

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Porovnání účinku látek (VN 004 a VN 009) ze skupiny derivátů vasicinu na modelu izolované průdušnice

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce:

PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové 2016

Mgr. Sandra Vrátná

„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. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu“.

V Hradci Králové, 15.2.2016

podpis:

Touto cestou bych ráda upřímně poděkovala své školitelce PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení, cenné rady, doporučení a hlavně čas, který mi při e-mailových či osobních konzultacích věnovala.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Sandra Vrátná

Školitel: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Název rigorózní práce: Porovnání účinku látek (VN 004 a VN 009) ze skupiny derivátů vasicinu na modelu izolované průdušnice.

Cílem rigorózní práce bylo in vitro stanovit relaxační aktivitu dvou strukturálních obměn chinazolinových alkaloidů VN 004 a VN 009 na hladké svalovině izolované průdušnice potkana. Námi testované syntetické látky byly odvozeny z alkaloidů vasicinu a vasicinonu, které jsou obsaženy v keři *Adhatoda vasica*. Na izolované průdušnici potkana jsme pozorovali kumulativní relaxační účinek jednotlivých dávek výše uvedených sloučenin.

Z naměřených hodnot je patrné, že tyto syntetické deriváty chinazolinu mají na izolované průdušnici potkana relaxační účinek. Derivát s ethylaminovým fragmentem VN 009 byl méně účinným derivátem, nicméně i tak vykazoval větší aktivitu než v případě standardu theofylinu. Naopak silnější relaxační účinek vykázal druhý z derivátů s ethylsulfanylovým fragmentem VN 004, jehož hodnota ED_{50} byla 32,5 krát nižší než hodnota ED_{50} theofylinu.

ABSTRAKT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Sandra Vrátná

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, Csc.

Name thesis: Comparison of the effects of substances (VN 004 and VN 009) from derivative of vasicin on model of isolated trachea

The aim of the thesis was to determine the in vitro activity of relaxing two structural modifications quinazoline alkaloids VN 004 (4-dimethylaminoethylsulfanylchinazolin) and VN 009 (N- [2- (piperidin-1-yl) ethyl] quinazolin-4-amine) on smooth muscle isolated rat trachea. They tested synthetic materials were derived from alkaloids vasicin and vasicinone contained in bushes *Adhatoda vasica*. On isolated rat trachea we were observed cumulative relaxation effect of single doses of the aforementioned compounds.

From the measured values it was clearly evident that these synthetic quinazoline derivatives demonstrated on isolated rat trachea relaxing effect. Derivates with ethylaminfragment VN 009 was less effective derivative, but even so, demonstrated a greater activity than the standard theophylline. Conversely, stronger relaxation effect reported from the second derivatives with ethylsulfanyl fragment VN 004, the value of ED_{50} was 32.5 times lower than the ED_{50} of theophylline.

OBSAH

1	POUŽITÉ ZKRATKY	8
2	ÚVOD.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	ASTMA BRONCHIALE A JEHO LÉČBA	10
3.1.1	Definice onemocnění	10
3.1.2	Epidemiologie a prevalence	10
3.1.3	Klasifikace onemocnění.....	11
3.1.4	Příznaky onemocnění.....	11
3.1.5	Diagnostika onemocnění.....	12
3.1.6	Rizikové faktory	13
3.1.7	Patofyziologie	13
3.1.8	Léčba	14
3.2	ADHATODA.....	26
3.2.1	Popis rostliny	26
3.2.2	Výskyt.....	26
3.2.3	Rostlinné drogy.....	27
3.2.4	Obsahové látky	27
3.2.5	Využití.....	27
3.2.6	Sloučeniny	28
4	CÍL PRÁCE	30
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1	POUŽITÝ MATERIÁL	31
5.1.1	Chemikálie	31
5.1.2	Přístroje a pomůcky	32
5.1.3	Pokusná zvířata.....	33
5.1.4	Testované látky.....	33
5.2	METODIKA.....	34
5.2.1	Příprava Krebs-Henseleitova roztoku:	34
5.2.2	Provedení pokusu	35
6	VÝSLEDKY	37

7	DISKUZE	40
8	ZÁVĚR	42
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

1 POUŽITÉ ZKRATKY

cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
ČIPA	Česká iniciativa pro astma
CO ₂	oxid uhličitý
ED ₅₀	střední efektivní dávka
FEV 1	forced expiratory volume (jednosekundová vitální kapacita plic)
GINA	Global Initiative for asthma
GM-CSF	Granulocyte-makrophage colony-stimulating factor (faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IgE	imunoglobulin E
IL 13	interleukin 13
NO	oxid dusnatý
O ₂	kyslík
PEV	peak expiratory flow (vrcholová výdechová rychlost)
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
WHO	World health organization (Světová zdravotnická organizace)

2 ÚVOD

Astma bronchiale je poměrně časté onemocnění, které si zaslouží naši zvýšenou pozornost nejen proto, že jeho výskyt v posledních 50 letech celosvětově dramaticky stoupá. Nemoc postihuje osoby všech věkových kategorií, nelze ji vyléčit a velkým problémem je, že ji nelze ani účinně předcházet ⁽¹⁰⁾. Pokud jsou pacienti v péči lékaře, žije drtivá většina z nich bez větších potíží, podstatná část pacientů ale o své nemoci neví a tudíž je ohrožena do budoucna velkými problémy, které vedou k omezení každodenního života a které mohou v krajním případě skončit i smrtí. Přesto doznala léčba a výzkum v posledních několika letech výrazného pokroku a intenzivně se zkoumají nové možnosti a látky, které by nemoc mohly ovlivnit a umožnit tak pacientům s touto diagnózou vést co možná nejlépe život.

Cílem této práce bylo stanovit relaxační aktivitu dvou nově syntetizovaných látek VN 004 (4-dimethylaminoethylsulfanylchinazolin) a VN 009 (*N*-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]chinazolin-4-amin), které vznikly obměnou struktury chinazolinových alkaloidů (vasicinu a vasicinonu), jež jsou součástí keře *Adhatoda vasica*. Při syntéze námi testovaných látek na Katedře organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové se vycházelo právě z těchto chinazolinových alkaloidů. Aktivita těchto syntetizovaných látek byla stanovena *in vitro* na hladké svalovině izolované průdušnice potkana a dosažené výsledky byly porovnány s teofylinem, který je považován za standard.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ASTMA BRONCHIALE A JEHO LÉČBA

Toto onemocnění představuje závažný problém veřejného zdraví a v celosvětovém měřítku představuje i významnou zátěž pro zdravotně- sociální systém a systém politický. Průmyslově vyspělé země na léčbu astmatu vynakládají 1-2 % ze svých celkových výdajů na zdravotní péči - v Evropě činila tato částka za rok 2003 17,7 miliard eur ⁽¹⁰⁾.

Astma bronchiale je onemocnění, které vyžaduje zvýšenou pozornost kvůli své prevalenci, která v posledních 50 letech stoupá v rozvojových i rozvinutých zemích. Pokud není nemoc pod kontrolou, má za následek závažné omezení každodenního života a někdy i smrt ⁽⁶⁾. Postihuje osoby všech věkových kategorií, nelze ji vyléčit a ani ji nelze účinně předcházet ⁽¹⁰⁾.

Nové poznatky o etiopatogenezi sice pomohly pochopit průběh nemoci, stále však trvají určité rezervy v prevenci, diagnostice i léčbě tohoto onemocnění. Navzdory všemu doznala léčba v posledních letech výrazného pokroku a bezpochyby vede ke snížení počtu hospitalizací pro toto onemocnění ⁽²⁾.

3.1.1 Definice onemocnění

Astma bronchiale můžeme definovat jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, přičemž patogeneze se účastní mnoho buněčných populací a produktů. Hlavní roli v rozvoji zánětu mají především eozinofily a jejich cytotoxicky účinné proteiny, ale podílejí se na něm i neurogenní mechanismy. Zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou, která vede ke stále se opakujícím epizodám obtížného hvízdavého dýchání nebo dušnosti, dále k pocitům krátkého dechu, tíhy na hrudi a k atakům dráždivého kašle. Tyto stavy bývají spojeny s variabilní bronchiální obstrukcí- ta bývá reverzibilní spontánně, popřípadě po léčebném zásahu. Astmatu většinou předchází nebo ho doprovází alergická rhinitida ⁽¹⁾.

3.1.2 Epidemiologie a prevalence

Celosvětově prevalence astmatu za posledních 20 let dramaticky stoupá- v jednotlivých regionech se pohybuje mezi 1- 18%. Nyní se odhaduje, že astmatem

trpí celosvětově 300 milionů osob, přičemž 250 tisíc ročně na astma umírá. Odhaduje se, že v roce 2025 bude trpět astmatem již 400 milionů osob. U nás je prevalence astmatu odhadována na 8%, mortalita je ve srovnání s CHOPN tradičně nízká- posledních 6 let se pohybuje kolem 100 osob za rok ⁽⁶⁾.

