). Najpoužívanejšími liekmi na lekársky predpis boli lieky z ATC skupín R06 – antihistaminiká na systémové použitie (35,1 %, 27/77) a z liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu antiflogistiká a antireumatiká (37,6 %, 56/149; ATC skupina M01) a analgetiká (24,8 %, 37/149; ATC skupina N02).

Dohľad rodičov nad užívaním liekov adolescentmi. Väčšina adolescentov (66,4 %) uviedla, že sa rozpráva s rodičmi o liekoch. Menej ako polovica respondentov (42,6 %) odpovedala, že neužívajú lieky bez toho, aby o tom rodičia vedeli. Z tabuľky 1 vyplýva, že rodičia viac kontrolujú adolescentov pri užívaní liekov na lekársky predpis (46,7 %) v porovnaní s liekmi vydávanými bez lekárskeho predpisu (34,4 %). Rodičia v 15,6 % prípadov nevedeli o užívaní liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu adolescentmi.

Vnímanie účinnosti a bezpečnosti liekov adolescentmi. Názory adolescentov na účinnosť a bezpečnosť liekov boli skúmané Likertovou stupnicou.

Pred edukáciou vyslovila väčšina adolescentov dôveru v účinnosť liekov na lekársky predpis („určite áno“ – 39,3 %, 48/122 a „skôr áno“ – 43,4 %, 53/122) a liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu („určite áno“ – 13,1 %, 16/122 a „skôr áno“ – 66,4 %, 81/122). Po edukácii považovalo lieky na lekársky predpis za účinné až 92,6 % adolescentov (113/122) a lieky vydávané bez lekárskeho predpisu považovalo za účinné 90,2 % adolescentov (110/122).

Pred edukáciou väčšina adolescentov považovala za bezpečné lieky na lekársky predpis (65,6 %, 80/122) aj lieky vydávané bez lekárskeho predpisu (67,2 %, 82/122). Po edukácii považovalo za bezpečné lieky na lekársky predpis 85,2 % adolescentov (104/122) a lieky vydávané bez lekárskeho predpisu 76,2 % adolescentov (93/122).

Porovnanie vnímania účinnosti a bezpečnosti liekov adolescentmi pred a po edukácii.

Zistili sme signifikantné rozdiely medzi priemernými skóre odpovedí adolescentov pred edukáciou a po edukácii (vyšší súhlas) z položiek Likertovej škály ($p < 0,001$; pre položky o vnímaní účinnosti a bezpečnosti liekov na lekársky predpis a o vnímaní účinnosti liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu). Rozdiely v položkách o vnímaní bezpečnosti liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu a vhodnosti používania liekov pre dospelých deťmi neboli signifikantné ($p = 0,198$ a $p = 0,734$). Porovnanie odpovedí adolescentov pred a po edukácii v otázkach vnímania účinnosti a bezpečnosti liekov je popísané v tabuľke 2, ako aj ich vnímanie vhodnosti použitia liekov pre dospelých deťmi.

Analýza vedomostí adolescentov o liekoch. Pred edukáciou odpovedali adolescenti súhlasne najmä na tvrdenie o škodlivosti užívania alkoholu v kombinácii s liekmi („určite áno“ – 68,0 % (83/122) a „skôr áno“ – 23,0 % (28/122)).

Tabuľka 1/Table 1
Vzťah adolescentov a rodičov pri užívaní liekov.
The relationship between adolescents and parents when taking medication.

Položka	n (%)
Rozprávajú sa s rodičmi o liekoch	*n = 122*
určite/skôr áno	81 (66,4)
neviem posúdiť	6 (4,9)
skôr/určite nie	35 (28,7)
Ako často užívajú lieky bez toho, aby o tom vedeli ich rodičia	
nikdy	52 (42,6)
občas	61 (50,0)
často	6 (4,9)
vždy	3 (2,5)
Užívanie liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu pod dohľadom rodiča	
áno, rodič vie, že ich užívam a kontroluje ma ako ich užívam	42 (34,4)
áno, rodič vie, že ich užívam, ale nekontroluje ma ako ich užívam	61 (50,0)
nie, rodič nevie, že ich užívam, ani ma nekontroluje ako ich užívam	19 (15,6)
Užívanie liekov na lekársky predpis pod dohľadom rodiča	
áno, rodič vie, že ich užívam a kontroluje ma ako ich užívam	57 (46,7)
áno, rodič vie, že ich užívam, ale nekontroluje ma ako ich užívam	63 (51,6)
nie, rodič nevie, že ich užívam, ani ma nekontroluje	2 (1,6)

