

Univerzita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta

Zánět a mechanismy jeho rezistence na kortikoidy

Doktorská dizertační práce

MUDr. Jan Potěšil

Olomouc 2013

Téma doktorské dizertační práce: Zánět a mechanizmy jeho rezistence na kortikoidy

Student doktorského studia: MUDr. Jan Potěšil

Školitel: prof. MUDr. František Kopřiva, Ph.D.

Školící pracoviště: Dětská klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc

Doktorský studijní program: Pediatrie

Prohlášení: Prohlašuji, že práci na tomto projektu jsem vykonal samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Projekt byl realizován v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnici Olomouc pod odborným dozorem vedoucího Laboratoře experimentální medicíny doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D., vedoucího laboratoře buněčné biologie Laboratoře experimentální medicíny MUDr. Petra Džubáka, Ph.D. a hlavně pod odborným vedením svého školitele prof. MUDr. Františka Kopřivy, Ph.D. V závěrečné fázi byl projekt realizován v nástupnické organizaci Laboratoře experimentální medicíny – Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Poděkování: Úpřímně děkuji všem, kteří mi pomohli a byli vždy ochotni pomoci s realizací mého výzkumného projektu, a to jak kolegům z laboratoří a klinických pracovišť, zejména MUDr. Petru Džubákovi, Ph.D., MUDr. Marku Godavovi a MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D., tak hlavně svému školiteli prof. MUDr. Františku Kopřivovi, Ph.D., za cenné rady, trpělivost, vstřícnost, za podporu a pomoc i v (pro mne) nejkritičtějších okamžicích studia, stejně jako prof. MUDr. Vladimíru Mihálovi, CSc. a doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D., za cenné rady, podporu a hlavně trpělivost. Ze všeho nejvíce ale děkuji své rodině za důvěru, trvalou podporu a všestrannou pomoc.

Práce na tomto projektu byla podporována granty: IGA NR8954-3/2006, EEA Financial Mechanism CZ0099, MSM 6198959216, IGA UP LF_2013_016, Biomedreg CZ.1.05/2.1.00/01.0030.

V Olomouci 14.10.2013

Jan Potěšil

Obsah (1)

1. Teoretická část	8
1.1 Téma a zaměření doktorské dizertační práce	8
1.2 Zánět	8
1.2.1 Základní charakteristika	8
1.2.2 Složky imunitního systému	8
1.2.3 Imunitní systém v „informační soustavě“	10
1.2.4 Transportní systémy „informační soustavy“	11
1.2.5 Protein vícečetné lékové rezistence 1	12
1.2.6 Fáze zánětu	13
1.3 Endogenní kortikoidy	16
1.3.1 Endogenní glukokortikoidy	
1.3.2 Vliv glukokortikoidů na imunitní systém - mechanismus účinku a ovlivnění komunikace mezi složkami	17
1.4 Exogenní glukokortikoidy	19
1.4.1 Vliv glukokortikoidů na imunitní systém - ovlivnění nespecifické a specifické složky	19
1.4.2 Stručná charakteristika exogenních glukokortikoidů	20
1.4.3 Farmakokinetika (absorbce, distribuce, metabolismus a exkrece) a farmakodynamika exogenních glukokortikoidů ve vztahu k MDR1 proteinu	21
1.4.4 Exogenní glukokortikoidy a lékové interakce	21
1.4.5 Glukokortikoidní rezistence	22
1.5 Alergická imunopatologická aktivita	24
2. Experimentální část	25
2.1 Cíle práce	25
2.2 Materiál a metody	25
2.2.1 Materiál	25
2.2.2 Izolace a fixace mononukleárních buněk periferní krve	26
2.2.3 Permeabilizace mononukleárních buněk, analýza MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve průtokovou cytometrií, metodou nepřímé imunofluorescence	27

Obsah (2)

2.2.4	Statistická analýza	28
2.3	Výsledky	28
2.3.1	Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve - u zdravých jedinců - na věku	28
2.3.1.1	Výsledky a publikování výsledků studie	28
2.3.2.	Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganizmu u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)	29
2.3.2.1	Výsledky a publikování výsledků studie	30
2.3.3	Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na inhalačně aplikovaný glukokortikoid - budesonid - u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)	31
2.3.3.1	Výsledky a publikování výsledků studie	32
2.3.4	Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na systémově aplikovaná piperazinová antihistaminika druhé generace (cetirizin dihydrochlorid a levocetirizin dihydrochlorid) u jedinců s alergickým zánětem	33
2.3.4.1	Výsledky a publikování výsledků studie	34
2.3.4.2	Výsledky a publikování výsledků studie	36
3.	Anotace	37
3.	Summary	38
4.	Seznam použité literatury	39
5.	Přehled publikací autora	46
6.	Přílohy	48
6.1.	Příloha 1	48
6.2	Příloha 2	50
6.3	Příloha 3	52
6.4	Příloha 4	54
6.5	Příloha 5	56

Seznam použitých zkratek (1)

ACTH	adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotropic hormone) kortikotropin
ABC	ATP vázající doména (ATP-binding cassette)
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
APC	buňka prezentující antigen (antigen presenting cell) buňka předkládající antigen
CBG	globulin vázající kortikoidy (corticosteroid-binding globulin) transkortin
CRH	kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)
ECP	eosinofilní kationický protein (eosinophilic cationic protein)
EDN	eozinofily derivovaný neurotoxin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraocotová
EPO	eozinofilní peroxidáza
GC	glukokortikoidy (glucocorticoids)
GC-GR α	glukokortikoid-glukokortikoidní receptor α (glucocorticoid-glucocorticoid receptor α)
G-CSF	faktoru stimulující granulocytární kolonie (granulocyte-colony stimulating factor)
GR	glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor)
hGR gene	gen pro glukokortikoidní receptor (human glucocorticoid receptor gene, <i>hGR</i> gene)
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	hlavní lidský histokompatibilní systém (human leukocytes antigens) hlavní komplex lidských histokompatibilních antigenů (human leukocyte antigen complex)
HSC	hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell)
HSP	heat shock protein

Seznam použitých zkratek (2)

IFN	interferon
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukin
MBP	hlavní bazický protein (major basic protein)
MDR1	protein vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1)
PBS	fosfátový fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
RFU	relative fluorescence units
SLE	systemový lupus erythematosus
TCR	receptor lymfocytu T (T-cell receptor) T lymfocytární receptor pro antigen
TNF	tumor nekrotizující faktor faktor nekrotizující nádory

1. Teoretická část

1.1 Téma a zaměření doktorské dizertační práce

Tématem zadané a nyní předkládané doktorské dizertační práce je: Zánět a mechanismy jeho rezistence na kortikoidy. Experimentální část práce byla zacílena na výrazně uží a zatím nedostatečně prozkoumanou oblast možné kortikoidní rezistence u zánětlivé reakce – transmembránový buněčný transport. Cíleně byl studován protein podílející se na buněčném primárním aktivním transmembránovém transportu – protein vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1) (kapitola 2.1 Cíle práce).

Tento protein nejenže fyziologicky působí jako imunoregulátor, ale může být i příčinou kortikoidní rezistence v terapii chronických zánětlivých onemocnění. Buňkami, na které byla v rámci výše uvedeného tématu zaměřena experimentální pozornost, byly lymfocyty periferní krve. Lymfocyty jsou pro svou ústřední koordinační, regulační a efektorovou roli v regulaci zánětlivé reakce také důležitými cílovými buňkami pro kortikoidní léčiva aplikovaná z imunomodulační indikace. Neméně významné bylo zaměření experimentální části práce na co nejvíce homogenizovanou skupinu subjektů. Cílovými subjekty byli: 1) zdraví jedinci převážně z dětské populace do 19 let (a výjimečně jedinci do 22,5 let); 2) jedinci z dětské populace do 19 let s perzistující zánětlivou aktivitou, která je dobře definována a klasifikována a není v dětské populaci ojedinělá – jedinci s alergickým zánětem mediovaným imunoglobuliny třídy E (IgE).

Z výše uvedených důvodů je v teoretické části stručně prezentován zánět (zánětlivá reakce) včetně významu proteinu vícečetné lékové rezistence 1 a lymfocytů v zánětlivé reakci. Jsou charakterizovány endogenní a exogenní kortikoidy a jejich imunomodulační působení na zánětlivou reakci, se stručnou charakteristikou alergického zánětu. Podrobněji jsou uvedeny známé nebo předpokládané molekulární mechanismy kortikoidní rezistence u průduškového astmatu – v přehledovém článku, jehož jsem prvním autorem (příloha 4).

V tomto přehledovém článku jsou charakterizovány základní principy klasifikace astmatu a jeho komplexní léčebná strategie.

1.2 Zánět

1.2.1 Základní charakteristika

Zánět (zánětlivá reakce) je komplexní adaptační odpověď nejen lidského makroorganismu na nepříznivé podněty. Nepříznivými podněty mohou být např. zevní biologické (infekční, enzymatické), fyzikální (látkové, iritační) a chemické podněty, ale také vnitřní biologické podněty vlastního makroorganismu dané nedostatečnou nebo neadekvátní kontrolou dějů makroorganizmem.

Zjednodušeně můžeme zánětlivou reakci charakterizovat jako reakci na jakékoliv nepříznivé podněty, které by mohly poškodit integritu a narušit homeostázu makroorganismu (Krejsek et al., 2004). Přestože zánětlivá reakce makroorganismu významně metabolicky zatěžuje, je z fylogenetického hlediska jednou z nejstarších adaptačních odpovědí na takto chápané nepříznivé podněty (Krejsek et al., 2004).

Na úrovni makroorganismů se na zánětlivé reakci podílí hlavně systém imunitní, endokrinní a nervový, přičemž působení těchto systémů se vzájemně překrývá. Tím je docíleno komplexních „identifikačních“, „regulačních“, „koordinačních“ a „efektorových“ aktivit makroorganismu. Neméně významnou rolí v zánětlivé reakci mají i další systémy makroorganismu.

1.2.2 Složky imunitního systému

Fyziologické složky imunitního systému podílející se na těchto aktivitách se velmi schématicky člení na: 1) lymfatické orgány a tkáň; 2) nespecifické humorální a buněčné složky; 3) specifické humorální a buněčné složky; 4) komunikaci mezi složkami (tabulka 1) (Bartůňková et al., 2007).

Tabulka 1. Schématické členění fyziologických složek imunitního systému
(upraveno podle Krejsek et al., 2004, Bartůňová et al., 2004)

Lymfatické orgány a tkáně	
centrální lymfatické orgány	<ul style="list-style-type: none"> kostní dřeň thymus
periferní lymfatické orgány	<ul style="list-style-type: none"> slezina lymfatické uzliny lymfatická tkáň asociovaná se sliznicemi (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)
Nespecifické složky	
humorální složky	<ul style="list-style-type: none"> komplementový systém lektin vázající manózu C-reaktivní protein (CRP) sérový amyloidový protein (SAP) přirozené protilátky
buněčné složky	<ul style="list-style-type: none"> fagocytující buňky <ul style="list-style-type: none"> eosinofilní granulocyty neutrofilní granulocyty monocyty z monocytů diferencující se makrofágy dendritické buňky (v určité fázi diferenciaci) buňky NK (přirození zabíječi) lymfocyty <ul style="list-style-type: none"> T lymfocyty s T receptorem typu γ/δ (CD3+CD4-CD8-) nuocyty NHC buňky (natural helper cells, NHC) multi-potent progenitor type 2 cells (MPP type 2) innate type 2 helper cells (Ih2) volně zařazené <ul style="list-style-type: none"> invariable natural killer T cells (iNKT) mucosal-associated invariant T (MAIT) innate lymphoid cells 22 (ILC22)
Specifické složky	
humorální složky	<ul style="list-style-type: none"> imunoglobuliny (produkty plazmocytů diferencovaných z B lymfocytů) <ul style="list-style-type: none"> Imunoglobulin M (IgM) Imunoglobulin D (IgD) Imunoglobulin A (IgA) Imunoglobulin G (IgG) Imunoglobulin E (IgE)
buněčné složky	<ul style="list-style-type: none"> T lymfocyty B lymfocyty
Komunikace mezi složkami	
adhezivní molekuly	
cytokiny	<ul style="list-style-type: none"> prozánětlivé (podporují zánětlivou reakci) <ul style="list-style-type: none"> interleukin-1α (IL-1α), IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF-α protizánětlivé (inhibují zánětlivou reakci) <ul style="list-style-type: none"> IL-4, IL-10, TGF-β
eikosanoidy	

1.2.3 Imunitní systém v „informační soustavě“

V procesu zánětlivé reakce (i mimo tento proces) působí imunitní systém nejen identifikačně, regulačně, koordinačně a efektorově, ale hlavně „komunikačně“ (informačně), kdy v makroorganizmu působí v rámci „informační soustavy“ (Krejsek et al., 2004). Do této informační soustavy jistě patří i složky jiných systémů, např. endokrinního a nervového. V informační soustavě dochází (během zánětlivé reakce i mimo ni) k četným dílčím variabilním interakcím, které mohou být kontinuální nebo intervalové, ale nakonec jsou ve svém důsledku vždy komplexní a systémové. K interakcím dochází jak mezi složkami imunitního systému, tak i se složkami (a mezi složkami) ostatních systémů makroorganizmu. Tyto interakce jsou fyziologicky regulovány a aktivita imunitního systému je tak makroorganizmem „kontrolována“. Při nedostatečné nebo neadekvátní kontrole aktivity imunitního systému (s rozvojem zánětlivé aktivity) dochází k rozvoji patologické (imunopatologické) aktivity (reaktivity).

Komunikace mezi složkami systémů makroorganizmu je zprostředkována především zástupci systému endokrinního a imunitního. Z imunitního systému jsou to převážně ti zástupci, kteří jsou schématicky členěni do tzv. komunikace mezi složkami (tabulka 1). Zástupci z komunikace mezi složkami nejenže se složkami systémů komunikují, ale „úrovni komunikace“ i regulují aktivitu buněčných, a následně humorálních složek všech zúčastněných systémů. Mezi takto chápané zástupce jsou řazeny především: 1) molekuly vázané v biomembránách buněk - adhezivní molekuly; 2) molekuly, které jsou buňkami sekretovány (z buňky transportovány) a schopné „volného“ pohybu v prostoru mimo buňku, jsou souhrnně označovány jako humorální mediátory (lipidové a proteinové).

Lipidové mediátory jsou většinou tvořeny procesem tzv. lipidové remodelace z fosfolipidů tvořících biomembrány buňky. Lipidovými mediátory jsou např. eikosanoidy, produkty metabolismu (metabolity) kyseliny arachidonové. Kyselina arachidonová je syntetizována z fosfolipidů (fosfatidylinositolů) aktivitou celé „rodiny“ fosfolipáz, např. fosfolipázy A_2 (phospholipase A_2 , PLA_2). Z kyseliny arachidonové vznikají aktivitou 5-lipooxygenázy leukotrieny, a aktivitou cyklooxygenázy prostanoidy (prostaglandiny a tromboxany). Z fosfolipidů biomembrány buňky (na jejichž metabolismu se také podílí PLA_2) mohou vznikat i další lipidové mediátory, např. aktivitou 15-lipooxygenázy lipoxiny nebo aktivitou lysofosfatidylcholin acetyltransferázy destičky aktivující faktor (platelet-activating factor, PAF). Tyto lipidové mediátory mohou být podle funkční (regulační) aktivity děleny na tzv. prozánětlivé (zánětlivou reakci indukují (podporují)) a protizánětlivé (zánětlivou reakci inhibují).

Proteinovými mediátory jsou např. cytokiny, které jsou exprimovány většinou buněk makroorganizmu. Schématicky jsou členěny do jednotlivých skupin, většinou podle strukturálního nebo funkčního hlediska. Významnými funkčními skupinami jsou tzv. prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny. Cytokiny mohou být označovány buď názvy historickými a funkčními (proto se setkáváme s označením cytokinů pod pojmy interleukiny, chemokiny, adipokiny, interferony, faktory nekrotizující nádory a růstové faktory hematopoetických buněk (Krejsek et al., 2004) (Bartůňková et al., 2007), nebo názvy nomenklaturními. Cytokiny regulují (ovlivňují) v obecném chápání aktivitu buňky ve vztahu ke „vzdálenostem“ v makroorganizmu: 1) autokrinně (ovlivňuje aktivitu buňky, která aktivuje jeho proteinovou expresi); 2) parakrinně (ovlivňuje buněčnou aktivitu buněk, nacházejících se v mikroprostředí jeho proteinové exprese (sekrece)); 3) endokrinně (nebo také systémově; po transportu cévním řečištěm působí na buňky v tkáních vzdálených od místa jeho primární sekrece). Obdobně můžeme rozdělit i působení cytokinů na: 1) pleiotropní (ovlivňuje aktivitu několika různých buněk); 2) kaskádové (jeden konkrétní cytokin indukuje expresi a (a nebo) sekreci jiného konkrétního cytokinu); 3) redundantní (některé konkrétní cytokiny mohou být v indukci (nebo inhibici) signálu nahrazeny jinými konkrétními cytokiny) (Bartůňková et al., 2007). Většinou je k cílovému cytokinovému ovlivnění aktivity buňky nezbytná interakce buňky s různými (konkrétními) cytokiny, kdy je navíc k ovlivnění aktivity buňky nutné působení mnohých (četných) cytokinů reprezentujících konkrétní cytokin.

Humorálních mediátorů je velké množství, v zánětlivé reakci jsou z proteinů významně zastoupeny např. ještě kininy (např. bradykinin s vazodilatačním účinkem) a endoteliny, nebo také histamin, serotonin a adenosin.

Humorální mediátory působí na jednotlivé složky systémů makroorganismu prostřednictvím receptorů, které iniciují indukci (transdukci), nebo inhibici signálu. Tyto receptory jsou většinou integrovány (vázány) do cytoplazmatické membrány buněk, mohou ale také být přítomny mimo buňku v solubilní formě nebo mohou být lokalizovány v buňce bez vazby s biomembránou, např. v cytoplasmě.

1.2.4 Transportní systémy „informační soustavy“

Nedílnou součástí informační soustavy jsou transportní systémy. Zvláště významné jsou transportní systémy na úrovni buňky, lokalizované v buňce podle své primární funkce. Převažuje lokalizace v buněčných biomembránách. Biomembrány vymezují jednotlivé buněčné kompartmenty, i rozhraní se zevním prostředím. Kromě toho jsou fyziologické procesy na úrovni biomembrán nezbytné k udržení buněčné homeostázy. K těmto procesům patří právě i transport (ve smyslu prostupu látek) na úrovni biomembrány.

Rozlišujeme několik typů transportu (prostupu) biologickými membránami: 1) pasivní difuze (prostá neboli volná difuze a facilitovaná neboli usnadněná difuze); 2) vstup přes membránové póry; 3) spřažený transport (symport nebo antiport); 4) vezikulární transport; 5) aktivní transport (Dostálek et al., 2004).

Aktivní transport biomembránou je transport zprostředkovaný nosičem (transportérem) – intergrálním membránovým proteinem (integrálními membránovými proteiny). Transportovaná látka je přenášena přes biomembránu proti gradientu svého elektrochemického potenciálu. Aktivní transport je z energetického hlediska velmi náročný, podílí se na asi 30 – 70 % celkových energetických potřeb buňky (v závislosti na aktivitě buňky) (Dostálek et al., 2004).

Aktivní transportní systémy se u makroorganismu dělí na: 1) primární (transportní proteiny „rodiny“ adenozin trifosfát (ATP) vázajících domén (ATP-binding cassette, ABC)); 2) sekundární; 3) terciární (mezi sekundární a terciární transportéry jsou řazeny peptidové transportéry, transportéry organických aniontů, transportéry organických kationtů) (Dostálek et al., 2004).