3.1.3 Klasifikace onemocnění

Abychom mohli stanovit diagnózu astmatu a rozhodnout tak o způsobu jeho léčby, je nutno použít klasifikaci astmatu podle tíže příznaků. Tato klasifikace má 4 základní stupně:

- 1) Intermitentní astma - příznaky se vyskytují nepravidelně- denní maximálně 1x týdně, noční nejvýše 2x měsíčně, choroba neovlivňuje kvalitu života ani pacienta nijak neomezuje, plicní funkce jsou v normě, variabilita PEF je nižší než 20%
- 2) Lehké perzistující astma - denní příznaky se vyskytují častěji než 1x týdně, ale jsou méně časté než 1xdenně, noční příznaky jsou častější než 2x měsíčně, hodnota FEV je větší než 80%, variabilita PEF je 20- 30%, úlevová léčiva jsou aplikována méně než 1x denně
- 3) Středně těžké perzistující astma - příznaky se objevují každodenně, avšak nemají trvalý charakter, noční příznaky jsou častější než 1x týdně, choroba narušuje běžné aktivity pacienta i jeho spánek, hodnota FEV/PEF je 60-80%, aplikace úlevových léčiv je již každodenní
- 4) Těžké perzistující astma - příznaky se objevují každodenně a mají již trvalý charakter, časté jsou i příznaky v noci, nemoc omezuje běžné činnosti člověka a zhoršuje jeho kvalitu života, hodnota PEF/FEV je menší než 60%, variabilita PEF je větší než 30% ⁽¹⁾

3.1.4 Příznaky onemocnění

Jedním z typických příznaků astmatu je bronchiální hyperreaktivita na široké spektrum inhalačních alergenů různého fyzikálního a chemického složení. Tato hyperreaktivita je charakterizována přechodným zúžením dýchacích cest, omezením jejich průchodnosti a zvýšením odporu v dýchacích cestách. Astma bývá většinou

snadno diagnostikováno díky typickým příznakům, ovšem v některých případech může být průběh onemocnění atypický- jde především o neurčité pocity tísně na hrudi, ataky kašle bez doprovázejících pískotů. Právě v těchto případech bývají pacienti léčení chybně antibiotiky, antitusiky či jinými preparáty- většinou však bez žádoucího efektu⁽²⁾.

3.1.5 Diagnostika onemocnění

Pro stanovení diagnózy astmatu se používá mimo anamnestických údajů a fyzikálního vyšetření také vyšetření spirometrické a bronchodilatační test s rychle působícím β_2 -mimetikem, po kterém dochází ke zvýšení usilovně vydechnutého objemu vzduchu za jednu vteřinu- FEV₁ o 12 a více procent a zároveň minimálně o 200 ml. Při podezření na astma bronchiale při typických anamnestických údajích, absenci fyzikálního nálezu a normálních hodnotách ventilačního vyšetření je prováděn bronchokonstrikční test s metacholinem nebo histaminem. Pokles FEV₁ o 20 a více procent oproti výchozí hodnotě při koncentraci provokační látky méně než 4 mg/ml je pro uvedenou diagnózu typický. Zátěžové vyšetření bicykloergometrie, které patří mezi nepřímé bronchoprovokační testy, se používá k průkazu bronchiální hyperreaktivity hlavně u malých dětí. Nezbytnou součástí vyšetřovacího programu je alergologické vyšetření k zjištění atopie a průkazu alergenů, které mohou působit jako spouštěči astmatických projevů. V posledních letech se používá rovněž měření hodnoty vydechovaného oxidu dusnatého (NO) jako detektoru eozinofilního zánětu dýchacích cest. Jedná se o biomarker (neurotransmitter), který má nízkou senzitivitu a dobrou specifitu. "Nadbytek" NO u astmatiků vzniká konverzí L-argininu na NO a citrát působením enzymů, tzv. syntáz oxidu dusnatého. Tento izotop (radioaktivně značený L-arginin) je pak přítomen v dýchacích cestách astmatiků (u osob zdravých se vyskytuje výjimečně). Někdy může dojít ke zkreslení měřené hodnoty NO- může ji zvýšit atopie, infekce horních cest dýchacích, naopak ji snižuje kouření a léčba kortikosteroidy. V poslední době se do popředí dostává rovněž úloha atypické bakteriální infekce při astmatu. Patogeny jako *Mycoplasma pneumoniae* nebo *Chlamydia pneumoniae* představují důležitý faktor v patogenezi a klinickém obrazu astmatu. Momentálně je řešena otázka, zda léčba makrolidy u těchto pacientů může ovlivnit chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest⁽²⁾.

3.1.6 Rizikové faktory

Příčiny vzniku astma bronchiale nejsou přesně určeny, nicméně při vzniku onemocnění hraje roli jak expozice zevním faktorům, tak genetické předpoklady. Polovina astmatiků v dospělosti začíná s projevy astmatu již v dětství, nejčastěji příznaky začínají do 5 let věku dítěte. Také alergická rýma je závažným rizikovým faktorem pro rozvoj bronchiálního astmatu, přestože bývá často považována za banální onemocnění. Je známo také množství rizikových faktorů jedince, ale i prostředí, které podporují domněnku o současném působení všech těchto vlivů. Velkou roli bezesporu hraje expozice škodlivým látkám v řadě povolání. Profesionální astma představuje ve vyspělých zemích zhruba 10% případů- jedná se tak o nejčastější respirační onemocnění z povolání. Roli zde hraje expozice pesticidům, parfémům, enzymům, ale i aromatickým látkám nebo pryžím ⁽²⁾.

3.1.7 Patofyziologie

Při vzniku onemocnění hrají roli jak genetické, tak vnější faktory. Jeho vznik souvisí velmi pravděpodobně se zvýšeným kontaktem s alergeny v novorozeneckém a kojeneckém věku- toto riziko se navíc stupňuje spolu s rodinou predispozicí ⁽³⁾.

Alergie je přemrštěná reakce imunitního systému na zevní antigeny (alergeny). Jedná se o imunopatologickou reakci I. typu zprostředkovanou protilátkou imunoglobulinem E (IgE) u jedinců s genetickou dispozicí (atopiků). Alergeny jsou nejčastěji malé proteiny, které jsou součástí pylů rostlin a stromů, roztočů, domácího prachu, peří, plísní, srsti a exkrementů zvířat, jedu blanokřídlého hmyzu a potravin. Organický prach, pryskyřice a latex se mohou vyskytovat v určitých pracovních procesech ⁽⁹⁾.

Základní podmínkou vedoucí ke vzniku **alergického (extrinsic) astmatu** je opakovaný kontakt s alergenem, který způsobí proces senzibilizace organismu pacienta. Aktivují se T a B lymfocyty a spustí se kaskádová reakce vedoucí k expresi receptorů pro IgE, a to především na mastocytech, bazofilech a eozinofilech. Rovněž dochází ke zvýšení syntézy IgE - po jeho navázání na receptory je organizmus připraven na další setkání s alergenem. Tato nová expozice alergenu vyvolá u organismu odpověď, která může vyústit až v astmatický záchvat. Z časového hlediska můžeme tuto odpověď rozdělit do dvou fází:

- 1) Časná fáze- jejím základem je navázání antigenu na IgE na povrchu mastocytů a dalších buněk, což vede k uvolnění nitrobuněčných zásob mediátorů a tvorbě dalších- např. histaminu, leukotrienů, prostaglandinů, tromboxanů. Tyto působky mají účinky vazogenní, spasmogenní a prozánětlivé a okamžitě tak způsobí kontrakci hladkého svalstva dýchacích cest- tedy bronchokonstrikci.
- 2) Pozdní fáze- nebývá přímo závislá na expozici antigenu a vyskytuje se především v noci v různých intervalech. Je složena z mnoha navzájem propojených dějů, přičemž jejich postavení není dosud zcela objasněno. Vznik pozdní fáze je spojen hlavně s eozinofily, které jsou zodpovědné za vznik alergického zánětu. Uvolňují nadále velké množství prozánětlivých mediátorů, které následně způsobí odlučování a poškozování epitelu bronchů. Epitel se proto stává více prostupný pro bronchokonstrikční látky, méně chrání proti nové expozici antigenu a je i citlivější k fyzikálním podnětům. Konečným důsledkem těchto dějů je remodelace průdušek, jež je zodpovědná za klinický průběh perzistujících forem astmatu ⁽³⁾.

Tzv. **nealergické (intrinsic) astma** vznikne i bez přítomnosti alergenu. Důvodem vzniku může být stres, chlad, viry, námaha nebo polutanty. Mechanismus spuštění není zatím příliš znám, ale zřejmě budou stimulovány dráždivé receptory sensorických nervů a bude tak docházet k uvolnění neuropeptidových mediátorů, které následně aktivují mastocyty a další buňky. Další průběh je pak obdobný jako u alergického astmatu ⁽³⁾.

3.1.8 Léčba

V posledních letech doznala léčba tohoto onemocnění výrazných změn a jejím důsledkem je proto snížení počtu hospitalizací. Za hlavní milník v terapii lze považovat rok 1975, kdy byly do praxe zavedeny inhalační kortikosteroidy a rovněž vstup fixních kombinací do léčby v roce 1999. První národní léčebná a diagnostická doporučení se objevila před 20 lety. Tzv. Globální iniciativa pro astma (GINA), která byla založena pod patronací WHO v roce 1993, vydala svůj základní dokument v roce 1995. Ten je pravidelně jednou ročně novelizován na základě medicíny založené na důkazech. V České republice je národní sesterskou organizací GINA Česká iniciativa pro astma (ČIPA), která byla založena 3 odbornými lékařskými společnostmi v roce 1996 ⁽¹¹⁾.

