

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



DIZERTAČNÍ PRÁCE

STUDIUM ÚČINKŮ VYBRANÝCH LÁTEK
NA RESPIRAČNÍ SYSTÉM POTKANA
METODAMI *IN VIVO* A *IN VITRO*

Hradec Králové, 2009

Mgr. Martina Kottová

Tuto práci jsem vypracovala pod vedením školitelky PharmDr. Jany Pourové, Ph.D. Prohlašuji, že dizertační práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, ze kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Martina Kottová

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Janě Pourové, Ph.D., školitelce mé dizertační práce, za odborné vedení a rady, které mi ochotně poskytovala v průběhu celého postgraduálního studia. Ráda bych také poděkovala PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za laskavou pomoc a vstřícnou spolupráci.

Můj další dík patří Prof. RNDr. Milanu Pourovi, Ph.D., PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D., Prof. RNDr. Lud'ku Jahodářovi, CSc. a PharmDr. Janě Karličkové, Ph.D. za poskytnutí testovaných látek a odborných konzultací, dále Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc., laborantkám Jitce Michlové a Pavlíně Jamborové a všem dalším, kteří mi byli jakkoli nápomocni.

Martina Kottová

I. ÚVOD	8
II. CÍL PRÁCE	10
III. TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1. ASTHMA BRONCHIALE.....	13
3.1.1. Definice astmatu.....	13
3.1.2. Etiopatogeneze a patofyziologie astmatu.....	13
3.1.2.1. Extrinsic astma.....	17
3.1.2.2. Intrinsic astma.....	19
3.1.2.3. Zánětlivé změny dýchacích cest.....	20
3.1.2.4. Bronchiální hyperreaktivita.....	22
3.1.2.5. Obstrukce dýchacích cest.....	22
3.1.3. Prevence astmatu.....	23
3.1.4. Farmakoterapie astmatu.....	24
3.1.4.1. Preventivní antiastmatika.....	25
3.1.4.2. Úlevová antiastmatika.....	30
3.2. OXIDAČNÍ STRES A JEHO ROLE U ASTHMA BRONCHIALE.....	32
3.2.1. Role volných radikálů v patogenezi astmatu.....	34
3.2.2. Antioxidační ochrana respiračního systému.....	34
3.2.2.1. Enzymatické antioxidanty.....	35
3.2.2.2. Neenzymatické antioxidanty.....	36
3.3. ÚČINKY DERIVÁTŮ CHINAZOLINU NA RESPIRAČNÍ SYSTÉM.....	38
3.3.1. Účinky chinazolinových alkaloidů obsažených v <i>Justicia adhatoda</i>	38
3.3.1.1. Farmakologické studie <i>Justicia adhatoda</i>	40
3.3.1.2. Farmakokinetika vasicinu.....	41
3.3.1.3. Toxikologické studie.....	41
3.3.2. Účinky syntetických derivátů vasicinu a chinazolinu.....	43
IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
4.1. <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTY.....	50
4.1.1. Zvířata a použitý materiál.....	50
4.1.1.1. Zvířata.....	50
4.1.1.2. Testované látky.....	50
4.1.1.3. Chemikálie.....	50
4.1.1.4. Přístroje.....	51
4.1.2. Metodika modelu alergického astmatu.....	51
4.2. <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTY.....	55
4.2.1. Zvířata a použitý materiál.....	55
4.2.1.1. Zvířata.....	55
4.2.1.2. Testované látky.....	56
4.2.1.3. Chemikálie.....	56
4.2.1.4. Přístroje.....	56
4.2.2. Metodika izolované průdušnice.....	57
4.2.3. Přírodní látky testované in vitro.....	59
4.2.4. Syntetické látky testované in vitro.....	60
4.2.4.1. Vasicinon.....	60
4.2.4.2. 4-hydroxychinazolin a jeho jednoduché deriváty.....	60
4.2.4.3. Chinazolin s etylaminovým fragmentem.....	62

4.2.4.4. Chinazolin s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem	63
V. VÝSLEDKY	65
5.1. <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTY	66
5.1.1. Bronchiální reaktivita	66
5.1.2. Analýza BALF.....	66
5.1.3. Histopatologická analýza.....	67
5.2. <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTY	72
5.2.1. Relaxační účinky chinazolinových alkaloidů izolovaných z <i>Justicia adhatoda</i> ...	72
5.2.2. Porovnání relaxačních účinků přírodního a syntetického vasicinonu	73
5.2.3. Relaxační účinky syntetických derivátů chinazolinu	75
5.2.3.1. Relaxační účinek 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů ...	75
5.2.3.2. Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem	76
5.2.3.3. Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem	78
5.2.4. Porovnání relaxačních účinků všech testovaných látek	79
VI. DISKUZE	81
6.1. <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTY	82
6.2. <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTY	87
VII. ZÁVĚR	90
7.1. <i>IN VIVO</i> EXPERIMENTY	91
7.2. <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTY	92
VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	94
IX. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH A VĚDECKÝCH PRACÍ	106
X. SOUHRN	108
XI. PŘÍLOHY	117

5-HT	5-hydroxytryptamin, serotonin
a.	arterie, tepna
BALF	bronchoalveolar lavage fluid (tekutina bronchoalveolární laváže)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	cluster of differentiation (soubor povrchových znaků na buňkách)
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
COX-2	cyklooxygenáza 2
DRC	dose-response curve (křivka závislosti účinku na dávce)
ED ₅₀	dosis effectiva media (střední účinná dávka)
FEV ₁	forced expiratory flow (usilovně vydechnutý objem za 1. sekundu)
FR	fyziologický roztok
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor (faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů)
GSHPx	glutathionperoxidáza
HLA	human leukocyte antigens (antigeny lidských leukocytů)
15-HETE	hydroxyeikosatetraenová kyselina
i.m.	intramuskulární podání látky
i.p.	intraperitoneální podání látky
i.v.	intravenózní podání látky
ICAM	intercellular adhesion molecule (adhezní molekula)
IgE	imunoglobulin E
IKS	inhalační kortikosteroidy
IL	interleukin
IU	international unit (mezinárodní jednotka)
<i>J.</i>	<i>Justicia</i> (rodový název léčivé rostliny)
LABA	long-acting β_2 agonists (β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem)
M _R	molekulová hmotnost
NANC	non-adrenergní, non-cholinergní
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NÚ	nežádoucí účinky

OA	ovalbumin
PEF	peak expiratory flow (vrcholový výdechový průtok)
PG	prostaglandin
RANTES	regulated upon activated normal T expressed and presumably excreted chemokine (cytokin uvolňovaný cytotoxickými T lymfocyty)
RNS	reactive nitrogen species (reaktivní formy dusíku)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
RTLFL	respiratory tract lining fluid (tekutina pokrývající dýchací cesty)
s.c.	subkutánní podání látky
SABA	slow-acting β_2 agonists (β_2 mimetika s krátkodobým účinkem)
SEM	standard error of the mean (směrodatná odchylka průměru)
SIT	specific immunotherapy (specifická alergenová imunoterapie)
SOD	superoxiddismutáza
Th	pomocné lymfocyty
v.	véna, žíla
VCAM	vascular cell adhesion molecule (adhezní molekula)
WHO	World health organization (Světová zdravotnická organizace)

I. ÚVOD

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest známé více než 2 000 let. Jde o celoživotní onemocnění, které dosud není zcela vyléčitelné.

Podle epidemiologických statistik postihuje astma přibližně 300 milionů osob a jeho incidence v posledních desetiletích neustále stoupá. Onemocnění se vyskytuje ve všech oblastech světa, častěji však v zemích ekonomicky více rozvinutých. V Evropě a Spojených státech je prevalence astmatu 5–10 % u dospělých a 10–15 % u dětí. V České republice se celková prevalence astmatu pohybuje kolem 8 %, u dětí je vyšší (12–15 %). Diagnóza astmatu je i v České republice stále podhodnocována. Odhaduje se, že u nás není diagnostikováno cca 250 000-350 000 astmatiků (www.ginasthma.org).

Dvě třetiny všech diagnostikovaných případů spadají do dětského věku a do puberty. V dětství převažuje výskyt astmatu u chlapců (téměř 2:1 k dívkám), ústup příznaků po pubertě se pak pozoruje rovněž častěji u chlapců. V pubertě se poměr pohlaví vyrovnává a ve věku nad 40 let významně převažují ženy. Vliv ženských pohlavních hormonů naznačuje často pozorovaná exacerbace před menstruací nebo v jejím průběhu (premenstruální astma). U žen se také udává vyšší mortalita, zvláště v souvislosti s vyšší incidencí astmatu s rychlým a nepředvídatelným nástupem zhoršení (Kašák, 2005).

Na patogenezi astmatu participují mnohé faktory, mimo jiné i oxidační stres. U zdravého organismu je toxicita volných radikálů potlačena mnohými enzymatickými i neenzymatickými antioxidačními systémy. U astmatiků je funkce těchto endogenních systémů narušena kvůli změnám aktivity antioxidačních enzymů a vitaminů v respiračním systému (Kelly et al., 1999). Nerovnováha mezi oxidanty a antioxidanty samozřejmě není jedinou příčinou patogeneze astmatu, nicméně její role je důležitá a podílí se na progresi onemocnění.

Přes rozšiřující se škálu a množství používaných antiastmatik morbidita i mortalita astmatu neustále roste – celosvětová mortalita je nyní odhadována na 250 000 osob ročně (www.ginasthma.org). Stávající prevalence astmatu proto vyžaduje dynamický vývoj nové léčby. Existuje několik cest, kterými se může ubírat vývoj nových léčiv. Vždy je důležité vytipování účinné látky na základě poznání patogeneze choroby. Hledání nového léčiva může být rovněž inspirováno znalostmi o účinných látkách rostlinných drog, přičemž se prostřednictvím experimentálních výzkumů pokoušíme odhalit a popsat strukturu, která je zodpovědná za dané účinky léčivé rostliny.

II. CÍL PRÁCE

Cílem této dizertační práce bylo zhodnotit účinky antioxidačně působícího α -tokoferolu na *in vivo* modelu alergického astmatu potkana, tj. stanovit změny bronchiální reaktivity, míru infiltrace zánětlivých buněk do plic a histopatologické změny v respiračním systému potkanů.

Dalším cílem bylo studium účinků vybraných látek metodou *in vitro*. Prvním dílčím úkolem bylo zhodnocení relaxačních účinků přírodních chinazolinových alkaloidů obsažených v *Justicia adhatoda* (léčivá rostlina používaná v lidovém léčitelství) na hladkou svalovinu izolované průdušnice potkana. Druhým úkolem bylo stanovení relaxační aktivity vybraných syntetických derivátů chinazolinu, případně odhalení závislosti mezi strukturou a relaxačním účinkem testovaných syntetických derivátů.

III. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ASTHMA BRONCHIALE

3.1.1. DEFINICE ASTMATU

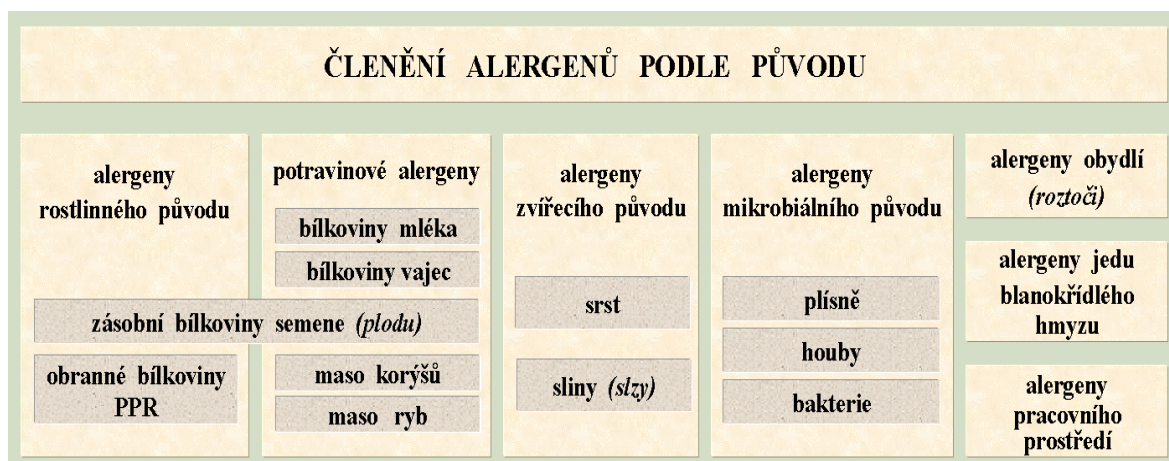
Asthma bronchiale je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky a buněčné působky. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíhy na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně, nebo vlivem léčby (www.ginasthma.org).

K zásadnímu pokroku v poznání významu zánětu u astmatu došlo až v posledních třiceti letech. Nyní je astma chápáno jako nemoc dlouhodobého charakteru probíhající i v době, kdy nejsou zjištěny funkční změny a pacient je bez obtíží.

Ve starověku byla dušnost u astmatu vysvětlována zvýšenou sekrecí hlenu, který byl po dlouhou dobu jediným zevně patrným obstrukčním faktorem. Koncem 17. století předpokládal John Floyer, že dušnost je způsobena akutním zúžením průdušek. O necelé století později pak William Cullen navrhl bronchospasmus jako vlastní podstatu astmatu. Velký pokrok v pochopení astmatu učinil v 19. století Henry Hyde Salter, který mj. popsal řadu typických spouštěčů astmatického záchvatu (zvířecí chlupy, peří aj.). Jeho koncepce přetrvala s různými obměnami celé století a postupně vedla k vývoji řady bronchodilatačních látek od efedrinu, adrenalinu a teofylinu přes isoproterenol až po selektivní dlouhodobá β_2 mimetika. Postupem času přestalo být astma chápáno jako pouhé záchvaty dechových obtíží, ale začalo být vnímáno jako chronické onemocnění, kde jsou primární příčinou zánětlivé a strukturální změny dýchacích cest (Kašák, 2005).

3.1.2. ETIOPATOGENEZE A PATOFYZIOLOGIE ASTMATU

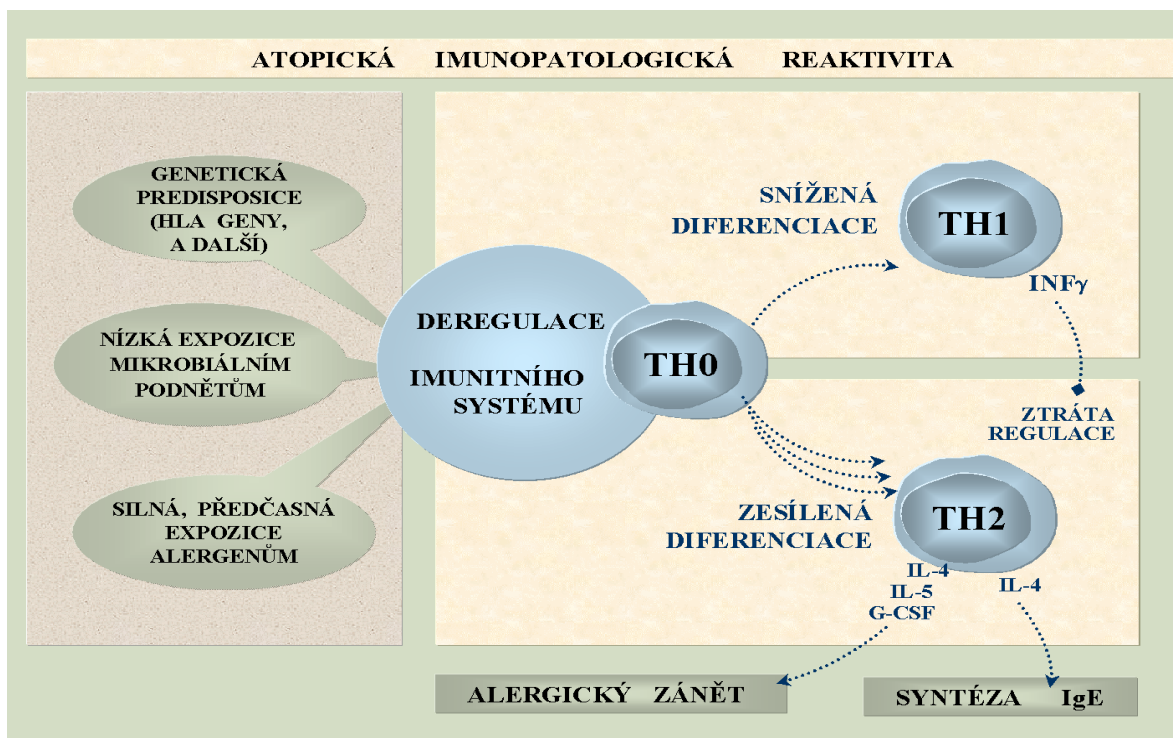
Hlavním znakem bronchiálního astmatu je chronický zánět dýchacích cest doprovázený hyperreaktivitou. Hypersenzitivní reakci spouští řada podnětů: alergenů (obr. 1), viry, vzdušné polutanty (O_3 , SO_2), ale i námaha, chlad nebo stres (Fendrich et al., 2002).



Obr. 1 Členění alergenů podle původu. (PPR – pathogen pattern receptors; receptory, kterými imunitní systém identifikuje molekulární vzory na povrchu mikroorganismů). Převzato z Krejsek, Kopecký, 2004. Upraveno.

Při vzniku astmatu mají roli jak genetické, tak vnější faktory (obr. 2). Genetická dispozice je úzce spjata s atopií, přičemž atopií rozumíme vystupňovanou tvorbu IgE v odpovědi na běžné alergeny. Pro diagnózu atopie je charakteristické zvýšení IgE celkového nebo specifického v séru, pozitivní kožní test na jeden či více alergenů, zvýšená reaktivita kůže, nosu, bronchů, střev, cév a nervů. V populaci je asi 30-50 % atopiků. Jen málo z nich má klinickou symptomatologii. Dispozice je dědičná, jde o polygenní autozomálně recesivní přenos, v němž se uplatňují geny na 5. a 11. chromozómu (Bureš, Horáček, 2003). Bylo popsáno zhruba 18 oblastí genomu, kde se pravděpodobně nacházejí geny, jejichž produkty jsou součástí abnormální atopické reaktivity. Na krátkém raménku 5. chromozomu jsou kódovány cytokiny IL-4, IL-13, IL-9, IL-15 a GM-CSF, jejichž produkty se nepochybně podílejí na patogenetických mechanismech alergického zánětu. Polymorfismus v promotorové oblasti genu pro IL-4 je asociován se zvýšenou hladinou IgE u osob s astmatem. Podobná asociace byla nalezena pro polymorfismus genu pro IL-13. Na 6. chromozomu určují rozvoj atopické reaktivity geny kódující molekuly HLA. Rozvoj atopické reaktivity manifestující se jako astma, bronchiální hyperreaktivita a atopický ekzém je spojen s polymorfismem genu kódujícím β řetězec Fc ϵ RI, nacházejícím se na chromozomu 11q. Na 12. chromozomu je lokalizován gen pro interferon γ , který působí proti aktivitě subsetu Th2 T lymfocytů (Krejsek, Kopecký,

2004). Je známo, že geneticky predisponovaný jedinec má porušenou rovnováhu pomocných lymfocytů ve prospěch Th2 lymfocytů (Bureš, Horáček, 2003), více viz kapitola 3.1.2.3. Na 14. chromozomu se nachází mimo jiné gen kódující transkripční jaderný faktor NF κ B, což je nejdůležitější transkripční faktor podílející se např. na expresi inducibilní NO-syntázy, COX-2, chemokinů, cytokinů a adhezních molekul. Na dlouhém raménku 20. chromozomu se nachází gen kódující molekulu ADAM-33, což je membránová metaloproteináza modulující buněčnou adhezi (Krejsek, Kopecký, 2004).



Obr. 2 Atopická reaktivita – důsledek genetické dispozice a působení vnějších faktorů. (G-CSF - faktor stimulující růst kolonií granulocytů; IL – interleukin; INF γ – interferon γ). Převzato z Krejsek, Kopecký, 2004.

Genetická predispozice je ovlivněna množstvím nepříznivých vnějších faktorů a to již od 22. týdne nitroděložního vývoje. Na etiopatogenezi astmatu se může podílet prenatální expozice tabákovému kouři, infekce a nevhodná strava v těhotenství (např. nedostatek vitamínu E) (Devereux et al., 2006; Kumar, 2008). Mimořádně rizikový je především novorozenecký a kojenecký věk (Brussee et al., 2005), ale senzibilizace může být prodělána kdykoliv v průběhu života. Mezi nejrizikovější faktory patří některé pylové

alergeny, alergeny roztoče domácího prachu (*Dermatophagoides pteronissinus*) a kočky domácí (*Felis domesticus*) a respirační infekce. Zajímavé výsledky přinesly studie zabývající se dětmi vyrůstajícími v tzv. farmářském prostředí (v našich podmínkách lze přirovnat k malým vesnicím). Tyto děti byly již od narození v kontaktu s hospodářskými zvířaty, což mělo za následek sníženou prevalenci pozdějšího rozvoje astmatu a alergií. Bylo zjištěno, že nejvýznamnějším faktorem farmářského prostředí je lipopolysacharidový endotoxin, který pomáhá navodit rovnováhu Th1 a Th2 lymfocytů posunutou ve směru převahy Th2, se kterou se člověk narodí (Horová, 2008).

Astma spojené s atopií se tradičně označovalo jako *extrinsic astma*, tj. alergické astma, v protikladu k *intrinsic astma*, které se projevuje i u osob bez prokázané alergie, častěji ve vyšším věku (Kašák, 2005). V současné době je na základě doporučení *Global Strategy for Asthma Management and Prevention* preferována klasifikace podle projevených příznaků nemoci, jejich frekvence a výskytu. Podle tohoto doporučení se astma dělí na intermitentní, lehké perzistující, středně těžké perzistující a těžké perzistující (obr. 3). Tento koncept přinesl výrazné zjednodušení a v České republice se velmi vžil (Bateman et al., 2008; Kašák, 2009).

KLASIFIKACE ZÁVAŽNOSTI ASTMATU			
	denní příznaky	noční příznaky	plicní funkce
stupeň 1 intermitentní	< 1x týdně mezi záchvaty bez příznaků, normální PEF	≤ 2x měsíčně	$\frac{PEF/FEV_1}{PEF} \leq 80\%$ PEF < 20 %
stupeň 2 lehké perzistující	> 1x týdně, ale < 1x denně záchvaty mohou omezovat běžnou činnost	> 2x měsíčně	$\frac{PEF/FEV_1}{PEF} \leq 80\%$ PEF < 20-30 %
stupeň 3 středně těžké perzistující	každý den záchvaty omezují běžnou činnost	> 1x týdně	$\frac{PEF/FEV_1}{PEF} \leq 60-80\%$ PEF > 30 %
stupeň 4 těžké perzistující	trvalé omezená tělesná aktivita	časté	$\frac{PEF/FEV_1}{PEF} \leq 60\%$ PEF > 30 %

Obr. 3 Klasifikace závažnosti astmatu (PEF - vrcholový výdechový průtok, FEV₁ – usilovně vydechnutý objem za 1. sekundu). Převzato z Krejssek, Kopecký, 2004. Upraveno.

Změny probíhající u astmatických pacientů nejlépe vystihuje klasický imunologický model, který popisuje reakci astmatika na alergen, tedy tzv. alergické astma.

3.1.2.1. EXTRINSIC ASTMA

V případě alergického astmatu nejprve dojde k senzibilizaci pacienta při prvním setkání s alergenem. Senzibilizace spočívá v aktivaci příslušného klonu T-buněk, které jsou následně schopné vytvářet B-buňky aktivující cytokiny, což vede produkci a uvolňování IgE. Kromě toho vznikají interleukiny, které mimo jiné indukují expresi IgE-receptorů hlavně na mastocytech, eozinofilech a makrofázích. IgE se naváže na své receptory na povrchu buněk a organismus je takto připraven na další setkání s alergenem. Nová expozice vyvolá v organismu odpověď, která může vyústit až v astmatický záchvat. Z časového hlediska ji lze rozdělit na časnou a pozdní reakci.

Časná reakce začíná navázáním antigenu na IgE na povrch mastocytů, eozinofilů a makrofágů. Vznik komplexu antigen-protilátka vede k uvolnění nitrobuněčných zásob celé skupiny mediátorů (histamin, leukotrieny B₄, C₄ a D₄, PGD₂ a PGF_{2α}, tromboxan A₂), které mají spazmogenní účinky a způsobí okamžitou bronchokonstrikci.

Pozdní reakce není přímo časově závislá na expozici alergenu. Vyskytuje se v různých intervalech od expozice a často bývá noční. Základem je progresivní zánět. Skládá se z mnoha dějů, které jsou navzájem propojeny, a jejichž postavení není zatím zcela objasněno. Mezi nejdůležitější patří chemotaxe, poškození epitelu dýchacích cest a vagový a axonový reflex.

➤ *Chemotaxe:* řada z mediátorů časné reakce vykazuje kromě bronchokonstrikčních účinků i chemotaktické působení. Díky nim dochází k infiltraci dalších buněk do dýchacích cest a jejich aktivaci, zejména cytokiny uvolňujících T lymfocytů, eozinofilů a neutrofilů. Ty samy uvolňují stejné chemotaktické mediátory a tím přispívají k další infiltraci a aktivaci buněk.

➤ *Poškození epitelu:* epitel je z velké části tvořen jednou vrstvou skvamózních buněk, které na svém povrchu nesou řasinky (buňky typu I). V menším množství obsahuje kubické sekreční buňky (buňky typu II), které produkují surfaktant. Povrch epitelu je pokryt tenkým filmem tvořeným surfaktantem a hlenem. Třetím typem buněk jsou

alveolární makrofágy. Netvoří sice přímo součást epitelu, ale jsou na něj přichyceny adhezí nebo se pohybují volně v lumen alveolu. Epitel dýchacích cest a makrofágy představují první „obranou linii“ respiračního systému. Pomocí fagocytózy a pohybu řasinek odstraňují vdechnuté cizí částice a mikroorganismy. Kromě toho epitelové buňky produkují PGE₂, který má inhibiční účinek na mastocyty a bronchiální hladký sval, a za normálních okolností tak brání přehnané reakci dýchacích cest.

Mediátory uvolněné při odpovědi na alergen (15-HETE – hydroxyeikosatetraenová kyselina, EMBP – eosinophil major basic protein, ECP – eosinophil cationic protein) způsobí poškození a odlučování buněk epitelu. Epitel se tak stává více propustným 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 vezikul více mediátorů zánětu. Zároveň je sníženo i inhibiční působení PGE₂ na hladký sval, což dále usnadní bronchokonstrikci. Ukázalo se, že poškozený epitel sám uvolňuje některé mediátory (15-HETE), které přispívají k jeho další lézi.

➤ *Vagový a axonový reflex:* inervaci dýchacích cest dělíme na cholinergní, adrenergní a non-adrenergní, non-cholinergní (NANC).

Cholinergní systém pokrývá celé dýchací cesty a senzorické vagové receptory jsou umístěny mezi buňkami epitelu a pod nimi. U astmatiků, kde je respirační epitel narušen, je působení na tyto receptory usnadněno a k podráždění stačí relativně menší podnět. Tím může být prach, cigaretový kouř, mechanická stimulace a v neposlední řadě mediátory zánětu. Výsledkem podráždění je vagový reflex a cholinergní bronchokonstrikce, kterou lze blokovat pomocí anticholinergních látek.

Adrenergní systém má nervová zakončení pouze v horních dýchacích cestách. V dolních dýchacích cestách, kde nemá vlastní inervaci, působí prostřednictvím cirkulujících katecholaminů na presynaptické β receptory cholinergního systému a tak nepřímo moduluje bronchomotorický tonus. Stimulace β receptorů vede ke snížení uvolňování acetylcholinu a projeví se bronchodilatací. Je snížena degranulace mastocytů a zvýšen transport iontů v epitelu, což vede k větší sekreci vody, nižší viskozitě hlenu a zlepšení mukociliárního transportu. Kromě toho se adrenergní stimulace projeví

v bronchiálních cévách (α_1 receptory), kde reguluje krevní tok a snižuje extravazaci plazmy vyvolanou mediátory zánětu. I tento děj nepřímo ovlivní reaktivitu dýchacích cest.

NANC systém nemá vlastní nervovou síť a působí prostřednictvím kotransmiterů klasických autonomních nervů. Kotransmitery jsou obvykle neuropeptidy, ale také puriny nebo NO. Účinky NANC systému dělíme na inhibiční (vedou k bronchodilataci, mediátor je např. NO) a na excitační (způsobují bronchokonstrikci). Mezi hlavní mediátory excitačního NANC systému patří tachykininy (substance P, neurokinin A, neurokinin B) a kalcitoninu podobný peptid (CGRP). Jsou umístěny v zásobních vezikulách zakončení sensorických nocicepčních nervů a tzv. C-vláken. Jak už bylo řečeno, nervová zakončení se nalézají v respiračním epitelu nebo pod ním a jejich stimulace je při poškození epitelu usnadněna. 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. Jsou ovlivněny i buňky zánětu a imunitní buňky. Kromě toho sensorické nervy inervují ganglia parasymptiku a tak uvolněné mediátory modulují gangliovou transmisi, což vyústí v gangliové reflexy. O významu excitačního NANC systému svědčí mimo jiné i to, že u pacientů s dlouhodobým či těžkým astmatem se zvyšuje množství nervů, které obsahují zásoby hlavního tachykininu substance P (Fendrich et al., 2002).

3.1.2.2. INTRINSIC ASTMA

Astmatická reakce vzniká i bez přítomnosti alergenu. Podnětem může být stres, námaha, chlad, virová infekce či vzdušné polutanty. I když mechanismus spuštění není zcela jasný, předpokládáme, že dochází stimulaci dráždivých receptorů sensorických nervů a uvolnění neuropeptidových mediátorů, které následně aktivují mastocyty a ostatní buňky. Další průběh je stejný jako u alergického astmatu (Fendrich et al., 2002).

