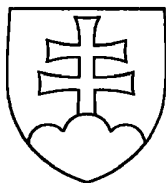


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 29.07.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 08/690 476
(32) Dátum priority: 30.07.96
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 10.09.99
(86) Číslo PCT: PCT/EP97/04125, 29.07.97

(21) Číslo dokumentu:

113-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁶ :

A 61K 31/195,
A 23L 1/305,
A 23 1/03
// (A 61K 31/195,
A 61K 38:13)
(A 61K 31/195,
A 61K 31:435)

(71) Prihlasovateľ: NOVARTIS NUTRITION AG, Bern, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Schneider Heinz, Cordast, CH;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Liečivo alebo nutričný prípravok na báze glycínu na použitie na profylaxiu a/alebo terapiu renálnej dysfunkcie**

(57) Anotácia:
Opisuje sa použitie glycínu na prípravu liečiva alebo nutričného prípravku na profylaxiu a/alebo terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi.

Liečivo alebo nutričný prípravok na báze glycínu na použitie na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia glycínu na prípravu liečiva alebo/a nutričného prípravku, ktorý sa môže aplikovať terapeuticky pacientom na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej látkami patriacimi do tried cyklosporínov alebo/a askomycínov.

Doterajší stav techniky

Cyklosporíny patria do triedy štrukturálne charakteristických cyklických poly-N-metylovaných undekapeptidov, ktoré majú zvyčajne protizápalový, protivírusový alebo/a protiparazitárny účinok, každý vo väčšom alebo menšom stupni. Prvým z identifikovaných cyklosporínov bol fungálny metabolit Cyklosporín A alebo Ciclosporin a jeho štruktúra je uvedená v The Merck Index, 11. vydanie, Merck & Co., Inc., Rathway, New Jersey, USA (1989) pod číslom 2759 zoznamu. Neskôr sa identifikovali Cyklosporíny B, C, D a G, ktoré sú takisto uvedené v The Merck Index pod číslom 2759 zoznamu. Je známy aj veľký počet syntetických analógov a reprezentatívne príklady sú uvedené v EP 296 123, EP 484 281 a GB 2 222 770. Na účely tohto popisu sa Cyklosporín A a jeho štrukturálne podobné analógy a deriváty, ako aj metabolity, vo všeobecnosti uvádzajú ako "cyklosporíny".

Askomycíny, z ktorých najznámejší je FK-506, tvoria inú triedu vo všeobecnosti imunosupresívnych látok, uvádzanú aj ako makrolidové supresíva. FK-506 je makrolidové imunosupresívum, ktoré je produkované *Streptomyces tsukubaensis* č. 9993. Štruktúra FK-506 je uvedená v dodatku k už uvedenému The Merck Index ako položka A5. Je známy aj veľký počet príbuzných zlúčenín, ktoré si zachovávajú základnú štruktúru a imunologické vlastnosti FK-506. Tieto zlúčeniny sú opísané v rôznych publikáciách, napríklad v EP 184 162, EP 315 973, EP 323 042, EP 423 714, EP 427 680, EP 465 426, EP 474 126, WO 91/13889, WO 91/19495, EP 484 935, EP 532

088, EP 532 089, WO 93/5059 a podobne. Askomycín, FK-506 a ich štrukturálne podobné analógy a deriváty, ako aj metabolity, sa v tomto popise súhrnne nazývajú "askomycíny".

Vzhľadom na svoje neobyčajne užitočné vlastnosti majú cyklosporíny (najmä Cyklosporíny A a G) a askomycíny (napríklad FK-506) široké použitie, napríklad pri prevencii rejekcie transplantátu, pri liečbe autoimúnnych chorôb, ako je reumatoidná artritída a psoriáza, ale aj pri liečbe viacliekovej rezistencie. Cyklosporíny a askomycíny majú aj niektoré vedľajšie účinky, pričom najzávažnejšia je renálna dysfunkcia, najmä nefrotoxicita, hlavne pri vyšších dávkach. Nefrotoxicita sa vyznačuje znížením renálneho prietoku krvi a glomerulárnej filtrácie so zodpovedajúcim zvýšením kreatinínu, alkalickéj fosfatázy a močoviny v sére, ako aj napučiavaním proximálnych buniek a nekrózou a infiltráciou makrofágov. V niektorých štúdiách sa dokázalo, že hypoxia poškodzuje pomerne selektívne proximálne kanáliky a znížený krvný prietok môže viesť k hypoxii. Uviedol sa dôkaz zahŕňajúci do tejto patológie intracelulárne kalcium a blokátory kalciových kanálikov sú účinné pri minimalizácii poškodenia. Blokátory kalciových kanálikov sa však nemôžu podať bez ďalších následkov. V súčasnosti teda nie je známa žiadna použiteľná terapia pre tento dôležitý vedľajší účinok na obličky.

Podstata vynálezu

Teraz sa neočakávane zistilo, že glycín je vhodný na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cefalosporínmi alebo askomycínmi.

Podľa vynálezu sa najmä zistilo, že dietetický glycín inhibuje alebo/a zlepšuje jeden z hlavných vedľajších účinkov chronickej aplikácie cyklosporínu - nefrotoxicitu. Glycín bráni zníženiu rýchlosti glomerulárnej filtrácie. Glycín bráni aj zvýšeniu kreatinínu a močoviny v sére a má sklon minimalizovať zvýšenie alkalickéj fosfatázy účinkom Cyklosporínu A. Dietetickým glycínom sa zabráni aj napučiavaniu a nekróze proximálnych

kanálikov a infiltrácii makrofágov. Je teda zrejmé, že glycín má veľký ochranný účinok na nefrotoxicitu spôsobenú Cyklosporínom A.

Vzhľadom na uvedené účinky spadajú do rozsahu vynálezu liečivá alebo/a nutričné prípravky obsahujúce glycín, ako aj spôsoby použitia glycínu. Na použitie v liečivách, nutričných prípravkoch a spôsoboch podľa vynálezu sa glycín účelne používa vo forme voľnej aminokyseliny (na rozdiel od formy soli), vo forme prekursorov glycínu, najmä alanínu alebo serínu (*L*-alanínu, *L*-serínu) takisto vo forme voľnej aminokyseliny, vo forme fyziologicky prijateľnej soli uvedených aminokyselín alebo vo forme zmesi uvedených aminokyselín alebo/a ich fyziologicky prijateľných solí. Glycín sa výhodne používa vo forme voľnej aminokyseliny (na rozdiel od formy soli), vo forme fyziologicky prijateľnej soli alebo vo forme zmesi glycínu vo forme voľnej aminokyseliny s glycínom vo forme fyziologicky prijateľnej soli. Najvýhodnejší je glycín vo forme voľnej aminokyseliny. Glycín sa podľa vynálezu môže použiť aj vo forme dipeptidov.

Predmetom vynálezu je teda použitie glycínu na prípravu liečiva alebo nutričného prípravku na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi.

Predmetom vynálezu je ďalej spôsob profylaxie alebo/a terapie renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi, ktorý spočíva v tom, že sa aplikuje človeku alebo inému cicavcovi pred liečbou, súčasne s liečbou alebo po liečbe cyklosporínom alebo askomycínom, liečivo alebo nutričný prípravok obsahujúci glycín v množstve, ktoré je schopné inhibovať alebo/a zlepšiť renálnu dysfunkciu.

Ďalej je predmetom vynálezu aj liečivo alebo nutričný prípravok obsahujúci glycín na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi.

Predmetom vynálezu je aj liečivo alebo nutričný prípravok obsahujúci terapeuticky účinné množstvo cyklosporínu alebo askomycínu v kombinácii s glycínom v množstve schopnom inhibovať

alebo/a zlepšiť renálnu dysfunkciu vyvolanú cyklosporínom alebo askomycínom.