Transportní transmembránové proteiny ABC (ABC transportéry) dostaly svůj název podle způsobu získávání zdroje energie potřebné pro transport – štěpí ATP na adenosindifosfát (ADP) a fosfát (Pi). Toto štěpení je zajišťováno enzymy ze skupiny tzv. ATPáz. Do velké rodiny ABC transportérů je zařazováno přibližně 50 proteinů (McGuire et al., 1991) (Sharom 2008). Tato velká rodina je dělena do 7 fylogeneticky odlišných „podrodin“ (Borst et al., 2002).

ABC transportéry jsou schopny primárním aktivním transportem přenášet jak některé endogenní, tak i exogenní látky – tyto látky jsou tzv. transportovatelnými substráty ABC transportérů. Z endogenních látek jsou transportovatelnými substráty mnohé humorální lipidové i proteinové mediátory, včetně cytokinů. Doposud není zcela objasněno, zdali je transport „některých“ cytokinů mimo buňku: 1) uskutečňován přímo ABC transportéry (cytokiny jsou ABC transportovatelné substráty); 2) uskutečňován nepřímo interakcí s ABC transportéry (ABC mediovaný transport), kdy cytokiny nejsou ABC transportovatelné substráty, ale jsou substráty ABC transportéru v širším slova smyslu (pro svou interakci s ABC transportérem, s ABC transportérovým komplexem). Humorální mediátory (včetně cytokinů) také mohou ovlivňovat: 1) transportní aktivitu ABC transportéru (jsou induktory nebo inhibitory transportní aktivity); 2) ABC transportérovou expresní aktivitu buňky (jsou induktory (aktivátory) nebo inhibitory exprese ABC transportéru (expresní aktivity)). Tak se např. ABC transportéry podílí při (přímém nebo mediovaném) transportu cytokinů (v závislosti na cytokinu) na regulaci autokrinní, parakrinní, nebo endokrinní aktivity cytokinů. A autokrinní, parakrinní, nebo endokrinní aktivita cytokinů se podílí na regulaci buněčné aktivity ABC transportérů.

ABC transportéry transportují také exogenní látky (xenobiotika). Eliminace cizorodých látek z buněčného prostoru je fylogeneticky významnou „vlastností“ ABC transportérů. Tato jejich vlastnost ale mnohdy ovlivňuje farmakokinetiku léčiv. Četná léčiva jsou, jako exogenní látky,

transportovatelnými substráty. Snížení intracelulární koncentrace (intracelulární dispozice) léčiva v cílové buňce může např. vést k rezistenci na toto léčivo. Jeden konkrétní transportní protein je schopen transportovat přes biomembránu i několik, strukturně a funkčně odlišných léčiv. Právě pro tuto svou vlastnost byl první objevený ABC protein pojmenován – protein vícečetné lékové rezistence 1.

1.2.5 Protein vícečetné lékové rezistence 1

Informace o proteinu vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1), označovaného také jako ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1) nebo P-glycoprotein 1 (PGY1), a jeho vlivu na eflux mnohých cytostatických léčiv u nádorové buněčné linie, byla poprvé publikována v roce 1976 (Juliano et al., 1976). První metaanalýza, hodnotící jeho klinický význam v terapii nádorových onemocnění chemoterapeutiky, byla publikována již v roce 1993 (Éfferth et al., 1993). Postupně se prokázalo, že MDR1 může být příčinou rezistence i na jiná léčiva než na léčiva užívaná v terapii nádorových onemocnění.

Velmi důležitý posun ve vnímání fyziologické funkce MDR1 proteinu ve vztahu k imunitnímu systému byl nepřímý průkaz exprese MDR1 u lidských periferních lymfocytů v roce 1989 (Neyfakh et al., 1989). Následovaly průkazy (nepřímé, později přímé) fyziologické exprese MDR1 u dalších buněk imunitního systému, včetně buněk z nespecifických a specifických složek imunitního systému (tabulka 2). MDR1 je exprimován jen v některých buňkách orgánů nacházejících se na rozhraní tkání se zevním prostředím (sliznice dýchacích cest, sliznice tenkého a tlustého střeva), v buňkách v oblasti bariéry imunokompetentních orgánů (hemato-encefalické bariéry, hemato-testikulární bariéry, placentární bariéry) nebo v buňkách orgánů s eliminační a sekreční funkcí (jater, pankreatu, ledvin a nadledvin) (Cordon-Cardo et al., 1990).

Tabulka 2. Volné buňky ze složek imunitního systému nebo ze složek jiných systémů, exprimující MDR1

hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell, HSC)	Chaudhary et al., 1991
T lymfocyt (CD3+)	Drach et al., 1992
B lymfocyt (CD19+)	Drach et al., 1992
NK buňka (CD16+56+)	Drach et al., 1992
monocyt	Drach et al., 1992
granulocyt	Klimecki et al., 1994
makrofág	Pileri et al., 1991
dendritická buňka	Randolph et al. 1998
erytrocyt	Finstad et al., 1991

(MDR1- protein vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1))

Stejně významné bylo prokázání fyziologických transportních aktivit, kterých se MDR1 protein účastní (přímo nebo nepřímo). Z humorálních složek endokrinního systému transportuje např. kortikoidy (aldosteron, kortisol a kortison). Z humorálních složek imunitního systému se podílí na transportu proteinových mediátorů – cytokinů, transportuje např. prozánětlivé lipidové mediátory sfingosin-1-fosfát (sphingosine-1-phosphate, S1P) a PAF (tabulka 3). S1P je, mimo jiné, klíčový představitel humorálních lipidových mediátorů nervového systému. MDR1 protein, jako součást transportních systémů v informační soustavě makroorganismu, vstupuje do interakcí hlavně s imunitním, endokrinním a nervovým systémem a svou transportní (a expresní) aktivitou tyto systémy reguluje. A naopak, tyto systémy (resp. někteří zástupci z jednotlivých složek těchto systémů) jeho transportní (a expresní) aktivitu regulují (McRae et al., 2003) (Ho et al., 2006).

Tabulka 3. Příklad MDR1 mediovaného transportu endogenních látek - humorálních prozánětlivých mediátorů a kortikoidních hormonů

sfingosin-1-fosfát (sphingosine-1-phosphate, S1P)	Honig SM, et al, 2003
destičky aktivující faktor (platelet-activating factor, PAF)	Ernest S, et al, 1999
IL-2	Drach J, et al, 1996
IL-4	Drach J, et al, 1996
IL-12	Frank MH, et al, 2001
IFN- γ	Drach J, et al, 1996
TNF- α	Frank MH, et al, 2001
aldosteron	Ueda K, et al, 1992
kortisol	Yates CR, et al, 2003
	Ueda K, et al, 1992
kortison	Yates CR, et al, 2003

(MDR1 - protein vícečetné lékové rezistence (multidrug resistance protein 1))

MDR1 protein je členem B podrodiny ve velké rodině ABC transportérů. Je produktem *ABCB1* genu lokalizovaného na chromozomu 7q21.12 (Riordan et al., 1985). *ABCB1* zahrnuje 29 exonů, kdy první exon (1a a 1b) a část druhého exonu nejsou translatovány (Bodor et al., 2005). Mediátorová RNA (messenger RNA, mRNA) je včetně oblastí, které nejsou translatovány, dlouhá 4872 bp. Následný syntetizovaný protein (primární struktura) je tvořen 1280 aminokyselinami s molekulární hmotností 170 kDa. Sekundární proteinová struktura je dána dvěma homologními polovinami (každá je složena z 610 aminokyselin) spojených řetězcem (z 60 aminokyselin). Pomocí 6 transmembránových domén je integrován do biomembrán buněk – hlavně cytoplazmatické membrány, ale může být integrován i v biomembránách jednotlivých buněčných kompartmentů (Rajagopal et al., 2003). (Další informace o MDR1 proteinu budou uváděny postupně - v teoretické a experimentální části práce).

1.2.6 Fáze zánětu

Velmi zjednodušeně může být v časovém schématu zánětlivá reakce rozdělena na 3 fáze (Krejsek et al., 2004). Na fázi iniciační, vrcholnou a reparační.

Iniciační fáze zánětlivé reakce je spouštěna bezprostředně po nepříznivém podnětu, kdy je tento nebezpečný podnět identifikován, trvá hodiny až dny a podílí se na ni jak složky imunitního systému (převážně nespecifické, tabulka 1), tak složky ostatních systémů (např. kardiovaskulárního systému, koagulačního a fibrinolytického systému krve). Pro tuto fázi je charakteristická rychlá amplifikace odpovědi imunitního systému.

Vrcholná fáze nastává v odstupu dnů (a většinou méně než 1 týdne). Hlavní aktivitu v této fázi mají specifické složky imunitního systému (tabulka 1), především pak T lymfocyty. Tato fáze je velmi důležitá pro dokončení adaptační odpovědi organismu a současně vytváří podmínky pro rozvoj tzv. imunologické paměti. Vrcholná fáze začíná v periferních lymfatických orgánech (tabulka 1), do kterých migrovaly buněčné nespecifické složky imunitního systému (především dendritické buňky). Tyto buněčné nespecifické složky, schopné prezentovat zpracované antigeny v sekundárních lymfatických orgánech buněčným specifickým složkám (hlavně T lymfocytům) v kontextu molekul hlavního lidského histokompatibilního systému (human leukocytes antigens, HLA) I. a II. třídy, jsou označovány jako antigen prezentující buňky (antigen presenting cell, APC). Antigen, který je takto prezentován, musel být v iniciační fázi „detekován, posouzen a zpracován“ nespecifickou složkou imunitního systému v souvislosti s úvodním nepříznivým podnětem.

Na regulaci iniciační i vrcholné fáze se svou transportní (a expresní) aktivitou účastní i MDR1 protein. Pokud je jeho transportní aktivita u dendritických buněk (lidských kožních

dendritických buněk) zablokována, nejsou dendritické buňky schopny migrace do lymfatických uzlin (Randolph et al., 1998)

Buněčné specifické složky jsou ústřední regulační a efektorovou součástí imunitního systému. V této regulačně-efektorové aktivitě mají centrální roli T lymfocyty. Po ukončení diferenciaci v thymu T lymfocyty jako imunokompetentní T lymfocyty migrují cévním řečištěm, prostupují do periferních lymfatických orgánů a opakovaně přes lymfatické tkáně migrují zpět do cévního řečiště. Tzv. naivní T lymfocyty, které neměly kontakt s antigenem, mohou prostupovat cévním řečištěm mezi buňkami vysokého endotelu postkapilárních venul. T lymfocyty, které již měly kontakt s antigenem a jsou „aktivované“, mohou prostupovat mezi „jakýmkoliv“ buňkami endotelu, je-li endotel aktivován. MDR1 ovlivňuje (reguluje) i migraci T lymfocytů – změnou transportní aktivity pro PAF (Raggers et al., 2001) a S1P (Honig et al., 2003)

Velmi zjednodušeně – komplexní mechanismus indukčních a inhibičních interakcí mezi APC a T lymfocyty v periferních lymfatických orgánech (v době vytvoření tzv. imunologické synapse) může vést k antigen-specifické aktivaci T lymfocytu - při dostatečné úrovni (aktivitě) aktivačních signálů prostřednictvím membránových interakcí tzv. I. signálu (receptorových interakcí prostřednictvím T lymfocytárního receptoru pro antigen (T-cell receptor, TCR (TCR $\alpha\beta$), který je asociovaný s komplexem CD3) s antigenem prezentovaným na molekulách HLA APC) a kostimulačních, akcesorních a adhezních membránových interakcí tzv. II. signálu, realizovaných v optimálním cytokinovém mikroprostředí. Aktivované, antigen specifické T lymfocyty podstupují klonální expanzi a migrují do cévního řečiště, ze kterého v místě aktivace endotelu mohou prostoupit do tkáně mimo cévní řečiště. Takto aktivované T lymfocyty dokáží identifikovat i antigeny zpracované a předkládané jinými buňkami než APC. Interakci mezi APC a T lymfocyty také může (teoreticky, na úrovni kostimulačních interakcí) ovlivňovat transportní (a expresní) aktivita MDR1 proteinu, např. pro schopnost mediovat transport cytokinu IL-2.

Schématicky je populace T lymfocytů (CD3+) rozdělována na subpopulaci pomocných induktorových T lymfocytů s povrchovou expresí molekuly CD4 (CD3+CD4+) a tlumivých cytotoxických T lymfocytů s povrchovou expresí molekuly CD8 (CD3+CD8+). Toto schématické (a spíše didaktické) dělení plně neodpovídá skutečnosti v zastoupení lymfocytů v krevním řečišti – asi 1-2% T lymfocytů může exprimovat CD4 i CD8 (CD3+CD4+CD8+) nebo neexprimují ani CD4, ani CD8 (Krejsek et al., 2004). CD4 a CD8 molekuly jsou hlavně koreceptorovými molekulami v procesu identifikace antigenu v kontextu HLA systému. Zjednodušeně - zpracované antigeny jsou předkládány v kontextu molekul II. třídy HLA systému a tyto komplexy jsou schopny identifikovat CD3+CD4+ lymfocyty, nebo antigeny mohou být předkládány v kontextu molekul I. třídy HLA systému a tyto komplexy identifikují CD3+CD8+ lymfocyty. Tak se subpopulace CD3+CD8+ lymfocytů podílí převážně na tlumivé nebo cytotoxické efektorové aktivitě (např. destrukcí virem infikované buňky). Aktivované T lymfocyty CD3+CD8+ mají zvýšenou expresi MDR1 (Gupta et al., 1992). A naopak aktivované T lymfocyty CD3+CD4+ expresi MDR1 snižují (inhibují) (Donnenberg et al., 2004)

T lymfocytární pomocná induktorová subpopulace CD3+CD4+ je dále schématicky dělena na Th₁, Th₂, Th₁₇ a T_{reg} imunoregulačních subsetů (Kopřiva et al., 2012). Tyto subsety se od sebe liší svou aktivitou, hlavně pak expresní (a sekreční) cytokinovou aktivitou. Th₁ T lymfocyty se podílí na regulačně-efektorové aktivitě cílené především intracelulárně (s intracelulární lokalizací antigenu) a Th₂ T lymfocyty na regulačně-efektorové aktivitě cílené především extracelulárně (s extracelulární lokalizací antigenu).

Předpokládá se, že preferenční je diferenciaci lymfocytů do Th₁ subsetu. Stejně tak se předpokládá, že týž lymfocyt může (vlivem celé řady k tomu určujících interakcí) přecházet změnou své buněčné aktivity do jednotlivých subsetů (Krejsek et al., 2004). Subset Th₁ T lymfocytů je charakterizován expresí cytokinů interferonu- γ (IFN- γ) a interleukinu-2 (IL-2) (Krejsek et al., 2004) (Kopřiva et al., 2012). K diferenciaci T lymfocytů do subsetu Th₁ je nutná např. přítomnost cytokinů IL-1, IL-12, IL-18, IL-27 a IFN- γ (Krejsek et al., 2004) (Kopřiva et al., 2012). Pro diferencovaný Th₂ subset T lymfocytů je charakteristická exprese cytokinů IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-25 a faktoru stimulujícího granulocytární kolonie (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) (Krejsek et al., 2004) (Kopřiva et al.,

²⁰¹²). K diferenciaci do Th₂ subsetu je nutné cytokinové mikroprostředí s „dostatečnou“ koncentrací IL-4 a IL-13 (Krejsek et al., 2004). Th₁₇ T lymfocyty sekretují IL-17A, IL-17F, IL-21 a IL-22 (Kopřiva et al., 2012) a diferenciaci do Th₁₇ subsetu iniciuje např. IL-1, IL-6, IL-21 (Kopřiva et al., 2012). T_{reg} sekretují hlavně IL-10 a tumor nekrotizující faktor β (TNFβ) (Kopřiva et al., 2012). Podle převažující cytokinové exprese jsou odlišovány i další subpopulace buněčně specifických pomocných indukčních T lymfocytů, např. lymfocyty Th₅, Th₉ nebo Th₂₂ T lymfocyty. Z výše uvedeného výčtu je zřejmé, že transportní (a expresní) aktivita MDR1 se také podílí na diferenciaci T lymfocytů do jednotlivých imunoregulačních subsetů.

Th₂ subset lymfocytů v periferních lymfatických orgánech může vytvořit funkční imunologickou synapsi s B lymfocyty (komplexní mechanismus indukčních a inhibičních interakcí mezi Th₂ lymfocytem a B lymfocyttem), která vede k antigen specifické aktivaci B lymfocytu – jeho klonální expanzi a diferenciaci do stádia plazmatické buňky, stejně jako k tzv. izotypovému přepnutí syntézy řetězců imunoglobulinů a následné produkci antigen specifických protilátek různých izotypů (tříd) imunoglobulinů. Tím se Th₂ subset, ale hlavně B lymfocyty, podílí na protilátkové, antigen specifické „odpovědi“ imunitního systému.

Imunoglobuliny jsou děleny, na základě rozdílů v tzv. těžkém řetězci (který je součástí řetězce imunoglobulinů), do třídy G (IgG, s těžkým řetězcem γ, a do podtříd IgG₁-IgG₄), třídy M (IgM, s těžkým řetězcem μ), třídy A (IgA, s těžkým řetězcem α, a do podtříd IgA₁ a IgA₂), třídy D (IgD, s těžkým řetězcem δ) a třídy E (IgE, s těžkým řetězcem ε) (Krejsek et al., 2004). Antigen specifické protilátky IgE jsou pro svou účast v zánětlivé reakci u tzv. alergických zánětlivých onemocnění (tj. onemocnění s tzv. alergickou zánětlivou reakcí – alergickou imunopatologickou reakcí – alergickým zánětem) často označovány jako alergen specifické IgE protilátky. Pokud se antigen specifické protilátky třídy IgE podílí na zánětlivé reakci (na alergickém zánětu), bývá tato zánětlivá reakce označována jako IgE mediovaná (zprostředkovaná). Alergický zánět může, ale nemusí být zprostředkovaný IgE protilátkami. Pokud je alergický zánět IgE mediováný, spouští interakce mezi antigen specifickými IgE protilátkami (navázanými na receptorech pro tyto protilátky, tj. receptorech pro Fc fragment (oblast) ε, Fc_εRI receptorech) a antigenem signální transdukcí (často označovanou jako síť signálních cest) aktivující buňky (Kopřiva et al., 2012). Z buňky se uvolní mnohé humorální mediátory, včetně histaminu. Proteosyntézu IgE indukují cytokiny IL-4 nebo IL-13, a cytokiny IL-5, IL-6 a TNFα se svou aktivitou na zvýšené proteosyntéze podílejí (Kopřiva et al., 2012). Naopak, IL-8, IL-12 a transformující růstový faktor α (transforming growth factor-α, TGFα) proteosyntézu IgE inhibují (Kopřiva et al., 2012). I zde je, jen se zaměřením na MDR1 mediováný transport cytokinů (tj. IL-4, TNFα a IL-12), zřetelný význam MDR1 transportní (a expresní) aktivity na proteosyntézu IgE.

Protilátková odpověď může, ale nemusí být závislá na T lymfocytech. B lymfocyty rozpoznávají nativní antigen v jeho konformační (terciální) struktuře bez kontextu molekul HLA systému. Navíc jsou tzv. autoreaktivní B lymfocyty fyziologickou součástí imunitního systému makroorganismu a jsou za fyziologických okolností pod regulační aktivitou T lymfocytů.

Rozdílnou expresí membránových molekul a rozdílnou aktivitou se od sebe rozlišují dvě subpopulace B lymfocytů. B2 subpopulace B lymfocytů převažuje co do počtu nad B1 subpopulací (cirkulující v cévním řečišti i v periferních lymfatických orgánech). Mezi buněčnou specifickou složku bývá zařazována B2 subpopulace exprimující antigen specifické protilátky, zatímco B1 subpopulace produkující tzv. přirozené protilátky, je řazena do nespecifické buněčné složky (na „hranici“ složky) imunitního systému. Ke snížení exprese MDR1 proteinu dochází u aktivovaných B lymfocytů (Wirhns et al., 2005).

