

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmakologie a toxikologie

**SLEDOVÁNÍ ÚČINKU DERIVÁTŮ
CHINAZOLINU NA IZOLOVANÉ
PRŮDUŠNICI POTKANA**

(Rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Marie Vopršálová, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2010

Mgr. Lucie VALÍČKOVÁ

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

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala PharmDr. Marie Vopršálové, CSc. za pomoc při tvoření této práce, cenné rady, připomínky a množství času, které mi věnovala.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| Obsah..... | 3 |
| Seznam zkratek..... | 5 |
| 1. Úvod a cíl práce..... | 6 |
| 2. Teoretická část..... | 7 |
| <u>2.1 Asthma bronchiale a jeho současná terapie.....</u> | <u>7</u> |
| 2.1.1 Patogeneze..... | 7 |
| 2.1.2 Základní cíle léčby astma bronchiale..... | 9 |
| 2.1.3 Terapie astma bronchiale..... | 11 |
| 2.1.4 Lékové formy a způsob aplikace antiastmatik..... | 12 |
| 2.1.5 Úlevová léčiva (léčiva s bronchodilatačním účinkem)..... | 12 |
| 2.1.6 Léčiva kontrolující astma (léčiva s protizánětlivým účinkem)..... | 14 |
| <u>2.2 Justicia adhatoda a její obsahové látky.....</u> | <u>18</u> |
| <u>2.3 Deriváty chinazolinu a jejich účinky.....</u> | <u>22</u> |
| 2.3.1 Deriváty chinazolinu vykazující bronchodilatační aktivitu..... | 23 |
| <u>2.4 Laboratorní potkan - dýchací ústrojí.....</u> | <u>28</u> |
| 3. Experimentální část..... | 31 |
| <u>3.1 Použitý materiál.....</u> | <u>31</u> |
| 3.1.1 Chemikálie..... | 31 |
| 3.1.2 Pomůcky a přístroje..... | 31 |
| 3.1.3 Pokusná zvířata..... | 32 |
| 3.1.4 Testované látky..... | 32 |
| <u>3.2 Metodika.....</u> | <u>33</u> |
| 3.2.1 Příprava roztoků..... | 33 |
| 3.2.1.1. Příprava Krebs – Henseleitova roztoku..... | 33 |
| 3.2.1.2 Příprava roztoku carbacholu..... | 33 |
| 3.2.1.3 Příprava roztoku teofylinu..... | 34 |
| 3.2.1.4 Příprava roztoků testovaných látek pro kumulativní dávkování..... | 34 |
| 3.2.2 Provedení pokusů..... | 34 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| 4. Výsledky | 36 |
| <u>4.1 VN-011</u> | 36 |
| <u>4.2. VN-013</u> | 38 |
| 5. Diskuze | 41 |
| 6. Závěr | 43 |
| 7. Seznam literatury | 44 |
| Abstrakt | |

SEZNAM ZKRATEK

| | |
|---------------------------------------|--|
| MW | molekulová hmotnost |
| označ. | označení |
| NaCl | chlorid sodný |
| KCl | chlorid draselný |
| NaHCO ₃ | hydrogenuhličitan sodný |
| KH ₂ PO ₄ | dihydrogenfosforečnan draselný |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | síran hořečnatý heptahydrát |
| CaCl ₂ | chlorid vápenatý |
| KH | Krebs – Henseleitův |
| VN-011 | 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethoxy]chinazolin |
| VN-013 | 4-(2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl)chinazolin |
| p.o. | perorální |
| PGE | Prostaglandin E |
| Ach | acetylcholin |
| H | histamin |

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Astma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají svou roli mnohé buňky a buněčné částice. Je spojeno s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudníku a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní, buď spontánně, nebo vlivem léčby (20).

Astma postihuje osoby všech věkových kategorií, nelze je vyléčit a ani mu nelze účinně předcházet. V České republice je odhadovaná prevalence 8%, mortalita je tradičně velmi nízká, za posledních pět let se pohybuje kolem 100 osob za rok (20).

Hledání nových léčiv je jedním z hlavních úkolů výzkumu a vývoje v oblasti farmacie. Vychází jak z empirických tak faktických poznatků a umožňuje medicíně získávat nové způsoby léčby a zlepšení lékařské péče v podobě kvalitnějších a modernějších léčiv.

V předkládané práci jsem se zaměřila na sledování účinku derivátů chinazolinu, u kterých se předpokládá bronchodilatační účinek. Tyto látky byly syntetizovány na katedře organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, předlohou pro ně se stala struktura chinazolinových alkaloidů. Tyto alkaloidy (vasicin a vasicinon) jsou obsaženy v indické rostlině *Justicia adhatoda* (syn. *Adhatoda vasica*) a vykazují bronchodilatační účinek.

Cílem předkládané práce bylo:

- 1) zjistit účinky vybraných synteticky získaných derivátů vasicinonu na hladkou svalovinu průdušnice potkana, a to látek VN-011 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etoxy] chinazolinu a VN-013 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsufanyl] chinazolinu
- 2) porovnat relaxační aktivitu testovaných látek se standardním léčivem theofylinem

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Astma bronchiale a jeho současná terapie

Astma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění respiračního systému. Jeho hlavními znaky jsou zvýšená reaktivita dýchacích cest na různé podněty, následné ataky záchvatovité dušnosti doprovázející náhlé zúžení průdušek (bronchospasmus) a kašel (21).

Stimuly vyvolávající astmatický záchvat jsou různorodé. Mohou to být alergen, respirační infekce, poškození bronchů inhalovanými škodlivinami, látky znečišťující životní prostředí, ale i chlad (inhalace studeného vzduchu, ochlazení bronchů zrychlenou ventilací jako příčina tzv. astmatu z námahy), farmaka (β -sympatolytika, NSAID), námaha a stres (19,21,25).

2.1.1 Patogeneze

Astma rozdělujeme na typ extrinsic (alergické astma vyvolané alergenem) a typ intrinsic (nealergické bez známého podnětu). V případě alergického astmatu dojde nejprve k senzitivizaci pacienta při prvním setkání s alergenem (např. pyl, prachové částice v bytě, proteiny z roztočů). Ta spočívá v aktivaci podskupiny lymfocytů T_H2 , které pak vytváří B-buňky aktivující cytokiny, což vede k produkci a uvolňování imunoglobulinu E. Kromě toho vznikají také interleukiny, které podporují diferenciaci a aktivaci eosinofilů a indukují expresi IgE-receptorů hlavně na mastocytech a dále také na eozinofilech a makrofágách. IgE se naváže na své receptory na povrchu buněk a organismus je takto připraven na další setkání s alergenem (19,21,25).

U astmatu na alergickém podkladu vazba alergenu na IgE na mastocytech vede dále k uvolnění celé řady mediátorů zánětu. Ty způsobují mj. vazodilataci, zvýšenou cévní permeabilitu a adhezivitu endotelu, což umožní vyšší migraci lymfocytů, eosinofilů a makrofágů, které jsou dalším zdrojem uvolňování zánětlivých mediátorů. Pro započetí zánětlivé reakce je důležitý IL-1. Celý systém je tak připraven a následná další expozice alergenem nebo noxe vyvolá odpověď, která může vyústit až v astmatický záchvat (25).

V časně fázi astmatického záchvatu, která nastává rychle, dochází ke spasmu hladkých svalů bronchů. Základem je navázání antigenu na IgE na povrchu mastocytů, eozinofilů a mikrofágů. Vznik komplexu antigenu a protilátky vede k uvolnění nitrobuňečných zásob celé řady mediátorů (histamin, spasmogenně působící peptidy, leukotrieny B₄, C₄, D₄, prostangladiny D₂ a F_{2α} a tromboxan A₂), které mají spasmogenní účinky a způsobují okamžitou kontrakci hladkých svalů dýchacích cest – **bronchokonstrikci** (21,25).

Pozdní fáze nastává v různé době po expozici alergenem a často bývá noční. Jde v podstatě o rozvíjející se zánětlivou reakci, jejíž začátek nastal již v průběhu časně fáze. Řada z mediátorů časně reakce má kromě bronchokonstrikčních i **chemotaktické účinky**. Díky nim dochází k infiltraci dalších buněk do dýchacích cest a jejich aktivaci, zejména specificky aktivovanými T_{H2} lymfocyty, eosinofily a neutrofilů, jejichž uvolněné mediátory vedou k **poškození a odlupování bronchiálního epitelu** (21,25).

Epitel dýchacích cest a mikrofágy představují první „obranou linii“ respiračního systému. Pomocí fagocytózy a pohybu řasinek odstraňují cizí vdechnuté částice a mikroorganismy. Kromě toho epiteliální buňky produkují PgE₂, která má inhibiční účinek na mastocyty a bronchiální hladký sval, a tak za normálních okolností brání přehnané reakci dýchacích cest (25).

Ztráta epitelových buněk způsobí, že epitel je více propustný pro bronchokonstrikční látky, méně chrání při nové expozici antigenu, je vnímavější k fyzikálním podnětům a produkuje méně PgE₂. Menší množství PgE₂ méně inhibuje mastocyty a ty uvolňují ze zásobních vehikul více mediátorů zánětu. Zároveň je sníženo i inhibiční působení PgE₂ na hladký sval, což dále usnadní bronchokonstrikci (25).

Poškozením bronchiálního epitelu se zvýší dostupnost nervových zakončení pro dráždivé podněty, což se podílí na vznikající hyperreaktivitě. Růstové faktory, uvolněné z infiltrujících buněk, působí na buňky hladkého svalu bronchů a vyvolávají hypertrofii a hyperplazii. Ukázalo se, že poškozený epitel sám uvolňuje některé mediátory, které přispívají k jeho další lézi. To posléze způsobuje zesílení bronchiální svaloviny, což se spolu s chronickými zánětlivými změnami podílí na zúžení průsvitu bronchů a **kontrakční i sekreční hyperreaktivitě** (21,25).

Stimulací nervových zakončení dochází k uvolnění mediátorů ze sensorických nervových zakončení. Jedná se o tachykininy (substance P, neurokinin A a B), které patří mezi hlavní mediátory excitačního neadrenergního-necholinergního systému (NANC), jež způsobuje bronchokonstrikci. Nervová zakončení tohoto systému se nacházejí v respiračním epitelu a nebo pod ním, po aktivaci se uvolňují zásoby mediátorů, které ovlivňují okolní tkáň – nastává **lokální axonový reflex**. Dochází ke kontrakci hladkých svalů dýchacích cest, dilataci cév a extravazaci plazmy, sekreci hlenu a zvýšení propustnosti epitelu. Kromě toho sensorické nervy inervují ganglia parasymptiku a tak uvolněné mediátory moduluji gangliovou transmissi. To vyústí v **gangliové reflexy**, které vyvolají cholinergní bronchokonstrikci (25).

Součástí inervace dýchacích cest je také cholinergní systém, který pokrývá celé dýchací cesty a sensorické vagové receptory jsou umístěny mezi buňkami epitelu a pod nimi. Výsledkem podráždění je **vagový reflex** a cholinergní bronchokonstrikce, kterou lze blokovat pomocí anticholinergních látek (25).

2.1.2 Základní cíle léčby astma bronchiale

Léčba astma bronchiale vyžaduje spolupráci pacienta i jeho nejbližšího okolí. Pacient musí být poučen o příčinách onemocnění a spouštěcích noxách, jichž se má pokud možno vyvarovat.