Podle současného názoru se na vzniku a rozvoji astmatu podílí tři faktory:

- zánět dýchacích cest
- bronchiální hyperreaktivita
- intermitentní obstrukce dýchacích cest

3.1.2.3. ZÁNĚTLIVÉ ZMĚNY DÝCHACÍCH CEST

Chronický zánět je při astmatu přítomen vždy, bez ohledu na tíži choroby. Hlavní buněčné typy, které se podílejí na zánětu, jsou antigen prezentující buňky, Th2 lymfocyty, eozinofily, mastocyty, neutrofilové, makrofágy, bazofily a epitelové buňky.

Antigen prezentující buňky jsou zastoupeny zejména dendritickými buňkami, ale vlivem zánětlivých cytokinů (např. interferon γ) může jakákoli jaderná buňka exprimovat HLA II. třídy a stát se tak zdrojem aberantní prezentace antigenů (Kašák, 2005).

Lymfocyty se ve sliznici pacientů s bronchiálním astmatem nacházejí ve zvýšeném množství. Bylo potvrzeno, že hlavní podíl tvoří T lymfocyty CD4⁺, podle spektra produkovaných cytokinů především buňky druhého typu – Th2, které jsou zřejmě do zánětlivých změn u astmatu zapojeny v roli koordinátora. Samy se sice na výsledných změnách přímo nepodílejí, ale produkují celou řadu cytokinů, které se účastní řízení jak akutní, tak chronické reakce. Lymfocyty Th2 přebírají od buněk prezentujících antigen (dendritické buňky) v komplexu s HLA II. třídy informaci o alergenech v kontaktu s bronchiální sliznicí. Aktivované lymfocyty produkují bohaté spektrum cytokinů, které se podílejí na řízení zánětlivé reakce. Jde např. o IL-4, jehož nejdůležitější funkcí je stimulace B lymfocytů k produkci protilátek typu IgE, a který je sám induktorem diferenciaci lymfocytů typu Th0 na typ Th2. IL-4 má také schopnost indukovat expresi adhezních molekul na buňkách endotelu (ICAM-1, VCAM-1), které mj. umožňují adhezi eozinofilů na endotel cév. Dalším důležitým faktorem je IL-5, který stimuluje diferenciaci a aktivaci eozinofilů v kostní dřeni, má chemotaktickou aktivitu pro eozinofily a navíc pozitivně ovlivňuje zrání a prodlužuje přežívání těchto buněk tím, že negativně ovlivňuje jejich apoptózu. IL-13 indukuje tvorbu IgE (Špičák et al., 2004). Posunutí nerovnováhy ve prospěch Th2 lymfocytů má pro rozvoj alergického zánětu zásadní význam. Tato dysbalanční teorie Th1/Th2 lymfocytů je však v poslední době nahrazována teorií o snížení tvorby regulačních T lymfocytů, které kontrolují výkonné lymfocyty, což vede k rozvoji alergického onemocnění (Kašák, 2005).

Eozinofily jsou zcela jednoznačně významnými efektorovými složkami alergického zánětu. Diferencují se v kostní dřeni a jejich zralé formy cirkulují v krvi a mají tendenci se akumulovat ve sliznicích. Na jejich povrchu je exprimováno množství membránových molekul (např. adhezní molekuly, aktivační molekuly, receptory pro Fc fragment

imunoglobulinů, receptory pro složky komplementu, pro chemokiny, cytokiny a různé mediátory), pomocí kterých přijímají aktivační podněty různého původu (Krejsek, Kopecký, 2004). Aktivované eozinofily uvolňují velké množství mediátorů, které ovlivňují bronchiální hyperreaktivitu, kontrakci hladkých svalů, vazodilataci a významně se podílejí na poškozování epitelu bronchů. Zdrojem těchto mediátorů jsou eozinofilní granula obsahující bazické polypeptidy (hlavní bazický protein, eozinofilní kationický protein, eozinofilní neurotoxin) a eozinofilní peroxidázu. Eozinofily jsou mj. schopny autochemoatrakce (samy produkují své eozinofilní chemoatraktanty – eotaxin, IL-5, IL-8, RANTES), a tím samovolně udržují perzistenci zánětu. Množství eozinofilů a jejich proteinů v indukovaném sputu, v biopsiích, v bronchoalveolární laváži i v periferní krvi dobře koreluje s aktivitou astmatu.

Mastocyty (žírné buňky) jsou hlavními buňkami časně fáze alergické reakce i anafylaxe. Na jejich povrchu je exprimován vysokoafinitní receptor pro IgE (FcεRI), na který se svou Fc částí váže IgE stimulovaný alergenem. Po vazbě alergenu na dvě sousední molekuly protilátky IgE přítomné na membráně žírné buňky dojde k její degranulaci a uvolnění řady mediátorů (histamin, prostaglandiny, leukotrieny aj.), které vyvolávají bronchospasmus a dále přispívají k rozvoji zánětlivé odpovědi. Zároveň dochází k další tvorbě mediátorů a cytokinů. Mastocyty též odpovídají na stimulaci eozinofilními mediátory, a tím je podněcována jejich další exocytóza a novotvorba lipidových mediátorů (Kašák, 2005).

Neutrofily se podílejí na zánětlivých změnách dosud ne zcela jasným způsobem. Jejich migrace do určité míry koreluje s migrací eozinofilů, nebyl však prokázán přímý podíl neutrofilů na poškození epitelu ani na vzniku a vývoji průduškové hyperreakivity. Studie u některých forem těžkého astmatu zjistily zvýšený podíl neutrofilů v bronchoalveolární laváži a bylo vysloveno podezření, že u těchto forem nabývá neutrofilní infiltrace především v oblasti periferních dýchacích cest na významu a může korelovat se špatnou odpovědí na léčbu (Špičák et al., 2004).

Makrofágy se pravděpodobně podílejí na procesech poškozování a reparace s následkem přestavby dýchacích cest; degradují řadu makromolekul extracelulární matrix včetně elastinu a secernují růstové faktory, včetně základního růstového faktoru pro fibroblasty.

Bazofily mají svou základní funkci stejnou jako mastocyty, tj. produkci prozánětlivých mediátorů jako odpověď na přemostění molekul IgE navázaných na jejich povrchu. Bazofily však přispívají k pozdní fázi alergické reakce a samy secernují některé imunoregulační cytokiny, zejména IL-4 a IL-3.

Epitelové buňky jsou během alergického zánětu jednak poškozovány, jednak aktivovány. Po jejich aktivaci dochází k indukci tvorby zánětlivých cytokinů, receptorů, antigenu HLA II. třídy a adhezních molekul. Epitelové buňky za účasti NO-syntázy produkují oxid dusnatý působící vazodilataci a sekreci hlenu.

Zdrojem buněčných působků jsou i fibroblasty, buňky endotelu, hladkých svalů aj. Výsledkem těchto procesů je bezprostředně kontrakce hladkých svalů, dlouhodobě pak udržování chronického zánětu a přestavba (remodelace) dýchacích cest včetně novotvorby cév v bronchiální sliznici (Kašák, 2005).

3.1.2.4. BRONCHIÁLNÍ HYPERREAKTIVITA

Bronchiální hyperreaktivita je jedním z hlavních rysů bronchiálního astmatu. Jedná se o zvýšenou dispozici astmatika reagovat na podněty nadměrnou bronchiální obstrukcí. Je způsobena především zánětem probíhajícím ve sliznici dýchacích cest, dále hypertrofií a změněnými vlastnostmi hladkého svalu a dysbalancí autonomního nervového systému. Jak již bylo zmíněno, dispozice k bronchiální reaktivitě je geneticky podmíněná (mimo jiné se na ní podílí polymorfismus genů pro β_2 receptory) (Špičák et al., 2004).

3.1.2.5. OBSTRUKCE DÝCHACÍCH CEST

K obstrukci dýchacích cest vedou čtyři mechanismy: akutní bronchokonstrikce, edém vnitřní vrstvy průduškové stěny, hypertrofie hlenových žlázek a přestavba průduškové stěny.

Akutní bronchokonstrikce patří k fyziologickým obranným mechanismům, u astmatu se však objevuje jako reakce na jinak neškodné podněty. Bronchokonstrikce je nejčastěji vyvolána degranulací mastocytů závislou na IgE, např. po expozici inhalačnímu alergenu, jako časná astmatická reakce. Uvolněné mediátory působí kontrakci hladkého svalu. Nealergické podněty (tělesná zátěž, studený vzduch, výpary, silné emoční podněty –

pláč, smích) vyvolávají bronchokonstrikci různými kombinacemi přímé a nepřímé stimulace hladkého svalu.

Edém vnitřní vrstvy průduškové stěny charakteristicky nastává 6-24 hodin po kontaktu s alergenem (pozdní astmatická reakce).

Hypertrofie hlenových žlázek nastává v důsledku zvýšené sekrece hlenu a exsudace plazmatických proteinů. U těžkého astmatu potom tyto zátky uzavírají periferní průdušky a zabraňují průniku inhalovaného léku.

Přestavba průduškové stěny je dlouhodobým důsledkem probíhajícího zánětu a způsobí zafixování původně reverzibilní obstrukce. Strukturální změny zahrnují zejména zvýšené ukládání kolagenu a fibronektinu do intersticia přilehlého k vrstvě epitelu, hyperplazii pohárkových buněk a slizničních žlázek a hypertrofii hladkého svalu. Homogenní zesílení bazální membrány je morfologickým znakem astmatu a koreluje s intenzitou astmatického zánětu a tíží nemoci. Zesílení je částečně reverzibilní po léčbě vyššími dávkami inhalačních kortikosteroidů (Kašák, 2005).

3.1.3. PREVENCE ASTMATU

Primární prevence je prováděna před expozicí rizikovým faktorům, cílem je zamezení vzniku astmatu u rizikových osob, tj. především osob z atopických rodin. Za rozhodující období jsou považovány první roky života, k senzibilizaci plodu však může dojít již nitroděložně od 22. týdne gravidity. Jedním z účinných prenatalních i postnatálních opatření je zamezení expozice tabákovému kouři (Kašák, 2005). Dalším účinným postnatálním faktorem je co nejdříve období plné výživy mateřským mlékem. To má význam zejména proto, že se oddálí kontakt dítěte s nejdůležitějšími alergeny kravského mléka, mezi něž patří např. β -laktoglobulin a kasein (www.tigis.cz).

Sekundární prevence je zaměřena na jedince, u kterých již došlo k alergické senzibilizaci. Její snahou je zabránit rozvoji alergického zánětu se všemi jeho důsledky, včetně vzniku bronchiální hyperreaktivity. Je tvořena souborem několika opatření:

- ekologická intervence: má zajistit eliminaci kauzálně působících alergenů a omezit vliv tzv. „spouštěčů“ alergických potíží

- imunologická intervence: spočívá v zabránění rozvoje senzibilizace pomocí alergenové imunoterapie
- farmakoterapeutická intervence: prevenci vzniku astmatu působí dlouhodobé podávání některých antihistaminik u dětí s ekzémem nebo léčba nazálními steroidy u pacientů s rinitidou (www.tigis.cz).

Terciární prevence spočívá v omezení kontaktu astmatika s alergenem, čímž zabráníme spuštění alergické reakce. Proto je důležitá správná identifikace alergenu. Nejčastější metodou jsou alergologické testy (intradermální podání vybraných alergenů) či důkaz specifických protilátek v séru. Metoda prevence vystavení alergenem je dobře účinná, jedná-li se o lokalizovaný alergen (např. určité zvíře). Pokud je však alergen naopak široce rozšířený (např. domácí prach), je její realizace v praxi velmi obtížná (Fendrich et al., 2002).

3.1.4. FARMAKOTERAPIE ASTMATU

Hlavním cílem léčby je dostat astma pod kontrolu, tedy dosáhnout stavu, kdy má astmatik minimální nebo žádné chronické příznaky, minimální nebo žádné exacerbace (tj. epizody progresivního zhoršení dušnosti, kašle, pískotů či tíže na hrudníku), žádné mimořádné návštěvy zdravotnických zařízení, minimální, ideálně žádné užití záchranné léčby (tj. β_2 mimetik s rychlým nástupem účinku), žádné omezení životních aktivit včetně fyzické zátěže, denní variabilitu maximální výdechové rychlosti pod 20 % normy a minimální nebo žádné nežádoucí účinky léčby (www.ginasthma.org).

Vhodnou farmakoterapií se snažíme o dosažení kontroly příznaků a udržení nemoci v bezpříznakové formě. Antiastmatika používaná v současnosti lze rozdělit do dvou skupin:

- *Preventivní antiastmatika* mají protizánětlivé účinky, a proto představují hlavní a nejdůležitější složku léčby perzistujícího astmatu. Jejich podávání se označuje jako udržovací nebo dlouhodobá medikace.
- *Úlevová antiastmatika*, označovaná též jako záchranná antiastmatika, jsou rychle účinná bronchodilatancia určená k odstranění akutních potíží, především bronchokonstrikce. Nepůsobí protizánětlivě, a proto nemají vliv na průběh onemocnění z dlouhodobého hlediska (Kašák, 2005).

3.1.4.1. Preventivní antiastmatika

Preventivní antiastmatika se podávají denně a dlouhodobě. Zahrnují protizánětlivé léky a bronchodilatancia s dlouhodobým účinkem (inhalační a systémové kortikosteroidy, inhalační a perorální β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem, kromony, retardované metylxantiny a další léčiva) (Kašák, 2005).

INHALAČNÍ KORTIKOSTEROIDY (IKS; beclometason, budesonid, ciclesonid, fluticason, mometason – viz příloha 1A) jsou v současné době nejúčinnějšími protizánětlivými antiastmatiky – jejich nástup znamenal revoluci ve farmakoterapii astmatu. Jejich pravidelné podávání vede ke zlepšení plicních funkcí, snížení bronchiální hyperreaktivity, redukci frekvence a tíže exacerbací a ke zlepšení kvality života (Marek et al., 2005). Jsou indikovány u všech nemocných, kteří mají příznaky perzistujícího astmatu (Kašák, Pohunek, 2004). Je prokázáno, že pravidelné dlouhodobé užívání i malých dávek inhalačních kortikosteroidů snižuje mortalitu. Přerušением léčby dochází ke zhoršení choroby (Suissa et al., 2000).

Nežádoucí účinky IKS jsou hlavně lokální (chrapot, orofaryngeální kandidóza, příležitostný kašel z podráždění dýchacích cest), ale těmito účinkům lze předejít používáním inhalačního nástavce a výplachem úst po aplikaci. Systémové nežádoucí účinky se vyskytují jen zřídka, a to zejména při dlouhodobém podávání vysokých dávek. (Marek et al., 2005). Nejméně NÚ má pravděpodobně ciclesonid, protože je metabolizován na farmakologicky aktivní derivát až na úrovni bronchiální stěny (Manning et al., 2008; Pedersen et al., 2008; Vermeulen et al., 2007) a mometason, který se vyznačuje vysokou vazebností na plazmatické proteiny, čímž klesá pravděpodobnost vazby na extrapulmonální glukokortikoidní receptory (Baptist, Reddy, 2009).

Pokud není kontroly astmatu dosaženo nízkou dávkou IKS, jsou aditivními léky první volby β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem (LABA – long-acting β_2 agonists, viz dále). Kombinace IKS a LABA je účinnější než pouhé zvýšení dávky IKS (Greening et al., 1994; Pauwels et al., 1997; O'Byrne et al., 2001; Barnes, 2007; Shrewsbury et al., 2000; Kankaanranta et al., 2004; Prenner, 2008). IKS příznivě zasahují do působení β_2 mimetik tím, že zvyšují expresi β_2 receptorů, čímž brání rozvoji tolerance, která by mohla nastat při dlouhodobé monoterapii β_2 mimetiky (Kašák, 2007; Sin, Man, 2006; Barnes, 2002). LABA na druhou stranu připravují („primují“) kortikosteroidní receptor, který je vázaný

v cytosolu v inaktivní formě v multiproteinovém komplexu. Tím je usnadněn vznik aktivního komplexu kortikosteroid-receptor za přítomnosti menšího množství kortikosteroidu (Kašák, 2002). LABA zvyšují translokaci komplexu kortikosteroid-kortikosteroidní receptor do jádra buňky, kde dochází k uplatnění kortikosteroidu při genové transkripci, a navíc zvyšují rezidenční čas komplexu kortikosteroid-receptor v buněčném jádru. Díky interakci IKS a LABA se u astmatiků snižuje tvorba chemokinu RANTES, který je významným chemoatraktantem pro eozinofily (Kašák, 2007).

Logickým vyústěním těchto poznatků bylo zavedení *fixní kombinace*, kdy jsou IKS a LABA aplikovány současně z jednoho inhalátoru. V současné době jsou na českém trhu dostupné kombinace budesonid/formoterol, beclometason/formoterol a fluticason/salmeterol. Účinek fixní kombinace není pouze aditivní, ale synergický, což často umožňuje podávat nižší dávky jednotlivých složek, než by vyžadovalo podávání oddělené. Podle některých autorů je nejúčinnější fixní kombinace budesonid/formoterol, která údajně nejvíce snižuje incidenci těžkých exacerbací středně těžkého a těžkého astmatu a redukuje množství exacerbací vyžadujících hospitalizaci (Bousquet et al., 2007; Korn, 2008; McCormack, Lyseng-Williamson, 2007; Kašák, 2008a; O'Byrne, 2007). Jedna z recentních studií ovšem naznačuje, že mezi podáváním fixní kombinace budesonid/formoterol není v porovnání s fixní kombinací fluticason/salmeterol při kontrole astmatu žádný rozdíl (Busse et al., 2008).

SYSTÉMOVÉ KORTIKOSTEROIDY (metylprednisolon, prednison, triamcinolon - viz příloha 2A) mají na rozdíl od inhalačních výrazné vedlejší účinky, proto je dlouhodobá terapie nežádoucí. V rámci preventivní léčby se proto užívají pouze u těžkého perzistujícího astmatu. K dispozici jsou perorální, injekční a rektální lékové formy. V současné době se dává přednost perorální lékové formě podávané v jedné ranní dávce nebo alternativně obden ráno (Susa, 2003).

Nežádoucí účinky jsou značné: ovlivnění imunitních reakcí, snížení fibroplastických procesů (zpomalení hojení ran, atrofie podkoží a kůže), diabetogenní účinek, ovlivnění CNS (nespavost, motorický neklid, vertigo, z psychotických stavů především deprese a mánie), oční (indukce glaukomu), gastrointestinální (exacerbace vředové gastroduodenální choroby, žaludeční hemoragie), vliv na pohybové ústrojí (steroidní myopatie, osteoporóza), kardiovaskulární (hypertenze, urychlení vývoje arteriosklerózy,

zvýšená koagulabilita, edémy), metabolické (hyperlipidemie, hypercholesterolemie) a endokrinní (útlum růstu u dětí, sekundární amenorea, pokles potence a libida u mužů, útlum osy hypotalamus-hypofýza-nadledvinová kůra) (Mikroverze AISLP).

β_2 MIMETIKA S DLOUHODOBÝM ÚČINKEM (LABA - viz příloha 1B) jsou bronchodilatační látky, jejichž účinek přetrvává nejméně 12 hodin. Relaxují hladké svalstvo dýchacích cest, zlepšují mukociliární clearance, snižují vaskulární permeabilitu a mohou také modulovat uvolnění mediátorů z mastocytů a bazofilů. Při dlouhodobé léčbě vykazují mírný protizánětlivý účinek (Kašák, 2005). V inovovaných národních i celosvětových dokumentech jsou jednoznačně upřednostňována inhalační sympatomimetika (formoterol, salmeterol), protože ve srovnání s perorálními sympatomimetiky (clenbuterol, procaterol) mají nižší četnost i závažnost nežádoucích účinků (www.ginasthma.org; Kašák, 2008b). Formoterol kombinuje rychlý nástup účinku (do 1-3 minut po vdechnutí) s dlouhodobým působením, proto může být také podáván jako úlevové antiastmatikum (Buhl, Vogelmeier, 2007; Cates, Lasserson, 2009). Někdy je řazen do zvláštní skupiny – RABA (rapid-acting β_2 agonists - β_2 mimetika s rychlým nástupem účinku) (Kašák, 2008b). Rychlý nástup účinku je považován za jeho přednost a tato vlastnost je charakteristická i pro většinu v současnosti vyvíjených LABA – tj. vyvíjí se LABA i tzv. super LABA působící 24 hodin (např. indacaterol, u nás prozatím neregistrován) s rychlým nástupem účinku (Beeh et al., 2007; Kanniess, 2008).

Nežádoucí účinky perorálních a méně často i inhalačních β_2 mimetik zahrnují aktivaci sympatiku s projevy třesu, palpitace, tachykardie a periferní vazodilatace. Po vysokých dávkách se vzácně vyskytuje hypokalémie (riziko je zvýšené při současném podávání kortikosteroidů, teofylinu nebo diuretik) (Fendrich et al., 2002). Protože byly popsány případy náhlého úmrtí u některých pacientů léčených pouze salmeterolem (Salpeter et al., 2006), je bezpečnost užívání LABA v posledních letech pečlivě sledována. Současné návody pro léčbu astmatu jednoznačně doporučují podávání LABA pouze s IKS, což ideálně splňují již zmíněné fixní kombinace (Kašák, 2008b; Bousquet et al., 2007; Jaeschke et al., 2008).

KROMONY (nedokromil, ketotifen - viz příloha 1C) stabilizují membránu mastocytů a inhibují tak vyplavení histaminu, leukotrienů a dalších mediátorů zánětu.

Potlačují kašel a bronchokonstrikci po tělesné zátěži, při inhalaci studeného vzduchu a při dráždění vzdušnými polutanty.

Nežádoucí účinky jsou mírné a přechodné - zahrnují únavu, závrať, bolest hlavy, bolestivost a otok kloubů (četnost výskytu těchto účinků je nižší než 1:10000). Po podání inhalačních lékových forem může nastat podráždění horních cest dýchacích, kašel, popřípadě bronchospasmus (Hardman et al., 2001).

RETARDOVANÉ METYLYXANTINY (teofylin - viz příloha 2B) jsou bronchodilatační látky, které mají extrapulmonální účinky včetně účinku protizánětlivého (Kašák, 2005). V minulosti byly předepisovány velmi často. V současné době se dává přednost inhalačním glukokortikoidům, β_2 mimetikům a antileukotrienům; teofylin je mnohdy indikován pouze jako doplňkové léčivo u pacientů s obtížně kontrolovatelným astmatem (Hardman et al., 2001). V monoterapii je lze využívat jako preventivní léky u pacientů s lehkým perzistujícím astmatem (Kašák, 2005). Mechanismus účinku spočívá pravděpodobně v inhibici fosfodiesteráz - dochází k hromadění cAMP a cGMP a tím k relaxaci buněk hladkého svalu. Mimo to působí teofylin i jako kompetitivní antagonist na adenosinových receptorech (adenosin může po navázání na tyto receptory navodit u astmatiků bronchokonstrikci a přispívá k uvolnění mediátorů zánětu z mastocytů) (Hardman et al., 2001). Podávají se perorálně k profylaxi záchvatů - retardovaný přípravek užívaný večer předchází nočnímu astmatickému záchvatu. Intravenózní aplikace je vyhrazena pro akutní exacerbaci astmatu (Lulmann et al., 2004). Inhalační aplikace teofylinu prozatím není možná, protože je obtížné dosáhnout terapeutické koncentrace v plicích. Do budoucna by možná mohl být tento problém vyřešen enkapsulací teofylinu do mukoadhezních škrobových mikrosfér o průměru 5-11 μm , které by umožnily transport a uvolnění teofylinu přímo v oblasti respiračního epitelu, což by mohlo vést k omezení nežádoucích účinků teofylinu a zvýšení účinnosti léčby (Momeni, Mohammadi, 2009).

Nežádoucí účinky zahrnují bolesti hlavy, nauzeu, neklid, poruchy spánku, gastroezofageální reflux a další. Závažná intoxikace může vést k život ohrožujícím srdečním arytmiím. Vzhledem k tomu, že má teofylin poměrně úzkou terapeutickou šíři, je vhodné, aby jeho hladina v krvi byla monitorována (Pauk, Zatloukal, 2002).

ANTIHIISTAMINIKA II. GENERACE (desloratadin, levocetirizin, rupatadin - viz příloha 1D) mají inhibiční účinky na alergickou odpověď. Jejich role v léčbě astmatu není

dosud jasně určena, ale byl prokázán trvalý příznivý účinek v léčbě alergické rýmy (koincidence astmatu a alergické rýmy se pohybuje okolo 50 %) (Bousquet et al., 2001). Mohou být s výhodou použita pro pacienty s těžší formou alergické rýmy a s komplikujícím astmatem alergického typu (Kopřiva, 2007). Vzhledem k protizánětlivým účinkům mohou mít určitý význam v terapii sezónního pylového astmatu.

Nežádoucí účinky některých antihistaminik II. generace zahrnují stále ještě sedaci, zvláště v úvodním období léčby (Kašák, 2005).

ANTILEUKOTRIENY (montelukast, zafirlukast - viz příloha 1E) jsou kompetitivní antagonisté leukotrienů na leukotrienových receptorech. V léčbě astmatu jsou indikovány zejména u astmatu vyvolaného kyselinou acetylsalicylovou (tzv. aspirin-senzitivní astma), účinné bývají též u ponámahového astmatu (O'Byrne et al., 1997) nebo u koincidence astmatu a alergické rýmy (Price et al., 2006). Montelukast prokazatelně omezuje zánět v distální části plic (Kraft et al., 2006). U nemocných s těžkým perzistujícím astmatem mohou antileukotrieny snížit potřebnou dávku kortikosteroidů podávaných celkově (O'Byrne et al., 1997; Matsunaga et al., 2009). Výsledky recentní metaanalýzy, že kombinovaná terapie montelukast/IKS přináší je lépe účinná, a to při srovnatelném bezpečnostním profilu (Joos et al., 2008).

Nežádoucí účinky jsou mírné – bolest hlavy, nauzea, ztráta chuti k jídlu, bolestivost v horní části žaludku, malátnost, vyrážka a svědění. Po podání zafirlukastu může výjimečně nastat zvýšení koncentrace jaterních aminotransferáz (Hardman et al., 2001).

OMALIZUMAB (XOLIAIR[®] - 75 mg, 150 mg) je rekombinantní monoklonální protilátka vyvolávající tzv. down-regulaci sekrece IgE a redukující množství B-lymfocytů. (Hanf et al., 2006). Váže se na již vytvořený IgE a zabraňuje tak jeho vazbě na receptory buněk účastnících se rozvoje zánětu (Krčmová, 2006). Omalizumab se také váže na IgE molekuly exprimované na B lymfocytech a tím snižuje uvolňování jejich mediátorů do cirkulace a inhibuje tvorbu nových molekul IgE (Sedlák, 2009). Je určen pro léčbu těžkého perzistujícího alergického astmatu, které není možné přiměřeně kontrolovat inhalačními kortikosteroidy společně s inhalačními β_2 mimetiky s dlouhodobým účinkem. Omalizumab se podává výhradně astmatikům, kteří mají prokázanou alergickou vazbu na celoroční alergie. Aplikuje se subkutánně jednou za 2 - 4 týdny (Krčmová, 2008).

Nežádoucí účinky jsou většinou mírné, nejčastěji se jedná o lokální reakce v místě vpichu (zčervenání, pálení, svědění, bolestivost či otok), méně často může lék vyvolat bolest hlavy či zvýšenou náchylnost k infekcím (Belliveau, 2005).

SPECIFICKÁ ALERGENOVÁ IMUNOTERAPIE (SIT; viz příloha 1F) je jediný terapeutický postup, který kauzálně zasahuje do vývoje specifické imunologické přecitlivělosti a svým účinkem je schopna tlumit proces alergizace astmatického pacienta. Její podstatou je injekční nebo sublinguální aplikace postupně se zvyšujících dávek speciálně upraveného alergenu, který je příčinou pacientových obtíží. Tento proces navozuje imunologickou toleranci, to znamená, že už v průběhu léčby a po jejím ukončení dochází ke snížení až vymizení obtíží spojených s expozicí příčinnému alergenu. SIT tedy neléčí konkrétní alergické onemocnění, ale ovlivňuje přecitlivělost samotnou. Mechanismus účinku SIT není jednoznačně objasněn, ale pravděpodobně spočívá v ovlivnění regulačních T lymfocytů s přesunem od Th2/Th0 klonu ve prospěch Th0/Th1 klonu pomocných T lymfocytů s dokladovanými změnami v interleukinové síti (www.cipa.cz). Podmínkou úspěšnosti SIT je průkaz alergie mediované IgE. Sublinguální SIT je účinnější u dospělých astmatiků, zejména pokud jsou spouštěcím faktorem alergické reakce pylly (Pipet et al., 2009).

Nežádoucí účinky injekčních lékových forem bývají spíše lokální (zarudnutí až rozsáhlá bolestivá opožděná alergická reakce v místě vpichu), ale mohou být i systémové (exacerbace astmatu, anafylaktická reakce) (Kašák, 2005). Podání sublinguálních lékových forem může vyvolat svědění nebo otok v ústní dutině; riziko vzniku anafylaxe je mnohem nižší (Pipet et al., 2009).

3.1.4.2. Úlevová antiastmatika

Rychle účinná úlevová antiastmatika jsou léky rychle uvolňující bronchokonstrikci a ji doprovázející příznaky. Zahrnují inhalační β_2 mimetika s rychlým nástupem účinku, inhalační anticholinergika, systémové kortikosteroidy a metylxantiny s krátkodobým účinkem.

INHALAČNÍ A PERORÁLNÍ SYMPATOMIMETIKA S KRÁTKODOBÝM ÚČINKEM (SABA; salbutamol, terbutalin, fenoterol - viz příloha 3A) patří mezi základní úlevové léky v léčbě astmatu. Relaxují hladké svaly průdušek, podporují mukociliární

clearance a snižují vaskulární permeabilitu; na zánětlivé změny v průduškách nemají žádný vliv. Účinek nastupuje do několika minut po aplikaci a přetrvává 4 – 6 hodin (Kašák, Pohunek, 2004).

Nežádoucí účinky jsou podobné jako u inhalačních sympatomimetik s dlouhodobým účinkem.