Pro úplnost, mezi nespecifickou buněčnou složku jsou řazeny i mnohé T lymfocyty – nejen CD3+ T lymfocyt exprimující TCRγδ, ale např. i „nově“ identifikované populace lymfocytů: nuocyty, natural helper cells (NHC), multi-potent progenitor type 2 cells (MPP type 2) nebo innate type 2 helper cells (Ih₂), které se podílí nejen na fyziologickém průběhu zánětlivé reakce, ale pravděpodobně i na možném imunopatologickém průběhu. Nuocyty, stejně jako MPP type 2 lymfocyty a Ih₂ lymfocyty jsou přítomny v periferních lymfatických orgánech. K těmto lymfocytům je ještě možné volně přiřadit mucosal-associated invariant T buňky (MAIT cells) reprezentující více

než 45 % populace lymfocytů v játrech, a které mají vysokou úroveň membránové exprese MDR1 proteinu. MAIT jsou charakteristické expresí invariabilního TCR receptoru a receptory NK buněk. NK buňky jsou také řazeny do nespecifické buněčné složky. NK buňky, při porovnání s T a B lymfocyty, mají výrazně vyšší expresi MDR1 proteinu (Klimečki et al., 1994) a tato zvýšená exprese se významně podílí na cytotoxické aktivitě NK buněk (Ludescher et al., 1998).

Reparační fáze začíná dny (časná fáze reparační fáze) a trvá týdny (pozdní fáze reparační fáze) od začátku zánětlivé reakce. V této fázi dochází k reparaci a eliminaci změn, které vyvolal nejen nepříznivý podnět iniciující zánětlivou reakci, ale hlavně změn, které vyvolala samotná zánětlivá reakce. V této fázi je velmi významná adekvátní regulace aktivity jak systému imunitního, tak ostatních systémů makroorganismu. Součástí této fáze je např. inhibice buněčné antigen specifické T lymfocytární aktivity, která je stejně důležitá, jako její indukce ve vrcholné fázi. Možnými mechanismy je např. postupná eliminace antigenních podnětů, snížená exprese kostimulačních molekul účastnících se T lymfocytárních interakcí, nebo zvýšená exprese inhibičních signálních molekul aktivovanými T lymfocyty (např. CD152). Dalším mechanismem je proces tzv. signální T deprivace lymfocytů, kterého se účastní složky nespecifické imunity (inhibicí transdukce signálů, zprostředkovanou jednak inhibicí exprese a aktivace membránových receptorů, tak i inhibicí sekrece a aktivace tzv. prozánětlivých cytokinů) – na tomto procesu se opět svou transportní (a expresní) aktivitou podílí MDR1 protein. Jinou možností je tzv. programovaná buněčná smrt u aktivovaných T lymfocytů, které např. zvýšeně exprimují molekuly asociované s procesem apoptózy (např. CD95 (Apo/Fas)) (Krejsek et al., 2004). I na regulaci programované buněčné smrti lymfocytů se svou transportní aktivitou podílí MDR1 protein (Johnstone et al., 2000).

Nejen ve smyslu fyziologické regulace zánětlivé aktivity, ale i v kontextu současného vnímání imunopatologické aktivity zánětlivé reakce se jeví reparační fáze zánětlivé reakce jako klíčová. A neméně významný se jeví, v regulaci zánětlivé aktivity, podíl proteinu MDR1. Chronická (nebo periodická) zánětlivá onemocnění jsou obecně následkem nedostatečné nebo neadekvátní regulace zánětlivé aktivity makroorganismem. Reparační fáze tak může trvat měsíce, ale většinou roky od začátku zánětlivé reakce. U těchto onemocnění je pro nedostatečnou nebo neadekvátní regulaci zánětlivé aktivity užíván zastřešující termín imunopatologická aktivita (imunopatologická reaktivita) a tato imunopatologická aktivita může být podle převažujícího imunopatologického hlediska „hrubě“ dělena např. na autoimunitní, autoinflamatorní nebo alergickou imunopatologickou aktivitu. V rozvoji alergické imunopatologické aktivity – u chronických alergických zánětlivých onemocnění – mají rozhodující úlohu Th₂ (CD3+CD4+) pomocné induktorové T lymfocyty. Naopak T_{reg} (CD3+CD4+) pomocné induktorové T lymfocyty modulují (inhibují) v konečném důsledku alergickou imunopatologickou aktivitu - např. IgE mediovanou – sekrecí TGFβ, který inhibuje proteosyntézu IgE (proteosyntézu IgG₄ protilátek „blokuje“ IgE T_{reg} indukují) (Kopřiva et al., 2012).

Imunitní systém a jeho aktivitu je nutno posuzovat v širokém kontextu informační, identifikační, regulační a efektorové soustavy makroorganismu, kdy svým působením nejen ovlivňuje, ale je sám ovlivňován velmi „sofistikovanými“ interakcemi s vnitřním a zevním prostředím makroorganismu. Jednou z těchto sofistikovaných interakcí je například již zmíněná interakce mezi systémy makroorganismu, mezi systémem imunitním a endokrinním. Endokrinní systém v takovéto interakci může působit jako imunoregulátor - prostřednictvím endogenních kortikoidů s především tzv. glukokortikoidním účinkem – glukokortikoidů.

1.3 Endogenní kortikoidy

Kůra nadledvin (u lidí) produkuje více než padesát steroidních látek, z nichž jen některé mají významnou hormonální aktivitu. Tyto steroidní látky se schematicky dělí na dvě základní skupiny: androgeny (anabolické a pohlavní hormony) a kortikoidy (kortikosteroidy, kortikoidní hormony). Podle převažujícího působení na metabolismus minerálů (mineralotropní účinek) nebo glukózy (glukotropní účinek) jsou kortikoidy označovány jako mineralokortikoidy a glukokortikoidy. Mezi mineralokortikoidy patří aldosteron a deoxykortikosteron, mezi glukokortikoidy patří kortisol, kortison a kortikosteron.

1.3.1 Endogenní glukokortikoidy

Produkce glukokortikoidů (glucocorticoids, GC) je řízena vícestupňově. Hlavní úlohu má regulace osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Endokrinní, neurální a imunitní (cytokinové) signály z celého těla „se sbíhají“ na úrovni hypotalamu, odkud je řízena sekrece kortikoliberinu (corticotropin-releasing hormone, CRH). V předním laloku hypofýzy stimuluje CRH uvolňování kortikotropinu (adrenocorticotropic hormone, ACTH), který, navázáním na specifický receptor v kůře nadledvin indukuje produkci a sekreci glukokortikoidů.

Množství sekretovaného ACTH je ovlivněno aktuální hladinou glukokortikoidů v cirkulaci mechanismem zpětné vazby (zvýšená hladina glukokortikoidů potlačuje jeho sekreci a snižuje další endogenní tvorbu glukokortikoidů). Uvolňování CRH (a následně ACTH) vykazuje cirkadiánní (diurnální, dlouhodobou) a pulzní (epizodickou, krátkodobou) periodicitu. Tím je dosaženo fyziologického kolísání plazmatických hladin glukokortikoidů v průběhu dne (nejnižší jsou od večerního usínání do půlnoci, nejvyšší od čtvrté do deváté ranní hodiny) a v průběhu aktuálních potřeb organismu (např. výrazný vliv má fyzická nebo psychická zátěž, která stimuluje přes mozgová centra adaptační zvýšení hladin glukokortikoidů).

Endogenní glukokortikoidy mají významnou úlohu v regulaci homeostázy makroorganismu – významně ovlivňují metabolickou aktivitu i aktivitu imunitního systému ^(Sapolsky et al., 2000). Tak mimo jiné regulují aktuální potřeby makroorganismu při zánětlivé reakci, která je metabolicky (substrátově, energeticky) velmi náročná.

Metabolismus ovlivňují především podporou využití zásobní energie. Výrazný je vliv katabolický - antianabolický. Při vyšších než fyziologických koncentracích urychlují katabolismus bílkovin (hlavně svalů) a zpomalují proteosyntézu. Snižují syntézu kolagenu inhibicí proliferace fibroblastů. Podporují lipolýzu depotních tuků na končetinách, ale na trupu a obličeji syntézu a ukládání tuků zesilují. Významně se podílejí na udržení glykémie ve fyziologickém rozmezí. Pro diabetogenní účinek (antagonisté inzulínu) je charakteristický vzestup glykémie s poklesem utilizace glukózy. Mají nepřímý vliv na urychlení glukoneogeneze. Částečný anabolický vliv se projeví zvýšenou tvorbou glykogenu v játrech (aktivací glykogensynthasy). Zlepšují chuť k jídlu (i při vyvolané hyperglykémii) s tendencí k váhovému přírůstku. Tyto změny metabolické aktivity jsou výhodné pro adaptační reakci na stres.

U člověka je ze všech glukokortikoidů nejdůležitější kortisol (hydrokortison). V krvi cirkuluje ve specifické vazbě na transkortin (globulin vázající kortikoidy, corticosteroid-binding globulin, CBG), (cca 85-95%), výrazně volněji se váže na albumin. Jen volný, nenavázaný kortisol, je biologicky aktivní (asi 8% z denní sekrece 16-25 mg u dospělého jedince). Ve tkáních dochází enzymatickým působením 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy, isoenzymu typu 1 (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 isoenzyme) ke konverzi neaktivního kortisonu na aktivní kortisol. A naopak, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza, isoenzym typu 2 (11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 isoenzyme) způsobuje konverzi aktivního kortisolu na inaktivní kortison. Tím je docíleno rovnováhy v regulačních aktivitách tkání - kortison nepůsobí ve zpětné vazbě na sekreci ACTH. Kortisol udržuje normální krevní tlak, spolupůsobí na rovnováhu vody a elektrolytů. V nadbytku vyvolává euforii, v nedostatku depresi. Kortisol má i velmi významný imunomodulační vliv. Fyziologicky se podílí na regulaci zánětlivé aktivity makroorganismu – inhibicí zánětlivé aktivity ^{(Silverman et al., 2012) (Webster et al., 2004)}.

1.3.2 Vliv glukokortikoidů na imunitní systém - mechanismus účinku a ovlivnění komunikace mezi složkami

Kortisol komplexně a na několika úrovních moduluje buněčnou aktivitu nejen ovlivněním metabolismu sacharidů, ale především ovlivněním metabolismu lipidů a proteinů – regulací jejich syntézy. Takto výrazný zásah do aktivity buňky je způsoben kortisolovou (a obecně glukokortikoidní) modulací nejen expresní, ale např. i signální, transportní a degradační aktivity buňky (indukcí nebo inhibicí této aktivity). Často je komplexní proces glukokortikoidní modulace indukující cílovou aktivitu buňky označován jako transaktivace, a proces inhibované aktivity jako

transreprese. V kontextu imunitního systému je transaktivace chápána jako indukce protizánětlivé buněčné aktivity, a transreprese jako inhibice prozánětlivé buněčné aktivity. Tato modulace je klasicky dělena na tzv. negenomovou (bez přímé vazby komplexu vázajícího glukokortikoid s DNA) a genomovou (s přímou vazbou komplexu vázajícího glukokortikoid s DNA). Negenomová i genomová modulace, ať už přímo nebo nepřímo, velmi výrazně zasahuje do transkripčních, posttranskripčních, translačních a posttranslačních buněčných mechanismů.

Při kontaktu s cytoplazmatickou membránou buněk se endogenní glukokortikoidy (kortisol) mohou vázat na glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor, GR) vázaný v cytoplazmatické membráně (membránový GR, membrane-bound GR). Membránový GR je efektorový protein v tzv. multiproteinovém komplexu, se specifickým vazebným místem pro glukokortikoidy (Löwenberg et al., 2006). Jeho receptorová membránová denzita není u všech buněk stejná. Po vazbě s glukokortikoidem prochází membránový GR komplex konformačními změnami, vedoucími k signálové transdukcii. Regulační mechanismy této signálové transdukcce ještě nejsou plně objasněny. Následkem této signálové transdukcce je mimo jiné rychlá reakce modulující (inhibující) aktivitu specifických buněčných složek imunitního systému – T lymfocytů (Löwenberg et al., 2006) (Löwenberg et al., 2007).

Endogenní glukokortikoidy jsou lipofilní (hydrofobní) hormony. Nevázané na membránový GR prostupují pasivní difuzí přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy. Zde se mohou vázat na GR rozptýlený v cytoplazmě. GR je exprimován v cytoplazmě prakticky všech buněk makroorganismu a jeho receptorová denzita také není u všech buněk stejná (Rhen et al., 2005). GR je kódován genem pro glukokortikoidní receptor (human glucocorticoid receptor gene, *hGR* gene). Struktura GR, určená alternativním sestřihem primárního transkriptu, má několik základních izoforem. Obecně je za základní izoformy pokládáno pět izoforem, označovaných jako - GR α , GR β , GR-P, GR γ a GR-A (Lu et al., 2004) (Sánchez-Vega et al., 2006). Jen forma GR α váže glukokortikoidy. Před vazbou s glukokortikoidy je i GR α v cytoplazmě součástí multiproteinového komplexu (např. s chaperonovými proteiny - heat shock proteinem 90 (heat shock protein 90, HSP90), HSP70 a HSP50) (Pratt, 1993). Po vazbě GR α s glukokortikoidem je zformován komplex glukokortikoid-glukokortikoidní receptor α (glucocorticoid-glucocorticoid receptor α complex, GC-GR α complex), který prochází konformačními změnami, zajišťujícími signálovou transdukcii – především jsou od GR α uvolněny chaperonové proteiny a je odkryt tzv. jaderný lokalizační signál GR α (Pratt, 1993). Aktivovaný komplex je translokován do jádra (Terry et al., 2007). Na mechanismu jaderné translokace se podílí importující proteiny jádra importin- α a importin-13 (Goldfarb et al., 2004).

GC-GR α komplexy translokované do jádra se vážou (jako homodimerní komplexy) na specifické úseky DNA v promotorové oblasti genů cílových pro steroidní hormony (steroid-responsive genes), označované jako glucocorticoid response elements (GREs), a interakcí s transkripčními koaktivními faktory (kofaktory) indukují (případně inhibují) transkripci cílových genů (Bamberger et al., 1996) (Schaaf et al., 2002). Těmito kofaktory je např. vazebný protein pro CREB (cyclic AMP response element binding protein, CBP), steroidní receptorový koaktivátor 1 (steroid receptor coactivator 1, SRC-1), protein 1 ovlivňující glukokortikoidní receptor (glucocorticoid receptor interacting protein 1, GRIP-1), a další.

Inhibice proteosyntézy prozánětlivých mediátorů je glukokortikoidy uskutečňována na několika úrovních: 1) na úrovni transkripce genů; 2) posttranskripční aktivity; 3) posttranslační aktivity. Transkripci genů glukokortikoidy inhibují: 1) vazbou komplexu GC-GR α s GREs blokující promotorové oblasti genů kódujících prozánětlivé cytokiny, jako jsou geny pro IL-1 α (interleukin-1alpha gene, *IL1A*) a IL-1 β (interleukin-1beta gene, *IL1B*) (Zhang et al., 1997); 2) nezávisle na vazbě s DNA, kompetitivní inhibicí nebo inhibicí funkční aktivity některých transkripčních faktorů a kofaktorů, nezbytných pro transkripci prozánětlivých mediátorů, monomerním GC-GR α komplexem. Těmito faktory (kofaktory) mohou být např. aktivační protein-1 (activator protein-1, AP-1), nukleární faktor- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) a další aktivátory transkripce, stejně jako signální transduktory (Jonat et al., 1990) (Scheinman et al., 1995) (Chrousos et al., 2005) (Kino et al., 2002).

Kromě toho mohou glukokortikoidy indukovat proteosyntézu inhibitoru κ B (inhibitor κ B α , I κ B α), který inhibuje funkční aktivitu NF- κ B (Scheinman et al., 1995) (Auphan et al., 1995) (Göttlicher et al., 1998) (Karin et

al., 1997) (Rhen et al., 2005). Posttranskripční aktivitu modulují glukokortikoidy snížením stability mRNA kódující IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF a GM-CSF (Tobler et al., 1992). Další mechanismy aktivované glukokortikoidy modifikují i posttranslační úpravy prozánětlivých cytokinů, způsobující snížení jejich sekrece buňkou (Rhen et al., 2005).

Indukce proteosyntézy protizánětlivých mediátorů glukokortikoidy je způsobena: 1) vazbou GC-GR α s GREs v promoterové oblasti genů kódujících tyto mediátory; 2) zvýšením „návratnosti“ transkripčních faktorů do promoterových oblastí genů kódujících tyto mediátory. Zvýšení sekrece protizánětlivých cytokinů je glukokortikoidy ovlivněno i na úrovni biomembrány - transportním mechanismem. Glukokortikoidy indukují proteosyntézu MDR1 a jeho biomembránovou expresi (Iqbal et al., 2011). Zvýšená exprese MDR1 integrovaného v cytoplazmatické membráně může přispívat ke zvýšené sekreci protizánětlivých cytokinů s MDR1 mediovaným transportem – IL-2 a IL-4 (Poznámka: MDR1 mediuje i transport prozánětlivého cytokinu TNF α).

Souhrnně, v kontextu imunitního systému (a informační soustavy obecně), glukokortikoidy inhibují proteosyntézu a sekreci cytokinů IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-13, IL-8, TNF α , IFN- γ a faktoru stimulujícího granulocytární-makrofágové kolonie (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)). A naopak indukují syntézu protizánětlivě funkčně aktivních proteinových produktů, jako jsou např. protizánětlivé cytokiny IL-4, IL-10, TGF β), receptor (přirozený inhibitor) pro prozánětlivý cytokin IL-1 (IL-1 receptor II, IL-1RII), neutrální endopeptidázy nebo glykoprotein lipokortin-1, makrokortin nebo lipomodulin (Krejsek et al., 2004) (Flower et al., 1979) (Blackwell et al., 1980) (Kim et al., 2001).

Neutrální endopeptidázy degradují bradykinin. Lipokortin-1 (lipocortin-1), označovaný také jako annexin-1, stejně jako makrokortin (macrocortin) nebo lipomodulin, inhibuje fosfolipázou PLA₂ mediovanou syntézu kyseliny arachidonové, a tak snižuje produkci prozánětlivých lipidových mediátorů buňkou (např. eikosanoidů) (Flower 1979).

Endogenní glukokortikoidy tak ovlivňují (modulují) všechny výše uvedené fáze zánětlivé reakce. Nejvýrazněji se projevuje jejich imunomodulační vliv prostřednictvím regulace zástupců ze složky komunikace mezi složkami, která následně moduluje aktivitu nejen nespecifických a specifických buněčných složek imunitního systému, ale obecně aktivitu všech složek informační soustavy, a následně četné složky všech systémů makroorganismu. Tohoto jejich imunomodulačního, zánětlivou aktivitu regulujícího (inhibičního) působení je využíváno i léčebně - aplikací syntetických (exogenních) glukokortikoidů.

1.4 Exogenní glukokortikoidy

1.4.1 Vliv glukokortikoidů na imunitní systém - ovlivnění nespecifické a specifické složky

Kromě (a také prostřednictvím) regulace zástupců ze složky označované jako komunikace mezi složkami (tj. adhezivních molekul, a proteinových a lipidových mediátorů) glukokortikoidy ovlivňují (regulují) i aktivitu zástupců z nespecifických i specifických (humorálních i buněčných) složek imunitního systému, i aktivitu zástupců ze složky imunitního systému, označovanou jako lymfatické orgány a tkáň (tabulka 1).

U zástupců nespecifické buněčné složky imunitního systému, fagocytujících buněk, např.: 1) u makrofágů - inhibují fagocytární a mikrobicidní funkční aktivitu, snižují antigen prezentující aktivitu, snižují expresi HLA molekul II. třídy, a snižují lipidovou syntézu prozánětlivých eikosanoidů monocytomakrofágovým systémem (Kopřiva 2010) (Rhen et al., 2005) (Tsujiura et al., 2004); 2) u neutrofilů - inhibují apoptózu (Kopřiva 2010) (Barnes 1995); 3) u eosinofilů - aktivují („podporují“) apoptózu (přímo, nebo nepřímo inhibicí syntézy IL-5 podporujícího přežívání eosinofilů (Barnes 1995) (Löwenberg 2007)); 4) u žírných buněk – inhibují degranulaci (Leung et al., 1995) (Farrell et al., 2000); 5) u basofilů - inhibují degranulaci.