Obecně stanovené cíle terapie

- dosažení kontroly příznaků onemocnění a udržení bezpříznakového stavu
- prevence akutního zhoršení, které je charakterizováno projevy rozvinuté bronchiální obstrukce
- prevence možného úmrtí na akutní projevy a prevence zhoršení onemocnění
- prevence (a event. léčba) nežádoucích účinků použitých léčiv
- dobrá kvalita života

Reálným cílem diagnostických postupů musí být rychlé ověření diagnózy, aby následovalo co nejčasnější zahájení terapie a bylo dosaženo plné kompenzaci nemoci. Dobře kompenzované astma lze potom v praxi charakterizovat takto:

- žádné chronické příznaky (ani noční)

- co nejmenší počet akutních astmatických exacerbací
- není potřeba naléhavých návštěv u lékaře
- co nejmenší potřeba inhalačních „záchranných“ léčiv
- není potřeba omezení běžných životních aktivit (včetně tělesné zátěže)
- normální hodnoty plicních funkcí
- nejsou žádné projevy nežádoucích účinků léčiv (25)

Dělení bronchiálního astmatu podle stupně závažnosti

1. **Intermitentní astma:** příznaky se vyskytují nepravidelně, často v dlouhých intervalech, denní maximálně 1x týdně, noční nejvýše 2x měsíčně. Nemoc neovlivňuje kvalitu života, pacienta neomezuje, plicní funkce jsou (s výjimkou doby příznaků) v normě.
2. **Lehké perzistující astma:** denní příznaky se objevují častěji než 1x týdně, ale méně často než 1x denně, noční příznaky častěji než 2x měsíčně, aplikace úlevových léčiv je méně častá než 1x denně.
3. **Středně těžké perzistující astma:** denní příznaky se objevují každodenně, avšak nemají trvalý charakter, noční příznaky častěji než 1x týdně. Nemoc narušuje denní činnost pacienta i jeho spánek, aplikace úlevových léčiv je každodenní.
4. **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. Jsou přítomny trvalé známky obstrukce (18,25).

Tato klasifikace však nezohledňuje dostatečně variabilitu příznaků v čase (tíže astmatu se může v čase měnit) a zejména odpověď pacienta na léčbu. Proto vznikl nový dokument GINA (2006), který zavádí **klasifikaci astmatu podle úrovně jeho kontroly:**

1. **Astma je považováno za kontrolované,** pokud jsou přítomny všechny následující znaky: denní příznaky žádné (tj. maximálně 2x týdně), omezení aktivity žádné, noční příznaky žádné, potřeba úlevových léčiv žádná (tj. max. 2x týdně), plicní funkce normální, exacerbace astmatu žádná.
2. **Astma je považováno za částečně kontrolované,** pokud je přítomen kterýkoliv z těchto znaků: denní příznaky častější než 2x týdně, omezení aktivity jakékoliv,

noční příznaky jakékoliv, potřeba úlevových léčiv častější než 2x týdně, plicní funkce nižší než 80% náležité hodnoty nebo osobní nejlepší hodnoty, exacerbace astmatu jedna za rok nebo častější.

3. **Astma** je považováno za **nedostatečně kontrolované**, pokud jsou přítomny tři či více znaků částečné kontroly astmatu (18).

2.1.3 Terapie astma bronchiale

Farmakoterapie má **dva cíle**: za prvé zabránit hrozícímu nebo začínajícímu astmatickému záchvatu, případně jej zmírnit („**terapie záchvatu**“) a za druhé předejít vzniku záchvatů („**terapie v intervalu mezi záchvaty**“). Dosažení prvního cíle vyžaduje uvolnění bronchospasmů za použití **úlevových léčiv - bronchodilatancií**. K dosažení druhého cíle je nutno snížit citlivost bronchů. K tomu používáme **léčiva kontrolující astma - léčiva s protizánětlivým účinkem** (18,19).

Třístupňové úrovni kontroly nad astmatem odpovídá vedení léčby v pěti možných stupních (18):

1. stupeň, tj. **astma pod kontrolou** - β_2 -sympatomimetika s rychlým nástupem účinku jsou aplikovaná dle potřeby

2. stupeň, tj. **astma pod částečnou kontrolou** – na výběr je monoterapie

- a) nízkou dávkou inhalačního glukokortikoidu
- b) perorálně podávaným antileukotriem

3. stupeň, tj. **astma pod částečnou/nedostatečnou kontrolou** – na výběr je terapie:

- a) inhalačním glukokortikoidem v nízké dávce + dlouhodobě působícím β_2 -sympatomimetikem
- b) inhalačním glukokortikoidem ve střední nebo vysoké dávce
- c) inhalačním glukokortikoidem v nízké dávce + p.o. podávaným antileukotriem
- d) inhalačním glukokortikoidem v nízké dávce + p.o. podávaným xantinem v retardované lékové formě

4. stupeň, tj. **astma pod nedostatečnou kontrolou** – na výběr je terapie:

- a) inhalačním glukokortikoidem ve střední nebo vysoké dávce + dlouhodobě

- působícím β_2 -sympatomimetikem
- b) inhalačním glukokortikoidem ve střední nebo vysoké dávce + dlouhodobě působícím β_2 -sympatomimetikem + p.o. podávaným antileukotrienem
- c) inhalačním glukokortikoidem ve střední nebo vysoké dávce + dlouhodobě působícím β_2 -sympatomimetikem + p.o. podávaným xantinem v retardované lékové formě

5. stupeň, tj. obtížně léčitelné astma – k trojkombinaci uvedené u 4. stupně se přidá p.o. podávaný glukokortikoid v nejnižší možné dávce (případně i další antiastmatika) nebo podkožně podávaný omalizumab.

2.1.4 Lékové formy a způsob aplikace antiastmatik

Kromě perorálních a běžných parenterálních lékových forem se velmi dobře uplatňují **lékové formy inhalační**. Při tomto podání léčivo působí přímo na dýchací cesty, kde tak může mít vysokou koncentraci, která je často prakticky 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. Nástup účinku je přitom velmi rychlý (s výjimkou kortikoidů) a lze použít také látky, které nejsou absorbovány při p.o. podání nebo které mají vysoký first pass efekt (25).

2.1.5 Úlevová léčiva (léčiva s bronchodilatačním účinkem)

Bronchodilatancia slouží k potlačení akutních příznaků bronchiálního astmatu, případně k jejich profylaxi (obvykle před očekávanou zátěží). Dělí se do 4 skupin (18):

1. **β_2 -sympatomimetika**
2. **systémové glukokortikoidy** – jen krátkodobě, max. po dobu 10 dnů, přednostně se podává p.o. prednison
3. **inhalační anticholinergika** (ipratropium)
4. **injekční xantiny** (aminophyllin)

β_2 -sympatomimetika

β_2 -sympatomimetika představují nejdůležitější a nejpočetnější skupinu úlevových antiastmatik. Působí jako kompetitivní selektivní agonisté na β_2 receptorech,

jejíž stimulací dochází k relaxaci hladké svaloviny bronchů. Tyto látky dokáží zabránit bronchokonstrikci navozené histaminem, inhalací studeného vzduchu i alergenu (18).

Rozlišujeme **4 typy** (18):

- a) s rychlým nástupem účinku a jeho krátkým trváním (**inhalační salbutamol**, inhalační **terbutalin** a inhalační **fenoterol**)
- b) s rychlým nástupem účinku a jeho dlouhým trváním (inhalační **formoterol**, perorální **clenbuterol**)
- c) s pomalým nástupem účinku a jeho krátkým trváním (**perorální salbutamol**)
- d) s pomalým nástupem účinku a jeho dlouhým trváním (inhalační **salmeterol**, perorální **procaterol**)

Inhalační β_2 -sympatomimetika s rychlým nástupem účinku (RABA) jsou podávána podle potřeby k potlačení akutních příznaků dušnosti a jsou indikována též u pozátěžového bronchospasmu. Patří k nim β_2 -sympatomimetika s krátkým trváním účinku (SABA) a formoterol, který náleží mezi β_2 -sympatomimetika s dlouhým trváním účinku (LABA), avšak jeho rychlým nástupem. SABA ani LABA se dlouhodobě nikdy nepodávají samostatně. LABA v kombinaci s inhalačním glukokortikoidem lze použít k dlouhodobé terapii kontrolující astma. Fixní kombinace inhalačního glukokortikoidu s formoterolem lze využít jako úlevové léčivo (18).

Krátkodobě účinná β_2 -sympatomimetika se nepodávají pravidelně, ale podle potřeby při záchvatu dušnosti jako monoterapie při intermitentním astmatu. U perzistující astmatu se podávají v kombinaci s jinými léčivy. Mimo to slouží i jako profylaktika před zátěží. Dlouhodobě účinné látky dobře účinkují při noční dušnosti. Používají se při těžkých formách astmatu, kdy je vhodná dlouhodobá bronchodilatace (21,25).

Anticholinergika

Anticholinergika (parasymptolytika) jsou kompetitivné antagonisté na muskarinových receptorech. Blokují postgangliovou eferentní vagovou cestu, čímž vedou k bronchodilataci, a zároveň brání bronchokonstrikci způsobené acetylcholinem. Ve srovnání s β_2 -sympatomimetiky nastupuje bronchodilatační účinek pomaleji a dobou trvání je srovnatelný se salbutamolem nebo fenoterolem (krátkodobý). Používají se

k posílení bronchodilatačního účinku β_2 -sympatomimetik, a to především u akutních exacerbací astmatu. Zástupcem této skupiny je **ipratropium** (18).

Injekční xantiny

Aminophyllin (tj. komplex theophyllinu s edaminem) se od teophyllinu liší velmi dobrou rozpustností ve vodě, která umožnila připravit jeho injekční lékovou formu (v současné době je její užití považováno za spíše nevhodné s ohledem na výskyt nežádoucích účinků a potřebu monitorovat plazmatické hladiny teophyllinu). Přesto však může být použit k terapii akutního bronchospasmu (18).

2.1.6 Léčiva kontrolující astma (léčiva s protizánětlivým účinkem)

Léčiva kontrolující astma slouží k dlouhodobé terapii, snižují zánětlivou reakci a reaktivitu bronchů. Jejich hlavními zástupci jsou:

1. glukokortikoidy

- a) inhalační glukokortikoidy (beclomethason dipropionat, budesonid, fluticason propionat, mometason furoat, ciclesonid)
- b) systémové (prednison, methylprednisolon, hydrocortison)

2. perorální antilekotroneny (montelukast, zafirlukast)

3. perorální xantiny v retardovaných formách (theophyllin, aminophyllin)

4. ostatní léčiva : omalizumab, ketotifen, inhalační nedokromil (18)

Glukokortikoidy

V léčbě astmatu jsou nejúčinnější léčivou skupinou s protizánětlivým účinkem. Mechanismus účinku glukokortikoidů na molekulární úrovni zahrnuje inhibici tvorby protizánětlivých cytokinů, inhibici fosfolipázy A_2 a cyklooxygenázy, které jsou za fyziologických okolností zodpovědné za syntézu mediátorů zánětu (prostaglandinů, leukotrienů a faktoru aktivujícího destičky), za inhibice exprese některých genů, v jejímž důsledku dochází k omezení počtu receptorů pro cytokiny, a za stimulaci exprese jiných genů, v jejímž důsledku např. dochází ke zvýšení adrenergických β -receptorů v dýchacích cestách. Glukokortikoidy inhibují infiltraci buněk zánětu (např. makrofágů, lymfocytů T) do zánětem postižených tkání a současně inhibují jejich aktivaci a tvorbu komplexu antigen-protilátka, čímž tlumí pozdní fázi alergické reakce.

Výsledkem podání je pokles migrace buněk do plic, méně uvolněných mediátorů zánětu, menší vazodilatace a exudace plazmy (18,21,25).

Kortikosteroidy nejsou určeny pro léčbu akutních stavů. Podávají se dlouhodobě u všech forem perzistujícího astmatu. Pro jejich použití platí čtyři obecné zásady:

- zahájit léčbu co nejdříve
- inhalační podání má přednost
- podání začíná vyššími dávkami, jež se postupně snižují na nejnižší ještě účinné
- snižování dávek začíná až po stabilizaci astmatu, nejdříve po 3 měsících podávání

Kortikoidy jsou podávány perorálně, injekčně nebo inhalačně. Dělí se na inhalační a systémové.

Inhalační glukokortikoidy se podávají ve formě aerosolu, suspenze nebo v práškové formě. Mezi hlavní zástupce patří **beclometason dipropionat, budesonid, ciclesonid, fluticason propionát, mometason furoat**. (18,19,21,25).

Systémové kortikosteroidy se podávají perorálně buď pro zvládnutí akutních astmatických stavů, které nereagují na inhalační β_2 -sympatomimetika, nebo na úvod dlouhodobé léčby inhalačními kortikoidy. Pravidelně a dlouhodobě jsou podávány u těžkého perzistujícího astmatu, kde ani vysoké dávky inhalačních kortikoidů podané spolu s dlouhodobě účinnými β_2 -sympatomimetiky, antileukotrieny nebo retardovanými formami xantinů nevedou ke zvládnutí stavu. Používá se perorálně **prednison** a **metylprednisolon** (na léčbu závažné formy bronchiálního astmatu) a pro léčbu status astmaticus se podává nitrožilně **hydrocortison** (18,21,25).

