

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra farmakologie a toxikologie



Studium mechanismu účinku chinoxalinového derivátu VN-034 na  
respirační systém in vitro  
(rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové, 2012

Mgr. Iva Machová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány“.

.....

Iva Machová

Děkuji své školitelce PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při tvorbě této rigorózní práce.

# Obsah

1. Úvod.....	10
2. Teoretická část .....	11
2.1. Astma bronchiale .....	11
2.1.1. Definice .....	11
2.1.2. Etiopatogeneze .....	11
2.1.3. Klinický obraz.....	12
2.1.4. Klasifikace astmatu .....	13
2.1.5. Terapie astma bronchiale .....	13
2.1.5.1. Glukokortikoidy .....	14
2.1.5.2. Antileukotrieny .....	16
2.1.5.3. Metylxantiny (teofyliny s prodlouženým účinkem).....	16
2.1.5.4. Ketotifen.....	17
2.1.5.5. Nedokromil .....	17
2.1.5.6. Anticholinergika.....	17
2.1.5.7. $\beta_2$ -sympatomimetika .....	18
2.1.5.8. Biologická léčba.....	19
2.1.5.9. Specifická alergenová imunoterapie .....	21
2.2. CHOPN .....	22
2.2.1. Definice .....	22
2.2.2. Etiopatogeneze .....	22
2.2.3. Klinický obraz.....	23
2.2.4. Klasifikace.....	24
2.2.5. Terapie CHOPN .....	24
2.2.6. Nefarmakologická léčba.....	25
2.2.7. Farmakologická léčba .....	26
2.2.7.1. $\beta_2$ -sympatomimetika .....	26
2.2.7.2. Inhalační a systémové kortikoidy.....	26
2.2.7.3. Anticholinergika.....	27
2.2.7.4. Metylxantiny .....	27

2.2.7.5. Nová bronchodilatancia .....	28
2.2.7.6. Mukolytika, expektorancia a antibiotika.....	29
2.3. Deriváty chinazolinu a chinoxalinu .....	29
2.3.1. Přírodní chinazolinové alkaloidy .....	29
2.3.2. Syntetické deriváty vasicinu a chinazolinu .....	30
2.3.3. Syntetické deriváty chinoxalinu .....	32
3. Experimentální část.....	35
3.1. Cíl experimentální práce .....	35
3.2. Použitý materiál a zvířata.....	35
3.2.1. Chemikálie .....	35
3.2.2. Testovaná látka.....	36
3.2.3. Pokusná zvířata .....	37
3.2.4. Přístroje a pomůcky.....	37
3.3. Metodika .....	39
3.3.1. Příprava Krebs-Henseleitova roztoku .....	39
3.3.2. Provedení pokusů .....	39
3.3.2.1. Účinek testované látky na $\beta$ -receptory .....	40
3.3.2.2. Účinek testované látky na M-receptory .....	43
3.3.3. Statistické vyhodnocení výsledků .....	44
3.3.3.1. Účinek testované látky na $\beta$ -receptory .....	44
3.3.3.2. Účinek testované látky na M-receptory .....	45
4. Výsledky .....	46
5. Diskuze.....	52
6. Závěr .....	56
7. Seznam literatury .....	57

## Seznam použitých zkratek

ATP	adenozintrifosfát
5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CC	chemokin
CCR1	receptor pro CC chemokin
CD	cluster of differentiation (soubor povrchových znaků na buňkách)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DRC	dose-response curve (křivka závislosti účinku na dávce)
ED <sub>50</sub>	dosis effectiva media (střední účinná dávka)
FcεRI	vysokoafinní receptor pro IgE
FEV <sub>1</sub>	forced expiratory flow (usilovně vydechnutý objem za 1 sekundu)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor (faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů)
GPCR	receptory spojené s G-proteiny
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G
IKS	inhalační kortikosteroidy
IL	interleukin
LABA	β <sub>2</sub> -agonisté s dlouhodobým účinkem
LAMA	anticholinergikum s dlouhodobým účinkem
LTB <sub>4</sub>	leukotrien B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leukotrien C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leukotrien D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leukotrien E <sub>4</sub>
M <sub>r</sub>	molekulová hmotnost
NF-κB	nukleární faktor kappa B

PAF	platelet activating factor (faktor aktivující destičky)
PDE4	inhibitory fosfodiesterázy 4
PEF	peak expiratory flow (vrcholový výdechový průtok)
RABA	$\beta_2$ -agonisté s rychlým nástupem účinku
RANTES	regulated upon activated normal T expressed and presumably excreted chemokine (cytokin uvolňovaný cytotoxickými T lymfocyty)
SABA	$\beta_2$ -agonisté s krátkodobým účinkem
SAMA	anticholinergikum s krátkodobým účinkem
sGC	solubilní guanylátcykláza
Th	pomocné lymfocyty
TNF	tumor necrosis factor (tumor nekrotizující faktor)
Ultra-LABA	$\beta_2$ -agonisté s ultra-dlouhodobým účinkem

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Iva Machová

Konzultant: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium mechanismu účinku chinoxalinového derivátu VN-034 na respirační systém in vitro

Abstrakt: Cílem této práce bylo zkoumat in vitro mechanismus dilatačního účinku chinoxalinového derivátu VN-034 a ověřit, zda by testovaná látka mohla být  $\beta$ -agonista nebo M-antagonista. Použili jsme klasickou in vitro metodu izolované trachey morčete nebo potkana. V naší experimentální práci se látka VN-034 nechovala jako kompetitivní  $\beta$ -agonista, nicméně její působení bylo ovlivnitelné propranololem. Bližší mechanismus účinku nebylo z výsledků možné určit. Při testování účinku na M-receptory se látka VN-034 chovala jako kompetitivní M-antagonista.



# Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Iva Machová

Consultant: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of Thesis: In vitro mechanism of action of quinoxaline derivate  
VN-034 on the respiratory system

Abstract: The aim of this thesis was to investigate the mechanism of relaxation effect of quinoxaline derivative VN-034 in vitro, and to evaluate the potential of the substance to act as a  $\beta$ -agonist or M-antagonist. The classical in vitro method of isolated trachea was applied. In our experimental work VN-034 did not behave as a competitive  $\beta$ -agonist, however propranolol had an influence on its effect. On  $\beta$ -receptors, detailed mechanism of action could not be determined. On M-receptors, the substance behaved as a competitive antagonist.

# 1. Úvod

Chronické záněty dýchacích cest jsou různorodou skupinou onemocnění, která představují v současnosti celosvětový problém. Jejich nárůst souvisí s nárůstem automobilové dopravy, rostoucí spotřebou tabákových výrobků a s dalšími civilizačními jevy, které jsou charakteristické pro současnost. Podle posledních odhadů trpí astmatem ve světě 300 milionů lidí a chronickou obstrukční plicní nemocí (CHOPN) dokonce 600 milionů osob. Předpokládá se, že v roce 2020 bude CHOPN nejčastější příčinou úmrtí ve skupině respiračních onemocnění.

Při léčbě astmatu a CHOPN dnes máme k dispozici velké množství látek, i přesto nedokážeme tato onemocnění zcela zvládnout. Neustále proto pokračuje hledání nových léčiv. Mezi zkoumané látky patří také některé deriváty chinazolinu a chinoxalinu, u kterých byl zjištěn bronchodilatační účinek. Tato práce je věnována mechanismu účinku jednoho z chinoxalinových derivátů.

## 2. Teoretická část

Astma bronchiale a CHOPN jsou sice dvě rozdílné nemoci, ale jejich společným jmenovatelem je přítomnost obstrukce dýchacích cest a mají také shodné některé další příznaky. V patogenezi obou chorob hraje hlavní roli zánět, který je u astmatu eozinofilní a u CHOPN neutrofilní. Patofyziologickým projevem zánětlivých změn je u obou nemocí obstrukce průdušek, která je u astmatu variabilní a reverzibilní a u CHOPN ne zcela reverzibilní a je progredující. Astma bronchiale je nemocí farmakologicky dobře ovlivnitelnou, nemoc lze často prostřednictvím protizánětlivých léků zastavit, u CHOPN můžeme progresi onemocnění pouze zpomalit.

### 2.1. Astma bronchiale

#### 2.1.1. Definice

Astma je chronická zánětlivá choroba dýchacích cest, charakterizovaná zvýšenou reaktivitou na různé stimuly vedoucí k variabilní a bronchiální obstrukci, která je reverzibilní buď spontánně, nebo vlivem terapie.<sup>9</sup>

#### 2.1.2. Etiopatogeneze

Na vzniku astmatu se podílejí:

- a) Genetická dispozice (uplatňují se geny v 5. a 11. chromosomu) s větší vnímavostí hostitele (atopie).
- b) Mechanismy imunologické přecitlivělosti I. typu zprostředkované protilátkami IgE, ale i III. a IV. typu s jejich případnou kombinací. Vlastní podstatou atopie je převaha podskupiny lymfocytů Th<sub>2</sub>, které produkují zvýšené množství cytokinů aktivujících B-lymfocyty (z toho následně vyplývá zvýšení tvorby a uvolňování protilátek třídy IgE) nebo (jako IL-5) podporují diferenciaci a aktivaci eozinofilů, indukují expresi IgE na mastocytech.

- c) Neimunologické mechanismy, kde bronchospasmus je navozen chronickou iritací, námahou, infekcí (zejména virovou), popř. psychickou alterací.<sup>3,9</sup>

Imunologické i neimunologické mechanismy vyvolají zánětlivý proces s kumulací buněk různého typu (eozinofily, polymorfonukleáry, bazofily, lymfocyty, alveolární makrofágy) v bronchiální sliznici. Vzájemnou buněčnou interakcí dochází k uvolňování mediátorů, které svým účinkem jednak atrahují další buňky (chemotaktické faktory z neutrofilů a eozinofilů), jednak poškozují epitelovou bariéru, zvyšují sekreční aktivitu a permeabilitu kapilár (hlavní bazický protein, faktor aktivující destičky, lyzosomové enzymy). Dále do těchto dějů zasahují neurální mechanismy (neuropeptidy, neurotransmitery), které zvyšují prozánětlivý účinek, a metabolity kyseliny arachidonové (prostaglandiny, leukotrieny). Bronchospasmus vzniká tedy jako komplexní děj s časnou a pozdní fází, na němž se podílejí buněčné, humorální a nervové mechanismy.<sup>9</sup>

Časná fáze nastupuje do 30 minut a je způsobena mediátory ze žírných buněk. Při interakci alergenu s IgE na povrchu žírných buněk se degranulací uvolňuje histamin, spazmogenně působící peptidy, dochází k rychlé tvorbě leukotrienů LTC<sub>4</sub> a LTD<sub>4</sub>, PAF, prostaglandinů a LTB<sub>4</sub>, působícího chemotakticky především na eozinofily a mononukleáry. Dochází ke spasmu hladkých svalů bronchů.<sup>2,3,9</sup>

Pozdní fáze je výsledkem uvolněných mediátorů z neutrofilů a eozinofilů. Projevuje se po 4-6 hodinách slizničním zánětem s možným poškozením a odlupováním bronchiálního epitelu. Dochází k remodelaci dýchacích cest s nezvratnými projevy obstrukce, s hypertrofií a hyperplazií hladkého svalstva, se subepiteliální fibrózou, ztluštěním bazální membrány a zmnožením pohárkových buněk.<sup>2,3,9</sup>

### **2.1.3. Klinický obraz**

Astma může vzniknout v kterémkoliv věku. Typické jsou opakované stavy dušnosti, provázené pískoty na hrudníku, pocit sevření či tíhy na hrudi,

dráždivý kašel, který někdy může být dominujícím nebo i jediným příznakem. Tyto obtíže se často objevují nebo zhoršují při virové infekci, kontaktu se spouštěči nebo chemickými parami a aerosoly, po námaze, při silných emocích. Pro astma je charakteristická velká interindividuální i individuální časová variabilita. Časté komorbidity astmatu jsou alergická rýma, popřípadě atopická dermatitida.<sup>1,10</sup>

#### **2.1.4. Klasifikace astmatu**

Podle tíže příznaků je astma děleno na:

- a) Intermitentní astma: příznaky se vyskytují nepravidelně, denní maximálně 1x týdně, noční nejvýše 2x měsíčně, nemoc neovlivňuje kvalitu života, pacienta neomezuje, plicní funkce jsou v normě, variabilita PEF je nižší než 20%.
- b) Lehké perzistující astma: denní příznaky se objevují častěji než 1x týdně, ale méně často než 1x denně, noční příznaky častěji než 2x měsíčně, hodnota FEV<sub>1</sub> je větší než 80%, variabilita PEF je 20-30%, aplikace úlevových léčiv je méně častá než 1x denně.
- c) Středně těžké perzistující astma: denní příznaky se objevují každodenně (nemají však trvalý charakter), noční příznaky častěji než 1x týdně, nemoc narušuje denní činnost pacienta i jeho spánek, hodnota FEV<sub>1</sub>/PEF je 60-80%, aplikace úlevových léčiv je každodenní.
- d) Těžké perzistující astma: denní příznaky se objevují každodenně a mají trvalý charakter, časté jsou i noční příznaky, nemoc omezuje běžné aktivity pacienta a zhoršuje kvalitu jeho života, hodnota FEV<sub>1</sub>/PEF je nižší než 60%, variabilita PEF je větší než 30%.<sup>4</sup>

#### **2.1.5. Terapie astma bronchiale**

Léčba průduškového astmatu ve všech věkových kategoriích je založena především na farmakologickém ovlivnění alergického zánětu a bronchokonstrikce. Nedílnou součástí léčebného režimu je samozřejmě také snaha o eliminaci vyvolávajícího agens, hlavně domácích alergenů (srst

domácích zvířat, alergeny roztočů domácího prachu, ale podle stavu i potravinové alergeny). Samozřejmě má být striktní zákaz kouření v domácím prostředí.<sup>5,6</sup> Antiaistmatika lze podávat cestou perorální, parenterální nebo nejčastěji používanou cestou inhalační. Při inhalačním podání působí léčivo přímo na dýchací cesty, kde tak může mít vysokou koncentraci, která je často nedosažitelná při jiných aplikačních cestách. Do systémové cirkulace se dostává jen malé množství podaného léčiva, čímž jsou výrazně omezeny možné nežádoucí účinky vyplývající z ovlivnění dalších systémů.<sup>3,5,6</sup>

V současné době je k dispozici celá řada účinných a bezpečných léčivých látek. Preparáty používané v léčbě astma bronchiale se dělí na dvě základní skupiny. Léky dlouhodobě působící (udržovací) zajišťují kontrolu nad astmatem. Léky rychle a krátkodobě působící (úlevové) napomáhají ovlivnění příznaků a exacerbaci choroby. Cílem léčby je dosažení tzv. plné kontroly astmatu, aby pacient mohl vést plnohodnotný způsob života bez podstatného omezení svých aktivit. Dále je třeba předejít exacerbaci onemocnění, zhoršování stavu a zabránit úmrtí na toto onemocnění. Plné kontroly astmatu lze správnou léčbou dosáhnout u většiny pacientů.<sup>3,5,6</sup>