Glycín je užitočný najmä na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie - nefrotoxicity.

Glycín je ďalej užitočný najmä na terapiu alebo/a profylaxiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi, ako je Cyklosporín A (Ciclosporin) a PSC 833 ((3'-deoxy-3'-oxo-MeBmt)¹(Val)²-Ciclosporin, napr. ako sa opisuje v EP 296 122), najmä Cyklosporín A.

Glycín je zvlášť užitočný aj na terapiu alebo/a profylaxiu renálnej dysfunkcie vyvolanej askomycínmi, ako je FK-506 a ASM (33-epi-chlór-33-deoxyaskomycín, napr. ako sa opisuje v príklade 66a EP 427 680), najmä FK-506.

Ďalej je glycín užitočný najmä na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej imunosupresívnymi cyklosporínmi alebo askomycínmi.

Nutričný prípravok alebo liečivo sa môže pacientovi aplikovať enterálne alebo parenterálne. Výhodná je cesta enterálnej aplikácie. Výhodnými aplikačnými cestami sú najmä orálna aplikácia alebo/a aplikácia žalúdočnou sondou. Liečivo alebo prípravok sa účelne aplikuje vo forme vodného roztoku. Liečivo alebo prípravok vo forme vhodnej na enterálnu aplikáciu je teda výhodne vodný alebo vo forme prášku, pričom sa prášok účelne pred použitím pridá k vode. Pri použití aplikácií žalúdočnou sondou bude množstvo vody, ktorá sa má pridať, závisieť okrem iného od pacientovej potreby vody a od jeho stavu. Je zrejmé, že na akútnu liečbu je cesta parenterálnej aplikácie najvýhodnejšia.

Liečivo alebo prípravok môžu byť zostavené tak, aby pacientovi poskytl 1 až 80 g, výhodne 10 až 60 g, zvlášť výhodne 15 až 30 g glycínu za 24 hodín. Množstvo liečiva alebo prípravku, ktoré sa má aplikovať, závisí do značnej miery od pacientových špecifických potrieb. Takéto denné množstvá glycínu sú vhodné na liečbu požadovaných účinkov, ako aj na profylaxiu/predliečbu. Liečivo

alebo prípravok obsahujúci glycín sa môže pacientovi aplikovať v takom množstve, aby sa koncentrácia glycínu v pacientovej plazme zvýšila na hodnotu medzi 0,5 a 2,0 mM, výhodne medzi 1,0 a 2,0 mM. Aj keď sa anticipujú vyššie koncentrácie než sú uvedené koncentrácie, očakáva sa, že sa dosiahnu významné klinické účinky, ak sa koncentrácia kyseliny zvýši ako dôsledok aplikácie prípravku alebo liečiva, takže je v rozsahu od 1,2 do 1,5 mM. U traumatických, hyperkatabolických pacientov môže byť dokonca výhodné zvýšiť hladiny glycínu, serínu alebo alanínu v plazme asi na 0,2 až 0,3 mM, čo zodpovedá hladinám glycínu v plazme zdravých jedincov.

Liečivo alebo nutričný prípravok obsahuje výhodne iba glycín a prípadne *L*-arginín alebo *L*-ornitín ako voľné aminokyseliny (na rozdiel od aminokyselín viazaných na proteín alebo peptid).

Keď sa glycín aplikuje vo forme liečiva, bude takéto liečivo obsahovať od 0,1 do 99 g glycínu na 100 g.

Vo všeobecnosti sa dosiahnu priaznivé účinky, keď sa glycín aplikuje vo forme nutričného prípravku, ktorý môže byť podľa okolností kompletne zostavenou výživou (t. j. výživou dodávajúcou v zásade všetku potrebnú energiu, aminokyseliny, vitamíny, minerály a stopové prvky) alebo doplnkom výživy. Doplnok výživy typicky zaistuje 5 až 20 % celkovej dennej kalorickej potreby, výhodne asi 10 % celkovej dennej kalorickej potreby. Nutričný prípravok bude výhodne prijímaný vo vodnej kvapalnej forme. Nutričný prípravok teda môže obsahovať zdroj sacharidov, tuk lipidov (zdroj tuku) alebo/a proteín (zdroj dusíka) a glycín, ktorý sa vyznačuje tým, že je prítomný v kompletnej výžive v množstve asi 0,2 až 60 g, výhodne 5 až 45 g, zvlášť výhodne 7,5 až 30 g na 100 g suchej hmotnosti prípravku. Nutričný prípravok bude výhodne ďalej obsahovať iné nutrične výhodné komponenty, ako sú vitamíny, minerály, stopové prvky, vlákna (výhodne rozpustné vlákna). Množstvo sacharidov je v rozsahu od 0 do 85 % hmotnostných, výhodne od 25 do 75 % hmotnostných, množstvo tuku je v rozsahu od 0 do 30 % hmotnostných a množstvo proteínu v rozsahu od 0 do 75 %

hmotnostných, výhodne od 15 do 65 % hmotnostných. Výhodné nutričné prípravky zahŕňajú nasledovné prípravky: doplnok výživy pozostávajúci v podstate z glycínu a sacharidov, doplnok výživy pozostávajúci v podstate z glycínu, sacharidov a proteínu alebo/a kompletná výživa pozostávajúca v podstate z glycínu, sacharidu, proteínu, tuku, vitamínov, minerálov, stopových prvkov a prípadne vlákien. Takéto doplnky výživy alebo kompletné výživy výhodne ďalej obsahujú L-arginín alebo inú fyziologicky prijateľnú zlúčeninu spojenú so syntézou oxidov dusíka, ako je L-ornitín alebo glycerol, pričom sa uprednostňuje L-arginín.

Ako príklady vhodných zdrojov dusíka sa dajú uviesť nutrične prijateľné proteíny, ako sú proteíny sójových bôbov alebo proteíny odvodené od mlieka, ako je srvátka, kazeináty alebo práškové odstredeného mlieka alebo/a ich proteínové hydrolyzáty. Vhodnými zdrojmi sacharidov sú všetky cukry, maltodextríny a škroby. Ako vhodné zdroje tukov sa dajú uviesť triglyceridy ako aj di- a monoglyceridy.

Príkladmi vitamínov vhodných na inkorporáciu do liečiva alebo prípravku podľa vynálezu sú vitamín E, vitamín A, vitamín D, vitamín K, kyselina listová, tiamín, riboflavín, vitamín B₁, B₂, B₆ a B₁₂, niacín, biotín a kyselina pantoténová v nutrične prijateľnej forme.

Príkladmi minerálnych prvkov a stopových prvkov vhodných na inkorporáciu do liečiva alebo prípravku sú sodík, draslík, vápnik, fosfor, horčík, mangán, meď, zinok, železo, selén, chróm a molybdén v nutrične prijateľnej forme.

Výraz "rozpuštné vlákna", ako sa tu používa, sa týka vlákien, ktoré sú schopné podstúpiť podstatnú fermentáciu v hrubom čreve, aby sa nakoniec vytvorili masné kyseliny s krátkym reťazcom. Príkladmi vhodných rozpuštných vlákien sú pektín, guma guar, guma zo struku svätéhojanskeho chleba (*Ceratonia*), xantánová guma, ktoré prípadne môžu byť hydrolyzované. Pre dospelých je celkové množstvo rozpuštných vlákien účelne v rozsahu od 3 do 30 g.