Antileukotrieny

Antileukotrieny mají protizánětlivý a bronchodilatační účinek, brání bronchokonstikci vyvolané zátěží, alergeny nebo inhalací studeného vzduchu, tlumí časnou i pozdní fázi alergické reakce (18).

Biologický účinek leukotrienů lze léčebně ovlivnit buď inhibicí jejich tvorby zásahem na úrovni 5-lipoxygenázy (v ČR neregistrovaným inhibitorem tohoto enzymu

je *zileuton*), nebo pomocí antagonistů leukotrienů na příslušných receptorech (receptorová struktura je pro všechny leukotrieny společná). Mezi kompetitivní antagonisty leukotrienů na jejich receptorech patří **zafirlukast** a **montelukast** a v ČR neregistrovaný *pranlukast* a *ibudilast* (18).

Xantiny

Xantiny působí jako inhibitory fosfodiesterázy typu 1 až 4 (nejčastěji typu 3), čímž zvyšují koncentraci cAMP a vyvolávají relaxaci hladké svaloviny dýchacích cest (bronchodilatační účinek). Snižují tvorbu prozánětlivých cytokinů, mírně inhibují degranulaci žírných buněk a antagonizují působení prostanglandinů. Tlumí časnou i pozdní fázi alergické odpovědi a účinkují při akutním i chronickém astmatu. Existují v retardovaných i neretardovaných formách (18,25).

Díky svému bronchodilatačnímu působení jsou xantiny obsažené v neretardovaných lékových formách řazeny mezi úlevová léčiva. Naproti tomu xantiny v retardovaných lékových formách tvoří součást kombinací používaných v dlouhodobé terapii astmatu, při níž se využívá protizánětlivého účinku. V současnosti ztratily xantiny jako úlevová léčiva svůj význam a jejich užití v této indikaci je považováno za obsolentní (18).

Retardované lékové formy xantinů se používají v kombinaci s inhalačními glukokortikoidy u všech forem perzistujícího astmatu, a to zejména u pacientů s nočními příznaky. Přidat xantiny ke glukokortikoidům je výhodné zejména proto, že xantiny snižují riziko vzniku sekundární rezistence na glukokortikoidy a zároveň umožňují snížit jejich dávku (18).

Nejúčinnějším a nejpoužívanějším xantinem je **teophyllin**. **Aminophyllin** (tj. komplex theophyllinu s edaminem) se od theophyllinu liší velmi dobrou rozpustností ve vodě, která umožnila připravit jeho injekční lékovou formu (v současné době je její užití považováno za spíše nevhodné s ohledem na výskyt nežádoucích účinků a potřebu monitorovat plazmatické hladiny theophyllinu). V omezené míře se používá **etofyllin**, který se od obou výše uvedených liší významně nižším bronchodilatačním účinkem (18).

Ostatní léčiva kontrolující astma

Mezi ostatní léčiva kontrolující astma patří nedocromil, ketotifen a omalizumab. **Nedocromil** stabilizuje membránu žírných buněk, bazofilů a dalších buněk zánětu, snižuje schopnost jejich chemotaxe. Potlačuje kašel a bronchokonstrikci po tělesné zátěži, při inhalaci studeného vzduchu, při dráždění škodlivinami ovzduší. Používá se především k dlouhodobé terapii u lehkého a středně těžkého perzistujícího astmatu. Jeho hlavní výhodou je inhalační aplikace a minimum nežádoucích účinků (18).

Ketotifen také stabilizuje membránu žírných buněk a zároveň antagonizuje H1 receptory. Jeho indikací je dlouhodobá terapie perzistujícího bronchiálního astmatu a profylaxe bronchiálního astmatu u pacientů s alergickou bronchitidou nebo rinitidou (18).

Omalizumab je rekombinantně vyráběná monoklonální protilátka proti IgE. Specificky se váže na IgE a snižuje jeho plazmatickou hladinu, čímž brání jeho vazbě na receptor lokalizovaný především na bazofilech a žírných buňkách. Aplikuje se podkožně při terapii těžkých forem perzistujícího astmatu u pacientů, kteří mají pozitivní kožní test nebo in vitro prokázanou reaktivitu na alergen celoročně se vyskytující v ovzduší (18).

2.2 Justicia adhatoda a její obsahové látky

Botanické jméno: Justicia adhatoda L. (syn. Adhatoda vasica Nees, Adhatoda zeylanica Med.)

Čeleď: Acanthaceae

Synonyma: Malabarský ořech, Adulsa, Arusha, Vasaka, Justicia adhatoda, Adathodai, Bakash, Adathoda, Adalodakam, Adusoge, Addasaramu, Lion's Muzzle, Stallion's Tooth

Výskyt

Justicia adhatoda (Acanthaceae) je stále zelený keř rostoucí v tropických oblastech jihovýchodní Asie, kde se vyskytuje zejména v oblastech s nadmořskou výškou nad 1000 m. Obvykle ji najdeme na otevřených pláních především v nižších oblastech Himalájí, ale také v Indii, Srí Lance, Barmě a Malaisii. (8)

Popis rostliny

Dosahuje výšky 1 – 2,5 metru, listy má jednoduché, trvale ochlupené, 7 – 15 cm dlouhé a 4 – 7 cm široké. (1,2,3,4) Listy získávají schnutím hnědozelenou barvu, charakteristicky voní a chutnají hořce. Mají dobře patrné histologické rysy, které mohou být snadno pozorovány na fragmentech listů čištěných v chloralhydrátu. Průduchy tvoří protáhlou elipsu, která je obklopena dvěma srpkovitými buňkami. Epidermis nese jedno až trojbuněčné bradavičnaté chlupy a malé žlaznaté chlupy se čtyřbuněčnou sekreční žlázou. (5,7,8) Květy jsou bílé, růžové nebo purpurové. Okvětí je široké a bílé, jeho dolní okraje jsou žíhané do purpurova. Květenství je husté (dense) s krátkou stopkou, plody tvoří malé tobolky se čtyřmi semeny. (1,2,3,4)



Obr. č. 1 Justicia adhatoda.

Převzato z www.sbepl.com/adhatoda-vasica.html



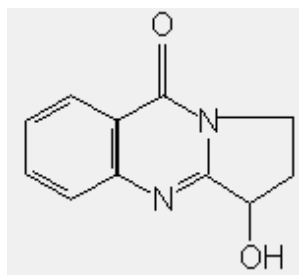
Obr. č. 2 Detail květu.

Převzato z www.herbal-supplement-resource.com/adhatoda-vasica.html

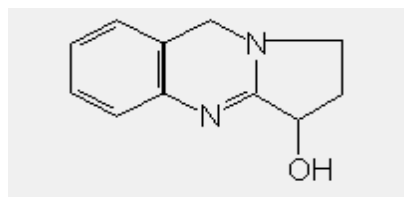
Rostlinné drogy: list, kořen, květ

Obsahové látky:

V listech je přítomno několik alkaloidů, z nichž nejdůležitější je chinazolinový alkaloid vasicin. Další obsahové látky jsou 1-vasicinon, deoxyvasicin, oxyvasicin, N-oxid vasicinu a maionton. Z vedlejších alkaloidů např. vasicol, adhatodinín a vasicinol. Listy jsou bohaté na vitamín C a karoteny a poskytují esenciální oleje.(2) Květy obsahují beta-sitosterol-D-glukosid, kempferol a quercetin, kořeny vasicinolon, vasicol, peganin, hydroxyl oxychalcon a glucosyl oxychalcon. (6) Výtěžek alkaloidů z odlišných vzorků v Indii se pohybuje od 0,541 % do 1,105 % na suché bázi. (5,6)



Vasicinon



Vasicin

Historie a tradice: lidové léčitelství

Justicia adhatoda je už po tisíciletí používána v tradiční indické medicíně, zejména k léčení astmatu, bronchitidy, tuberkulózy a dalších plicních a respiračních poruch. Léčivých schopností této rostliny využívala ajurvédská medicína také při malomocenství, krevních poruchách, srdečních potížích, žízni, zvracení, ztrátě paměti, leukodermatu, žloutence nebo např. kapavce. Odvar z listů může pomoci při kašli a dalších projevech nachlazení.

Uklidňující vliv pomáhá také při podráždění a zánětu v hrdle. Expektorační účinek může zabránit usazování hlenu v dýchacích cestách. Obklad z listů může být přikládán na poranění pro své antibakteriální a protizánětlivé vlastnosti, také mohou být aplikovány na klouby pro odlehčení projevů revmatických onemocnění. Justicia adhatoda může být také použita k zástavě vnitřního a vnějšího krvácení jako např. peptické vředy, hemeroidy nebo krvácení z dásní. Dále prokazuje antispasmodické, expektorační a krev čistící účinky. Bývá také užívána k urychlení porodu. (4)

Mechanismus účinku (1)

Justicia adhatoda působí jako induktor enzymů účinných při metabolismu xenobiotik. Sloučeniny připravené chemickou modifikací molekuly vasicinu inhibují degranulaci žírných buněk a tedy uvolňování histaminu, snižují aktivitu cAMP fosfodiesterázy a lipoxygenázy a inhibují vychytávání vápníku.(1)

Farmakologie a aktivita

Farmakologické účinky vasicinu a vasicinonu jsou velmi dobře známé. Nedávné

výzkumy ukázaly, že aktivita alkaloidů vasicinu a jeho autooxidačního produktu vasicinonu prokázaly bronchodilatační a antihistaminový efekt. Aktivita je porovnatelná s teofylinem jak in vitro tak in vivo, přičemž levotočivé formy jsou více účinné než jejich racemická směs. Vasicinon ukázal bronchodilatační aktivitu in vitro, ale bronchokonstrikční in vivo, což je pravděpodobně způsobeno jeho biotransformací in vivo. Oba alkaloidy v kombinaci 1:1 vykazovaly výraznou bronchodilatační aktivitu jak in vivo, tak in vitro. Bronchodilatační účinek je přisuzován chinazolin-4-on kruhu.(9)

Vasicin také vykazoval silnou stimulační aktivitu na respirační trakt, mírnou hypotenzní aktivitu a kardiodepresivní efekt. Vasicinon tyto aktivity postrádal. Kardiodepresivní efekt byl významně snížen, když byla podávána směs vasicinu a vasicinonu. D-forma vasicinonu nevykázala žádný efekt na izolované srdce, ale pravděpodobně L-forma je slabý kardiostimulant. Esenciální oleje v koncentraci (2 - 20 g/ml) inhibovaly růst všech rodů *M. tuberculosis* in vitro (5).

Kromě bronchodilatačního a antiastmatického účinku mají obsahové látky také účinek expektorační a mukolytický, dále antipyretický a antispasmodický (8). Alkaloidy stimulují kontrakci děložní svaloviny a urychlují porod, vykazují tedy účinek oxytocický, uterotonický a také abortivní.(6) Alkoholový extrakt má insekticidní a pesticidní účinek. (8)

Dávkování a toxicita

Justicia adhatoda je součástí mnoha přípravků. Při užívání těchto přípravků je důležité dodržovat doporučené dávkování stanovené výrobcem. Průměrná dávka je 250 mg extraktu dvakrát denně, je však vhodnější dávku upravit individuálně. (1) Podle jiného zdroje jsou běžné dávky 1 až 3 gramy sušených listů. Při doporučeném používání a dávkování je považována za bezpečnou. Teratogenní studie neprokázaly žádný negativní vliv na plod, na dětech ale bezpečnost této rostliny ověřena nebyla.