### **2.1.5.1. Glukokortikoidy**

Při terapii astmatu jsou nejúčinnější skupinou léčiv s protizánětlivým účinkem. Zabraňují tak vzniku ireverzibilních změn, které doprovázejí a zhoršují neléčené nebo nedostatečně léčené astma. Používají se dlouhodobě u všech forem perzistujícího astmatu. Mechanismus účinku zahrnuje inhibici tvorby prozánětlivých cytokinů (interleukinů, TNF $\alpha$ , GM-CSF), inhibici fosfolipázy A<sub>2</sub> a cyklooxygenázy, které jsou za fyziologických podmínek zodpovědné za syntézu mediátorů zánětu (prostaglandinů, leukotrienů a faktoru aktivujícího destičky), za inhibici exprese některých genů, v jejímž důsledku dochází k omezení počtu receptorů pro cytokiny. Glukokortikoidy inhibují infiltraci buněk zánětu (např. makrofágů, lymfocytů T) do tkání postižených zánětem a současně inhibují jejich aktivaci a tvorbu komplexu antigen-protilátka, čímž tlumí pozdní fázi alergické reakce.<sup>3,4</sup>

K dispozici jsou inhalačně a systémově podávané glukokortikoidy. Inhalační kortikoidy nejsou určeny ke zvládnutí akutních příznaků, ale k pravidelné dlouhodobé léčbě. Při jejich aplikaci může dojít k místním nežádoucím účinkům (chrapot, orofaryngeální kandidóza). Mezi zástupce glukokortikoidů patří:

**Beklometazon dipropionát** byl prvním inhalačním kortikosteroidem, který dosáhl dnes požadovaných vlastností, je značně lipofilní, snadno proniká buněčnými membránami a tím i do tkání, jeho  $t_{1/2}$  je 6,5 hod, přesto je jeho terapeutický index relativně příznivý, mírně horší než u budesonidu a výrazně lepší než u flutikazonu. **Budesonid** má v současnosti po ciklesonidu nejvýhodnější terapeutický index, jde o lék první volby v těhotenství.<sup>4,8</sup>

Vysoká lipofilita **flutikazonu propionátu** souvisí s velkým distribučním objemem a dlouhým eliminačním poločasem (8-14,4 hod), vyšší riziko systémových účinků souvisí také s vysokou afinitou k receptorům. **Mometazon furoát** vykazuje vynikající bezpečnostní profil. **Ciklesonid** se od ostatních inhalačních kortikoidů liší tím, že jeho molekula je sama neaktivní. Aby byla aktivní, musí projít nejprve metabolizací v plicích. Z inhalačních kortikosteroidů vykazuje nejlepší bezpečnostní profil.<sup>4,7,8,29</sup>

Celkové podávání kortikoidů se využívá u těžkých astmatických stavů, kdy ke zvládnutí onemocnění nepostačují inhalační kortikoidy a další léčiva. Jestliže například u akutního stavu nenastává úleva po opakované aplikaci inhalačních  $\beta_2$ -sympatomimetik, je indikováno p.o. podání **prednisonu** nebo **metylprednisolonu** po dobu 3-10 dnů v denní dávce pro dospělého 40-60 mg. Pravidelné p.o. podávání se využívá u těžkého perzistujícího astmatu, kde jsou ostatní léky bez dostatečného účinku a nezajišťují kontrolu astmatu. Perorálním preparátům je dáována přednost před dlouhodobou parenterální léčbou. Z perorálních léků jsou preferovány prednison, prednisolon nebo metylprednisolon pro jejich minimální mineralokortikosteroidní účinky, relativně krátký poločas účinku a omezený účinek na příčně pruhované svalstvo.<sup>3,4,29</sup>

### 2.1.5.2. Antileukotrieny

Leukotrieny vznikají působením 5-lipoxygenázy na kyselinu arachidonovou, a to zejména v žírných buňkách, monocitech, eozinofilech, ale také v buňkách cévního endotelu. Mají významný spasmogenní, vazomotorický a prozánětlivý účinek. Biologický účinek leukotrienů lze ovlivnit pomocí antagonistů leukotrienů na příslušných receptorech LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> a LTF<sub>4</sub> (antileukotrieny). Mezi jejich zástupce patří v ČR registrovaný **zafirlukast** a **montelukast**. Antileukotrieny mají protizánětlivý a bronchodilatační účinek, brání bronchokonstrikci vyvolané zátěží, alergeny nebo inhalací studeného vzduchu, tlumí časnou i pozdní fázi alergické reakce.<sup>4,5,11</sup>

### 2.1.5.3. Metyl xantiny (teofyliny s prodlouženým účinkem)

Působí jako inhibitory fosfodiesterázy typu 1 až 4, čímž zvyšují koncentraci cAMP a vyvolávají relaxaci hladké svaloviny dýchacích cest a plicních cév. Snižují tvorbu prozánětlivých cytokinů, mírně inhibují degranulaci žírných buněk a antagonizují působení prostaglandinů.<sup>4</sup>

Díky svému bronchodilatačnímu působení jsou xantiny obsažené v neretardovaných lékových formách řazeny mezi úlevová léčiva, ale vzhledem k četným nevýhodám jsou dnes obsolentní. Naproti tomu xantiny v retardovaných lékových formách tvoří součást kombinací používaných k dlouhodobé terapii astmatu. Používají se také v kombinaci s inhalačními glukokortikoidy, protože xantiny snižují riziko sekundární rezistence na glukokortikoidy a současně umožňují snížit jejich dávku.<sup>3,4,7,12</sup>

Nejúčinnějším metylxantinovým bronchodilatanciem je **teofylin**. Při bronchodilatačním působení je jeho nevýhodou úzké terapeutické rozmezí, které v některých případech vyžaduje, aby byla jeho hladina v séru monitorována. Vyznačuje se také četnými lékovými interakcemi (např. s cimetidinem, allopurinolem, hormonální antikoncepcí, makrolidovými atb...). Dalším zástupcem je **aminofylin** (tj. komplex teofylinu s etylendiaminem), který se od teofylinu liší pouze dobrou rozpustností ve vodě, která umožnila připravit jeho injekční lékovou formu. Xantinem používaným v omezené míře je **etofylin**, který



se od obou výše uvedených liší významně nižším bronchodilatačním účinkem.<sup>3,4,7,12</sup>

#### **2.1.5.4. Ketotifen**

Je H<sub>1</sub>-antihistaminikum se středně silným sedativním účinkem. Stabilizuje membránu žírných buněk, čímž brání uvolnění mediátorů zánětu. Nástup účinku je u ketotifenu pozvolný a dostavuje se obvykle za 8-10 týdnů po zahájení perorální aplikace.<sup>4</sup>

#### **2.1.5.5. Nedokromil**

Stabilizuje membránu žírných buněk, bazofilů a dalších buněk zánětu, snižuje schopnost jejich chemotaxe, potlačuje kašel a bronchokonstrikci po tělesné zátěži, při inhalaci studeného vzduchu. Jeho účinek nastupuje po jednom týdnu aplikace.<sup>4</sup>

#### **2.1.5.6. Anticholinergika**

Jsou kompetitivní antagonisté acetylcholinu na muskarinových M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> a M<sub>3</sub> receptorech. Blokují postgangliovou eferentní vagovou cestu, čímž vedou k bronchodilataci, a zároveň brání bronchokonstrikci způsobené acetylcholinem. Nemají vliv na tvorbu ani viskozitu sputa, neovlivňují mukociliární motilitu, avšak jejich dlouhodobá aplikace snižuje objem sputa. Bronchodilatační účinek anticholinergik nastupuje ve srovnání s β<sub>2</sub>-sympatomimetiky pomaleji. Používají se k posílení bronchodilatačního účinku β<sub>2</sub>-sympatomimetik, a to především ke zvládnutí akutních exacerbací astmatu. Mezi inhalační anticholinergika s krátkodobým účinkem (SAMA) patří **ipratropium**. Je používán jako alternativní bronchodilatační lék pro nemocné, kteří zažili výskyt nežádoucích účinků SABA. Ipratropium i novější tiotropium se v České republice používají k léčbě CHOPN (viz dále). V porovnání s β<sub>2</sub>-sympatomimetiky jsou sice méně účinné, ale nemají nežádoucí vliv na kardiovaskulární systém.<sup>4,5,11,13,29</sup>

### 2.1.5.7. $\beta_2$ -sympatomimetika

Jsou nejdůležitější a nejpočetnější skupinou úlevových antiastmatik. Působí jako kompetitivní selektivní agonisté na adrenergických  $\beta_2$ -receptorech, jejichž stimulací dochází ke zvýšení koncentrace cAMP, následně pak k aktivaci proteinkinázy A, fosforylaci cílových bílkovin a k relaxaci hladké svaloviny bronchů.  $\beta_2$ -sympatomimetika dokáží zabránit bronchokonstrukci navozené histaminem, metacholinem, inhalací studeného vzduchu i alergenu.  $\beta_2$ -agonisté relaxují hladké svaly dýchacích cest, zlepšují mukociliární clearance, snižují vaskulární permeabilitu a mohou modulovat uvolnění mediátorů z mastocytů. Jsou dostupná v inhalačních, perorálních i injekčních lékových formách. Injekční aplikace je vyhrazena pro těžké akutní stavy obvykle hospitalizovaných pacientů.<sup>4,5,29</sup>

Inhalační  $\beta_2$ -sympatomimetika s rychlým nástupem účinku (RABA), tj. s účinkem do tří minut po aplikaci, jež trvá 4-6 hodin a maxima dosahuje po 15 až 20 minutách, jsou např. **salbutamol**, **terbutalin** a **fenoterol**, které patří mezi  $\beta_2$ -sympatomimetika s krátkým trváním účinku (SABA). K nim se řadí také ještě **formoterol**, který má jak rychlý nástup účinku, tak dlouhé trvání účinku, tj. minimálně 12 hodin.<sup>4,5,11,13,29</sup>

Inhalační  $\beta_2$ -agonisté s rychlým nástupem účinku jsou léky volby pro léčbu akutní exacerbace astmatu a jsou použitelné pro preventivní léčbu námahou indukovaného astmatu. Ve srovnání s perorální léčbou přináší léčba inhalačními  $\beta_2$ -agonisty s rychlým nástupem účinku menší nežádoucí účinky jako kardiovaskulární stimulace, třes kosterního svalstva a hypokalemie.<sup>4,5,11,13,29</sup>

Inhalační  $\beta_2$ -sympatomimetika s dlouhodobým účinkem (LABA) jsou bronchodilatační léky, jejichž účinek trvá nejméně 12 hodin. Mezi zástupce patří **formoterol** a **salmeterol**. Protože dlouhodobá léčba LABA nemá vliv na perzistující zánětlivé změny u astmatu, měly by být tyto léky vždy kombinovány s inhalačními kortikoidy. V kombinaci vykazují synergický efekt – kortikoidy svými efekty zvyšují počty  $\beta$ -receptorů a  $\beta$ -agonisté aktivují glukokortikoidní receptory. K dispozici jsou tak fixní kombinace inhalačního kortikoidu a LABA, kdy jsou obě složky kombinovány v jednom inhalačním lékovém přípravku. Fixní

kombinace zajišťuje rovnoměrnou depozici obou složek, navíc aplikace jednoho kombinovaného přípravku je pohodlnější pro pacienta a zajišťuje lepší compliance.<sup>4,5,11,13,29</sup>

#### **2.1.5.8. Biologická léčba**

V současné době představuje doplňkovou léčbu astmatu, a to hlavně u pacientů, kteří trpí onemocněním a neodpovídají na obvyklou léčbu. Ovšem rozdílné odpovědi na léčbu naznačují, že je třeba identifikovat určité fenotypy ke zjištění optimálních účinků specifických druhů léčby.<sup>30</sup>

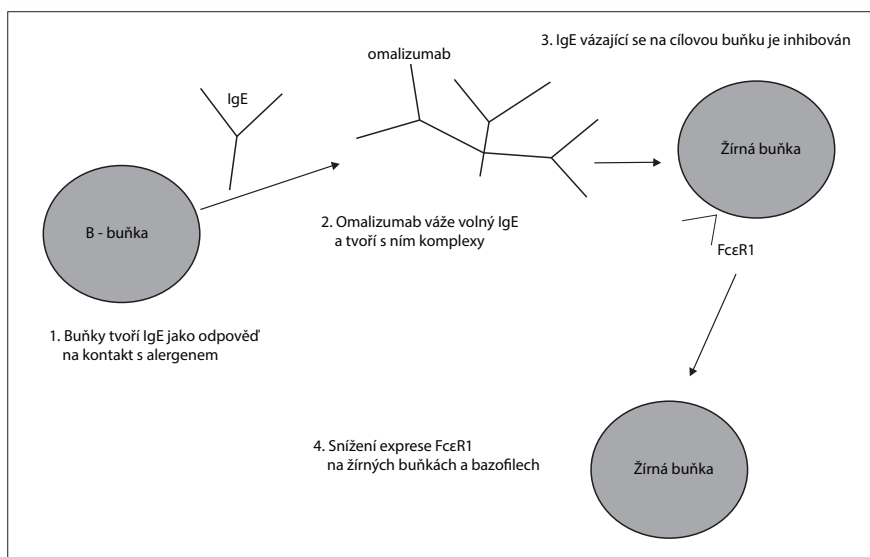
##### *Anti-IgE monoklonální protilátka*

Je to monoklonální protilátka tvořená z 95% lidským imunoglobulinem podtřídy G1 (IgG1), ke kterému je v oblasti hypervariabilních úseků připojena myší anti-IgE protilátka. **Omalizumab** se selektivně váže na IgE v místě vazby IgE s vysoko- a nízkoafinními buněčnými receptory. Bylo dokázáno, že omalizumab je schopen snížit množství cirkulujícího IgE řádově. Snížení volného IgE v séru a omezení jeho vazby na vysokoafinní receptory zamezuje degranulaci efektorových buněk, což vede ke snížení aktivace buněk zánětu s následnou redukcí receptorů FcεRI na mastocytech a bazofilech. Omalizumab je též schopen vazby s molekulami IgE exprimovanými na B-lymfocytech, což vede k inhibici produkce nových IgE protilátek.<sup>4,14,15</sup>

U pacientů s astmatem potlačuje časnou i pozdní fázi alergické reakce. Účinně potlačuje příznaky astmatu, zvyšuje kvalitu života a umožňuje snížit nutnost podávání i dávky systémových i inhalačních kortikoidů.<sup>15</sup>