Hlavním cílem léčby je dosáhnout pokud možno plné kontroly nad astmatem tak, aby u pacienta zůstaly zachovány normální plicní funkce, mohl vykonávat běžné fyzické aktivity a aby byl minimalizován výskyt typických příznaků a frekvence exacerbací. Na místě je také vyloučit nežádoucí účinky předepisovaných léčiv. Přesto je sestavení léčebného plánu vždy individuální pro každého pacienta. Léčebný program je vždy proces dynamický, vycházející z komplexního posouzení stavu pacienta a je veden stupňovitě s ohledem na frekvenci a četnost příznaků. Velkou roli hraje i dobrá spolupráce pacienta- pro efektivní léčbu je třeba zvolit i optimální inhalační pomůcky spolu s názornou inhalační technikou. Právě zde totiž můžeme v případě nepochopení najít příčinu nedostatečného účinku léčiv ⁽²⁾.

Vysvětlení příčin, příznaků a komplikací nemoci, zdůraznění nutnosti dlouhodobé léčby a dodržování režimu alergika by mělo být základní zásadou léčby. Alergie je celoživotní stav vyžadující pozornost pacienta i lékaře ⁽⁹⁾. Preparáty využívané v léčbě astmatu lze rozdělit do dvou skupin:

- 1) Preventivní antiastmatika (tzv. udržovací neboli dlouhodobá medikace) - léky dlouhodobě působící, hlavní je protizánětlivý účinek- jedná se o nejdůležitější složku v léčbě perzistujícího astmatu
- 2) Rychle a krátce působící bronchodilatancia (úlevová či záchranná medikace) - odstraňují akutní potíže (především bronchokonstrikci), ovlivňují příznaky a exacerbaci choroby, jejich vliv z dlouhodobého hlediska je nepodstatný, protože nemají protizánětlivý účinek ^(2,3)

3.1.8.1 Preventivní antiastmatika

Jejich podání je každodenní a dlouhodobé a zahrnuje protizánětlivé léky a bronchodilatancia s dlouhodobým účinkem, tedy:

- 1) Inhalační a systémové kortikosteroidy
- 2) Inhalační a perorální β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem
- 3) Antileukotrieny
- 4) Retardované methylxantiny, kromony
- 5) Další látky (antihistaminika 2. generace nebo omalizumab)

Výše zmíněná léčiva představují hlavní terapeutické prostředky k dosažení kontroly nad astmatem. K monoterapii se používají inhalační kortikosteroidy, které jsou považovány za základní a neúčinnější skupinu léčiv kontrolujících astma a perorální leukotrieny. Mnohem častěji se však léčiva kombinují a to v závislosti na stupni kontroly astmatu, přičemž se volí následující kombinace:

- 1) Inhalační glukokortikoid+ LABA (samostatně nebo ve fixní kombinaci)
- 2) Inhalační glukokortikoid+ perorální antileukotrien
- 3) Inhalační glukokortikoid+ perorální xantin v retardované lékové formě
- 4) Inhalační glukokortikoid+ LABA+ perorální antileukotrien nebo perorální xantin v retardované lékové formě
- 5) Inhalační glukokortikoid+ široké kombinace včetně perorálních kortikosteroidů a omalizumabu

Díky kombinacím dosáhneme vyšší účinnosti a zároveň je možno snížit dávky inhalačních kortikosteroidů ⁽¹⁾.

Léčba může být vedena v 5 stupních:

1. Stupeň (tj. astma pod kontrolou)- β_2 sympatomimetika s rychlým nástupem účinku jsou aplikována podle potřeby
2. Stupeň (tj. astma pod částečnou kontrolou) na výběr je:
 - monoterapie nízkou dávkou inhalačního kortikosteroidu nebo perorálně podaným antileukotriem

3. Stupeň (tj. astma pod částečnou kontrolou/nedostatečnou kontrolou) na výběr je terapie:
- a) inhalačním glukokortikoidem v nízké dávce+ dlouhodobě působícím β_2 sympatomimetikem
 - b) inhalačním kortikosteroidem ve střední nebo vysoké dávce
 - c) inhalačním kortikosteroidem v nízké dávce+ perorálně podávaným antileukotrienem
 - d) inhalačním kortikosteroidem v nízké dávce+ perorálně podávaným xantinem v retardované lékové formě
4. Stupeň (tj. astma pod nedostatečnou kontrolou) na výběr je terapie
- a) inhalačním kortikosteroidem ve střední nebo vysoké dávce+ dlouhodobě působícím β_2 sympatomimetikem
 - b) inhalačním kortikosteroidem ve střední nebo vysoké dávce+ dlouhodobě působícím β_2 sympatomimetikem+ perorálně podávaným antileukotrienem
 - c) inhalačním kortikosteroidem ve střední nebo vysoké dávce +dlouhodobě působícím β_2 sympatomimetikem+ perorálně podávaným xantinem v retardované lékové formě
5. Stupeň (tj. obtížně léčitelné astma), kdy se k trojkombinaci uvedené v bodě 4b,c přidává perorálně podávaný kortikosteroid v nejnižší možné dávce (případně i další antiastmatika) nebo podkožně aplikovaný omalizumab. Prevalence tohoto typu astmatu v ČR je 5% ⁽¹⁾

Jednotlivé skupiny léčiv:

- 1) Inhalační kortikosteroidy (**beclomethason, budesonid, ciclesonid, fluticason**)- momentálně skupina nejúčinnějších protizánětlivých látek působí na celou řadu faktorů jako je zlepšení plicních funkcí, snížení bronchiální hyperreakivity, zmírnění příznaků, redukce frekvence a tíže exacerbací nebo zlepšení kvality života. Indikací je u všech pacientů s perzistujícím astmatem. Bylo prokázáno, že dlouhodobé užívání i malých dávek těchto látek snižuje mortalitu astmatu, ovšem pokud je léčba přerušena, dochází naopak k jeho zhoršení ⁽³⁾.

Jejich účinek spočívá v přestupu přes cytoplazmatickou membránu a následném navázání na specifické „rozpuštěné“ receptory umístěné v cytoplazmě. Takto vytvořený komplex je přenesen do jádra buňky, zde se naváže na specifická místa některých genů v oblasti regulující transkripci. Dochází tak ke stimulaci exprese některých genů a následné syntéze příslušných bílkovin, některé geny jsou naopak potlačovány, a to především ty, které umožňují rozvoj zánětlivé reakce. Kortikoidy inhibují pronikání buněk zánětu do tkání postižených zánětem a také inhibují aktivaci a tvorbu komplexu antigen-protilátka, čímž je utlumena pozdní fáze alergické reakce (7).

Před časem bylo prokázáno, že je velmi prospěšná kombinace těchto látek s β_2 mimetiky s dlouhým účinkem. Jejich vzájemně pozitivní přínos spočívá především v procesu, kdy kortikosteroidy zvyšují expresi β_2 receptorů (tím se brání rozvoji tolerance, která by vznikla při dlouhodobém podávání těchto látek). LABA naopak připravují receptor pro kortikosteroidy, který je v cytosolu vázán v neaktivní formě, čímž se zjednoduší vznik aktivního komplexu kortikosteroid-receptor. Tyto poznatky pak vedly k zavedení fixních kombinací těchto látek, které se aplikují pomocí jednoho inhalátoru a vedou ke zlepšení compliance pacienta.

V současné době se jedná o kombinace budesonid/formoterol (SYMBICORT TURBUHALER) beclomethason/formoterol (COMBAIR, FORMODUAL) nebo fluticason/ salmeterol (DUASPIR DISKUS, SERETIDE INHALER, SERETIDE DISKUS). Účinek je synergický, tudíž je možno podávat nižší koncentrace obou zmíněných látek. Jedná se o neúčinnější kombinaci preventivních léčiv, s nimiž lze u některých pacientů dosáhnout úplné kontroly astmatu (3).

- 2) Systémové kortikosteroidy (methylprednisolon, prednison, triamcinolon)- mechanismus účinku je stejný jako u inhalačně podávaných léčiv, nicméně množství nežádoucích účinků je podstatně vyšší. Není žádoucí jejich dlouhodobé užívání, proto jsou podávány pouze u těžkého perzistujícího astmatu. Podání může být v perorální, injekční či rektální formě (3).
- 3) β_2 mimetika s dlouhým účinkem (LABA)- látky působící relaxaci hladkého svalstva bronchů buď perorální (**clenbuterol, procaterol**) nebo mnohem

výhodnější inhalační cestou (**formoterol, salmeterol**). Zlepšují mukociliární clearance, snižují vaskulární propustnost nebo mohou upravovat uvolnění mediátorů z mastocytů a bazofilů. Jejich protizánětlivý účinek je minimální, působí nejméně 12 hodin ⁽³⁾. Jejich působení je založeno na kompetitivním selektivním agonismu na adrenergických β_2 receptorech. Jejich stimulací dojde ke zvýšení koncentrace cAMP, dále pak k aktivaci proteinkinázy, fosforylaci cílových bílkovin a výsledkem je pak relaxace hladké svaloviny bronchů (ale též svaloviny dělohy a cév po systémovém podání). Tímto způsobem lze zabránit bronchokonstrikci navozené např. metacholinem, histaminem, inhalací studeného vzduchu nebo alergenem ⁽⁷⁾.