INHALAČNÍ ANTICHOLINERGIKA (ipratropium - viz příloha 3B) jsou bronchodilatancia inhibující účinek acetylcholinu uvolňovaného z cholinergních nervů v dýchacích cestách. Po inhalaci blokují bronchokonstrikční reflex vyvolaný vdechnutím dráždivých částic. Mají slabší bronchodilatační účinek než inhalační β_2 mimetika a všeobecně mají pomalejší nástup účinku. Jsou považovány za alternativní bronchodilatační lék pro pacienty, kteří nemohou být léčeni β_2 mimetiky s rychlým nástupem účinku (starší pacienti nebo osoby, u kterých β_2 mimetika vyvolávají třes či tachykardii).

Ipratropium bromid je sloučenina s kvartérním dusíkem, proto prochází špatně přes bariéry (včetně gastrointestinální a hematoencefalické) a aplikuje se pouze inhalačně. V terapii astmatu se osvědčila jeho kombinace s β_2 mimetiky (např. fenoterolem).

Nežádoucí účinky jsou nejčastěji spojeny se suchostí a hořkou chutí v ústech. Při aplikaci ipratropia je nutno vyvarovat se kontaktu preparátu s očima, zvláště u pacientů s glaukomem s úzkým úhlem. Vysoké dávky léku mohou způsobit obtíže u nemocných s hyperplazií prostaty nebo s obstrukcí hrdla močového měchýře (Kašák, 2005).

SYSTÉMOVÉ KORTIKOSTEROIDY (viz příloha 2A) se jako úlevová antiastmatika krátkodobě podávají perorálně nebo injekčně (perorální léčba je preferována). I přes pomalý nástup účinku (4 - 6 hodin) jsou důležitými léky v léčbě akutní exacerbace astmatu, protože působí preventivně proti progresi exacerbace, snižují potřebu urgentní návštěvy ambulance a hospitalizace a působí preventivně proti časnému relapsu po ukončení akutní léčby.

Nežádoucí účinky systémových kortikosteroidů nebyly během krátkodobé léčby běžně pozorovány (Kašák, 2005).

METYLXANTINY S KRÁTKODOBÝM ÚČINKEM (teofylin, aminofylin - viz příloha 2B) jsou bronchodilatancia obecně méně účinná než inhalační β_2 mimetika; jejich role v léčbě exacerbace astmatu zůstává kontroverzní (Kašák, 2005). Podávají se perorálně

nebo parenterálně (z injekčních forem je u nás registrovaný pouze aminofylin – rozpustná sůl teofylinu s etylendiaminem) (Lulmann et al., 2004)

Nežádoucí účinky mohou být závažné (viz kapitola 3.1.4.1.), ale obecně jim lze předejít úpravou dávkování a monitorováním. Metylchantiny s krátkodobým účinkem by neměly být podávány pacientům léčeným retardovanými metylchantiny bez znalosti sérové koncentrace teofylinu (Kašák, 2005). Dalším nežádoucím účinkem může být alergie na etylendiamin (Pauk, Zatloukal, 2002).

Určitá specifika má farmakoterapie asthma bronchiale v těhotenství. Tato kapitola však přesahuje rámec této dizertační práce a úmyslně zde není zahrnuta.

3.2. OXIDAČNÍ STRES A JEHO ROLE U ASTHMA BRONCHIALE

Plíce jsou jediným vnitřním orgánem, který je v přímém kontaktu se zevním prostředím plochou přibližně 100 m². Z toho asi 4 m² připadají na dýchací cesty, zbytek představuje povrch alveolů. Obrovská kontaktní plocha činí dýchací ústrojí velmi citlivým nejen ke kyslíku, ale i ke všem škodlivinám zevního prostředí (cigaretový kouř, oxidy dusíku a síry, ozón, azbest, oxid křemičitý, ...). Tyto látky jsou radikály nebo reagenty, které mohou v tkáni indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku (Štípek et al., 2000). V plicích je vyvinut specifický účinný antioxidační systém, takže za normálních okolností je rovnováha mezi antioxidanty a oxidanty zachována (MacNee, 2001). Při zvýšené tvorbě volných radikálů či snížené koncentraci antioxidantů dochází k převaze volných radikálů; tento stav se označuje termínem oxidační stres (Racek, 2003).

V organismu vzniká běžně řada reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), které mají značný fyziologický a patogenetický význam. Příklady nejčastěji se vyskytujících reaktivních forem kyslíku a dusíku jsou uvedeny v tab. 1.

Volný radikál		Látky, které nejsou volnými radikály	
superoxid	$\cdot\text{O}_2^-$	peroxid vodíku	H_2O_2
hydroxylový radikál	$\cdot\text{OH}$	kyselina chlorná	HOCl
peroxyl	$\cdot\text{ROO}$	ozon	O_3
alkoxyl	$\cdot\text{RO}$	singletový kyslík	$^1\text{O}_2$
hydroperoxyl	$\cdot\text{HO}_2$	nitrosyl	NO^+
oxid dusnatý	$\cdot\text{NO}$	nitroxid	NO
oxid dusičitý	$\cdot\text{NO}_2$	kyselina dusitá	HNO_2

Tab. 1 Nejčastěji se vyskytující reaktivní formy kyslíku a dusíku.

Látky, které nemají charakter radikálu, mohou být na volný radikál přeměněny homolytickým štěpením kovalentní vazby, redukcí či oxidací. Volné radikály jsou látky schopné samostatné existence, které mají ve svém elektronovém obalu jeden či více nepárových elektronů. Protože stabilní konfigurace vyžaduje párové seskupení elektronů, snaží se volné radikály chybějící elektron doplnit. Z toho plyne jejich malá stabilita a vysoká reaktivita. Volný radikál získává chybějící elektron setkáním s jiným radikálem, častěji však vytržením elektronu z neutrální molekuly. Z té se pak stává radikál a může reagovat s jinou sloučeninou, přeměnit ji na radikál, atd. Nastartuje se tak řetězová reakce vedoucí k poškození řady molekul. Řetězová reakce je ukončena, setkají-li se dva volné radikály, častěji však tehdy, setká-li se radikál s látkou, jejíž radikál je stabilní a může přetrvávat delší dobu. Protože ztráta elektronu je z elektrochemického hlediska oxidace, mají volné radikály oxidační účinek (Racek, 2003).

Volné radikály poškozují biomolekuly plicní tkáně, zejména membránové lipidy, narušují endotelové buňky a ovlivňují regulační buněčné mechanismy. Z poškozených struktur se uvolňují chemoatraktanty přivolávající makrofágy a leukocyty, které se aktivují endogenními mediátory. Reaktivní formy kyslíku a dusíku tedy v následné fázi vyvolají zánětlivé změny, kde leukocyty (zejména neutrofilů) a další buňky (např. alveolární makrofágy) začnou tvořit obrovská množství superoxidu, který se mění v reaktivnější formy kyslíku. Ty pak oxidují lipidy buněčných membrán, inaktivují některé proteiny, poškozují nukleové kyseliny a podporují degradaci fibronektinu, kolagenu a kyseliny hyaluronové (Štípek et al., 2000).

3.2.1. ROLE VOLNÝCH RADIKÁLŮ V PATOGENEZI ASTMATU

Zánět, typický pro astma, je mimo jiné výsledkem zvýšeného oxidačního stresu v dýchacích cestách. Zánětlivé buňky astmatiků (zejména makrofágy, neutrofilů a eozinofilů) uvolňují velká množství ROS, což může ústít v přímé poškození a odlupování epitelových buněk. ROS též mohou navodit hyperreaktivitu, charakteristickou pro astma. Modelové studie naznačují, že ROS přispívají k hyperreaktivitě dýchacích cest zvýšením tonu vagu, což je způsobeno poškozením β adrenergických receptorů citlivých na oxidaci. Některé spouštěče astmatu (např. virová infekce, ozon a vzdušené polutanty) mohou sloužit jako zdroje ROS; tím dochází ke zhoršení zánětu a dalších symptomů astmatu.

ROS působí přímou kontrakci hladké svaloviny dýchacích cest; tento efekt je ještě znatelnější při poškození epitelu. ROS navíc pravděpodobně stimulují uvolňování histaminu z mastocytů a podněcují sekreci hlenu buňkami epitelu, což vede k dalšímu zhoršení astmatu.

Množství eozinofilů v BALF a v krvi úzce koreluje s bronchiální hyperreaktivitou. Eozinofilperoxidáza produkovaná fagocyty může vyvolat oxidační poškození proteinů v průběhu bromace tyrosinových zbytků, což dokazuje zvýšená koncentrace 3-bromtyrosinu v BALF astmatiků (3-bromtyrosin je specifický ukazatel modifikace proteinů reaktivními bromovanými formami). Oxidanty vytvořené eozinofilperoxidázou mohou reagovat s RNS a podnítit tak nitraci proteinů (MacNee, 2001).

Dalším zdrojem volných radikálů v plicích je xantinoxidáza, která může mít patogenetický význam zejména v počátečních fázích oxidačního poškození. Xantinoxidáza a xantindehydrogenáza jsou dvě formy jednoho enzymu – xantinoxidoreduktázy. V endotelu převažuje za fyziologických podmínek *D*-forma (xantindehydrogenázová). Za patologických podmínek však *D*-forma přechází na *O*-formu (xantinoxidázovou), která je schopná redukovat kyslík nebo peroxid vodíku (Štípek et al., 2000).

3.2.2. ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA RESPIRAČNÍHO SYSTÉMU

Respirační systém se brání účinku volných radikálů prostřednictvím specifických antioxidantů, které jsou schopny již v nízkých koncentracích inhibovat nebo oddalovat

účinek volných radikálů. Plíce jsou pokryty specifickou tekutou vrstvičkou, tzv. RTL (respiratory tract lining fluid), která obsahuje enzymatické i neenzymatické antioxidanty, např. vitamin C, uráty, redukovaný glutathion, vitamin E, extracelulární superoxiddismutázu, glutathionperoxidázu a katalázu, v menších koncentracích pak mukopolypeptidové glykoproteiny, ceruloplasmin, proteiny vážící železo (laktoferin a transferin) a malé molekuly, např. bilirubin (Avissar et al., 1996; Halliwell, 1996; Halliwell, Gutteridge, 1990; Heffner, Repine, 1989; Racek, 2003). Cílem kapitoly je stručně popsat účinky nejdůležitějších endogenních a exogenních antioxidantů.

3.2.2.1. Enzymatické antioxidanty

Superoxiddismutáza (SOD) je základní antioxidační enzym regulující hladinu superoxidu (superoxid je nejčastěji se objevující volný radikál v živých organismech, z něhož mohou vznikat další, mnohem škodlivější reaktivní formy kyslíku – hydroxylový radikál, peroxynitrit či kyselina chlorná). SOD urychluje redukci superoxidu na peroxid vodíku, čímž předchází tvorbě vysoce reaktivního hydroxylového radikálu (Štípek et al., 2000). V současné době jsou známy tři izoformy superoxiddismutázy: intracelulární CuZn-SOD, mitochondriální Mn-SOD a extracelulární EC-SOD (Nadeem et al., 2008; Zelko, 2002). V plicní tkáni jsou všechny tři izoformy zastoupeny v hojném množství (Kinnula, Crapo, 2003).

Glutathionperoxidáza (GSHPx) je enzym katalyzující redukci peroxidu vodíku a současnou oxidaci glutathionu obsahujícího cystein. Snížení její koncentrace může vést k hromadění peroxidu vodíku. Aby mohla GSHPx likvidovat peroxid vodíku plynule, je třeba glutathion regenerovat prostřednictvím glutathionreduktázy (Rahman, MacNee, 2000; Rahman, 2003). GSHPx se vyskytuje ve třech odlišných formách, které se nacházejí v různých oddílech buňky. První dvě formy se nacházejí v cytoplazmě buněk a v krevní plazmě. V aktivním centru obsahují selenocystein (selenový analog cysteinu). Značný nedostatek selenu se může projevit poklesem aktivity GSHPx. Třetí forma GSHPx je vázána v buněčné membráně a redukuje nejen peroxid vodíku, ale i lipidové hydroperoxydy, které přeměňuje na příslušné hydroxyderiváty lipidů. Tím chrání fosfolipidy buněčných membrán a přerušuje řetězovou reakci poškození lipidů volnými

radikály (lipoperoxidaci). Nedojde tak k posledním fázím, kdy by vznikl malondialdehyd a jiné toxicky a mutageně působící aldehydy (Racek, 2003).

Kataláza je tetramer skládající se ze čtyř identických podjednotek, z nichž každá obsahuje jednu hemovou skupinu (Kirkman et al., 1999). Zajišťuje štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. V plicích je lokalizována v makrofázích, fibroblastech a pneumocytech. Její aktivita je u astmatiků zvýšená (Kirkham, Rahman, 2006).

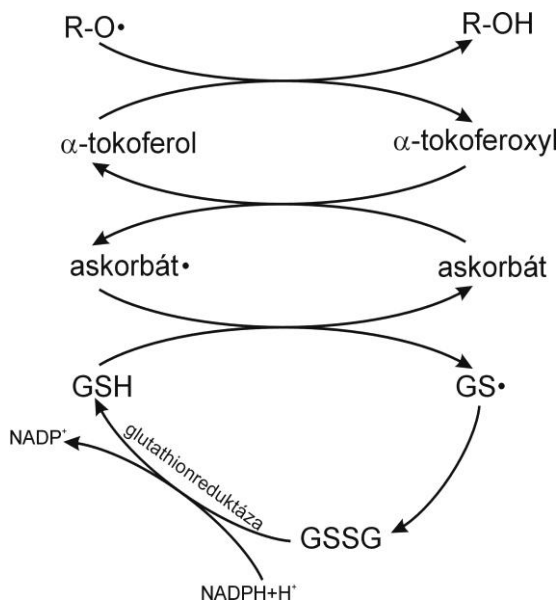
3.2.2.2. Neenzymatické antioxidanty

Glutathion je ubikviterní neenzymatický tripeptidický thiol nezbytný pro buněčnou regeneraci. Hraje klíčovou roli v kontrole protizánětlivých procesů v plicích. K jeho vyplavení dochází při každém poškození buňky. Podílí se na imunomodulaci, přestavbě extracelulární matrix, apoptóze a mitochondriální respiraci (Racek, 2003; Štípek et al., 2000). Koncentrace glutathionu obsaženého v RTL F je přibližně 100x vyšší než jeho koncentrace v plazmě (van der Vliet et al., 1999; Psarras et al., 2005). U pacientů s těžkým astmatem je jeho koncentrace v RTL F snižena (Fitzpatrick et al., 2009).

Vitamin E (tokoferol) je antioxidant vyskytující se v ovoci, zelenině, rostlinném oleji a rybím tuku. Je tvořen osmi různými izomery s víceméně podobným antioxidačním potenciálem (α -, β -, γ -, δ -tokoferoly a tokotrienoly). Ve vyšších organismech je biologicky nejaktivnější formou je *D*- α -tokoferol, který představuje 90 % podíl všech tokoferolů zastoupených v živočišných tkáních (Marcus R, Coulston, 2001; Zingg, Azzi, 2004). Jednotlivé tokoferoly a tokotrienoly se liší přítomností metylových skupin na aromatickém kruhu (Waisser, 1998). Kvůli přítomnosti hydroxylových skupin vázaných na aromatickém jádru jsou vysoce efektivními donory vodíku (Riccioni, D'Orazio, 2005).

Tokoferol je účinný intracelulární liposolubilní antioxidant a je pravděpodobně jedním z nejdůležitějších inhibitorů lipidové peroxidace. Reaguje s peroxylovými radikály dříve, než mohou poškodit další lipidové molekuly (Kirkham, Rahman, 2006). Při reakci vitamínu E s volným radikálem vzniká tokoferolový radikál, který je regenerován zpět na tokoferol prostřednictvím vitamínu C. Ten je po přeměně na askorbylový radikál regenerován glutathionreduktázou (obr. 4) (Racek, 2003). Terapie α -tokoferolem může být prospěšná při alergickém zánětu dýchacích cest díky jeho schopnosti blokovat účinek volných radikálů a inhibovat cyklooxygenázu a syntézu leukotrienů (Centanni et al., 2001).

Nadměrná suplementace vitamínem E bez zajištění regenerace další antioxidační kaskádou však může mít prooxidační účinky (Racek, 2003).



Tokoferol má i další účinky, které se neodvíjí od jeho antioxidačních vlastností a pravděpodobně odráží jeho specifické interakce s enzymy, strukturálními proteiny, lipidy a transkripčními faktory. Na posttranslační úrovni inhibuje proteinkinázu C, 5-lipoxygenázu a fosfolipázu A_2 a aktivuje proteinfosfatázu 2A a diacylglycerolkinázu. Na transkripční úrovni moduluje některé geny (např. α -tropomyosin, kolagenázu) (Zingg, 2007).

Obr. 4. Schéma regenerace vitamínu E. Převzato z Racek, 2003. Upraveno.

Vitamin C je ve vodě rozpustný zhášeč volných radikálů. Regeneruje vitamin E v buněčných membránách a udržuje integritu LDL částic. Obnovuje se specifickou dehydrogenázou za účasti NADH (Beyer, 1994; Knight, 2000). Koncentrace vitamínu C i E jsou snižené u chronických kuřáků (Kirkham, Rahman, 2006). Bylo prokázáno, že suplementace vitamínem C vede ke zlepšení plicních funkcí u kuřáků i astmatiků (Schwartz, Weiss, 1994). Jiná studie zkoumající účinky prenatální expozice nikotinu na plod odhalila snížení hladiny elastinu v plicích novorozenců; tyto škodlivé účinky byly vitamínem C zmírněny (Proskocil et al., 2005). Současné názory na účinnost suplementace vitamínem C jsou dosud rozporuplné – nedávno byla publikována jak studie naznačující zvýšení koncentrace vitamínu C v RTLTF po jeho p.o. podávání (Behndig et al., 2009), tak studie dokazující opak (Hernandez et al., 2009).

Karotenoidy (α -karoten, β -karoten, lykopen, lutein, zeaxantin) jsou pigmenty rostlinného původu. Nejrozšířenější z nich je β -karoten. Je také největším zdrojem vitamínu A, který v organismu vzniká jeho štěpením. Beta-karoten velice účinně zháší

singletový kyslík a je schopen likvidovat i volné radikály, mj. alkylperoxylové (Racek, 2003). Nadměrná suplementace karotenoidy však souvisí s vyšší incidencí rakoviny plic - zřejmě dochází k prooxidačním reakcím, podobně jako u tokoferolu. V průběhu antioxidační reakce vznikají rozkladné produkty karotenoidů včetně vysoce reaktivních aldehydů a epoxidů (Walrand et al., 2005).

Koenzym Q₁₀ se vyskytuje v mitochondriálních membránách, kde má klíčovou úlohu při přenosu elektronů jako součást dýchacího řetězce. Je však přítomen i v dalších buněčných strukturách a v plazmě (Littarru, Tiano, 2007). Zháší některé volné radikály a může se podílet na regeneraci tokoferolu (Thomas et al., 1997). Oxidační stres může podnítit dysfunkci mitochondrií vedoucí ke zvýšení tvorby ROS a nakonec k apoptóze nervových buněk. Exogenně podávaný koenzym Q₁₀ by mohl tyto procesy omezit zhášením ROS, čímž by se podpořila stabilizace mitochondriální membrány (Somayajulu et al., 2005). Některé studie naznačují, že plazmatická hladina koenzymu Q₁₀ je u astmatiků snižena, což plně koresponduje s hypotézou oxidačního stresu (Gazdik et al., 2002a). U těchto pacientů suplementace koenzymem Q₁₀ umožnila redukci dávek kortikosteroidů a vedla k eliminaci oxidačního stresu (Gvozdjakova et al., 2005).

Kyselina močová je konečným produktem metabolismu purinů. Je to účinný zhášeč kyslíkových a dusíkových volných radikálů a brání nitraci proteinů. Oxidace kyseliny močové volnými radikály vede k tvorbě alantoinu, jehož koncentrace měřená v různých tělních tekutinách může sloužit jako marker oxidačního stresu (Kirkham, Rahman, 2006).

3.3. ÚČINKY DERIVÁTŮ CHINAZOLINU NA RESPIRAČNÍ SYSTÉM

3.3.1. ÚČINKY CHINAZOLINOVÝCH ALKALOIDŮ OBSAŽENÝCH V JUSTICIA ADHATODA

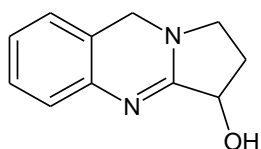
Justicia adhatoda L. (syn. *Adhatoda vasica* Nees, *Adhatoda zeylanica* Med., obr. 5) z čeledi Acanthaceae je nízký zelený keř rozšířený zejména v Indii, na Srí Lance a v Malajsii. V rámci tradiční medicíny se téměř 2 000 let užívá k terapii respiračních onemocnění, přičemž nebyly zdokumentovány žádné závažné nežádoucí účinky.

Vzhledem k tomu, že je v dané oblasti *J. adhatoda* nejčastěji používanou léčivou rostlinou při léčbě horních cest dýchacích, zahrnuje ji WHO do manuálu *The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care*, kde ji doporučuje k léčbě kašle, astmatu a hemoroidů. Rostlina je vhodná pro dlouhodobou léčbu jak u dětí, tak i u dospělých. Při předávkování může nastat průjem a zvracení.

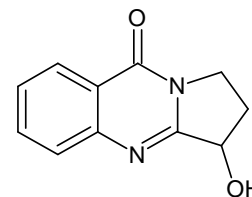
Bylo prokázáno, že za expektorační a antispastické účinky je zodpovědný chinazolinový alkaloid vasicin (syn. peganin - obr. 6), obsažený v listech, kořeni a květech. Listy obsahují i další alkaloidy (vasicinon - obr. 7), vasicinol, adhatodin, adhatonin, adhavašinson, anisotin), betain, steroidy a alkany. Kořeny obsahují některé alkaloidy, steroidy, karbohydráty a alkany. Květy obsahují triterpeny, flavonoidy a alkany.



Obr. 5 *Justicia adhatoda*, Acanthaceae. www.adhathoda-vasica.101herbs.com.



Obr. 6 Strukturální vzorec vasicinu.



Obr. 7 Strukturální vzorec vasicinonu.

V Asii je *J. adhatoda* běžně indikována v léčbě respiračních potíží zahrnujících kašel, astma, bronchitidu a tuberkulózu již od konce 19. století. Používá se jako expektorans, bronchodilatans a prostředek ke zvýšení tekutosti sputa. Listy a květy jsou v Nepálu užívány jako zelenina.

Ve 20. století se používání rostliny rozšířilo i do Evropy. Tekutý extrakt a tinkturu z *J. adhatoda* podávali angličtí lékaři jako antispastikum, expektorans a antipyretikum. V Německu byla droga oceňována jako podpůrný prostředek proti nachlazení, laryngitidě, bronchitidě, chřipce, rýmě, dráždivému kašli, černému kašli, senné rýmě, astmatu a sinusitidě. Byla též užívána na revmatismus, dnu, močové kameny a na zažívací potíže spojené se zácpou (Claeson et al., 2000).

Vasicin kromě toho má, podobně jako oxytocin, uterotonický účinek. Po tomto objevu se mnohé úsilí soustředilo na výzkum, který by vedl k objevení nového abortiva. V roce 1980 WHO zahrнула rostlinu do projektu regulace fertility *The Special Programme of Research in Human Reproduction*. Ačkoli některé vědecké publikace dodnes upozorňují na uterotonický účinek rostliny, neexistuje žádná relevantní humánní studie, která by abortivní účinky p.o. podávaného vasicinu potvrdila.

3.3.1.1. Farmakologické studie *Justicia adhatoda*

Experimentální studie prokázaly, že silice izolovaná z listů přímo ovlivňuje hladké svalstvo. Tím je vysvětlen relaxační účinek na horní dýchací cesty a na dělohu (Claeson et al., 2000). Experimentálně se potvrdila i antialergická a antiastmatická aktivita rostlinného extraktu (Dorsch, Wagner, 1991) a jeho antitusické působení (Dhuley, 1999). Byl rozpoznán protizánětlivý účinek (Wagner, 1989; Chakraborty, Brantner, 2001) a antiulcerózní působení rostliny (Shrivastava et al., 2006). Singh et al. ve své experimentální studii naznačili antioxidační působení etanolového extraktu (Singh et al., 2000). Antioxidační účinky byly později potvrzeny Jahangirem et al., kteří navíc tvrdí, že extrakt z *J. adhatoda* může omezit mutagenní účinky kadmia (Jahangir et al., 2006). Mimo to snižoval perorálně podávaný etanolový extrakt z listů glykémii u potkanů a králíků. Etanolový extrakt neměl žádný účinek proti bakteriím, houbám, kvasinkám ani hlísticím, ale vodný extrakt potlačoval mikrobiální flóru u pacientů s gingivitidou (Claeson et al., 2000). Experimenty provedené Kumarem naznačily, že by mohl etanolový extrakt z listů *J. adhatoda* chránit proti škodlivému působení γ -paprsků (Kumar et al., 2005; Kumar et al., 2007). Jiná studie objevila, že vodný extrakt z listů *J. adhatoda* působil protektivně při poškození jater navozeném *D*-galaktosaminem (Bhattacharyya et al., 2005). Recentně publikovaná experimentální studie dokazuje, že extrakt z listů působí proti tasemnicím (Yadav, Tangpu, 2008).

O vasicinu je známo, že vykazuje bronchodilatační aktivitu jak *in vitro*, tak *in vivo*. Názory na účinek vasicinonu, jeho hlavního metabolitu, se různí - některé studie prokazují jeho bronchodilatační účinky (Amin, Mehta, 1959; Cambridge, 1962), podle jiných autorů má vasicinon bronchokonstrikční působení (Atal, 1980). Pokud je podáván extrakt obsahující oba chinazolinové alkaloidy, převládá bronchodilatační působení.

Uterotonická aktivita vasicinu je srovnatelná s oxytocinem; účinek je však ovlivněn hladinou estrogenů a stavem děložní sliznice. Klinické studie potvrdily, že vasicin indukuje rytmické kontrakce myometria gravidní i negravidní dělohy (Claeson et al., 2000).

3.3.1.2. Farmakokinetika vasicinu

Vasicin podávaný v dávce 20 mg/kg (i.m.) se dobře absorboval a dosahoval plazmatické koncentrace 50 µl/ml u gravidních i u negravidních samic potkana. Po i.v. podání vasicinu byly v děloze potkanů a myší nalezeny vysoké koncentrace alkaloidu již během 5 min; maximální koncentrace bylo dosaženo během 10 min. Biologický poločas byl 5-7 minut po i.v. podání, 50 min po p.o. podání, 90 min po i.m. podání a 2 hod po s.c. podání. Po p.o. podání byla koncentrace vasicinu v děloze velmi nízká. Množství farmakokinetických a metabolických studií je sice prozatím nedostatečné, lze však s určitostí tvrdit, že orálně podávaný vasicin podléhá značnému jaternímu first-pass efektu a je biotransformován na vasicinon a další metabolity. Rozsah first-pass efektu je přibližně 40%; do systémového oběhu proniká po p.o. podání 60 % látky (Atal, 1980; Paliwa et al., 2000).

3.3.1.3. Toxikologické studie

Akutní toxicita vasicinu je po jednorázovém podání mírná (tab. 2).

Způsob aplikace	Myš	Potkan
p.o.	290	640
i.p.	125	115
s.c.	200	335
i.v.	79	-

Tab. 2 Hodnoty LD₅₀ vasicinu [mg/kg] u myší a potkanů.

Subakutní toxicita byla stanovena po 14 denním podávání vasicinu dvěma skupinám potkanů (6 sameců a 6 samic v každé skupině). Alkaloid byl podáván s.c. (dávka 10, 25 a 50 mg/kg tělesné hmotnosti) a p.o. (20 a 100 mg/kg tělesné hmotnosti); kontrolní skupině byl podáván fyziologický roztok. Klinické pozorování, chemický rozbor ani histopatologická analýza orgánů nepotvrdila žádné významné nežádoucí účinky (Claeson et al., 2000).

Chronická toxicita byla prováděna na potkanech a opicích. Vasicin byl orálně podáván čtyřem skupinám potkanů (10 samců a 10 samic v každé skupině; dávka 1, 1.25, 5 a 10 mg/kg tělesné hmotnosti) a čtyřem skupinám opic *Macac rhesus* (2 samci a 2 samice v každé skupině; dávka 0, 5, 10 a 20 mg/kg tělesné hmotnosti) po dobu 6 měsíců. Byla provedena klinická observace, chemická analýza a histopatologie orgánů. Mortalita léčených zvířat byla srovnatelná s kontrolními skupinami, pouze mortalita samců potkanů byla zvýšená v závislosti na dávce. Hematologické a biochemické hodnoty odpovídaly fyziologickému stavu. Pitva ani histopatologická analýza orgánů nepotvrdila žádné abnormality (Pahwa et al., 1987).

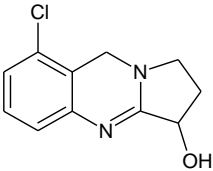
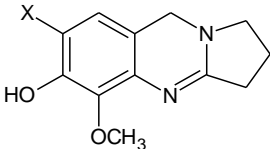
Podezření na reprodukční toxicitu vasicinu bylo příčinou výzkumu abortivních účinků *J. adhatoda*. Samicím potkana byl 8. nebo 16. den březosti podáván vasicin v dávce 5-15 mg/kg (i.p.). Nebyl prokázán žádný vliv na implantaci ani porod; stejné závěry byly získány i po premedikaci estradiolem. U morčat, kterým byl vasicin podáván v dávce 30 mg/kg (i.p.), došlo k pozdnímu potratu ve čtyřech případech z osmi. Premedikace estradiolem abortivní účinek vasicinu zvýšila (Claeson et al., 2000).

Otázka rizika abortivních účinků extraktu *J. adhatoda* je kontroverzní a dosud neexistují jednoznačné názory. Výsledky získané ze studie akutní a chronické toxicity abortivní účinek vasicinu nepotvrzují. Neexistuje žádný věrohodný vědecký důkaz o tom, že p.o. podaný extrakt z *J. adhatoda* působí abortivně. Stejně tak nejsou žádné podklady dokazující embryotoxicitu či fetotoxicitu vedoucí ke kompletní resorpci plodu. Žádná z 62 etnofarmakologických a bibliografických studií nepotvrdila riziko závažných nežádoucích účinků po p.o. podání *J. adhatoda*. Podezření na reprodukční toxicitu je pravděpodobně mylné - pro tento závěr svědčí mj. fakt, že si výsledky podobných studií odporují. Mnohé experimenty navíc nejsou v souladu obecnými metodickými pokyny, jsou neúplné a provedené na nedostatečně velkém souboru zvířat. Často byla použita i nevhodná metodika – např. i.p. podání gravidním zvířatům, malý počet kontrolních zvířat, atd. V dokumentacích mnohdy nebylo uvedeno dávkování.