Léčba omalizumabem je indikována u obtížně léčitelných a labilních astmatiků, kteří mají klinicky vyjádřenou alergickou vazbu na celoroční aeroalergeny. Je aplikován subkutánně v pravidelných dvou- až čtyřtýdenních intervalech. Velikost dávky a frekvence její aplikace závisí na plazmatické hladině IgE a na tělesné hmotnosti pacienta. Jedná se o léčbu dlouhodobou, zlepšení stavu lze očekávat postupně v průběhu 16 týdnů aplikace léku.<sup>4,14,15,16</sup>

Obr. 1 Mechanismus účinku omalizumabu<sup>30</sup>



### Protilátky proti IL-5

Slibnou molekulou pro klinické využití charakterizované eozinofilií je plně humanizovaná monoklonální protilátka Ig proti IL-5, který hraje důležitou úlohu jako stimulant maturace, diferenciaci, mobilizace, aktivace a životnosti eozinofilů. Představitelem je **mepolizumab**. Nemocní s persistující eozinofilií dýchacích cest budou pravděpodobně cílovou skupinou léčby anti-IL-5.<sup>15,16</sup>

### Protilátky proti TNF $\alpha$

Tumor nekrotizující faktor alfa je hlavní Th<sub>1</sub> cytokin, který se vyskytuje u pacientů s astmatem, zejména s jeho těžšími formami spojenými s neutrofilním zánětem. Monoklonální protilátky proti TNF  $\alpha$ , jakými jsou **etanercept** a **infliximab** jsou v současné době používány u některých jiných chronických zánětlivých stavů (např. Crohnova choroba a revmatoidní artritida). Studie s použitím protilátek proti TNF  $\alpha$  v léčbě astmatu jsou zatím rozporuplné a na malých počtech pacientů. Novým preparátem je **golimumab**, jehož použití bylo testováno na 309 pacientech s těžkým nekontrolovaným perzistujícím astmatem bez zjištění přesvědčivého pozitivního efektu.<sup>15,16,24,30</sup>

#### Protilátky proti IL-4

**Pascolizumab** je humanizovaná monoklonální protilátka proti IL-4. IL-4 je hlavní cytokin celé řady patofyziologických pochodů alergické reakce. Jeho účinek byl hodnocen ve studii s 24 pacienty, kteří měli mírné až středně závažné astma. Lék byl velmi dobře snášen, ovšem rozsáhlá studie II. fáze s různými dávkami neprokázala žádný klinický účinek. Na základě těchto poznatků se vyhodnocují další přístupy k ovlivnění účinků IL-4.<sup>15,16,25</sup>

#### Protilátky proti CD4

CD4+ T-lymfocyty představují důležitý zdroj prozánětlivých cytokinů. **Keliximab** je protilátka anti-CD4, která prokazovala u těžkých astmatiků přechodné snížení počtu CD4+ buněk a také změnu exprese CD4+ receptorů. Klinický efekt však nebyl výrazný, a proto byl vývoj tohoto léku zastaven.<sup>15,30</sup>

#### Protilátky proti IL-2

**Daclizumab** je protilátka proti IL-2 receptoru. Studie na fenotypově neselektovaných 88 pacientech se středně těžkým astmatem nedostatečně kontrolovaným inhalačními kortikoidy prokázala efekt daclizumabu. Bylo zjištěno malé, avšak významné zlepšení FEV<sub>1</sub> a snížení denních symptomů astmatu i spotřeby úlevové léčby. U tří pacientů však byly pozorovány závažné nežádoucí účinky, které pravděpodobně souvisely se zkoumanou látkou (anafylaktický šok, varicelová meningitida, karcinom prsu). Ačkoliv zřejmé výhody v kontrole příznaků a ve zlepšení plicních funkcí byly povzbudivé, pochybnosti o bezpečnosti léčiva pravděpodobně rozvoj této léčby omezí.<sup>16,26,30</sup>

#### **2.1.5.9. Specifická alergenová imunoterapie**

Specifická alergenová imunoterapie bývá také označována jako alergenová vakcinace. Podstatou je subkutánní nebo sublinguální aplikace postupně se zvyšujících dávek speciálně upraveného alergenu při prokazatelné alergii IgE typu (pylová, roztočová, plísňová). Podání alergenu má být celoroční, dlouhodobé. Největšího úspěchu bylo zatím docíleno v léčbě alergické rýmy.<sup>9,29</sup>

## 2.2. CHOPN

### 2.2.1. Definice

CHOPN je léčitelné onemocnění, kterému lze předcházet a které má významné mimoplicní účinky, jež mohou přispívat k jeho závažnosti u jednotlivých nemocných. Jeho plicní složka je charakterizována omezením průtoku vzduchu v průduškách (bronchiální obstrukcí), které není plně reverzibilní. Bronchiální produkce obvykle progreduje a je spojena s abnormální zánětlivou odpovědí plic na škodlivé částice a plyny. Do této definice patří dvě patologicko-anatomické jednotky, chronická bronchitida a plicní emfyzém.<sup>17,18</sup>

Chronická bronchitida je definována jako kašel s vykašláváním ve třech měsících ve dvou po sobě následujících letech. Emfyzém je trvalé zvětšení dechových cest distálně od terminálních bronchiolů spojené s destrukcí jejich stěn bez zřetelné fibrózy.<sup>17,18</sup>

### 2.2.2. Etiopatogeneze

Bronchiální obstrukce typická pro CHOPN vzniká společným postižením dolních dýchacích cest a destrukcí plicního parenchymu (emfyzémem). Poměr stupně postižení mezi dvěma složkami je individuální. Zánětlivé změny zahrnují metaplazii pohárkových buněk, zmnožení a hypertrofii hlenových žláz, hypervaskularizaci a hypertrofii hladké svaloviny a změny v extracelulární matrix společně s hromaděním zánětlivých buněk.<sup>18</sup>

Malé bronchy jsou hlavní příčinou zvýšení odporů v dýchacích cestách. Tyto bronchy jsou infiltrovány zánětlivými buňkami, stěna je edematózní a fibrotická, dochází k hromaděni myofibroblastů a kolagenu. Podobně jako u všech fibrotických tkání dochází ke kontrakci. Místem největší sekrece hlenu jsou horní cesty dýchací, zde dochází k hypertrofii hlenových žláz, atrofii a zánětlivému postižení chrupavek. Destrukce plicního parenchymu, která je vyvolána zánětlivými procesy, vede ke snížení zpětného elastického napětí plic, tyto změny snižují schopnost dýchacích cest, aby zůstaly otevřené v průběhu výdechu. Vzniklé zúžení je hlavní příčinou fixované bronchiální obstrukce.<sup>18</sup>

Vznik CHOPN se snaží vysvětlit dvě teorie:

a) Teorie oxidačního stresu:

U nemocných s CHOPN jsou ve vydechovaném vzduchu, sputu a systémové cirkulaci zvýšené biomarkery oxidačního stresu (např. peroxid vodíku, 8-isoprostan). Oxidancia jsou vytvářena cigaretovým kouřem a dalšími inhalovanými částicemi a uvolňují se z aktivovaných zánětlivých buněk, jako jsou makrofágy a neutrofilů. U nemocných může být také snižené množství endogenních antioxidačních látek.<sup>18</sup>

b) Teorie nerovnováhy mezi proteázami a antiproteázami:

Koncentrace proteáz, které štěpí složky pojivové tkáně, jsou u nemocných s CHOPN zvýšené. Destrukce elastinu, hlavní složky pojivové tkáně plicního parenchymu, je důležitým příznakem emfyzému a pravděpodobně je ireverzibilní. Zvýšené množství elastázy a proteázy není dostatečně inhibováno antiproteázovými systémy a dochází k přímému poškození plicní matrix.<sup>18</sup>

Dnes už je všeobecně známo, že nejvýznamnější příčinou CHOPN je kouření cigaret. Velká část pacientů jsou dlouhodobí kuřáci. Zcela nezvratně se potvrdilo, že zanechání kouření modifikuje průběh onemocnění.

### **2.2.3. Klinický obraz**

Klinický obraz závisí na stupni patomorfologických změn. Hlavním symptomem u počátečních stádií jsou narůstající dechové obtíže při námaze. Dušnost je často provázena produktivním kašlem. Pro pozdější stadia je charakteristické: prohlubování dušnosti, zhoršování kašle, nárůst expektorace, pískoty, pocity sevření na hrudníku, cyanóza, hubnutí, arytmie a otoky dolních končetin.<sup>9,19</sup>

## 2.2.4. Klasifikace

Podle tíže příznaků se CHOPN dělí do čtyř stadií:

- 1) Lehké CHOPN: hodnota  $FEV_1$  je větší než 80%, v tomto stadiu ještě pacient nemusí vnímat dechové obtíže.
- 2) Středně těžké CHOPN: hodnota  $FEV_1$  je 50-80%, v tomto stadiu se objevuje progresse dušnosti po zátěži, pocity krátkého dechu a kašel s expektorací.
- 3) Těžké CHOPN: hodnota  $FEV_1$  je 30-50%.
- 4) Velmi těžké CHOPN: hodnota  $FEV_1$  je nižší než 30%, nebo je nižší než 50% s projevy chronické dechové nedostatečnosti.<sup>4</sup>

## 2.2.5. Terapie CHOPN

Léčba všech stadií CHOPN se opírá o nefarmakologická i farmakologická opatření. Vysoce žádoucí je zanechání kouření, eliminace škodlivých a dráždivých částic z okolního prostředí, zvyšování tělesné zdatnosti, náležitá léčba infekcí dýchacích cest, léčba exacerbací. Je důležité si uvědomit, že farmakoterapie nebrání progresi nemoci. Je symptomatická. U stabilní CHOPN se zahajuje léčba podle zjištěného stadia CHOPN. Na rozdíl od astmatiků se u CHOPN intenzita léčby stupňuje v závislosti na progresi nemoci a mění se pouze při nežádoucích účincích léčby. Každý z dosavadních způsobů léčby je pouze schopen zmírnit příznaky a komplikace, zlepšit toleranci tělesné zátěže a snížit počet a tíži exacerbací nebo je oddálit. V dlouhodobé perspektivě však sebelépe vedenou farmakoterapií nelze zabránit postupnému zhoršování plicní funkce a progresi nemoci.<sup>4,18</sup>

V léčbě CHOPN se upřednostňuje léčba inhalační před jakoukoliv jinou formou, neboť je nejúčinnější (intenzitou, rychlostí, minimálními nežádoucími účinky). Užívají se léky s protizánětlivým, bronchodilatačním a muko-regulačním účinkem.<sup>4,18</sup>



## 2.2.6. Nefarmakologická léčba

Zanechání aktivního kouření je hlavní léčebná strategie. Omezení negativního vlivu pasivního kouření a zamezení vlivu ostatních škodlivin, které se vyskytují v okolním prostředí, včetně prostředí pracovního, lze ovlivnit již hůře. Zanechání aktivního kouření je základní podmínkou, ale v klinické praxi je mnohdy velmi obtížně naplněno, protože kouření je droga. V současné době je na trhu parciální agonista  $\alpha_4\beta_2$ -nikotinového receptoru **vareniklin**. Jeho agonistické působení na těchto receptorech je zodpovědné za absenci abstinčních příznaků, antagonistické působení za postupné rozměňování návyku kouřit a za snížení pocitu odměny prožívaného při kouření. Při léčbě vareniklinem se oproti léčbě závislosti na tabáku antidepresivem bupropionem současně nepodává náhradní nikotinová terapie, resp. nikotinové náhražky.<sup>4,20,29</sup>

Další látkou podávanou při odvykání kouření je **bupropion**. Bupropion zvyšuje koncentrace dopaminu a noradrenalinu v CNS, které nikotin vyplavil, a tím má toto antidepresivum potlačit touhu po cigaretě (prostřednictvím dopaminu) a abstinční příznaky (ovlivněním noradrenalinu). Jeho metabolit hydroxybupropion je antagonistou nikotinových receptorů  $\alpha_4\beta_2$ .<sup>4,23,29</sup>

Ve farmakoterapii se používají také náhražky nikotinu, jsou dostupná v několika lékových formách (žvýkačky, sublinguální tablety, transdermální systémy, nosní nebo inhalační spreje).<sup>4,21,23,29</sup>

Od II. stadia CHOPN je základní součástí léčby rehabilitace. Rehabilitace by měla být komplexní a neznamena pouze respirační fyzioterapii, ale i dechovou gymnastiku, mobilizační strečink a kondiční tělesná cvičení, úpravu výživy a denního režimu. Do nefarmakologické léčby patří i chirurgická léčba – bulektomie, volumredukční operace a transplantace plic. Bulektomie znamená resekci velkých bul, které stlačují zdravou plíci. Výsledkem je pak zlepšení funkčních parametrů a dušnosti. Bulektomie se provádí torakoskopicky. Volumredukční operace zmenšuje plicní hyperinflaci resekci části plic u nemocných s plicním emfyzémem. Metody volumredukce zatím nepatří mezi standardně prováděné výkony. Transplantace plic se indikuje u nemocných, kde

selhává veškerá terapie, s prognózou života do 3 let, nemocní musí mít dobrý stav výživy. Výsledky transplantací z důvodu CHOPN jsou dobré. Základním kritériem pro doporučení transplantace plic je  $FEV_1 < 35 \%$  a sekundární plicní hypertenze. Transplantuje se jedna nebo obě plíce. Ve světě se provádí někdy i současná transplantace srdce a plic. Indikováno je očkování protichřipkovou vakcínou, které snižuje celkovou mortalitu u nemocných s CHOPN a nově i protipneumokokovou vakcínou u pacientů nad 65 let, dlouhodobá domácí oxygenoterapie dle indikací.<sup>20,29</sup>

## **2.2.7. Farmakologická léčba**

### **2.2.7.1. $\beta_2$ -sympatomimetika**

Inhalační  $\beta_2$ -agonisté s krátkodobým účinkem (SABA) se předepisují k prevenci nebo ke zmírnění příznaků buď podle potřeby, nebo pro pravidelné užívání. Všechny druhy bronchodilatačních léků zvyšují u CHOPN odolnost vůči zátěži, aniž by významně zlepšily parametry obstrukce. Inhalační  $\beta_2$ -agonisté s dlouhodobým účinkem (LABA) jsou u CHOPN indikovány tam, kde je nutno podávat sympatomimetika pravidelně, tj. od II. stadia, protože podávání dvakrát denně je efektivnější než podávání třikrát nebo čtyřikrát denně.<sup>29</sup>