Glukokortikoidy také snižují počet cirkulujících i tkáňově-rezidentních dendritických buněk.

U zástupců ze specifické buněčné složky např.: 1) u B lymfocytů – snižují jejich počet v cirkulaci (tzv. deplece) (Irusen et al., 2002); 2) u T lymfocytů – snižují (výrazně a rychle) jejich počet v cirkulaci (inhibicí syntézy hlavního růstového faktoru T lymfocytů - IL-2), ovlivňují proces tzv.

selekce, ovlivňují diferenciaci do jednotlivých subpopulací a imunoregulačních subsetů, i přechod mezi subsety, narušují (oslabují) jejich „uvolňování“ z lymfatických orgánů a tkání a indukují jejich apoptózu.

Zástupce ze specifické humorální složky, imunoglobuliny, většinou neovlivňují (při krátkodobé aplikaci glukokortikoidů nebo aplikaci glukokortikoidů v „nízkých“ dávkách) (Savory et al., 1999) (Spahn et al., 1996) (Sher et al., 1994) nebo na jejich produkci mají spíše pozitivní vliv (stimulací aktivity Th₂ T lymfocytů (Krejsek et al., 2004)), jako je tomu u IgE třídy. Syntéza IgE může být v průběhu glukokortikoidní terapie zvýšena, pravděpodobně vlivem zvýšené syntézy IL-4 (Goleva et al., 2006). V období imunologické synapse mezi Th₂ T lymfocyty a B lymfocyty je k izotypovému přepnutí mezi izotypy těžkých řetězců imunoglobulinů nezbytné působení IL-4 (Krejsek et al., 2004). IL-4 (ale také IL-13) indukuje genovou transkripci oblasti kódující těžké řetězce izotypu ϵ (Goleva et al., 2006) (Kopřiva et al., 2012), který charakterizuje IgE třídu imunoglobulinů. Pokud jsou ale glukokortikoidy aplikovány dlouhodobě (chronicky) ve „vysokých“ dávkách, snižují celkovou koncentraci IgG a IgA protilátek v cirkulaci (pravděpodobně následkem glukokortikoidy indukované katabolické aktivity makroorganismu) (Sher et al., 1994) (Matthews et al., 2004) (Corrigan et al., 1991).

Kortisol objevili v roce 1937 E. C. Kendall s O. Wintersteinerem a v roce 1938 provedl T. Reichstein jeho syntézu. Hlavní zásluhu na průkazu jeho výrazného protizánětlivého účinku má P. S. Hench. V roce 1948 byl syntetický kortison poprvé použit v léčbě onemocnění s autoimunitní imunopatologickou aktivitou - revmatoidní artritidy.

Syntéza nových glukokortikoidů a jejich využití postupně způsobovala výrazný průlom v léčbě řady onemocnění - nejen pro své imunomodulační, ale i antiedematózní a antiproliferativní účinky – a staly se tak významným a obtížně nahraditelným léčivem. V současné době se nadále užívají nejen v léčbě zánětlivých onemocnění s imunopatologickou aktivitou (např. autoimunitní, autoinflamatorní a alergickou imunopatologickou aktivitou, ale i onemocnění s jinou, takto nezařaditelnou imunopatologickou aktivitou), a v transplantologii, ale pro své komplexní působení také např. v léčbě některých akutních stavů (edém mozku, akutní laryngitida), k léčbě hematologických a onkologických onemocnění a k urychlení maturace plicního parenchymu nezralého plodu.

S nárůstem jejich užívání byly popisovány i nežádoucí účinky, od 70. let jsou publikovány i práce kritizující jejich užívání. Nová terapeutická a indikační doporučení i vývoj nových derivátů a aplikačních forem pak měly (a mají) za cíl snížit jejich nežádoucí účinky. Pro své komplexní působení na imunitní systém glukokortikoidy nadále zůstávají nejučinnějším imunomodulačním – zánětlivou aktivitu inhibujícím - léčivem.

1.4.2 Stručná charakteristika exogenních glukokortikoidů

Exogenní (syntetické) glukokortikoidy jsou chemickými modifikacemi endogenních glukokortikoidů. Exogenní glukokortikoidy se od sebe – cíleně, v závislosti na farmakodynamickém terapeutickém použití - liší a mají tak rozdílné základní farmakokinetické děje: 1) uvolnění (liberation); 2) absorpci (absorption); 3) distribuci (distribution); 4) metabolismus (metabolism); 5) exkreci (excretion). Metabolismus (biotransformace) a exkrece bývají zahrnovány pod pojem eliminace (elimination). Glukokortikoidy se mezi sebou liší hlavně molekulární hmotností, biologickým poločasem, protizánětlivým účinkem (který je obtížně a relativně hodnotitelný), mineralokortikoidním účinkem, ale i vazebnou afinitou ke GR α . Afinitu ke GR α může např. ovlivňovat esterifikace na různých pozicích hydroxylových skupin.

Farmakodynamické terapeutické užití glukokortikoidů je možné v rámci systémové farmakodynamické terapie (systémové aplikační formy), nebo (převažující) místně-topické farmakodynamické terapie (s užitím místně-topických aplikačních forem). I místně-topická farmakodynamická terapie má určité systémové (tj. aktivitu systémů ovlivňující, resp. aktivitu zástupců složek systémů makroorganismu ovlivňující) účinky.

Na buněčné úrovni je jejich tzv. nespecifický efekt, který nastupuje do několika minut po aplikaci, dán ovlivněním fyzikálních a některých chemických vlastností povrchu buněk. Změny tzv. specificky (cíleně) ovlivňující aktivitu buňky (ve smyslu transaktivace a transreprese) jsou

způsobené vazbou glukokortikoidů s GR a projeví se od několika desítek minut do několika hodin (a desítek hodin).

1.4.3 Farmakokinetika (absorbce, distribuce, metabolismus a exkrece) a farmakodynamika exogenních glukokortikoidů ve vztahu k MDR1 proteinu

Absorbce exogenních glukokortikoidů je mimo jiné ovlivněná MDR1 proteinem integrovaným do cytoplazmatické membrány buněk, které jsou v tkáních na rozhraní se zevním prostředím (sliznice trávicího traktu, sliznice dýchacích cest, sliznice oka (kapitola 1.2.5)). Exogenní glukokortikoidy (užité v systémových aplikačních formách nebo místně-topických aplikačních formách) jsou nejen MDR1 transportovatelnými substráty (Yates et al., 2003) (Crowe 2012), ale jsou i induktory transportní aktivity a i induktory expresní aktivity MDR1 (Webster et al., 2002) (Manceau et al., 2012). Glukokortikoidy použité při systémové farmakodynamické terapii mají (kromě hydrokortisonu (tj. kortisolu) a prednisolonu (metabolizovaného z prednisonu) oproti endogenním glukokortikoidům malou nebo žádnou afinitu k transkortinu - v plazmě se vážou na albumin, nebo v ní volně cirkulují (Ballard, 1979). MDR1 protein se podílí (prostřednictvím integrace v cytoplazmatické membráně některých buněk) na distribuci: 1) „regionální“ (regionální distribuce (dispozice)) glukokortikoidů, expresí v buňkách tvořících bariéry imunokompetentních orgánů (hemato-encefalické bariéry, hemato-testikulární bariéry, placentární bariéry); 2) intracelulární (intracelulární distribuce (dispozice) glukokortikoidů), expresí jen v „některých“ buňkách, zvláště ve „volných“ buňkách, včetně buněk imunitního systému (tabulka 2). Tak se MDR1 protein podílí na komplexní glukokortikoidní distribuci plazmatické, likvorové a orgánové. Exogenní glukokortikoidy se účastní stejných redukčních, oxidačních, hydroxylačných a konjugačních reakcí jako endogenní glukokortikoidy. Např. hydrokortison, dexametason, methylprednisolon a budesonid jsou substráty jaterního enzymu cytochromu P-450 (enzymu CYP3A4). Zvýšená aktivita enzymu CYP3A4 urychluje metabolismus těchto glukokortikoidů. Na exkreci exogenních glukokortikoidů se také podílí MDR1 protein - z důvodu cytoplazmatické membránové exprese v buňkách orgánů s eliminační a sekreční funkcí (jater, pankreatu, ledvin).

MDR1 protein svou aktivitou ovlivňuje nejen farmakokinetiku glukokortikoidních léčiv, ale i jejich farmakodynamické použití. Podle biologického poločasu jsou glukokortikoidy aplikované v systémové farmakodynamické terapii děleny na krátkodobě, střednědobě a dlouhodobě působící (Lüllmann et al., 2004). Podle relativního protizánětlivého účinku se rozdělují na slabě, středně, silně a velmi silně účinné (Lüllmann et al., 2004).

1.4.4 Exogenní glukokortikoidy a lékové interakce

Souběžné užívání léčiv indukujících CYP3A4 (tzv. induktorů enzymu CYP3A4, mezi které patří např. fenobarbital, fenytoin, karbamazepin a rifampicin) urychluje metabolismus některých glukokortikoidů, substrátů CYP3A4 (kapitola 1.4.3) a snižuje tak jejich farmakodynamickou – imunomodulační – odezvu. Pro úplnost, tzv. inhibitory CYP3A4 (např. ketokonazol, itraconazol, mibefradil, diltiazem, cyklosporin a některá makrolidová antibiotika (erythromycin, clarithromycin)) zpomalují metabolismus těchto glukokortikoidních léčiv.

Z imunomodulačního hlediska jsou významné lékové interakce nejen s léčivy, jakými jsou induktory a inhibitory CYP3A4, ale i s léčivy, které indukují (případně inhibují) transportní aktivitu MDR1, nebo indukují (případně inhibují) expresní aktivitu MDR1, nebo obojí, a přispívají tak ke snížení (případně zvýšení) intracelulární cytoplazmatické koncentrace (intracelulární dispozice) glukokortikoidů v buňkách cílových z hlediska farmakodynamické terapie.

Zvýšená transportní aktivita nebo exprese MDR1 u buněk imunitního systému, hlavně pak u lymfocytů (aktivovaných T lymfocytů), ale i u aktivovaných buněk jiných systémů účastnících se zánětlivé reakce, může vést ke snížení intracelulární (cytoplazmatické) koncentrace (dispozice) exogenního glukokortikoidu. Snížená cytoplazmatická koncentrace v cílových buňkách farmakologické glukokortikoidní léčby pak přispívá k nižší (ke snížené) cílené farmakodynamické – imunomodulační – odezvě.

Velmi zjednodušeně je mnoho léčiv, která jsou MDR1 transportovatelnými substráty, ale: 1) nemají „vliv“ na inhibici nebo indukci transportní a expresní aktivity MDR1; 2) mají vliv na inhibici nebo indukci transportní a expresní aktivity MDR1. Obdobně je mnoho léčiv, která nejsou transportovatelnými substráty MDR1, ale ovlivňují inhibici nebo indukci transportní a (a nebo) expresní aktivity MDR1 (jsou substráty v širším slova smyslu). Kromě toho, vliv jednotlivého konkrétního léčiva se může v uvedených aktivitách k MDR1 překrývat (overlap of MDR1 substrate) (Chang et al., 2006) a vliv jednotlivého konkrétního léčiva na MDR1 nemusí být vždy stejný. Může to být způsobeno, mimo jiné, polymorfizmy *ABCB1* genu (Leschnizer et al., 2006) (Zhou 2007).

Substráty MDR1 proteinu nejsou jen léčiva užívanými v léčbě nádorových onemocnění (např. daunorubicin, doxorubicin, etoposide, vincristine, vinblastine), ale také léčiva užívaná např. v léčbě neurologických onemocnění (např. antiepileptika phenytoin, phenobarbital, lamotrigine), psychiatrických onemocnění (např. antipsychotika risperidon, levomeprazin; antidepressivum pritrptylen), kardiovaskulárních onemocnění (kardiotonika digoxin a digitoxin; antihypertenziva diltiazem, verapamil), infekčních onemocnění (antibiotika erythromycin, clarithromycin, amoxicilin, ciprofloxacin; antimikotikum itraconazol; antivirotika abacivir, lamivudine, stavudine, tenofovir a amprenavir, atazanavir, darunavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir), ale také léčiva užívaných např. v analgezií nebo k imunopresi (cyklosporin), a léčiva užívaných v léčbě onemocnění s imunopatologickou aktivitou (glukokortikoidy, ale i chlorochin, kolchicin, sirolimus, takrolimus) (Chang et al., 2006) (Mahar et al., 2002) (Zhang et al., 2012) (Pal et al., 2011) (Dostálek et al., 2006).

Mezi tato onemocnění jsou řazena i onemocnění s alergickou imunopatologickou aktivitou (alergická zánětlivá onemocnění) - a některá antihistaminika druhé generace jsou substráty MDR1.

Transportovatelnými substráty jsou piperidinová antihistaminika druhé generace astemizol, ebastin, desloratadin, fexofenadin, loratadin („slabý“ transportovatelný substrát), terfenadin, a piperazinová antihistaminika druhé generace cetirizin a levocetirizin. (Neuhaus et al., 2012) (Broccatelli et al., 2010) (Crowe et al., 2012). Cetirizin a levocetirizin navíc může ovlivňovat transportní a expresní aktivitu MDR1 proteinu (kapitola 2.3.4 Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na systémově aplikovaná piperazinová antihistaminika druhé generace (cetirizin dihydrochlorid a levocetirizin dihydrochlorid) u jedinců s alergickým zánětem). Pro úplnost, hydroxyzin je také MDR1 transportovatelným substrátem.

Všechna tato léčiva tak mohou vstupovat prostřednictvím MDR1, při souběžné aplikaci, do vzájemných lékových interakcí (kapitola 1.4.3 Farmakokinetika (absorbce, distribuce, metabolismus a exkrece) a farmakodynamika exogenních glukokortikoidů ve vztahu k MDR1 proteinu) (Caroline et al., 2010).

1.4.5 Glukokortikoidní rezistence

Systémovou formou nebo místně-topicky aplikovanou formou se mohou exogenní glukokortikoidy při kontaktu s cytoplazmatickou membránou buněk vázat na membránový GR, nebo pasivní difuzí prostupovat přes cytoplazmatickou membránu do cytoplazmy. Zde se vážou s GR α přítomným v cytoplazmě.

Receptorová denzita a variabilita GR α v buňkách tkání je pravděpodobně zodpovědná za rozdílnou citlivost jedinců i složek systémů makroorganismu na glukokortikoidní terapii. Posttranslační modifikace jednotlivých isoform GR α (vzniklých alternativním sestřihem a alternativní iniciací translace) mohou výrazně ovlivnit buněčnou (a tkáňově) specifickou funkční aktivitu GR α a určit tak buněčně specifickou odpověď na glukokortikoidy (Lu et al., 2004) (Kozaci 2007). Tím je obecně vysvětlována různá úroveň vnímavosti jedince na glukokortikoidní léčbu (v závislosti na zvoleném glukokortikoidním léčivu a aplikační formě glukokortikoidního léčiva).

V souvislosti s „úrovň“ farmakodynamické odezvy na glukokortikoidní léčbu onemocnění, při cílené glukokortikoidní terapii takového onemocnění, jsou užívána „označení“: 1) kortikosenzitivní (kortikosenzitivní, glukokortikoidsenzitivní; s adekvátní (dostatečnou) odezvou na glukokortikoidní terapii); 2) kortiko-insenzitivní (kortikoinsenzitivní, glukokortikoidinsenzitivní; s nedostatečnou odezvou na glukokortikoidní terapii, nedostatečně citlivé na glukokortikoidní terapii); 3) kortiko-dependentní (kortikodependentní, glukokortikoiddependentní; na

glukokortikoidech závislá adekvátní (dostatečná) odezva); 4) kortiko-rezistentní (kortikorezistentní, glukokortikoidrezistentní; bez odezvy na glukokortikoidní terapii).

Vzhledem k tomu, že jednotlivé, a takto označované úrovně odezvy na glukokortikoidní terapii jsou v klinické praxi při terapii odlišných onemocnění, s různou úrovní aktivity těchto onemocnění, obecně obtížně definovatelné, je nejčastěji užíván termín kortikodependentní a kortikorezistentní.

Problematika glukokortikoidní rezistence je nadále z klinického i molekulárněbiologického pohledu neobvykle složitá a komplexní, a stále ne zcela objasněná. Glukokortikoidní rezistence (která může být častou příčinou „selhání“ léčby např. v terapii nádorových onemocnění) je popisována i u onemocnění s imunopatologickou aktivitou, tj. u onemocnění s nedostatečnou, nebo neadekvátní kontrolou zánětlivé reakce.

Extrémně vzácnou příčinou glukokortikoidní rezistence je mutace genu pro GR (*hGR* genu), jejímž následkem je primární generalizovaná glukokortikoidní rezistence. Glukokortikoidní rezistence je často dělena na primární a sekundární. Vzhledem k nadále neobjasněným a komplexním mechanismům této rezistence ale bude od takového dělení upuštěno.

Jako přínosnější, i když pro klinickou praxi nedostatečné, se jeví dělení glukokortikoidní rezistence podle obecně vyvolávajících faktorů na: 1) glukokortikoidní rezistenci způsobenou vnitřními faktory (intrinsic factors of glucocorticoid resistance); 2) glukokortikoidní rezistenci způsobenou zevními (vnějšími) faktory (extrinsic factors of glucocorticoid resistance).

V tomto pojetí jsou zevní i vnitřní faktory velmi obecně vymezené. Mezi zevní faktory je zařazována: 1) interakce mezi zevním prostředím a glukokortikoidní aktivitou; 2) interakce mezi glukokortikoidy (glukokortikoidními léčivými) a jinými souběžně aplikovanými léčivými; 3) zánětlivá reakce. Mezi vnitřní faktory je zařazována: 1) cytokiny indukovaná suprese imunomodulační glukokortikoidní aktivity; 2) snížení (redukce) receptorové denzity GR ($GR\alpha$); 3) interakce $GR\alpha$ s $GR\beta$; 4) snížená afinita $GR\alpha$ ke glukokortikoidům (glukokortikoidním léčivům - ligandům); 5) narušená (nedostatečná) translokace GC- $GR\alpha$ komplexu do jádra; 6) redukováná (histonová) deacetylásová aktivita; 7) nadměrná exprese (over expression) transkripčních faktorů a kofaktorů, např. AP-1 a NF- κ B.

Zdá se, že zatím není dostatečně doceněný význam „dalšího“ faktoru, který je reprezentován aktivitou primárních aktivních transportních systémů na úrovni biomembrán, resp. transportní a expresní aktivitou MDR1 proteinu. Transportní a expresní aktivita MDR1 proteinu by mohla být zařaditelná mezi vnitřní i zevní faktory - v závislosti na příčině indukční (inhibiční) aktivity a v závislosti na transportovatelném substrátu (nebo substrátu v širším slova smyslu, včetně MDR1 mediovaného transportu). MDR1 protein tak symbolicky „stojí“ na rozhraní mezi „zevním a vnitřním“ i v molekulárních mechanismech glukokortikoidní rezistence.

Glukokortikoidy zvyšují expresi proteinu MDR1 - např. v lymfocytech (Manceau et al., 2012). MDR1 aktivně transportuje glukokortikoidy (včetně inhalačně aplikovaných forem glukokortikoidů) z cytoplazmy mimo buňku (Yates et al. 2003) (Crowe et al. 2012). Zvýšená lymfocytární exprese nebo transportní aktivita MDR1 jako příčina glukokortikoidní rezistence byla popsána u některých onemocnění s imunopatologickou aktivitou, např. u revmatické artritidy (Tsujiimura et al., 2008) (Tsujiimura et al., 2010), systémového lupu (systémový lupus erythematosus, SLE) (Tsujiimura et al., 2005) (Henmi 2008), nespecifického střevního zánětu (Farrell et al., 2000).