Ačkoli neexistuje žádný vědecky validní důkaz, který by potvrdil riziko závažné reprodukční toxicity *J. adhatoda*, doporučuje se nepodávat přípravky obsahující extrakt z této rostliny těhotným ženám.

3.3.2. ÚČINKY SYNTETICKÝCH DERIVÁTŮ VASICINU A CHINAZOLINU

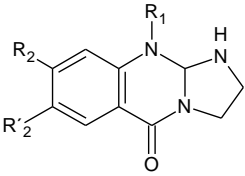
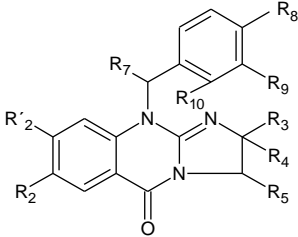
Účinky syntetických derivátů vasicinu na respirační systém se zabývali Ojo et al. (1996). Syntetizovali různé deriváty deoxyvasicinu a zkoumali jejich antihistaminový a bronchodilatační vliv na astma a další respirační onemocnění. Zjistili, že (*DL*)-vasicin podávaný i.v. nevykazoval až do dávky 5 mg/kg žádné bronchodilatační účinky. Žádný antihistaminový ani bronchodilatační účinek nevykazoval ani (*DL*)-7-metoxyvasicinový analog. Metylendioxydeoxyvasicin byl jako antagonist histaminem indukovaných kontrakcí jen málo účinný. Další derivát ((*DL*)-8-chlorvasicin)) vykazoval v dávce 25 mg/kg vyšší účinnost a menší toxicitu než (*DL*)-vasicin a posloužil proto jako výchozí struktura pro syntézu účinnějších analogů. Autoři syntetizovali sérii trisubstituovaných analogů deoxyvasicinu a zhodnotili potenciální účinky na bronchospasmus indukovaný serotoninem a histaminem. Bronchodilatační aktivita derivátů byla určena *in vitro* a *in vivo* experimentech. Byla stanovena ED₅₀ ligandů 17a-d a (*DL*)-8-chlorvasicinu (tab. 3) a porovnána s aminofylinem a isoprenalinem. Ligandy 17a-d a (*DL*)-8-chlorvasicin vyvolávaly v *in vitro* experimentu relaxaci závislou na dávce. Relaxační účinky byly potvrzeny také v *in vivo* podmínkách. Podobně jako aminofylin a isoprenalin by tedy mohly tyto látky inhibovat histaminem a serotoninem indukovaný bronchospasmus. Chlorderivát (**17b**) vykazoval stejnou bronchodilatační aktivitu jako fluorderivát (**17c**). Bronchodilatační účinky bromderivátu (**17a**) a jodderivátu (**17d**) byly srovnatelné; oba deriváty byly přibližně 2x méně účinné než 17b a 17c.

<p>(<i>DL</i>)-8-chlorvasicin</p> 	<p>7-halogen-5-metoxy-1,2,3,9-tetrahydropyrrolo[2,1-<i>b</i>]chinazolin-6-ol</p> 	X	
		Brom	17a
		Chlor	17b
		Fluor	17c
		Jod	17d

Tab. 3 Vzorec (*DL*)-8-chlorvasicinu a derivátu 17.

Jednu z prvních studií, která se zabývala bronchoprotektivními účinky syntetických derivátů chinazolinu, provedli již v roce 1975 Hardtmann et al. Předmětem jejich výzkumu byla skupina několika 10-substituovaných derivátů 2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-

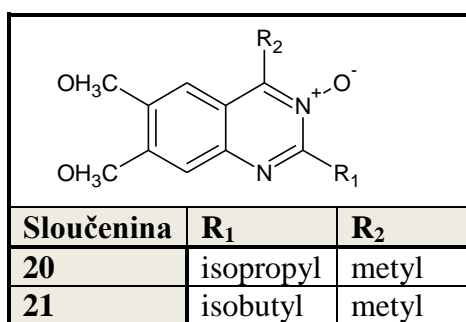
5(10*H*)-onu. Screening všech testovaných látek byl proveden na morčatech, kterým byl inhalací aerosolu obsahujícího histamin navozen bronchospasmus. Deriváty, které inhibovaly bronchospasmus silněji než použitý standard (teofylin), byly podrobeny dalšímu testování. Nejúčinnější deriváty (tab. 4) byly sloučeniny 10-benzyl-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-5(10*H*)-on (**44**) (5krát účinnější) a 10-(4-fluorbenzyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-5(10*H*)-on (**14**) (10krát účinnější než teofylin). Doba trvání bronchodilatačního účinku byla srovnatelná s teofylinem. Maximální plazmatické koncentrace bylo dosaženo za 30-60 min po p.o. podání a účinek přetrvával přibližně 3-4 h.

													
44	R ₁	R ₂	R' ₂	14	R ₂	R' ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀
	Benzyl	H	H		H	H	H	H	H	H	F	H	H

Tab. 4 Vzorce dvou nejúčinnějších 10-substituovaných derivátů 2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*]chinazolin-5(10*H*)-onu.

V navazujícím *in vivo* experimentu (anafylaktické mikrošoky indukované vaječným albuminem) byl derivát **44** stejně účinný jako teofylin. Derivát **14** byl přibližně 4x účinnější. Rozdíl mezi účinností derivátů při prvním a druhém experimentu naznačuje, že vyšší účinnost v histaminovém testu byla zprostředkována potenciálním antihistaminovým efektem. Derivát **14** ovlivňuje hladký bronchiální sval přímo, což dokazuje *in vitro* experiment na morčecích tracheálních prouzcích, kdy byla prokázána relaxace závislá na dávce. Účinek nebyl zprostředkován interakcí látky s β adrenergními receptory, protože přidání propranolol neměl na relaxační účinek žádný vliv. Mezi pozorované vedlejší účinky derivátu **14** patří pokles krevního tlaku po i.v. podání. Na druhou stranu ale **14** nevyvolává kardiální NÚ závislé na dávce. Centrální NÚ jsou omezené - teofylin způsobil u testovaných myši pokles funkce CNS a mírně zvýšenou lokomoční aktivitu v dávce 1,6 mg/kg, zatímco testovaná látka vyvolávala podobné příznaky až při dávce 102,4 mg/kg.

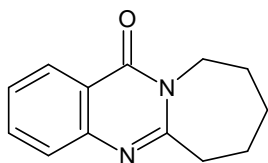
Combs et al. (1990) provedli rozsáhlou studii zaměřenou na syntézu a bronchodilatační účinky vybraných 2,4-dialkyl-6,7-dimetoxychinazolin-3-oxidů. Cílem experimentu bylo nalézt struktury, které by měly bronchoprotektivní účinky srovnatelné se strukturně příbuzným teofylinem, ovšem bez nežádoucích kardiostimulačních a centrálně stimulačních účinků. Pro ověření bronchodilatačních účinků byla použita skupina morčat, která byla senzibilizována i.p. podáním hydroxidu sodného (16 mg) a ovalbuminu (1 mg). Kardiovaskulární účinky (změna srdeční frekvence, pokles arteriálního krevního tlaku, pokles kontraktility srdečního svalu) jednotlivých derivátů byly hodnoceny na skupině psů premedikovaných pilokarpinem (0,75 mg/kg, i.p.). Autoři zjistili, že bronchodilatační účinek derivátů odvozených od základní sloučeniny (2-etyl-4-metyl-6,7-dimetoxychinazolin-3-oxid) se měnil se vzrůstajícím počtem atomů uhlíku na pozici 2 - nejprve stoupal a posléze klesal. Maximální aktivita byla pozorována u sloučenin obsahující 3-4 uhlíkatý řetězec. Kardiovaskulární účinek základního derivátu klesal spolu s prodlužující se délkou řetězce. Za deriváty s optimální bronchodilatační aktivitou byly označeny deriváty **20** (4-metyl-2-isopropyl-6,7-dimetoxychinazolin-3-oxid) a **21** (4-metyl-2-isobutyl-6,7-dimetoxychinazolin-3-oxid) - tab. 5. Kardiovaskulární nežádoucí účinky těchto derivátů byly ve srovnání s teofylinem podstatně nižší. Zhodnocení centrálních NÚ ukázalo, že na rozdíl od teofylinu vyvolávaly obě sloučeniny po p.o. podání myšim (100 mg/kg) mírný útlum CNS.



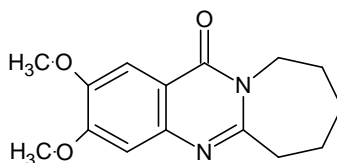
Tab. 5 Struktura nejúčinnějších 2,4-dialkyl-6,7-dimetoxychinazolin-3-oxidů.

Johri a Zutsi (2000) provedli chemickou modifikaci molekuly alkaloidu vasicinu za účelem syntézy bronchodilatačně aktivního derivátu nazvaného RLX (6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-on, obr. 8). Předmětem výzkumu bylo rozpoznat účinek RLX na degranulaci mastocytů, uvolnění histaminu a PGE, uptake vápníku a na

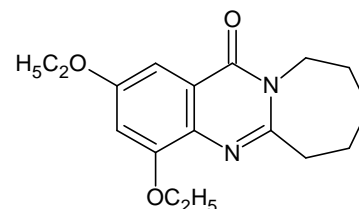
aktivitu cAMP fosfodiesterázy a lipoxygenázy v mesenterálních a peritoneálních mastocytech a v homogenizované plicní tkáni u anafylaktických potkanů. RLX v dávce 10 a 20 mg/kg inhiboval degranulaci mastocytů a uvolnění histaminu z tkání. Byla pozorována zvýšená koncentrace PGE a inhibice uptake vápníku peritoneálními mastocyty. Aktivita fosfodiesterázy a lipoxygenázy v plicích byla snížena. Autoři naznačují, že RLX může působit podobně jako kromoglykan sodný a aminofylin.



Obr. 8 Strukturální vzorec RLX.



Obr. 9 Strukturální vzorec dimetoxo-RLX.



Obr. 10 Strukturální vzorec dietoxo-RLX.

Z tohoto poznatku vycházeli Jindal et al. (2002), kteří syntetizovali a testovali *in vitro* bronchodilatační aktivitu dimetoxyderivátu RLX (2,3-dimetoxo-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-onu, obr. 9). Zjistili, že tato sloučenina strukturně podobná papaverinu byla účinnější než teofylin, aminofylin i RLX. Zvýšení účinnosti nastalo pravděpodobně díky zavedení metoxyskupin do polohy 8 a 9.

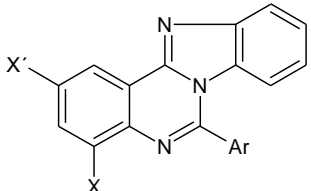
Také Zabeer et al. (2006) syntetizovali několik derivátů odvozených od chinazolinu. Bronchodilatační a antialergické účinky těchto struktur byly testovány na průdušnici morčete, na modelu bronchospasmu indukovaném inhalací aerosolu a na modelu systémové anafylaxe. Nejvýraznější bronchodilatační účinky z celé testované skupiny měl dietoxyderivát RLX (2,4-dietoxo-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-on, obr. 10). Byl prokázán nejen jeho relaxační efekt na izolovanou tracheu a bronchiální strom, ale i relaxační efekt na hladkou svalovinu tenkého střeva. Bronchodilatační účinek pravděpodobně nebyl zprostředkován β receptory. Kumulativní DRC křivky histaminu podávaného samostatně a poté s dietoxy-RLX naznačily, že látka pravděpodobně působí na hladké svalstvo přímo a nespecificky. Stejný výsledek ukázala obdobná DRC acetylcholinu podávaného samostatně a spolu s dietoxy-RLX. Sloučenina byla účinnější než teofylin, ale méně účinná než salbutamol. Antialergické účinky

zkoumané na několika experimentálních modelech (Schultz-Daleova reakce, pasivní kutánní anafylaxe, stabilizace mastocytů aj.) ukázaly, že dietoxy-RLX postrádá antialergickou aktivitu. Účinky na CNS a KVS nebyly prokázány ani po podání vysokých dávek. Studie subakutní toxicity neprokázaly žádné toxické účinky.

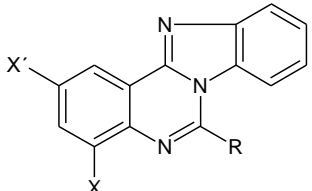
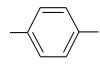
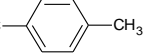
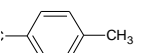
Studiu bronchodilatačních účinků vybraných derivátů imidazo[1,2-*c*]chinazolinů se několik let věnovali Bahekar a Rao. V prvním experimentu zaměřeném na tuto problematiku syntetizovali skupinu několika 6-aryl-benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů a testovali bronchodilatační účinky dvou derivátů: 6-fenylbenzimidazo[1,2-*c*]chinazolinu (4a) a 10-brom-6-fenylbenzimidazo[1,2-*c*]chinazolinu (4b), viz tab. 6. U obou struktur byla prokázána jen mírná *in vitro* aktivita, aktivita *in vivo* nalezena nebyla vůbec (Rao, Bahekar, 1999).

O rok později hodnotili bronchodilatační aktivitu dvou skupin 6-substituovaných derivátů benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů (Ia-p a IIa-l, tab. 7). U všech testovaných sloučenin byla prokázána účinnost na *in vitro* i *in vivo* modelech. Na základě získaných výsledků autoři dále studovali vztah mezi strukturou derivátů a jejich bronchodilatačním účinkem. Zjistili, že 6-alkyl substituované deriváty skupiny II vykazují vyšší účinnost, pokud obsahují delší alkylový řetězec. Deriváty skupiny I byly účinnější, pokud obsahovaly elektronegativní substituent v pozici 4. Přítomnost halogenů v molekule změnila biologickou aktivitu derivátů obou skupin. Autoři zjistili, že největší bronchodilatační aktivitu vykazoval 10-jod-6-propyl-benzimidazol[1,2-*c*]chinazolin (II) (Bahekar, Rao, 2000).

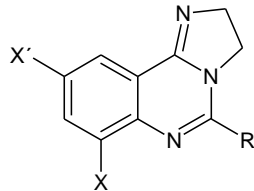
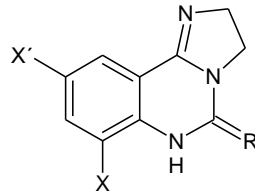
V další studii autoři zkoumali bronchodilatační vlastnosti 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolinů (Va-l), 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin-5-(6*H*)-thionů (VIIIa-d) a jejich oxoanalogů (IXa-d), viz tab. 8. U všech testovaných sloučenin se předpokládaný bronchodilatační účinek potvrdil. Studie závislosti účinku na struktuře odhalila, že u 5-alkyl substituovaných derivátů skupiny V byl bronchodilatační účinek přímo úměrný délce alkylového řetězce. Sloučeniny skupiny VIII a IX byly méně účinné; zvýšení účinnosti nepřineslo ani nahrazení atomu síry kyslíkem. Biologická aktivita derivátů obou skupin byla ovlivněna přítomností halogenu. Ze všech testovaných sloučenin byl nejúčinnější 5-propyl-9-jod-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin (Bahekar, Rao, 2001).

		X	X'	Ar
	4a	H	H	C ₆ H ₅
	4b	H	Br	C ₆ H ₅

Tab. 6 Vzorce testovaných derivátů 6-aryl-benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů.

		X, X'	R
	Ia-p	H, Br, I	  
IIa-l	H, Br, I	-CH ₃ -C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇	

Tab. 7 Struktura testovaných derivátů benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů.

Vzorec V				Vzorec VIII, IX			
Sloučenina	X	X'	R	Sloučenina	X	X'	R
Va	H	H	CH ₃	Vk	Br	Br	C ₃ H ₇
Vb	H	Br	CH ₃	VI	H	I	C ₃ H ₇
Vc	Br	Br	CH ₃	VIIIa	H	H	S
Vd	H	I	CH ₃	VIIIb	H	Br	S
Ve	H	H	C ₂ H ₅	VIIIc	Br	Br	S
Vf	H	Br	C ₂ H ₅	VIII d	H	I	S
Vg	Br	Br	C ₂ H ₅	IXa	H	H	O
Vh	H	I	C ₂ H ₅	IXb	H	Br	O
Vi	H	H	C ₃ H ₇	IXc	Br	Br	O
Vj	H	Br	C ₃ H ₇	IXd	H	I	O

Tab. 8 Vzorce testovaných derivátů 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolinů (Va-l), 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin-5-(6*H*)-thionů (VIIIa-d) a jejich oxoanalogů (IXa-d).

IV. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. IN VIVO EXPERIMENTS

4.1.1. ZVÍŘATA A POUŽITÝ MATERIÁL

4.1.1.1. Zvířata

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (dodavatel BioTest s.r.o., Konárovice, ČR) o hmotnosti 240-260 g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Zvířata byla umístěna v prostorách určených pro otevřený chov se zajištěním ventilace vzduchu a teplotou v rozmezí 22-24°C, s volným přístupem k pitné vodě a standardní peletizované stravě (krmná směs ST-1, výrobce VELAS, Lysá nad Labem, ČR). Experimenty byly prováděny až po uplynutí čtrnáctidenní aklimatizace zvířat. Čtyřadvacet hodin před experimentem byla zvířata ponechána nalačno.

Experiment byl prováděn 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.

4.1.1.2. Testované látky

D- α -tokoferol - M_R 430,7; 1000 IU/g sojového oleje (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo).

4.1.1.3. Chemikálie

Byly použity následující chemikálie: azur B, sojový olej (firma FLUKA, Buchs, Švýcarsko); *DL*-propranolol hydrochlorid, hydroxid hlinitý, ovalbumin (min. 98 %), serotonin hydrochlorid, sukcinylcholin chlorid (SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo); kyselina octová, metanol p.a. (KULICH, Hradec Králové, Česká republika); pentobarbital sodný (SPOFA, Praha, Česká republika); krystalová violeť a žlutý eozin (PLIVA-LACHEMA, Brno, Česká republika).

4.1.1.4. Přístroje

Centrifuga MPW-360 (JWEletronic, Warszawa, Polsko)

Digitální fotoaparát PixeLINK PL-A642 (Vitana Corporation, Ottawa, Kanada)

Fleischův pneumotachometr (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Německo)

Laboratorní váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

Mikroskop Nikon Eclipse E200 (Nikon Corporation, Tokyo, Japonsko)

Nebulizer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Německo)

Ventilátor malých laboratorních zvířat (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Německo)

4.1.2. METODIKA MODELU ALERGICKÉHO ASTMATU

Použili jsme klasický experimentální model alergického astmatu u potkana. Rozdělení zvířat v experimentu uvádí tab. 9. Všechna zvířata jsme nejprve senzibilizovali aplikací ovalbuminu (OA). Následovala orální aplikace α -tokoferolu nebo vehikula. Jednu hodinu po podání poslední dávky jsme vyvolali challenge inhalací aerosol obsahujícího antigen nebo fyziologický roztok (FR). Bronchiální hyperreaktivitu na 5-HT jsme sledovali po jedné nebo 24 hodinách po antigen challenge. Bezprostředně po zhodnocení plicní hyperreaktivitu jsme odebrali a analyzovali BALF. Plíce byly histopatologicky vyšetřeny.

	n_{1h}	n_{24h}	senzibilizace	medikace	antigen challenge
Léčená skupina	9	9	ovalbumin	α -tokoferol	antigen
Pozitivní kontrola	9	9		vehikulum	antigen
Negativní kontrola	8	10		vehikulum	fyziologický roztok

Tab. 9 Náhodné rozdělení zvířat do experimentálních skupin. Senzibilizace potkanů byla provedena i.p. aplikací 1 mg OA a 100 mg hydroxidu hlinitého ve třech po sobě jdoucích dnech, poté byla zvířata medikována po dobu deseti dnů α -tokoferolem nebo vehikulem (sojový olej). Za 21 dní po senzibilizaci byla provedena antigen challenge inhalací aerosolu antigenu nebo inhalací fyziologického roztoku. Sledované parametry byly hodnoceny za jednu (n_{1h}) nebo 24 hodin (n_{24h}) po antigen challenge.

Senzibilizace a antigen challenge

Navození modelu alergického astmatu u zvířat jsme provedli metodou podle Elvooda (Elwood et al., 1992), která vyvolává zvýšení protilátek proti IgE. Tento model byl popsán u různých druhů zvířat (potkan, morče, myš) a používán k výzkumu antioxidantů. Indukované změny plicních funkcí byly popsány v literatuře (Blesa et al., 2003; Shvedova et al., 1995; Nie et al., 2005; Boskabady, Ziaei, 2003).

Zvířeti jsme i.p. podali 1 ml FR obsahující 1 mg OA a 100 mg hydroxidu hlinitého. Aplikaci jsme opakovali ve třech po sobě následujících dnech. Vlastní pokus pak následoval za 21 dní od podání první dávky OA.

Vlastnímu experimentu (za 21 dní po senzibilizaci OA) předcházela antigen challenge – inhalace aerosolu ovalbuminu (100 mg ovalbuminu/2 ml FR) jednu nebo 24 hodin před experimentem. Zvířata byla umístěna do průhledné plastové inhalační



komory o objemu 4 l, která byla napojena na trysku nebulizeru (obr. 11). Částice aerosolu vytvořené rozprašovačem byly menší než 10 μm , 60 % těchto částic bylo menších než 2,5 μm (deklarováno výrobcem). Výkon nebulizeru byl 18-20 ml/hod. Inhalace probíhala až do úplného vyčerpání roztoku ovalbuminu. U kontrolních potkanů byla provedena challenge fyziologickým roztokem.

Obr. 11 HSE nebulizer. Převzato z www.harvardapparatus.com.

Premedikace tokoferolem

Zvířata byla premedikována tokoferolem v dávce 400 mg/kg/den po dobu 10 dní. Tokoferol byl podáván p.o. gastrickou sondou. Poslední dávka tokoferolu byla podána jednu hodinu před antigen challenge. Způsob podání, dávka i plán experimentu vycházely z již dříve publikovaných studií antioxidačních vlastností α -tokoferolu zkoumaných na laboratorních potkanech (MacDonald-Wicks, Garg, 2003; Helen et al., 2003; Demiralay et al., 2006; Frenoux et al., 2002; Zhang et al., 1996).

Příprava zvířat

Za 1 nebo 24 hodin po antigen challenge jsme zvířatům aplikovali pentobarbital (45 mg/kg, i.p.). Anestézie byla zachována po celou dobu experimentu (přibližně 45 minut) bez nutnosti dalšího podávání pentobarbitalu. Kanylovali jsme *v. jugularis externa* a tracheu a zvíře napojili na umělou ventilaci (ventilátor Hugo Sachs; 90 vdechů/min, 10 ml/kg hmotnosti). Spontánní respiraci zvířete jsme potlačili i.v. podáním sukcinylcholinu (2 mg/kg). Pět minut před podáním první dávky serotoninu jsme provedli premedikaci zvířete propranololem (1 mg/kg, i.v.) za účelem zesílení bronchokonstrikční odpovědi. Poté jsme v třiminutových intervalech i.v. aplikovali serotonin v dávkách 5, 10, 20 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a měřením plicní rezistence jsme hodnotili bronchiální reaktivitu.

Hodnocení bronchiální reaktivity

Použili jsme klasickou Konzett-Roesslerova metodu. Celkový objem ventilovaného vzduchu byl v každém cyklu stejný. Zvolený objem byl přitom nepatrně vyšší, než ten, který je potřebný k ventilaci. Overflow (tj. přebytek ventilovaného vzduchu) byl měřen pneumotachometrem a zaznamenán diferenciálním tlakovým transducerem jako proud vzduchu v ml/s. Overflow byl softwarem Pulmodyn (Hugo Sachs) vyhodnocen po každém respiračním cyklu. Nárůst overflow (tj. méně vzduchu vstupuje do plic potkana) přitom indikoval bronchokonstrikci. Bronchiální reaktivita byla stanovena z DRC křivky serotoninu (5, 10, 25 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) jednu nebo 24 hodin po challenge.

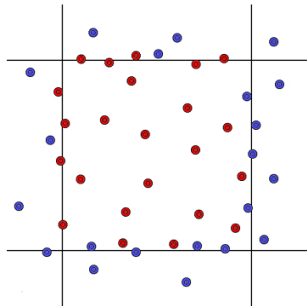
Analýza BALF

Po zhodnocení plicní reaktivity byla zvířata odpojena od ventilátoru a usmrcena podáním nadměrné dávky pentobarbitalu. Plíce byly šetrně vyjmuty a omyty ve fyziologickém roztoku. Bronchoalveolární laváž byla provedena dvěma alikvotami fyziologického roztoku (2 \times 6 ml). Poté byla BALF centrifugována (1200 otáček/min, 20 min, 4° C).

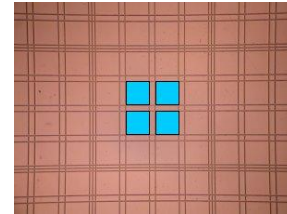
Stanovení celkového počtu buněk: buněčný pelet jsme resuspendovali v 1 ml fyziologického roztoku a poté smíchali 50 μl resuspendovaného peletu a 450 μl barvicího roztoku (0,5 g krystalové violeti, 5 ml kyseliny octové, destilovaná voda ad 250 ml).

Stanovení počtu buněk jsme provedli metodou počítání pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Bürkerova komůrka je tvořena dvěma počítacími prostory, jejichž dna jsou pokryta velmi jemnými vrypky. Počítací prostor je rozdělen trojitými vrypky na 9 velkých čtvercových polí, přičemž každé z těchto polí je dále členěno dvojitými vrypky na 16 menších čtverců. Nejmenší čtverce jsou tvořeny průsečíky dvojitých vrypů. Principem této metody je sčítání všech buněk ve známém objemu. Takto získaný počet se pak vztáhne na referenční objem (1 litr nebo 1 mm^3).

Do suché a čisté komůrky jsme pipetou aplikovali resuspendovaný pelet v takovém množství, aby byl počítací prostor plný. Komůrku jsme přenesli na stolek mikroskopu a vyčkali 3-5 minut, během kterých došlo k sedimentaci krevních elementů. Strana čtverce měří 0,2 mm, jeho obsah je tedy $0,04 \text{ mm}^2$. V případě, že se buňka dotýkala hrany čtverce, postupovali jsme následovně: počítali jsme jen ty buňky, které se dotýkají dvou předem náhodně vybraných hran čtverce; buňky dotýkající se dvou zbylých stran jsme do celkového počtu nezahrnuli. Buňky jsme počítali ve všech dílčích čtvercích (50) z jednoho velkého čtverce, viz obr. 12 a 13.



Obr. 12 Schéma počítání krvinek v Bürkerově komůrce. Počítáme např. krvinky dotýkající se levé a horní strany obvodu pole (červeně), krvinky ostatních stran nepočítáme (modře).
Převzato z www.lfp.cuni.cz.



Obr. 13 Čtverce pro počítání leukocytů; bílé krvinky se počítají v 50 větších čtvercích Bürkerovy komůrky; čtyři takové čtverce jsou na obrázku zvýrazněny.
Převzato z old.lf3.cuni.cz.

Stanovení diferenciálního počtu buněk: pelet jsme resuspendovali v 1 ml fyziologického roztoku, odebrali $30 \mu\text{l}$ a pipetou nanесли na podložní sklíčko pokryté želatinou (1,3 %). Preparát byl 10 min fixován v roztoku metanolu a poté obarven (žlutý eozin, azur B). Pod mikroskopem jsme vždy napočítali celkem 100 buněk a určili jsme procentuální podíl neutrofilů, eozinofilů, makrofágů a leukocytů.

Histopatologická analýza

Histopatologická analýza byla provedena na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Plíce včetně průdušnice byly bezprostředně po vyjmutí ponořeny do Bouinovy fixační tekutiny (300 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové a 100 ml neutrálního formolu; před použitím se přidává 5-7 ml ledové kyseliny octové na každých 100 ml roztoku). Po 48 hodinách fixace byly vzorky zpracovány v acetonu (3x během 24 hod), xylenu (2x během 10 min), prosyceny parafínem (2x během 24 hod) a zality do parafinových bločků. Vybrané parafinové řezy plicní tkáně o tloušťce 5-7 μm byly nejprve obarveny Alcianovou modří (15 min) a poté hematoxylinem (6-8 min) a eozinem (2 min). Obarvené vzorky byly studovány pod světelným mikroskopem vybaveným počítačovou zobrazovací analýzou. Fotodokumentace byla pořízena mikroskopem napojeným na digitální fotoaparát.

Statistická analýza

Výsledky byly hodnoceny pomocí Studentova t-testu a změny považovány za signifikantní při $P < 0,05$. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm SEM.

4.2. IN VITRO EXPERIMENTS

4.2.1. ZVÍŘATA A POUŽITÝ MATERIÁL

4.2.1.1. Zvířata

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (dodavatel BioTest s.r.o., Konárovice, ČR) o průměrné hmotnosti 310-330 g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Zvířata byla umístěna v prostorách určených pro otevřený chov se zajištěním ventilace vzduchu a teplotou v rozmezí 22-24°C, s volným přístupem k pitné vodě a standardní peletizované stravě (krmná směs ST-1, výrobce VELAS, Lysá nad Labem, ČR). Experimenty byly prováděny až po uplynutí čtrnáctidenní aklimatizace zvířat. Čtyřadvacet hodin před experimentem byla zvířata ponechána nalačno.

Experiment byl prováděn 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.