### **2.2.7.2. Inhalační a systémové kortikoidy**

Monoterapie inhalačními kortikosteroidy není pro CHOPN vzhledem ke kortikorezistenci vhodná. V léčbě CHOPN však mají své pevné místo, a to v případě léčby pacientů s CHOPN stadia III a IV, zvláště u nemocných s častými exacerbacemi (tj. dvěma a více exacerbacemi ročně). Vzhledem k relativní kortikorezistenci u pacientů s CHOPN se doporučuje tuto rezistenci částečně ovlivnit kombinací IKS s LABA nebo teofylinem. Studie prokázaly, že IKS snižují u pacientů ve stadiích III a IV četnost a tíži exacerbací o 20-30 %. Jejich současné postavení v léčbě stabilní CHOPN bylo prokázáno řadou studií. Podáváme je v dávkách středních až vysokých. Největší profit z této léčby mají pacienti s poklesem  $FEV_1$  pod 50% a s frekvenčními exacerbacemi. K léčbě CHOPN je na našem trhu indikován **beklometazon, budesonid a flutikazon**.<sup>20</sup>

Dlouhodobé podávání perorálních kortikoidů se při léčbě stabilizované CHOPN nedoporučuje. Podávání systémových kortikoidů má své opodstatnění jen při léčbě akutní exacerbace. Urychlují uzdravení nemocných a přispívají k dřívějšímu obnovení plicních funkcí. Doporučuje se podat 30-40 mg prednisonu denně po dobu 10 dní.<sup>29</sup>

### 2.2.7.3. Anticholinergika

Nejdůležitějším působením inhalačních anticholinergik s krátkodobým účinkem (SAMA) u nemocných s CHOPN je blokáda acetylcholinového účinku na M<sub>3</sub>-receptorech, jež vede ke zmírnění bronchokonstrikce a ke zmenšení produkce hlenu v submukózních žlázkách. **Ipratropium** se předepisuje k prevenci nebo ke zmírnění příznaků buď podle potřeby nebo pro pravidelné užívání.<sup>29</sup>

Představitelem inhalačních anticholinergik s dlouhodobým účinkem (LAMA) je **tiotropium**. Je to selektivní, kompetitivní, reverzibilní antagonist receptorů M<sub>1</sub> a M<sub>3</sub> s dlouhodobým působením, které trvá minimálně 24 hodin, což umožňuje jeho podávání jedenkrát denně. Tiotropium zmenšuje plicní hyperinflaci, čímž dochází ke zvýšení tolerance fyzické zátěže. Výsledky čtyřleté klinické studie UPLIFT prokázaly, že léčba tiotropiem dlouhodobě zlepšuje funkci plic, zlepšuje kvalitu života nemocných, snižuje riziko exacerbací vedoucích k hospitalizaci, snižuje riziko mortality i respirační a kardiovaskulární morbidit. Studie UPLIFT prokázala, že nejúčinnější je léčba tiotropiem v časných stádiích CHOPN, tedy od II. stadia. Tiotropium má minimální nežádoucí účinky typické pro všechna inhalační anticholinergika. Dominuje suchost v ústech. Je indikován u všech forem CHOPN, v ČR je povolen pro léčbu nemocných s CHOPN stadia II až IV. U pacientů s CHOPN stadia II je tiotropium lékem první volby.<sup>29</sup>

### 2.2.7.4. Metylxatiny

Všechny studie, které ukazují účinnost **teofylinu** u CHOPN, byly prováděny s protražovaně působícími přípravky. Teofylin je u CHOPN účinný, ale vzhledem k jeho toxicitě je dáována přednost inhalačním bronchodilatancím.

Kombinace teofylinu s inhalačními  $\beta_2$ -agonisty nebo anticholinergiky může přinést zlepšení plicních funkcí i celkového zdravotního stavu.<sup>29</sup>

#### 2.2.7.5. Nová bronchodilatancia

V prosinci 2009 byl registrován v Evropské unii první zástupce zcela unikátní nové třídy inhalačních bronchodilatancií, tzv. Ultra-LABA (inhalační  $\beta_2$ -agonisté s ultra-dlouhodobým účinkem). **Indakaterol** je  $\beta_2$ -agonista s 24-hodinovou bronchodilatací a současně s rychlým nástupem účinku do 5 minut. Za jeho dlouhotrvající účinek a jeho rychlý nástup je nejspíše zodpovědná unikátní interakce této molekuly s lipidy v buněčné membráně. Je předepisován u nemocných s diagnózou CHOPN od středně těžkého stadia (stadium II), kteří dodržují zákaz kouření. Jeho výhodou je i příznivý bezpečnostní profil. Do budoucna by se jevila jako velmi výhodná kombinace dvou inhalačních léků s ultra-dlouhodobým účinkem: Ultra-LABA a LAMA. V současnosti se tímto směrem ubírá klinický výzkum, sleduje se účinnost a bezpečnost fixní kombinace indacaterolu s glycopyrroniem bromidem – novým přípravkem ze skupiny LAMA.<sup>16,27,28</sup>

**Carmoterol** má 52x vyšší afinitu k  $\beta_2$ -receptorům než k  $\beta_1$ -receptorům, má rychlý nástup účinku, který efektivně přetrvává po dobu 24 hodin. Nyní probíhají randomizované placebem kontrolované studie, které ověří možnosti klinického použití léku.<sup>16</sup>

**Milveterol** je další LABA ve vývoji.<sup>16</sup>

Nedávno se na trhu objevila nová skupina tzv. selektivních inhibitorů fosfodiesteráz 4 (PDE4) reprezentovaná **roflumilastem**. Tato skupina má v současnosti u pacientů s CHOPN největší protizánětlivý účinek. Roflumilast zlepšuje plicní funkce a snižuje exacerbace u nemocných ve III. a IV. stadiu. Toto léčivo dále zlepšuje plicní funkce i u těch nemocných, kteří jsou již léčeni inhalačními dlouhodobými bronchodilatanciemi (LABA nebo LAMA). Neexistují komparativní studie s inhalačními kortikosteroidy. Roflumilast nemůže být

podáván současně s teofyliny. Mezi časté nežádoucí účinky patří nauzea, snížená chuť k jídlu, bolesti břicha a průjem, poruchy spánku a bolest hlavy. Nežádoucí účinky jsou reverzibilní po ukončení léčby. Častý bývá navíc váhový úbytek asi dvou kilogramů a je doporučeno hmotnost v průběhu terapie sledovat. Z tohoto důvodu není roflumilast indikován u pacientů s nižším BMI a dále u pacientů s depresemi.<sup>20</sup>

#### **2.2.7.6. Mukolytika, expektorancia a antibiotika**

U stabilizované CHOPN není doporučena dlouhodobá léčba touto skupinou léků, přínos z léčby mají především nemocní s obtížnou expektorací vazkého sputa. Preferována jsou mukolytika s antioxidačním účinkem, která snižují četnost exacerbací. Jde o N-acetylcystein a erdostein, který má i antibakteriální účinky.<sup>29</sup>

Co se týče antibiotické terapie, pak není doporučeno profylaktické kontinuální používání antibiotik, protože neovlivňuje četnost exacerbací. Antibiotika lze doporučit pouze pro léčbu infekčních exacerbací a jiných bakteriálních infekcí.<sup>20</sup>

### **2.3. Deriváty chinazolinu a chinoxalinu**

#### **2.3.1. Přírodní chinazolinové alkaloidy**

V tropických oblastech jihovýchodní Asie roste stále zelený keř *Adhatoda vasica* patřící do čeledi *Acanthaceae*. V Indii, kde je známá pod názvem *vasaka*, je tato rostlina používána v lidové medicíně pro léčbu respiračních onemocnění jak u dětí, tak u dospělých. K léčebným účelům se používají hlavně listy, květy, plody a kořeny této rostliny. Je indikována v léčbě respiračních onemocnění zahrnujících kašel, astma, bronchitidu a tuberkulózu.<sup>22,32,34,39</sup>

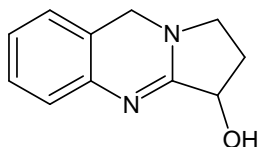
Biologicky účinnými látkami jsou zejména chinazolinové alkaloidy, z nichž nejdůležitější je vasicin (obr. 2) a jeho oxidační produkt vasicinon (obr. 3). Dalšími alkaloidy jsou vasicol, v menší míře se v rostlině nachází také adhatonin,

vasicinol a vasicinolon. Květy obsahují hlavně kempferol a kvercetin, kořeny obsahují  $\beta$ -sitosterol-D-glukosid a deoxyvasicin.<sup>22,32,39</sup>

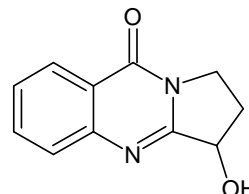
Experimentální studie prokázaly, že silice izolovaná z listů *Adhatoda vasica* přímo ovlivňuje hladké svalstvo, vyvolává bronchodilataci. Vasicin a vasicinon prokazují bronchodilatační aktivitu *in vitro* a bronchokonstrikční aktivitu *in vivo*, kombinace obou alkaloidů v poměru 1:1 prokazovala bronchodilatační aktivitu jak *in vivo*, tak *in vitro*. Vasicin ovlivňuje také kromě respiračního traktu dělohu. Vyvolává stah hladkého svalstva dělohy podobně jako oxytocin. Uterotonická aktivita je vyvolána potenciací účinku prostaglandinu. Klinické studie potvrdily, že vasicin indukuje rytmické kontrakce myometria těhotné i netěhotné dělohy.<sup>22,32,39</sup>

Alkoholový extrakt z listů a kořenů prokazuje antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Experimentálně se potvrdily ještě další účinky hepatoprotektivní, protizánětlivé, antiulcerózní a antioxidační.<sup>32,33,34,35</sup>

Obr. 2 Strukturální vzorec vasicinu



Obr. 3 Strukturální vzorec vasicinonu



### 2.3.2. Syntetické deriváty vasicinu a chinazolinu

Účinky syntetických derivátů vasicinu na respirační systém se zabývali Ojo et al. Syntetizovali různé deriváty deoxyvasicinu, jako například (*DL*)-7-methoxyvasicinový analog, metylendioxydeoxyvasicin, (*DL*)-8-chlorvasicin a další fluor, bróm a jód deriváty. Zkoumali jejich bronchodilatační vliv na astma a další respirační onemocnění. Podobně jako aminofylin

a isoprenalin by mohly tyto látky inhibovat histaminem a serotoninem indukovaný bronchospasmus.<sup>39,45</sup>

Látka získaná modifikací molekuly vasicinu, která vykazovala bronchodilatační účinek byla 6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-on dále označovaná jako RLX. Látka RLX inhibovala degranulaci žírných buněk, snižovala aktivitu lipoxygenázy. Výzkumy ukázaly, že účinkuje dlouhodobě a srovnatelně s kromoglykátém sodným a aminofylinem.<sup>34,35,39</sup>

Dalším derivátem je dimethoxyderivát RLX (2,3-dimetoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-onu). Tento derivát, strukturně podobný papaverinu, byl účinnější než teofylin, aminofylin i RLX.<sup>39</sup>

Zaber et al. provedli chemickou modifikaci molekuly alkaloidu vasicinu a syntetizovali několik derivátů. Jejich bronchodilatační účinek byl testován na průdušnici morčete, na modelu bronchospasmu indukovaném inhalací aerosolu a na modelu systémové anafylaxe. Nejvýznamnější bronchodilatační účinky z celé testované skupiny byly nalezeny u struktury 2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-on. Tato sloučenina byla syntetizována z antranilové kyseliny. Vykazovala výrazný bronchodilatační účinek, který ovšem nebyl zprostředkován  $\beta$ -receptory. Relaxační účinek byl navíc prokázán i u hladké svaloviny střeva. Výzkumy ukázaly, že relaxační účinek na tracheu byl vyšší než u teofylinu a nižší než u salbutamolu.<sup>35,39</sup>

Dále byla provedena studie zaměřená na zkoumání bronchodilatačního účinku u 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolinů, 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin-5-(6*H*)-thionů a jejich oxoanalogů. U všech zkoušených struktur se předpokládaný bronchodilatační účinek potvrdil. V 5-alkyl substituované sloučenině vykazoval delší alkylový řetězec větší bronchodilatační aktivitu. 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin-5-(6*H*)-thiony a jejich oxoanalogy byly méně účinné, záměna atomu síry kyslíkem nepřinesla zvýšení účinnosti. U obou skupin změnila přítomnost halogenů biologickou účinnost. Mezi testovanými sloučeninami byl nejúčinnější 5-propyl-9-jod-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin.<sup>38,39</sup>

Na FAF UK byly testovány účinky 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů, dále účinky derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem, s ethoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy-fragmentem.<sup>39</sup>

První hodnocenou látkou byl 4-hydroxychinazolin. Tato struktura prokazovala mírnou relaxační aktivitu na hladkou svalovinu izolované průdušnice potkana, která byla ale signifikantně nižší než u teofylinu. Proto byly do struktury zavedeny jednoduché funkční skupiny. Hydroxyskupina byla derivatizována tak, aby vzniklý boční řetězec obsahoval kyselou, bazickou skupinu nebo pouhý alkyl. Zjistilo se, že chinazolin-4-yl acetát a 4-methoxychinazolin dihydrochlorid vykazují srovnatelnou relaxační aktivitu s teofylinem.<sup>39</sup>

Ze skupiny derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem byl nejúčinnější látkou *N*-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etyl]chinazolin-4-amin.<sup>39</sup>

Poslední testovanou skupinou látek byly deriváty chinazolinu s ethoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem. Bylo zjištěno, že všechny látky z této skupiny vykazovaly signifikantně vyšší relaxační účinek než teofylin.<sup>39</sup>

Z experimentů vyplynulo, že nejúspěšnější připravené deriváty chinazolinu obsahovaly v bočním řetězci bazické centrum vázané na atom dusíku, síry nebo kyslíku v poloze 4 chinazolinového jádra přes fragment obsahující dva nebo tři uhlíky. Výskyt kyselé skupiny se projevil vymizením biologické aktivity.<sup>39</sup>

Za deriváty vasicinu jsou považovány i bromhexin a ambroxol, i když v obou případech byla původní chemická struktura již výrazně modifikována. Bromhexin se metabolizuje na ambroxol, který se osvědčil pro svou dobrou snášenlivost a výrazný průnik do plic.<sup>22</sup>

### **2.3.3. Syntetické deriváty chinoxalinu**

Kromě derivátů chinazolinu jsou deriváty chinoxalinu další skupinou látek, u kterých jsou testovány účinky na respirační systém. Do této skupiny patří i námi testovaná látka VN-034.