Je potrebné uviesť, že glycín sa môže použiť v kombinácii s jedným alebo viacerými nasledovnými komponentmi:

- (i) s ω -3-polynenasýtenými mastnými kyselinami (PUFA), prípadne v zmesi s ω -6-polynenasýtenými mastnými kyselinami,
- (ii) s L-arginínom alebo s inou fyziologicky prijateľnou zlúčeninou spojenou so syntézou oxidov dusíka, alebo s ich zmesami, a
- (iii) so zdrojom nukleobázy.

Pritom sa dáva prednosť použitiu liečiva alebo nutričného prípravku obsahujúceho glycín v kombinácii s arginínom alebo s inou fyziologicky prijateľnou zlúčeninou spojenou so syntézou polyamínov, ako je ornitín. Výhodné je aj použitie liečiva alebo nutričného prípravku obsahujúceho glycín, arginín alebo ornitín a ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA).

Zdroje nukleobázy vhodné na použitie v kombinácii s glycínom sú tvorené alebo pozostávajú z prírodných nukleobáz, nukleozidov, nukleotidov, ribonukleovej kyseliny (RNA), deoxyribonukleovej kyseliny (DNA), ich ekvivalentov alebo/a zmesí obsahujúcich jednu alebo niekoľko týchto zlúčenín.

Prírodné nukleobázy zahŕňajú puríny adenín a guanín, ako aj pyrimidíny cytozín, tymín a uracil. Keď je zdroj nukleobázy vo forme voľných nukleobáz, výhodný je uracil.

Prírodné nukleozidy zahŕňajú nukleozidy ribózy adenosín, guanosín, uridín a cytidín a nukleozidy deoxyribózy deoxyadenosín, deoxyguanosín, deoxytymidín a deoxycytidín.

Prírodné nukleotidy zahŕňajú fosfátové estery prírodných nukleozidov, ako sú monofosfáty adenylátu (AMP), guanylátu (GMP), uridylátu (UMP), cytidilátu (CMP), deoxytymidylátu (dTMP), deoxycitidylátu (dCMP) a difosfáty a trifosfáty prírodných nukleozidov, ako sú adenosíndifosfát (ADP) a adenosíntrifosfát (ATP).

Uprednostňuje sa vyčistený zdroj nukleobázy, ako je droždie. Môžu sa však použiť aj iné zdroje, ako je mäso a podobne. Zdrojom nukleobázy je výhodne RNA.

Predmetom vynálezu sú teda liečivá alebo nutričné prípravky obsahujúce účinné množstvá:

- (a) glycínu (komponent (a))
v spojení s jedným alebo viacerými komponentmi zvolenými z
- (b) ω -3-polynenasýtených mastných kyselín, prípadne v zmesi s ω -6-polynenasýtenými mastnými kyselinami (komponent (b)),
- (c) L-arginínu alebo inej fyziologicky prijateľnej zlúčeniny spojenej so syntézou oxidov dusíka, alebo ich zmesi (komponent (c)), a
- (d) zdroja nukleobázy (komponent (d)).

Dávkovanie by malo byť také, aby liečivá alebo nutričné prípravky boli účinné pri prevencii alebo/a liečbe nefrotoxicity vyvolanej makrolidovými imunosupresívnymi liekmi.

Jednotlivá dávka takéhoto liečiva alebo nutričného prípravku obsahuje výhodne 1,5 až 80 hmotnostných dielov komponentu (a) v spojení s nasledovnými množstvami jedného alebo viacerých komponentov zvolených z (b) až (d): 0,1 až 20 hmotnostných dielov komponentu (b), 3 až 40 hmotnostných dielov komponentu (c) a 0,1 až 4,0 hmotnostné diely komponentu (d). Zvlášť výhodná jednotlivá dávka obsahuje 1,5 až 80 hmotnostných dielov komponentu (a) v spojení s nasledovnými množstvami jedného alebo viacerých komponentov zvolených z (b) až (d): 2 až 5 hmotnostných dielov komponentu (b), 7,5 až 20 hmotnostných dielov komponentu (c) a 1,7 až 2,0 hmotnostné diely komponentu (d).

Množstvo komponentov (a) až (d) aplikované denne bude účelne zodpovedať 1,5 až 80 g pre komponent (a), 0,1 až 20 g, výhodne 2

až 5 g, pre komponent (b), 3 až 40 g, výhodne 7,5 až 20 g, pre komponent (c) a 0,1 až 4,0, výhodne 1,7 až 2,0 g, pre komponent (d).

Pokiaľ ide o komponent (d), uvedené dávkovanie sa týka RNA, DNA, nukleozidov alebo nukleotidov. V prípade nukleobáz je jedna hmotnostná jednotka nukleobáz považovaná za ekvivalentnú 2,5 až 3,0 hmotnostným jednotkám RNA, DNA, nukleozidov alebo nukleotidov.

V prípade, keď sa glycín v liečivách alebo v nutričných prípravkoch použije v kombinácii s jednou alebo viacerými vyššie uvedenými komponentmi (b), (c) a (d), budú tieto liečivá alebo nutričné prípravky obsahovať účelne v jednotlivej dávke

- (a) 1,5 až 80 hmotnostných dielov glycínu, v kombinácii s jednou alebo viacerými zlúčeninami zvolenými zo skupiny pozostávajúcej z
- (b) 2 až 5 hmotnostných dielov ω -3-polynenasýtených mastných kyselín,
- (c) 7,5 až 20 hmotnostných dielov L-arginínu, L-ornitínu alebo glycerolu, alebo ich zmesi, a
- (d) 1,7 až 2,0 hmotnostných dielov RNA.

Výhodné liečivá alebo nutričné prípravky obsahujú v jednotlivej dávke:

- (a) 1,5 až 80 hmotnostných dielov glycínu v spojení s
- (c) 3 až 40 hmotnostnými dielmi, výhodne 7,5 až 20 hmotnostnými dielmi, arginínu alebo ekvivalentného množstva jednej alebo viacerých fyziologicky prijateľných zlúčenín spojených so syntézou polyamínov alebo ekvivalentné množstvo zmesi arginínu s takouto zlúčeninou.

Výhodnejšie obsahujú liečivá alebo nutričné prípravky podľa vynálezu komponent (a) v kombinácii s komponentom (c) v

hmotnostnom pomere od 1 : 2 do 4 : 1, výhodne najmä v hmotnostnom pomere od 1 : 1 do 2 : 1.

Ďalej obsahujú liečivá alebo nutričné prípravky výhodne v jednotlivej dávke:

- (a) 1,5 až 80 hmotnostných dielov glycínu v kombinácii s
- (b) 0,1 až 20 hmotnostnými dielmi, výhodne 2 až 5 hmotnostnými dielmi, ω -3-polynenasýtených mastných kyselín, a
- (c) 3 až 40 hmotnostnými dielmi, výhodne 7,5 až 20 hmotnostnými dielmi, arginínu alebo s ekvivalentným množstvom jednej alebo viacerých iných fyziologicky prijateľných zlúčenín spojených so syntézou polyamínov alebo s ekvivalentným množstvom zmesi arginínu s takouto zlúčeninou.

ω -3-Polynenasýtené mastné kyseliny sú účelne chránené proti peroxidácii počas skladovania prípravku.

Fyziologicky prijateľné cesty ochrany ω -3-polynenasýtených mastných kyselín proti peroxidácii počas skladovania sú v odbore známe. Zahŕňajú fyziologicky prijateľnú mikroenkapsuláciu ω -3-polynenasýtených mastných kyselín a použitie fyziologicky prijateľných antioxidantov v množstvách dostačujúcich na ochranu mastných kyselín.