4.2.1.2. Testované látky

- přírodní látky¹: standardizovaný etanolvý extrakt z *Justicia adhatoda*, vasicin, vasicinon
- syntetické látky²: vasicinon, VN 001, VN 002, VN 003, VN 004, VN 005, VN 006, VN 007, VN 008, VN 009, VN 010, VN 011, VN 013, VN 014

¹ látky byly poskytnuty Katedrou farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové

² látky byly poskytnuty Katedrou organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové

4.2.1.3. Chemikálie

Byly použity následující chemikálie: dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (firma KULICH, Hradec Králové, Česká republika); *D*-(+)-glukóza monohydrát p. a., heptahydrát síranu hořečnatého, chlorid draselný p. a., chlorid sodný p. a., chlorid vápenatý p. a., bezvodý práškový (firma LACHEMA, Brno, Česká republika); hydrogenuhličitan sodný p. a. (firma PENTA, Chrudim, Česká republika); karbamoylcholin chlorid 99 % a teofylin (firma SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Německo).

4.2.1.4. Přístroje

Isotonic transducer № 7006 (Ugo Basile, Comerio VA, Itálie)

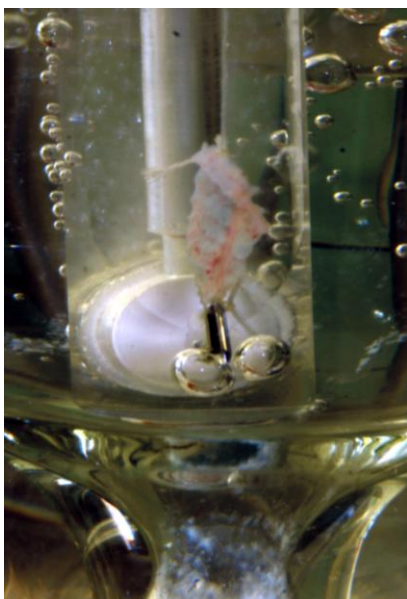
Laboratorní váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)

Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Dresden, Německo)

Zapisovač UNIRECORD № 7050 (Ugo Basile, Comerio VA, Itálie)

4.2.2. METODIKA IZOLOVANÉ PRŮDUŠNICE

Základem experimentu byla klasická *in vitro* metodika podle Castillo a de Beera poprvé uvedená v roce 1947, která se ovšem s určitými modifikacemi používá dodnes (Bahekar, Rao 2000; Ramanitrahasimbola et al., 2005). Testování probíhalo na samcích kmene Wistar, což je model, který lze používat v podobných experimentech (Agbonon et al., 2004). Laboratorní zvíře jsme usmrtili vykrvácením z *a. carotis* a zafixovali na operační stolek. Tupou preparací jsme obnažili tracheu a přenesli ji do Petriho misky se Krebs-Henseleitovým živným roztokem (pH 7,8) o následujícím složení (mM): NaCl 116.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0 a glukóza 11.1. Odstranili jsme přebytečnou tkáň, tracheu středem podkovovitých chrupavek vertikálně



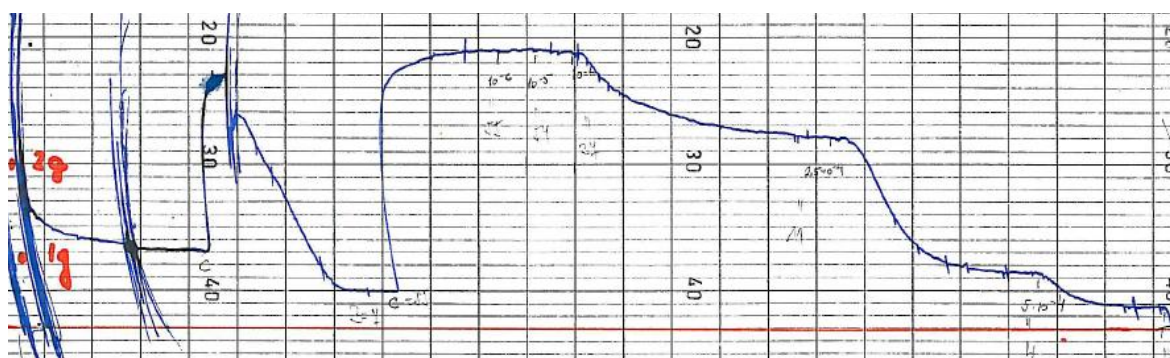
rozstříhnuli tak, aby nebyl poškozen *musculus trachealis*, a rozdělili ji na dvě stejné části. Tracheu jsme rozprostřeli tak, aby hladká svalovina byla uprostřed, a na protilehlé konce jsme připevnili ligatury. Preparát jsme přenesli do Schullerovy nádoby na izolovaný orgán o objemu 50 ml (obr. 14). Nádobka byla naplněna živným roztokem vyhřívaným na 37°C a okysličovaným pneumoxidem (95 % O₂, 5 % CO₂). Preparát jsme fixovali ligaturou jedním koncem k fritě zásobující živný roztok pneumoxidem a druhým na izotonický převodník spojený s registračním zařízením (zapisovačem).

Obr. 14 Izolovaná trachea fixovaná v Schullerově nádobě na izolovaný orgán.

Aparaturu jsme již dříve kalibrovali pomocí dvou závaží o hmotnosti 1 a 2 g. Preparát jsme zatížili na 2 g a nechali 30 min stabilizovat, přičemž jsme každých 10 min prováděli výměnu živného roztoku. Po uplynutí intervalu jsme snížili zatížení na 1 g a vyčkali, dokud se křivka záznamu nestabilizovala ve fázi plató. Poté byl preparát připraven k testování.

Do lázně naplněné živným roztokem jsme přidali karchol o koncentraci 10⁻⁵ M, čímž došlo ke kontrakci trachey. Po dosažení maximální kontrakce jsme provedli výplach

a ponechali tracheu 10 min relaxovat. Další dávkou karbacholu (10^{-5} M) jsme tracheu opět kontrahovali a přidávali kumulativní dávky vodného roztoku testované látky ve vzrůstající koncentraci. Další dávku testované látky jsme vždy přidali až po stabilizované odpovědi hladkého svalstva průdušnice na předcházející koncentraci (obr. 15). Na konci experimentu jsme přidali teofylin v koncentraci 3×10^{-3} M, což je dávka používaná v podobných experimentech prováděných na izolované průdušnici (Naline et al., 1994). Relaxaci navozenou jednotlivými dávkami testované látky jsme potom porovnávali s touto maximální relaxací navozenou teofylinem a výsledek jsme vyjádřili v procentech. Jako pozitivní kontrola slouží teofylin (koncentrace 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 2.5×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7.5×10^{-4} a 10^{-3} M).



Obr. 15 Kopie záznamu z experimentu prováděného *in vitro*. Trachea byla kontrahována karbacholem (10^{-5} M), po dosažení maximální koncentrace byla kumulativně přidávána testovaná látka. Další dávka testované látky vždy následovala až po stabilizované odpovědi hladké svaloviny izolované průdušnice na dávku předchozí. Maximální relaxace byla navozena teofylinem (3×10^{-3} M) podaným na konci experimentu.

Statistická analýza

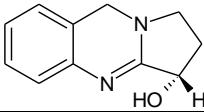
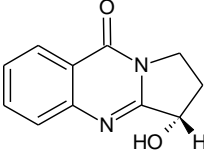
Získané hodnoty byly zpracovány v programu GraphPad Prism 5. Na osu X byl nanesen log koncentrace testované látky, na osu Y procentuální relaxace tkáně. Metodou nelineární regrese byla získána DRC křivka a odečtena hodnota ED_{50} (dávka látky vyvolávající polovinu maximální odpovědi). Výsledky jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ pro každou testovanou látku. Tato data byla posléze analyzována prostřednictvím one-way ANOVA testu doplněného o Dunettův nebo Bonferroniho Multiple Comparison Test. Rozdíly byly považovány za signifikantní, jestliže $P < 0,05$ (pokud není uvedeno jinak).

4.2.3. PŘÍRODNÍ LÁTKY TESTOVANÉ IN VITRO

Justicia adhatoda je známá svým expektoračním a bronchodilatačním působením, přičemž tyto účinky jsou přisuzovány chinazolinovým alkaloidům (vasicinu a vasicinonu). Cílem experimentu bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňuje extrakt z *J. adhatoda*, vasicin a vasicinon tonus hladké svaloviny izolované průdušnice potkana.

Droga byla importována z Indie. Nadzemní části *J. adhatoda* obsahující převážně listy byly sbírány a sušeny v lednu 2001. Původ drogy byl certifikován společností Swami Corporation, Indie. Na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové byl sušený rostlinný materiál (2000 g) rozemlet na prášek a extrahován 80 % etanolem (perkolace za studena). Etanolový extrakt byl zakoncentrován a zbytek byl protřepán s vodou. Vodná vrstva byla extrahována etylacetátem. Koncentrovaná etylacetátová frakce byla chromatografována na silikagelu (+12 % vody). Směsí chloroform-metanol (gradient 0-16 %) bylo postupně eluováno 41 frakcí. Tenkovrstvá kapalinová chromatografie 28. - 32. frakce indikovala skvrny vasicinu a vasicinonu. Krystalizací a rekrystalizací z metanolu byly získány bílé mikrokristaly těchto alkaloidů.

Přehled testovaných látek je uveden v tab. 10, použité koncentrace testovaných látek a počet testovaných preparátů shrnuje tab. 11.

TESTOVANÉ LÁTKY PŘÍRODNÍHO PŮVODU		
(-) Vasicin	$M_R = 188,23$	
(-) Vasicinon	$M_R = 202,21$	

Tab. 10 Strukturní vzorec a molekulová hmotnost vasicinu a vasicinonu.

Koncentrace [M]	Testovaná látka		
	Extrakt	Vasicin	Vasicinon
10^{-7}	+	+	+
10^{-6}	+	+	+
10^{-5}	+	+	+
10^{-4}	+	+	+
$2,5 \times 10^{-4}$	+		
5×10^{-4}	+	+	+
$7,5 \times 10^{-4}$	+	+	+
10^{-3}	+	+	+
n	5	6	3

Tab. 11 Přehled použitých koncentrací testovaných přírodních látek; n = počet tracheálních preparátů.

4.2.4. SYNTETICKÉ LÁTKY TESTOVANÉ IN VITRO

Cílem dalšího experimentu bylo ověřit, jaký bronchodilatační účinek vykazují různé deriváty chinazolinu získané synteticky, případně zjistit, zda existuje vztah mezi účinností a chemickou strukturou jednotlivých derivátů. Struktura veškerých testovaných látek byla navrhována ve spolupráci s Katedrou organické a anorganické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Jejich syntéza probíhala tamtéž. Testovány byly bronchodilatační účinky syntetického vasicinonu, 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů, účinky chinazolinů s etylaminovým fragmentem a účinky chinazolinů s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem.

4.2.4.1. Vasicinon

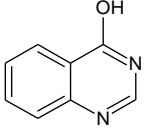
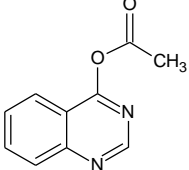
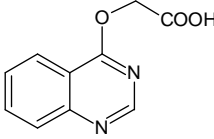
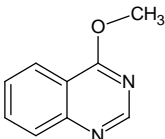
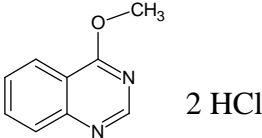
První testovanou látkou syntetickou látkou byl vasicinon. Byly použity konc. 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , $7,5 \times 10^{-4}$, 10^{-3} M; testování bylo provedeno na osmi preparátech.

4.2.4.2. 4-hydroxychinazolin a jeho jednoduché deriváty

Testovali jsme tyto deriváty:

- VN 001 (4-hydroxychinazolin)
- VN 002 (chinazolin-4-yl acetát)
- VN 005 (kyselina (chinazolin-4-yloxy)octová)
- VN 006 (4-metoxychinazolin)
- VN 007 (4-metoxychinazolin dihydrochlorid)

Vzorci a molekulové hmotnosti jednotlivých derivátů jsou uvedeny v tab. 12, použité koncentrace a počet testovaných preparátů shrnuje tab. 13.

4-HYDROXYCHINAZOLIN A JEHO JEDNODUCHÉ DERIVÁTY		
VN 001 4-hydroxychinazolin	$M_R = 146,15$	
VN 002 chinazolin-4-yl acetát	$M_R = 188,18$	
VN 005 kyselina (chinazolin-4-yl-oxy)octová	$M_R = 204,18$	
VN 006 4-metoxychinazolin	$M_R = 160,17$	
VN 007 4-metoxychinazolin dihydrochlorid	$M_R = 233,09$	

Tab. 12 Strukturální vzorec a molekulová hmotnost VN 001, VN 002, VN 005, VN 006 a VN 007 získaných synteticky. Derivát VN 006 byl nerozpustný a proto nebyl testován.

Koncentrace [M]	Testovaná látka			
	VN 001	VN 002	VN 005	VN 007
10^{-7}	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+
$2,5 \times 10^{-4}$	+	+	+	+
5×10^{-4}	+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-4}$	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+
n	7	7	4	6

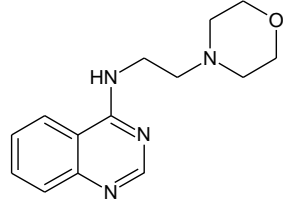
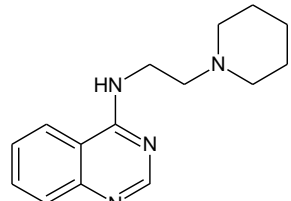
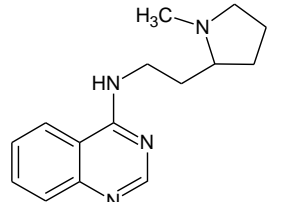
Tab. 13 Přehled použitých koncentrací 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů; n = počet tracheálních preparátů.

4.2.4.3. Chinazolin s etylaminovým fragmentem

Dále jsme testovali deriváty chinazolinu obsahující ve své struktuře etylaminový fragment:

- VN 008 (*N*-(2-morfolinoetyl)chinazolin-4-amin)
- VN 009 (*N*-[2-(piperidin-1-yl)etyl]chinazolin-4-amin)
- VN 010 (*N*-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etyl]chinazolin-4-amin)

Vzorci a molekulové hmotnosti jednotlivých derivátů jsou uvedeny v tab. 14 použité koncentrace a počet použitých preparátů v tab. 15.

DERIVÁTY CHINAZOLINU S ETYLAMINOVÝM FRAGMENTEM		
<p>VN 008 (<i>N</i>-(2-morfolinoetyl)chinazolin-4-amin)</p>	<p>$M_R = 258,32$</p>	
<p>VN 009 (<i>N</i>-[2-(piperidin-1-yl)etyl]chinazolin-4-amin)</p>	<p>$M_R = 256,35$</p>	
<p>VN 010 (<i>N</i>-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etyl]chinazolin-4-amin)</p>	<p>$M_R = 256,35$</p>	

Tab. 14 Strukturální vzorec a molekulová hmotnost VN 008, VN 009 a VN 010 získaných synteticky.

Koncentrace [M]	Testovaná látka		
	VN 008	VN 009	VN 010
10^{-7}	+	+	+
10^{-6}	+	+	+
10^{-5}	+	+	+
5×10^{-5}			+
10^{-4}	+	+	+
$2,5 \times 10^{-4}$			+
5×10^{-4}	+	+	
$7,5 \times 10^{-4}$	+	+	
10^{-3}	+	+	
n	6	6	8

Tab. 15 Přehled použitých koncentrací derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem; n = počet tracheálních preparátů.

4.2.4.4. Chinazolin s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy-fragmentem

Poslední testovanou skupinou látek byly deriváty chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem:

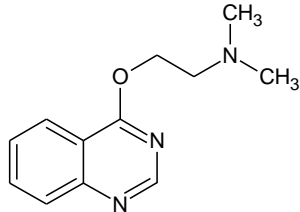
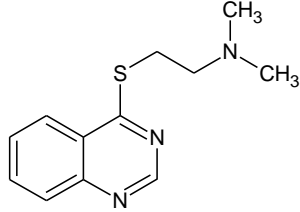
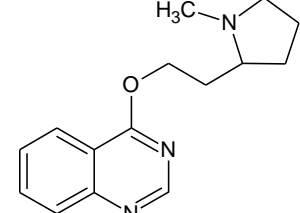
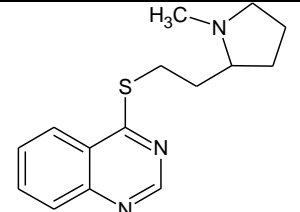
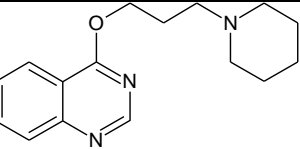
- VN 003 (4-dimethylaminoetoxychinazolin)
- VN 004 (4-dimethylaminoethylsulfanylchinazolin)
- VN 011 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etoxy]chinazolin)
- VN 013 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]chinazolin)
- VN 014 (4-[3-(piperidin-1-yl)propyloxy]chinazolin)

Použité koncentrace a počet testovaných preparátů jsou uvedeny v tab. 16, vzorce a molekulové hmotnosti jednotlivých derivátů v tab. 17.

Koncentrace [M]	Testovaná látka				
	VN 003	VN 004	VN 011	VN 013	VN 014
10^{-7}	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+
5×10^{-5}		+	+	+	+
$7,5 \times 10^{-5}$		+			
10^{-4}	+	+	+	+	+
$1,25 \times 10^{-4}$		+		+	
$2,5 \times 10^{-4}$	+		+	+	+
5×10^{-4}	+			+	+
$7,5 \times 10^{-4}$	+			+	

10^{-3}	+				
n	8	8	8	8	9

Tab. 16 Přehled použitých koncentrací testovaných derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem; n = počet tracheálních preparátů.

DERIVÁTY CHINAZOLINU S ETOXY-, ETYLSULFANYLOVÝM NEBO PROPOXY- FRAGMENTEM		
VN 003 4-dimetylaminoetoxychinazolin	$M_R = 217,27$	
VN 004 4-dimetylaminoethylsulfanylchinazolin	$M_R = 233,33$	
VN 011 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etoxyl]chinazolin)	$M_R = 257,33$	
VN 013 (4-[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)ethylsulfanyl]chinazolin)	$M_R = 273,40$	
VN 014 (4-[3-(piperidin-1-yl)propoxy]chinazolin)	$M_R = 271,36$	

Tab. 17 Strukturální vzorec a molekulová hmotnost VN 003, VN 004, VN 011, VN 013 a VN 014 získaných synteticky.

V. VÝSLEDKY

5.1. *IN VIVO* EXPERIMENTS

5.1.1. *BRONCHIÁLNÍ REAKTIVITA*

Zjistili jsme, že i.v. aplikace serotoninu (5-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) jednu hodinu po antigen challenge vyvolala u všech zvířat bronchokonstrikční odpověď závislou na dávce. Bronchospasmus u potkanů senzibilizovaných ovalbuminem (pozitivní kontrola) nebyl ve srovnání s negativní signifikantně větší a žádné rozdíly v odpovědi respiračního systému jsme nenalezli ani po premedikaci α -tokoferolem.

Zhodnocením plicní reaktivity měřené 24 hodin po antigen challenge jsme zjistili, že i.v. kumulativní podání serotoninu zvířatům senzibilizovaným OA neléčeným α -tokoferolem (pozitivní kontrola) vyvolalo signifikantní nárůst overflow závislý na dávce ve srovnání s negativní kontrolou (po poslední dávce serotoninu byl nárůst overflow 753 ± 34 %, $n=9$ u pozitivní kontroly a 396 ± 34 %, $n=10$ u negativní kontroly). U zvířat premedikovaných α -tokoferolem byla tendence k nižší hyperreaktivitě (558 ± 41 %; $n=9$) ve srovnání se senzibilizovanou skupinou bez premedikace, viz graf 1, nicméně tyto změny nebyly statisticky významné.

5.1.2. *ANALÝZA BALF*

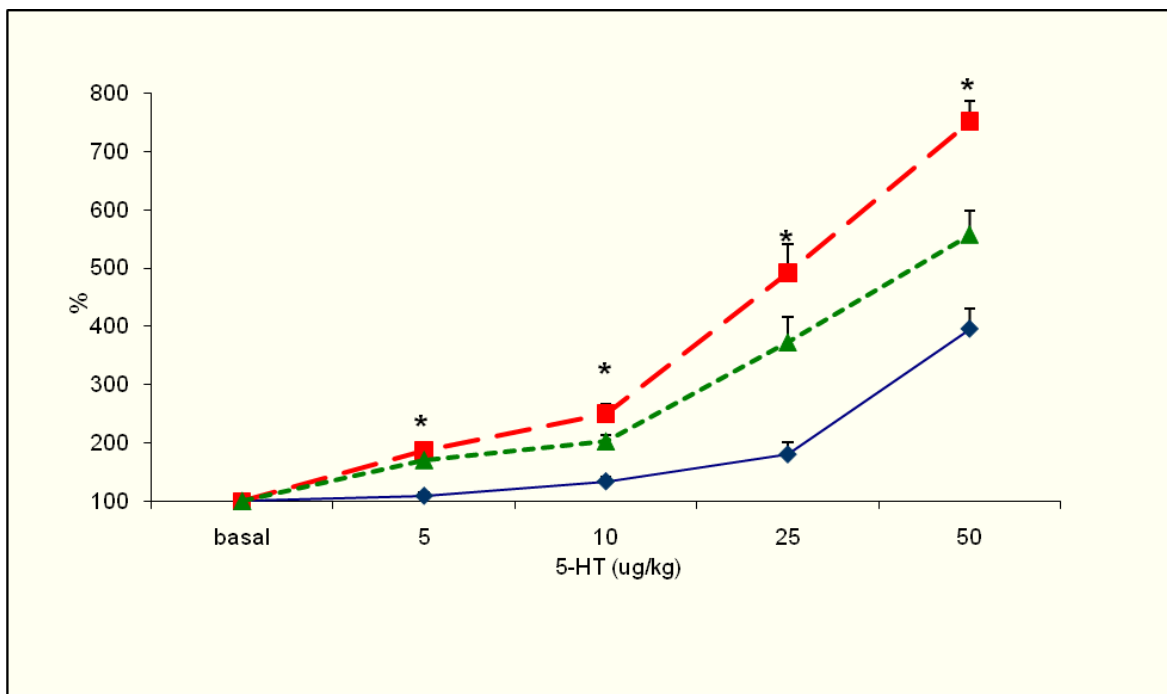
BALF jsme odebrali po jedné nebo 24 hodinách po expozici fyziologickému roztoku nebo ovalbuminu. V BALF odebraném za jednu hodinu po antigen challenge nebyl mezi skupinami pozorován žádný rozdíl v celkovém počtu buněk. Celkový počet buněk v BALF u negativní kontroly byl $0,24 \pm 0,02$ ($n=9$), u pozitivní kontroly $0,33 \pm 0,05$ ($n=8$) a u zvířat premedikovaných α -tokoferolem $0,30 \pm 0,03$ ($n=9$) ($10^6/\text{ml}$). Podobně nebyly prokázány žádné změny ani u diferenciálního počtu buněk.

Celkový počet buněk odečtený z BALF odebraného za 24 hodin po antigen challenge byl signifikantně vyšší pozitivní kontroly ($0,97 \pm 0,09$; $n=9$) ve srovnání kontrolou negativní ($0,24 \pm 0,02$; $n=10$), $10^6/\text{ml}$. Nárůst celkového počtu buněk byl u zvířat premedikovaných α -tokoferolem nižší, nicméně pokles nebyl signifikantní ($0,60 \pm 0,08$; $n=9$), $10^6/\text{ml}$. Diferenciální počet buněk ukázal nárůst eozinofilů ($0,133 \pm 0,028$; $n=9$) a signifikantní nárůst neutrofilů ($0,342 \pm 0,046$, $n=9$) u pozitivní kontroly oproti negativní kontrole (počet eozinofilů $0,005 \pm 0,001$, $n=10$; počet neutrofilů $0,007 \pm 0,001$, $n=10$;

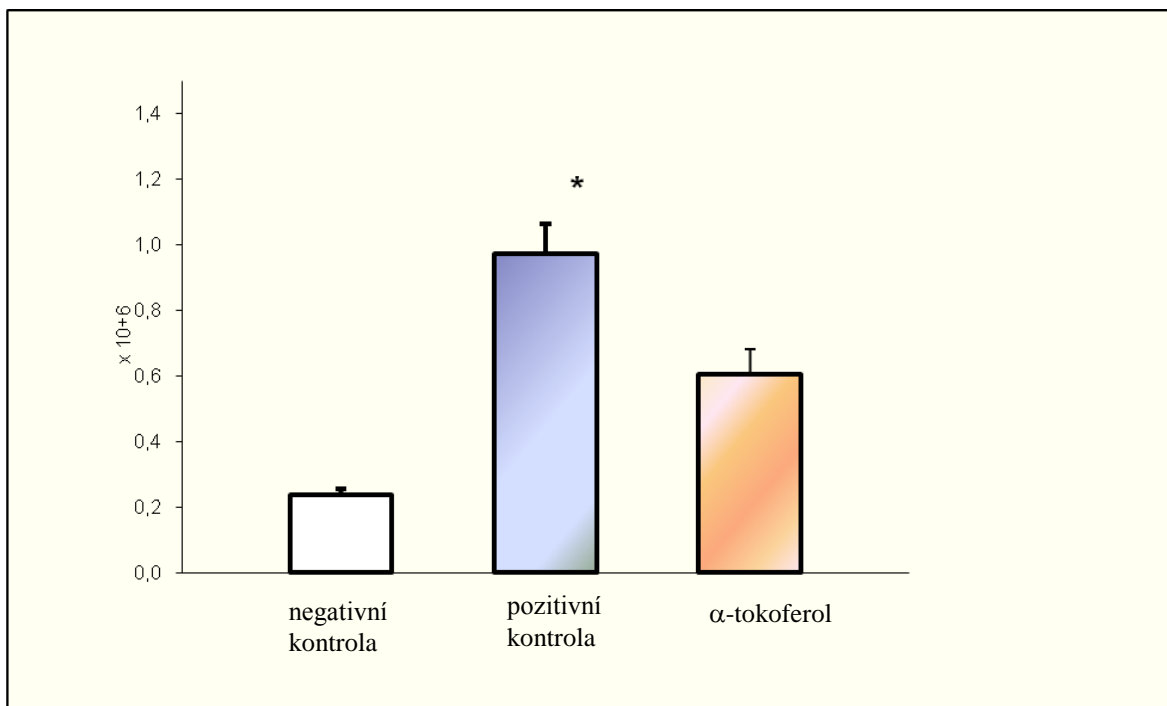
$10^6/\text{ml}$). U skupiny léčené α -tokoferolem byla patrná tendence k nižšímu nárůstu eozinofilů a neutrofilů v BALF (eozinofily $0,039 \pm 0,011$; $n=9$, neutrofilů $0,122 \pm 0,032$; $n=9$), nicméně ve srovnání s pozitivní kontrolou nebyl rozdíl signifikantní, viz grafy 2 a 3.

5.1.3. HISTOPATOLOGICKÁ ANALÝZA

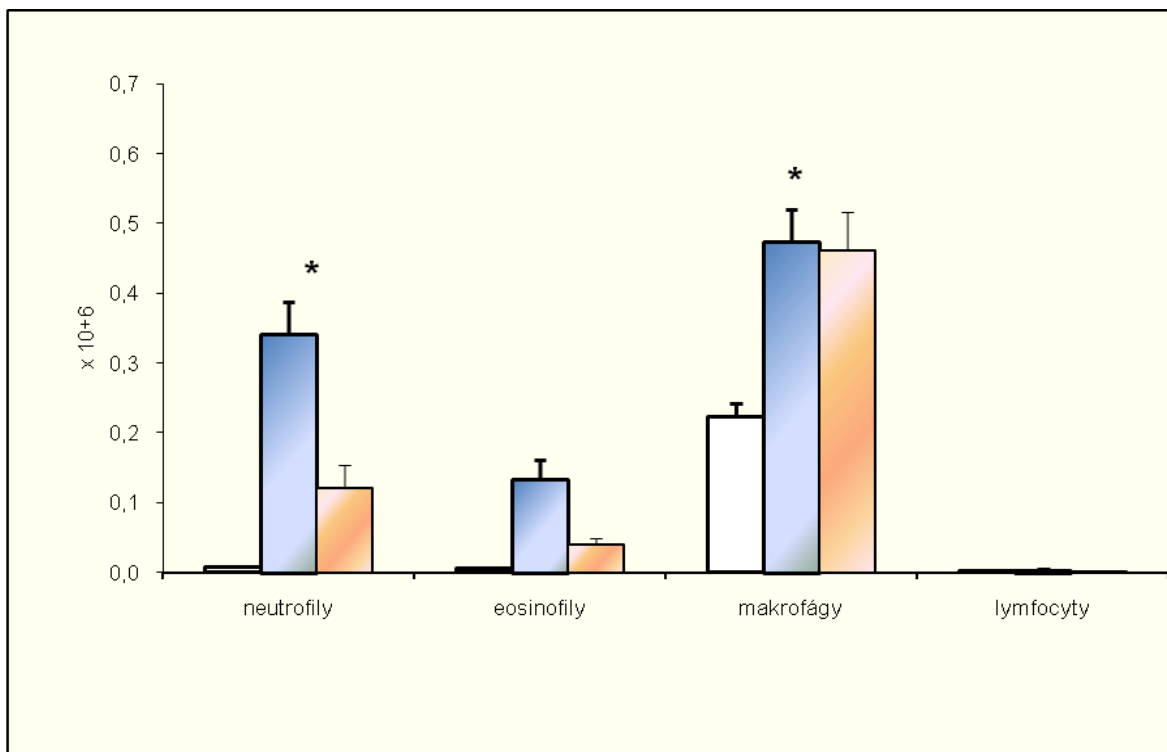
Histopatologická analýza plicní tkáně senzibilizovaných zvířat vystavených challenge ovalbuminem (pozitivních kontrol a zvířat premedikovaných α -tokoferolem) odhalila zánětlivé změny ve srovnání s kontrolní skupinou vystavenou fyziologickému roztoku. V plicích byl nalezen typický zánětlivý infiltrát v peribronchiálním a perivaskulárním prostoru. Infiltrát vznikl centrálně a poté se rozšiřoval podél cév a bronchů do okrajového plicního parenchymu. Místy došlo k mírnému zesílení a konstrikcí buněčné stěny bronchů a bronchiolů a k hypersekreci hlenu pohárkovými buňkami. Peribronchiální a perivaskulární zánětlivý infiltrát obsahoval převážně eozinofily, mastocyty, dále lymfocyty a makrofágy. Infiltrát expandoval do plicního intersticia a způsobil lokální edém. U zvířat premedikovaných α -tokoferolem nebyly nalezeny žádné kvantitativní ani kvalitativní rozdíly v porovnání s pozitivní kontrolou. V intersticiálním prostoru byl také nalezen peribronchiální a perivaskulární zánět s převahou eozinofilů a lymfocytů. Hypertrofie vrstvy buněk hladkého svalstva nalezená u premedikovaných zvířat byla srovnatelná s nálezy u pozitivní kontroly (obr. 16).