Jednu ze studií, která se zabývala účinky syntetických derivátů chinoxalinu na respirační systém, provedl Marokata et al. Předmětem jejich výzkumu byla nově syntetizovaná látka YM-90709 (2,3-dimethoxy-6,6-dimethyl-5,6-



dihydrobenzo[7,8]indolizino[2,3-b]chinoxalin). U této látky bylo již dříve zjištěno, že inhibovala vazbu IL-5 na jeho receptor na lidských eosinofilech, avšak neinhibovala vazbu granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) na tentýž receptor. Za normálních okolností je receptor pro IL-5 exprimován jen některými primárně myeloidními buňkami - eosinofily a bazofily, skládá se ze dvou jednotek, z nichž jedna je součástí receptorů pro IL-3 a GM-CSF, druhá je specifická pro IL-5.<sup>41</sup>

Marokata aplikoval intravenózně látku YM-90709 potkanům, kteří měli antigenem indukovaný zánět v dýchacích cestách. YM-90709 zabránila infiltraci eosinofilů a lymfocytů do bronchoalveolární tekutiny a neovlivnila leukocyty v periferní krvi ani v kostní dřeni. Glukokortikoidy zabránily navíc infiltraci neutrofilů a významně snížily množství leukocytů v periferní krvi i v kostní dřeni. V jiné studii Marokata et al. zjistil, že látka YM-90709 snižuje množství eosinofilů v dýchacích cestách stejně jako monoklonální protilátka proti IL-5.<sup>41,42</sup>

V současné době je také předmětem výzkumu NFkappaB/IkappaB komplex a jeho aktivační kinázy jako terapeutický cíl pro astma i CHOPN. NF-kappaB je transkripční faktor, který patří mezi hlavní aktivátory zánětlivého procesu, protože se významně podílí na aktivaci prozánětlivých působků, jako jsou cytokiny, chemokiny, interleukiny nebo faktory komplementu. Mezi zkoumané inhibitory kappaB kinázy patří 4-(2'-aminoethyl)amino-1,8-dimethylimidazo[1,2-a]chinoxalin (BMS-345541).<sup>43,44</sup>

Chemokiny a jejich receptory, které patří do rodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR), se mohou podílet na akumulaci a aktivaci leukocytů v zanícených tkáních a v patogenezi zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Jedním z takových je i CCR1 receptor, který je receptor pro CC chemokiny, jako je například CCL5(RANTES). Zapojení CCR1 v imunologických onemocněních je dokumentována v několika klinických studiích. Gladue et. al. se zabývají CCR1 antagonistou, kterým je látka CP-481,715 (chinoxalin-2-karboxylová kyselina [4(R)-karbamoyl-1(S)-(3-fluorbenzyl)-2(S)-7dihydroxy-7-methyl-octyl]amid.<sup>46</sup>

Vzhledem k tomu, že CP-481,715 je specifická pro lidský CCR1, nešlo ve studii použít klasický zvířecí model. Byly použity transgenní myši, kterým byl

nahrazen myší CCR1 za hCCR1, a na tomto modelu se posuzovaly protizánětlivé účinky testované látky. Výsledky naznačují, že by se mohla uplatnit v léčbě zánětlivých reakcí v lidském těle.<sup>46</sup>

In vivo testoval účinky látky 7-chlor-5-propyl-2H-[1,2,4]triazolo[4,3-a]chinoxalin-1,4-dion Leibowitz et al. Dospělo se k závěru, že testovaná látka účinkuje jako inhibitor IgE a vykazuje podobnou biologickou aktivitu jako kromoglykát sodný.<sup>47</sup>

Látka 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on (ODQ) působí jako inhibitor solubilní guanylátcyklázy (sGC). Papapetropoulos et al. studovali, zda je bronchokonstrikce u astmatu provázená změnami v expresi solubilní guanylátcyklázy (sGC). Solubilní guanylátcykláza zvyšuje cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Ten aktivuje GMP dependentní proteinové kinázy zastoupené například v hladké svalovině. Výsledkem je snížení intracelulární koncentrace kalcia s následnou svalovou relaxací.<sup>49</sup>

Studiem současného podávání glukokortikoidů a NO se zabývali Jonasson et al. Přišli na to, že současné podávání NO a glukokortikoidů bylo výrazně účinnější než podávání NO nebo glukokortikoidů odděleně. Použitím inhibitoru solubilní guanylátcyklázy 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on zjistili, že účinek NO dárců byl zprostředkován cGMP nezávislým mechanismem.<sup>48</sup>

Isoprostany jsou metabolity membránových lipidů vznikajících při oxidačním stresu, včetně astmatu, CHOPN i cystické fibrózy. I když je jejich účinek na epitelu dýchacích cest jen málo prozkoumán, jsou zodpovědné za různé biologické reakce v dýchacích cestách, na hladkém svalstvu i lymfatickém systému. Catalli et al. studovali inhibiční aktivitu isoprostanů na hladkém svalstvu dýchacích cest psů a prasat. Přišli na to, že inhibiční aktivita nebyla ovlivněna inhibitorem solubilní guanylátcyklázy 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on.<sup>50</sup>

## 3. Experimentální část

### 3.1. Cíl experimentální práce

Cílem experimentální části této rigorózní práce bylo studium mechanismu relaxačního účinku syntetického derivátu VN-034, odvozeného od molekuly vasicinonu, metodou in vitro na izolované trachee morčete a potkana. Cílem bylo ověřit, zda by se mohlo jednat o  $\beta$ -agonistu a nebo o M-antagonistu.

### 3.2. Použitý materiál a zvířata

#### 3.2.1. Chemikálie

Tab. 1 Použité chemikálie

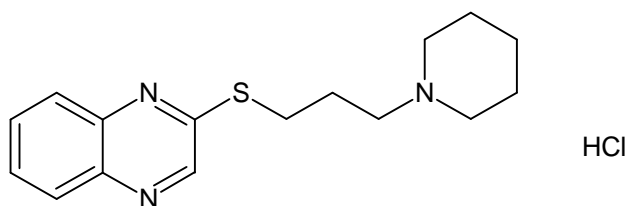
Název	Vzorec	Výrobce	$M_r$
Chlorid sodný p.a.	NaCl	Penta, Chrudim, Česká republika	58,44
Chlorid draselný p.a.	KCl	Lachema, Brno, Česká republika	74,56
Hydrogenuhlíčan sodný p.a.	NaHCO <sub>3</sub>	Penta, Chrudim, Česká republika	84,01
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika	136,09
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	Lachema, Brno, Česká republika	246,47
D-glukóza p.a.	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Penta, Chrudim, Česká republika	198,17
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl <sub>2</sub>	Lachema, Brno, Česká republika	110,99

Karbamoylcholin chlorid 99%	$C_6H_{15}ClN_2O_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo	182,65
Teofylin	$C_7H_8N_4O_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo	180,17
Destilovaná voda	$H_2O$	Dostupná na pracovišti	18,01
Salbutamol	$C_{13}H_{21}NO_3$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo	239,31
Propranolol	$C_{16}H_{21}NO_2$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo	259,34
Ipratropium bromid monohydrát	$C_{20}H_{30}BrNO_3 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo	430,38

### 3.2.2. Testovaná látka

Testovaná látka byla syntetická látka VN-034, která byla poskytnuta Katedrou organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Je to 2-[3-(piperidin-1-yl)propylsulfanyl]chinoxalin hydrochlorid,  $M_r=323,88$

*Obr. 4* Strukturální vzorec látky VN-034



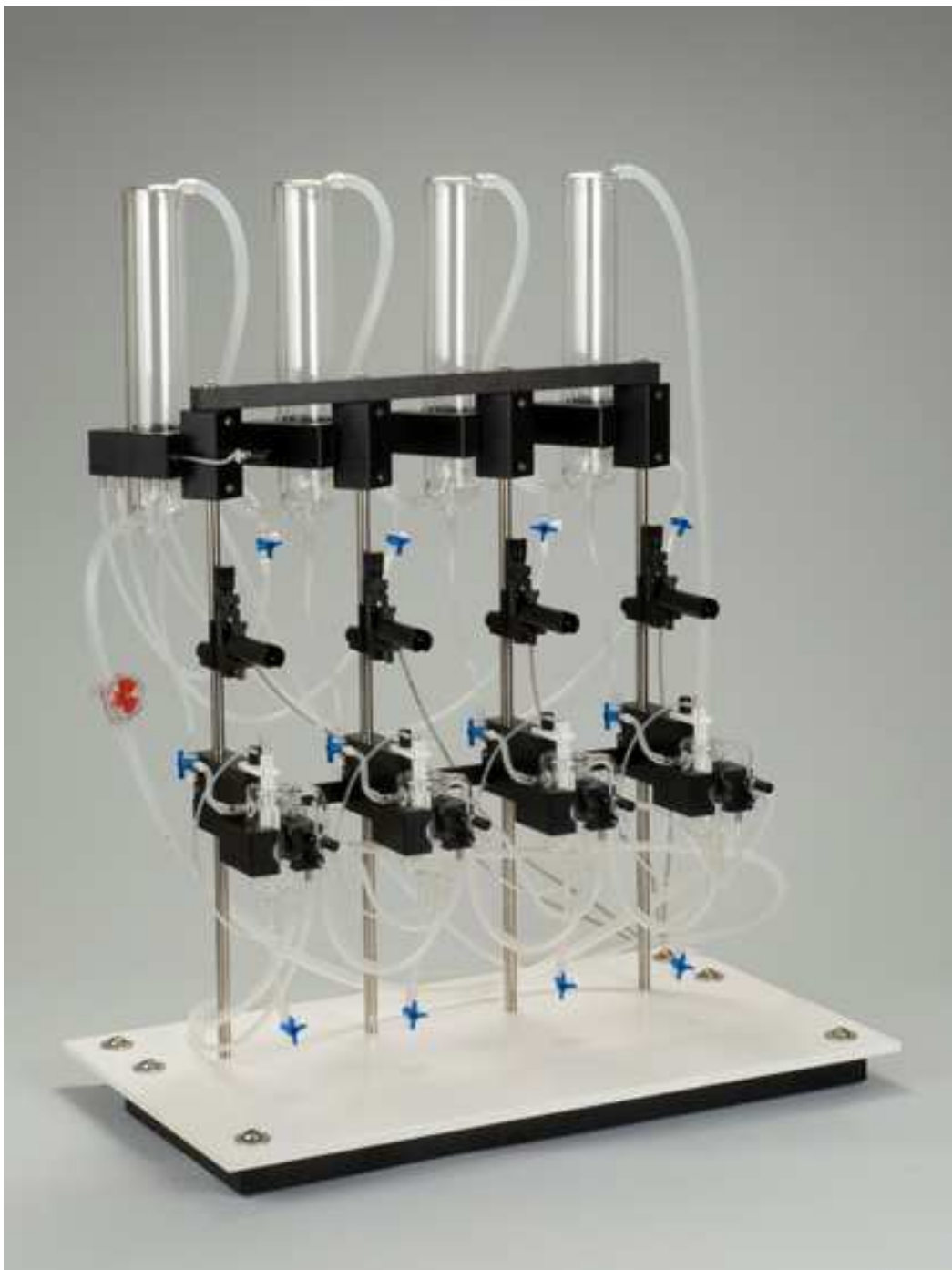
### **3.2.3. Pokusná zvířata**

Experimenty byly prováděny na samcích morčat o průměrné hmotnosti 400g a samcích potkanů kmene Wistar o průměrné hmotnosti 300g. Zvířata byla umístěna ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde byla chována za standardních laboratorních podmínek. Zvířata měla volný přístup k pitné vodě a standardní peletizované potravě. Pokusy byly prováděny po desetidenní aklimatizaci a v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### **3.2.4. Přístroje a pomůcky**

- Aparatura na izolované orgány: Multi chamber tissue bath system ISO-08-TSZ4, SEN-03-FSG1 Force/Displacement transducer (Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko)
- Vyhodnocovací software (S.P.E.L. Advanced Kymograph SOFT-03-KYMO, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Počítač
- Plynová bomba s pneumoxidem
- Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Dresden, Německo)
- Laboratorní sklo, pomůcky k navažování, nůžky, pinzety, peán, ligatura

*Obr. 5 Aparatura na izolované orgány<sup>31</sup>*



### 3.3. Metodika

#### 3.3.1. Příprava Krebs-Henseleitova roztoku

Tab. 2 Složení Krebs-Henseleitova roztoku (g/l)

Složení	Koncentrace g/l
NaCl	6,8
KCl	0,35
NaHCO <sub>3</sub>	2,1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,29
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	2,0
CaCl bezvodý	0,28

Pro čtyři vzorky izolované trachey jsme připravovali vždy 1 litr Krebs-Henseleitova živného roztoku. Jednotlivé navážky jsme rozpustili v destilované vodě a tyto roztoky jsme smíchali. Roztok chloridu vápenatého jsme přidávali k ostatním roztokům až nakonec, aby nedošlo k vysrážení vápenatých solí, které jsou slabě rozpustné. Nakonec jsme roztok doplnili destilovanou vodou na požadovaný objem.

#### 3.3.2. Provedení pokusů

Testování probíhalo na izolované trachee morčete nebo potkana. Laboratorní zvíře jsme rychle omráčili a usmrtili vykrvením po podstřihnutí krční tepny. Poté jsme zvíře fixovali na operační stůl. V krční oblasti jsme odstříhali kožní řasu a tupou preparací jsme obnažili a uvolnili po obou stranách tracheu, kterou jsme oddělili od dýchacího traktu v oblasti bifurkace. Tracheu jsme přenesli do Petriho misky s Krebs-Henseleitovým roztokem. V Petriho misce jsme průdušnici očistili od zbytků okolní tkáně a ventrální část průdušnice jsme vertikálně rozstříhali (středem podkovovitých chrupavek). Poté jsme preparát rozdělili na čtyři přibližně stejné části. Tracheu jsme rozprostřeli tak, aby hladká svalovina byla uprostřed a na protější rohy chrupavkovité části jsme opatrně připevnili ligatury. Takto připravený preparát jsme přenesli do Schullerovy

nádobky na izolovaný orgán. Schullerova nádobka byla naplněna živným Krebs-Henseleitovým roztokem vyhřívaným na 37°C a okysličovaným pneumoxidem (směs 95% O<sub>2</sub> a 5% CO<sub>2</sub>). Preparát jsme fixovali ligaturami k pevně uchycené fritě s pneumoxidem a k izotonickému převodníku spojenému s registračním zařízením (počítač). Stejný postup jsme provedli pro všechny čtyři preparáty.

Před vlastním pokusem jsme průdušnici zatížili na 2,5 g a nechali ji 10 minut stabilizovat, poté jsme v každé Schullerově nádobce vyměnili živný roztok. Po uplynutí dalších 10 minut jsme provedli opět výměnu živného roztoku a zatížení jsme snížili na 1 g (pracovní napětí). Výplach živným roztokem jsme provedli ještě dvakrát (v intervalu 10 minut). Poté jsme do každé Schullerovy nádobky odměřili pomocí injekční stříkačky 5 ml živného roztoku.