Podle několika studií působí extrakt *Adhatoda vasica* jako abortivum, proto je jeho použití v těhotenství kontraindikováno s výjimkou porodu, kdy může být použita pro své uterotonické účinky (1,7). Pokud je tato rostlina užívána s jinými látkami a přípravky, které vykazují expektorační nebo antispasmodický efekt, je nutno dbát zvýšené opatrnosti. (4) Jiné závažné nežádoucí účinky nebyly dosud popsány.(1)

Klinické využití

Šťáva a odvar z listů a kořenů pomáhá při chronickém nachlazení, astmatu, bronchitidě a dušnosti. Užívá se také při hemoroidech, menstruačním krvácení. Listy, květy a kořeny jsou široce používány k léčbě rýmy, kašle, černého kašle, chronické bronchitidy a astmatu. (2)

V poslední době proběhly studie zkoumající využití jak samotné rostliny, respektive izolovaných frakcí, tak modifikovaných účinných látek. Alkaloidy obsažené v *Justicia adhatoda* vykazaly protizánětlivý účinek srovnatelný s účinkem hydrokortizonu. Ostatní frakce takový účinek nevykazaly. Ve studii provedené na morčatech působily alkaloidy proti alergeny indukované bronchiální obstrukci v dávce 10 mg/ml aerosolu. 6,7,8,9,10,12 - hexahydroazepin - [2,1-b] - chinazolin - 12 - on (označovaný jako RLX) je sloučenina získaná chemickou modifikací vasicinu, u které byly zkoumány její bronchodilatační účinky. RLX inhibuje degranulaci žírných buněk, vychytávání vápníku a snižuje aktivitu cAMP fosfodiesterázy a lipoxygenázy. Výzkumy ukázaly, že účinkuje dlouhodobě a srovnatelně s kromoglykátém sodným a aminofylinem. (1)

Dále bylo zkoumáno využití *J. adhatody* jako antitusika na morčatech a králících. Kašel byl u zvířat vyvolán mechanicky, chemicky a elektricky. Po i.v. podání byl účinek *J. adhatody* nižší než účinek kodeinu u mechanicky a elektricky vyvolaného kašle, po p.o. podání u chemicky vyvolaného kašle byly účinky obou látek srovnatelné.(1)

2.3 Deriváty chinazolinu a jejich účinky

Chinazolin je sloučenina složená ze dvou cyklů, dříve známá jako benzo-1,3-diazin byla poprvé sestavena v laboratoři Gabriel v roce 1903, i když jeden z jejích derivátů byl znám mnohem dříve. (16)

Poprvé navrhl název chinazolin pro tuto sloučeninu Weddige na základě izomerie se sloučeninami cinnolin a chinoxalin. Paal a Bush navrhli číslování chinazolinového kruhu, které je v současné době používáno. Mezi další méně často

používané názvy pro tuto strukturu jsou phenmiazin a 5,6-benzopyrimidin. Nicméně, jméno chinazolin je dnes všeobecně přijímáno. (16)

Z mnoha derivátů chinazolinu jsou nejdůležitější sloučeniny ketochinazoliny, označované též jako chinazolinony. V závislosti na pozici keto nebo oxo skupiny mohou být tyto sloučeniny zařazeny do dvou typů (16):

1) 2 - (1H) chinazolinony nebo 2-dihydro-2-oxo chinazoliny

2) 4 (3H)-chinazoliny nebo 3,4-dihydro-oxochinazoliny

Tyto systémy představují laktam-laktimovou tautomerii a podrobují hydroxy skupiny substitučním reakcím. Prvním syntetizovaným derivátem chinazolinonu byl 2-kyano-4-(3H)-chinazolinon. (16).

2.3.1 Deriváty chinazolinu vykazující bronchodilatační aktivitu

Mezi deriváty chinazolinu s nejvýraznějším bronchodilatačním účinkem patří 2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on (95-4) a 6, 7, 8, 9, 10, 12-hexahydro-azepino-[2, 1-b] chinazolin-12-on – (RLX). Tyto látky byly odvozeny z přirozeně se vyskytujícího chinazolinového alkaloidu vasicinu.

2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on

Tato sloučenina (dále označovaná jako 95-4) odvozená z přirozeně se vyskytujícího chinazolinového vasicinu byla syntetizována z antranilové kyseliny. Studie byly zaměřené na hodnocení bronchodilatačního a antialergického působení za použití řady in vitro a in vivo metod. Pro hodnocení antialergické aktivity byly využity Schultz-Dale reakce (experimentální in vitro test na hypersensitivitu, při kterém se proužek hladké svaloviny odebere ze sensitivizovaného zvířete a vystaví se expozici specifickým antigenem), pasivní kožní anafylaxe (P.C.A. test), stabilizace žírných buněk a antiacetylcholinové a antihistaminové působení. Pro hodnocení bronchodilatačního účinků se používala trachea z morčete, dále histaminovým aerosolem navozená bronchokonstrikce a protekce proti systémové anafylaxi (12,26).

95-4 vykazovala výrazný bronchodilatační účinek, který však nebyl zprostředkován přes β -adrenergní receptory. Na hladké svalovině střeva byl také prokázán relaxační efekt. Studie kumulativní dávky – odpovědi s acetylcholinem a histaminem indikovala nespecifický přímý efekt na hladkou svalovinu. 95-4 byla shledána jako víc účinná než teofylin a míň než salbutamol v základní dávce. Při testování celé řady experimentálních modelů se zjistilo, že postrádá antialergickou aktivitu. Nebyly odhaleny žádné nežádoucí účinky (12).

Kontrakce navozená acetylcholinem, histaminem a antigenem byla po této látce několikanásobně nižší ve srovnání s teofylinem, avšak ne ve srovnání se salbutamolem (viz Tab. 1). Po premedikaci propranololem byl relaxační efekt trvalý. 95-4 je mnohem účinnější než teofylin ale méně účinný než salbutamol jako beta adrenergní agonista (12).

Tab. č. 1 EC_{50} při sledování relaxačního efektu na průdušnici kontrahované Ach, histaminem, antigenem (12)

| Léčivá látka | EC_{50} (M) | | |
|--------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | ACh | Histamin | Antigen Ovalalbumin |
| 95-4 | 4×10^{-5} | 1.2×10^{-5} | 7×10^{-5} |
| Theofylin | 2.5×10^{-4} | 5.2×10^{-4} | 5×10^{-4} |
| Salbutamol | 0.03×10^{-7} | 0.11×10^{-7} | 0.02×10^{-7} |

Dávka ACh (2×10^{-7}) a histaminu (5×10^{-7}) způsobila submaximální kontrakci a antigen (ovalbumin 100 μ g/ml) způsobil maximální kontrakci.

95-4 v perorální dávce 50 mg/kg poskytla 100% ochranu ve srovnání 40% a 60% ochrany zaznamenané teofylinem a derifylinem, a to pro případ bronchospasmu indukovaného histaminovým aerosolem. Tato ochrana je srovnatelná se salbutamolem (viz Tab. 2).

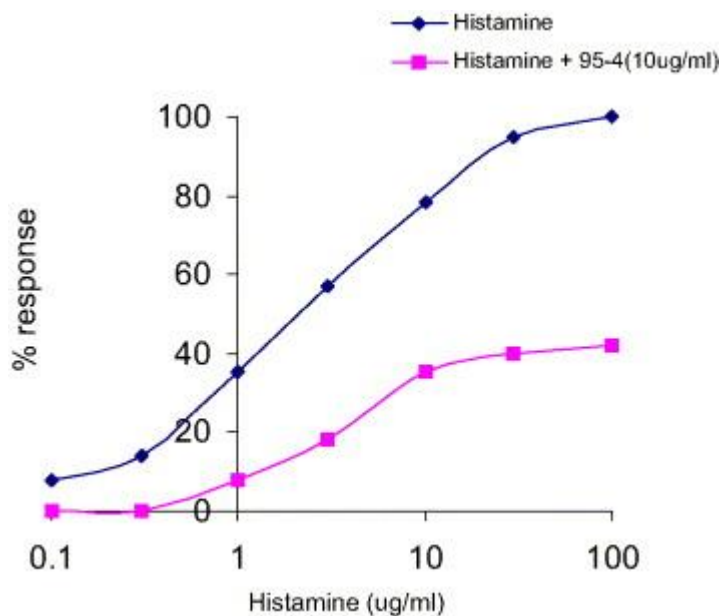
Tab. č. 2 Ochrana proti bronchospasmu navozeného histaminovým aerosolem (5 ml 1% roztoku histaminu, doba působení 2 minuty (12)

| Léčivá látka | Dávka: mg/kg p.o. | Průměrný čas v sekundách pro začátek bronchospasmu | Závažnost bronchospasmu | Přežití zvířat (%) |
|--------------|-------------------|--|-------------------------|--------------------|
| kontrola | – | 66 ± 4 | +++ | 0 |
| 95-4 | 50 | 132 ± 6 | + | 100 |
| Theofylin | 50 | 90 ± 4 | ++ | 40 |
| Derifylin | 10 | 102 ± 5 | + | 60 |
| Salbutamol | 1 | 144 ± 4 | + | 100 |

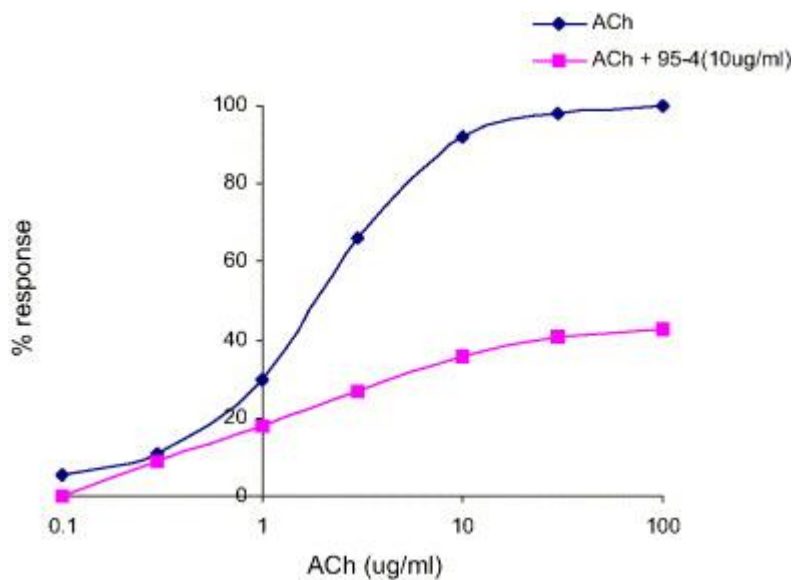
Antiacetylcholinový a antihistaminový účinek

Studie kumulativní dávka-odpověď na ileu morčete s Ach a H za absence a přítomnosti 95-4 odhalila posun křivky doprava a zmenšení sklonu a maxima v přítomnosti sloučeniny 95-4 proti Ach a histaminu (viz graf 1 a 2).

Evidentně to nebyl případ kompetitivního bloku nebo překonatelný obrat jako nastane s agonistou a antagonistickým působením přes stejné receptory. Posun křivky doprava a zmenšení sklonu maxima je charakteristika sloučenin mající přímý efekt, který není zprostředkovaný přes receptory. Bronchiální relaxační efekt není zprostředkovaný β -adrenergními receptory (12).



Graf č.1 Křivka kumulativní dávky-odpovědi histaminu a histaminu + 95-4 (12)



Graf č. 2. Křivka kumulativní dávky-odpovědi Ach a Ach + 95-4 (12)

95-4 má značný relaxační efekt na bronchiální svalovinu, může najít užití v podmínkách přidružených při spasmu bronchiální svaloviny. (12)

6, 7, 8, 9, 10, 12-hexahydro-azepino-[2, 1-b] chinazolin-12-on – (RLX)

Tato látka s bronchodilátčním účinkem byla získána při chemické modifikaci molekuly alkaloidu vasicinu (Ex: *Adhatoda vasica*). Perorální účinek RLX byl pozorován pomocí různých metodik in vitro. RLX (10 a 20 mg/kg) inhibuje antigenem indukované degranulační mastocyty a uvolnění histaminu z cílové tkáně. Také byl zaznamenán zvýšený odliv PGE (plíce) a inhibovaný ^{45}Ca (peritoneální mastocyty) uptake. Aktivita plicní fosfodiesterázy a lipoxygenázy byla snížena. Z toho vyplývá, že RLX by mohl zastoupit cromoglykát a aminofylin s dodatečnými atributy jeho perorální účinnosti a dlouhé doby působení (10). Disponuje také protizánětlivým a antiartrotickým účinkem (12).