Molekulární mechanismy glukokortikoidní rezistence jsou nejen velmi obtížně identifikovatelné, ale i interpretovatelné - vzhledem ke komplexní modulační aktivitě glukokortikoidů. Zdá se, že u onemocnění s imunopatologickou aktivitou jsou molekulární mechanismy glukokortikoidní rezistence - na buněčné úrovni - shodné (Ito et al., 2006) (Chikanza et al., 2004).

Nicméně, aktuálně není, u většiny onemocnění s imunopatologickou aktivitou, glukokortikoidní rezistence přesně definována, nebo není definována vůbec. Vzhledem k tomu, že: 1) pravděpodobně nejčastější indikací glukokortikoidní terapie v dětském věku je průduškové astma; 2) u průduškového astmatu je glukokortikoidní rezistence přesně definována a klasifikačně zařaditelná, jsou molekulární mechanismy glukokortikoidní rezistence - na buněčné úrovni -

prezentovány u tohoto onemocnění s imunopatologickou aktivitou – průduškovým astmatem (příloha 4).

Potěšil J, Kopřiva F, Godava M, Svetlíková M. Kortikorezistentní astma – aktuální klasifikace, definice a molekulární mechanizmy glukokortikoidní rezistence na buněčné úrovni. *Klinická farmakologie a farmacie*.

Vzhledem k tomu, že v experimentální části práce byly mezi subjekty i jedinci s alergickou imunopatologickou aktivitou, bude v závěru teoretické části práce velmi stručně shrnuta alergická imunopatologická aktivita.

1.5 Alergická imunopatologická aktivita

Velmi zjednodušeně je alergická imunopatologická aktivita (alergický zánět) schématicky dělena na: 1) akutní; 2) chronickou (jednotlivé časové fáze se prolínají); nebo na: 1) přecitlivělost časného typu (I. typ, fáze „překotné“ degranulace žírných buněk a bazofilů, po interakci s IgE protilátkami navázanými na jejich povrchu a jejich prostřednictvím s antigenem, s uvolněním humorálních mediátorů do okolí buněk (především histaminu); tento typ reakce není u autoimunitní imunopatologické aktivity ^(Kopřiva et al., 2012); 2) cytotoxický typ (II. typu, s vázaným antigenem na povrchu buňky, interakcí s protilátkami a následnou aktivací komplementu); 3) přecitlivělost z imunokomplexů (III. typ, zvýšená produkce a zvýšené ukládání imunokomplexů); 4) přecitlivělost pozdního typu (IV. typ, buňkami zprostředkovaná interakce, antigen je „fixován“ ve tkáni, migrace buněk do místa lokalizace antigenu). Mechanizmy takto zjednodušeně rozděleného alergického zánětu se překrývají.

Vrcholná fáze alergické imunopatologické aktivity (alergického zánětu) probíhá relativně pomalu ^(Kopřiva et al., 2012) a klonální expanze aktivovaných alergen-specifických T lymfocytů není výrazná - pro alergický zánět je charakteristická převažující aktivace a následná diferenciaci do Th₂ lymfocytů. Imunologická synapse mezi alergen-specifickými Th₂ lymfocyty a B lymfocyty může vést k syntéze alergen-specifických protilátek imunoglobulinů třídy E (gE). Pokud se alergického zánětu účastní IgE protilátka, je alergický zánět označován jako IgE mediováný (IgE-mediováný).

Pro chronický alergický zánět je charakteristická převaha Th₂ lymfocytů. V oblasti chronicky probíhajícího alergického zánětu (např. v oblasti dýchacích cest při alergickém průduškovém astmatu) je dominantní zastoupení eozinofilů, někdy i bazofilů, a výrazné zastoupení monocytů/makrofágů, lymfocytů, destiček a neutrofilů ^(Kopřiva et al., 2012). Na imunopatologické aktivitě chronického alergického zánětu se významně uplatňují humorální mediátory nejen Th₂ lymfocytů, ale i eozinofilů, které amplifikují imunopatologickou aktivitu chronického alergického zánětu – hlavní bazický protein (major basic protein, MBP), eozinofilní kationický protein (eosinophilic cationic protein, ECP), eozinofilní peroxidáza (EPO) a eozinofily derivovaný neurotoxin (EDN). Chronický alergický zánět následně způsobuje morfologické změny tkání, ovlivňuje bariérové funkce tkáně na jejím rozhraní (s vnitřním nebo (nebo i) zevním prostředím) a rozvíjí se stav tzv. nespecifické hyperreaktivity, kdy klinické projevy alergické reaktivity iniciuje i velmi nízká koncentrace alergenu (antigenu), případně nízká koncentrace jiných hyperreaktivně působících látek. Prolongovaná reparační fáze zánětu nevede k obnově poškozené tkáně, ale k její patologické přestavbě.

2. Experimentální část

2.1 Cíle práce

Transportní a (a nebo) expresní aktivita proteinu vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1) může být jednou z příčin rezistence na glukokortikoidní léčiva (glukokortikoidy) (kapitola 1.4.5). Glukokortikoidy jsou také (kromě jiných léčiv) využívány pro své významné imunomodulační účinky (kapitola 1.4.1) u chronických zánětlivých onemocnění s nedostatečnou nebo neadekvátní regulací zánětlivé aktivity makroorganizmem (tj. u onemocnění s imunopatologickou aktivitou) (kapitola 1.3.2 a 1.4.1), a to včetně onemocnění s tzv. alergickým zánětem, včetně průduškového astmatu (kapitola 1.5). U těchto onemocnění je v procesu imunopatologické aktivity primárně klíčová aktivita specifických i nespecifických buněčných složek imunitního systému – především lymfocytů (kapitola 1.2.6). Obdobně klíčová je, na úrovni lymfocytů, imunomodulační aktivita léčebně aplikovaných glukokortikoidů.

MDR1 protein vstupuje do četných interakcí s mediátory účastnících se zánětlivé reakce (kapitola 1.2.4 a 1.2.5), a jejich aktivitu tak reguluje, nebo je jimi sám regulován (kapitola 1.2.5). Prostřednictvím MDR1 proteinu dochází i k četným lékovým interakcím (kapitola 1.4.4). Do těchto MDR1 zprostředkovaných lékových interakcí vstupují nejen glukokortikoidy, ale např. i léčiva užívaná ke zmírnění klinických obtíží charakteristických pro onemocnění s alergickou imunopatologickou aktivitou (alergickým zánětem) – antihistaminika druhé generace (kapitola 1.4.4).

Použitím metody nepřímé průtokové cytometrie byla analyzována exprese proteinu MDR1 na buňkách lymfocytů periferní krve, s cílem zhodnotit zatím neobjasněný klinický význam lymfocytární exprese MDR1 proteinu ve vztahu ke kortikoidní (glukokortikoidní) rezistenci.

Cíle experimentální části práce byly následující:

- 1) Posoudit závislost exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve – u zdravých jedinců – na věku (kapitola 2.3.1);
- 2) Posoudit závislost exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganizmu u chronického alergického zánětu mediovaného IgE protilátkami – u jedinců s průduškovým astmatem, lehkým perzistujícím (kapitola 2.3.2);
- 3) Posoudit závislost exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunomodulační terapii chronického alergického zánětu mediovaného IgE protilátkami – na inhalačně aplikovaný glukokortikoid budesonid – u jedinců s průduškovým astmatem (kapitola 2.3.3);
- 4) Posoudit závislost exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunomodulační terapii alergického zánětu mediovaného IgE protilátkami – na systémově per orálně aplikovaná piperazinová antihistaminika druhé generace (cetirizin dihydrochlorid, levocetirizin dihydrochlorid) (kapitola 2.3.4).

2.2 Materiál a metody

2.2.1 Materiál

U všech jedinců zařazených do studií byl proveden odběr biologického materiálu – periferní krve venepunkcí. Periferní krev byla odebrána v množství 6 ml do standardních zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraocetovou (EDTA). Zkumavky s krví byly ihned po odběru ukládány do chladicího boxu s trvalou teplotou 8°C a nejpozději do 4 hodin po odběru byly v transportním boxu na suchém ledu transportovány do laboratoře k dalšímu zpracování (transport trval maximálně 15 minut). Odběry krve byly prováděny s informovaným souhlasem jedinců a u jedinců do 18 let věku i s informovaným souhlasem jejich zákonných zástupců. Postupy, použité ve studiích, byly

schváleny a byly v souladu s etickými standardy odpovědné Etické komise Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a byly v souladu s Helsinskou deklarací z roku 1975, ve znění revize z roku 2000.

2.2.2 Izolace a fixace mononukleárních buněk periferní krve

Z periferní krve byly za sterilních podmínek separovány mononukleární buňky hustotní centrifugací. Pomocí osmotické lýzy byly odstraněny erytrocyty. Mononukleární buňky byly dvakrát promyty. Po jejich vyizolování byla bezprostředně provedena jejich fixace.

Hustotní roztok (Ficoll Hypaque, Pharmacia, Švédsko) (hustota 1,077 g/ml)

Promývací roztok (Phosphate Buffer Saline, PBS) (10x koncentrovaný) – složení: 1,4 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,1 M Na₂HPO₄·12 H₂O, 0,015 M KH₂PO₄

Lyzační roztok – složení: deionizovaná H₂O

Rekonstituční roztok (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma Aldrich, USA) (10x koncentrovaný)

Fixační roztok – metanol (100%)

Do sterilních plastových zkumavek (2 zkumavky pro jeden vzorek) aplikujeme hustotní roztok (3 ml) a něj navrstvíme periferní krev (3 ml) tak, aby nedošlo k promíchání. Centrifugujeme při 2200 otáčkách za minutu (rotation per minute, rpm), 30 minut, při teplotě 8°C. Po centrifugaci Pasteurovou pipetou odsajeme mononukleární buňky nacházející se nad hustotním roztokem (kde „tvoří“ zkaleně zbarvenou oblast) - vždy ze 2 zkumavek pro jeden vzorek, kdy mononukleární buňky po odsání aplikujeme do 1 nové zkumavky. Zkumavka je doplněna promývacím roztokem do celkového objemu (všech roztoků) 8 ml ve zkumavce. Centrifugujeme při 1600 rpm, 8°C, 7 minut. Opatrně vylijeme supernatant ze zkumavky tak, aby mononukleární buňky zůstaly na dně zkumavky (tvoří tzv. buněčnou peletu). Buněčnou peletu protřepeme, aplikujeme 4,5 ml lyzačního roztoku a po 30 sekundách od aplikace aplikujeme rekonstituční roztok. Zkumavka je doplněna promývacím roztokem do celkového objemu (všech roztoků) 8 ml ve zkumavce. Centrifugujeme při 1200 rpm, 8°C, 5 minut. Opatrně vylijeme supernatant ze zkumavky, protřepeme. Zkumavka je opětovně doplněna promývacím roztokem do celkového objemu (všech roztoků) 8 ml ve zkumavce. Centrifugujeme při 1400 rpm, 8°C, 7 minut. Po vylití supernatantu ze zkumavky je buněčná peleta rozrušena na třepačce, a ihned je na třepačce do zkumavky aplikován fixační roztok – metanol o teplotě -20°C (do celkového objemu max. 0,5 ml). Takto fixované mononukleární buňky jsou v uzavřené zkumavce uchovány v mrazícím zařízení při teplotě -20°C. Interval od fixace do analýzy metodou nepřímé průtokové cytometrie nebyl delší než 6 měsíců.

2.2.3 Permeabilizace mononukleárních buněk, analýza MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve průtokovou cytometrií, metodou nepřímé imunofluorescence

Principem nepřímé imunofluorescence je vazba sledovaného znaku a primární protilátky, a následné vazby primární protilátky a sekundární protilátky značené fluorescenční koncovkou. Fixované buňky byly permeabilizovány a následně značeny primární protilátkou. Poté byly opětovně promyty a značeny sekundární protilátkou. Po promytí následovala analýza na průtokovém cytometru, modifikovaná podle Den Boer et al. (Den Boer et al., 1997).

Promývací roztok (Cell Wash, Becton-Dickinson, USA)

Pracovní permeabilizační roztok – složení: 1 ml FACS Permeabilizing solution 2 (Becton-Dickinson, USA) (10x koncentrovaný), 9 ml deionizované H₂O (Roztok je uchováván při 8°C.)

Rinsing Buffer – složení: 20 ml Cell Wash (Becton-Dickinson, USA), 0,1 mg bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, USA), 20 ug Nonidet P-40 (Sigma Aldrich, USA)

Roztok pro ředění blokačního roztoku – složení: 100 ml Cell Wash (Becton-Dickinson, USA), 0,5 g BSA (Sigma Aldrich, USA) (Uchováváno při teplotě -20°C v alikvotech o 2 ml, před použitím vytemperováno na pokojovou teplotu.)

Blokační roztok – složení: 30 ul Roztoku pro ředění blokačního roztoku, 10 ul Fc Receptor Saturation reagent (Beckman Coulter Company, USA) (Množství odpovídá materiálu pro jeden vzorek, roztok je připravován bezprostředně před použitím.)

Pracovní roztok primární protilátky vůči MDR1 – složení: 4 ul primární protilátky: Monoclonal Anti-P-Glycoprotein (Sigma Aldrich, USA), 1 ml Rinsing buffer (Roztok je uchováván při 8°C.)

Pracovní roztok izotypové kontroly pro protilátku vůči MDR1 – složení: 7,1 ul izotypová kontrola: IgG1 Isotype Control, unconjugated (Sigma Aldrich, USA), 1 ml Rinsing buffer (Roztok je uchováván při 8°C.)

Pracovní roztok sekundární protilátky, která se používá pro značení primární protilátky vůči MDR1 – složení: 4 ul sekundární protilátky: Anti-mouse IgG Fab2 fragment – FITC antibody (Sigma Aldrich, USA), 1 ml Rinsing buffer (Roztok je uchováván při 8°C.)

Ze zkumavky s fixovanými buňkami odebereme 250 tisíc buněk na analyzovaný vzorek (variabilní objem, který verifikujeme po předchozím spočítání buněk v Bürkerově komůrce), který aplikujeme do zkumavky. Současně zpracováváme dva vzorky od jednoho subjektu, přičemž jeden vzorek slouží jako izotypová kontrola (pro protilátku vůči MDR1) a jeden vzorek pro vazbu primární protilátky vůči MDR1. Do obou zkumavek přidáme 2 ml promývacího roztoku a centrifugujeme (rychlostí 500 g / 5 minutu, pokud není uvedeno jinak). Z obou odsajeme supernatant a do obou přidáme 0,5 ml pracovního permeabilizačního roztoku. Centrifugujeme. Opětovně z obou zkumavek odsajeme supernatant a do obou přidáme 2 ml Rinsing Buffer. Centrifugujeme. Opětovně z obou zkumavek odsajeme supernatant, do každé přidáme 40 ul blokačního roztoku (s humánními Fc receptory), doplníme 2 ml Rinsing Buffer a centrifugujeme. Z obou zkumavek odsajeme supernatant. Následně dvakrát zopakujeme předchozí postup, tj. doplníme 2 ml Rinsing Buffer a centrifugujeme, odsajeme supernatant. Poté do jedné zkumavky (samozřejmě adekvátně označené) přidáme 40 ul pracovního roztoku primární protilátky vůči MDR1, do druhé zkumavky (se vzorkem sloužícím jako izotypová kontrola) aplikujeme 40 ul pracovního roztoku izotypové kontroly pro protilátku vůči MDR1. Při pokojové teplotě, a ve tmě, inkubujeme po dobu 30 minut. Následně do obou zkumavek aplikujeme 2 ml Rinsing Buffer. Centrifugujeme. Z obou zkumavek odsajeme supernatant a protřepeme. Do každé zkumavky přidáme 40 ul pracovního roztoku sekundární protilátky. Inkubujeme při pokojové teplotě 30 minut ve tmě. Následně přidáme 2 ml promývacího roztoku do každé zkumavky. Centrifugujeme. Vylijeme supernatant a protřepeme. Aplikaci 2 ml promývacího roztoku, centrifugaci a odsátí supernatantu pro každou zkumavku provedeme ještě dvakrát. Do obou zkumavek aplikujeme 500 ul Rinsing Buffer (resuspendujeme). Mírně promícháme a uchováváme při pokojové teplotě ve tmě před analýzou průtokovým cytometrem. Vzorky analyzujeme nejpozději do 3 hodin od ukončení značení.

Analyzujeme na průtokovém cytometru (FACS Calibur, Becton-Dickinson, USA), měříme pomocí CellQuest softwaru (Becton-Dickinson, USA). Při měření každý vzorek nastavujeme adjustací voltáže detektoru pro FL-1 pro izotypovou kontrolu, která má medián nastaven na kanál 10 +/- 1,5, bezprostředně měříme vzorek s primární protilátkou vůči MDR1. Vzhledem k tomu, že hodnotíme pouze jeden fluorescenční parametr, není nutná kompenzace fluorescenčních kanálů. Hodnoty intenzity fluorescence (relative fluorescence units, RFU) jsou získány pro jedno měření z 10 000 buněk poté, co byla vybrána oblast lymfocytů (na základě velikosti a granularity buněk). Vzorek – izotypová kontrola – slouží k hodnocení pozadí a nespecifických interakcí. Hodnotíme medián intenzity fluorescence (RFU) a procento MDR1 pozitivních buněk vůči MDR1 negativním v intervalech od 10-100 a 100-5140. Po provedení analýzy vytiskneme protokol k analýze každého vzorku, současně provádíme i elektronickou archivaci jak hrubých dat, tak i protokolů k analýze vzorků.

Poznámka: V průběhu postgraduálního studia jsem se podílel na této laboratorní činnosti: 1) izolaci a fixaci mononukleárních buněk periferní krve (kapitola 2.2.2); 2) permeabilizaci mononukleárních buněk a analýze lymfocytárního MDR1 proteinu průtokovou cytometrií metodou nepřímé imunofluorescence (kapitola 2.2.3).

2.2.4 Statistická analýza

Vždy byl analyzován: 1) medián intenzity fluorescence (RFU); 2) zastoupení MDR1 pozitivních lymfocytů v analyzované populaci (%). Expresе lymfocytárního MDR1 proteinu byla mezi subjekty porovnáвана jako: medián exprese MDR1 a (a nebo) procentuální zastoupení MDR1 pozitivních lymfocytů v populaci a (a nebo) medián exprese MDR1 vážený procentem pozitivních buněk a (a nebo) vážené hodnoty mediánu exprese MDR1, kdy váhami chápeme procento MDR1 pozitivních buněk. Porovnání a statistická analýza použitá u jednotlivých studií bude uvedena u těchto studií.

2.3 Výsledky

2.3.1 Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve - u zdravých jedinců - na věku

Hypotéza: Pro aktivitu imunitního a endokrinního systému jsou charakteristické určité změny, které souvisí s věkem (stářím) makroorganismu. MDR1 protein, který aktivitu imunitního systému určitým způsobem reguluje (kapitola 1.2.6), a je aktivitou imunitního systému regulován (McRae et al., 2003) (Ho et al., 2006), by mohl vykazovat změny v expresi MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve závislé na věku jedince. Pokud by byly tyto fyziologické změny exprese MDR1 proteinu významné, mohly by se podílet, na úrovni lymfocytů periferní krve, na farmakodynamice glukokortikoidních léčiv, případně na MDR1 mediované, glukokortikoidní rezistenci.

Cíl: Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve – u zdravých jedinců – na věku.

Distribuce subjektů: Soubor zdravých jedinců středoevropské populace ve věku od 2 měsíců do 24 let.

Pro zařazení do souboru musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) věk od 2 měsíců; 2) věk do 24 let; 3) absence chronického zánětlivého onemocnění (zjištěno dotazem); 4) absence akutního zánětlivého onemocnění v intervalu alespoň 4 týdny před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem a klinickým vyšetřením); 5) bez léčby po dobu alespoň 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem), kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K; 6) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě po dobu alespoň 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem) (Morris et al., 2006). Poznámka: Věk od 2 měsíců byl stanoven hlavně z důvodu možnosti nábora subjektů do studie, který byl prováděn na Dětské klinice Fakultní nemocnice Olomouc (děti do 2 měsíců zde většinou nejsou hospitalizovány, nebo dispenzarizovány).