Typickým príkladom vhodného fyziologicky prijateľného mikroenkapsulačného činidla je škrob. Mikroenkapsulácia sa môže uskutočniť známym spôsobom. Mikro kapsule sa môžu potiahnuť známym spôsobom fyziologicky prijateľnými obalovými prostriedkami, ako je arabská guma.

Ako typické príklady antioxidantov vhodných na ochranu mastných kyselín proti peroxidácii sa dajú uviesť antioxidačné vitamíny, ako je vitamín C, vitamín E, alebo ich zmesi.

Množstvo pridaného antioxidantu by malo postačovať na zabránenie peroxidácie ω -3-polynenasýtených mastných kyselín. Tieto množstvá sa dajú ľahko vypočítať. Vo všeobecnosti sa kvôli zjednodušeniu budú akékoľvek antioxidanty používať v nadbytku. Je potrebné vziať do úvahy, že prítomnosť akéhokoľvek iného prostriedku aplikovaného v kombinácii s ω -3-polynenasýtenými mastnými kyselinami môže vyžadovať prispôsobenie množstva použitého antioxidantu.

ω -3-Polynenasýtené mastné kyseliny sa môžu použiť vo forme vhodnej na fyziologické dodanie ω -3-polynenasýtených mastných kyselín, napr. vo forme voľnej kyseliny, vo forme triglyceridu alebo vo forme fyziologicky prijateľných prírodných zdrojov ω -3-polynenasýtených mastných kyselín. Tieto prírodné zdroje zahŕňajú ľanový olej a rybie oleje, ako je menhadenový olej, lososí olej, makrelový olej, olej z tuniaka, tuk z tresčej pečene a olej zo sardel. Tieto prírodné zdroje, najmä rybie oleje, obsahujú značné množstvá ω -3-polynenasýtených mastných kyselín. Ak sa používajú ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny v triglyceridovej forme, tieto triglyceridy môžu zahŕňať estery s inými fyziologicky prijateľnými mastnými kyselinami. Výhodné ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny zahŕňajú kyselinu eikozapentaénovú (EPA) a kyselinu dokozaheptaénovú (DHA) vo forme voľnej kyseliny, v triglyceridovej forme alebo vo forme prírodných zdrojov s vysokým obsahom EPA alebo/a DHA.

Je zrejmé, že ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny sa môžu aplikovať vo vyšších množstvách, než sa uvádzajú, a že tieto vyššie množstvá zvyčajne nezhoršia požadovaný účinok alebo nevyvolajú nežiaduce vedľajšie účinky.

K zlúčeninám zvlášť vhodným na použitie ako komponent (c) v prípravku podľa vynálezu patrí *L*-arginín, glycerol a *L*-ornitín, najvýhodnejšie *L*-arginín. Komponent (c) sa môže použiť vo voľnej forme, vo forme fyziologicky prijateľnej soli s kyselinou fosforečnou, s kyselinou citrónovou, s kyselinou vínou, s kyselinou fumarovou, s kyselinou adipovou alebo s kyselinou

mliečnou, alebo vo forme malého peptidu. Výhodne sa používa L-arginín vo voľnej forme.

Výraz "malé peptidy", ako sa tu používa, sa týka peptidov obsahujúcich 2 až 6, výhodne 2 až 4, aminokyseliny.

Ako sa už uviedlo, ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny sa budú účelne aplikovať vo forme rybích olejov chránených alebo nechránených proti peroxidácii. Takéto rybie oleje obsahujú aj ω -6-polynenasýtené mastné kyseliny.

ω -6-Polynenasýtené mastné kyseliny majú takisto priaznivý účinok na imunitnú odpoveď a na odolnosť voči infekcii po operácii. Výživy podľa vynálezu budú preto účelne ďalej obsahovať ω -6-polynenasýtené mastné kyseliny.

Na účely vynálezu budú ω -6-polynenasýtené mastné kyseliny vo forme voľnej kyseliny alebo vo forme vhodnej na fyziologické dodanie ω -6-polynenasýtených mastných kyselín, napr. v triglyceridovej forme. Ako príklady ω -6-polynenasýtených mastných kyselín zvlášť vhodných na použitie podľa vynálezu sa dajú uviesť kyselina linoleová a kyselina arachidónová, pričom najvýhodnejšia je kyselina linolová. Príklady vhodných zdrojov ω -6-polynenasýtených mastných kyselín sú v odbore známe. Patria k nim rybie oleje a rastlinné oleje. Ako príklady zdrojov ω -6-polynenasýtených mastných kyselín s vysokým obsahom kyseliny linolovej sa dajú uviesť safrolový olej, slnečnicový olej, sójový olej, bavlníkový olej a kukuričný olej.

Aplikácia denného množstva ω -6-polynenasýtených mastných kyselín v rozsahu od 1,5 do 5,0 g zvyčajne postačuje na dosiahnutie priaznivého účinku. Jednotlivá dávka liečiva alebo nutričného prípravku definovaného vyššie môže teda ďalej obsahovať 1,5 až 5 hmotnostných dielov ω -6-polynenasýtených mastných kyselín.

Okrem komponentov (b), (c) a (d) a ω -6-polynenasýtených mastných kyselín sa môžu k výživám podľa vynálezu pridať ďalšie komponenty, ktoré môžu mať priaznivý účinok na aktivitu glycínu.

Ako príklad takýchto priaznivých komponentov sa dajú uviesť ω -9-polynenasýtené mastné kyseliny. Výhodným prírodným zdrojom takýchto zmesí mastných kyselín sú rybie oleje. Vzhľadom na ich chuť a iné dôvody sa budú rybie oleje v orálnych aplikačných formách používať výhodne v enkapsulovanej forme.

V prípade, že je nutričný prípravok určený na použitie ako doplnok výživy, množstvo jeho prostredníctvom dodanej energie by nemalo byť príliš veľké, aby sa zbytočne nepotlačila pacientova chuť k jedlu. Doplnok by mal účelne obsahovať zdroje energie v množstve dodávajúcim 628 až 4186,8 kJ/deň, výhodne 1046,7 až 2093,4 kJ/deň. Príspevok zdroja dusíka, zdroja sacharidov a zdroja lipidov k celkovej dennej kalorickej potrebe sa pohybuje v širokých rozsahoch. Na použitie ako doplnok sa môže aplikácia uskutočniť v práškovej alebo kvapalnej forme.

Čas liečby sa bude zhodovať s liečbou imunosupresívnym liekom.

Doplnok výživy sa bude účelne aplikovať vo forme jednotlivých dávok vhodných na aplikáciu doplnku 1 až 4-krát denne. Ak nutričné prípravky obsahujú zdroje energie, je vhodné nedodávať viac než 4186,8 kJ/deň. Okrem tohto obmedzenia, pokiaľ ide o prívod energie, sa môžu a budú nutričné prípravky na prevenciu alebo/a liečbu nefrotoxicity vyvolanej makrolidovými imunosupresívnymi liečivami účelne dodávať vo forme kompletnej výživy alebo doplnkov výživy, ako sa opisuje vyššie.

Typické farmakologicky prijateľné formy prípravkov (liečiv) na orálnu aplikáciu budú ďalej obsahovať farmakologicky prijateľné riedidlá, nosiče, vitamíny, korenia, pigmenty alebo/a iné prísady, o ktorých je odborníkovi dobre známe, že sú vhodné na inkorporáciu do takéhoto prípravku, a prípadne makrolidového imunosupresívneho liečiva.

Výživy a prípravky podľa vynálezu sa môžu získať známym spôsobom, napríklad zmiešaním ingrediencií.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Vynález je ďalej ilustrovaný nasledovnými príkladmi, cieľom ktorých však nie je akokoľvek obmedzovať rozsah nárokovaného vynálezu.