- 4) **Kromony (nedokromil)**- mechanismus účinku je postaven na stabilizaci membrán mastocytů, bazofilů a dalších buněk zánětu (snižuje schopnost jejich chemotaxe), což vede k inhibici uvolnění histaminu, leukotrienů a ostatních mediátorů zánětu. Obnovují uzávěr chloridových kanálů v buněčné membráně a brání odtoku chloridových iontů z aktivované buňky ⁽¹⁾. Tlumí i neurogenní dráždění, takže potlačují kašel a bronchokonstrikci způsobené tělesnou zátěží, vzdušnými polutanty nebo inhalací studeného vzduchu. Účinek na rozšíření bronchů je minimální, užívány jsou hlavně jako udržovací léčba u lehkého a středně těžkého astmatu. Výhodou nedokromilu je jeho inhalační aplikace a minimum nežádoucích účinků. Užíván je i do kombinací ⁽¹⁾. Nástup účinku trvá většinou týdny ⁽³⁾.
- 5) **Antileukotrieny (montelukast, zafirlukast)**- jejich cílem je kompetitivně antagonistovat účinek leukotrienových mediátorů zánětu. Účinek leukotrienů lze inhibovat i zásahem na úrovni 5- lipooxygenázy, ovšem inhibitorem tohoto enzymu je pouze v ČR neregistrovaný **zileuton** ⁽¹⁾. Leukotrieny mají především vazoaktivní, prozánětlivou a bronchokonstrikční aktivitou. Vznikají působením 5- lipooxygenázy na kyselinu arachidonovou uvolněnou z buněčné membrány působením fosfolipázy A2, a to hlavně v žírných buňkách, monocytech, eozinofilech ale také v buňkách cévního endotelu ⁽¹⁾. Užívány jsou hlavně v terapii ponámahového astmatu nebo astmatu navozeného kyselinou acetylsalicylovou. U těžce nemocných pacientů mohou snížit dávku podávaných kortikosteroidů ⁽³⁾. Jejich význam v poslední době

stoupá především proto, že mohou být využity v monoterapii. Použití je samozřejmě možné také do kombinace ⁽¹⁾.

- 6) Dalšími používanými látkami mohou být antihistaminika 2. generace (**desloratadin**, **levocetirizin** nebo **rupatadin**), které mají význam spíše v terapii sezónního pylového astmatu.

V poslední době je rovněž velmi oblíbená terapie pomocí monoklonálních protilátek, kde je hlavním zástupcem **omalizumab** jako rekombinantní monoklonální protilátka proti imunoglobulinu Ig E ⁽³⁾. Tato látka inhibuje časnou i pozdní alergickou reakci ještě před jejím spuštěním. Váže se na volně cirkulující molekuly IgE, se kterými tvoří solubilní trimerické komplexy, které jsou pak vychytávány retikuloendoteliárním systémem a vylučovány ledvinami. Látka se také váže na molekuly IgE exprimované na B- lymfocytech a tím snižuje uvolňování jejich mediátorů do cirkulace a inhibuje tvorbu nových molekul IgE. Výhodou je nemožnost vazby na IgE protilátky na povrchu mastocytů, čímž se minimalizuje riziko anafylaktické reakce, která by mohla nastat po přemostění dvou IgE molekul a následné degranulaci mastocytů. Výsledkem všech těchto procesů je snížení hladiny IgE o 96-99% původních hodnot a rovněž snížení bronchiální hyperreakivity. Jedná se o léčbu velmi účinnou a bezpečnou, s minimem nežádoucích účinků ⁽¹⁰⁾. Podkožní aplikace se provádí jednou za 2-4 týdny podle váhy nemocného a celkového IgE (UI/ml). Léčba omalizumabem je dlouhodobá, první účinky se dostavují za 12-16 týdnů. Vazba této látky na Ig E zabrání vazbě komponent spojených s rozvojem zánětu. Podáván je u těžkých stavů, kdy nezabírají ani vysoké dávky kortikosteroidů- dokáže redukovat těžké záchvaty, zlepšuje dlouhodobou kontrolu nad astmatem. Léčení jsou pouze dospělí a dospívající pacienti, jejichž astma je prokazatelně zprostředkováno imunoglobulinem E. Léčba ovšem není dosud příliš rozšířena z důvodu velmi vysokých nákladů s ní spojených.

3.1.8.2 Úlevová antiastmatika

Patří zde látky, které velmi rychle uvolňují konstriktci bronchů při exacerbaci astmatu (tzv. astmatický záchvat). Jsou podávány podle potřeby k potlačení akutní dušnosti a jsou rovněž indikována u pozátěžového bronchospasmu ⁽¹⁾.

Řadíme zde:

- 1) Inhalační a perorální β_2 mimetika s rychlým nástupem účinku a formoterol
- 2) Inhalační anticholinergika
- 3) Systémové kortikosteroidy
- 4) Methylxantiny s krátkým účinkem

Astmatickým záchvatem neboli exacerbací astmatu je myšlen stav postupného narůstání dušnosti, kašle, hvízdavého dýchání, pocitů tíhy na hrudi a jejich kombinací, které mohou vyústit až v ohrožení života ⁽¹⁾. Exacerbace mohou mít rychlý začátek (minuty až hodiny) nebo pomalý začátek (až 2 týdny). Návrat do stavu před exacerbací trvá 5-14 dní ⁽⁶⁾. Pokud k exacerbaci astmatu dojde, znamená to, že astma není pod dostatečnou kontrolou ⁽¹⁰⁾.

Rozlišujeme 3 formy exacerbace:

- 1) Lehká forma- projeví se zrychleným dýcháním, prodloužením výdechu, někdy i podrážděností, neklidem nebo pocitem úzkosti
- 2) Středně těžká forma- pacient vyhledává polohu vsedě, vyjadřuje se pouze v krátkých větách, při delší řeči se zadýchává, hrudník je v inspirační poloze, objevují se hlasité pískoty a hvízdavé projevy, dítě je neklidné a odmítá stravu
- 3) Těžká forma exacerbace- objevují se příznaky jako neschopnost dokončit větu na jeden dech, tachykardie nad 110/min, tachypnoe nad 25/min, při progresi pískavé dýchání mizí a dýchání je tiché ⁽¹⁾.

Domácí léčba těchto stavů obnáší sebekontrolu pacienta, kdy si pomocí výdechoměru zkontroluje stav bronchiální obstrukce, dále se většinou postupuje podle instrukcí, které pacient od lékaře individuálně dostává. Většinou je nutno aplikovat inhalačně rychle působící β_2 sympatomimetikum (např. salbutamol), jehož aplikace se opakuje v průběhu první hodiny co 20 minut a dále podle účinku každé 4 hodiny. Podle

potřeby lze užít perorálně prednison - tento postup je upřednostňován spíše než zvýšení dávky inhalačních kortikosteroidů, které se mohou zvýšit až na 4- násobek ⁽¹⁾.

Základem lékařské péče je podání kyslíku, opakovaná aplikace inhalačních β_2 -sympatomimetik s rychlým nástupem účinku (možná je i kombinace s ipratropiem) a systémové podání kortikosteroidů, většinou perorálně (injekční aplikace je nutná pouze u těžkých stavů). V případě problematického inhalačního podání β_2 sympatomimetik je možno podat látky perorálně. V léčbě použité pro zvládnutí záchvatu by se mělo pokračovat ještě po dobu 5-10 dní ⁽¹⁾.

Jednotlivé skupiny léčiv:

- 1) Inhalační sympatomimetika s rychlým nástupem účinku (salbutamol, terbutalin, fenoterol)- jejich mechanismus účinku byl zmíněn již v kapitole dlouhodobě působících sympatomimetik. Účinek nastupuje do několika minut a přetrvává 4-6 hodin a dokáže krátkodobě zlepšit bronchokonstrikci a ventilační funkce. Do této skupiny bývá zařazen i **formoterol**, který i přes svůj dlouhodobý účinek má velmi rychlý nástup ⁽³⁾.
- 2) Inhalační anticholinergika (ipratropium)- podstatou působení je kompetitivní antagonismus acetylcholinu na muskarinových receptorech M1, M2, M3. Blokuje postgangliovou eferentní vagovou cestu, čímž dojde k bronchodilataci a zároveň je zabráněno bronchokonstrikci způsobené acetylcholinem. Neovlivňují mukociliární motilitu, jejich vliv na tvorbu sputa a viskozitu je minimální, ale dlouhodobá aplikace snižuje jeho objem ⁽⁷⁾. Opět nemají vliv na zánět, jejich účinek oproti β_2 mimetikům je pomalejší a bronchodilatace menší. Jedná se o alternativu pro pacienty, kteří nemohou užívat β_2 - mimetika z důvodu nežádoucích účinků jako je třes nebo tachykardie. Ipratropium je látka obsahující kvarterní dusík a tudíž špatně prochází přes bariery- proto se aplikuje pouze inhalačně. Využívá se rovněž jeho kombinace s β_2 mimetiky ⁽³⁾.
- 3) Systémové kortikosteroidy se jako rychle působící léčiva podávají perorálně (většina případů) nebo parenterálně. Jsou důležitými léky v terapii, přestože nástup jejich účinku je pozvolný. Užívat by se měli krátkodobě, maximálně 10 dní ⁽¹⁾. Působí preventivně proti progresi exacerbace, snižují návštěvy

ambulancí i hospitalizace. Po vymizení příznaků je možno léky vysadit nebo snížit za předpokladu, že pokračuje léčba inhalačními kortikosteroidy ⁽³⁾.