Před samotným testováním jsme do lázně naplněné živným roztokem přidali roztok karbacholu, kterého jsme do lázně aplikovali vždy 50 μl, přičemž výsledná koncentrace v lázni byla 10<sup>-6</sup> M, pokud bylo k experimentu použito morče, nebo 10<sup>-5</sup> M, pokud byl pokusným zvířetem potkan. Aplikovali jsme první dávku karbacholu, došlo ke kontrakci trachey, kterou jsme viděli díky záznamu v počítači. Po dosažení maximální kontrakce jsme provedli výplach a nechali tracheu zpět relaxovat a stabilizovat se. Tímto jsme ověřili reaktivitu preparátu. Poté následoval vlastní pokus.

### **3.3.2.1. Účinek testované látky na β-receptory**

Účinek na β-receptory byl zkoušen na trachee morčete. Schullerovu nádobku jsme opět naplnili objemem 5 ml pomocí injekční stříkačky a aplikovali jsme další dávku karbacholu 10<sup>-6</sup> M. Po úplné kontrakci trachey jsme začali aplikovat jednotlivé kumulativní dávky testované látky a sledovali, zda dochází k relaxaci preparátu. Další dávku testované látky jsme přidali vždy až po stabilizaci odpovědi hladkého svalstva na dávku předchozí. K aplikaci jednotlivých dávek jsme používali mikropipety. Po aplikaci všech koncentrací testované látky jsme přidali roztok teofylinu o koncentraci 3x10<sup>-3</sup>M a tuto relaxaci navozenou teofylinem jsme považovali za maximální. Koncentrace teofylinu byla převzata z odborné literatury.<sup>36</sup>



Odpovědi navozené jednotlivými dávkami testované látky jsme potom vyjádřili jako procento z maximální relaxace navozené teofylinem.

V některých experimentech jsme ještě navíc provedli desetiminutovou preinkubaci s propranololem o koncentraci  $10^{-6}$  M. Cílem této preinkubace bylo zablokovat  $\beta$ -receptory v trachee. Zvolená koncentrace propranololu byla převzata z odborné literatury.<sup>37</sup>

Poté zůstal postup experimentu stejný. Do živného roztoku jsme přidali karbachol o koncentraci  $10^{-6}$  M, po dosažení maximální kontrakce jsme podávali kumulativní dávky testované látky, nakonec jsme přidali roztok teofylinu o koncentraci  $3 \times 10^{-3}$  M. Kromě látky VN-034 jsme tímto způsobem testovali i salbutamol (známý  $\beta$ -agonista).

Tab. 3 Kumulativně podávané koncentrace testované látky a salbutamolu bez preinkubace s propranololem nebo s preinkubací

Koncentrace (M)	VN 034	VN 034+P	Salbutamol	Salbutamol+P
$5 \times 10^{-11}$			✓	
$10^{-10}$			✓	
$5 \times 10^{-10}$			✓	
$10^{-9}$	✓	✓	✓	
$5 \times 10^{-9}$			✓	
$10^{-8}$	✓	✓	✓	
$5 \times 10^{-8}$	✓	✓	✓	
$10^{-7}$	✓	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-7}$	✓	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-7}$	✓	✓	✓	✓
$10^{-6}$	✓	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-6}$	✓	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-6}$	✓	✓	✓	✓
$10^{-5}$	✓	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-5}$	✓	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-5}$	✓	✓	✓	✓
$10^{-4}$	✓	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-4}$				✓
$5 \times 10^{-4}$				✓
$10^{-3}$				✓
$2,5 \times 10^{-3}$				✓
$5 \times 10^{-3}$				✓
$10^{-2}$				✓

### 3.3.2.2. Účinek testované látky na M-receptory

Pro tyto pokusy jsme používali tracheu potkana umístěnou v 5 ml Krebs-Henseleitova roztoku. Nejprve jsme nechali preparát 10 minut inkubovat s testovanou látkou VN-034 o koncentraci  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  nebo s ipratropiem  $10^{-8} \text{M}$  (známý M-antagonista) nebo nechali samotný v živném roztoku (kontrola). Cílem inkubace bylo zablokovat muskarinové receptory v trachee. Použitá koncentrace byla získána z předešlých pokusů a odpovídá dávce, která navodí 97% relaxaci po kontrakci karbacholem  $10^{-5} \text{M}$ . Poté jsme začali k preparátu postupně přidávat jednotlivé kumulativní dávky karbacholu. Sledovali jsme, zda došlo ke kontrakci hladkého svalstva průdušnice. Další dávka karbacholu byla přidána vždy až po stabilizaci odpovědi na dávku předchozí. Odpovědi navozené jednotlivými dávkami karbacholu jsme vyjádřili jako procento z maximální kontrakce navozené nejvyšší dávkou karbacholu.

Tab. 4 Kumulativně podávané koncentrace karcholu po preinkubaci s látkou VN 034 ( $5 \times 10^{-5} M$ ) nebo ipratropiem ( $10^{-8} M$ ) a nebo bez preinkubace (kontrola).

Koncentrace karcholu (M)	VN 034 + Karchol	Ipratropium + Karchol	Karchol (kontrola)
$10^{-9}$	✓	✓	✓
$10^{-8}$	✓	✓	✓
$10^{-7}$	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-7}$	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-7}$	✓	✓	✓
$10^{-6}$	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-6}$	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-6}$	✓	✓	✓
$10^{-5}$	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-5}$	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-5}$	✓	✓	✓
$10^{-4}$	✓	✓	✓
$2,5 \times 10^{-4}$	✓	✓	✓
$5 \times 10^{-4}$	✓	✓	
$10^{-3}$	✓	✓	

### 3.3.3. Statistické vyhodnocení výsledků

#### 3.3.3.1. Účinek testované látky na $\beta$ -receptory

Získané hodnoty jsme zpracovali pomocí programu GraphPad Prism 5. Na osu X byl vynesena log koncentrace testované látky, na osu Y relaxace hladkého svalstva v procentech (průměr $\pm$ SEM). Metodou nelineární regrese jsme získali DRC křivky (dose-response curve). Z jednotlivých DRC křivek jsme odečetli hodnotu  $ED_{50}$ , která je definována jako dávka testované látky vyvolávající polovinu maximální odpovědi. Dále byla odečtena i hodnota  $E_{max}$  (nejvyšší dosažená odpověď po kumulativním podání testované látky vyjádřená

jako procento z maximální relaxace navozené teofylinem  $3 \times 10^{-3}$  M). Pro každou hodnotu byl určen konfidenční interval 95%. Získaná data byla následně analyzována pomocí F-testu, v němž jsme srovnávali relaxační působení testované látky samotné a nebo při zablokování  $\beta$ -receptorů antagonistou. Hodnoty byly považovány za rozdílné při  $p < 0,05$ .

### **3.3.3.2. Účinek testované látky na M-receptory**

Při statistickém vyhodnocení jsme postupovali obdobně jako při sledování účinku na  $\beta$ -receptory. Na osu X byl vynesena log koncentrace kumulativně podávaného karbacholu, na osu Y kontrakce hladkého svalstva v procentech (průměr $\pm$ SEM). Z DRC křivek byly odečteny hodnoty  $ED_{50}$ . Srovnávali jsme kontrakci navozenou kumulativním podáním karbacholu při zablokování M-receptorů antagonistou a nebo bez zablokování. Pro každou hodnotu byl určen konfidenční interval 95%. Získaná data byla analyzována pomocí F-testu, kde jsme srovnávali kontrahující účinek karbacholu na hladký sval při zablokování M-receptorů antagonistou a nebo bez něho. Hodnoty byly považovány za rozdílné při  $p < 0,05$ .

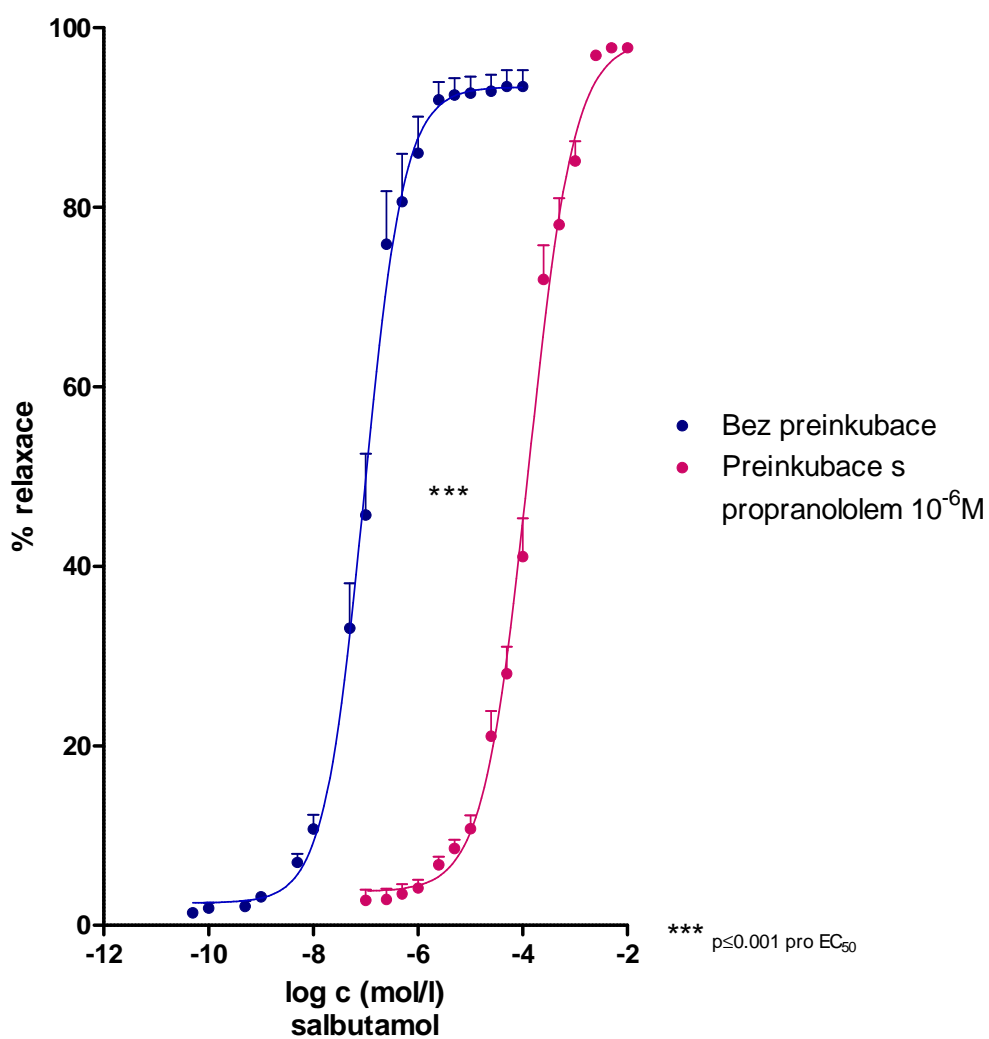
## 4. Výsledky

Tab. 5 Relaxační účinek látky VN-034 a salbutamolu na izolovanou tracheu morčete prekontrahovanou karbacholem ( $10^{-6}M$ ) bez preinkubace s propranololem ( $10^{-6}M$ ) a nebo s preinkubací.

Látka	N	EC <sub>50</sub> CI <sub>95%</sub> pro EC <sub>50</sub> (mol/l)	Významný rozdíl proti kontrolě?	E <sub>max</sub> CI <sub>95%</sub> pro E <sub>max</sub> (%)	Významný rozdíl proti kontrolě?
VN-034	8	2,652*10 <sup>-6</sup> (2,065*10 <sup>-6</sup> – 3,407*10 <sup>-6</sup> )	Ano p=0,0005	78,76 (73,13 – 84,40)	Ano p=0,0062
Propranolol + VN-034	12	4,486*10 <sup>-6</sup> (3,887*10 <sup>-6</sup> – 5,176*10 <sup>-6</sup> )		70,19 (66,99 – 73,40)	
Salbutamol	7	9,343*10 <sup>-8</sup> (7,805 *10 <sup>-8</sup> - 1,118*10 <sup>-7</sup> )	Ano p<0,0001	93,41 (90,71 - 96,10)	Ne p=0,1423
Propranolol + salbutamol	8	1,306*10 <sup>-4</sup> (1,069*10 <sup>-4</sup> - 1,595*10 <sup>-4</sup> )		98,63 (92,60 – 104,7)	

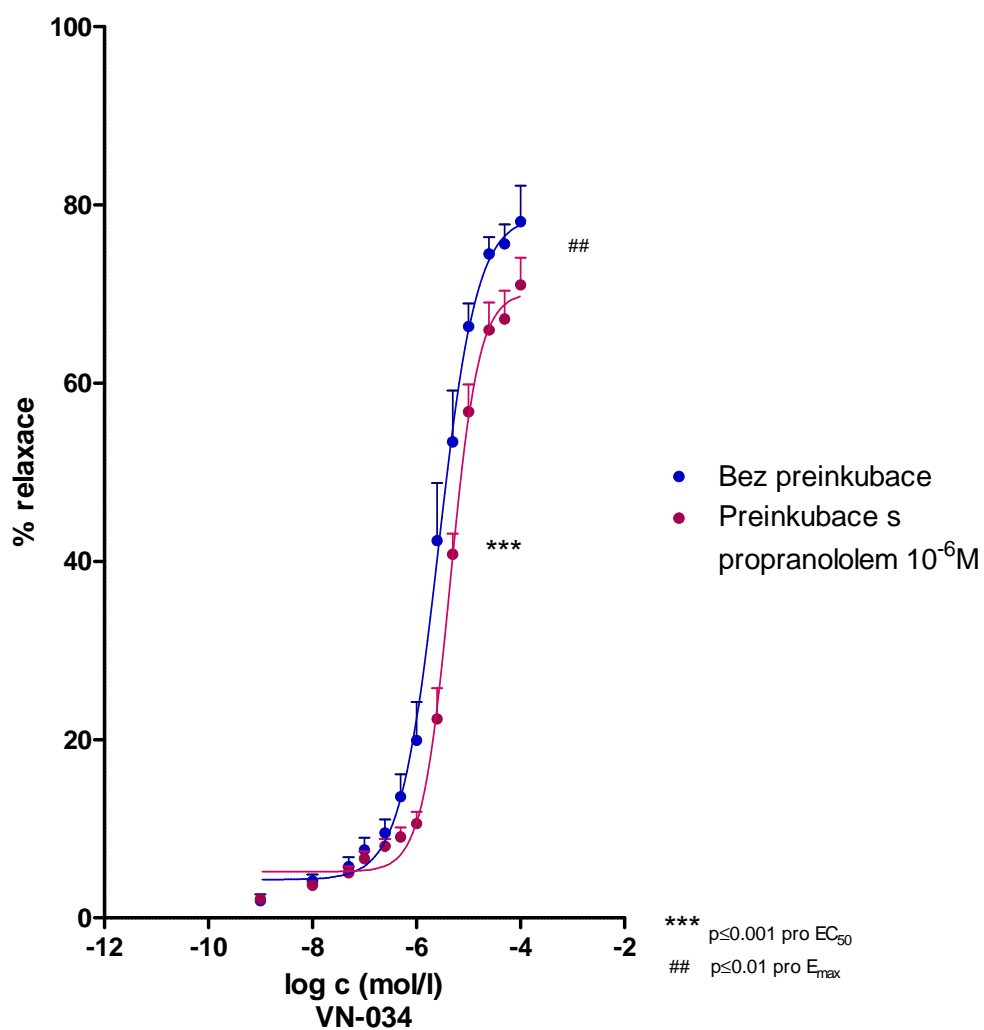
Graf 1 Relaxační účinek salbutamolu na izolovanou tracheu morčete prekontrahovanou karcholem ( $10^{-6}M$ ) bez preinkubace s propranololem ( $10^{-6}M$ ) a nebo s preinkubací.