Základní charakteristika souboru: n = 41; 14 dívek, 27 chlapců; věk v intervalu 2 měsíce – 22,2 let, medián věku 4,73 let; místo nábora subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2006-2011.

Byl posuzován (porovnáván): 1) medián exprese MDR1; 2) věk (roky). Statistická analýza byla provedena programy Statistica 8 software (StatSoft Inc., USA) a R (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko). K posouzení závislostí byl použit Spearmanův korelační koeficient.

2.3.1.1 Výsledky a publikování výsledků studie

U jedinců (subjektů) zařazených do souboru byla prokázána závislost mediánu exprese MDR1 na věku – medián exprese MDR1 se s věkem signifikantně snižoval (Spearmanův korelační koeficient $R = -0.40014$, $p = 0,0095$). U jedinců ve věku do 1 roku a ve věku od 4 do 6 let byl medián MDR1 exprese nejvyšší. Tuto fyziologickou změnu v expresní aktivitě neumíme vysvětlit. Nicméně, pro farmakodynamické použití glukokortikoidních léčiv může být tato změna v expresní aktivitě významná. Zvýšená exprese MDR1 proteinu v cytoplazmatické membráně lymfocytů, buněk cílových pro glukokortikoidní léčiva, může vést k nevýhodnému ovlivnění signální transdukce glukokortikoidního léčiva (k omezení nebo snížení této transdukce) – snížením

ligandové denzity pro glukokortikoidní receptor v cytoplazmě. Nedokážeme posoudit, nakolik se může zvýšená fyziologická exprese MDR1 proteinu v dětské populaci podílet na případné MDR1 mediované glukokortikoidní rezistenci na úrovni lymfocytů periferní krve. Ale předpokládáme, že se může podílet na ovlivnění farmakokinetiky MDR1 transportovatelných léčiv – ovlivněním intracelulární distribuce. Očekávané farmakodynamické změny tak, na úrovni lymfocytů (např. u MDR1 transportovatelných antivirotik nebo MDR1 transportovatelných imunomodulačních léčiv (příloha 1)), nemusí být naplněny.

Slabá stránka studie: Absence stanovení úrovně exprese MDR1 u lymfocytárních subpopulací, které nelze provést při použité metodě fixace lymfocytů.

Výsledky by mohly být publikovány formou původní práce v recenzovaném časopise s impakt faktorem (příloha 1).

Potesil J, Kopriva F, Dzubak P, Godava M, Radova L, Srovnal J, Mihal V, Hajduch M. The expression of multidrug resistance protein 1 and multidrug resistance-associated protein 1 on peripheral blood lymphocytes amongst children and young adults. *Central European Journal of Immunology*. IF (2011) 0,378

2.3.3. Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganismu u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)

Průduškové astma (astma) je (velmi volně) syndromem různě vyjádřených a vzájemně se překrývajících fenotypů projevujících se na podkladě systémové aktivity makroorganismu (imunopatologické aktivity), která vede k chronickým zánětlivým změnám v cestách dýchacího systému (Barnes et al., 2008) (Bell et al., 2011). Těto imunopatologické aktivity se účastní více než 50 humorálních mediátorů (cytokinů) (Barnes et al., 2008). V České republice je odhadována celopopulační prevalence na asi 8 % a prevalence u dětí do 19 let věku na 10-15 % (Pohunek et al., 2012).

Hypotéza: MDR1 protein transportuje mnohé humorální mediátory včetně mediátorů, které se podílí na regulaci aktivity imunitního systému (tabulka 3). Exprese MDR1 je regulována na několika úrovních (Zhou 2007) (Hodges et al., 2011). Kromě jiného je ovlivnitelná i aktivitou imunitního systému, včetně aktivity cytokinů (McRae et al., 2003). Aktivní zánětlivá reakce makroorganismu může vést ke zvýšení exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve (Tsujiura et al., 2005). Pokud by zánětlivá reakce u chronického alergického zánětu – u průduškového astmatu, alergického, IgE mediovaného – vedla k výraznému zvýšení exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve, mohla by se podílet, na úrovni lymfocytů periferní krve, na farmakodynamice glukokortikoidních léčiv, nebo případně na MDR1 mediované glukokortikoidní rezistenci.

Cíl: Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganismu u chronického alergického zánětu mediovaného IgE protilátkami - u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým).

Distribuce subjektů: Porovnání exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve mezi subjekty zařazenými do těchto souborů (skupin):

1. skupina: skupina jedinců s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým, IgE mediovaným, bez terapie;
2. skupina: skupina zdravých jedinců, bez terapie.

Pro zařazení do 1. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) nově diagnostikované lehké perzistující astma, klasifikace podle dokumentu Globální iniciativy pro astma (Global Initiative for Asthma, GINA) GINA 2005 a aktualizovaných verzí (GINA 2009) (příloha 4); 2) prokázána alergie, IgE mediovaná, na inhalační alergeny, přítomností specifických IgE protilátek signifikantní sérovou hladinou specifických IgE protilátek (analyzátor ImmunoCAP 250, Phadia, Švédsko) nebo adekvátní kožní reakcí při kožním vbodovém testu s pozitivní a negativní kontrolou (Allyostal, Stallergenes, Francie); 3) absence jiného chronického zánětlivého onemocnění (zjištěno dotazem); 4) absence akutního zánětlivého onemocnění v intervalu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 5) bez léčby (kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K, v per orální aplikační formě (gtt.)) po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem

biologického materiálu (zjištěno dotazem). Poznámky: 1) pokud nebyl bod 4) a 5) a podmínka informovaného souhlasu splněny v den stanovení diagnózy, který byl i dnem doporučení terapie (terapie astmatu), nebyl subjekt do studie zařazen; 2) odběr biologického materiálu byl prováděn v den stanovení diagnózy a doporučení terapie, nebo den před zahájením terapie; 3) k posouzení přítomnosti specifických IgE protilátek byl preferován kožní vbodový test, prováděný týž den; 4) pokud nebyl kožní vbodový test proveden, bylo provedeno stanovení sérové hladiny specifických IgE protilátek – při nízké hladině specifického IgE (tj. $< 0,35$ IU / ml) nebyl subjekt do studie zařazen (výsledky byly obdrženy dodatečně).

Pro zařazení do 2. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) absence chronického zánětlivého onemocnění (zjištěno dotazem); 2) absence akutního zánětlivého onemocnění v intervalu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 3) bez léčby, kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K, po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem).

Základní charakteristika souboru (souborů):

1. skupina: $n = 20$; 8 dívek, 12 chlapců; věk v intervalu 1,85 – 16,38 let, medián věku 7,62 let; do stanovení exprese MDR1 byla délka klinických příznaků astmatu (splňující kritéria pro lehké perzistující astma) od 4,5 měsíců do 16,8 měsíců; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2010-2012;

2. skupina: $n = 30$; 17 dívek, 13 chlapců; věk v intervalu 0,15 – 17,08 let, medián věku 2,94 let; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2010 – 2012.

Byl posuzován (porovnáván): 1) medián exprese MDR1; 2) procento MDR1 pozitivních lymfocytů; 3) medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů. Statistická analýza byla provedena programy Statistica 8 software (StatSoft Inc., USA) a R (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko). Pro zjištění závislosti exprese lymfocytárního MDR1 proteinu byly použity zobecněné lineární modely s adjustací na věk.

2.3.2.1 Výsledky a publikování výsledků studie

Jedinci s lehkým perzistujícím astmatem, alergickým IgE mediovaným, bez terapie (tj. subjekty v 1. skupině) měli signifikantně nižší medián exprese MDR1 ($p < 0,02$) a také signifikantně nižší procentuální zastoupení MDR1 pozitivních lymfocytů ($p < 5,39 \cdot 10^{-3}$) – při porovnání se zdravými jedinci bez terapie (tj. subjekty zařazenými do 2. (kontrolní) skupiny). Medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů byl u jedinců s lehkým perzistujícím astmatem nižší, ale ne již statisticky významně ($p < 0,22$).

Chronický alergický zánět u průduškového astmatu tak svou systémovou aktivitou pravděpodobně snižuje expresi MDR1 u lymfocytů periferní krve, a neměl by být příčinou glukokortikoidní rezistence, MDR1 mediované, na úrovni lymfocytů. Např. Cytokiny, podílející se na alergické imunopatologické aktivitě, MDR1 expresi zvyšují (IL-2 a tumor nekrotizující faktor- α , TNF α)^(Tsujiimura 2004), ale také snižují (IL-6)^(Poller et al., 2010). Snížená exprese (signifikantně) MDR1 proteinu byla také prokázána např. v zánětlivě změněné tkáni sliznice tlustého střeva u jedinců s ulcerózní kolitidou (srovnáno se zdravými jedinci)^{(Englund et al., 2007) (Gutmann et al., 2008)}. Naopak u jedinců s chronickým zánětem paranazálních dutin byla ve sliznici paranazálních dutin prokázána zvýšená exprese MDR1 (srovnáno se zdravými jedinci)^(Bleier et al., 2012).

Slabé stránky studie: 1) malý počet subjektů v 1. skupině; 2) medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů nevykazuje statisticky signifikantní rozdíl mezi 1. a 2. skupinou; 3) absence stanovení úrovně exprese MDR1 u lymfocytárních subpopulací, které nelze provést při použité metodě fixace lymfocytů.

Výsledky byly publikovány formou původní práce v recenzovaném časopise bez impakt faktoru (příloha 3).

Potěšil J, Kopřiva F, Džubák P, Donevska S, Hajdúch M. Systémový vliv průduškového astmatu na expresi proteinu vícečetné lékové rezistence 1 v lymfocytech periferní krve u dětí. *Alergie*. 2012, roč. 15, č. 3, s. 171-174.

2.3.3 Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na inhalačně aplikovaný glukokortikoid - budesonid - u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)

V terapii průduškového astmatu mají inhalačně aplikované glukokortikoidy své výlučné (ale ne výjimečné postavení), a jsou lékem volby – v komplexní léčebné strategii průduškového astmatu – od „tíže“ lehkého perzistujícího průduškového astmatu (příloha 4). Budesonid je exogenní (syntetický) lipofilní glukokortikoid, aplikovaný u astmatu v inhalační aplikační formě.

Hypotéza: Budesonid by mohl, jako transportovatelný substrát MDR1 proteinu (*in vitro*, buněčná linie epiteliálních buněk střeva exprimujících MDR1 protein – L-MDR1 a Caco-2 buněčná linie) (Dilger et al., 2004), ovlivňovat expresi MDR1 u lymfocytů periferní krve. Pokud by v inhalační aplikační formě podávaný budesonid ovlivňoval expresi MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve u jedinců s průduškovým astmatem (*in vivo*), mohl by se podílet na MDR1 mediované změně aktivity buňky, stejně jako na intracelulární distribuci (dispozici) MDR1 transportovatelných léčiv, případně na MDR1 zprostředkované glukokortikoidní rezistenci (při výrazné indukci exprese). Poznámka: U jedinců s kortikorezistentním astmatem nebyla prokázána zvýšená exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve (Montano et al., 1996). Nicméně, zvýšená exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve byla publikována jako příčina glukokortikoidní rezistence u jiných onemocnění s imunopatologickou aktivitou. Těmito onemocněními např. jsou systémový lupus erythematosus (Tsujiura et al., 2005) nebo nespecifický střevní zánět (Farrell et al., 2000).

Cíl: Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na inhalačně aplikovaný glukokortikoid – budesonid – u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým).

Distribuce subjektů: Prospektivní posouzení exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve mezi subjekty zahrnutými do těchto souborů (skupin):

1. skupina: skupina jedinců s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým, IgE mediováným, bez terapie, před zahájením terapie astmatu glukokortikoidem v inhalační aplikační formě – budesonidem;
2. skupina: skupina jedinců z 1. skupiny, v odstupu 4 týdnů od zahájení terapie astmatu glukokortikoidem v inhalační aplikační formě – budesonidem.

Pro zařazení do 1. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) nově diagnostikované lehké perzistující astma (klasifikace podle dokumentu GINA 2005); 2) prokázaná alergie, IgE mediovaná, na inhalační alergeny – adekvátní kožní reakcí při kožním vbodovém testu s pozitivní a negativní kontrolou (Allyostal, Stallergenes, Francie); 3) absence jiného chronického zánětlivého onemocnění (zjištěno dotazem); 4) bez akutního zánětlivého onemocnění v době odběru biologického materiálu (zjištěno dotazem a klinickým vyšetřením); 5) bez léčby po dobu alespoň 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 6) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě po dobu alespoň 4 týdny před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem) (Morris et al., 2006). Poznámky: 1) pokud nebyl bod 4), 5), 6) a podmínka informovaného souhlasu splněna v den stanovení diagnózy, který byl i dnem doporučení terapie (terapie astmatu), nebyl subjekt do studie zařazen; 2) odběr biologického materiálu byl prováděn v den stanovení diagnózy a doporučení terapie, nebo den před zahájením terapie budesonidem.

Pro zařazení do 2. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) terapie budesonidem po dobu 4 týdnů, denně, v inhalační aplikační formě (inh. sus. pss. nebo inh. sol. pss. nebo inh. plv. dos.), v denní dávce 200-400 ug, dané věkem a aktivitou onemocnění; 2) bez další léčby po dobu těchto 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem), kromě případně

nepravidelně aplikovaného bronchodilatačního léčiva v inhalační aplikační formě (salbutamol inh. sus. pss.); 3) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě po dobu těchto 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 4) bez akutního zánětlivého onemocnění v době odběru biologického materiálu (zjištěno dotazem a klinickým vyšetřením). Poznámky: 1) druhý odběr biologického materiálu byl prováděn v odstupu 4 týdny +/- 4 dny od zahájení léčby budesonidem; 2) nedošlo ke ztrátě subjektů ve studii.

Základní charakteristika souboru (souborů):

1. skupina: n = 32; 15 dívek, 17 chlapců; věk v intervalu 2 – 18 let, medián věku 11 let; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2007-2009;

2. skupina: n = 32; 15 dívek, 17 chlapců; věk v intervalu 2 – 18 let, medián věku 11 let; terapie budesonidem n = 32, medián terapie 4 týdny; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2007-2009.

Posuzovány (porovnávány) byly (mezi jednotlivými skupinami): vážené hodnoty mediánu exprese MDR1, kdy váhami chápeme procento MDR1 pozitivních buněk. Statistická analýza byla provedena programy Statistica 7 software (StatSoft Inc., USA). Byl užit Studentův t-test a Pearsonův korelační koeficient.

2.3.3.1 Výsledky a publikování výsledků studie

Jedinci s lehkým perzistujícím astmatem (alergickým IgE mediovaným) měli po 4týdenní terapii budesonidem v inhalační aplikační formě signifikantně nižší vážené hodnoty mediánu exprese MDR1, kdy váhami chápeme procento MDR1 pozitivních buněk ($p < 10^{-3}$). Inhalačně aplikovaný glukokortikoid budesonid, jako MDR1 transportovatelný substrát, nezpůsobil indukci MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve, naopak jeho expresi snížil. Na základě uvedených výsledků se domníváme, že nižší exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve u jedinců s astmatem léčených inhalačně aplikovaným glukokortikoidem budesonidem je pravděpodobně způsobena jeho imunomodulačním působením, které vede ke snížení imunopatologické aktivity makroorganismu (s následnou nižší buněčnou aktivitou na úrovni lymfocytů periferní krve, projevující se sníženou expresí MDR1), než ovlivněním jeho exprese některým z možných inhibičních mechanismů (Maier et al., 2006).

Výsledky byly publikovány formou publikovaného abstrakta (příloha 5).

Potesil J, Kopriva F, Dzubak P, Hajduch M. Inhaled corticosteroids only decrease on the lymphocytes PGP expression and antileukotrienes mrp expression in asthmatic children after one month treatment. Abstracts 19th ERS Annual Congress, European Respiratory Journal. 2009, roč. 34, Suppl. 53, s. 1981 (P1981).

Potesil J, Kopriva F, Zapalka M, Dzubak P, Hajduch M. Inhaled corticosteroids only decrease on the lymphocytes P-glycoprotein expression and antileukotrienes the multidrug resistance protein expression in asthmatic children after one month treatment. Folia Medica Cassoviensia. 2009, Tomus 61, Suppl. 1, s. 43 (ID 272).

Poznámka: Výsledky studie (s jiným designem) posuzující závislost exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na inhalačně aplikovaný glukokortikoid – budesonid – u jedinců s průduškovým astmatem, byly publikovány formou původní práce v recenzovaném časopise s impakt faktorem (příloha 2).

Kopriva F, Dzubak P, Potesil J, Hajduch M. The anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids versus anti-leukotrienes on the lymphocyte P-glycoprotein (PGP) expression in asthmatic children. Journal of Asthma. 2009, roč. 46, č. 4, s. 366-370.

2.3.4 Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na systémově aplikovaná piperazinová antihistaminika druhé generace (cetirizin dihydrochlorid a levocetirizin dihydrochlorid) u jedinců s alergickým zánětem

Histamin je humorální mediátor syntetizovaný v Golgiho aparátu žírných buněk i bazofilů. Z těchto buněk je spontánně uvolňován, nebo je z nich rychle („překotně“) uvolněn (z granulí – degranulací) při navázání antigenu na IgE protilátky, které jsou na povrchu těchto buněk. Klinický projev takovéto překotné degranulace je zařazován pod akutní alergický zánět. Histamin působí prostřednictvím receptorů. Jsou rozlišovány 4 typy receptorů pro histamin: H1, H2, H3 a H4. V alergické imunopatologické reakci se uplatňuje především transdukce zprostředkována H1 a H4 receptorem. K omezení klinického projevu této alergické reakce jsou užívána léčiva ze skupiny blokátorů H1 receptorů pro histamin, tzv. antihistaminika. H1 antihistaminika pro systémovou aplikační formu jsou rozdělována na: 1) antihistaminika první generace; 2) antihistaminika druhé generace. Mezi antihistaminika druhé generace jsou řazeny: 1) piperidinová antihistaminika; 2) piperazinová antihistaminika. Mezi piperazinová antihistaminika druhé generace patří: cetirizin dihydrochlorid (cetirizin) a levocetirizin dihydrochlorid (levocetirizin). Cetirizin i levocetirizin mají velmi podobnou farmakokinetiku a liší se jen v některých parametrech (Baltes et al., 2001) (Tillement et al., 2003).

Hypotéza: cetirizin a levocetirizin jsou MDR1 transportovatelné substráty, které mohou prostřednictvím MDR1 vstupovat do lékových interakcí s dalšími léčivy (Bartra et al., 2006). Navíc ovlivňují expresi MDR1 proteinu (*in vitro*, buněčná linie epiteliálních buněk střeva exprimujících MDR1 protein – Caco-2 buněčná linie) (Shen et al., 2007). Cetirizin je racemát složený ze stejného množství: 1) levotočivého enantiomeru – R-enantiomeru – levocetirizinu; 2) pravotočivého enantiomeru – S-enantiomeru – dextrocetirizinu. Levocetirizin indukuje expresi MDR1 (v závislosti na koncentraci), zatímco dextrocetirizin inhibuje expresi MDR1 (v závislosti na koncentraci) (Shen et al., 2007). Vliv cetirizinu a levocetirizinu na buněčnou expresi MDR1 *in vivo* nebyl doposud studován – včetně možného ovlivnění exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve. Pokud by levocetirizin, případně cetirizin, užívaný v systémové aplikační formě pro klinické projevy alergického zánětu, zvyšoval expresi MDR1 u lymfocytů periferní krve, mohl by se podílet na MDR1 zprostředkované interakci s jinými léčivy, včetně glukokortikoidních léčiv, na úrovni lymfocytů. Tak by se mohla tato antihistaminika účastnit MDR1 zprostředkované rezistence na glukokortikoidní léčiva (i jiná MDR1 transportovatelná léčiva) na úrovni lymfocytů periferní krve. Změna exprese MDR1 lymfocytů, indukovaná cetirizinem nebo levocetirizinem, by také mohla být jednou z příčin jejich „imunomodulačního působení“.