- 4) Methylxantiny s krátkým účinkem- jedná se o inhibitory fosfodiesterázy typu 1-4 (nejvíce ovšem typu 3), v důsledku toho dochází ke zvýšení hladiny cAMP a tím je vyvolána relaxace hladké svaloviny dýchacích cest (bronchodilatační účinek) a plicních cév. Jejich vliv na imunitní systém spočívá především v potlačení uvolňování IL-4 a IL-5, snižují také hladiny eozinofilního kationového proteinu ve sputu a snižují tvorbu prozánětlivých cytokinů. Stimulují dechové centrum, zvyšují plicní výdej a cévní plicní rezistenci, podporují perfuzi ischemického myokardu, zřejmý je jejich mírně diuretický účinek a dilatační efekt na hladké svaly trávicího ústrojí, žlučových cest a snižují kontraktilitu dělohy. Lehce snižují degranulaci žírných buněk a antagonizují působení prostaglandinů. Podporují mukociliární motilitu, stimulují sekreci kyseliny chlorovodíkové v žaludku a vylučování katecholaminů z nadledvin ⁽⁷⁾. Tyto látky byly dříve předepisovány hojně, nyní jsou již preferovány jiné skupiny látek. Theofylin proto bývá indukován jako doplňková léčba u pacientů s těžko kontrolovatelným astmatem. Nehodí se pro inhalační aplikaci, musí být proto podáván celkově, perorálně se podává jako profylaxe záchvatu (např. večer pro eliminaci nočních záchvatů) nebo intravenózně při akutní exacerbaci. Injekčně je u nás registrován pouze aminofylin ⁽³⁾.

Astma bronchiale je doposud klasifikováno jako nevléčitelné onemocnění, které je ale možno udržet pod kontrolou. Cílem je nastavit takovou léčbu, aby při co nejmenší účinné dávce léčivého přípravku byl nemocný bez typických příznaků a omezení v každodenním životě. Je-li tomu naopak, je třeba léčebný přístup přehodnotit a upravit ⁽¹⁾. Nabízejí se nové léčebné možnosti včetně protizánětlivé profylaxe, nové aplikační systémy, objasnění genetické úlohy, otázka vyléčitelnosti onemocnění. Velká naděje se rovněž upíná k možnostem prenatálního ovlivnění choroby. Momentálně však zůstává nepodcenitelným základem při diagnostice a vedení léčby vytvoření optimální, fungující, pro všechny zúčastněné přínosné a někdy těžko dosažitelné vzájemné spolupráce mezi pacientem, praktickým lékařem a odborným lékařem ⁽²⁾.

3.1.8.3 Novinky v léčbě astmatu

V současné době je v různé fázi výzkumu na 160 látek, které by mohly přispět k rozšíření stávající palety antiastmatik. Nejčastěji se jedná o nové fixní kombinace látek nebo o látky ze skupiny inhibitorů fosfodiesterázy 4, která byla popsána teprve nedávno. Inovaci představují molekuly s duálním mechanismem účinku- tzv. M3 antagonisté/ β_2 -agonisté (MABA). Z těchto nových látek byla v nedávné době na trh uvedena fixní kombinace fluticason propionát + formoterol fumarát (FLUTIFORM) nebo je možno se setkat s novou látkou roflumilastem (DAXAS). Novou kombinací látek přináší také přípravek RELVAR ELLIPTA, kde se jedná o kombinaci inhalačního kortikosteroidu (fluticason furoát) a ultradlouhodobě působícího β antagonisty (vilanterolu). Jeho výhodou je synergické působení obou molekul a 24hodinový účinek⁽²⁹⁾. V klinickém vývoji se také nalézá mometason furoát v kombinaci s indacaterolem- látkou, která je zástupcem ultradlouze působících β_2 mimetik, které byly do klinické praxe uvedeny teprve nedávno. Do této skupiny látek můžeme dále zařadit i další nadějně molekuly- carmoterol, milveterol, GSK-642444, BI-1744-CL, LAS-100977 nebo PF-00610355.

Výzkum je veden i směrem k ovlivnění imunokompetentních buněk. Jako významné se jeví ovlivnění aktivity mastocytů, inhibice účinku imunoglobulinu IgE a TNF α . Nedávno byla do praxe s nadějí uvedena humanizovaná monoklonální protilátka proti IgE – omalizumab. Přestože se jedná o velmi nadějnou látku v terapii, stávající vysoká cena léku neumožňuje jeho širší využití. Na trh se nově dostalo i vůbec první non-inhalační léčivo k léčbě těžké formy astmatu mepolizumab (u nás dosud neregistrovaný lék NUCALA nebo MEPOLIZUMAB), což je rovněž humanizovaná monoklonální protilátka IgG proti interleukinu IL- 5, který má hlavní účinek v stimulaci dozrávání, diferenciace, mobilizace, aktivace a životnosti eozinofilů. Proto se počítá s jeho využitím i v léčbě hypereozinofilního syndromu⁽³⁰⁾. Na interleukiny rovněž působí antagonisticky rekombinantní protein pitakinra, jehož účinkem je duální antagonismus interleukinů IL- 4 a IL- 13, což má za následek omezení činnosti Th2 lymfocytů. Antagonisticky proti IL- 9 působí i další humanizovaná monoklonální protilátka MEDI-528, jejíž profil je analogický jako pitakinra. Studie probíhají i s další monoklonální protilátkou a zároveň inhibitorem IL 13 lebrikizumabem⁽³⁰⁾.

Pozitivní informace se objevují také o molekule tranilastu, která byla popsána již v 80. letech a která také inhibuje aktivaci mastocytů a působí rovněž proti fibrotizaci tkáně.

I ve skupině methylxantinů, kde je hlavní zástupce teofylin s velkým množstvím nežádoucích účinků, se objevují novinky. Naději skýtá doxofylin, který má s teofylinem srovnatelný účinek a zároveň daleko lepší bezpečnostní profil. Mezi antagonisty leukotrienových receptorů nacházíme pranlukast nebo nový inhibitor 5- lipooxygenázy, kterým je vedle zileutonu také látka s označením PF-4191834 ⁽⁸⁾.

3.2 ADHATODA



Obrázek 1: *Justicia adhatoda*

ČELEĎ - Acanthaceae- pryskyřníkovité

ROD - Adhatoda (nesměna)

DRUH - Adhatoda vasica (nesměna léčivá)

SYNONYMUM - *Justicia adhatoda*, *Adhatoda zeylanica*

ALTERNATIVNÍ ČESKÁ JMÉNA - nesměna cévnatá, adhatoda vasica, adathoda léčivá, vasaka, adhatoda, vasa, adulsa

JAZYKOVÁ VARIANTA - Malabar nut ⁽¹²⁾

3.2.1 Popis rostliny

Keř může dorůst výšky od 1 do 2,5 metru. Listy jsou dlouhé 10-16 cm, drobně pýřité a široce kopinaté. Po usušení chutnají nahořkle, mají nahnědle zelenou barvu a voní po čaji. Květenství je husté, stopkaté, koruna je velká a bílá s fialovým pruhováním na spodním okraji. Plodem jsou malé tobolky se 4 semeny. ^(18,27,28,22)

3.2.2 Výskyt

Tento divoce rostoucí stálezelený keř je možno nalézt v tropických oblastech jihovýchodní Asie ⁽⁴⁾. Objevuje se tak především v oblasti Srí Lanky, Nepálu, Indie, Pakistánu, Indonésie, Malajsie, Číny nebo Panamy ⁽¹⁷⁾

3.2.3 Rostlinné drogy

K léčebným účelům se používají zejména kořeny, plody a květy.

3.2.4 Obsahové látky

Biologicky aktivními a nejdůležitějšími látkami jsou hlavně alkaloidy, z nichž nejvýznamnější je vasicin (získaný z listů), dále rostlina obsahuje 2- hydroxy- 4- glukosyloxychalcon, vasicol (z listů), oxidační produkt vasicinu vasicinon (z listů, stonků a kořenů), vasicinol (ve stoncích a kořenech) a deoxyvasicinon (v listech), dále pak rostlina obsahuje vitamin C, karotenoidy a silice ⁽⁴⁾. V přírodě existuje větší množství morfortypů této rostliny, které se mimo jiné liší i obsahem vasicinu. Bylo zjištěno, že obsah účinných látek v rostlině kolísá v průběhu roku. Přestože je tato rostlina používána již tisíce let, stále není přesně znám molekulární mechanismus působení v lidském těle ^(13,28,22).

Molekula **vasicinu** byla poprvé izolována v roce 1924 Senem a Ghosem a velká pozornost ji byla věnována hlavně v letech 1960-1980. Ve svém přirozeném stavu je molekula opticky aktivní, při extrakci dostaneme racemické formy ⁽¹³⁾. Vasicin je totožný s alkaloidem peganinem získaným z *Peganum harmala* (syrská ruta vytrvalá), která je zdrojem halucinogenních harmalinových alkaloidů. Strukturou se jedná o tricyklické deriváty chinazolinu. ⁽²³⁾

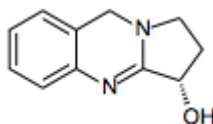
3.2.5 Využití

Zejména v Indii je tato rostlina používána v lidovém léčitelství již přes 2000 let jako bronchodilatační a expektorační prostředek při respiračních onemocněních. Farmaceutický průmysl užívá tuto rostlinu pro výrobu přípravků, které příznivě ovlivňují fyziologické funkce plic a dýchacích cest, chrání plíce před nepříznivým vlivem znečištěného vnějšího prostředí a před alergeny, při rýmě a nachlazení pomáhá uvolňovat dýchací cesty, snižuje viskozitu bronchiálního hlenu a usnadňuje vykašlávání ^(5,27). Vasicin dále vykazuje antioxidační, hepatoprotektivní, antidiabetickou a protizánětlivou aktivitu ^(13,28,22). Vlastní mechanismus příznivého účinku na respirační trakt spočívá v tom, že účinné látky fungují jako kompetitivní antagonisté inhibující účinky acetylcholinu na presynaptické membráně nervových zakončení vláken bloudivého nervu v dýchacích cestách. Tím dochází k relaxaci hladké svaloviny dýchacích cest, k jejich uvolnění a ke zvýšení sekrece hlenu ⁽⁵⁾.