Príklad 1

Zviera a výživy

Samci potkanov Sprague-Dawkey (Sasco) s hmotnosťou približne 200 g sa počas 3 dní pred zahájením liečby Cyklosporínom A krmili syntetickou práškovou výživou obsahujúcou 5 % glycínu a 15 % kazeínu (glycínu) alebo 20 % kazeínu (kontrola). Komponenty práškovej výživy sú uvedené v tabuľke 1. Všetkým zvieratám sa poskytla ľudská starostlivosť v zhode s inštitucionálnymi smernicami. Po období predbežného kŕmenia sa denne približne počas 4 týždňov podával žalúdočnou sondou Cyklosporín A (25 mg/kg rozpustený ako 2,5 mg/ml v olivovom oleji) alebo vehikulum. Študovali sa štyri skupiny po 6 až 8 potkanov (kontrola, glycín, cyklosporín + kontrola, cyklosporín + glycín). Denne sa u zvierat zisťovala hmotnosť a strávenie výživy.

Tabuľka 1

Zloženie kontrolnej a glycínovej výživy (%)

Komponent	Kontrola	Glycín
Kazeín	20,0	15,0
Glycín	0,0	5,0
Sacharóza	50,0	50,0
Kukurličný olej	5,0	5,0
Celulóza	5,0	5,0
Zmes minerálov	3,5	3,5
Zmes vitamínov	1,0	1,0

DL-metionín	0,3	0,3
Bitartarát cholínu	0,2	0,2
Kukurličný škrob	15,0	15,0

Rýchlosť glomerulárnej filtrácie a klinická chémia

Zvieratá sa umiestnili na 48 až 72 hodín pred usmrtením do metabolických klietok, odobrali sa vzorky moču za 24 hodín a z chvostovej žily sa odobralo 0,5 ml krvi na zmeranie kreatinínu v krvi. V deň usmrtenia sa odobral ďalší 1 ml krvi z vena cava a nahradil sa rovnakým objemom Ringersovho laktátového roztoku. Močovina (Coulombe, J. J. & Favreau, L., A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea, Clin. Chem. 9, 102 - 108 (1963)) a kreatinín v sére (Heinegard, D. & Tiderstrom, G., Determination of serum creatinin by a direct colorimetric method, Clin. Chim. Acta 43, 305 - 310), ako aj kreatinín v moči, sa zmerali použitím Sigma súprav, zatiaľ čo alkalická fosfatáza v sére sa zmerala enzymaticky (vzorky krvi sa odobrali asi po 4 týždňoch liečby Cyklosporínom A). Rýchlosť glomerulárnej filtrácie sa vypočítala z pomeru kreatinínu v moč/krv (Laiken, N. D. & Fanestil, D. D., Filtration and Blood Flow. In: Physiological basis of medical practice, J. B. West & Wilkins, Baltimore/London 1985, str. 461 - 471) (vzorky moču sa odobrali asi po 4 týždňoch liečby Cyklosporínom A).

Histológia

V deň usmrtenia sa zvieratá anestetizovali pentobarbitolom (50 mg/kg), brušná dutina sa otvorila a aorta sa kanylovala i. v. kanylou French 24 s koncom blízko odstupu obličkových tepien. Na aortu sa naložila svorka a zašila sa pod odstupom obličkových tepien a ľavá oblička sa prepláchla 5 ml normálneho fyziologického roztoku a následne sa zafixovala perfúziou 4 % roztokom paraformaldehydu vo fyziologickom roztoku pufrovanom fosfátom. Oblička sa vyňala, rozkrájala sa na 0,5 mm plátky a umiestnila sa do 10 % formalínu. Plátky sa vyfarbili hematoxylíneozínom a analyzovali sa mikroskopicky. Dilatované kanáliky sa spočítali v piatich rôznych

snímkach s malým zväčšením (100 x), spočítali sa nekrotické bunky a infiltrujúce makrofágy v piatich rôznych kanálikoch pri vysokom zväčšení (400 x) a vypočítali sa priemery $\pm$ štandardná chyba merania.

Kvantifikácia neutrofilov

Druhý deň po usmrtení sa pripravili krvné nátery zo vzoriek dutej žily a vyfarbili sa farbivom Wright Giemsa. Pre 200 bielych krviniek sa uskutočnili pri vysokom zväčšení (400 x) diferenciálne odpočty bielych krviniek a vypočítali sa percentá.

Štatistika

Pre všetky štatistické prehľady sa použila jednocestná analýza rozptylu a Boferonniho test *post-hoc*. Zvolilo sa $p < 0,05$ pred štúdiou na označenie významnosti.

Výsledky

Klinická chémia a rýchlosť glomerulárnej filtrácie

Je známe, že Cyklosporín A zvyšuje močovinu v sére. Skutočne sa v tejto štúdii močovina zvýšila viac než o 70 % (tabuľka 2). Zatiaľ čo glycín má tendenciu minimalizovať toto zvýšenie, účinok nebol štatisticky významný. Cyklosporín A zvýšil aj alkalickú fosfatázu (tabuľka 2) a glycín mal sklon k zamedzeniu jej zvýšenia. Kreatinín v sére mal hodnotu v rozsahu od 0,4 do 0,6 mg/dl v kontrolnej skupine a v glycínom upravenej skupine (obr. 1), ale významne (až dvojnásobne) sa zvýšil Cyklosporínom A. Tomuto zvýšeniu sa úplne zabránilo glycínovou výživou. Hodnoty sú stredné $\pm$ štandardná chyba merania ($P < 0,01$ analýzou rozptylu, $n = 5 - 6$ v každej skupine). a, $p < 0,05$ v porovnaní s kontrolou, b, $p < 0,05$ v porovnaní so skupinou s Cyklosporínom A.

Je známe aj to, že Cyklosporín A znižuje rýchlosť glomerulárnej filtrácie. Pri tejto štúdii boli v skupine s Cyklosporínom A hodnoty 30 % hodnôt v kontrolnej skupine alebo v skupine so samotným glycínom (obr. 2). Toto zníženie rýchlosti glomerulárnej filtrácie sa takisto úplne zamedzilo glycínom vo výžive. Výživa obsahujúca 1 % celkového kalorického obsahu ako glycín už bola dostatočná na to, aby sa dosiahol tento účinok (výsledky nie sú znázornené). Hodnoty sú stredné $\pm$ štandardná odchýlka merania ($P < 0,01$ analýzou rozptylu, $n = 5 - 6$ v každej skupine). $a, p < 0,05$ v porovnaní s kontrolou, $b, p < 0,05$ v porovnaní so skupinou s Cyklosporínom A. Pozorovali sa aj výrazné zmeny v objeme moču (kontrola, $9,1 \pm 1,6$ ml/24 h, glycín, $6,7 \pm 0,8$, Cyklosporín A, $14,4 \pm 2,3$, glycín + Cyklosporín A, $11,8 \pm 2,1$).

Tabuľka 2

Účinky Cyklosporínu A a glycínovej výživy na močovinu v sére a hladiny alkalické fosfatázy

	Močovina (mg/dl)	Alkalická fosfatáza (j./l)
Kontrola	$21,8 \pm 1,8$	$46,5 \pm 4,4$
Glycín	$20,6 \pm 2,4$	$33,1 \pm 5,6$
Cyklosporín A (CsA)	$34,9 \pm 3,7^a$	$65,9 \pm 12,6$
Cyklosporín A + glycín	$31,2 \pm 0,6^a$	$47,7 \pm 8,8$

Hodnoty sú priemerné $\pm$ štandardná chyba merania, $a, p < 0,05$ v porovnaní s kontrolami analýzou rozptylu a Student-Newman-Keul-sonovým testom ($n = 5 - 6$ v každej skupine).