Další deriváty chinazolinu s bronchodilatační aktivitou

Mezi testované látky patřily **deriváty chinazolin-3-oxidů**, jejichž neaktivnější a nejselektivnější komponenty obsahovaly methylovou skupinu na pozici 4, středně rozvětvenou alkylovou skupinu na pozici 2 a malou elektron poskytující skupinu na fenylovém kruhu. Signifikantní vylepšení v selektivitě bylo pozorováno na základě srovnání pulmonálního versus kardiovaskulárního efektu těchto nových bronchodilátorů s efektem teofylinu (14).

Další skupinou testovaných látek byly **5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazoliny, 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin -5(6H)-thiony a jejich oxo analogy**. V 5-alkyl substituované sloučenině vykazoval delší alkylový řetězec větší bronchodilatační aktivitu. 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin -5(6H)-thiony a jejich oxo analogy byly shledány jako méně účinné a záměna kyslíku za síru neukázala žádný signifikantní efekt na biologickou aktivitu. Přítomnost halogenů změnila biologickou aktivitu v obou sériích. Mezi testovanými sloučeninami byl shledán jako nejúčinnější 9-jodo-5-(n-propyl)-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin - procentuální krytí = 87.1%; relativní aktivita = 1.1 srovnatelná se standardem aminofylinem (11).

Dále byly testovány **10-substituované 2,3-dihydroimidazo[2,1-b]chinazolin-5(10H)-ony** (13) a **trisubstituované deriváty deoxyvasicinu** (15). Bronchodilatační aktivita čistých vzorků derivátů deoxyvasicinu s vazbou 17a-d a DL-8-chlorvasicinu hydrochloridu je prokázána a srovnatelná s isoprenalinem a aminofylinem (15).

6-substituované benziimidazo[1,2-c] chinazoliny byly hodnoceny pro jejich bronchodilatační aktivitu in vitro a in vivo. Všechny testy vykazovaly dobrou aktivitu, jak in vitro, tak in vivo metodami. Vztah struktury a aktivity byly založeny na výsledcích získaných pro tuto studii. V 6-alkyl substituovaných sloučeninách delší alkylový řetězec a 4–substituce elektron odnímající skupinou vykazovaly větší aktivitu. Přítomnost halogenů změnila biologickou aktivitu. 10-iodo-6-(n-propyl)-benzimidazol[1,2-c]chinazolin byl nejvíc účinný (procentuelní krytí = 75%; relativní aktivita = 1.1 (17).

2.4 Dýchací ústrojí potkana

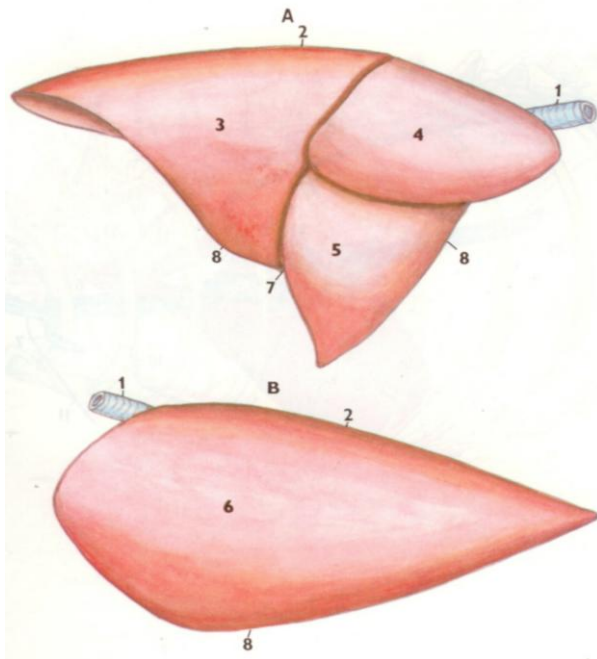
Prvním oddílem dýchacího ústrojí potkana je dutina nosní (cavum nasi). Začíná nasopodu zevního nosu nosními dírkami a ústí nozdrami do nosohltanu. Z nosní dutiny jde vzduch do dutiny hltanové, kde se dechové cesty kříží. Pak vstupuje vdechovaný vzduch do hrtanu, který tvoří začátek dechové cesty krční.

Průdušnice (trachea) je tenkostěnná pružná trubice, jejíž stěna je tvořena sliznicí, vazivem, chrupavkou, svalovinou a vrstvou obalovou. Sliznice krytá řasinkovým epitelem obsahuje četné žlázy a lymfatické uzlíky. Trachea leží před jícnem a skládá se asi z 25 až 30 dorzoventrálně zploštělých, vzadu neuzavřených a prstenčitých chrupavek, které jsou navzájem vazivově spojeny. První kraniální chrupavkou je chrupavka štítná (cartilago thyreoidea), pod ní se nachází chrupavka prstencová (cartilago cricoidea). Dorzálně jsou chrupavky spojeny hladkým svalstvem, které se na ně upíná zvěňčí (na rozdíl od průdušnice morčete a člověka). Průsvit průdušnice se postupně zmenšuje. Tracheální epitel je dvojvrstevný a opatřený řasinkami. Trachea se v bifurcatio tracheae (v hrudní dutině asi pod 4. nebo 5. hrudním obratlem) dělí na pravou a levou průdušku (bronchus principalis dexter et sinister). Bronchy pak vstupují do plic. (22,23)

Plíce (pulmo) vyplňují skoro celou kónickou dutinu hrudní. Pravá plíce se člení na čtyři laloky, levá má pouze jeden lalok. Pravý kaudální lalok (lobus caudalis) obklopuje srdce a svým hrotem směřuje vlevo. Pak následuje malý plochý poloměsíčitý srdeční lalok (lobus cranialis), který kryje dorzálně spodní úsek hrotitého laloku a

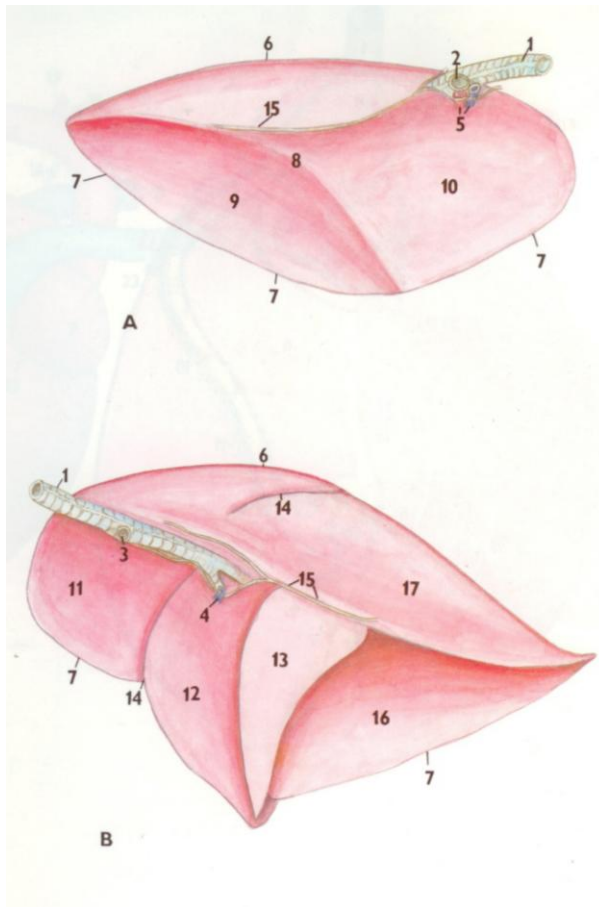
kraniální část středního laloku (lobus medius). Je spojen s dolní dutou žílou. Posledním lalokem pravé strany plic je přídatný lalok (lobus accessorius), jenž ční vlevo vpřed a obklopuje srdce svým kraniálním, vpravo směřujícím hrotem. (23)

Obr. č. 3. Plíce z pravé (A) a levé (B) strany (24)



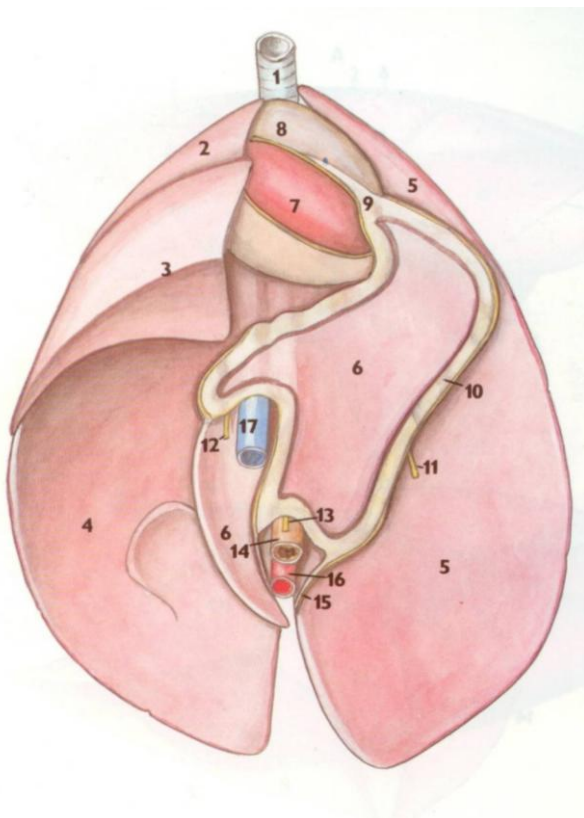
1. Trachea – průdušnice
2. Margo dorsalis (obtutus) – dorzální okraj (zaoblený)
3. Lobus caudalis pulmonis dextri – kaudální lalok pravé poloviny plic
4. Lobus cranialis pulmonis dextri – kraniální lalok pravé poloviny plic
5. Lobus medius pulmonis dextri – mediální lalok pravé poloviny plic
6. Pulmo sinister – levá plíce
7. Incisura intrlobaris – mezilalokový zářez
8. Margo ventralis – ventrální okraj

Obr. č. 4. Pravá (A) a levá (B) polovina plic při pohledu na mediastinální plochu (24)



1. Trachea – průdušnice
2. Bronchus principalis dexter – pravá hlavní průduška
3. Bronchus principalis sinister – levá hlavní průduška
4. V. pulmonalis sinister – levá plicní žíla
5. A. et v. pulmonalis sinistra – levá plicní tepna a žíla
6. Margo dorsalis (obtusus) – dorzální (tupý) okraj
7. Margo ventralis (acutus) – ventrální (ostrý) okraj
8. Margo basalis – bazální okraj
9. Facies diaphragmatica pulmonis sinistri – bránicová plocha levé poloviny plic
10. Impressio cardiaca pulmonis sinistri – srdcový otisk levé poloviny plic
11. Lobus cranialis pulmonis dextri – kraniální lalok pravé poloviny plic
12. Lobus medius pulmonis dextri – střední lalok pravé poloviny plic
13. Lobus accessorius pulmonis dextri – přídatný lalok pravé poloviny plic
14. Incisura cardiaca pulmonis dextri – srdeční zářez pravé poloviny plic
15. Insertio mediastini – meziplicní úpon
- 16., 17. Lobus caudalis pulmonis dextri – kaudální lalok pravé poloviny plic
16. Facies diaphragmatica pulmonis dextri – bránicová plocha pravé poloviny plic

Obr. č. 5. Plíce a srdce při pohledu na bránicovou plochu



1. Trachea – průdušnice
2. Lobus cranialis pulmonis dextri – kraniální lalok pravé poloviny plic
3. Lobus medius pulmonis dextri – střední lalok pravé poloviny plic
4. Lobus caudalis pulmonis dextri – kaudální lalok pravé poloviny plic
5. Pulmo sinister – levá polovina plic
6. Lobus accessorius – přídatný lalok
7. Cor – srdce
8. Pericardium – osrdečník
9. Lig. Sternopericardiacum – osrdečnickovohrudní vaz
10. Mediastinum caudale – kaudální meziplicí
11. N. phrenicus sinister – levý bránicový nerv
12. N. phrenicus dexter – pravý bránicový nerv
13. Truncus vagalis ventralis – ventrální bloudivý nerv
14. Esophagu – jícen
15. Insertio pleurae mediastinalis – úpon meziplicní pohrudnice
16. Aorta – srdečnice
17. V. cava caudalis – zadní dutá žíla