Cíl 1): Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na systémově aplikovaná antihistaminika – cetirizin a levocetirizin – u jedinců s lehkou intermitentní rýmou, alergickou.

Distribuce subjektů: Porovnání exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve mezi subjekty zařazenými do těchto souborů (skupin):

1. skupina: skupina jedinců s lehkou intermitentní rýmou, alergickou, IgE mediovanou, se systémovou terapií cetirizinem nebo levocetirizinem v per orální aplikační formě;
2. skupina: skupina zdravých jedinců, bez terapie.

Pro zařazení do 1. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) byla (dříve) diagnostikována lehká intermitentní rýma (klasifikace podle dokumentu Alergická rýma a její vliv na astma (Allergic rhinitis and its impact on asthma, ARIA) ARIA 2008); 2) byla prokázána alergie, IgE mediovaná, na inhalační alergeny - adekvátní kožní reakcí při kožním vbodovém testu s pozitivní a negativní kontrolou (Allyostal, Stallergenes, Francie); 3) pravidelná systémová denní aplikace cetirizinu (v per orální aplikační formě (gtt. nebo tbl.), v denní dávce 5-10 mg v závislosti na věku subjektu) nebo levocetirizinu (v per orální aplikační formě (gtt. nebo por. sol. nebo tbl.), v denní dávce 2,5-5 mg, v závislosti na věku subjektu), po dobu nejméně 3 měsíců; 4) absence akutního zánětlivého onemocnění po dobu alespoň 4 týdny před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 5) bez jiné léčby (kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K v per orální aplikační formě (gtt.)) po dobu alespoň 4 týdny před odběrem biologického materiálu

(zjištěno dotazem); 6) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě po dobu alespoň 4 týdny před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem). Poznámky: přítomnost specifických IgE protilátek musela být prokázána před odběrem biologického materiálu v intervalu kratším než 12 měsíců.

Pro zařazení do 2. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) absence chronického zánětlivého onemocnění (zjištěno dotazem); 2) absence akutního zánětlivého onemocnění po dobu alespoň 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 3) bez léčby (kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K) po dobu alespoň 4 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 4) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě (zjištěno dotazem).

Základní charakteristika souboru (souborů):

1. skupina: n = 20; 14 dívek, 6 chlapců; věk v intervalu 2 – 16 let, medián věku 7 let; terapie cetirizinem n = 10, terapie levocetirizinem n = 10, terapie v intervalu 3 – 7 měsíců, medián terapie 4,5 měsíce; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2008-2011;

2. skupina: n = 45; 34 chlapců, 11 dívek; věk v intervalu 0,2 – 15 let, medián věku 3 roky; místo náboru subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2006-2011. Poznámka: Většina subjektů ve 2. skupině byla zastoupena i v souboru uvedeném v kapitole 2.3.1 (Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve – u zdravých jedinců – na věku).

Byl posuzován (porovnáván): Medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů. Statistická analýza byla provedena programy Statistica 8 software (StatSoft Inc., USA) a R (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko). Pro zjištění závislostí exprese lymfocytárního MDR1 proteinu byly použity zobecněné lineární modely s adjustací na věk.

2.3.4.1 Výsledky a publikování výsledků studie

Jedinci s alergickou lehkou intermitentní rýmou s terapií cetirizinem nebo levocetirizinem (tj. subjekty zařazené do 1. skupiny) měli signifikantně vyšší medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů ($p < 10^{-6}$), při porovnání se zdravými jedinci bez terapie (tj. subjekty zařazenými do 2. (kontrolní) skupiny). Cetirizin a levocetirizin by tak mohl indukovat expresi MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve *in vivo*.

Slabé stránky studie: 1) malý počet subjektů v 1. skupině; 2) terapeuticky nehomogenní soubor v 1. skupině.

Výsledky byly publikovány formou publikovaného abstrakta (příloha 5).

Potěšil J., Kopřiva F., Džubák P., Kratochvílová R., Radová L., Mihál V., Hajdúch M. Effect of second-generation antihistamines on lymphocyte ABCB1 protein expression. *Československá pediatrie*. 2011, roč. 66, č. 6, s. 418.

Cíl 2): Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na systémově aplikovaná antihistaminika – cetirizin a levocetirizin – u jedinců s lehkou perzistující rýmou, alergickou IgE mediovanou, a s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, a alergickým IgE mediovaným.

Distribuce subjektů: Porovnání exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve mezi subjekty zařazenými do těchto souborů (skupin):

1. skupina: skupina jedinců se systémovou terapií cetirizinem v per orální aplikační formě, s lehkou perzistující rýmou, alergickou IgE mediovanou, a s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým IgE mediovaným;

2. skupina: skupina jedinců se systémovou terapií levocetirizinem v per orální aplikační formě, s lehkou perzistující rýmou, alergickou IgE mediovanou, a s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým IgE mediovaným;

3. skupina: skupina jedinců s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým IgE mediovaným.

Pro zařazení do 1. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: 1) pravidelná systémová per orální denní aplikace cetirizinu (v lékové aplikační formě gtt. nebo tbl.), v denní dávce 5-10 mg v závislosti na věku subjektu, po dobu nejméně 6 týdnů; 2) byl bez jiné léčby než cetirizinem (kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K) po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 3) diagnostikována (dříve) perzistující rýma, lehká, která přetrvává (klasifikace podle dokumentu ARIA 2008); 4) prokázaná alergie (dříve), IgE mediovaná, na inhalační alergeny – přítomností specifických IgE protilátek signifikantní sérovou hladinou specifických IgE protilátek (analyzátor ImmunoCAP 250, Phadia, Švédsko) nebo adekvátní kožní reakcí při kožním vbodovém testu s pozitivní a negativní kontrolou (Allyostal, Stallergenes, Francie); 5) absence akutního zánětlivého onemocnění po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); 6) bez užívání induktorů nebo inhibitorů MDR1 ve stravě po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem) (Morris et al., 2006). Poznámky: přítomnost specifických IgE protilátek musela být prokázána před odběrem biologického materiálu v intervalu kratším než 12 měsíců.

Pro zařazení do 2. skupiny musel subjekt splňovat tyto podmínky: : 1) pravidelná systémová per orální denní aplikace levocetirizinu (v lékové aplikační formě gtt. nebo por. sol. nebo tbl.), v denní dávce 2,5-5 mg v závislosti na věku subjektu, po dobu nejméně 6 týdnů; 2) byl bez jiné léčby než levocetirizinem (kromě vitamínu D3 (cholecalciferolu), případně vitamínu K) po dobu alespoň 6 týdnů před odběrem biologického materiálu (zjištěno dotazem); body 3) až 6) jsou shodné s jedinci v 1. skupině.

Pro zařazení do 3. skupiny musel subjekt splňovat podmínky, uvedené v kapitole 2.3.2 (Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganismu u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)), tj. podmínky pro skupinu jedinců s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým, IgE mediovaným, bez terapie.

Poznámka: U všech jedinců byla, při odběru biologického materiálu ke stanovení exprese MDR1, také odebrána periferní krev k vyšetření těchto „vybraných“ laboratorních parametrů: 1) absolutní počet eosinofilů v krevním obraze; 2) sérová hladina celkového IgE; 3) sérová hladina eosinofilního kationického proteinu (eosinophilic cationic protein, ECP).

Základní charakteristika souboru (souborů):

1. skupina: n = 20; 7 dívek, 13 chlapců; věk v intervalu 2,85 – 19,93 let, medián věku 7,67 let; délka terapie cetirizinem od 2 měsíců do 26 měsíců, medián délky terapie 7 měsíců; místo nábory subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2010-2012;

2. skupina: n = 13; 9 dívek, 4 chlapci; věk v intervalu 1,67 – 17,66 let, medián věku 12,01 let; délka terapie levocetirizinem od 2 měsíců do 12 měsíců, medián délky terapie 6 měsíců; místo nábory subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2010-2012;

3. skupina: n = 21; 8 dívek a 13 chlapců; věk v intervalu 1,85 – 16,38 let, medián věku 8,1 let; místo nábory subjektů do studie: Dětská klinika Fakultní nemocnice Olomouc; interval odběru biologického materiálu: 2010-2012. Poznámka: Většina subjektů ve 3. skupině byla zastoupena i v souboru uvedeném v kapitole 2.3.2 (Posouzení závislosti exprese MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve na imunopatologické aktivitě makroorganismu u jedinců s průduškovým astmatem (lehkým perzistujícím, alergickým)), tj. ve skupině jedinců s nově diagnostikovaným lehkým perzistujícím astmatem, alergickým, IgE mediovaným, bez terapie.

Byl posuzován (porovnáván): 1) medián exprese MDR1; 2) medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů. Statistická analýza byla provedena programy Statistica 8 software (StatSoft Inc., USA) a R (R Foundation for Statistical Computing, Rakousko). Pro zjištění závislosti exprese lymfocytárního MDR1 proteinu byly použity zobecněné lineární modely s

adjustací na věk. Kruskal Wallisův test byl použit k porovnání vybraných laboratorních parametrů mezi skupinami a k porovnání délky terapie mezi 1. a 2. skupinou.

2.3.4.2 Výsledky a publikování výsledků studie

Jedinci s alergickým zánětem léčení cetirizinem (tj. subjekty v 1. skupině) měli signifikantně vyšší medián exprese MDR1 ($p < 5,23 \cdot 10^{-8}$) i signifikantně vyšší medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů ($p < 4,02 \cdot 10^{-6}$), než jedinci s alergickým zánětem bez terapie cetirizinem (tj. subjekty v 3. skupině). Jedinci s alergickým zánětem léčení levocetirizinem (tj. subjekty v 2. skupině) měli signifikantně vyšší medián exprese MDR1 ($p < 9,76 \cdot 10^{-5}$) i signifikantně vyšší medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů ($p < 1,62 \cdot 10^{-3}$) než jedinci s alergickým zánětem bez terapie levocetirizinem (tj. subjekty v 3. skupině). Jedinci léčení cetirizinem měli vyšší expresi MDR1, ale ne významně (medián exprese MDR1 $p < 0,28$; medián exprese MDR1 vážený procentem MDR1 pozitivních lymfocytů $p < 0,19$). V délce terapie (antihistaminiky) nebyl mezi 1. a 2. skupinou rozdíl ($p < 0,25$).

Mezi subjekty zařazenými do jednotlivých skupin nebyl statisticky významný rozdíl ve vybraných laboratorních parametrech, tj. v: 1) absolutním počtu eosinofilů ($p < 0,66$); 2) sérové hladině celkového IgE ($p < 0,88$); 3) v sérové hladině ECP ($p < 0,33$).

Cetirizin a levocetirizin, užívaný v systémové aplikační formě, by tak mohl indukovat expresi MDR1 proteinu u lymfocytů periferní krve *in vivo*, a vstupovat tak do MDR1 mediovaných lékových interakcí, včetně interakcí s glukokortikoidními léčivy. Pro farmakodynamické použití glukokortikoidních léčiv může být tato změna v expresní aktivitě významná – zvýšená exprese MDR1 proteinu v cytoplazmatické membráně lymfocytů může vést k omezené nebo snížené signální transdukcii - snížením ligandové denzity pro glukokortikoidní receptor, tj. snížením intracelulární (cytoplazmatické) distribuce (denzity). Nedokážeme posoudit, nakolik se může zvýšená exprese MDR1 proteinu podílet na případné MDR1 mediované glukokortikoidní rezistenci na úrovni lymfocytů periferní krve. Stejně tak nedokážeme posoudit, nakolik může změna exprese MDR1 proteinu, indukována cetirizinem nebo levocetirizinem, ovlivnit aktivitu lymfocytu – změnou jeho transportní aktivity na úrovni cytoplazmatické membrány (i případně biomembrán kompartmentů). Podle našich výsledků usuzujeme, že inhibiční vliv dextrocetirizinu na expresi MDR1, prokázáný *in vitro*, je *in vivo* minimální, nebo žádný.

Pokud by byla prokázána indukce exprese MDR1 – cetirizinem nebo levocetirizinem – u lymfocytů periferní krve v další nezávislé studii, musel by se přísně přehodnotit jejich farmakologický přínos. Souběžná terapie cetirizinem nebo levocetirizinem by mohla vést k významným MDR1 zprostředkovaným lékovým interakcím na úrovni lymfocytů s MDR1 transportovatelnými léčivy, u kterých je, pro farmakodynamiku léčiva na úrovni buňky, nezbytná „adekvátní“ intracelulární (lymfocytární) distribuce (denzita) léčiva, tj. u: 1) imunomodulačních léčiv – glukokortikoidů, chlorochinu a kolchicinu; 2) antivirotik, užívaných v léčbě infekce HIV (human immunodeficiency virus) (abacivir, lamivudin, stavudin, tenofovir a amprenavir, atazanavir, darunavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, saquinavir, tipranavir (Pal et al., 2011)).

Zvýšená exprese MDR1 u lymfocytů, indukovaná aplikací cetirizinu nebo levocetirizinu, by se mohla podílet i na zvýšeném transportu endogenních glukokortikoidů (endogenního glukokortikoidu) z cytoplazmy mimo buňku (Yates et al., 2003). Snížená ligandová denzita endogenních glukokortikoidů v cytoplazmě by mohla teoreticky vést k „posunu“ probíhající imunopatologické aktivity (reakce) do další „oblasti“ zvýšené nedostatečné regulace zánětlivé aktivity makroorganizmem – endogenní imunomodulační (protizánětlivý) vliv by tak mohl být částečně eliminován.

Slabé stránky studie: 1) nadále malý počet subjektů v 1. skupině i 2. skupině; 2) absence stanovení úrovně exprese MDR1 u lymfocytárních subpopulací, které nelze provést při použité metodě fixace lymfocytů.

Výsledky nebyly publikovány.

3. Anotace

Protein vícečetné lékové rezistence 1 (multidrug resistance protein 1, MDR1), také označovaný jako ATP-binding cassette (ABC) sub-family B member 1 (ABCB1) nebo P-glykoprotein 1 (P-glycoprotein 1, P-GP1), je transmembránový primární aktivní transportér, který transportuje mnohé endogenní látky z intracelulárního do extracelulárního prostoru, nebo mezi buněčnými kompartmenty. Tím se podílí např. na regulaci endokrinního a imunitního systému – působí jako imunoregulátor. S použitím průtokové cytometrie s nepřímou imunofluorescencí jsme prokázali vliv věku na fyziologickou expresi MDR1 u lymfocytů periferní krve ($n = 41$, věk od 2 měsíců do 22,5 let; Spearmanův korelační koeficient $R = -0,40014$, $p = 0,0095$). Zvýšená exprese MDR1 byla u dětí do 1 roku věku a ve věku 4-6 let – příčinu neznáme. Zvýšená lymfocytární exprese MDR1 se může podílet na snížení lymfocytární koncentrace MDR1 transportovatelných antivirotik a imunomodulačních léčiv a přispívat tak k ovlivnění (omezení) jejich farmakodynamického terapeutického užití. Např., zvýšená exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve je pokládána za jednu z možných příčin glukokortikoidní rezistence na buněčné úrovni. Tak se MDR1 protein podílí i na fenoménu lékové rezistence, stejně jako na MDR1 mediovaných lékových interakcích. MDR1 transportovatelné jsou četné exogenní látky, včetně léčiv užívaných jako blokátory H1 receptorů pro histamin, tzv. antihistaminika (druhé generace). Mezi antihistaminika druhé generace (piperazinová antihistaminika) patří cetirizin dihydrochlorid (cetirizin) a levocetirizin dihydrochlorid (levocetirizin). Shen *et al.* (2007) prokázal (*in vitro*, buněčná linie Caco-2 původem z lidského kolorektálního karcinomu užívaná jako model epiteliálních buněk střeva), že exprese MDR1 může zvýšit levotočivý enantiomer cetirizinu – R-enantiomer levocetirizin, zatímco S-enantiomer dextrocetirizin inhibuje expresi MDR1 (v závislosti na koncentraci). Ze stejného důvodu jsme posoudili závislost exprese MDR1 u lymfocytů periferní krve na systémové terapii cetirizinem a levocetirizinem, která trvala alespoň 6 týdnů, u jedinců do 19 let věku (*in vivo*). K průkazu exprese MDR1 jsme opětovně použili průtokovou cytometrii s nepřímou imunofluorescencí. U jedinců léčených cetirizinem ($n = 20$, ve věku od 2,85 do 18,93 let, medián věku 7,67 let) a u subjektů léčených levocetirizinem ($n = 13$, ve věku od 1,67 do 17,66 let, medián věku 12,01 let), s lehkou perzistující alergickou rýmou a nově diagnostikovaným průduškovým astmatem, lehkým perzistujícím, alergickým, jsme prokázali vyšší expresi MDR1 proteinu ($p < 5,23 \cdot 10^{-8}$ a $p < 9,76 \cdot 10^{-5}$) než u jedinců s nově diagnostikovaným průduškovým astmatem, lehkým perzistujícím, alergickým ($n = 21$, ve věku 1,85 do 16,38 let, medián věku 8,1 let). Můžeme tak pouze předpokládat, že dlouhodobá systémová terapie cetirizinem nebo levocetirizinem může negativně ovlivnit souběžnou terapii s MDR1 transportovatelnými antiviroty a imunomodulačními léčivy – glukokortikoidy. Zvýšená exprese může vést ke snížení koncentrace MDR1 transportovatelných léčiv v lymfocytech, v cílových buňkách pro některá antivirotika a imunomodulační léčiva, a může tak přispívat k omezení jejich farmakodynamického terapeutického užití, nebo k lékové rezistenci. Je proto důležité a nezbytné posoudit vliv cetirizinu a levocetirizinu na lymfocytární expresi MDR1, stejně jako na transportní aktivitu a intracelulární (lymfocytární) koncentraci vybraných MDR1 transportovatelných léčiv.

3. Summary

Multidrug resistance protein 1 (MDR1), also known as ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1) or P-glycoprotein 1 (P-GP1), is a membrane-associated efflux transporter and it transports certain endogenous compounds from the intracellular to the extracellular space, or between cell compartments. Thus MDR1 participates, for example, in the regulation of endocrine and immune system - it acts as immunomodulator. We showed the impact of age on the physiological expression of MDR1 in peripheral blood lymphocytes (PBLs) using the flow cytometry analysis with indirect immunofluorescence staining technique (n = 41, aged from 2 months to 22.5 years of age; Spearman R = - 0.40014, p = 0.0095). The increased PBLs MDR1 expression was found in children up to 1 year of age and from 4 to 6 years of calendar age. In addition, this increased expression may reduce the concentration of MDR1 transported antiviral and immunomodulatory drugs in lymphocytes and thus lead to the attenuated efficacy of these drugs in younger children. For example, increased MDR1 expression in PBLs can lead to MDR1-mediated drug resistance to MDR1 transported immunomodulatory drugs – glucocorticoids. Thus MDR1 participates in the drug resistance phenomenon and in drug-drug interactions. Additionally, MDR1 transports certain exogenous compounds including second-generation histamine H1-receptor antagonists (i.e. antihistamines). Cetirizine dihydrochloride (cetirizine) and levocetirizine dihydrochloride (levocetirizine) are piperazine second-generation antihistamines. Cetirizine is a zwitterion and as a racemate consists in equal amounts of levocetirizine [(R) enantiomer, the eutomer] and dextrocetirizine [(S) enantiomer, the distomer]. Shen *et al.* (2007) used a human Caco-2 cell line model to demonstrate an increase in MDR1 mRNA and MDR1 expression in cells pretreated with levocetirizine and a decrease in MDR1 mRNA and MDR1 expression in cells pretreated with dextrocetirizine (in a concentration dependent manner). To address this, we focused on the *in vivo* impact of an 6-week and prolonged systemic administration of cetirizine and levocetirizine on the PBLs MDR1 expression in subjects under 19 years of age. The PBLs MDR1 expression was determined by using the flow cytometry analysis with indirect immunofluorescence staining technique. Subjects treated with cetirizine (n = 20, aged from 2.85 to 18.93 years, median age 7.67 years) and levocetirizine (n = 13, aged from 1.67 to 17.66 years, median age 12.01 years) suffered from mild persistent allergic rhinitis and having newly diagnosed mild persistent allergic asthma showed increased PBLs MDR1 expression in comparison to subjects who had not used antihistamines in the last 6 weeks and had newly diagnosed mild persistent allergic asthma (n = 21; 1.85 to 16.38 years, median age 8.1 years; p < 5.23*10⁻⁸ and p < 9.76*10⁻⁵). Thus we can only assume that long-term therapy with cetirizine or levocetirizine may affect concomitant therapy with MDR1 transported antiviral and immunomodulatory drugs, glucocorticoid included. Reduced concentration of MDR1 transported immunomodulatory drugs in lymphocytes, the target cells for these drugs, might lead to attenuated efficacy or to drug resistance. It is therefore appropriate to assess the impact of cetirizine and levocetirizine on PBLs MDR1 expression, PBLs MDR1 transport activity, as well as on the lymphocyte concentration and the efficacy of selected drugs.