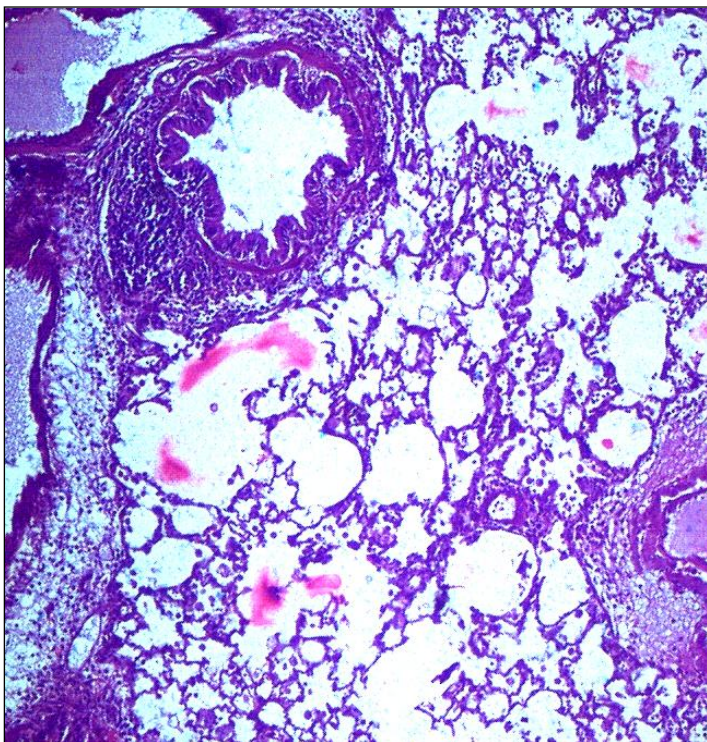
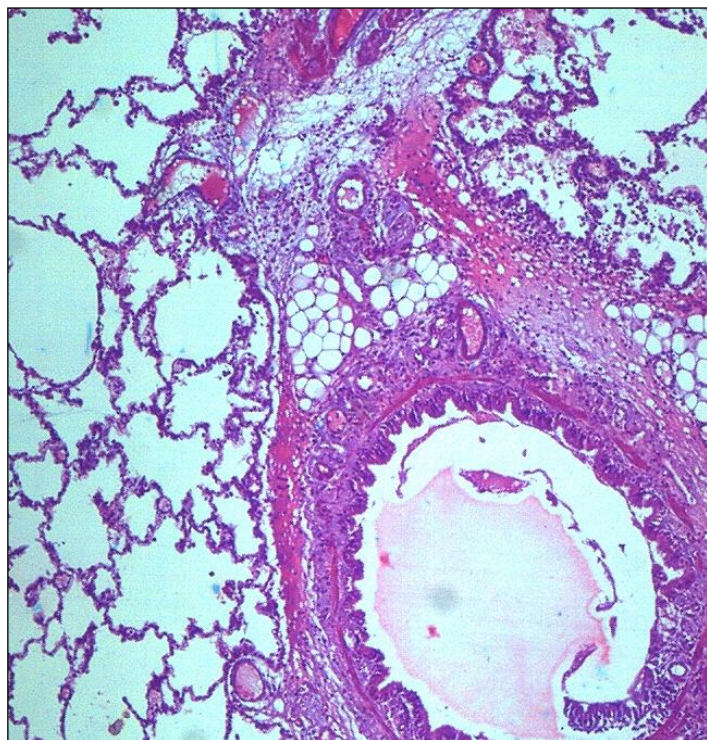
Graf 1 DRC pro 5-HT podávaný i.v. potkanům Wistar po inhalaci aerosolu FR (negativní kontrola) nebo antigenu (OA 1 %, 15 min). Zvířatům senzibilizovaným antigenem bylo žaludeční sondou podáváno vehikulum (pozitivní a negativní kontrola) nebo α -tokoferol (400 mg/kg po dobu 10 dní, poslední dávka byla podána jednu hodinu před challenge). Nárůst overflow je vyjádřen jako procentuální změna oproti bazálním hodnotám. U zvířat premedikovaných α -tokoferolem je patrná tendence k nižší hyperreaktivitě dýchacích cest na i.v. podání 5-HT. Jednotlivé body jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 10 (negativní kontrola), z 9 (pozitivní kontrola) a z 9 zvířat (α -tokoferol); * $P < 0,05$ v porovnání s negativní kontrolou. (—■—) negativní kontrola, (—▲—) pozitivní kontrola a (—◆—) skupina premedikovaná α -tokoferolem.



Graf 2 Celkový počet buněk v BALF odebrané za 24 hodin po expozici aerosolu fyziologického roztoku (negativní kontrola) nebo antigenu (OA 1 %, 15 min). Alergizovaným zvířatům bylo gastrickou sondou podáváno vehikulum (pozitivní kontrola) nebo α -tokoferol (400 mg/kg po dobu 10 dní, poslední dávka byla podána jednu hodinu před challenge). U zvířat premedikovaných α -tokoferolem byl nárůst celkového počtu buněk v BALF poněkud nižší. Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr \pm SEM z 10 (negativní kontrola), z 9 (pozitivní kontrola) a z 9 zvířat (α -tokoferol). * $P < 0,05$ v porovnání s negativní kontrolou.



Graf 3 Počet neutrofilů, eosinofilů, makrofágů a lymfocytů v BALF odebrané za 24 hodin po expozici aerosolu fyziologického roztoku (negativní kontrola) nebo antigenu (OA 1 %, 15 min). Alergizovaným zvířatům bylo gastrickou sondou podáváno vehikulum (pozitivní a negativní kontrola) nebo α -tokoferol (400 mg/kg po dobu 10 dní, poslední dávka byla podána jednu hodinu před challenge). Jednotlivé sloupce vyjadřují průměr \pm SEM z 10 (negativní kontrola, bílá), z 9 (pozitivní kontrola, modrá) a z 9 zvířat (α -tokoferol, oranžová). * $P < 0,05$ v porovnání s negativní kontrolou.

**A****B**

Obr. 16 Histopatologické nálezy plicní tkáně obarvené hematoxylinem a eozinem u zvířat léčených α -tokoferolem (A) a zvířat vystavených antigen challenge (B). Peribronchiální a perivaskulární zánět (obsahující převážně eozinofily a lymfocyty) a hypertrofie hladkého svalu bronchiolů byly prokázány u obou skupin. Žádné rozdíly nebyly nalezeny.

5.2. IN VITRO EXPERIMENTY

Prvním krokem bylo stanovení hodnoty ED_{50} zvolené standardní látky, v tomto případě teofylinu (tab. 18). Tracheu kontrahovanou karbacholem ($10^{-5}M$) jsme postupně relaxovali kumulativně podávanými dávkami teofylinu – 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} , $7,5 \times 10^{-7}$ a 10^{-3} .

Testovaná látka	n	$ED_{50} \pm SEM$ [$\mu mol/l$]
Teofylin	8	500 ± 43

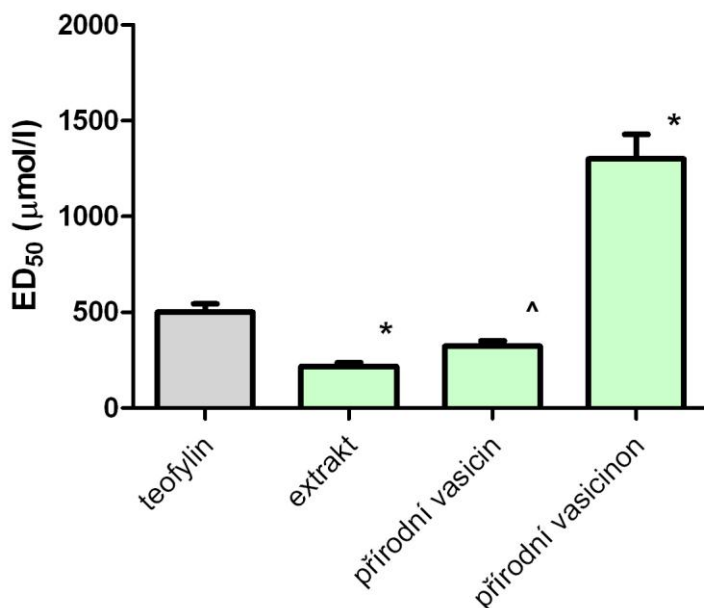
Tab. 18 Relaxační účinek teofylinu na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karbacholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu mol/l$].

5.2.1. RELAXAČNÍ ÚČINKY CHINAZOLINOVÝCH ALKALOIDŮ IZOLOVANÝCH Z JUSTICIA ADHATODA

Zjistili jsme, že všechny námi testované chinazolinové alkaloidy izolované z *Justicia adhatoda* vykazovaly relaxační aktivitu na karbacholem navozenou kontrakci hladkého svalu izolované průdušnice potkana. Jak přírodní vasicin, tak standardizovaný extrakt z *J. adhatoda* měly v porovnání s teofylinem signifikantně vyšší relaxační účinek. Mírnou relaxační aktivitu jsme prokázali i u vasicinonu přírodního původu, ovšem oproti teofylinu byl jeho účinek signifikantně nižší. Nejúčinnější testovanou látkou z celé skupiny byl extrakt z *J. adhatoda*, viz graf 4 a tab. 19.

Testovaná látka	n	$ED_{50} \pm SEM$ [$\mu mol/l$]	Signifikantní rozdíl v ED_{50} oproti teofylinu?	
Extrakt z <i>J. adhatoda</i>	4	218 ± 20	✓	$P < 0,0001$
Přírodní vasicin	6	323 ± 28	✓	$P < 0,05$
Přírodní vasicinon	3	1300 ± 129	✓	$P < 0,0001$

Tab. 19 Relaxační účinek testovaných chinazolinových alkaloidů izolovaných z *J. adhatoda* na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karbacholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu mol/l$]. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu (rozšířeného o Dunnettův test). Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže $P < 0,05$ (pokud není uvedeno jinak).



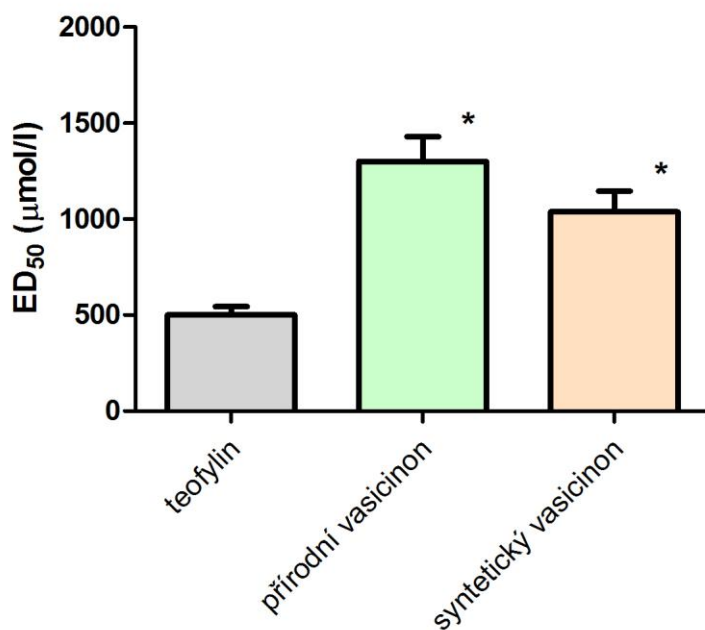
Graf. 4 Relaxační účinek teofylinu a chinazolinových alkaloidů izolovaných z *J. adhatoda* (zelená barva) v porovnání s teofylinem (šedá). Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen ^ ($P < 0,05$) nebo * ($P < 0,0001$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu\text{mol/l}$].

5.2.2. POROVNÁNÍ RELAXAČNÍCH ÚČINKŮ PŘÍRODNÍHO A SYNTETICKÉHO VASICINONU

Vzhledem k tomu, že relaxační účinek vasicinonu izolovaného z *Justicia adhatoda* byl odlišný od účinku ostatních izolovaných látek, a také vzhledem k nejednotným názorům v dosud publikovaných studiích (viz kapitola 3.3.1.1.), rozhodli jsme se určit relaxační aktivitu také u vasicinonu získaného syntetickou cestou a získané hodnoty ED_{50} obou testovaných látek vzájemně porovnat. Zjistili jsme, že relaxační vlastnosti syntetického a přírodního vasicinonu jsou podobné (tab. 20, graf 5) One-way ANOVA test rozšířený o Bonferroniho Multiple Comparison Test dokazuje, že obě látky relaxují hladký sval izolované průdušnice potkana signifikantně méně než teofylin a že rozdíl v ED_{50} syntetického a přírodního vasicinonu není statisticky významný.

Testovaná látka	n	ED ₅₀ ± SEM [μmol/l]	Signifikantní rozdíl v ED ₅₀ oproti teofylinu?	
Přírodní vasicinon	3	1300 ± 129	✓	<i>P</i> <0,0001
Syntetický vasicinon	8	1037,5 ± 109	✓	<i>P</i> <0,0001

Tab. 20 Relaxační účinek přírodního a syntetického vasicinonu na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karbacholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l]. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu (rozšířeného o Bonferroniho Multiple Comparison Test). Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže $P < 0,05$ (pokud není uvedeno jinak).



Graf. 5 Relaxační účinek přírodního vasicinonu získaného izolací z *J. adhatoda* (zelená barva) a vasicinonu získaného syntetickou cestou (oranžová) v porovnání s teofylinem (šedá). Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen * ($P < 0,0001$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l].

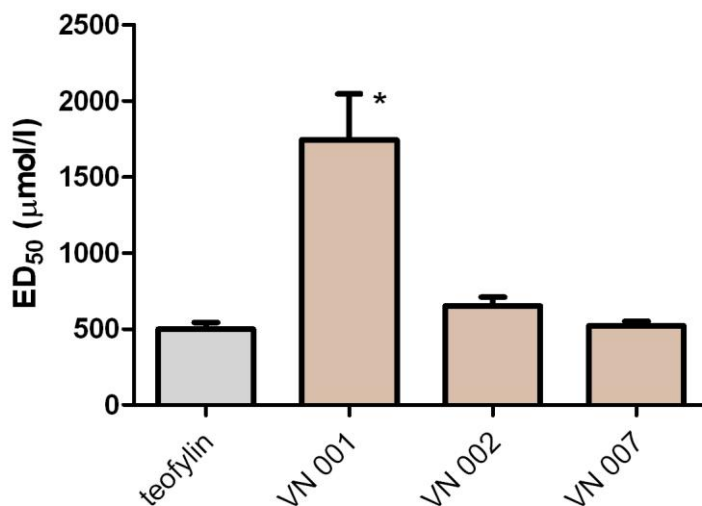
5.2.3. RELAXAČNÍ ÚČINKY SYNTETICKÝCH DERIVÁTŮ CHINAZOLINU

5.2.3.1. Relaxační účinek 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů

Nejprve byla zhodnocena relaxační aktivita VN 001 (4-hydroxychinazolinu). Zjistili jsme, že tato výchozí struktura disponuje mírnou relaxační aktivitou, jež je však signifikantně nižší než účinek teofylinu. Proto jsme dále chtěli zjistit, zda zavedení jednoduchých funkčních skupin do struktury VN 001 nějakým způsobem ovlivní relaxační aktivitu na hladkou svalovinu izolované průdušnice. Hydroxyskupina byla derivatizována takovým způsobem, aby vzniklý boční řetězec obsahoval kyselou či bazickou skupinu nebo pouhý alkyl. Tímto způsobem byly získány deriváty VN 002, VN 005, VN 006. Derivát VN 006 nebyl rozpustný ve vodném roztoku, byl proto převeden na dihydrochlorid (VN 007), který již rozpustný byl. Derivát VN 005 postrádal jakýkoli relaxační efekt, relaxační aktivita derivátů VN 002 a VN 007 byla srovnatelná s teofylinem, viz tab. 21 a graf 6.

Testovaná látka		n	ED ₅₀ ± SEM [μmol/l]	Je ED ₅₀ signifikantní vůči teofylinu?	
VN 001	4-hydroxychinazolin	7	1742 ± 303	✓	<i>P</i> <0,0001
VN 002	chinazolin-4-yl acetát	7	650 ± 59	-	ns
VN 005	kyselina (chinazolin- 4-yl)octová	4	neúčinný	-	-
VN 006	4-metoxychinazolin	-	nerozpustný	-	-
VN 007	4-metoxychinazolin dihydrochlorid	6	519 ± 32	-	ns

Tab. 21 Relaxační účinek 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karcholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l]. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu (rozšířeného o Dunnettův test). Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže *P*<0,05 (pokud není uvedeno jinak).



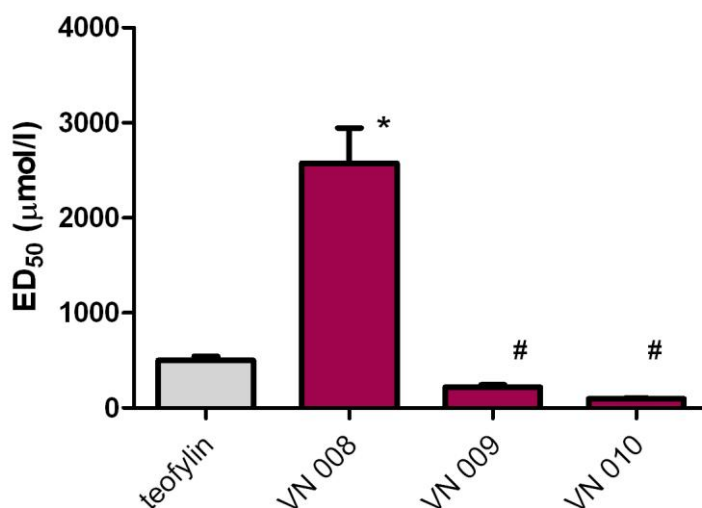
Graf. 6 Relaxační účinek 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů (hnědá barva) ve srovnání s teofylinem (šedá). Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen * ($P < 0,0001$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu\text{mol/l}$].

5.2.3.2. Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem

Vzhledem k tomu, že účinek 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů byl srovnatelný nebo nižší než relaxační účinek teofylinu, byla syntetizována a testována skupina derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem. První látka z této skupiny, derivát VN 008, byl ve srovnání s teofylinem velmi málo účinný. Zbývající dva deriváty, VN 009 a VN 010, byly ovšem oproti teofylinu signifikantně účinnější – VN 009 byl 2x účinnější a VN 010 byl 5x účinnější, viz tab. 22 a graf 7. Při statistickém porovnání ED_{50} derivátů VN 009 a VN 010 jsme zjistili, že hodnota ED_{50} derivátu VN 010 je signifikantně nižší než hodnota ED_{50} derivátu VN 009 ($P < 0,005$), a že derivát VN 010 je tedy nejúčinnějším derivátem této skupiny.

Testovaná látka		n	ED ₅₀ ± SEM [μmol/l]	Je ED ₅₀ signifikantní vůči teofylinu?	
VN 008	<i>N</i> -(2-morfolinoetyl)chinazolin-4-amin	6	2576 ± 370	✓	<i>P</i> <0,0001
VN 009	<i>N</i> -[2-(piperidin-1-yl)etyl]chinazolin-4-amin	6	218 ± 26	✓	<i>P</i> <0,001
VN 010	<i>N</i> -[2-(1-methylpyrrolidin-2-yl)etyl]chinazolin-4-amin	8	97 ± 3	✓	<i>P</i> <0,0001

Tab. 22 Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karbacholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l]. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu (rozšířeného o Bonferroniho Multiple Comparison Test). Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže *P*<0,05 (pokud není uvedeno jinak).



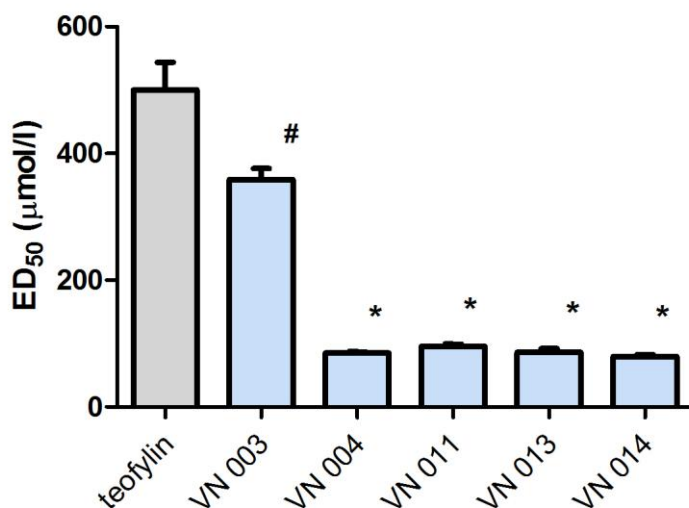
Graf. 7 Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem (červená barva) ve srovnání s teofylinem (šedá). Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen # (*P*<0,001) nebo * (*P*<0,0001). Hodnoty jsou vyjádřeny jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l].

5.2.3.3. Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem

Poslední testovanou skupinou látek byly deriváty chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem. Zjistili jsme, že všechny látky z této skupiny vykazovaly signifikantně vyšší relaxační účinek na hladkou svalovinu izolované průdušnice potkana než teofylin (tab. 23 a graf 8). Jako nejúčinnější se ukázaly deriváty VN 004 a VN 013 (ethylsulfanylderiváty), VN 011(etoxyderivát) a VN 014 (propoxyderivát). Hodnoty ED_{50} těchto čtyř derivátů byly 5-6x nižší než byla hodnota ED_{50} teofylinu. Při aplikaci Bonferoniho statistického testu jsme zjistili, že rozdíl v ED_{50} těchto čtyř derivátů není statisticky významný, a proto nelze v této skupině určit strukturu s největším relaxačním účinkem.

Testovaná látka		n	$ED_{50} \pm SEM$ [$\mu\text{mol/l}$]	Je ED_{50} signifikantní vůči teofylinu?	
VN 003	4-dimethylamino- etoxychinazolin	8	$359 \pm 17,3$	✓	$P < 0,001$
VN 004	4-dimethylaminoethyl- sulfanylchinazolin	8	$85 \pm 2,4$	✓	$P < 0,0001$
VN 011	4-[2-(1-methylpyrrolidin-2- yl)etoxy]chinazolin	8	96 ± 4	✓	$P < 0,0001$
VN 013	4-[2-(1-methylpyrrolidin-2- yl)ethylsulfanyl]chinazolin	8	$86 \pm 6,1$	✓	$P < 0,0001$
VN 014	4-[3-(piperidin-1- yl)propyloxy]chinazolin	9	$80 \pm 2,9$	✓	$P < 0,0001$

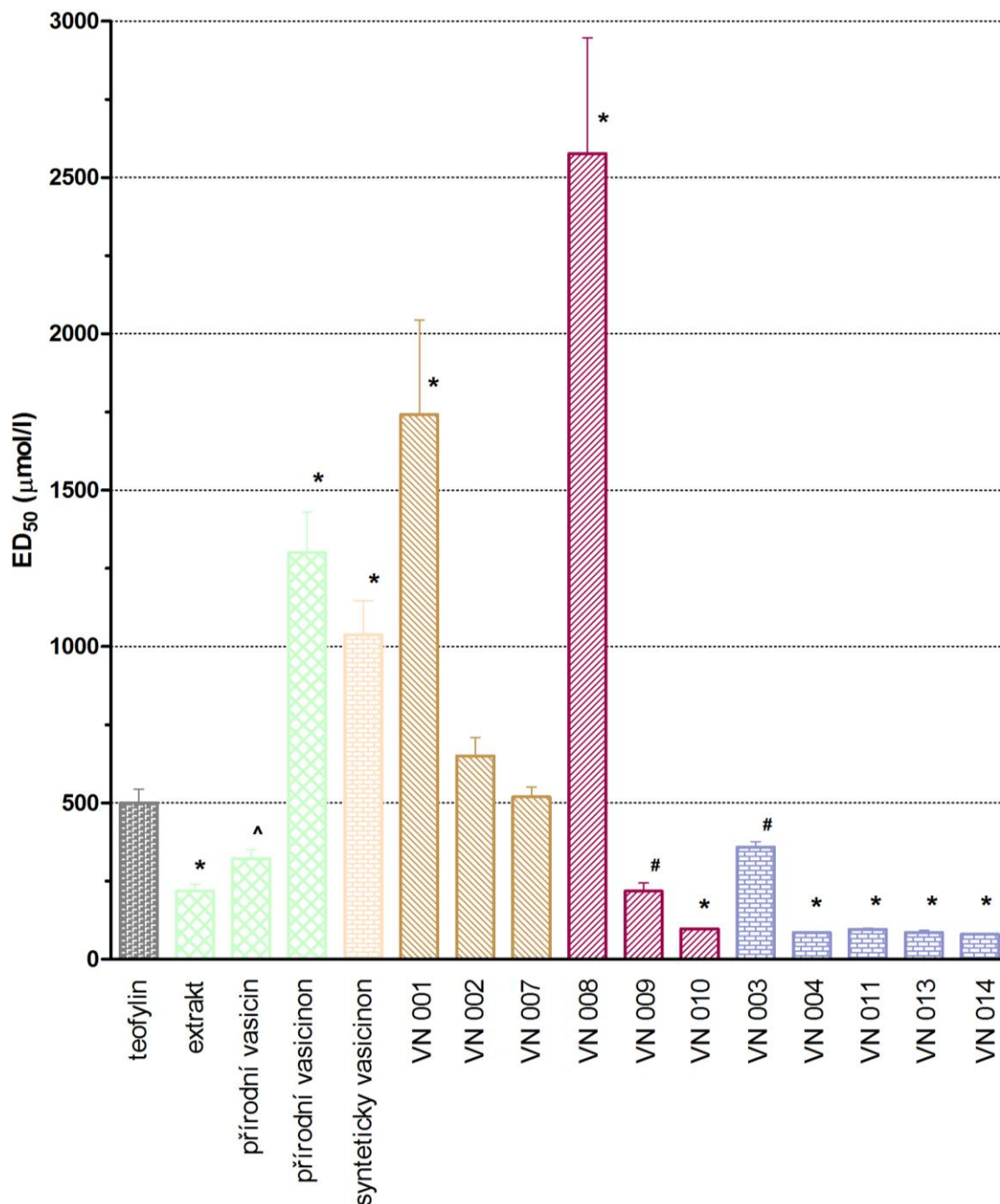
Tab. 23 Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem na izolovanou tracheu potkana prekontrahovanou karchacholem (10^{-5}). Data jsou vyjádřena jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu\text{mol/l}$]. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu (rozšířeného o Bonferoniho Multiple Comparison Test). Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže $P < 0,05$ (pokud není uvedeno jinak).



Graf. 8 Relaxační účinek derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxyfragmentem (modrá barva) ve srovnání s teofylinem (šedá). Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen # ($P < 0,001$) nebo * ($P < 0,0001$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako $ED_{50} \pm SEM$ [$\mu\text{mol/l}$].

5.2.4. POROVNÁNÍ RELAXAČNÍCH ÚČINKŮ VŠECH TESTOVANÝCH LÁTEK

Tato část umožňuje srovnání všech výsledků získaných sledováním relaxačního účinku testovaných přírodních chinazolinových alkaloidů včetně extraktu z *Justicia adhatoda* a syntetických derivátů chinazolinu (viz graf 9). V grafu nejsou zahrnuty nerozpustné (VN 006) a zcela neúčinné sloučeniny (VN 005). Pro jednodušší orientaci jsou deriváty patřící do společné skupiny barevně odlišeny.



Graf. 9 ED₅₀ teofylinu a testovaných přírodních a syntetických derivátů chinazolinu. Signifikantní rozdíl v účinnosti oproti teofylinu je vyznačen ^ (P<0,05), # (P<0,001) nebo * (P<0,0001). Kontrola (teofylin) je označena šedou barvou, extrakt z *Justicia adhatoda* a přírodní chinazolinové alkaloidy zelenou, syntetický vasicinon oranžovou, 4-hydroxychinazolin a jeho jednoduché deriváty hnědou, deriváty chinazolinu s etylaminovým fragmentem vínovou a deriváty chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem modrou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako ED₅₀ ± SEM [μmol/l].

VI. DISKUZE

6.1. *IN VIVO* EXPERIMENTS

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění charakterizované obstrukcí dýchacích cest, plicní hyperreaktivitou, zvýšenou vaskulární permeabilitou doprovázenou edémem, progresivní sekrecí hlenu a infiltrací zánětlivých buněk (Ellis et al., 2004; Tanaka et al., 2004). Bylo prokázáno, že jedna z příčin zvyšující se prevalence astmatu jde ruku v ruce se západním životním stylem souvisejícím s nevhodnou dietou, jejímž hlavním rysem je nedostatečné množství antioxidantů, zvýšené množství ω -6 polynenasycených mastných kyselin (margaríny) a deficit ω -3 polynenasycených mastných kyselin (rybí olej) (Weiss, 1997; Riccioni et al., 2007; Devereux, Seaton, 2005). Je zřejmé, že na patogenezi astmatu výrazně participuje oxidační stres spolu se zánětlivými buňkami produkujícími zvýšená množství reaktivních kyslíkových radikálů (MacNee, 2001). Nadměrná produkce kyslíkových radikálů vede ke změnám koncentrace endogenních antioxidantů, např. glutathionu, vitamínu C a E, β -karotenu, močové kyseliny, thioredoxinu, superoxidodismutázy, katalázy a glutathionperoxidázy, což ústí v narušení oxidačně-antioxidační rovnováhy v respiračním systému. Tato nerovnováha přispívá k patofyziologickým stavům spojeným s astmatem (vaskulární permeabilita, hypersekrece hlenu, kontrakce hladkého svalu, narušení epitelové vrstvy) (Fujisawa, 2005; Agacdiken et al., 2004; MacNee, 2001; Nadeem, 2008).