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál

3.1.1 Chemikálie

Tab. č. 3. Použité chemikálie

| Název | Vzorec | Výrobce | MW |
|--|---|------------------------------|--------|
| Chlorid sodný p.a. | NaCl | Lachema | 58,44 |
| Chlorid draselný ČsL 3 | KCl | Lachema | 74,56 |
| Hydrogenuhlíčan sodný p.a. | NaHCO ₃ | Penta | 84,01 |
| Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. | KH ₂ PO ₄ | RNDr. Jan Kulich | 136,09 |
| Síran hořečnatý heptahydrát | MgSO ₄ · 7H ₂ O | Lachema | 246,47 |
| D- glukosa monohydrát p.a. | C ₁₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O | Lachema | 198,17 |
| Chlorid vápenatý bezvodý práškový p.a. | CaCl ₂ | Lachema | 110,99 |
| Carbamoylcholine chloride, 99% | Neuveden na obalu | Sigma-Aldrich chemie Germany | 182,65 |
| Theophylline, anhydrous, minimum 99% | Neuveden na obalu | Sigma-Aldrich chemie Germany | 180,17 |
| Destilovaná voda | | Dostupná na pracovišti | |

3.1.2 Pomůcky a přístroje

Laboratorní sklo, laboratorní váhy Kern, pomůcky k navažování

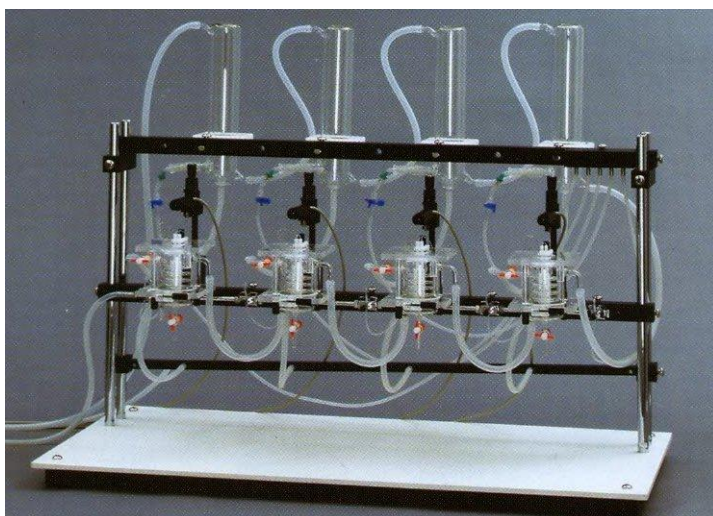
Operační nástroje (nůžky, pinzety, pean...), ligatura

Chladič, termostat, plynová bomba s pneumoxidem

Aparatura na izolované orgány: Multi chamber tissue bath system Experimetria Ltd.,

Budapešť, Maďarsko, vyhodnocovací Software (S.P.E.L. Advanced Kymograph

Software, Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko) – viz obr. č. 6



Obr. č. 6 Aparatura na izolované orgány

3.1.3 Pokusná zvířata

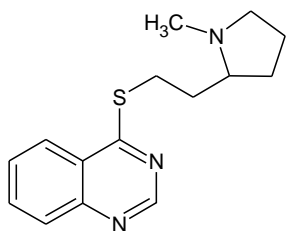
Experimenty byly prováděny na potkanech kmenu Wistar ♂ o hmotnosti 250 – 300 g, kteří byli dodáni z BioTestu s.r.o Konárovice. Zvířata byla náhodně rozdělena do skupin a umístěna ve viváriu FaF UK, kde byla chována za standardních laboratorních podmínek - s volným přístupem ke standardní peletizované potravě a pitné vodě. Před experimentem byla zvířata 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.

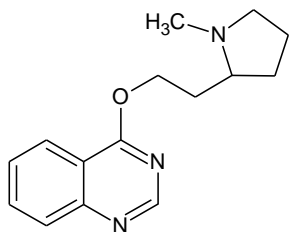
3.1.4 Testované látky

Testované látky byly syntetizovány na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Byl zjišťován účinek těchto látek:

VN-013 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]chinazolin MW= 273,40



VN-011 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethoxy]chinazolin MW= 257,33



3.2 Metodika

3.2.1 Příprava roztoků

3.2.1.1 Příprava Krebs – Henseleitova roztoku

Tab. č. 4. Složení Krebs – Henseleitova roztoku (g/l)

| | 1 litr |
|---|---------------|
| NaCl | 6,8 |
| KCl | 0,35 |
| NaHCO₃ | 2,1 |
| KH₂PO₄ | 0,14 |
| MgSO₄ · 7H₂O | 0,29 |
| Glukóza | 2,0 |
| CaCl₂ bezvodý | 0,28 |

Krebs – Henseleitův roztok je živný roztok, kterého jsme připravovali vždy 1 litr pro čtyři vzorky izolované trachey. Navážená množství jednotlivých látek jsme odděleně rozpustili v destilované vodě a tyto roztoky smíchali. Roztok chloridu vápenatého jsme po rozpuštění přidali k ostatním roztokům až nakonec, aby nedošlo k vysrážení vápenatých solí, které jsou slabě rozpustné. Poté jsme roztok doplnili destilovanou vodou na požadovaný objem.

3.2.1.2 Příprava roztoku carbacholu

Roztok carbacholu byl připraven tak, aby jeho výsledná koncentrace v 5 ml lázni po aplikaci 50 μ l byla 10^{-5} M.

3.2.1.3 Příprava roztoku teofylinu

Roztok teofylinu jsme připravili tak, aby jeho výsledná koncentrace v 5 ml lázni byla po aplikaci 10^{-2} M. To je koncentrace, při které dojde k navození maximální relaxace hladké svaloviny trachey.

3.2.1.4 Příprava roztoků testovaných látek pro kumulativní dávkování

Při přípravě jednotlivých roztoků jsme vycházeli z molekulových hmotností látek VN-011 a VN-013. V případě látky VN-011 jsme připravili roztoky, jejichž aplikace v lázni vytvořila výsledné koncentrace: 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.

U látky VN-013 jsme připravili a použili roztoky s výslednou koncentrací v lázni: 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.

3.2.2 Provedení pokusu

Zvíře jsme nejdříve usmrtili zlomením vazů úderem o hranu pracovní desky a vykrvili podstříhnutím krční tepny. Poté jsme potkana fixovali na operační stůl a začali s preparací trachey odstříhnutím kožní řasy v oblasti krku. Poté jsme tupou preparací obnažili a uvolnili po obou stranách tracheu, kterou jsme oddělili od dýchacího traktu v oblasti bifurkace. Vypreparovaná trachea byla středem podkovovitých chrupavek vertikálně rozstřížena. Takto jsme získali asi dvoucentimetrový úsek trachey, který jsme pak ihned přenesli do Petriho misky s Krebs - Henseleitovým roztokem.

Zde jsme průdušnici očistili od zbytků okolních tkání a rozstříhli tak, aby se hladká svalovina vyskytovala uprostřed preparátu. Poté jsme preparát rozdělili na čtyři stejné části a tím získali tracheální proužky pro testování. Do dvou protějších rohů preparátu jsme připevnili ligatury a preparát zavěsili do Schulerovy nádoby na izolovaný orgán. Nádoba byla naplněna Krebs – Henseleitovým živným roztokem (5 ml) a vyhřívána na 37°C . Pro zajištění fyziologických podmínek byl roztok kromě vyhřívání také okysličován pneumoxidem (směs 95 % O_2 a 5 % CO_2).

Výstupním zařízením aparatury (Multi chamber tissue bath systém) byl počítáč se speciálním softwarem (S.P.E.L Advanced Kymograph Software), který

zaznamenával celý proces testování od kalibrace až po konečný grafický záznam. Po umístění preparátu do lázně aparatury byla provedena kalibrace.

Preparát jsme zatížili na 2 g a nechali 30 minut stabilizovat, přičemž každých 10 minut jsme prováděli výplach živného roztoku. Po uplynutí intervalu jsme snížili zatížení na 1 g a počkali, až se křivka záznamu stabilizovala. Poté byl preparát připraven k testování.

Vlastní testování látek na izolované průdušnici potkana spočívalo v tom, že jsme nejdříve vyvolali kontrakci hladké svaloviny trachey a pomocí testovaných látek jsme sledovali, do jaké míry mají schopnost svalovinu relaxovat. Pro vyvolání kontrakce jsme používali roztok carbacholu, kterého jsme do lázně aparatury aplikovali vždy 50 μ l, přičemž výsledná koncentrace v lázni byla 10^{-5} M. Druhá odpověď trachey na carbachol byla zpravidla výraznější, proto jsme nejdříve aplikovali jednu dávku, poté provedli výplach a po ustálení křivky na záznamu v počítači jsme aplikovali druhou dávku.

Po úplné kontrakci trachey, která se na záznamu projevila zarovnaním křivky, jsme začali aplikovat jednotlivé kumulativní dávky testovaných látek, a to vždy až po stabilizaci odpovědi hladkého svalstva průdušnice na dávku předchozí. Látky jsme aplikovali do Schulerovy nádoby pomocí mikropipet v těchto 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 (u látky VN-013 jsme testovali pouze prvních 6 koncentrací). Po aplikaci všech koncentrací testovaných látek jsme pokus ukončili aplikací roztoku teofylinu o koncentraci 10^{-2} M, čímž došlo k navození maximální relaxace hladkého svalstva trachey.

Relaxační účinek každé koncentrace jsme vyjádřili jako procentuální změnu v poměru k maximální relaxaci. Získané hodnoty jsme zpracovali pomocí programu GraphPad Prism 5. Na osu X jsme nanесли log koncentrace testované látky, na osu Y procentuální odpověď (relaxaci tkáně). Metodou nelineární regrese jsme získali DRC křivku a hodnotu ED_{50} pro látky VN-011 a VN-013. Křivku pro teofylin a hodnotu ED_{50} jsme převzali z diplomové práce (27).

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

4. VÝSLEDKY

U testovaných látek byla hodnocena jejich schopnost relaxovat hladký sval trachey. Účinnost testovaných látek byla srovnávána s účinností teofylinu, který se pro svůj výrazný bronchodilatační efekt používá jako standard. Relaxační účinek každé dávky byl vyjádřen jako procento z maximální relaxace, která byla navozena teofylinem. V tabulkách (č. 5 až 11) jsou uvedeny hodnoty pro testované látky, výsledkem je znázornění v podobě grafu a zároveň byla určena EC_{50} (viz Tab. 13).

EC_{50} (nebo-li ED_{50} dosis effectiva 50%) označuje dávku nebo koncentraci, která vyvolává 50% maximálně možné reakce, anebo při které dosahujeme očekávaného účinku v 50% případů (19).