Na tvrdenie o možnom výskyte nežiaducich účinkov v prípade predávkovania sa odpovedalo „určite áno“ 63,9 % (78/122) adolescentov a „skôr áno“ 32,0 % (39/122) adolescentov. Viac ako polovica adolescentov poznala aj možnú závislosť pri dlhodobom užívaní kvapiek do nosa (66,4 %, 81/122), či nutnosť doužívať celé predpísané množstvo antibiotík (69,7 %, 85/122).

Po edukácii prejavili adolescenti väčšinový súhlas so všetkými tvrdeniami. S určitosťou súhlasili s tvrdeniami o škodlivosti užívania alkoholu v kombinácii s liekmi – „určite áno“ odpovedalo 90,2 % (110/122), o nutnosti doužívať celé predpísané množstvo antibiotík – „určite áno“ odpovedalo 89,3 % (109/122), o možnosti vzniku závislosti v prípade dlhodobého užívania niektorých kvapiek do nosa – „určite áno“ odpovedalo 86,9 % (106/122) a o možnosti vzniku nežiaducich účinkov v prípade užitia viac tabliet lieku (predávkovania sa) – „určite áno“ odpovedalo 86,1 % (105/122).

Porovnanie vedomostí adolescentov o rizikách jednotlivých skupín liekov pred a po edukácii. Vo všetkých vedomostných položkách mali adolescenti nižšie priemerné skóre odpovedí (vyšší súhlas s tvrdeniami) po edukácii (1,19 – 1,77) ako pred edukáciou (1,42 – 3,40), rozdiely boli signifikantné (Tabuľka 3).

Tabuľka 2/Table 2
Porovnanie vnímania účinnosti a bezpečnosti liekov adolescentmi pred a po edukácii.
A comparison of adolescents' perception regarding the efficacy and safety of medicines before and after the education.

Položky Likertovej škály		Priemer ± SD	*p*
Myslím si, že lieky na lekársky predpis (lieky, ktoré mi predpísal lekár), ktoré užívam, sú účinné (zlepšujú môj zdravotný stav).	pred edukáciou	1,81 ± 0,650	**< 0,001**
	po edukácii	1,47 ± 0,466	
Myslím si, že voľnopredajné lieky, ktoré užívam, sú účinné (zlepšujú môj zdravotný stav).	pred edukáciou	2,10 ± 0,403	**< 0,001**
	po edukácii	1,82 ± 0,380	
Myslím si, že lieky na lekársky predpis (lieky, ktoré mi predpísal lekár), ktoré užívam, sú bezpečné (nemôžu mi ublížiť).	pred edukáciou	2,23 ± 0,889	**< 0,001**
	po edukácii	1,84 ± 0,926	
Myslím si, že voľnopredajné lieky, ktoré užívam, sú bezpečné (nemôžu mi ublížiť).	pred edukáciou	2,25 ± 0,869	0,198
	po edukácii	2,13 ± 0,991	
Myslím si, že lieky, ktoré užívajú dospelí, sú vhodné aj pre deti.	pred edukáciou	3,95 ± 0,692	0,734
	po edukácii	3,98 ± 0,818	

Priemer ± SD vypočítaný pre hodnoty z Likertovej škály: 1 = áno, 2 = skôr áno, 3 = neviem posúdiť, 4 = skôr nie, 5 = nie, nižšie skóre predstavuje vyšší súhlas,
p – vypočítaná štatistická významnosť podľa párového t-testu, ktorý bol použitý na porovnanie priemerných skóre pred a po edukácii v jednotlivých Likertových položkách, zvýraznené hodnoty predstavujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$).