Histológia a biele krvinky

Je zrejmé, že Cyklosporín A spôsobuje napučiavanie a nekrózu proximálnych kanálikov spojené s infiltráciou bielych krviniek, ako sa uviedlo vyššie. Týmto javom sa úplne zabránilo výživou obsahujúcou glycín. V priemere sa Cyklosporínom A (CsA) značne zvýšilo

proximálne napučíavanie a nekróza buniek, ako aj infiltrácia makrofágov (obr. 3 a 4). Na sklíčku sa spočítali proximálne dilatované kanáliky (panel A z obr. 3) v troch rôznych poliach pri nízkom zväčšení (100 x) a vypočítal sa priemer $\pm$ štandardná chyba merania. Na piatich rôznych kanálikoch sa pri vysokom zväčšení (400 x) spočítali nekrotické bunky (panel B z obr. 3) (priemer $\pm$ štandardná chyba merania * $p = < 0,05$ analýzou rozptylu). Na obr. 4 sa spočítali na sklíčku pri vysokom zväčšení (400 x) v rezoch vyfarbených hematoxylínomeozínom makrofágy v okolí piatich rôznych kanálikov a vypočítali sa priemery $\pm$ štandardná chyba merania (* $p = < 0,05$ analýzou rozptylu).

Ďalej došlo takmer k trojnásobnému zvýšeniu počtu neutrofilov v krvných náteroch z potkanov liečených Cyklosporínom A (obr. 5). Krvné nátery sa vyfarbili Wright Giemsovým farbivom a uskutočnili sa diferenciálne odpočty buniek (* $p = < 0,05$ analýzou rozptylu).

Príklad 2

Enterálne prostriedky

V nasledovných prostriedkoch znamená MM "zmes minerálov", SM "zmes stopových prvkov" a VM "zmes vitamínov". Obsah týchto troch zmesí je nasledovný:

MM

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Maltodextríny	34,40
Citrát/fosfát draselný	34,60
Dicitrát horečnatý	8,20
Chlorid vápenatý	8,00
Citrát/chlorid sodný	9,00
Kyselina citrónová	3,50
Vínan cholínu	2,30

SM

<u>Ingredienca</u>	<u>g/100 g</u>
Maltodextríny	47,79
Droždie s molybdénom	18,00
Droždie s chrómom	9,20
Síran zinočnatý	7,00
Droždie so selénom	7,00
Síran železnatý	6,92
Glukonát meďnatý	2,24
Síran mangánatý	1,12
Fluorid sodný	0,70
Jodid draselný	0,03

VM

<u>Ingredienca</u>	<u>g/100 g</u>
Maltodextríny	43,44
Askorbát sodný	35,00
Vitamín E-ac.50 %	16,00
Niacínamid	1,55
Vitamín A-acetát	1,20
Ca-D-pantotenát	0,98
Vitamín K ₁ 1 %	0,71
Vitamín B ₁₂ 0,1 %	0,30
Vitamín D ₃	0,28
Vitamín B ₆	0,20
Vitamín B ₁	0,17
Vitamín B ₂	0,15
Kyselina listová	0,02
Biotín	0,01

Prostriedok I obsahujúci glycín

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	12,28
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slnečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

Prostriedok II obsahujúci glycín

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	10,10
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β -karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slnečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

Prostriedok obsahujúci glycín a arginín

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	8,93
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
Arginín	1,17
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β-karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,36
Slnečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

Prostriedok obsahujúci glycín a rybí olej (ω-3-polynenasýtené mastné kyseliny)

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	10,10
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β-karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slnečnicový olej	0,23

Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EPAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

Prostriedok obsahujúci glycín a ribonukleovú kyselinu (RNA)

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	9,96
• Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
• RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β -karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slnečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

• Prostriedok obsahujúci glycín, arginín a rybí olej (ω -3-polynenasýtené mastné kyseliny)

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	8,93
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
Arginín	1,17
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β -karotén	0,03

Lipidy:

Palmový olej	1,32
Slnečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EPAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

Prostriedok obsahujúci glycín, arginín a RNA

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	8,79
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
Arginín	1,17
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
VM	0,10
β -karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	2,33
Slnečnicový olej	0,26
Emulgátor Nathin E	<u>0,13</u>
	100,00

Prostriedok obsahujúci glycín, RNA a rybí olej (ω -3-polynenasýtené masné kyseliny)

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	9,96
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05

VM	0,10
β -karotén	0,03
Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slnečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EPAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,00

- Prostriedok obsahujúci glycín, arginín, RNA a rybí olej (ω -3-poly-nenasýtené mastné kyseliny)

<u>Ingrediencia</u>	<u>g/100 g</u>
Voda	77,40
Maltodextríny	8,79
Kazeináty Na/Ca	4,60
Glycín	3,00
Arginín	1,17
RNA z droždového extraktu	0,14
MM	2,00
SM	0,05
• VM	0,10
• β -karotén	0,03
• Lipidy:	
Palmový olej	1,32
Slnečnicový olej	0,23
Emulgátor Nathin E	0,13
Rybí olej EOAX 3000 TG	<u>1,04</u>
	100,0

Ako sa už uviedlo, rybí olej je prírodným zdrojom ω -3-poly-nenasýtených mastných kyselín, zatiaľ čo slnečnicový olej je prírodným zdrojom ω -6-polynenasýtených mastných kyselín.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie glycínu na prípravu liečiva alebo nutričného prípravku na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi.
2. Použitie podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že liečivo alebo nutričný prípravok obsahuje ďalej komponent (c) pozostávajúci z L-arginínu alebo inej fyziologicky prijateľnej zlúčeniny spojennej so syntézou oxidu dusíka, alebo z ich zmesi.
3. Použitie podľa nárokov 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že nutričný prípravok je doplnkom výživy.
4. Použitie podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že doplnok výživy pozostáva hlavne z glycínu a zdroja sacharidu.
5. Použitie podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že doplnok výživy obsahuje ďalej zdroj proteínu.
6. Použitie podľa nárokov 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že nutričný prípravok je kompletne zostavená výživa.
7. Použitie podľa nárokov 1 alebo 2, v y z n a č u j ú c e s a t ý m, že liečivo ďalej obsahuje cyklosporín alebo askomycín.
8. Liečivo alebo nutričný prípravok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje terapeuticky účinné množstvo cyklosporínu alebo askomycínu v kombinácii s glycínom v množstve účinnom na inhibíciu alebo/a zlepšenie renálnej dysfunkcie vyvolanej uvedeným cyklosporínom alebo askomycínom, pričom glycín a prípadne L-arginín