4.1 VN-011

Tab. č. 5 Relaxace izolované průdušnice látkou VN-011 (g)

| | | VN011 -1 | VN011 -1 | VN011 -1 | VN011 -2 | VN011 -2 | VN011 -2 | VN011 -3 | VN011 -3 | VN011 -3 | VN011 -3 |
|-----------|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Basal | Konc.(M) | 0,91 | 0,88 | 0,94 | 1,04 | 1,05 | 1,12 | 1,04 | 0,96 | 0,94 | 0,95 |
| Carbachol | | 1,82 | 2,06 | 1,79 | 2,15 | 1,93 | 1,46 | 1,40 | 1,71 | 1,74 | 2,06 |
| VN-011 | 10^{-7} | 1,82 | 2,06 | 1,79 | 2,15 | 1,93 | 1,46 | 1,40 | 1,71 | 1,74 | 2,06 |
| v M | 10^{-6} | 1,82 | 2,05 | 1,78 | 2,15 | 1,93 | 1,46 | 1,40 | 1,71 | 1,74 | 2,06 |
| | 10^{-5} | 1,82 | 2,02 | 1,78 | 2,13 | 1,9 | 1,45 | 1,39 | 1,71 | 1,74 | 2,01 |
| | 5×10^{-5} | 1,72 | 1,92 | 1,71 | 1,87 | 1,81 | 1,4 | 1,34 | 1,59 | 1,64 | 1,88 |
| | $7,5 \times 10^{-5}$ | 1,66 | 1,87 | 1,66 | 1,76 | 1,75 | 1,14 | 1,31 | 1,52 | 1,6 | 1,78 |
| | 10^{-4} | 1,58 | 1,79 | 1,61 | 1,65 | 1,66 | 1,3 | 1,29 | 1,44 | 1,53 | 1,67 |
| | $2,5 \times 10^{-4}$ | 1,06 | 1,19 | 1,11 | 1,13 | 1,23 | 1,09 | 1,12 | 1,05 | 1,06 | 1,05 |
| | 5×10^{-4} | 0,88 | 1,01 | 0,96 | 1 | 1,06 | 0,98 | 1,06 | 0,96 | 0,94 | 0,87 |
| | $7,5 \times 10^{-4}$ | | | | 0,93 | 0,97 | 0,89 | 1,04 | 0,92 | 0,9 | 0,81 |
| teofylin | 10^{-2} | 0,87 | 0,87 | 0,83 | 0,9 | 0,91 | 0,86 | 1,02 | 0,9 | 0,88 | 0,79 |

Tab. č. 6 Relaxace izolované průdušnice látkou VN-011 (%)

| | Konc.(M) | VN011-1 | VN011-1 | VN011-1 | VN011-2 | VN011-2 | VN011-2 | VN011-3 | VN011-3 | VN011-3 | VN011-3 |
|----------|----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| VN-011 | 10^{-7} | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 10^{-6} | 0,00 | 0,84 | 1,04 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| | 10^{-5} | 0,00 | 3,36 | 1,04 | 1,60 | 2,94 | 1,67 | 2,63 | 0,00 | 0,00 | 3,94 |
| | 5×10^{-5} | 10,53 | 11,76 | 8,33 | 22,40 | 11,76 | 10,00 | 15,79 | 14,81 | 11,63 | 14,17 |
| | $7,5 \times 10^{-5}$ | 16,84 | 15,97 | 13,54 | 31,20 | 17,65 | 53,33 | 23,68 | 23,46 | 16,28 | 22,05 |
| | 10^{-4} | 25,26 | 22,69 | 18,75 | 40,00 | 26,47 | 26,67 | 28,95 | 33,33 | 24,42 | 30,71 |
| | $2,5 \times 10^{-4}$ | 80,00 | 73,11 | 70,83 | 81,60 | 68,63 | 61,67 | 73,68 | 81,48 | 79,07 | 79,53 |
| | 5×10^{-4} | 98,95 | 88,24 | 86,46 | 92,00 | 85,29 | 80,00 | 89,47 | 92,59 | 93,02 | 93,70 |
| | $7,5 \times 10^{-4}$ | | | | 97,60 | 94,12 | 95,00 | 94,74 | 97,53 | 97,67 | 98,43 |
| teofylin | 10^{-2} | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

Tab. č. 7 Průměr hodnot z Tab. 5 pro látku VN-011 odečtené v procentech

| | | PRŮMĚR | sem (ds.est/n) | n |
|----------|-----------|--------|----------------|----|
| VN-011 | 10-7M | 0,00 | 0,00 | 10 |
| | 10-6M | 0,19 | 0,13 | 10 |
| | 10-5M | 1,72 | 0,46 | 10 |
| | 5*10-5M | 13,12 | 1,26 | 10 |
| | 7,5*10-5M | 23,40 | 3,71 | 10 |
| | 10-4M | 27,72 | 1,88 | 10 |
| | 2,5*10-4M | 74,96 | 2,08 | 10 |
| | 5*10-4M | 88,97 | 1,67 | 10 |
| | 7,5*10-4M | 96,44 | 0,66 | 7 |
| teofylin | 10-2M | 100,00 | 0,00 | 10 |

4.2 VN-013

Tab. č. 8 Relaxace izolované průdušnice látkou VN-013 (g)

| | | VN013-1 | VN013-1 | VN013-1 | VN013-1 | VN-013-3 | VN-013-3 | VN-013-3 | VN-013-3 |
|-----------|------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Basal | Konc. (M) | 0,98 | 0,83 | 0,86 | 0,99 | 0,94 | 0,87 | 0,96 | 1,01 |
| Carbachol | | 2,02 | 2,57 | 2,47 | 2,1 | 1,84 | 1,71 | 2,1 | 1,61 |
| VN-013 | 10^{-7} M | 2,01 | 2,56 | 2,45 | 2,08 | 1,84 | 1,70 | 2,09 | 1,59 |
| v M | 10^{-6} M | 2,01 | 2,54 | 2,45 | 2,07 | 1,83 | 1,68 | 2,07 | 1,58 |
| | 10^{-5} M | 1,97 | 2,42 | 2,38 | 1,99 | 1,79 | 1,66 | 2,02 | 1,56 |
| | 5×10^{-5} M | 1,73 | 1,7 | 1,95 | 1,48 | 1,4 | 1,29 | 1,52 | 1,38 |
| | $7,5 \times 10^{-5}$ M | 1,65 | 1,54 | 1,8 | 1,42 | 1,3 | 1,21 | 1,48 | 1,31 |
| | 10^{-4} M | 1,49 | 1,33 | 1,62 | 1,4 | 1,16 | 1,10 | 1,35 | 1,19 |
| | $2,5 \times 10^{-4}$ M | 1,11 | 0,68 | 0,85 | 0,81 | 0,84 | 0,78 | 0,9 | 0,95 |
| teofylin | 10^{-2} M | 1,11 | 0,67 | 0,84 | 0,79 | 0,81 | 0,77 | 0,9 | 0,94 |

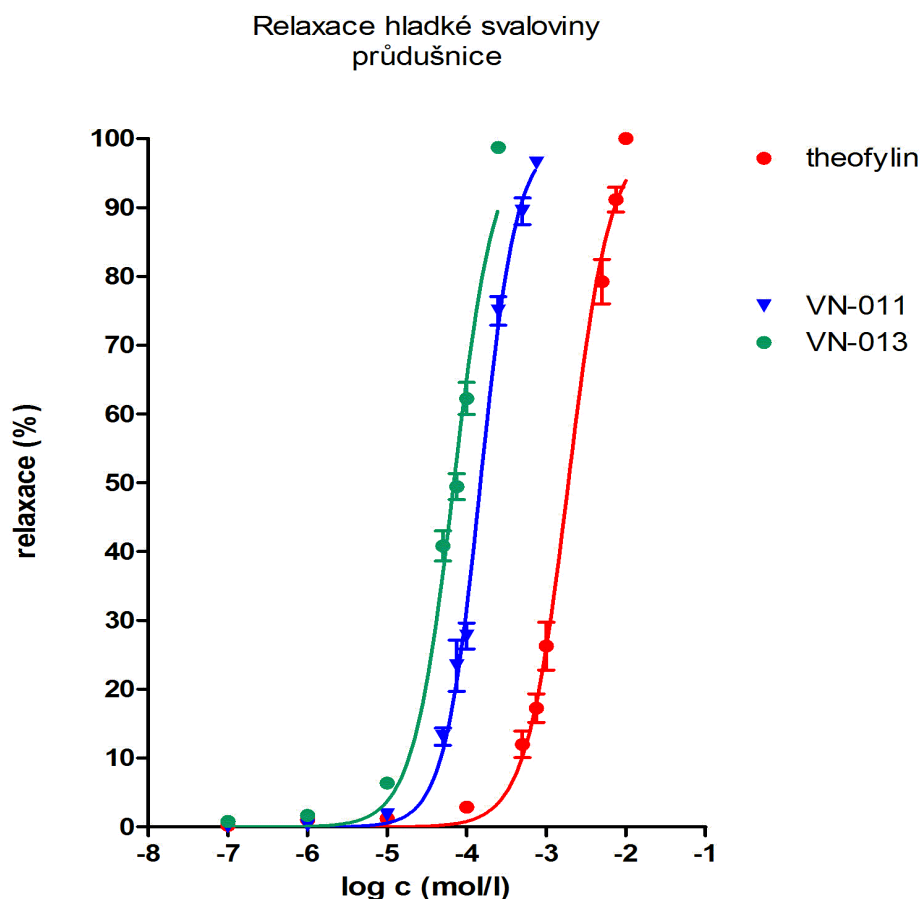
Tab. č. 9 Relaxace izolované průdušnice látkou VN-013 (%)

| | Konc.(M) | VN013-1 | VN013-1 | VN013-1 | VN013-1 | VN-013-3 | VN-013-3 | VN-013-3 | VN-013-3 |
|----------|------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| VN-013 | 10^{-7} M | 1,10 | 0,53 | 1,23 | 1,53 | 0,00 | 1,06 | 0,83 | 2,99 |
| | 10^{-6} M | 1,10 | 1,58 | 1,23 | 2,29 | 0,97 | 3,19 | 2,50 | 4,48 |
| | 10^{-5} M | 5,49 | 7,89 | 5,52 | 8,40 | 4,85 | 5,32 | 6,67 | 7,46 |
| | 5×10^{-5} M | 31,87 | 45,79 | 31,90 | 47,33 | 42,72 | 44,68 | 48,33 | 34,33 |
| | $7,5 \times 10^{-5}$ M | 40,66 | 54,21 | 41,10 | 51,91 | 52,43 | 53,19 | 51,67 | 44,78 |
| | 10^{-4} M | 58,24 | 65,26 | 52,15 | 53,44 | 66,02 | 64,89 | 62,50 | 62,69 |
| | $2,5 \times 10^{-4}$ M | 100,00 | 99,47 | 99,39 | 98,47 | 97,09 | 98,94 | 100,00 | 98,51 |
| teofylin | 10^{-2} M | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |

Tab. č. 10 Průměr hodnot z Tab. 10 pro látku VN-013 odečtené v procentech

| | | PRŮMĚR | sem (ds.est/n) | n |
|------------------|------------------|---------------|-----------------------|----------|
| VN-013 | 10-7M | 1,03 | 0,30 | 10 |
| | 10-6M | 2,14 | 0,38 | 10 |
| | 10-5M | 6,38 | 0,42 | 10 |
| | 5*10-5M | 40,81 | 2,19 | 10 |
| | 7,5*10-5M | 49,42 | 1,88 | 10 |
| | 10-4M | 62,24 | 2,32 | 10 |
| | 2,5*10-4M | 98,99 | 0,30 | 10 |
| | 5*10-4M | | | |
| 7,5*10-4M | | | | |
| teofylin | 10-2M | 100,00 | 0,00 | |

Ze získaných výsledků procentuální relaxace tracheálních preparátů byl vypracován graf č.3, který zobrazuje vztah mezi dávkou a účinkem testovaných látek v porovnání s teofylinem. DRC křivka byla získána metodou nelineární regrese. Hodnota ED_{50} pro látky VN-011 a VN-013 byla odečtena z grafu č. 3. pomocí programu GraphPad Prism 5. Křivka a hodnotu ED_{50} pro teofylin byla převzata z diplomové práce (27).

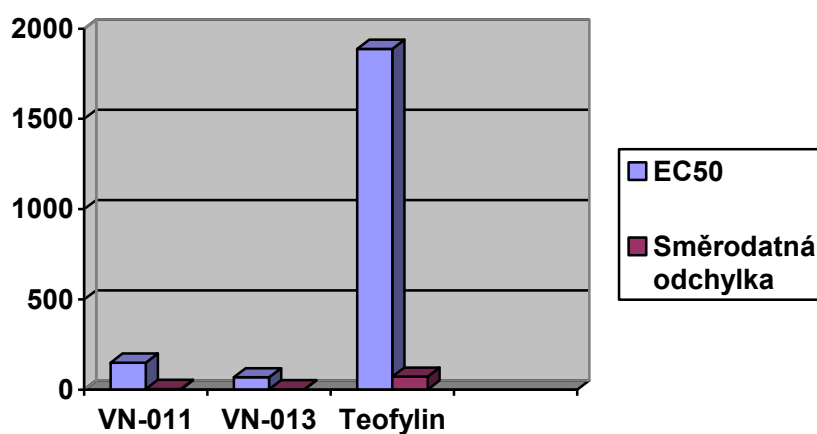


Graf č.3 Křivky závislosti účinku na dávce ukazující relaxační účinek derivátů chinazolinu s etyloxy- a etylsulfanyl fragmentem v porovnání s teofylinem. Kontrakce izolované průdušnice byla navozena karbacholem ($10^{-5} M$), maximální relaxace byla navozena teofylinem ($10^{-2} M$) podaným na konci experimentu.