V řadě klinických studií byly u astmatiků potvrzeny změny v koncentraci antioxidantů. Bylo prokázáno, že koncentrace vitamínu C v plazmě (Vural, Uzun, 2000) a leukocytech je u astmatických pacientů snižena (Olusi et al., 1979). Dále bylo zjištěno, že ačkoli mohou být u astmatiků plazmatické koncentrace vitamínů C a E normální nebo zvýšené, v tekutině pokrývající dýchací cesty jsou tyto vitamíny zastoupeny v nízkém množství (Kelly et al., 1999). U dospělých astmatiků byla též nalezena nižší plazmatická hladina koenzymu Q₁₀ a α -tokoferolu, než tomu bylo u zdravých jedinců (Gazdik et al., 2002a). Jiné studie analyzující obsah antioxidačních vitamínů u astmatických dětí také prokázaly sníženou koncentraci těchto vitamínů v krvi (Shanmugasundaram et al., 2001) i v séru, a to dokonce i během asymptomatického období (Aderle et al., 1985; Kalayci et al., 2000). Nedávno provedená studie potvrdila, že antioxidační ochrana u dětí s asthma

bronchiální je oslabena díky nižší koncentraci enzymatických i neenzymatických antioxidantů, zejména GSHPx, SOD, glutathionu a aminokyselin nezbytných k jeho syntéze, vitaminů C a E, lykopenu a β -karotenu (Sackesen et al., 2008). Někteří autoři naznačují, že dětské astma je nemoc zapříčiněná deficitem liposolubilních vitaminů v prenatálním stadiu (Weiss, 1997; Devereux, 2007). Poměrně dlouho je též známo, že astmatici mají nižší koncentraci selenu v plazmě a erytrocytech a sníženou aktivitu glutathionperoxidázy v erytrocytech a trombocytech, což může vést k prohlubování zánětu (Kadrabová et al., 1996; Misso et al., 1996; Hasselmark et al., 1990). Výzkumy odhalily, že suplementace selenem vede ke zvýšení aktivity glutathionperoxidázy (Nève, 1995; Voitsekhovskaia et al., 2007), což, jak bylo zjištěno o několik let později, má příznivý vliv zejména na astma kortikodependentních pacientů, protože snižuje potřebu inhalačních a systémových kortikosteroidů (Gazdik et al., 2002b). Doposud však nelze uvést jednoznačné závěry, protože recentně publikované klinické studie naznačují, že pacienti s těžkým astmatem mají plazmatické koncentrace selenu naopak v normě. Autoři dokonce popisují zvýšenou aktivitu glutathionperoxidázy těžkých astmatiků, což lze vysvětlit tím, že dochází k tzv. up-regulaci enzymů jako odpověď na oxidační stres (Jacobson et al., 2007). V dýchacích cestách astmatiků se nachází zvýšené množství oxidovaného glutathionu, což opět podporuje hypotézu oxidačního stresu u pacientů s astmatem (Kelly et al., 1999). Ačkoli podrobný mechanismus není znám, volné radikály a oxidační stres se s největší pravděpodobností podílejí na vzniku a průběhu astmatu.

Před několika lety byl na *in vivo* modelu alergického astmatu pozorován mírný protektivní účinek α -tokoferolu při bronchospasmu navozeném ovalbuminem (Štětinová, Grossmann, 2000). O tři roky později bylo v *in vitro* experimentu prokázáno, že premedikace α -tokoferolem signifikantně snižuje kontraktilitu izolované průdušnice u morčat senzibilizovaných ovalbuminem (Kilic, Erol, 2003). V dubnu 2005 byly publikovány další dvě studie zabývající se vlivem α -tokoferolu na respirační systém. První experiment popisuje příznivé účinky p.o. podávaného vitaminu E na hyperreaktivitu dýchacích cest u potkanů, kteří byli senzibilizováni ovalbuminem (Jain et al., 2005). V druhém experimentu jsou pak popisovány imunomodulační vlastnosti aerosolu α -tokoferolu sledované u modelu akutního respiračního zánětu navozeného

lipopolysacharidy. Autoři naznačují, že by inhalační podání α -tokoferolu mohlo mít přínosné účinky ve strategii kontroly zánětlivých procesů v plicích (Hybertson et al., 2005). Ve stejném časovém horizontu, kdy byly publikovány výsledky našeho experimentu, zveřejnili svou studii i Okamoto et al., kteří zjistili, že α -tokoferol inhibuje alergickou odpověď sledovanou na ovalbuminem navozeném modelu alergického astmatu u myši. Tento antioxidant snižoval IL-4 a IL-5 v BALF, tlumil reaktivitu dýchacích cest na acetylcholin a omezil infiltraci zánětlivých buněk do plic (Okamoto et al., 2006). Za zmínku stojí i nedávno publikovaná experimentální studie, podle které intenzivní suplementace γ -tokoferolem příznivě ovlivnila zánětlivou reakci navozenou ovalbuminem. Orálně podávaný γ -tokoferol omezil infiltraci eozinofilů do plic senzibilizovaných potkanů, redukoval změny epitelových buněk a snižoval produkci hlenu pohárkovými buňkami. Dále inhiboval syntézu PGE₂, leukotrienu B₄ a cysteinylových leukotrienů v plicích (Wagner et al., 2008).

Celkově však bylo publikováno jen velmi málo studií zabývajících se účinky vitamínu E na izolovanou tracheu nebo experimentálně navozené astma a mechanismus účinku tokoferolu není doposud úplně objasněn.

Protože nedostatek antioxidantů ve stravě může být jednou z příčin zvyšující se prevalence astmatu (Weiss, 1997; Soutar et al., 1997), zabývali jsme se otázkou, zda by mohla být suplementace α -tokoferolem prospěšná u experimentálně navozeného modelu alergického astmatu potkana. Cílem *in vivo* experimentu bylo objasnit účinek orálně podávaného α -tokoferolu na hyperreaktivitu dýchacích cest, na infiltraci buněk zánětu (zejména eozinofilů, neutrofilů) a na histologické změny dýchacích cest u modelu alergického astmatu potkanů. Je známo, že ačkoli se na patogenezi astmatu podílí všechny zánětlivé buňky, ústřední roli mají eozinofily (Wood et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Adamko et al., 2004). Ostatní buňky, jako např. neutrofilů, se na tomto procesu podílejí také, ale jejich úloha je pravděpodobně méně důležitá. Migrace zánětlivých buněk závisí na množství faktorů, mj. i na expresi adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 (Adamko et al., 2004). Expresie ICAM-1 a VCAM-1 je závislá na NF- κ B (Holden et al., 2004; Kim et al., 2001), o kterém je známo, že je senzitivní vůči oxidantům (Yang et al., 1998). Léčba antioxidanty chrání NF- κ B a mohla by tak inhibovat expresi obou adhezních molekul

(Chang, Crapo, 2002). Dokonce byl pozorován i pokles eozinofilie po p.o. podání některých antioxidantů, např. N-acetylcysteinu (Blesa et al., 2002; Blesa et al., 2003) a chloraminového derivátu taurinu (Martinez-Losa et al., 2009). Byl též popsán vztah mezi oxidativním stresem a migrací neutrofilů v plicích (MacNee, 2001; Drost et al., 1992; Lehr et al., 1993).

Předpokládali jsme, že orální podání α -tokoferolu by mohlo mít příznivý vliv na antigenem vyvolanou hyperreaktivitu dýchacích cest navozenou na modelu alergického astmatu potkana. V námi provedeném experimentu neměla suplementace α -tokoferolem statisticky významný vliv na hyperreaktivitu dýchacích cest, na infiltraci zánětlivých buněk ani na histologické změny v porovnání s kontrolními skupinami. Naše poznatky mohou být vysvětleny třemi způsoby.

➤ Za prvé, naše hypotéza byla chybná a α -tokoferol nemá navzdory svým antioxidačním vlastnostem žádný vliv na bronchiální odpověď ani plicní zánět vyvolaný alergenem, bez ohledu na dávkovací schéma. Protože však byly jiné antioxidanty v podobných experimentálních modelech účinné (Blesa et al., 2002; Blesa et al., 2003; Cortijo et al., 2001; Jain et al., 2005), je pravděpodobné, že existuje souvislost mezi oxidačně-antioxidačními vlastnostmi a odpovědí na alergenem vyvolanou challenge. Antioxidační ochrana organismu představuje složitý komplex mechanismů, které pracují ve vzájemné souhře, doplňují se, a mnohdy i potencují, navíc musejí být v rovnováze s prooxidačními látkami, tedy s produkcí volných radikálů (regulovaná produkce malého množství ROS je fyziologická a pro organismus nezbytná). Můžeme proto právem hovořit o komplexním systému udržení redoxní rovnováhy. Jeho jednotlivé součásti jsou velmi různorodé, mají nestejnou intenzitu i mechanismus účinku (Racek, 2003). Každý antioxidant má v tomto komplexním systému svou úlohu. Integrace exogenních antioxidantů do fyziologického antioxidačního systému zřejmě zásadně zvyšuje šanci na jejich účinnost. Například thiolová sloučenina N-acetylcystein (NAC) působí přímo jako scavenger volných radikálů a může sloužit jako prekurzor redukovaného glutathionu, klíčové složky antioxidační obrany. V souladu s tím měla premedikace NAC sledovaná na modelu alergického astmatu příznivý účinek na antigenem navozenou hyperreaktivitu dýchacích cest, peroxidaci lipidů a expresi některých enzymů (Blesa et al., 2003;

Cotgreave, 1997). Jak již bylo zmíněno, α -tokoferol je antioxidačně působící vitamin s oxidoredukčními vlastnostmi. Má schopnost zhaset volné radikály a jeho regenerace vyžaduje interakci s dalšími antioxidanty. Námi pozorovaný nesignifikantní účinek tokoferolu by mohl být vysvětlen tak, že u potkanů senzibilizovaných ovalbuminem nezastává α -tokoferol významnou roli v reakci na antigen challenge. Je možné, že koncentrace α -tokoferolu není ve zvoleném experimentálním modelu pro funkci antioxidačního systému důležitá a že syntéza a regenerace hlavních antioxidantů (např. redukovaného glutathionu) a jejich přímých prekurzorů na množství tokoferolu nezávisí nebo má zanedbatelný vliv. Je také třeba vzít v úvahu participaci jiných než antioxidačních faktorů, a také komplexní charakter patogeneze astmatu.

➤ Za druhé, model alergického astmatu potkana nebyl vhodně zvolený a proto neumožnil verifikaci naší hypotézy. Tato možnost je však méně pravděpodobná, protože jsme za 24 hod po antigen challenge našli signifikantní rozdíly v bronchiální reaktivitě senzibilizovaných potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou a histopatologická analýza taktéž potvrdila zánětlivé změny. Tyto výsledky jsou ve shodě s obecně uznávanou koncepcí pozdní reakce u senzibilizovaných potkanů vystavených antigen challenge (Blesa et al., 2003; Cortijo et al., 2001; Blesa et al., 2002). Mimoto je tento model alergického astmatu často používaný v podobných studiích (Elwood et al., 1991; Elwood et al., 1992). Potkani a morčata jsou nejčastěji používaná laboratorní zvířata v *in vitro* i *in vivo* experimentálních výzkumech astmatu. Potkani kmene Wistar byli sice používáni v experimentech založených na senzibilizaci ovalbuminem (Ferreira et al., 2004; Xu et al., 2004; Feitosa et al., 2002) a v dalších studiích zabývajících se respiračním systémem (Pauluhn, 2004; Dye et al., 2002), nicméně nevylučujeme možnost, že by použití potkanů Brown Norway mohlo přinést ucelenější výsledky, protože tento kmen je typický svou vyšší hladinou neutrofilů a eozinofilů.

➤ Za třetí, α -tokoferol je schopen změnit odpověď na challenge ovalbuminem u aktivně senzibilizovaných potkanů, ale použité dávky nebo způsob podání nebyly optimální. Domníváme se však, že dávka 400 mg/kg/den byla adekvátní. Tato dávka vycházela z již dříve publikovaných studií, které se zabývaly antioxidačními účinky α -tokoferolu (dávky uvedené v těchto studiích kolísají v rozmezí 100-500 mg/kg/den)

(MacDonald-Wicks, Garg, 2003; Helen et al., 2003; Demiralay et al., 2006, Frenoux et al., 2006; Zhang et al., 1996). U potkanů premedikovaných tokoferolem sice nebyly nalezeny žádné signifikantní změny, ale byla pozorována tendence k omezení bronchiální hyperreaktivity a nižší množství eozinofilů a neutrofilů. Je možné, že bychom dospěli k odlišným výsledkům, pokud bychom zvolili jiný způsob podání. Hernandez et al. totiž nedávno zjistili, že orální suplementace α -tokoferolem zvyšuje jeho hladinu v plazmě, nikoli však v RTLf (Hernandez et al., 2009). Tato studie byla sice klinického charakteru, nicméně podobný mechanismus může existovat i u potkanů. Koncentrace α -tokoferolu v RTLf by se mohla zvýšit jeho aplikací ve formě aerosolu. Toto podání je sice neobvyklé, nicméně možné - byly publikovány experimentální studie, které ověřily příznivé účinky inhalačně podávaného α - a γ -tokoferolu na akutní poškození plic (Morita et al., 2006; Hamahata et al., 2008).

Toto byla jedna z prvních studií popisujících účinky vitamínu E na plicní odpověď sledovanou na experimentálním modelu alergického astmatu u potkana. I přesto, že v tomto experimentu premedikace α -tokoferolem neměla signifikantní vliv na bronchiální reaktivitu, ani viditelně neovlivnila histologické nálezy, nelze potenciální terapeutickou hodnotu α -tokoferolu vyloučit.

6.2. *IN VITRO* EXPERIMENTS

Jednou z mnoha léčivých rostlin používaných v podpůrné terapii respiračních onemocnění je *Justicia adhatoda* (Acanthaceae). Tato rostlina je původem z Indie, kde je tamními obyvateli používána již několik století k terapii astmatu a kašle. Její bronchoprotektivní účinky jsou pravděpodobně zprostředkovány chinazolinovým alkaloidem vasicinem (Claeson et al., 2000). Prvním cílem *in vitro* experimentu bylo ověřit, jakým způsobem ovlivňují vybrané chinazolinové alkaloidy izolované z *J. adhatoda* tonus izolované průdušnice potkana. Při testování účinku těchto látek jsme vycházeli z modifikované metodiky dle Castillo a de Beera (Castillo, de Beer, 1947), která se dodnes používá v testování relaxačních účinků látek na hladkou svalovinu izolované průdušnice.

Všechny námi testované přírodní substance (vasicin, vasicinon a standardizovaný extrakt z listů *J. adhatoda*) vykazovaly relaxační účinky na izolovanou průdušnici potkana.

Nejúčinnější byl jednoznačně rostlinný extrakt obsahující oba alkaloidy. Tento poznatek může být vysvětlen tím, že se obsahové látky extraktu navzájem ve svém fyziologickém účinku potencují. Na účinku by se mohly podílet i jiné látky, než sledované chinazolinové alkaloidy; jejich koncentrace sice není v porovnání s vasicinem a vasicinonem vysoká, ale je možné, že mohou potencovat účinek testovaného vasicinu a vasicinonu. Podle očekávání se relaxační efekt potvrdil i u vasicinu, ačkoli jeho účinnost byla nižší než u standardizovaného extraktu. Nejméně účinnou testovanou přírodní látkou byl vasicinon, nicméně i ten vykazoval mírné relaxační účinky. Naše poznatky jsou ve shodě s poznatky podobně zaměřených studií (Amin, Mehta, 1959; Cambridge et al., 1962). Výsledek testování kontrastuje pouze s tvrzením Atala (1980), který považuje účinky vasicinonu za bronchokonstrikční. Jeho informace ani schéma pokusu se nám ale nepodařilo ověřit, protože výsledky jeho experimentu známe pouze zprostředkovaně, a to díky přehledovému článku Claesona et al. (2000). V každém případě byly námi zjištěné relaxační vlastnosti vasicinonu signifikantně nižší ve srovnání s teofylinem, vasicinem i extraktem.

Vzhledem k omezenému množství vasicinonu izolovaného z *J. adhatoda* jsme relaxační působení studovali jen na malém souboru zvířat, což mohlo hodnotu ED₅₀ ovlivnit. Proto jsme se rozhodli stanovit i relaxační aktivitu vasicinonu získaného syntetickou cestou a obě získané hodnoty ED₅₀ porovnat. Aplikace Bonferroniho statistického testu dokazuje, že mezi účinností obou derivátů není signifikantní rozdíl. Signifikantně nejnižší relaxační účinek přírodního vasicinonu ze všech testovaných přírodních látek proto pravděpodobně nebyl způsoben chybou vzniklou použitím malého souboru zvířat, ale zřejmě je skutečně dán jeho odlišnými farmakologickými vlastnostmi.

➤ Je všeobecně známo, že chemickou modifikací přírodní struktury lze velmi často získat sloučeniny s vyšší účinností. Protože vasicin a vasicinon jsou deriváty odvozené od chinazolinu, testovali jsme relaxační účinky některých jeho derivátů získaných zavedením různých funkčních skupin do základní struktury. Hodnotili jsme relaxační aktivitu 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů, derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem a derivátů chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem. Testované deriváty jsme srovnávali s klasickou bronchodilatační látkou – teofylinem. Vzhledem k tomu, že se jednalo o nově navržené

struktury, u kterých doposud nebyla hodnocena relaxační aktivita, nelze jejich účinnost porovnávat s výsledky již publikovaných experimentů zkoumajících účinky chinazolinových derivátů na respirační systém. Na základě zjištěných dat můžeme konstatovat, že účinnost navrhovaných a testovaných látek se postupně zvyšovala; stejně tak výsledky byly nejvíce homogenní u poslední skupiny s nejsilnější relaxační aktivitou. Ze získaných výsledků je dále zřejmé, že chinazolinová struktura sama o sobě není jediným dostačujícím předpokladem relaxačního účinku na hladkou svalovinu izolované průdušnice, ale že látka musí mít i vhodné fyzikálně-chemické vlastnosti, např. dostatečnou rozpustnost.

Z uvedených hodnot relaxační aktivity látek VN 001 – VN 014 vyplývá, že nejúspěšnější připravené deriváty chinazolinu testované v rámci této dizertační práce obsahovaly v bočním řetězci bazické centrum (terciární alifatický amin) vázané na atom dusíku, síry nebo kyslíku v poloze 4 chinazolinového jádra přes fragment obsahující dva nebo tři uhlíky; výskyt kyselé skupiny (VN 005) se projevil vymizením biologické aktivity. Výjimkou ze skupiny chinazolinů obsahující tento bazický řetězec byla pouze látka VN 008, kde byl terciární dusík součástí morfolinového kruhu, což naznačuje, že přítomnost dalšího atomu s elektronakceptorovými vlastnostmi v blízkosti bazického centra není žádoucí. Rozdíl v relaxační aktivitě nejúčinnějších látek s terciární aminoskupinou nebyl příliš významný, jako nejperspektivnější se jevily deriváty chinazolinu obsahující atom síry v bočním řetězci. Studium účinků syntetických derivátů chinazolinu na izolovanou průdušnici potkana bude pokračovat i nadále. Další směr vývoje této skupiny chinazolinů se bude ubírat cestou identifikace optimálního počtu členů spojovacího řetězce, jeho přesunutí do poloh 2 a 3 chinazolinu a dále substituce na samotném chinazolinovém jádru takovým způsobem, aby se dosáhla podobnost s již známými bronchodilatačními látkami popsány v kapitole 3.3.2.

VII. ZÁVĚR

7.1. *IN VIVO* EXPERIMENTY

Při studiu účinku vybraných látek na respirační systém metodami *in vivo* jsme sledovali účinky α -tokoferolu na experimentálně navozený model alergického astmatu u potkana kmene Wistar. Hodnotili jsme vliv α -tokoferolu na bronchiální hyperreaktivitu, na celkový a diferenciální počet buněk a na histopatologické změny plicní tkáně.

➤ Při hodnocení bronchiální hyperreaktivit jsme zjistili, že serotonin aplikovaný jednu hodinu po antigen challenge navodil bronchokonstrikční odpověď závislou na dávce. Tuto odpověď jsme zaznamenali u zvířat premedikovaných α -tokoferolem i u obou kontrolních skupin. Rozdíly v bronchospasmu se mezi skupinami statisticky významně nelišily.

➤ Při dalším hodnocení bronchiální reaktivity jsme zjistili, že serotonin aplikovaný za 24 hodin po antigen challenge navodil u pozitivní kontroly signifikantní nárůst overflow závislý na dávce v porovnání s negativní kontrolou. U potkanů premedikovaných α -tokoferolem jsme pozorovali určitou tendenci k nižší hyperreaktivitě oproti pozitivní kontrole, ovšem tyto změny nebyly statisticky významné.

➤ V tekutině bronchoalveolární laváže (BALF) odebrané za jednu hodinu po challenge fyziologickým roztokem nebo ovalbuminem jsme nepozorovali žádný statisticky významný rozdíl v celkovém ani diferenciálním počtu buněk.

➤ V BALF odebraném za 24 hodin po challenge fyziologickým roztokem nebo ovalbuminem jsme u pozitivní kontroly našli signifikantně vyšší celkový počet buněk ve srovnání s negativní kontrolou. U zvířat premedikovaných α -tokoferolem byl nárůst celkového počtu buněk nižší než u pozitivní kontroly, ovšem tato tendence nebyla signifikantní. Diferenciální počet buněk ukázal signifikantně vyšší množství eozinofilních a neutrofilních granulocytů u pozitivní kontroly ve srovnání s negativní kontrolou. Ve skupině zvířat premedikovaných α -tokoferolem jsme pozorovali tendenci k nižšímu nárůstu eozinofilů a neutrofilů oproti pozitivní kontrole, nicméně rozdíl nebyl signifikantní.

➤ Histopatologickou analýzou plicní tkáně jsme zjistili, že jak u zvířat léčených α -tokoferolem, tak u pozitivní kontroly nastala tvorba peribronchiálního a perivaskulárního zánětu a došlo k hypertrofii hladkého svalstva bronchiolů. Nebyly

nalezeny žádné kvantitativní ani kvalitativní rozdíly, což znamená, že premedikace α -tokoferolem nenavodila ve srovnání s pozitivní kontrolou žádné pozorovatelné změny. U negativní kontroly žádné zánětlivé změny nalezeny nebyly.

7.2. IN VITRO EXPERIMENTY

Při zkoumání účinku vybraných látek na respirační systém *in vitro* metodou jsme hodnotili relaxační účinky přírodních a syntetických derivátů chinazolinu na izolovanou tracheu potkana kmene Wistar v porovnání se standardem (teofylin).

➤ Všechny námi testované přírodní deriváty disponovaly určitou relaxační aktivitou. Nejsilnější relaxační účinek jsme prokázali u standardizovaného extraktu z *Justicia adhatoda*, jehož účinnost byla oproti teofylinu signifikantně vyšší. Také vasicin byl v porovnání s teofylinem účinnější, ovšem na nižší hladině statistické významnosti. Nejméně účinnou látkou ze skupiny přírodních látek byl vasicinon. Vykazoval pouze mírnou relaxační aktivitu, která byla oproti teofylinu signifikantně nižší.

➤ Dále jsme porovnávali relaxační účinek přírodního vasicinonu izolovaného z *Justicia adhatoda* s účinkem vasicinonu získaného syntetickou cestou. Relaxační efekt přírodního vasicinonu byl sice oproti aktivitě syntetického analogu poněkud vyšší, nicméně rozdíl v jejich aktivitě nebyl statisticky významný. Oba deriváty byly signifikantně méně účinné než teofylin.

➤ Testováním účinku 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů získaných syntetickou cestou jsme prokázali mírnou relaxační aktivitu u derivátů VN 001, VN 002 a VN 007. Relaxační efekt VN 001 byl oproti teofylinu signifikantně nižší, deriváty VN 002 a VN 007 byly nesignifikantně méně účinné než použitý standard. Tuto skupinu látek proto hodnotíme jako málo účinnou.

➤ Testováním relaxačního účinku syntetických derivátů chinazolinu s etylaminovým fragmentem jsme zjistili, že nejméně účinnou strukturou z této skupiny byl derivát VN 008. Jeho relaxační efekt byl jen mírný a derivát byl oproti standardu signifikantně méně účinný. Naproti tomu ale deriváty VN 009 a VN 010 ukazovaly v porovnání s teofylinem statisticky významný relaxační efekt.

➤ Poslední testovanou skupinou syntetických látek byly deriváty chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy-fragmentem. Nejméně účinnou strukturou z této

skupiny byl etoxyderivát VN 003, nicméně jeho aktivita byla ale v porovnání s teofylinem signifikantně vyšší. U struktur VN 004 a VN 013 (etylsulfanylderiváty), VN 011 (etoxyderivát) a VN 014 (propoxyderivát) jsme prokázali relaxační efekt, který byl v porovnání s teofylinem signifikantně vyšší. Relaxační účinek posledních čtyř derivátů jsme považovali za srovnatelný, neboť rozdíly v ED_{50} těchto sloučenin nebyly statisticky významné. V této skupině látek proto nelze určit sloučeninu s nejúčinnějším typem fragmentu.

Závěrem lze konstatovat, že nejsilnější relaxační účinky na hladkou svalovinu izolované průdušnice potkana vykazují deriváty mající v bočním řetězci bazické centrum vázané na atom dusíku, síry nebo kyslíku v poloze 4 chinazolinového jádra přes fragment obsahující dva nebo tři uhlíky.

VIII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adamko D, Lacy P, Moqbel R. Eosinophil function in allergic inflammation: from bone marrow to tissue response. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004; 4:149–58.

Aderele WI, Ette SI, Oduwale O et al. Plasma vitamin C (ascorbic acid) levels in asthmatic children. *Afr J Med Med Sci.* 1985 Sep-Dec; 14(3-4):115-20.

Agacdiken A, Basyigit I, Ozden M et al. The effects of antioxidants on exercise-induced lipid peroxidation in patients with COPD. *Respirology.* 2004; 9:38–42.

Agbonon A, Aklkokou K, Kwashie EG, Gbéassor M. Anti-cholinergic effect of *Pluchea ovalis* (pers.) Dc. (asteraceae) root extract on isolated Wistar rat tracheae. *Ann Pharm Fr.* 2004 Sep; 62(5):354-8.

Amin AH, Mehta DR. A bronchodilator alkaloid (vasicinone) from *Adhatoda vasica* Nees. *Nature.* 1959 Oct 24; 184(Suppl 17):1317.

Atal CK. Chemistry and Pharmacology of Vasicine - A New Oxytocic and Abortifacient. Regional Research, Laboratory, Jammu-Tawi. 1980.

Avissar N, Finkelstein JN, Horowitz S et al. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am J Physiol.* 1996 Feb; 270(2 Pt 1):L173-82.

Bahekar RH, Rao AR. Bronchodilation and structure-activity relationship studies on new 6-substituted benzimidazo[1,2-c]quinazolines. *Arzneimittelforschung.* 2000 Aug; 50(8):712-6.

Bahekar RH, Rao AR. Synthesis, evaluation and structure-activity relationships of 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazolin-2(1H)-thiones and their oxo-analogues as new potential bronchodilators. *Arzneimittelforschung.* 2001; 51(4):284-92.

Baptist AP, Reddy RC. Inhaled corticosteroids for asthma: are they all the same? *J Clin Pharm Ther.* 2009 Feb; 34(1):1-12.

Barnes PJ. Scientific rationale for combination inhalers with a long-acting β_2 -agonists and corticosteroids. *Eur Respir J.* 2002; 19:182–191.

Barnes PJ. Scientific rationale for using a single inhaler for asthma control. *Eur Respir J.* 2007; 29:587–95.

Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J.* 2008 Jan; 31(1):143-78.

Beeh KM, Derom E, Kanniss F et al. Indacaterol, a novel inhaled beta2-agonist, provides sustained 24-h bronchodilation in asthma. *Eur Respir J.* 2007; 29:871–8.

Behndig AF, Blomberg A, Helleday R et al. Augmentation of respiratory tract lining fluid ascorbate concentrations through supplementation with vitamin C. *Inhal Toxicol.* 2009 Feb; 21(3):250-8.

Belliveau PP. Omalizumab: A Monoclonal Anti-IgE Antibody. *MedGenMed.* 2005 Jan 27; 7(1):27.

Beyer RE.: The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *J Bioenerg Biomembr.* 1994 Aug; 26(4):349-58.

Bhattacharyya D, Pandit S, Jana U et al. Hepatoprotective activity of *Adhatoda vasica* aqueous leaf extract on D-galactosamine-induced liver damage in rats. *Fitoterapia.* 2005 Mar; 76(2):223-5.

Blesa S, Cortijo J, Martinez-Losa M et al. Effectiveness of oral N-acetylcysteine in a rat experimental model of asthma. *Pharmacol Res.* 2002; 45: 135–40.