### Kontrakce trachey morčete karcholem $10^{-6}M$ a následná relaxace salbutamolem (kontrola, známý beta agonista)



Graf 2 Relaxační účinek látky VN-034 na izolovanou tracheu morčete prekontrahovanou karchacholem ( $10^{-6}M$ ) bez preinkubace s propranololem ( $10^{-6}M$ ) a nebo s preinkubací.

## Kontrakce trachey morčete karchacholem $10^{-6}M$ a následná relaxace látkou VN-034



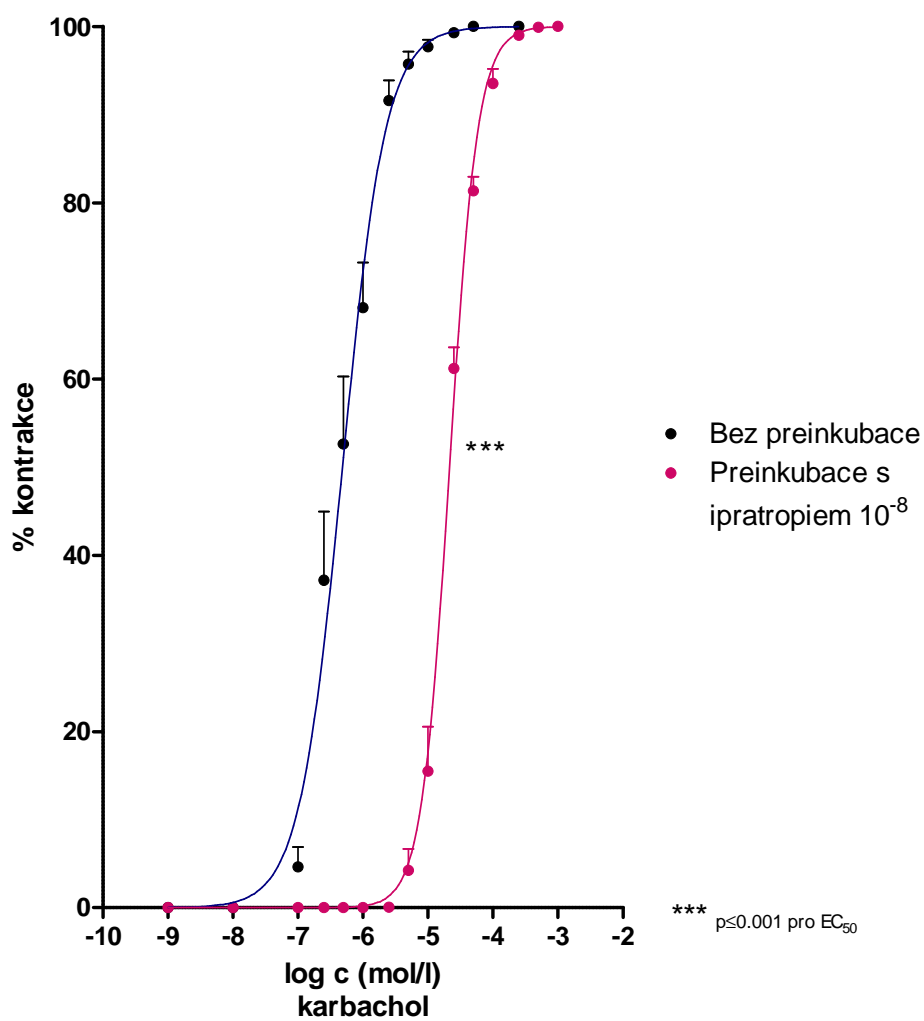


Tab. 6 Kontrakce trachey potkana navozená kumulativním podáním karbacholu po preinkubaci s látkou VN-034 ( $5 \cdot 10^{-5} M$ ) nebo ipratropiem ( $10^{-8} M$ ) a nebo bez preinkubace (kontrola).

Látka a použitá koncentrace (mol/l)	n	EC <sub>50</sub> CI <sub>95%</sub> pro EC <sub>50</sub> (mol/l)	Významný rozdíl proti kontrole?
Kontrola	12	$4,825 \cdot 10^{-7}$ ( $4.230 \cdot 10^{-7} - 5.503 \cdot 10^{-7}$ )	-
VN-034 ( $5 \cdot 10^{-5}$ )	8	$2,543 \cdot 10^{-5}$ ( $2.418 \cdot 10^{-5} - 2.675 \cdot 10^{-5}$ )	Ano p<0.0001
Ipratropium ( $10^{-8}$ )	7	$2,147 \cdot 10^{-5}$ ( $2.036 \cdot 10^{-5} - 2.264 \cdot 10^{-5}$ )	Ano p<0.0001

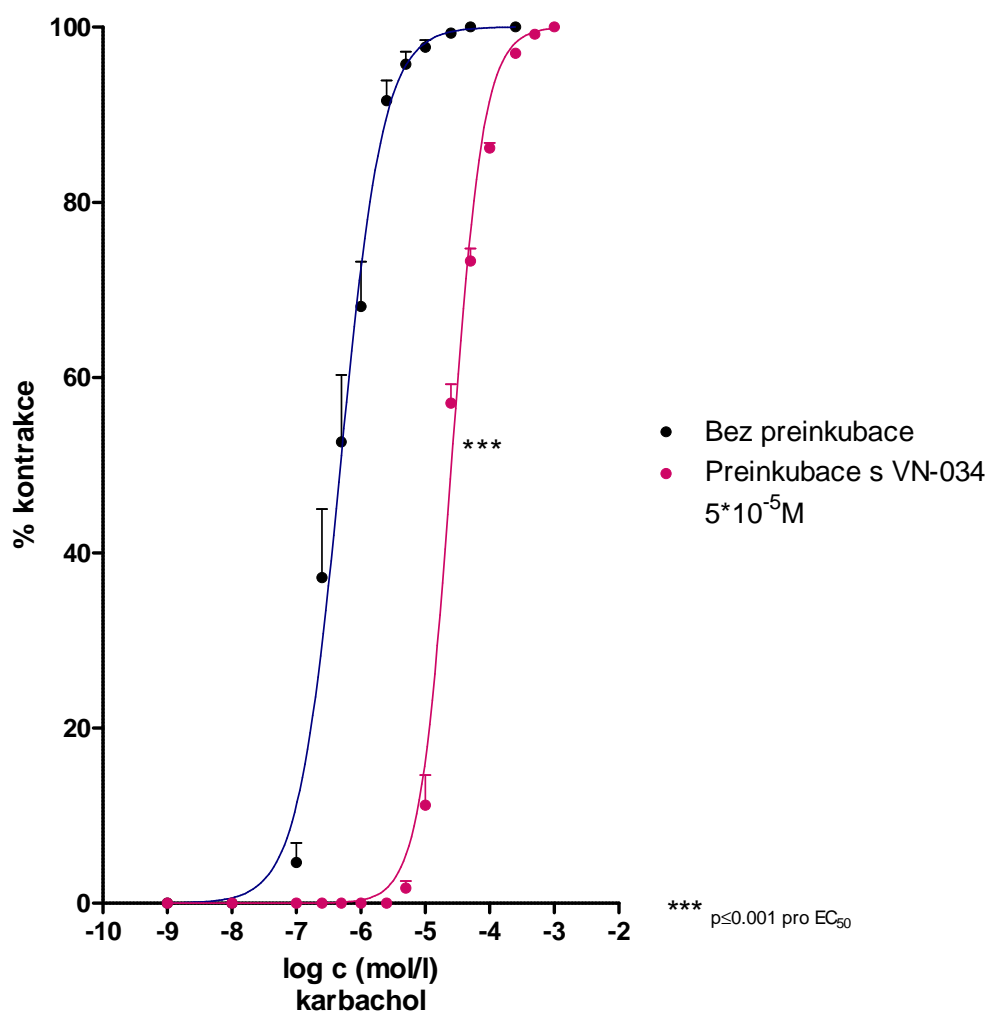
Graf 3 Kontrakce trachey potkana navozená kumulativním podáním karcholu po preinkubaci s ipratropiem ( $10^{-8}M$ ) a nebo bez preinkubace (kontrola).

### Preinkubace s ipratropiem $10^{-8}M$ a následná kontrakce trachey potkana navozená kumulativním podáním karcholu



Graf 4 Kontrakce trachey potkana navozená kumulativním podáním karcholu po preinkubaci s látkou VN-034 ( $5 \cdot 10^{-5} M$ ) a nebo bez preinkubace (kontrola).

### Preinkubace s látkou VN-034 $5 \cdot 10^{-5} M$ a následná kontrakce trachey potkana navozená kumulativním podáním karcholu



## 5. Diskuze

Onemocnění plic a dýchacích cest se stala v posledních desetiletích velmi závažným problémem. Celosvětový počet astmatiků je odhadován na 300 miliónů. Za posledních 20 let dochází celosvětově k nárůstu tohoto onemocnění hlavně u dětí a mladistvých. I v České republice je patrný tento trend. Z toho pramení i stále se zvyšující zdravotní i sociálně-ekonomický dopad na jednotlivce i celou společnost. Chronická obstrukční plicní nemoc je v současnosti čtvrtou příčinou mortality ve světě a předpokládá se, že bude třetí v roce 2020. Prevalence CHOPN je různá v různých regionech světa, ale odhaduje se, že postihuje asi 10% celosvětové dospělé populace. I když se jedná o chronické onemocnění, lze mu předcházet (hlavně redukcí kouření).

Poznatky z posledních desítek let posunuly významně vpřed znalost patogenních mechanismů u obou těchto nemocí. Jsou známy základní mechanismy, které vedou k rozvoji astmatu i CHOPN. I přes velké pokroky výzkumu zůstává astma i CHOPN u části pacientů stále závažným problémem a je třeba hledat stále nové léčebné postupy a léky.

Na Farmaceutické fakultě UK byly testovány účinky přírodních chinazolinových alkaloidů obsažených v *Justicia adhatoda*: vasicin, vasicinon a standardizovaný extrakt z listů. V experimentech se zjistilo, že jak přírodní vasicin, tak standardizovaný extrakt z *J. adhatoda* měly v porovnání s teofylinem signifikantně vyšší relaxační účinek. Mírná relaxační aktivita byla prokázána i u vasicinonu přírodního původu, ale oproti teofylinu byl jeho účinek signifikantně nižší. Nejúčinnější testovanou látkou z celé skupiny byl extrakt z *J. adhatoda*, který obsahoval oba alkaloidy.<sup>39</sup>

Je všeobecně známo, že chemickou modifikací přírodní struktury lze velmi často získat sloučeniny s vyšší účinností. Na FAF se testovaly relaxační účinky některých syntetických derivátů chinazolinu a chinoxalinu získaných zavedením různých funkčních skupin do základní struktury. U dvou derivátů VN-14 a VN-15 se navíc *in vitro* hledal i možný mechanismus relaxačního účinku. Z výsledků vyplynulo, že látka VN-14 se nechovala jako  $\beta$ -agonista. Účinek látky VN-15 byl

ovlivněn blokádou  $\beta$ -receptorů a zároveň se nejednalo o klasický kompetitivní antagonismus. Obě testované látky se chovaly jako M-antagonisté (dosud nepublikované výsledky).<sup>39,40</sup>

V této experimentální práci jsme testovali látku VN-034, která vykazovala bronchodilatační účinek.

Na prvním grafu je zobrazen relaxační účinek salbutamolu na izolovanou tracheu morčete bez preinkubace s propranololem ( $10^{-6}$ ) nebo s preinkubací. Na grafu je viditelný posun mezi jednotlivými křivkami. Hodnoty  $EC_{50}$  byly signifikantně odlišné a je patrné, že po preinkubaci s propranololem je k dosažení stejného účinku potřeba podat vyšší dávku salbutamolu. Zablokování  $\beta$ -receptorů propranololem znemožní působení salbutamolu, až vyšší koncentrace salbutamolu vytěsňují z  $\beta$ -receptorů propranolol a umožní navození relaxace. Tímto jsme potvrdili, že salbutamol je kompetitivní  $\beta_2$ -agonista, a také jsme ověřili správnost uspořádání pokusu.

Cílem našeho experimentu bylo ověřit, zda by látka VN-034 mohla být  $\beta$ -agonistou. Na dalším grafu je zobrazen relaxační účinek látky VN-034 na izolovanou tracheu morčete prekontrahovanou karbacholem ( $10^{-6}$ ) bez preinkubace s propranololem a nebo s preinkubací. Po preinkubaci s propranololem došlo k posunu křivky doprava a také ke snížení dosáhnutého maxima. Z grafu je zřejmý posun mezi křivkami a při porovnání hodnot  $EC_{50}$  i  $E_{max}$  byl zjištěn signifikantní rozdíl. Inkubace s propranololem dokázala antagonizovat relaxační působení látky VN-034 a zároveň se nejednalo o klasický kompetitivní antagonismus.