Tab. č. 11 Hodnoty EC₅₀ pro testované látky

Statistické hodnocení bylo provedeno one-way ANOVA testem. Relaxace je považována za signifikantní pokud $P < 0,05$

| Testovaná látka | EC ₅₀ ±SEM (μmol/l) | Statistická významnost vůči teofylinu |
|-----------------|-----------------------------------|--|
| VN-011 | 149±4,0 | ano |
| VN-013 | 69±2,0 | ano |
| Teofylin | 1888±72 | |



Graf č. 4. Zobrazení hodnot EC₅₀ a směrodatných odchylek pro testované látky a teofylin ve formě sloupcového grafu.

5. DISKUZE

VN-011 a VN-13 jsou deriváty odvozené od chinazolinového alkaloidu vasicinu, který je obsažen v indické rostlině *Justicia adhatoda*. Ta je už po tisíciletí používána v tradiční indické medicíně, zejména k léčení astmatu, bronchitidy, tuberkulózy a dalších plicních a respiračních poruch (4). Alkaloidy vasicin a jeho autooxidační produkt vasicinon prokázaly bronchodilatační a antihistaminový efekt. Aktivita je porovnatelná s teofylinem jak *in vitro* tak *in vivo*, přičemž levotočivé formy jsou více účinné než jejich racemická směs. Vasicinon ukázal bronchodilatační aktivitu *in vitro*, ale bronchokonstrikční *in vivo*, což je pravděpodobně způsobeno jeho biotransformací *in vivo*. Oba alkaloidy v kombinaci 1:1 vykazovaly výraznou bronchodilatační aktivitu jak *in vivo*, tak *in vitro* (9).

Při vývoji nových léčiv se často získávají látky s vyšší účinností cestou chemické obměny původní přírodní molekuly. Vzhledem k tomu, že bronchodilatační účinek je přisuzován 4-hydroxychinazolinu (9), očekávali jsme, že látky VN-011 a VN-13 budou taktéž vykazovat bronchodilatační aktivitu. Deriváty VN-011 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethoxy]chinazolin a VN-013 4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]chinazolin byly testovány na potkaní průdušnici, která byla kontrahována karbacholem. Pro zjištění účinnosti byl použit jako teofylin a byla určena EC_{50} . Efektivní dávka pro VN-011 byla stanovena $149 \pm 4,0 \mu\text{mol/l}$ a pro VN-013 $69 \pm 2,0 \mu\text{mol/l}$.

Obě testované látky (s etoxy- a etylsulfanylovým fragmentem) mají tedy signifikantně vyšší dilatační účinky na hladký sval průdušnice u potkana než teofylin (tab. X, graf č.X). Hodnoty EC_{50} těchto derivátů jsou mnohonásobně nižší (13krát pro VN-011 a 27krát pro VN-013) než je hodnota pro teofylin.

Námi získané výsledky je však obtížné srovnat s publikovanými daty účinků derivátů chinazolinu na hladkou svalovinu, poněvadž šlo o zcela nové struktury, jejichž účinnost ještě nebyla prověřována. Dále porovnání s jinými deriváty ztěžuje odlišné pokusné uspořádání, ať už jde o jiný druh laboratorního zvířete (velmi často morče) nebo použití jiné kontrakční substance (velmi často histaminu) nebo srovnávací látky (velmi často salbutamolu). Nicméně velmi nadějným derivátem vasicinu se jeví látka

2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on (označovaná jako 95-4). Tato látka byla testována za použití trachey z morčete a navození kontrakce acetylcholinem a histaminem a vykazovala výrazný bronchodilatační účinek (12,16). EC_{50} látky 95-4 při sledování relaxačního efektu na průdušnici kontrahované Ach byla 4×10^{-5} , po kontrakci histaminem $1,2 \times 10^{-5}$. 95-4 byla shledána jako víc účinná než teofylin a méně než salbutamol v základní dávce - viz Tab. č.1 (12).

Pro další obměnu struktury za účelem získání nových látek s bronchodilatačním účinkem bychom navrhovali použití halogenů jako substituentů. V případě 6-substituovaných benzimidazo[1,2-c] hinazolinů a 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolinů se substituce halogenem ukázala jako pozitivní. 10-iodo-6-(n-propyl)-benzimidazol[1,2-c]chinazolin a 9-jodo-5-(n-propyl)-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin vykazovaly větší účinek než jejich nehalogenované analogy (11, 17).

6. ZÁVĚR

Na základě předpokladu, že sloučeniny VN-011 a VN-013 mají bronchodilatační účinek, byla aktivita těchto látek porovnávána s aktivitou teofylinu, který se pro svůj výrazný bronchodilatační efekt používá jako standard. Relaxační účinek každé dávky byl vyjádřen jako procento z maximální relaxace, která byla navozena teofylinem.

Testované látky byly odvozeny z obsahových látek Justice adhatody (syn. Adhatoda vasica, čeled' Acanthaceae). Tato indická rostlina obsahuje chinazolinové alkaloidy vasicin a vasicinon, které disponují bronchodilatačním účinkem. Vzhledem k tomu, že bronchodilatační aktivita těchto látek je přisuzována 4-hydroxychinazolinu (9), byla pro syntézu derivátů VN-011 a VN-013 tato struktura výchozí. VN-013 nese na svém chinazolinovém kruhu ethylsulfanylovou skupinu a látka VN-011 ethoxy skupinu.

Účinnost těchto látek byla vyjádřena jako EC_{50} , tedy efektivní koncentrace, která vyvolává 50% maximálně možné reakce, anebo při které dosahujeme očekávaného účinku v 50% případů (19). EC_{50} pro VN-011 byla stanovena na $149 \pm 4,0 \mu\text{mol/l}$ a pro VN-013 na $69 \pm 2,0 \mu\text{mol/l}$.

Obě námi testované látky VN-011 a VN-013 mají statisticky významně vyšší relaxační účinky na hladkou svalovinu průdušnice potkana ve srovnání s teofylinem.

7. SEZNAM LITERATURY

1. <http://www.avicenna.cz/item/adhatoda-vasica/category/rostliny> (staženo, 11/2007)
2. <http://www.iloveindia.com/indian-herbs/adhatoda-vasica.html> (staženo, 11/2007)
3. Claeson U. P. et al. *Journal of Ethnopharmacology* 72 (2000), 1-20
4. <http://www.herbal-supplement-resource.com/adhatoda-vasica.html>
(staženo, 11/2007)
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Justicia_adhatoda#searchInput (staženo, 11/2007)
6. http://www.globalherbalsupplies.com/herb_information/adhatoda_vasica.htm
(staženo, 11/2007)
7. <http://www.sbepl.com/adhatoda-vasica.html> (staženo, 11/2007)
8. <http://www.womenshealth.com> (staženo, 11/2007)
9. <http://www.nature.com/nature/journal/v196/n4860/abs/1961217a0.html>
(staženo, 11/2007)
10. Johri RK, Zutshi U. Mechanism of action of 6, 7, 8, 9, 10, 12-hexahydro-azepino-[2, 1-b] quinazolin-12-one-(RLX)--a novel bronchodilator. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2000 Jan; 44(1).
11. 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)
12. Zabeer A, Bhagat A, Gupta OP et al. Synthesis and bronchodilator activity of new quinazolin derivative. *Eur J Med Chem.* 2006 Mar; 41(3):429-34.
13. Hardtmann GE, Koletar G, Pfister OR et al. Synthesis and biological evaluation of some 10-substituted 2,3-dihydroimidazo[2,1-b]quinazolin-5(10H)-ones, a new class of bronchodilators. *J Med Chem.* 1975 May; 18(5):447-53.
14. Combs DW, Rampulla MS, Russell RK et al. Design, synthesis and bronchodilatory activity of a series of quinazoline-3-oxides. *Drug Des Deliv.* 1990 Oct; 6(4):241-54.

15. Ojo B, Findsen LA, Igarashi N et al. Synthesis and bronchodilatory activity of four new derivatives of deoxyvasicine. *Drug Des Discov.* 1996 Mar; 14(1)
16. <http://www.pharmainfo.net/reviews/chemistry-quinazolinones> (staženo, 9/2009)
17. Bahekar RH, Rao AR. Bronchodilation and structure-activity relationship studies on new 6-substituted benzimidazo[1,2-c]quinazolines. *Arzneimittelforschung.* 2000 Aug; 50(8)
18. Autorský kolektiv, *Remedia Compendium čtvrté vydání*, Panax Co, Praha 2009, 946 stran
19. Lüllmann H. a kol.: *Farmakologie a toxikologie, překlad 15., zcela přepracovaného vydání, vydání 2. české*, Grada Publishing, a.s, Praha 2004, 728 stran
20. <http://www.farmakoterapie.cz/cz/Clanek/1096> (staženo, 9/2009)
21. Fendrich Z. a kol.: *Farmakologie pro farmaceuty I.*, Univerzita Karlova v Praze Nakladatelství Karolinum, Praha 2002, 207 stran
22. <http://old.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/anatomie.htm> (staženo, 9/2009)
23. Nejedlý, K.: *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*, 2. vydání, SPN Praha, 1967, 629 stran
24. Propesko, P., Rajtová, V., Horák, J.: *Atlas anatomie malých laboratorních zvířat, Díl 2, Potkan, myš, chrček zlatý*, Příroda Bratislava, 1990, 253 stran
25. Lincová, D., Farghali H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 1. vydání, Galén Praha, 2002, 601
26. <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Schultz-Dale+reaction> (staženo, 9/2009)
27. DP Barbora Schmidtová: *Hodnocení účinků bronchoprotektivních látek.*
Diplomová práce, katedra farmakologie a toxikologie, FafUK, Hradec Králové, 2009, 70 pp.

ABSTRAKT

Vasicin je chinazolinový alkaloid obsažený v rostlině *Justicia adhatoda* (syn. *Adhatoda vasica*, Acanthaceae). Tato indická rostlina je už po tisíciletí používána v tradiční indické medicíně zejména k léčení astmatu (4). Cílem předkládané práce bylo stanovit bronchodilatační účinky nových derivátů 4-hydroxychinazolinu, a to VN-011 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethoxy]chinazolin) a VN-013 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]chinazolin). K zjišťování relaxační aktivity testovaných látek jsme použili metodiku izolované průdušnice potkana, kterou jsme kontrahovali karbacholem v koncentraci 10^{-5} M a maximální relaxaci na konci experimentu navodili teofylinem o koncentraci 10^{-2} M. Pomocí programu GraphPad jsme z DRC křivek prověřovaných látek vypočítali hodnoty EC_{50} ($149 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/l}$ pro VN-011 a $69 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/l}$ pro VN-013). Námi získané výsledky jsme porovnávali se standardním bronchodilatačním léčivem teofylinem - hodnota EC_{50} 1888 ± 72 $\mu\text{mol/l}$ byla převzata z diplomové práce (27). Oba testované deriváty (s etoxy- a etylsufanylovým fragmentem) vykázaly na základě srovnání hodnot EC_{50} signifikantně vyšší dilatační účinky na hladký sval průdušnice u potkana než teofylin.

Vasicine is a quinazoline alkaloid contained in the plant *Justicia adhatoda* (syn. *Adhatoda Vasic*, Acanthaceae). The Indian plant is already used for thousands of years in traditional Indian medicine to treat asthma in particular (4). The aim of presented work was to determine the bronchodilatory effect of new derivatives of 4-hydroxyquinazoline, respectively VN-011 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethoxy]quinazoline) and VN-013 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]quinazoline). The survey relaxing activity test substances, we used the methodology isolated rat trachea, which was contracted by carbachol at concentration of 10^{-5} M and maximum relaxation at the end of the experiment was induced by theophylline in concentration of 10^{-2} M. Using GraphPad the DRC, we examined substances calculated curves of EC_{50} ($149 \pm 4,0$ $\mu\text{mol/l}$ for VN-011 a $69 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/l}$ for VN-013) Our obtained results were compared with standard drug theophylline - EC_{50} was taken from the thesis (27). Both the tested derivatives (with ethoxy- and etylsufanyl fragment) showed by comparing of EC_{50} significantly higher dilatatory effects on smooth muscle of the trachea in rats than theophylline.