DISKUSIA A ZÁVER

V našej práci sme zistili vysoko signifikantný vplyv edukácie o liekoch uskutočnenej formou interaktívnej prednášky a pripraveného informačného letáka o liekoch na väčšinu postojov k účinnosti a bezpečnosti liekov a na vedomosti adolescentov o liekoch vydávaných na lekársky predpis ako aj bez lekárskeho predpisu.

Edukácia signifikantne zvýšila dôveru adolescentov v účinnosť a bezpečnosť liekov na lekársky predpis a v účinnosť liekov vydávaných bez lekárskeho predpisu. Adolescenti ale nezmenili svoj postoj k bezpečnosti liekov vydávaných bez predpisu. Doteraz sa iba niekoľko prác (6, 11) zaoberalo vplyvom edukácie o liekoch na vedomosti adolescentov o liekoch. Aj keď sa zistil význam edukácie o účinnosti a bezpečnosti liekov, nie je možné porovnať výsledky, pretože autori použili iné otázky a na rozdiel od našej metódy hodnotili vedomosti bodmi a vyhodnocovali percentuálnu úspešnosť.

Pred edukáciou správne odpovedala väčšina účastníkov na tvrdenie o možnom výskyte nežiaducich účinkov liekov v prípade užitia väčšieho množstva tabliet, teda

Tabuľka 3/Table 3
Porovnanie vedomostí o riziku jednotlivých skupín liekov pred a po edukácii
A comparison of adolescents' knowledge regarding the risk of some medicine groups before and after the education

Položky Likertovej škály		Priemer± SD	*p*
Lieky na alergiu môžu utlmovať (vyvolávajú spánok, znižujú sústredenie).	pred edukáciou po edukácii	2,53 ± 1,011 1,56 ± 0,678	**<0,001**
Lieky proti bolesti môžu poškodzovať orgány v mojom tele.	pred edukáciou po edukácii	2,66 ± 0,952 1,71 ± 0,851	**<0,001**
Lieky proti kašľu môžu spôsobiť halucinácie a kŕče.	pred edukáciou po edukácii	3,40 ± 0,854 1,77 ± 0,839	**<0,001**
Dlhodobé užívanie (viac ako 10 dní) niektorých kvapiek do nosa môže byť návykové.	pred edukáciou po edukácii	2,15 ± 1,152 1,21 ± 0,434	**<0,001**
Lieky v kombinácii s alkoholom škodia.	pred edukáciou po edukácii	1,45 ± 0,613 1,19 ± 0,501	**0,001**
Keď užijem viac tabliet lieku, môže mi to uškodiť (môže vzniknúť nežiaduci účinok).	pred edukáciou po edukácii	1,42 ± 0,394 1,20 ± 0,358	**0,002**
Antibiotiká sa musia doužívať (užiť celé predpísané balenie).	pred edukáciou po edukácii	2,16 ± 1,356 1,19 ± 0,419	**<0,001**
Užívanie dvoch liekov súčasne môže meniť ich účinok.	pred edukáciou po edukácii	1,95 ± 0,725 1,30 ± 0,378	**<0,001**

priemer ± SD vypočítaný pre údaje z Likertovej škály: 1 = áno, 2 = skôr áno, 3 = neviem posúdiť, 4 = skôr nie, 5 = nie, nižšie skóre predstavuje vyšší súhlas,
p – vypočítaná štatistická významnosť podľa párového t-testu, ktorý bol použitý na porovnanie priemerných skóre pred a po edukácii v jednotlivých Likertových položkách, zvýraznené hodnoty predstavujú štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$).

predávkovania sa, o škodlivosti kombinovania liekov s alkoholom, o možnej zmene účinku liekov pri ich kombinovaní, o nutnosti doužívať celé predpísané balenie antibiotík aj o možnom vzniku závislosti pri dlhodobom užívaní niektorých kvapiek do nosa. Mnohí však označili pri vedomostných otázkach odpoveď „neviem". Rovnako to bolo aj pri prieskume vedomostí v USA a na Malte (11, 12).