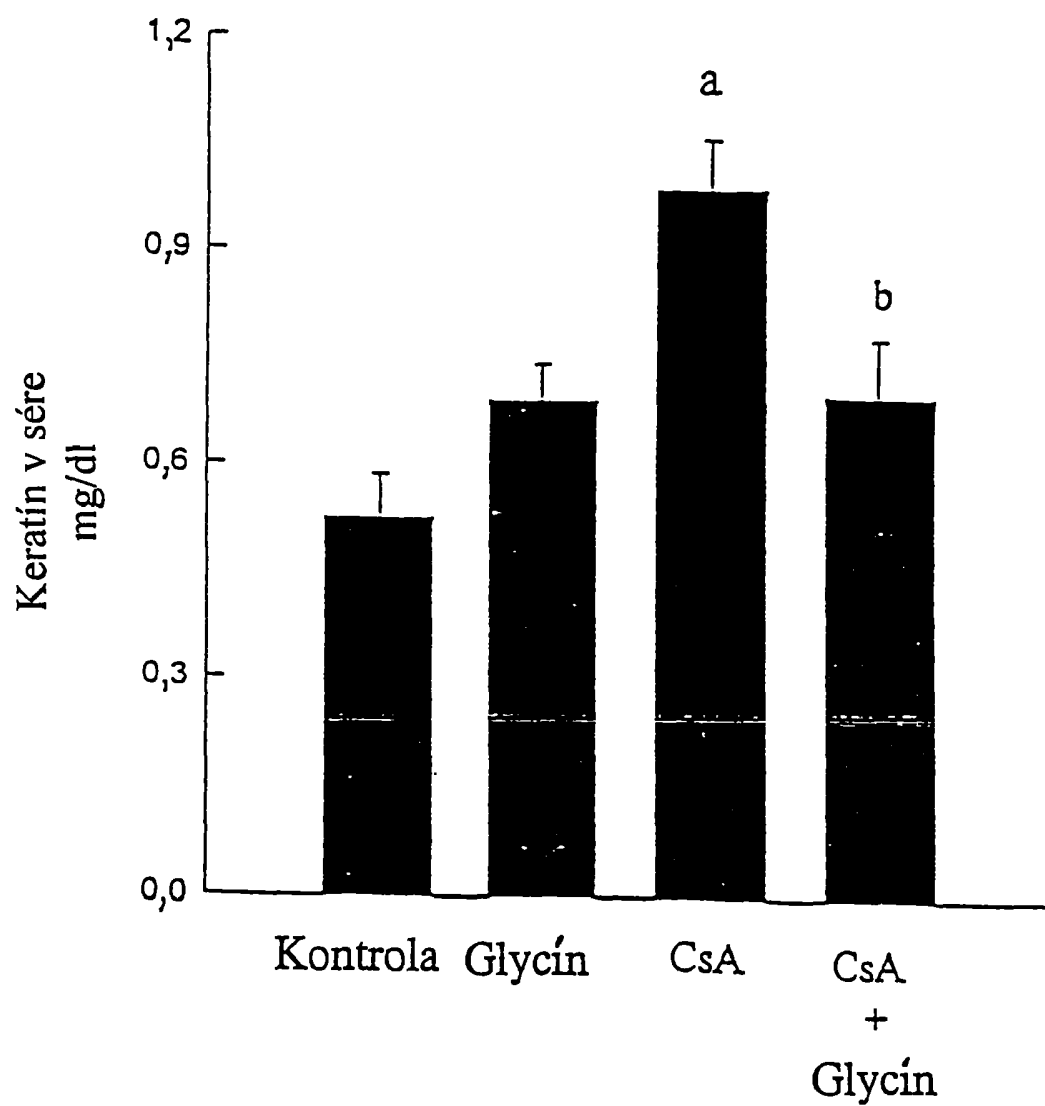
alebo *L*-ornitín sú jediné voľné aminokyseliny v uvedenom liečive alebo nutričnom prípravku.

9. Spôsob profylaktickej alebo/a terapeutickej liečby renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa človeku alebo inému cicavcovi aplikuje pred liečbou, súčasne s liečbou alebo po liečbe cyklosporínom liečivo alebo nutričný prípravok obsahujúci glycín v množstve účinnom na inhibíciu alebo/a zlepšenie renálnej dysfunkcie.

10. Liečivo alebo nutričný prípravok, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že obsahuje glycín na profylaxiu alebo/a terapiu renálnej dysfunkcie vyvolanej cyklosporínmi alebo askomycínmi.