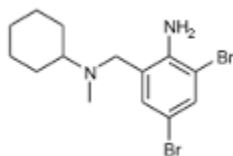
Vasicin je rovněž silným stimulantem respirace, má trombopoetické a uterotonické účinky a vykazuje středně silnou hypotenzní aktivitu. Uterotonická aktivita je vyvolána především potenciací prostaglandinu.⁽²²⁾

Tato rostlina byla rovněž zkoumána jako antitusikum na morčatech a králících. Kašel byl u zvířat vyvolán mechanicky, chemicky a elektricky. Po i. v. podání byl účinek na kašel způsobený mechanicky a elektricky nižší než u kodeinu, po p. o. podání u elektricky navozeného kašle byl účinek obou látek srovnatelný⁽⁴⁾. Adhatoda byla rovněž zahrnuta do výzkumu bylinné směsi, skládající se ze čtyř dalších rostlin, která dostala název Pentapala 04. Její účinky byly zkoušeny na potkanech kmene Wistar a potvrdily možný antioxidační potenciál v plicích a tudíž i možný efekt v léčbě astmatu.⁽²⁴⁾

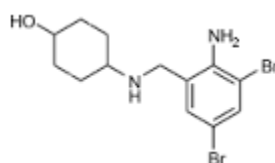
Látky s podobnou strukturou jsou ovšem také ambroxol a bromhexin, tedy látky, které našly uplatnění v humánní medicíně jako účinná mukolytika⁽⁵⁾.



Obrázek 2: Vasicin



Obrázek 3: Bromhexin



Obrázek 4: Ambroxol

3.2.6 Sloučeniny

Sloučeniny, které jsou připraveny chemickou modifikací molekuly vasicinu rovněž inhibují degranulaci žírných buněk a mají tudíž silný bronchodilatační a antialergický účinek. V posledních letech proběhly studie zkoumající využití nejen samostatné rostliny (popřípadě jejich izolovaných frakcí), ale také modifikovaných

účinných látek. Již zmíněné alkaloidy při nich vykazovaly protizánětlivý účinek, který je srovnatelný s účinkem hydrokortizonu.

6, 7, 8, 9, 10, 12 - hexahydroazepin - [2, 1-b] - chinazolin - 12 - on (označovaný jako **RLX**) je sloučenina, která byla získána chemickou modifikací vasicinu a u níž byly zkoumány bronchodilatační účinky. Tato látka inhibuje degranulaci žírných buněk a tedy uvolňování histaminu, snižuje aktivitu cAMP fosfodiesterázy a lipooxygenázy a inhibuje vychytávání vápníku. Účinky dokazují, že působí dlouhodobě a srovnatelně s kromoglykátlem sodným a aminofylinem.

Další modifikací je **2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on**, známý jako **95-4**. Sloučenina opět vykazuje bronchodilatační účinky. Zjistilo se, že má silnější relaxační účinek na hladký sval než teofylín, ale slabší účinek než salbutamol v základní dávce ^(16,25)

4 CÍL PRÁCE

In vitro stanovit relaxační aktivitu dvou strukturálních obměn chinazolinových alkaloidů (VN 004 a VN 009) na hladké svalovině izolované průdušnice potkana.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 POUŽITÝ MATERIÁL

5.1.1 Chemikálie

Tabulka 1: Použité chemikálie

Název	Vzorec	Výrobce	MW
Theophylline, anhydrosus, minimum 99%	Neuveden na obalu	Sigma-Aldrich chemie Germany	180,17
Carbamoylcholine chloride, 99%	Neuveden na obalu	Sigma-Aldrich chemie Germany	182,65
Chlorid sodný p.a.	NaCl	Penta Chrudim, Česká republika	58,44
Chlorid draselný p.a.	KCl	Penta Chrudim, Česká republika	74,56
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO ₃	Penta Chrudim, Česká republika	84,01
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH ₂ PO ₄	RNDr. Jan Kulich	136,09
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO ₄ · 7H ₂ O	Penta Chrudim, Česká republika	246,47
Chlorid vápenatý bezvodý práškový p.a.	CaCl ₂	Penta Chrudim, Česká republika	110,99

D- glukosa monohydrát p.a.	$C_{16}H_{12}O_6 \cdot H_2O$	Penta Chrudim, Česká republika	198,17
Carbamoylcholine chloride, 99%	Neuveden na obalu	Sigma-Aldrich chemie Germany	182,65

5.1.2 Přístroje a pomůcky

laboratorní váhy Kern

termostat

plynová bomba s pneumoxidem – směs 95% O₂ a 5% CO₂ (Linde gas)

laboratorní sklo

operační nástroje (pean, nůžky, pinzety)

aparatura na izolované orgány (Multi chamber tissue bath system, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko) s vyhodnocovacím Software (S.P.E.L. Advanced Kymograph Software, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko)



Obrázek 5: Aparatura na izolované orgány spolu s vyhodnocovacím softwarem

5.1.3 Pokusná zvířata

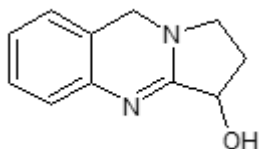
Experimenty byly prováděny na potkanech kmenu Wistar, samcích o hmotnosti 250 – 300 g, kteří pocházeli z BioTestu s.r.o. Konárovice a kteří byli rozděleni do náhodných skupin. Zvířata byla před pokusem adaptována nejméně 7 dní ve viváriu FaF UK. Zde byla chována za standardních laboratorních podmínek - krmena standardní peletizovanou potravou s přístupem k pitné vodě ad libitum. Před experimentem byla zvířata vždy ponechána 24 hodin nalačno.

Pokusy byly prováděny 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.

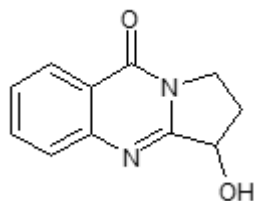
5.1.4 Testované látky

Testované látky byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a jako výchozí struktura byl použit 4-hydroxychinazolin. ⁽²¹⁾

Testovali jsme látky odvozené od vasicinu s vasicinonu:

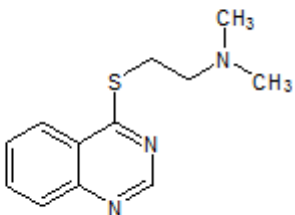
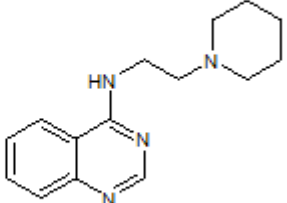


Obrázek 6: Vasicin



Obrázek 7: Vasicinon

Námi testované látky:

DERIVÁT CHINAZOLINU S ETYLSULFANYLOVÝM FRAGMENTEM		
VN 004 4-dimetylaminoethylsulfanylchinazolin	$M_R = 233,33$	
DERIVÁT CHINAZOLINU S ETYLAMINOVÝM FRAGMENTEM		
VN 009 (<i>N</i> -[2-(piperidin-1-yl)etyl]chinazolin-4-amin)	$M_R = 256,35$	

5.2 METODIKA

5.2.1 Příprava Krebs-Henseleitova roztoku:

Navážené substance (viz tabulka 2) jsme odděleně rozpustili v destilované vodě a následně smíchali. Nakonec jsme do téměř hotového roztoku přidali chlorid vápenatý, abychom zabránili vysrážení slabě nerozpustných vápenatých solí. Roztok jsme pak doplnili destilovanou vodou na požadovaný objem.

Tabulka 2: Složení Krebs-Henseleitova roztoku (g/l)

Látka	Množství [g/l]
NaCl	6,8
KCl	0,35
CaCl ₂ bezvodý	0,28
NaHCO ₃	2,1
KH ₂ PO ₄	0,14
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,29
Glukóza	2,0

5.2.2 Provedení pokusu

Vybraného jedince potkana, kterého jsme krátce před pokusem usmrtili exsanguinací, jsme fixovali na operační stůl a po odstříhnutí kožní řasy v oblasti krku jsme započali s preparací trachey. Tu jsem obnažili a oddělili ji od přilehlých částí dýchací soustavy v oblasti bifurkace. Následně jsme ji vertikálně rozstříhli středem podkovovitých chrupavek. Tímto způsobem jsme získali asi dvoucentimetrový úsek trachey, který jsme ihned po preparaci urychleně přemístili do Krebs-Henseleitova roztoku.

V roztoku jsme průdušnici očistili od zbývající pojivové tkáně a následně jsme tracheu upravili tak, aby byla hladká svalovina ve středu preparátu. Bylo nutno tracheu rozstříhnout tak, abychom získali 4 testovací proužky. Závěsné ligatury jsme umístili na protilehlých stranách tracheálního proužku a takto preparát zavěsili do lázně na izolovaný orgán. Nádobka obsahovala 5 ml Krebs-Henseleitova roztoku, zahřátého na 37 °C a pro dodržení fyziologických podmínek byl do nádoby vhněn pneumoxid (95% O₂ a 5% CO₂).