Stejným způsobem byl zkoumán možný mechanismus relaxačního účinku derivátů VN-14 a VN-15. U derivátu VN-14 neměla blokáda propranololem žádný účinek, posun mezi křivkami byl minimální, mezi hodnotami  $EC_{50}$  i  $E_{max}$  nebyl zjištěn signifikantní rozdíl. U látky VN-15 byly získány podobné výsledky jako pro námi testovanou látku VN-034. Naměřené výsledky nejvíce odpovídaly nekompetitivnímu antagonismu.<sup>40</sup>

Nejdůležitější způsob navození bronchodilatace v dýchacích cestách je přes aktivaci  $\beta_2$ -receptorů. Při aktivaci  $\beta_2$ -receptorů se stimuluje adenylátcykláza,

kteřá katalyzuje přeměnu ATP na cAMP. Zvýšené hladiny cAMP jsou pak spojeny s aktivací proteinkinázy A. Ta zajistí fosforylaci klíčových regulačních proteinů spojených s kontrolou tonu hladkého svalu. Mimo tento mechanismus existuje ještě mechanismus navození relaxace, který není závislý na zvýšení cAMP.<sup>51,52</sup> Jedná se o tzv. maxi-K kanál, který může být aktivován mechanismem závislým na cAMP nebo také nezávisle na cAMP.<sup>52,53</sup> Přítomnost obou těchto mechanismů byla prokázána při testování trachey morčete in vitro isoprenalinem. Ovšem stanovení jejich podílu na relaxaci je velmi obtížné.<sup>40,52</sup>

Také postavení  $\beta_2$ -receptorů při relaxaci hladkého svalstva není tak jednoznačné, jak se doposud myslelo. Noradrenalin relaxuje hladký sval morčete pravděpodobně prostřednictvím  $\beta_1$ -receptorů, navíc se ukazuje, že existuje více podtypů  $\beta_1$ -receptorů:  $\beta_1$ -low a  $\beta_1$ -high. Je pozoruhodné, že  $\beta_1$ -low a  $\beta_1$ -high se od sebe liší právě citlivostí k propranololu.<sup>54</sup> Účinek propranololu na respirační systém se tedy nedá vysvětlit pouze jednoduchým antagonismem na  $\beta_2$ -receptorech, navíc informace týkající se působení propranololu na respirační systém jsou sporné.<sup>55</sup> Kromě toho, že je propranolol neselektivní  $\beta$ -blokátor, má ještě další účinky. Má určitou vnitřní aktivitu ISA, nejasným mechanismem zvyšuje koncentraci noradrenalinu na synapsi, proto je někdy označován také jako nepřímý  $\alpha$ -agonista.<sup>56</sup> Působí také jako antagonist a nebo parciální agonista serotoninových receptorů, pravděpodobně 5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>1B</sub>. Afinita k H<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> a  $\alpha_2$  receptorům nebyla zjištěna. Bohužel zatím není přesně znám význam a rozsah výše uvedených účinků při kontrakci a relaxaci hladkého svalstva průdušek. Tyto další účinky, které propranolol vykazuje, by se také mohly uplatnit a antagonizovat působení látky VN-034.<sup>40</sup>

Z výsledků získaných v této rigorózní práci není možné přesně stanovit, jakým způsobem látka VN-034 relaxovala hladký sval trachey morčete. Stále zůstává nedostatečně prozkoumaný přesný mechanismus propojení  $\beta$ -receptorů s odpovědí hladkého svalstva, navíc se ukazuje, že při relaxaci trachey se mohou kromě  $\beta_2$ -receptorů uplatnit i  $\beta_1$ -receptory. U  $\beta_1$ -receptorů navíc rozlišujeme více podtypů. Ani u propranololu nejsou dostatečně prozkoumány všechny účinky k tomu, abychom mohli stanovit přesný mechanismus účinku.

Další část experimentu se zabývala působením látky VN-034 na M-receptory. Pro tyto pokusy jsme používali tracheu potkana. Z grafu je patrné, že při kumulativním podávání karbacholu po preinkubaci s ipratropiem ( $10^{-8}$ ) došlo k posunu křivky doprava a hodnota  $EC_{50}$  byla významně vyšší. Tímto jsme potvrdili, že ipratropium je kompetitivní M-antagonista a také jsme ověřili správnost uspořádání pokusu. Z dalšího grafu je zřetelné, že po preinkubaci s látkou VN-034 ( $5 \times 10^{-5} M$ ) došlo také k posunu křivky doprava a i zde byla hodnota  $EC_{50}$  signifikantně zvýšena. Tento účinek lze vysvětlit tak, že látka VN-034 zablokovala muskarinové receptory v trachee potkana. Aby došlo ke kontrakci hladkého svalstva, bylo pak potřeba podat vyšší dávku M-agonisty karbacholu. Látka VN-034 se tedy chovala jako kompetitivní M-antagonista.

## 6. Závěr

Při studiu účinku látky VN-034 na respirační systém metodou in vitro jsme hledali možný mechanismus účinku. Cílem bylo ověřit, zda by se mohlo jednat o  $\beta$ -agonistu a nebo o M-antagonistu.

V použitém uspořádání pokusů z výsledků vyplynulo:

- Testovaná látka VN-034 má relaxační účinek na tracheu morčete kontrahovanou karbacholem.
- Relaxační účinek látky VN-034 na tracheu morčete byl ovlivněn bloádou propranololem, látka se ale nechovala jako kompetitivní  $\beta$ -agonista. Z našich výsledků není možné určit bližší mechanismus účinku.
- Při testování účinku na M-receptory na trachee potkana se látka VN-034 chovala jako kompetitivní M-antagonista.



## 7. Seznam literatury

1. Kašák, V., Špičák, V., Pohunek, P. Astma bronchiale. Interní medicína pro praxi. 2001, 10, 442-445.
2. Janíčková, H. Akutní astma. Pediatrie pro praxi. 2001, 3, 124-128.
3. Lincová, D., et al. Základní a aplikovaná farmakologie. 1.vydání. Praha: Galén, 2002. 601 s. ISBN 80-7262-168-8.
4. Suchopár, J., et al. Remedia Kompendium. 4.vydání. Praha: Panax, 2009. 946 s. ISBN 978-80-902806-4-9.
5. Turzíková, J. Strategie léčby astmatu u malých dětí. Remedia. 2010, 1, 48-51.
6. Bártů, V. Léčba astmatu: doporučené postupy a individuální přístup. Lékařské listy [online]. 2011, 2, [cit. 2011-12-01]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/lecba-astmatu-doporucene-postupy-a-individualni-pristup-458491>
7. Lüllmann, H., et al. Barevný atlas farmakologie. 3.vydání. Praha: Grada, 2007. 384 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
8. Novák, J. Léčba astmatu inhalačními kortikosteroidy - 2011. Medicína pro praxi. 2011, 8(3), 112-118.
9. Klener, P., et al. Vnitřní lékařství. 3.vydání. Praha: Galén, 2006. 1152 s. ISBN 80-7262-430-X.
10. Salajka, F., Kašák, V., et al. Asthma bronchiale. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře [online]. 2008, [cit. 2011-12-03]. Dostupné z: <http://www.svl.cz/default.aspx/cz/spol/svl/default/menu/doporucenepostu/doporucenepostu>
11. Teřl, M. Astma bronchiale, novinky v diagnostice a léčbě. Interní medicína pro praxi. 2007, 4, 184-187.
12. Turčáni, P. Chronická obstrukční plicní nemoc dnes. Interní medicína pro praxi. 2008, 10(11), 502-507.

13. Kašák, V. Bronchiální astma. *Medicína pro praxi*. 2010, 7(8 a 9), 319-321.
14. Krčmová, I. Omalizumab - terapeutická perspektiva v léčbě těžkého bronchiálního astmatu. *Remedia*. 2006, 16(4), 438-442.
15. Braunová, J. Biologická léčba astmatu - historie a budoucnost nových léčebných možností. *Remedia*. 2010, 20(1), 69-73.
16. Sedlák, V., Koblížek, V. Budoucí léčba astma bronchiale. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2010, 24(2), 71-74.
17. Global Initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD [online]. 2006, [cit. 2011-12-05]. Dostupné z:  
[http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLDReport2006\\_0122.pdf](http://www.goldcopd.org/uploads/users/files/GOLDReport2006_0122.pdf)
18. Musil, J. Chronická obstrukční plicní nemoc - choroba stále aktuální. *Interní medicína pro praxi*. 2009, 11(7 a 8), 319-323.
19. Dindoš, J. Včasná diagnostika chronické obstrukční plicní nemoci, léčba a její farmakoeconomické výhody. *Interní medicína pro praxi*. 2010, 12(4), 186-190.
20. Pauk, N. Současné možnosti diagnostiky a léčby CHOPN. *Postgraduální medicína* [online]. 2011, 6, [cit. 2011-12-05]. Dostupné z:  
<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/soucasne-moznosti-diagnostiky-a-lecby-chopn-460136>
21. Zatloukal, J. Novinky v terapii CHOPN. *Medicína pro praxi*. 2007, 4 (7 a 8), 301-304.
22. Ahmed, S., Garg, M., et al. A phyto-pharmacological overview on *Adhatoda zeylanica* Medic. Syn. *A. vasica* (Linn.) Nees. *Natural Products Radiance*. 2008, 8(5), 549-554.
23. Žourková, A. Bupropion - více než antidepresivum. *Remedia*. 2007, 17(6), 592-594.
24. Wenzel, S., Barnes, P., et al. A randomized, double blind, placebo-controlled study of tumor necrosis factor alpha in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006, 174, 753-762.

25. Shames, R., Vexler, V., et al. The safety and pharmacokinetics of SB240683 (anti-IL-4 humanized monoclonal antibody) in patients with mild to moderate asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001, 107, 317.
26. Busse, W., Baker, J., et al. Preliminary safety and efficacy of daclizumab in the treatment of patients with moderate to severe chronic persistent asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004, 113, 286-287.
27. Pauk, N. Indacaterol - nový lék pro pacienty s CHOPN. *Lékařské listy* [online]. 2010, 1, [cit. 2011-12-05]. Dostupné z: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/indacaterol-novy-lek-pro-pacienty-s-chopn-449235>
28. Kos, S. Indacaterol - nový nadějný lék pro léčbu CHOPN. *Edukafarm* [online]. 2010, [cit. 2011-12-05]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/soubory/medinews/2010-02/indacaterol.pdf>
29. Marek, J., et al. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4.vydání. Praha: Grada, 2010. 808 s. ISBN 978-80-247-2639-7.
30. Gruengerg, D., Busse, W. Biologická léčba astmatu. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* [online]. 2011, 6, [cit. 2011-12-08]. Dostupné z: [http://www.prolekare.cz/cop-clanek?id=31702&confirm\\_rules=1](http://www.prolekare.cz/cop-clanek?id=31702&confirm_rules=1)
31. <http://www.experimentia.com/87-24252.php> [cit. 2011-12-15].
32. Claeson, U., Malmfors, T., et al. *Adhatoda vasica*: A critical review of ethnopharmacological and toxicological data. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000, 72(1-2), 1-20.
33. Shrivastava, N., Shrivastava, A., et al. Anti-ulcer activity of *Adhatoda vasica* Nees. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2006, 6(2), 43-49.
34. Horáčková, K. *Adhatoda vasica* [online]. [cit. 2011-12-11]. Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/item/adhatoda-vasica>
35. Zabeer, A., Bhagat, A., et al. Synthesis and bronchodilator activity of new quinazoline derivate. *European Journal of Medical chemistry*. 2006, 41(3), 429-434.

36. Martin, CA., et al.  $\beta_3$ -adrenoceptor agonists, BRL 37344 and SR 58611A, do not induce relaxation of human, sheep and guinea-pig airway smooth muscle in vitro. *European Respiratory Journal*, 1994. 7(9), 1610-1615.
37. Nieri, P., et al. CB1- and CB2-cannabinoid receptor-independent lipolysis induced by WIN 55, 212-2 in male rat adipocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2003, 368(5), 352-359.
38. Bahekar, RH., Rao, AR. Synthesis, evaluation and structure-activity relationships of 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazoline, 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazolin-5(6H)-thiones and their oxo-analogues as new potential bronchodilators. *Arzneimittelforschung*. 2001, 51(4), 284-92.
39. Kottová, M. Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami in vivo a in vitro: disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 2009
40. Šipulová, Z. Studium mechanismu účinku vybraných derivátů chinazolinu na respirační systém in vitro: rigorózní práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Fakulta farmaceutická, 2010
41. Morokata, T., Suzuki, K., et al. Effect of a novel interleukin-5 receptor antagonist, YM-90709 (2,3-dimethoxy-6,6-dimethyl-5,6-dihydrobenzo[7,8]indolizino[2,3-b]quinoxaline), on antigen-induced airway inflammation in BN rats. *International Immunopharmacology*. 2004, 4(7), 873-883.
42. Morokata, T., Suzuki, K., et. al. Effect of a novel interleukin-5 receptor antagonist, YM-90709, on antigen-induced eosinophil infiltration into the airway of BDF1 mice. *Immunology Letters*. 2005, 98(1), 161-165.
43. Caramori, G., Adcock, I., et al. Anti-inflammatory inhibitors of IkappaB kinase in asthma and COPD. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2004, 5(11), 1141-1147.
44. Keslacy, S., Tliba, O., et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-inducible inflammatory genes by interferon-gamma is associated with

- altered nuclear factor-kappaB transactivation and enhanced histone deacetylase activity. *Molecular Pharmacology*. 2007, 71(2), 609-618.
45. Ojo, B., Findsen, LA., et al. Synthesis and bronchodilatory activity of four new derivatives of deoxyvasicine. *International Journal of Drug Design and Discovery*. 1996, 14(1), 1-14.
46. Gladue, R., Cole, S. The human specific CCR1 antagonist CP-481,715 inhibits cell infiltration and inflammatory responses in human CCR1 transgenic mice. *Journal of Immunology*. 2006, 176(5), 3141-3148.
47. Leibowitz, M., Gorgon, R. In vivo anti-allergic and bronchopulmonary pharmacology of REV 3164 in rats and guinea-pigs. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1984, 271(1), 135-154.
48. Jonasson, S., Hedenstierna, G., et. al. Concomitant administration of nitric oxide and glucocorticoids improves protection against bronchoconstriction in murine model of asthma. *Journal of Applied Physiology*. 2010, 109(2), 521-531.
49. Papapetropoulos, A., Simoes, D. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2006, 290(1), 179-184.
50. Catalli, A., Zhang, D. Receptors and signaling pathway underlying relaxation to isoprostanes in canine and porcine airway smooth muscle. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002, 283(5), 1151-1159.
51. Torphy, T. Beta-adrenoreceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. *Trends in Pharmacological Science*. 1994, 15(10), 370-374.
52. Tanaka, Y., Yamashita, Y., et. al. MaxiK channel mediates beta2-adrenoreceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2003, 39(6), 205-219.

53. Kume, H., Hall, IP., et al. Beta-adrenergic agonists regulate K<sub>Ca</sub> channels in airway smooth muscle by cAMPdependent and -independent mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*. 1994, 93(1), 371-379.
54. Tanaka, Y., Yamashita, Y., et. al. Pharmacological characterization of the beta-adrenoreceptor that mediates the relaxant response to noradrenaline in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2007, 375(1), 51-64.
55. Maclagan, J., Ney, UM., et. al. Investigation of the mechanism of propranolol-induced bronchoconstriction. *British Journal of Pharmacology*. 1979, 66(3), 409-418.
56. Young, R., Glennon RA., et al. S(-)Propranolol as a discriminative stimulus and its comparison to the stimulus effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology*. 2009, 203(2), 369-382.