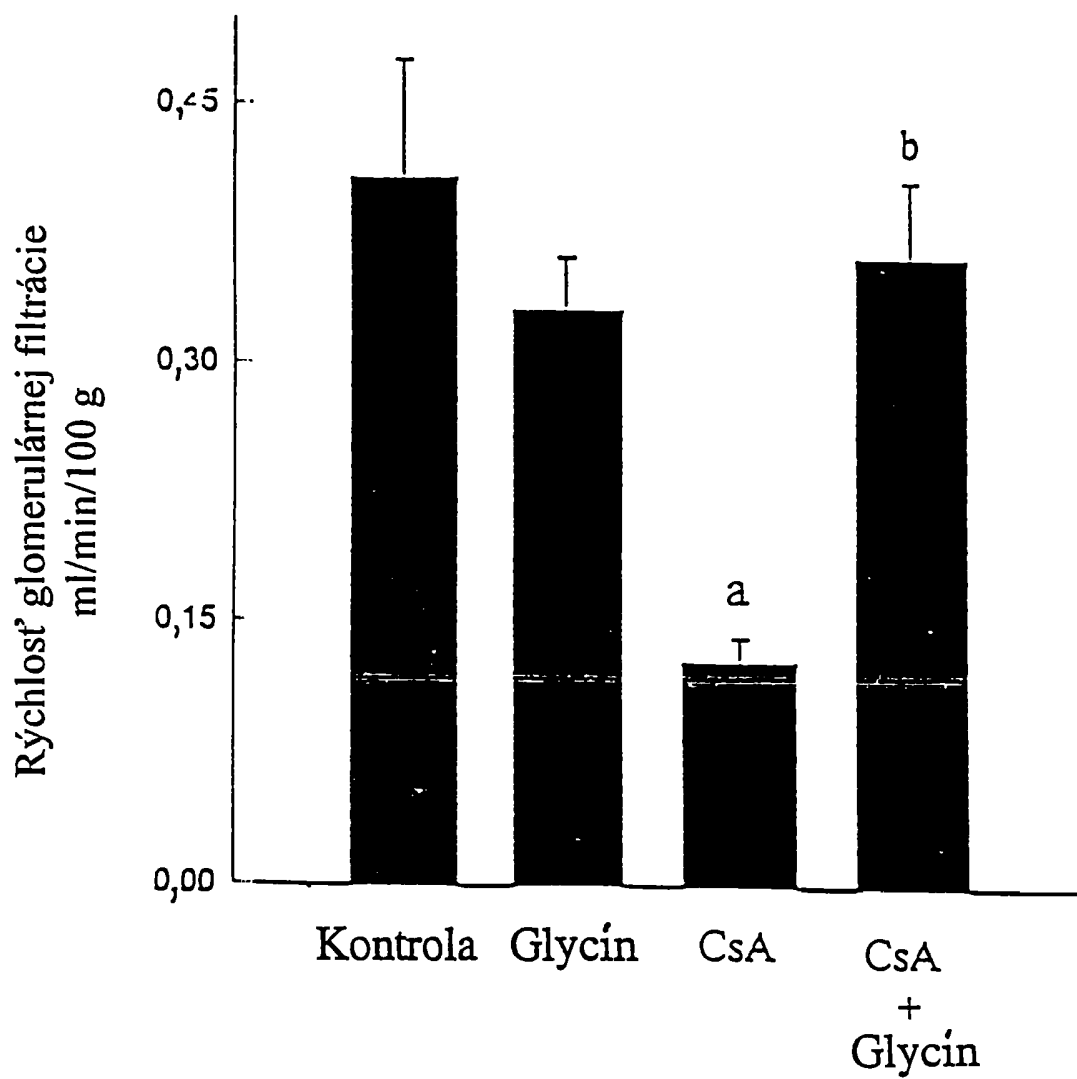
1/5

Obr. 1



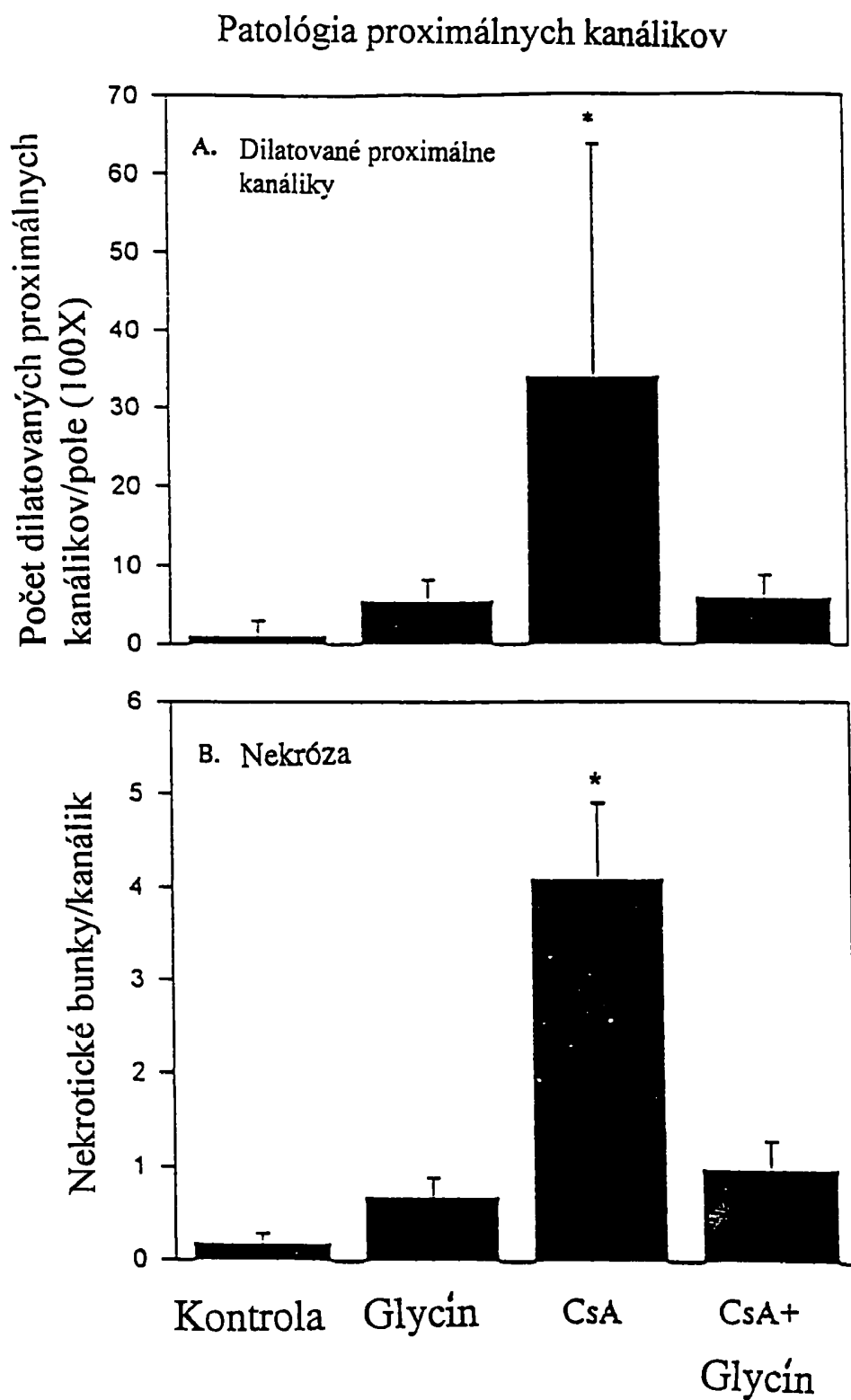
2/5

Obr. 1



Obr. 3

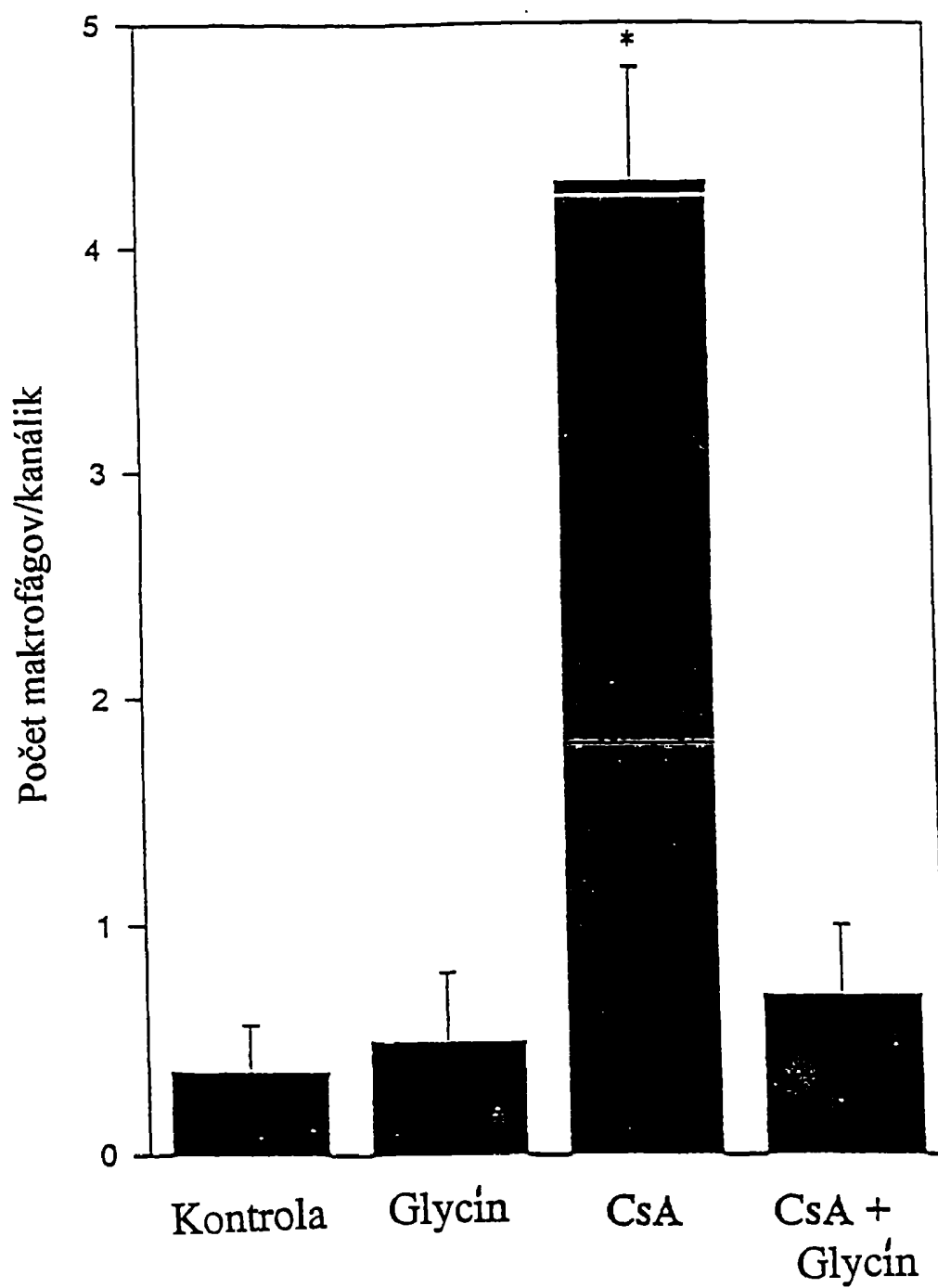
3/5



4/5

Obr. 4

Makrofágy



5/5

Obr. 5

Neutrofily