Celý průběh experimentu od kalibrace (byla provedena před umístěním preparátu do nádoby) až po výsledný grafický výstup řídil počítač se speciálním softwarem (S.P.E.L. Advanced Kymograph Software), který je výstupním zařízením aparatury (Multi chamber tissue bath system).

Před samotným měřením bylo třeba provést stabilizaci preparátu. Ten jsme nejprve zatížili 2,5 g a nechali 30 minut stabilizovat, přičemž bylo důležité provádět co 10 minut výplach živného roztoku. Po dané době jsme snížili zátěž na 1 g a vyčkali, dokud se křivka neustálila.

Před samotným testováním bylo nejprve potřeba vyvolat kontrakci potkaní trachey a poté sledovat, do jaké míry mají námi testované látky schopnost její hladkou svalovinu relaxovat. Kontrakci jsme vyvolali přidáním 50 μ l roztoku carbacholu (10^{-3} M), takže výsledná koncentrace v roztoku byla 10^{-5} M.

Druhá aplikace carbacholu bývá zpravidla výraznější, proto jsme po aplikaci první dávky provedli výplach a po stabilizaci křivky jsme aplikovali dávku druhou. Po maximální kontrakci preparátu (která se v záznamu projeví vodorovnou linií) jsme začali aplikovat jednotlivé kumulativní dávky námi testovaných látek. Vždy bylo ale třeba počkat, až se křivka po předešlé aplikaci dané koncentrace ustálí. Aplikace probíhala pomocí mikropipet v dávkách : 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 5×10^{-5} M, $7,5 \times 10^{-5}$ M, 10^{-4} M, $2,5 \times 10^{-4}$ M, 5×10^{-4} M, $7,5 \times 10^{-4}$ M.

Po podání všech dávek jsme navodili maximální relaxaci hladké tracheální svaloviny theofylinem v dávce 10^{-2} M.

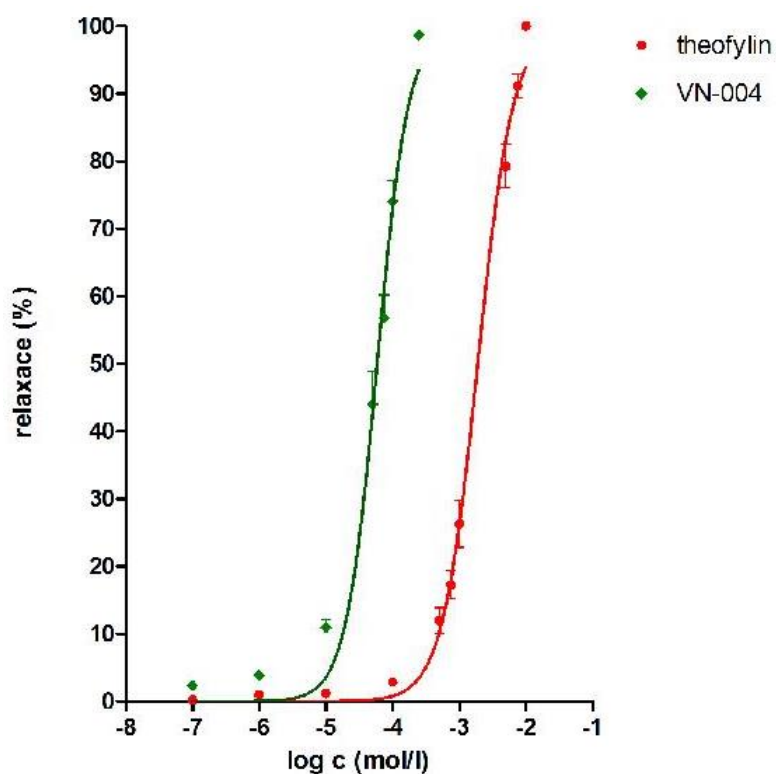
Relaxační účinek každé koncentrace testované látky jsme vyjádřili jako procentuální změnu v poměru k maximální relaxaci navozené theofylinem. Získané hodnoty jsme zpracovali v programu GraphPad Prism 5. Metodou nelineární regrese byly získány DRC křivky a hodnoty ED_{50} pro látky VN 004 a VN 009. Křivku pro theofylin včetně hodnoty ED_{50} jsme převzali z diplomové práce. ⁽¹⁹⁾ Hodnotou ED_{50} , která je označována někdy také jako tzv. "střední účinná dávka", rozumíme dávku, která vyvolá léčebný účinek u 50 % populace.

Získané hodnoty byly analyzovány pomocí one-way ANOVA testu. Rozdíly byly považovány za signifikantní, pokud $p < 0,05$.

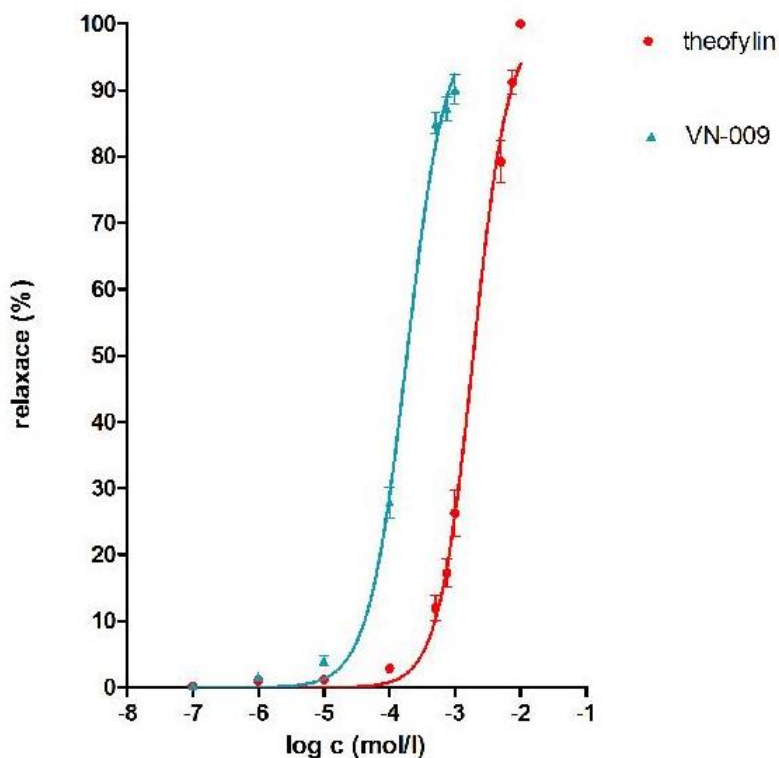
6 VÝSLEDKY

U testovaných látek VN 004 a VN 009 jsme zjišťovali jejich schopnost in vitro relaxovat hladkou svalovinu potkaní trachey. Relaxační účinek každé dávky jsme vyjádřili jako procento z maximální relaxace, kterou navodil theofylin. K porovnání účinnosti nových látek se jako standard zpravidla používá theofylin, který má výrazný bronchodilatační efekt. Pokud jsou křivky posunuty více doleva, vykazuje testovaná látka větší relaxační účinek než theofylin.

Obě zkoumané substance VN 004 a VN 009 relaxovaly hladkou svalovinu průdušnice prekontrahovanou karbacholem (10^{-5} M). Po kumulativním dávkování látky VN 009 byl zaznamenán relaxační potenciál na izolované potkaní tracheu oproti standardní látce theofylinu (obrázek 9). Z průběhu DRC křivky pro další testovanou látku VN 004 je patrný ještě výraznější relaxační účinek oproti standardu (obrázek 8).



Obrázek 8: Relaxační účinek derivátu chinazolinu s ethylsulfanylovým fragmentem v porovnání s theofylinem



Obrázek 9: Relaxační účinek derivátu chinazolinu s etylaminovým fragmentem v porovnání s theofylinem

Obě hodnoty ED₅₀ testovaných látek byly signifikantně rozdílné od standardu theofylinu (tabulka 3). Na základě porovnání hodnot ED₅₀ vyplývá, že derivát s ethylaminovým fragmentem VN 009 byl méně účinným derivátem, nicméně i tak vykazoval větší aktivitu ve srovnání s theofylinem (tabulka 4). Naopak silnější relaxační účinek vykázal druhý z derivátů s ethylsulfanylovým fragmentem VN 004, jehož hodnota ED₅₀ byla 32,5 krát nižší než hodnota ED₅₀ theofylinu (tabulka 5).

Tabulka 3: hodnota ED 50 standardní látky-theofylin

Theofylin	ED50 ± SEM	
n = 24	[μmol/l]	1888 ± 72

Tabulka 4: hodnota ED 50 testované látky VN 009

Derivát chinazolinu s etylaminovým fragmentem		ED ₅₀ ± SEM [μmol/l]	ED ₅₀ je signifikantní vůči teofylinu <i>P</i> <0,05
VN 009 n = 8	(<i>N</i> -[2-(piperidin-1-yl)etyl]chinazolin-4-amin)	186 ± 18	ano

Tabulka 5: Hodnota ED50 testované látky VN 004

Derivát chinazolinu s etylsulfanylovým fragmentem		ED ₅₀ ± SEM [μmol/l]	ED ₅₀ je signifikantní vůči teofylinu <i>P</i> <0,05
VN 004 n = 8	4 - dimetylaminoethylsulfanylchinazolin	58 ± 2,7	ano

7 DISKUZE

Justicia adhatoda je divoce rostoucí stálezelený keř, který nalezneme v tropických oblastech jihovýchodní Asie ⁽⁴⁾. V ayjurvédské medicíně je využíván už několik stovek let jako bronchodilatační a expektorační prostředek při respiračních onemocněních.