4. Seznam použité literatury

Dokumenty:

ARIA 2008. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organisation, GA(2)LEN and allergen). Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denbur J, Kokkens WJ, Togias A, et al. *Allergy*. 2008; Suppl 86:8-160.

Česká pneumologická a ftizeologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně. Doporučený postup diagnostiky a léčby astmatu, 2013. <<http://www.pneumologie.cz/guidelines>>

GINA 2005. Global Initiative for Asthma: A Pocket Guide for Physicians and Nurses. Updated 2005. Updated from the NHLBI/WHO Workshop Report: Global Strategy for Asthma Management and Prevention. NIH Publication No. 02-3659, 2005.

GINA 2009. Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 years and Younger. The Global Initiative for Asthma, 2009. <http://www.ginasthma.org/documents /6>

GINA 2012. Global Strategy for Asthma Management and Prevention. The Global Initiative for Asthma, 2012. <http://www.ginasthma.org/documents /4>

Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 years and Younger. The Global Initiative for Asthma, 2009. <<http://www.ginasthma.org/documents /6>>

Články:

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, et al. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995; 270:286-90.

Ballard PL. Delivery and transport of glucocorticoids to target cells. *Monogr Endocrinol*. 1979; 12:25-48.

Baltes E, Coupez R, Giezek H, et al. Absorption and disposition of levocetirizine, the eutomer of cetirizine, administered alone or as cetirizine to healthy volunteers. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001; 15:269-77.

Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev*. 1996; 17:245-61.

Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:183-92.

Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008; 118:3546-56.

Barnes PJ, Greening AP, Crompton GK. Glucocorticoid resistance in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152:S125-40.

Bartra J, Valero AL, del Cuvillo A, et al. Interactions of the H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006; 16 Suppl 1:29-36.

Bel EH, Sousa A, Fleming L et al. Unbiased Biomarkers for the Prediction of Respiratory Disease Outcome (U-BIOPRED) Consortium, Consensus Generation. Diagnosis and definition of severe refractory asthma: an international consensus statement from the Innovative Medicine Initiative (IMI). *Thorax*. 2011; 66:910-7.

Blackwell GJ, Carnuccio R, Di Rosa M, et al. Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. *Nature*. 1980; 287:147.

Bleier BS. Regional expression of epithelial MDR1/P-glycoprotein in chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2012; 2:122-5.

Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *AAPS J*. 2005; 7:E1-5.

- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71:537–592.
- Broccatelli F, Carosati E, Cruciani G, et al. Transporter-mediated Efflux Influences CNS Side Effects: ABCB1, from Antitarget to Target. *Mol Inform.* 2010; 29:16-26.
- Chang C, Bahadduri PM, Polli JE, et al. Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2006; 34:1976-84.
- Chikanza IC, Kozaci DL. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford).* 2004; 43:1337-45.
- Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE.* 2005; 2005:pe48.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, et al. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem.* 1990; 38:1277-87.
- Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, et al. Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 144:1026-32.
- Crowe A, Tan AM. Oral and inhaled corticosteroids: differences in P-glycoprotein (ABCB1) mediated efflux. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260:294-302.
- Crowe A, Wright C. The impact of P-glycoprotein mediated efflux on absorption of 11 sedating and less-sedating antihistamines using Caco-2 monolayers. *Xenobiotica.* 2012; 42:538-49.
- Den Boer ML, Zwaan CM, Pieters R, et al. Optimal immunocytochemical and flow cytometric detection of P-gp, MRP and LRP in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1997; 11:1078-85.
- Dilger K, Schwab M, Fromm MF. Identification of budesonide and prednisone as substrates of the intestinal drug efflux pump P-glycoprotein. *Inflamm Bowel Dis.* 2004; 10:578-83.
- Donnenberg VS, Burckart GJ, Zeevi A, et al. P-glycoprotein activity is decreased in CD4+ but not CD8+ lung allograft-infiltrating T cells during acute cellular rejection. *Transplantation.* 2004; 77:1699-706.
- Drach J, Gsur A, Hamilton G, et al. Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes. *Blood.* 1996; 88:1747-54.
- Efferth T, Osieka R. Clinical relevance of the MDR-1 gene and its gene product, P-glycoprotein, for cancer chemotherapy: a meta-analysis. *Tumor Diagn Ther.* 1993; 14:238–43.
- Englund G, Jacobson A, Rorsman F, et al. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13:291-7.
- Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:2306-13.
- Farrell RJ, Murphy A, Long A, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology.* 2000; 118:279-88.
- Finstad CL, Yin BW, Gordon CM, et al. Some monoclonal antibody reagents (C219 and JSB-1) to P-glycoprotein contain antibodies to blood group A carbohydrate determinants: a problem of quality control for immunohistochemical analysis. *J Histochem Cytochem.* 1991; 39:1603-10.
- Flower RJ, Blackwell GJ. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature.* 1979; 278:456.
- Frank MH, Denton MD, Alexander SI, et al. Specific MDR1 P-glycoprotein blockade inhibits human alloimmune T cell activation in vitro. *J Immunol.* 2001; 166:2451-9.

Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, et al. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 2004; 14:505-14.

Goleva E, Li LB, Eves PT, et al. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173:607-16.

Göttlicher M, Heck S, Herrlich P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med (Berl).* 1998; 76:480-9.

Gupta S, Kim CH, Tsuruo T, et al. Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function. *J Clin Immunol.* 1992; 12:451-8.

Gutmann H, Hruz P, Zimmermann C, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein expression in patients with newly diagnosed and therapy-refractory ulcerative colitis compared with healthy controls. *Digestion.* 2008; 78:154-62.

He Y, Liu Y, Zeng S. Stereoselective and multiple carrier-mediated transport of cetirizine across Caco-2 cell monolayers with potential drug interaction. *Chirality.* 2010; 22:684-92.

Henmi K, Yoshida M, Yoshikawa N, et al. P-glycoprotein functions in peripheral-blood CD4+ cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:873-8.

Ho EA, Piquette-Miller M. Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines. *Curr Cancer Drug Targets.* 2006; 6:295-311.

Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011; 21:152-61.

Honig SM, Fu S, Mao X, et al. FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes. *J Clin Invest.* 2003; 111:627-37.

Iqbal M, Gibb W, Matthews SG. Corticosteroid regulation of P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier. *Endocrinology.* 2011; 152:1067-79.

Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:649-57.

Johnstone RW, Ruefli AA, Tainton KM, Smyth MJ. A role for P-glycoprotein in regulating cell death. *Leuk Lymphoma* 2000; 38:1-11.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, et al. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 1990; 62:1189-204.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455:152-62.

Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:240-6.

Kazuhiro Ito, K Fian Chung, Ian M Adcock. Update on glucocorticoid action and resistance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006; 117:522-43.

Kim WY, Benet LZ. P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression in vitro. *Pharm Res.* 2004; 21:1284-93.

Kim SW, Rhee HJ, Ko J, et al. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem.* 2001; 276:15712.

Kino T, Chrousos GP. Tissue-specific glucocorticoid resistance-hypersensitivity syndromes: multifactorial states of clinical importance. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109:609-13.

- Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, et al. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood*. 1994; 83:2451-8.
- Kopřiva F. Posttranskripční a negenomové účinky glukokortikoidů. *Remedia*. 2010; 20:60-63.
- Lee CA, Cook JA, Reyner EL, et al. P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010; 6:603-19.
- Leung DY, Martin RJ, Szeffler SJ, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med*. 1995; 181:33-40.
- Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, et al. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*. 2007; 7:154-79.
- Löwenberg M, Verhaar AP, Bilderbeek J, et al. Glucocorticoids cause rapid dissociation of a T-cell-receptor-associated protein complex containing LCK and FYN. *EMBO Rep*. 2006; 7:1023-9.
- Löwenberg M, Verhaar AP, van den Brink GR, et al. Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for T-cell immunosuppression. *Trends Mol Med*. 2007; 13:158-63.
- Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1024:102-23.
- Ludescher C, Pall G, Irschick EU, et al. Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets. *Br J Haematol*. 1998; 101:722-7.
- Mahar Doan KM, Humphreys JE, Webster LO, et al. Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 303:1029-37.
- Maier A, Zimmermann C, Beglinger C, et al. Effects of budesonide on P-glycoprotein expression in intestinal cell lines. *Br J Pharmacol*. 2007; 150:361-8.
- Manceau S, Giraud C, Declèves X, et al. Expression and induction by dexamethasone of ABC transporters and nuclear receptors in a human T-lymphocyte cell line. *J Chemother*. 2012; 24:48-55.
- Matthews JG, Ito K, Barnes PJ, et al. Defective glucocorticoid receptor nuclear translocation and altered histone acetylation patterns in glucocorticoid-resistant patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113:1100-8.
- McGuire AH, Dehdashti F, Siegel BA, et al. Positron tomographic assessment of 16 alpha-[18F] fluoro-17 betaestradiol uptake in metastatic breast carcinoma. *J Nucl Med*. 1991; 32:1526–1531.
- McRae MP, Brouwer KL, Kashuba AD. Cytokine regulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev*. 2003; 35:19-33.
- Montano E, Schmitz M, Blaser K, et al. P-glycoprotein expression in circulating blood leukocytes of patients with steroid-resistant asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996; 6:14-21.
- Morris ME, Zhang S. Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*. 2006; 78:2116-30.
- Neuhaus W, Mandikova J, Pawlowitsch R, et al. Blood-brain barrier in vitro models as tools in drug discovery: assessment of the transport ranking of antihistaminic drugs. *Pharmazie*. 2012; 67:432-9.
- Neyfakh AA, Serpinskaya AS, Chervonsky AV, et al. Multidrug-resistance phenotype of a subpopulation of T-lymphocytes without drug selection. *Exp Cell Res*. 1989; 185: 496-505.
- Pal D, Kwatra D, Minocha M, et al. Efflux transporters- and cytochrome P-450-mediated interactions between drugs of abuse and antiretrovirals. *Life Sci*. 2011; 88:959-71.

- Pileri SA, Sabattini E, Falini B, et al. Immunohistochemical detection of the multidrug transport protein P170 in human normal tissues and malignant lymphomas. *Histopathology*. 1991; 19:131-40.
- Poller B, Drewe J, Krähenbühl S, et al. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30:63-70.
- Pratt WB. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 1993; 268: 21455-8.
- Raggers RJ, Vogels I, van Meer G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J*. 2001; 357:859-65.
- Rajagopal A, Simon SM. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:3389-99.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, et al. A physiologic function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:6924-9.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 2005; 353:1711-23.
- Riordan JR, Deuchars K, Kartner N, et al. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*. 1985; 316:817-9.
- Sánchez-Vega B, Krett N, Rosen ST, et al. Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5:3062-70.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000; 21:55-89.
- Savory JG, Hsu B, Laquian IR, et al. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:1025-37.
- Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; 83:37-48.
- Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, et al. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*. 1995; 270:283-6.
- Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM, et al. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*. 1995; 15:943-53.
- Sedlák V, Chlumský J, Teř M, et al. Doporučený postup diagnostiky a léčby obtížně léčitelného bronchiálního astmatu. 2011. <<http://www.pneumologie.cz/guidelines>>
- Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*. 2008; 9:105-127.
- Shen S, He Y, Zeng S. Stereoselective regulation of MDR1 expression in Caco-2 cells by cetirizine enantiomers. *Chirality*. 2007; 19:485-90.
- Sher ER, Leung DY, Surs W, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *J Clin Invest*. 1994; 93:33-9.
- Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1261:55-63.
- Spahn JD, Szeffler SJ, Surs W, et al. A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J Immunol*. 1996; 157:2654-9.

Terry LJ, Shows EB, Wentz SR. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*. 2007; 318:1412-6.

Tillement JP, Testa B, Brée F. Compared pharmacological characteristics in humans of racemic cetirizine and levocetirizine, two histamine H1-receptor antagonists. *Biochem Pharmacol*. 2003; 66:123-6.

Tobler A, Meier R, Seitz M, et al. Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood*. 1992; 79:45-51.

Tsujimura S, Saito K, Nakayama S, et al. Clinical relevance of the expression of P-glycoprotein on peripheral blood lymphocytes to steroid resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2005; 52:1676-83.

Tsujimura S, Saito K, Nakayama S, et al. Etanercept overcomes P-glycoprotein-induced drug resistance in lymphocytes of patients with intractable rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2010; 20:139-46.

Tsujimura S, Saito K, Nakayama S, et al. Transcriptional regulation of multidrug resistance-1 gene by interleukin-2 in lymphocytes. *Genes Cells*. 2004; 9:1265-73.

Tsujimura S, Saito K, Nawata M, et al. Overcoming drug resistance induced by P-glycoprotein on lymphocytes in patients with refractory rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:380-8.

Tsujimura S, Saito K, Tokunaga M, et al. Overcoming treatment unresponsiveness mediated by P-glycoprotein overexpression on lymphocytes in refractory active systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* 2005; 15:28-32.

Ueda K, Okamura N, Hirai M, et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem*. 1992; 267:24248-52.

van Oosten MJ, Dolhain RJ, Koper JW, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010; 12:R159.

Webster JI, Carlstedt-Duke J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; 82:277-88.

Webster JI, Sternberg EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J Endocrinol*. 2004; 181:207-21.

Wirhth S, Lanzavecchia A. ABCB1 transporter discriminates human resting naive B cells from cycling transitional and memory B cells. *Eur J Immunol*. 2005; 35:3433-41.

Yates CR, Chang C, Kearbey JD, et al. Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids. *Pharm Res*. 2003; 20:1794-803.

Zhang C, Kwan P, Zuo Z, et al. The transport of antiepileptic drugs by P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012; 64:930-42.

Zhang G, Zhang L, Duff GW. A negative regulatory region containing a glucocorticosteroid response element (nGRE) in the human interleukin-1beta gene. *DNA Cell Biol*. 1997; 16:145-52.

Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008; 38:802-32.

Monografie:

Bartůňková J, Šedivá A, Janda A. Imunodeficiency. Grada Publishing, Praha 2007.

Dostálek M, Janoštková E, Juřica J, Zahradníková L. Farmakokinetika. Grada Publishing, Praha 2006.

Krejsek J, Kopecký O. Klinická imunologie. Nucleus HK, Pardubice 2004.

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. Farmakologie a toxikologie. Grada Publishing, 2004: 439-441.

Kapitoly v monografiích:

Kopřiva F. Imunopatologie alergie. In: Petrů V, Čapková Š, Daňková E, Fuchs M, Homolka M, Chládková J, Kopřiva F, Novák J, Pohunek P, Rybníček O, Šedivá A, Šimoníčková J, Špičák V, Turzíkova J. Dětská alergologie. Praha, CZ: Mladá fronta, 2012: 41-65.

Pohunek P. Průduškové astma v dětském věku. In: Petrů V, Čapková Š, Daňková E, et al. Dětská alergologie. Praha, CZ: Mladá fronta, 2012: 229-250.

5. Přehled publikací autora

Původní vědecké publikace uveřejněné v časopisech s IF:

Kopriva F, Dzubak P, Potesil J et al. The anti-inflammatory effects of inhaled corticosteroids versus anti-leukotrienes on the lymphocyte P-glycoprotein (PGP) expression in asthmatic children. *Journal of Asthma*. 2009 roč. 46, č. 4, s. 366-370. IF (2009) 1,372

Původní vědecké publikace uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech:

Potěšil J, Kopriva F, Džubák P, Donevska S, Hajdúch M. Systémový vliv průduškového astmatu na expresi proteinu vícečetné lékové rezistence 1 v lymfocytech periferní krve u dětí. *Alergie*. 2012, roč. 15, č. 3, s. 171-174.

Přehledné/souborné práce uveřejněné v časopisech s IF:

Přehledné/souborné práce uveřejněné v ostatních recenzovaných časopisech:

Kapitoly v monografiích:

Mihál V, Čelková M, Dubrava L, Flögelová H, Gvozdiaková T, Hálek J, Halířová M, Hradilová M, Kantor L, Karásková E, Klásková E, Kolářová J, Kopriva F, Krahulík D, Langerová P, Malý T, Mikušková E, Neklanová M, Novák Z, Pospíšilová D, Potěšil J, Saitz J, Smolka V, Šmakal O, Urbánek K, Velgáňová Véghová M, Venháčová J, Venháčová P, Zápalka M, Zapletalová J. Vybrané kapitoly z pediatrie – aktualizované a rozšířené vydání. Univerzita Palackého v Olomouci. 2012, počet stran 750. ISBN-978-80-244-3229-8

Potěšil J. Artritidy související s infekcí. Počet stran 14 (s. 455-468).

Potěšil J. Vaskulitidy. Počet stran 13 (s. 491-508).

Publikovaná abstrakta:

Potěšil J. Terapie alergické rýmy, bronchiálního astmatu a atopického ekzému. XVI. Moravskoslezské pediatrické dny. Ostrava, 23.-24.11.2007. Sborník abstrakt, strana 5.

Potěšil J, Džubák P, Kratochvílová R, Janošťáková A, Kopriva F, Zápalka M, Karásková E, Vospělová J, Hajdúch M. Proteiny lékové rezistence a jejich význam u nenádorových onemocnění. III. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie. Olomouc, 28-30.11. 2007. Sborník abstrakt, strana 14.

Potesil J, Kopriva F, Dzubak P, Hajduch M. Inhaled corticosteroids only decrease on the lymphocytes PGP expression and antileukotrienes mrp expression in asthmatic children after one month treatment. Abstracts 19th ERS Annual Congress, *European Respiratory Journal*. 2009, roč. 34, Suppl. 53, s. 1981 (P1981).

Potesil J, Kopriva F, Zapalka M, Dzubak P, Hajduch M. Inhaled corticosteroids only decrease on the lymphocytes P-glycoprotein expression and antileukotrienes the multidrug resistance protein expression in asthmatic children after one month treatment. *Folia Medica Cassoviensia*. 2009, Tomus 61, Suppl. 1, s. 43 (ID 272).

Potěšil J, Kopriva F, Džubák P, Kratochvílová R, Radová L, Mihál V, Hajdúch M. Effect of second-generation antihistamines on lymphocyte ABCB1 protein expression. *Československá pediatrie*. 2011, roč. 66, č. 6, s. 418.

Potěšil J, Kopriva F, Džubák P, Radová L, Hajdúch M. Zvýšená exprese lymfocytárního ABCB1 proteinu u dětí dlouhodobě užívajících piperazinová antihistaminika druhé generace. *Česká revmatologie*. 2012, roč. 20, č. 3, s. 126-127.

6. Přílohy

6.1 Příloha 1

6.2 Příloha 2

6.3 Příloha 3

6.4 Příloha 4

6.5 Příloha 5