Menej ako polovica adolescentov si bola pred edukáciou vedomá rizika pri užívaní liekov proti bolesti, čo koreluje s výsledkami práce od Wilsonovej z roku 2010, ktorá skúmala vedomosti 14- až 20-ročných adolescentov o analgetikách vydávaných bez lekárskeho predpisu (4).

Pri všetkých tvrdeniach o vedomostiach o liekoch je možné jasne vidieť pozitívny efekt edukácie, keďže väčšina respondentov vyjadrila vyšší súhlas s tvrdeniami, čo sme v našom prípade považovali za správne odpovede. Rovnako štúdia v USA, ktorej

súčasťou bola 30-minútová edukácia realizovaná farmaceutmi, pozorovala zlepšenie vedomostí adolescentov v každej z oblastí ako aj celkovo, čo zdôrazňuje úlohu farmaceuta aj jeho kompetenciu realizovať takéto vzdelávania (6).

V našom výskume sme zistili, že adolescenti majú nedostatočné vedomosti o účinkoch a nežiaducich účinkoch liekov. Online edukácia významne zlepšila vedomosti adolescentov o liekoch. Výsledky práce môžu byť podkladom pre interaktívny program edukácie o liekoch pre rôzne vekové skupiny detí pripravený v spolupráci s farmaceutmi, pedagógmi a štátnymi inštitúciami zodpovednými za vzdelávanie a zdravie obyvateľov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hämeen-Anttila K, Bush PJ: Healthy children's perceptions of medicines: A review. Res Social Adm Pharm [online] 4, s. 98 – 114, 2008
2. Klimaszová, Z, Fazekaš T, Kuželová M: Adolescents' knowledge and perception of medicine risk. Pediatr Int [online] 60, s. 735 – 742, 2018
3. Aston J, Wilson KA, David R. P. Terry D: The treatment-related experiences of parents, children and young people with regular prescribed medication. Int J Clin Pharm 41, s. 113 – 121, 2019
4. Wilson KM, Singh P, Blumkin AK, Dallas L, Klein JD: Knowledge gaps and misconceptions about over-the counter analgesics among adolescents attending a hospital-based clinic. Acad Pediatr [online] 10, s. 228 – 232, 2010
5. Hanghøj S, Boisen KA: Self-reported barriers to medication adherence among chronically ill adolescents: a systematic review. J Adolesc Health 54, 121 – 138, 2014
6. Recchiuti K, Malone MK, Zimmerman B: School program improves adolescents' knowledge of responsible medicine use. Health Behav Policy Rev 5, s. 98 – 115, 2018
7. Hämeen-Anttila K, Airaksinen M, Vainio K, Bush PJ, Ahonen R: Developing a medicine education program in Finland: lessons learned. Health Policy [online] 78, s. 272 – 283, 2006
8. 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 [online] 52, s. 90 – 104, 2014
9. Videto DM, Dake JA: Promoting health literacy through defining and measuring quality school health education. Health Promot Pract 20, s. 824 – 833, 2019
10. Klimaszová Z, Fazekaš 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 63, s. 3 – 35, 2006
11. Darmanin Ellul R, Cordina M, Buhagiar A, Fenech AG, Mifsud J: Knowledge and sources of information about medicines among adolescents in Malta. Pharm Pract (Granada) [online] 6, s. 178 – 186, 2008.
12. Kelly T, Conn KM, Zak M: Evaluation of over-the-counter medication knowledge and literacy in adolescent students. Academic Pediatr 18, s. 556 – 562, 2018

Ján Klimas
(zostavovateľ)

POKROKY VO FARMAKOLÓGII
V SLOVENSKEJ REPUBLIKE XVII

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, 2022
Jazyková redakcia: autori
Technická redakcia:
Tlač: DOLIS GOEN, s. r. o., Bratislava

Rozsah 45 strán, 3,19 AH, prvé vydanie, náklad

ISBN 978-80-223-5483-7 (tlač)
ISBN 978-80-223-5484-4 (online)