Současný farmaceutický průmysl užívá tuto rostlinu pro výrobu přípravků, které příznivě ovlivňují fyziologické funkce plic a dýchacích cest, chrání plíce před nepříznivým vlivem znečištěného vnějšího prostředí a před alergeny, při rýmě a nachlazení pomáhá uvolňovat dýchací cesty, snižuje viskozitu bronchiálního hlenu a usnadňuje vykašlávání ⁽⁵⁾. Za nejvýznamnější účinnou látku je považován chinazolinový alkaloid vasicin ⁽¹⁴⁾.

Na základě toho, že jsou námi testované látky odvozeny od derivátů vasicinu, což je jeden z hlavních alkaloidů výše zmíněné rostliny, jsme předpokládali, že by i tyto látky mohly vykazovat bronchodilatační účinek. Tyto látky byly testovány na izolované průdušnici potkana, která byla před samotným měřením kontrahována roztokem karcholu. Získané hodnoty byly porovnány se standardem, kterým je v tomto případě theofylin. Námi testované syntetické deriváty chinazolinu vykazovaly na izolované průdušnici potkana relaxační efekt. Derivát s ethylaminovým fragmentem VN 009 byl méně účinným derivátem, nicméně i tak vykazoval větší aktivitu než v případě standardu theofylinu. Naopak silnější relaxační účinek vykázal druhý z derivátů s ethylsulfanylovým fragmentem VN 004, kdy zavedení ethylsulfanylové skupiny do molekuly vedlo k posílení relaxační aktivity. Právě intenzivním zkoumáním strukturálních obměn bylo zjištěno, že pro posílení relaxačního efektu je u 5-alkyl substituovaných sloučenin vhodná substituce halogenem popřípadě dalším alkylovým řetězcem ⁽²⁰⁾.

Na základě bronchodilatačního potenciálu Adhatody se vědci snaží syntetizovat molekuly podobné vasicinu a ukazuje se, že právě touto cestou by se mohly do budoucna ubírat další kroky odborníků a některá z těchto látek by snad mohla najít v terapii astmatu trvalé uplatnění. ⁽²⁶⁾ Stále je však nutno také zpřesnit mechanismus působení v organismu, protože stále není přesně jasné, zda se na účinku podílí jen muskarinový efekt nebo zda do procesů zasahují i β receptory ⁽²⁰⁾.

Dosud se povedlo nasyntetizovat mnoho jiných derivátů chinazolinových derivátů- podobnost s vasicinem vykazuje v současnosti jedno z nejpoužívanějších expetorancií bromhexin a jeho metabolit ambroxol, který byl do praxe zaveden v polovině 60 let. ⁽¹⁴⁾ Ambroxol v respiračním traktu podporuje sekreci hlenu, zvyšuje tvorbu plicního surfaktantu a stimuluje činnost řasinek, čímž zlepšuje mukociliární clearance. Ambroxol rovněž podporuje penetraci antibiotik do plicní tkáně, podílí se na snižování bronchiální hyperreakivity a zvyšuje sekreci IgA do bronchiálního sekretu ⁽¹⁵⁾.

VN 004 a VN 009 patří do skupiny látek (deriváty chinazolinu a chinaxolinu) připravených na Katedře anorganické a organické chemie. Z nich mnohé byly již otestovány na modelu izolované průdušnice a vykazují větší aktivitu než mateřský alkaloid vasicin a standardní léčivo theofylin. Kromě toho provedené in vitro a in vivo toxicitní studie naznačují, že se jedná o perspektivní skupinu potenciálních bronchodilatancí ⁽²¹⁾.

8 ZÁVĚR

V předkládané rigorózní práci jsme in vitro metodou izolované průdušnice stanovovali relaxační aktivitu dvou syntetických látek VN 004 (4-dimetylaminoethylsulfanylchinazolin) a VN 009 (*N*-[2-(piperidin-1-yl)ethyl]chinazolin-4-amin).

Získaná data jsme porovnali s relaxačním potenciálem theofylinu, který se používá pro svůj bronchodilatační efekt jako standard.

Z dosažených výsledků vyplývá:

- 1) Obě testované látky VN 004 a VN 009 odvozené od alkaloidu vasicinu navozují relaxaci hladké svaloviny průdušnice z potkana in vitro
- 2) Derivát VN 004 (s ethylsulfanylovým fragmentem) je účinnější než derivát VN 009 (s ethylaminovým fragmentem)
- 3) Obě látky mají statisticky významný silnější relaxační účinek v porovnání se standardní látkou – theofylinem

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Remedia compendium. 4. vyd. Praha: Panax, 2009:157-171
2. Bártů, V. *Novinky a trendy v léčbě asthma bronchiale*. Lékařské listy 2010;16:24-26
3. Kottová, M., Vopršalová, M., Pourová, J. *Farmakoterapie asthma bronchiale*. Praktické lékárenství 2008;4:116-122
4. www.avicenna.cz/item/adhatoda-vasica/category/rostliny [cit. 2012-05-16]
5. www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=369 [cit. 2012-05-16]
6. Kašák, V. *Kontrola astmatu a exacerbací*. Lékařské listy 2010;1:6-9
7. Vrátná Sandra. *Chronická obstrukční plicní nemoc a její léčba*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2011:47 s.,51 s.,55 s.
8. Slíva, J. *Nová image antiastmatik*. Edukafarm-Farmi news 2010;2:6
9. Mazáková, H. *Léčba alergií a astmatu*. Jaro a léto v ordinaci a lékárně (příloha časopisu Praktické lékárenství) ;2010,11-21
10. Sedlák, V. *Nové klinické zkušenosti s léčbou těžkého astmatu anti-IgE protilátkou (omalizumabem)*. Farmakoterapie 2009;1:59-64
11. Kašák, V. *Klinický význam konceptu tíže a kontroly astmatu*. Farmakoterapie 2009;1:47-53
12. <http://botany.cz/cs/justicia-adhatoda/> [cit. 2012-05-16]
13. Rachana, Basu Sujata, Pant Mamta, Kumar Manoj Priyanka and Saluja Sonam. *Rewiev ▫ Future Perspectives of Using Vasicine, and Related Compounds*. Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences 2011;Vol 1.,Issue 1:85-98
14. www.edukafarm.cz/data/soubory/casopisy/20/07-pohled_farmakologa.pdf [cit. 2013-03-21]
15. www.tribune.cz/clanek/25939-ambroxol-nejen-účinné-mukolytikum [cit. 2013-03-21]
16. Pramuková Zuzana. *Porovnanie účinku látok (VN 008 a VN 014) zo skupiny derivátov chinazolínu na modeli izolovanej priedušnice*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2013:51 s.

17. www.celostnimediceina.cz/adhatoda-vasica.htm [citováno 2012-05-16]
18. www.iloveindia.com/indian-herbs/adhatoda-vasica.html [cit. 2012-05-16]
19. Schmidtová Barbora. *Hodnocení účinků bronchoprotektivních látek*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2009:70 s.
20. Bahekar RH, Rao AR. *Bronchodilation and structure-activity relationship studies on new 6-substituted benzimidazol [1,2-c] quinazolines*. *Arzneimittel-Forschung* 2000;50(8):712-716
21. Špulák, M.,Pourová, J.,Vopršalová, M.,Mikušek, J.,Kuneš, J.,Vacek, J. *Novel bronchodilatory quinazolines and quinoxalines: Synthesis and biological evaluation*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014;74:65-72
22. Sayeed Ahmad,Madhukar Garg,Maksood Ali,Mhaveer Singh,Md Tanwir Athar and Shadid Husain Ansari. *A phyto-pharmakological overwiev on Adhatoda zeylanica Medic. syn A. vasica (Linn.)Ness*. *Natural Product Radiance* 2009;Vol. 8 (5):549-554
23. Kunal Nepali,Sahil Sharma,Ritu Ojha,Kanaya Lal Dhar. *Vasicine and structurally related quinazolines*. *Medicinal Chemisty Research* 2013;22:1-15
24. Srinivasa Rao.D, Indira A. Jayaaraj and R.Jayaaraj. *Antiasthmatic Role of "Pentapala -04" A Herbal Formulation Against Ova Albumin and Aluminium Hydroxide Induced Lung Damage in Rats*. *Ancient Science of Life* 2005;Vol: XXIV:134-142
25. Zabeer A. et al. *Synthesis and bronchodilator activity of new quinazolin derivative*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2006;41:429–434
26. Rajan Subramanian Kombu at al. *Synthesis and Bronchodilator Studies of Some Novel 6-Alkyl/Aryl-1,2,4- Triazino[4,3-c]Quinazolines*. *The Open Medicinal Chemistry Journal* 2008;2:101-111
27. <http://www.herbal-supplement-resource.com/adhatoda-vasica.html> [cit. 2012-05-16]
28. <http://www.ecoplanet.in/herbalextracts/Adhatodavasica.htm> [cit. 2012-05-16]
29. www.prolekare.cz/lecba-astmatu-novinky/relvar-ellipta-dve-nove-molekuly-v-lecbe-astmatu-bronchiale-a-chopn-4962 [cit. 2016-01-23]
30. www.aifp.cz/cs/o-nas/napsali-o-nas/aktuality-v-lecbe-astmatu-co-rikaji-soucasne-klinicke-studie/ [cit. 2016-01-23]