- Blesa S, Cortijo J, Mata M et al. Oral N-acetylcysteine attenuates the rat pulmonary inflammatory response to antigen. *Eur Respir J*. 2003; 21:394–400.
- Boskabady MH, Ziaei T. Effect of ascorbic acid on airway responsiveness in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Respirology* 2003; 8:473–8.
- Bousquet J, Boulet LP, Peters MJ et al. Budesonide/formoterol for maintenance and relief in uncontrolled asthma vs. high-dose salmeterol/fluticasone. *Respir Med*. 2007 Dec; 101(12):2437–46.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Nov; 108(5 Suppl):S147–334.
- Brussee JE, Smit HA, van Striden RT et al. Allergen exposure in infancy and the development of sensitization, wheeze, and asthma at 4 years. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May; 115(5): 946–52
- Buhl R, Vogelmeier C: Budesonide/formoterol maintenance and reliever therapy: a new treatment approach for adult patients with asthma. *Curr Med Res Opin*. 2007; 23:1867–78.
- Bureš J, Horáček J. *Základy vnitřního lékařství*. Praha: Galén. 2003; 92–93.
- Busse WW, Shah SR, Somerville L et al. Comparison of adjustable- and fixed-dose budesonide/formoterol pressurized metered-dose inhaler and fixed-dose fluticasone propionate/salmeterol dry powder inhaler in asthma patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121:1407–14.
- Cambridge GW, Jansen AB, Jarman DA. Bronchodilating action of vasicinone and related compounds. *Nature*. 1962 Dec 22; 196:1217.
- Castillo JC, de Beer EJ. The Tracheal Chain. A Preparation for the study of Antisposmodics with particulae Reference to Bronchodilator Drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1947; 90:104.
- Cates CJ, Lasserson TJ. Combination formoterol and inhaled steroid versus beta(2)-agonist as relief medication for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jan 21; (1):CD007085.
- Centanni S, Santus P, Di Marco F et al. The potential role of tocopherol in asthma and allergies: modification of the leukotriene pathway. *BioDrugs*. 2001; 15(2):81–6.
- Claeson UP, Malmfors T, Wikman G et al. *Adhatoda vasica*: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data. *J Ethnopharmacol*. 2000 Sep; 72(1–2):1–20.
- 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.
- Cortijo J, Blesa S, Martinez-Losa M et al. Effects of taurine on pulmonary responses to antigen in sensitized Brown-Norway rats. *Eur J Pharmacol*. 2001; 431:111–17.
- Cotgreave IA. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol*. 1997; 38:205–27.
- Demiralay R, Gürsan N, Erdem H. The effects of erdosteine, N-acetylcysteine, and vitamin E on nicotine-induced apoptosis of pulmonary cells. *Toxicology*. 2006; 219:197–207.
- Devereux G, Seaton A. Diet as a risk factor for atopy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Jun; 115(6):1109–17.
- Devereux G, Turner SW, Craig LC et al. Low maternal vitamin E intake during pregnancy is associated with asthma in 5-year-old children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Sep 1; 174(5):499–507.

- Devereux G. Early life events in asthma-diet. *Pediatr Pulmonol.* 2007 Aug; 42(8):663-73.
- Dhuley JN. Antitussive effect of *Adhatoda vasica* extract on mechanical or chemical stimulation-induced coughing in animals. *J Ethnopharmacol.* 1999 Nov 30; 67(3):361-5.
- Dorsch W, Wagner H. New antiasthmatic drugs from traditional medicine? *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991; 94(1-4):262-5.
- Drost EM, Selby C, Lannan S et al. Changes in neutrophil deformability following in vitro smoke exposure: mechanism and protection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 6:287-95.
- Dye JA, Madden MC, Richards JH et al. Ozone effects on airway responsiveness, lung injury, and inflammation. Comparative rat strain and in vivo/in vitro investigations. *Inhal Toxicol.* 1999; 11:1015-40.
- Ellis KM, Cannet C, Mazzoni L et al. Airway hyperresponsiveness to bradykinin induced by allergen challenge in actively sensitised Brown Norway rats. *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 2004; 369:166-78.
- Elwood W, Barnes PJ, Chung KF. Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic brown-Norway rats. *Int Arch Allergy Immunol.* 1992; 99:91-7.
- Elwood W, Lötvall JO, Barnes PJ et al. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized brown-Norway rats. *J Allergy Clin Immunol.* 1991 Dec; 88(6):951-60.
- Feitosa RF, Melciades GB, Assreuy AM et al. The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw oedema in rats. *Mediators Inflamm.* 2002; 11:155-63.
- Fendrich Z, Hrdina R, Klimtová I et al. *Farmakologie pro farmaceuty.* Praha: Karolinum. 2002; 108-121.
- Ferreira HH, Costa RA, Jacheta JM et al. Modulation of eosinophil migration from bone marrow to lungs of allergic rats by nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68:631-9.
- Fitzpatrick AM, Teague WG, Holguin F et al. Severe Asthma Research Program. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Jan; 123(1):146-152.
- Frenoux JM, Noirot B, Prost ED et al. Very high alpha-tocopherol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hypertensive rats but not in normotensive rats. *Med Sci Monit.* 2002; 8:401-7.
- Fujisawa T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005; 4:505-9.
- Gazdik F, Gvozdjakova A, Nadvornikova R et al. Decreased levels of coenzyme Q (10) in patients with bronchial asthma. *Allergy.* 2002a; 57:811-14.
- Gazdik F, Kadrabova J, Gazdikova K. Decreased consumption of corticosteroids after selenium supplementation in corticoid-dependent asthmatics. *Bratisl Lek Listy.* 2002b; 103(1):22-5.
- Greening AP, Ind PVV, Nortfield M et al. Added salmeterol versus higher-dose corticosteroid in asthma patients with symptoms on existing inhaled corticosteroid. *Lancet.* 1994; 344(8917):219-24.
- Gvozdjakova A, Kucharska J, Bartkovjakova H et al. Coenzyme Q10 supplementation reduces corticosteroids dosage in patients with bronchial asthma. *Biofactors.* 2005; 25(1-4):235-40.

- Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*. 1990 Jul; 280(1):1-8.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996; 16:33-50.
- Hamahata A, Enkhbaatar P, Kraft ER et al. Gamma-Tocopherol nebulization by a lipid aerosolization device improves pulmonary function in sheep with burn and smoke inhalation injury. *Free Radic Biol Med*. 2008 Aug 15; 45(4):425-33.
- Hanf G, Brachmann I, Kleine-Tebbe J et al. Omalizumab decreased IgE-release and induced changes in cellular immunity in patients with allergic asthma. *Allergy*. 2006 Sep; 61(9):1141-4.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn. The McGraw—Hill Companies, Inc, New York. 2001; 742-743
- 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.
- Hasselmark L, Malmgren R, Unge G et al. Lowered platelet glutathione peroxidase activity in patients with intrinsic asthma. *Allergy*. 1990 Oct; 45(7):523-7.
- Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Aug; 140(2):531-54.
- Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL et al. A comparative study of antioxidants S-allyl cysteine sulfoxide and vitamin E on the damages induced by nicotine in rats. *Pharmacology*. 2003; 67:113–17.
- Hernandez M, Zhou H, Zhou B et al. Combination treatment with high-dose vitamin C and alpha-tocopherol does not enhance respiratory-tract lining fluid vitamin C levels in asthmatics. *Inhal Toxicol*. 2009 Feb; 21(3):173-81.
- Holden NS, Catley MC, Cambridge LM et al. ICAM-1 expression is highly NF-kappaBdependent in A549 cells. *Eur J Biochem*. 2004; 271:785–91.
- Horová Z. Predispoziční factory vzniku alergií XI. Okolnosti ovlivňující vznik astmatu bronchiale. Diplomová práce. Katedra biologických a lékařských věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. 2008; 18-21.
- Hybertson BM, Chung JH, Fini MA et al. Aerosol-administered alpha-tocopherol attenuates lung inflammation in rats given lipopolysaccharide intratracheally. *Exp Lung Res*. 2005 Apr; 31(3):283-94.
- Chakraborty A, Brantner AH. Study of alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees on their antiinflammatory activity. *Phytother Res*. 2001 Sep; 15(6):532-4.
- Chang LY, Crapo JD. Inhibition of airway inflammation and hyperreactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33:379–86.
- Jacobson GA, Yee KC, Ng CH. Elevated plasma glutathione peroxidase concentration in acute severe asthma: comparison with plasma glutathione peroxidase activity, selenium and malondialdehyde. *Scand J Clin Lab Invest*. 2007; 67(4):423-30.
- Jaeschke R, O'Byrne PM, Nair P et al. The safety of formoterol among patients with asthma using inhaled corticosteroids. Systematic review and meta-analysis. *Pol Arch Med Wewn*. 2008 Nov; 118(11):627-35.

Jahangir T, Khan TH, Prasad L et al. Reversal of cadmium chloride-induced oxidative stress and genotoxicity by *Adhatoda vasica* extract in Swiss albino mice. *Biol Trace Elem Res.* 2006; 111(1-3):217-28.

Jain D, Chhabra SK, Raj HG. Effects of Vitamin E on airway responses and biochemical parameters in guinea pigs sensitized to ovalbumin. *Respir Physiol Neurobiol.* 2005 Apr 15; 146(2-3):231-8.

Jindal DP, Bhatti RS, Ahlawat S et al. Synthesis and bronchodilatory activity of some nitrogen bridgehead compounds. *Eur J Med Chem.* 2002 May; 37(5):419-25.

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):75-81.

Joos S, Miksch A, Szecsenyi J, et al. Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax.* 2008; 63:453-62.

Kadrabová J, Mad'aric A, Kovaciková Z et al. Selenium status is decreased in patients with intrinsic asthma. *Biol Trace Elem Res.* 1996 Jun; 52(3):241-8.

Kalayci O, Besler T, Kilinc K et al. Serum levels of antioxidant vitamins (alpha tocopherol, beta carotene, and ascorbic acid) in children with bronchial asthma. *Turk J Pediatr.* 2000; 42:17-21.

Kankaanranta H, Lahdensuo A, Moilanen E et al. Add-on therapy options in asthma not adequately controlled by inhaled corticosteroids: a comprehensive review. *Respir Res.* 2004; 5:17.

Kanniess F, Boulet LP, Pierzchala W et al. Efficacy and safety of indacaterol, a new 24-hour beta2-agonist, in patients with asthma: a dose-ranging study. *J Asthma.* 2008 Dec;45(10): 887-92.

Kašák V, Pohunek P. Flexibilní léčba astmatu. *Remedia.* 2004; 14:419-423.

Kašák V. *Astma bronchiale.* Praha: Maxdorf. 2005; 9-24, 70-99.

Kašák V. Budesonid/formoterol pro udržovací a úlevovou léčbu nekontrolovaného astmatu versus vysoká dávka kombinace salmeterol/fluticason. *Farmakoterapie.* 2008a; 1:7-11.

Kašák V. Budesonid/formoterol SMART (Symbicort Maintenance And Reliever Therapy) – nový koncept v léčbě bronchiálního astmatu. *Farmakoterapie.* 2007; 1:41-53.

Kašák V. Fixní kombinace budesonidu s formoterolem. *Remedia.* 2002; 4:214-218.

Kašák V. Formoterol – bezpečnost v léčbě astmatu a CHOPN. *Farmakoterapie.* 2008b; 4:393-400

Kašák V. Klinický význam konceptu tíže a kontroly astmatu. *Farmakoterapie.* 2009; 1:47-53.

Kelly FJ, Mudway I, Blomberg A et al. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet.* 1999; 354:482-3.

Kilic FS, Erol K. The effects of vitamin E in ovalbumin sensitized guinea pigs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003; 25:27-31.

Kim I, Moon SO, Kim SH et al. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:7614-20.

Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 15; 167(12):1600-19.

Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006 Aug; 111(2):476-94.

- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem*. 1999 May 14;274(20):13908-14.
- Knight JA.: Free radicals, antioxidants, and the immune system, *Ann Clin Lab Sci*. 2000; 30(2):145-58.
- Kopřiva F. Alergická rýma. *Praktické lékařství*. 2007; 3:108-116.
- Korn S, Vogelmeier C, Buhl R. Budesonide/formoterol maintenance and reliever therapy. A new treatment approach for adult patients with asthma. *Med Klin (Munich)*. 2008 May 15; 103(5):299-310.
- Kraft M, Cairns CB, Ellison MC et al. Improvements in distal lung function correlate with asthma symptoms after treatment with oral montelukast. *Chest*. 2006; 130:1726-32.
- Krčmová I. Omalizumab – terapeutická perspektiva v léčbě těžkého bronchiálního astmatu. *Remedia*. 2006; 16:438-442.
- Krčmová I. Omalizumab. *Remedia*. 2008; 18:76–81.
- Krejsek J, Kopecný O. Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus. 2004; 649-79.
- Kumar A, Ram J, Samarth RM et al. Modulatory influence of *Adhatoda vasica* Nees leaf extract against gamma irradiation in Swiss albino mice. *Phytomedicine*. 2005 Apr; 12(4):285-93.
- Kumar M, Samarth R, Kumar M et al. Protective Effect of *Adhatoda vasica* Nees Against Radiation-Induced Damage at Cellular, Biochemical and Chromosomal Levels in Swiss Albino Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2007 Sep; 4(3):343-50.
- Kumar R. Prenatal factors and the development of asthma. *Curr Opin Pediatr*. 2008 Dec; 20(6):682-7.
- Lehr HA, Kress E, Menger MD et al. Cigarette smoke elicits leukocyte adhesion to endothelium in hamsters: inhibition by CuZn-SOD. *Free Radic Biol Med*. 1993; 14:573–81.
- Littarru GP, Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol*. 2007 Sep; 37(1):31-7.
- Lulmann H, Mohr K, Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. Překlad 15. vydání. Praha: Grada Publishing. 2004; 162-163.
- MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. *J Nutr Biochem*. 2003; 14:211–18.
- MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2001; 19;429(1-3):195-207.
- Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic Asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Apr 16; (2):CD007031.
- Marcus R, Coulston AM. Fat-soluble vitamins. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG (eds). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn. The McGraw—Hill Companies, Inc, New York. 2001; 1786–8.
- Marek J, Bartůňková J, Brodanová M et al. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 3. vydání. Praha: Grada Publishing. 2005; 163-164.
- Martinez-Losa M, Cortijo J, Piqueras L et al. Taurine chloramine inhibits functional responses of human eosinophils in vitro. *Clin Exp Allergy*. 2009 Apr; 39(4):537-46.

Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T et al. Molecular Mechanism of the Additive Effects of Leukotriene Modifier in Asthmatic Patients Receiving Steroid Therapy. *Allergol Int.* 2009 Jan 25; 58(1):89-96.

McCormack PL, Lyseng-Williamson KA. Budesonide/formoterol: a review of its use as maintenance and reliever inhalation therapy in asthma. *Drugs.* 2007;67(16): 2407-31.

Mikroverze AISLP – ČR (verze 2009.2 – 1. 4. 2009).

Misso NL, Powers KA, Gillon RL et al. Reduced platelet glutathione peroxidase activity and serum selenium concentration in atopic asthmatic patients. *Clin Exp Allergy.* 1996 Jul; 26(7):838-47.

Momeni A, Mohammadi MH. Respiratory delivery of theophylline by size-targeted starch microspheres for treatment of asthma. *J Microencapsul.* 2009 Jan; 19:1-10.

Morita N, Traber MG, Enkhbaatar P et al. Aerosolized alpha-tocopherol ameliorates acute lung injury following combined burn and smoke inhalation injury in sheep. *Shock.* 2006 Mar; 25(3):277-82.

Nadeem A, Masood A, Siddiqui N. Oxidant-antioxidant imbalance in asthma: scientific evidence, epidemiological data and possible therapeutic options. *Ther Adv Respir Dis.* 2008 Aug; 2(4):215-35.

Naline E, Zhang Y, Qian Y et al. Relaxant effects and durations of action of formoterol and salmeterol on the isolated human bronchus. *Eur Respir J.* 1994 May; 7(5):914-20.

Nève J. Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *J Trace Elem Med Biol.* 1995 Jul; 9(2):65-73.

Nie X, Li Q, Cai G et al. The effect of N acetylcysteine on Clara cells and Clara cell 16 kDa protein in a murine model of allergen-induced airway inflammation. *Respirology.* 2005; 10:157–63.

O'Byrne PM, Barnes PJ, Rodriguez-Roisin R et al. Low dose inhaled budesonide and formoterol in mild persistent asthma: the OPTIMA randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Oct 15; 164(8 Pt 1):1392-7.

O'Byrne PM, Israel E, Drazen JM. Antileukotrienes in the Treatment of Asthma. *Anno Intern Med.* 1997 Sep 15; 127(6):472-480.

O'Byrne PM. Acute asthma intervention: insights from the STAY study. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 Jun; 119(6):1332-6.

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):1-14.

Okamoto N, Murata T, Tamai H et al. Effects of alpha tocopherol and probucol supplements on allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 2006; 141(2):172-80.

old.lf3.cuni.cz (<http://old.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/leukocyty.htm>).

Olusi SO, Ojutiku OO, Jessop WJE et al. Plasma and white blood cell ascorbic acid concentrations in patients with bronchiale asthma. *Clin Chem Acta.* 1979; 92:161–66.

Pahwa GS, Zutshi U, Atal CK. Chronic toxicity studies with vasicine from *Adhatoda vasica* Nees. in rats and monkeys. *Indian J Exp Biol.* 1987 Jul; 25(7):467-70.

Paliwa JK, Dwivedi AK, Singh S et al. Pharmacokinetics and in-situ absorption studies of a new anti-allergic compound 73/602 in rats. *Int J Pharm.* 2000 Mar 20; 197(1-2):213-20.

Pauk N, Zatloukal P. Současná farmakoterapie asthma bronchiale u dospělých. *Remedia.* 2002; 12:186-192.

Pauluhn J. Comparative analysis of pulmonary irritation by measurements of Penh and protein in bronchoalveolar lavage fluid in brown Norway rats and Wistar rats exposed to irritant aerosols. *Inhal Toxicol.* 2004; 16:159–75.

Pauwels RA, Löfdahl CG, Postma DS et al. Effect of inhaled formoterol and budesonide on exacerbations of asthma. Formoterol and Corticosteroids Establishing Therapy (FACET) International Study Group. *N Engl J Med.* 1997 Nov 13; 337(20):1405-11.

Pedersen S, Engelstätter R, Weber HJ et al. Efficacy and safety of ciclesonide once daily and fluticasone propionate twice daily in children with asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008 Dec 27; Epub ahead of print.

Pipet A, Botturi K, Pinot D et al. Allergen-specific immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. Mechanisms and proof of efficacy. *Respir Med.* 2009 Feb 10. Epub ahead of print.

Prenner BM. Role of long-acting beta2-adrenergic agonists in asthma management based on updated asthma guidelines. *Curr Opin Pulm Med.* 2008; 14:57–63.

Price DB, Swern A, Tozzi CA et al. Effect of montelukast on lung function in asthma patients with allergic rhinitis: analysis from the COMPACT trial. *Allergy.* 2006 Jun; 61(6):737-42.

Proskocil BJ, Sekhon HS, Clark JA et al.: Vitamin C prevents the effects of prenatal nicotine on pulmonary function in newborn monkeys. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 May 1; 171(9):1032-9.

Psarras S, Caramori G, Contoli M et al. Oxidants in Asthma and in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Curr Pharm Des.* 2005; 11(16):2053-62.

Racek J. Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. Praha: Galén. 2003; 9-21,31-59,66-67.

Rahman I, MacNee W: Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation, *Eur Respir J.* 2000 Sep; 16(3):534-54.

Rahman I. Oxidative Stress, Chromatin Remodeling and Gene Transcription in Inflammation and Chronic Lung Diseases, *J Bioch And Mol Biol.* 2003 Jan 31; 36(1):95-109.

Ramanitrahambola D, Rakotondramanana DA, Rasoanaivo P et al. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. *J Ethnopharmacol.* 2005 Dec 1; 102(3):400-7.

Rao AR, Bahekar RH. Synthesis of benzimidazo[1,2-c]quinazolines as possible bronchodilators. *Indian Journal of Chemistry.* 1999 April; 38(B):434-439.

Riccioni G, Barbara M, Bucciarelli T et al. Antioxidant vitamin supplementation in asthma. *Ann Clin Lab Sci.* 2007 Winter; 37(1):96-101.

Riccioni G, D'Orazio N. The role of selenium, zinc and antioxidant vitamin supplementation in the treatment of bronchial asthma: adjuvant therapy or not? *Expert Opin Investig Drugs.* 2005 Sep; 14(9):1145-55.

Sackesen C, Ercan H, Dizdar E et al. A comprehensive evaluation of the enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Jul; 122(1):78-85.

Salpeter SR, Buckley NS, Ormiston TM et al. Meta-analysis: effect of long-acting beta-agonists on severe asthma exacerbations and asthma-related deaths. *Ann Intern Med.* 2006 Jun 20; 144(12):904-12.

Sedlák V. Nové klinické zkušenosti s léčbou těžkého astmatu anti-IgE protilátkou (omalizumabem). *Farmakoterapie.* 2009; 5(1):59-64.

Shanmugasundaram KR, Kumar SS, Rajajee S. Excessive free radical generation in the blood of children suffering from asthma. *Clin Chim Acta.* 2001 Mar; 305(1-2):107-14.

Shrewsbury S, Pyke S, Britton M. Meta-analysis of increased dose of inhaled steroid or addition of salmeterol in symptomatic asthma (MIASMA). *BMJ.* 2000 May 20; 320(7246):1368-73.

Shrivastava N, Srivastava A, Banerjee A et al. Anti-ulcer activity of *Adhatoda vasica* Nees. *J Herb Pharmacother.* 2006; 6(2):43-9.

Shvedova AA, Kisin ER, Kagan VE et al. Increased lipid peroxidation and decreased antioxidants in lungs of guinea pigs following an allergic pulmonary response. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995; 132:72–81.

Schwartz J, Weiss ST. Relationship between dietary vitamin C intake and pulmonary function in the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Am J Clin Nutr.* 1994 Jan; 59(1):110-4.

Sin DD, Man SF. Corticosteroids and adrenoceptor agonists: the compliments for combination therapy in chronic airways diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006 Mar 8; 533(1-3):28-35.

Singh RP, Padmavathi B, Rao AR. Modulatory influence of *Adhatoda vasica* (*Justicia adhatoda*) leaf extract on the enzymes of xenobiotic metabolism, antioxidant status and lipid peroxidation in mice. *Mol Cell Biochem.* 2000 Oct; 213(1-2):99-109.

Somayajulu M, McCarthy S, Hung M et al. Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. *Neurobiol Dis.* 2005 Apr; 18(3):618-27.

Soutar A, Seaton A, Brown K. Bronchial reactivity and dietary antioxidants. *Thorax.* 1997 Feb; 52(2):166-70.

Suissa S, Ernst P, Benayoun S et al. Lowdose inhaled corticosteroids and the prevention of death from asthma. *N Engl J Med.* 2000; 343:332-6.

Susa Z. *Astma bronchiale.* Praha: Triton. 2003; 13-24,64-69.

Špičák V, Panzner P, Bartůňková J et al. *Alergologie.* Praha: Galén. 2004; 189-232.

Štětínová V, Grossmann V. Effects of known and potential antioxidants on animal models of pathological processes (diabetes, gastric lesions, allergic bronchospasm). *Exp Toxicol Pathol.* 2000; 52:473–9.

Štípek S, Borovanský J, Čejková J et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci.* Praha: Grada Publishing. 2000; 109-143.

Tanaka H, Komai M, Nagao K et al. Role of IL-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31:62–8.

Thomas SR, Neuzil J, Stocker R. Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherogenesis? *Mol Aspects Med.* 1997; 18 Suppl:S85-103.

van der Vliet A, O'Neill CA, Cross CE et al. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *Am J Physiol.* 1999 Feb; 276(2 Pt 1):L289-96.

Vermeulen JH, Gyurkovits K, Rauer H et al. Randomized comparison of the efficacy and safety of ciclesonide and budesonide in adolescents with severe asthma. *Respir Med.* 2007; 101(10):2182–91.

Voitsekhojskaia IuG, Skesters A, Orlikov GA et al. Assessment of some oxidative stress parameters in bronchial asthma patients beyond add-on selenium supplementation. *Biomed Khim.* 2007 Sep-Oct; 53(5):577-84.

Vural H, Uzun K. Serum and red blood cell antioxidant status in patients with bronchial asthma. *Can Respir J.* 2000 Nov-Dec; 7(6):476-80.

Wagner H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. *Planta Med.* 1989 Jun; 55(3):235-41.

Wagner JG, Jiang Q, Harkema JR et al. Gamma-tocopherol prevents airway eosinophilia and mucous cell hyperplasia in experimentally induced allergic rhinitis and asthma. *Clin Exp Allergy.* 2008 Mar; 38(3):501-11.

Waisser K. *Bioorganická chemie.* Praha: Karolinum. 2002; 102-103.

Walrand S, Farges MC, Dehaese O et al. In vivo and in vitro evidences that carotenoids could modulate the neutrophil respiratory burst during dietary manipulation. *Eur J Nutr.* 2005 Mar; 44(2):114-20.

Weiss ST. Diet as a risk factor for asthma. *Ciba Found Symp.* 1997; 206:244-57.

Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Biomarkers of lipid peroxidation, airway inflammation and asthma. *Eur Respir J.* 2003; 21:177–86.

www.adhathoda-vasica.101herbs.com.

www.cipa.cz. (Krčmová I. Specifická imunoterapie a astma. http://cipa.cz/specificka_imunoterapie).

www.ginasthma.org (GINA Workshop Report – updated December 2008).

www.harvardapparatus.com (http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku2_10001_11051_32704_-1_HAI_ProductDetail_N_37840_37851).

www.lfp.cuni.cz (<http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/krev/pocitani.htm>).

www.tigis.cz. (Petrů V. Prevence alergie. <http://www.tigis.cz/alergie/ALERG301/06.htm>).

Xu S, Xu Y, Zhang Z et al. Effect of nuclear factor-kappaB on airway remodeling in asthmatic rats. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2004; 24:13–18.

Yadav AK, Tangpu V. Anticestodal activity of Adhatoda vasica extract against Hymenolepis diminuta infections in rats. *J Ethnopharmacol.* 2008 Sep 26; 119(2):322-4.

Yamamoto K, Takanashi S, Hasegawa Y et al. Eotaxin level in induced sputum is increased in patients with bronchial asthma and in smokers. *Respiration.* 2003; 70:600–5.

Yang L, Cohn L, Zhang DH et al. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J Exp Med.* 1998; 188:1739–50.

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.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 1; 33(3):337-49.

Zhang Y, Turunen M, Appelkvist EL. Restricted uptake of dietary coenzyme Q is in contrast to the unrestricted uptake of alpha-tocopherol into rat organs and cells. *J Nutr.* 1996; 126:2089–97.

Zingg JM, Azzi A. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem.* 2004 May; 11(9):1113-33.

Zingg JM. Vitamin E and mast cells. *Vitam Horm.* 2007; 76:393-418.

**IX. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH A VĚDECKÝCH
PRACÍ**

PUBLIKACE V ČASOPISECH S IF

- Suchánková J, Vopršalová M, Kottová M, Semecký V, Višňovský P. Effects of oral alpha-tocopherol on lung response in rat model of allergic asthma. *Respirology*. 2006 Jul; 11(4):414-21.

PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH

- Kottová M, Pourová J, Vopršalová M. Oxidační stres a jeho role v respiračních onemocněních. *Čes Slov Farm*, 2007;56(5):215-9.
- Kottová M, Vopršalová M, Pourová J. Farmakoterapie asthma bronchiale. *Praktické lékařství* 2008; 4(3):116-21.

PUBLIKACE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH nevztahující se k tématu dizertační práce

- Kudláčková Z, Kottová M, Hronek M. Vliv hladiny glykemie na nezralou mozkovou tkáň během hypoxicko-ischemického a traumatického poškození mozku. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 2005; 8(2):63-9.

POSTERY NA KONGRESECH

- Kottová M, Suchánková J, Vopršalová M, Radová H. Porovnání modelu alergického astmatu u potkanů Wistar, Brown Norway a morčat. 55. farmakologické dny. Hradec Králové, 2005.
- Kottová M, Pourová J, Vopršalová M, Pour M, Pavlík J. Sledování reaktivity izolované trachey po podání derivátů chinazolinu. 56. farmakologické dny. Bratislava, 2006.
- Kottová M, Vopršalová M, Pourová J, Hladká P, Karličková J, Jahodář L. Účinky obsahových látek z *Adhatoda vasica* testované na izolované průdušnici potkana. 57. farmakologické dny. Olomouc, 2007.

X. SOUHRN

ÚVOD A CÍL STUDIE:

Asthma bronchiale je definováno jako chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky a buněčné působky. Jedná se o celoživotní onemocnění, které dosud není zcela vyléčitelné. Na jeho patogenezi participují mnohé faktory, mimo jiné i oxidační stres. U zdravého organismu je toxicita volných radikálů potlačena mnohými enzymatickými i neenzymatickými antioxidačními systémy. U astmatiků je funkce těchto endogenních systémů narušena. Přes rozšiřující se škálu a množství používaných antiastmatik morbidita i mortalita astmatu neustále roste. Hledání nových léčiv může být založeno na znalosti patofyziologických změn probíhajících při onemocnění, nebo může být inspirováno znalostmi účinných látek rostlinných drog, jejichž izolací a chemickou modifikací lze získat účinnější deriváty. Cílem této dizertační práce bylo objasnit účinky vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Prostřednictvím *in vivo* metody jsme zkoumali, jaké účinky má orálně podávaný antioxidant α -tokoferol na model alergického astmatu u potkana. Druhou část dizertační práce jsme věnovali *in vitro* hodnocení relaxačních účinků standardizovaného extraktu z *Justicia adhatoda*, přírodních chinazolinových alkaloidů (vasicinu, vasicinonu) a vybraných syntetických chinazolinových derivátů na izolovanou průdušnici potkana. Jejich účinek jsme porovnávali s teofylinem, klasickou látkou používanou v terapii asthma bronchiale.

METODIKA:

➤ Při studiu *in vivo* jsme použili klasický experimentální model alergického astmatu u potkana. Nejprve jsme všechna zvířata senzibilizovali aplikací 1 ml fyziologického roztoku obsahujícího 1 mg ovalbuminu a 100 mg hydroxidu hlinitého ve třech po sobě jdoucích dnech. Vlastní experiment následoval 21 dní po senzibilizaci. Mezitím jsme senzibilizovaným zvířatům podávali gastrickou sondou α -tokoferol (400 mg/kg/den – premedikovaná skupina) nebo vehikulum (pozitivní kontrola, negativní kontrola) po dobu 10 dní. Jednu hodinu po podání poslední dávky α -tokoferolu nebo vehikula jsme u premedikovaných zvířat a pozitivní kontroly navodili challenge aerosolem obsahujícím antigen (100 mg ovalbuminu/2 ml fyziologického roztoku). Negativní kontrola inhalovala fyziologický roztok. Za jednu nebo 24 hodin po antigen challenge jsme zvířata jsme uvedli do pentobarbitalové anestezie (45 mg/kg, i.p.) a kanylovali *v. jugularis*

a tracheu. Poté jsme zvířata napojili na respirační přístroj (90 vdechů/min, 10 ml/kg hmotnosti), premedikovali sukcinylcholinem (2 mg/kg) a propranololem (1 mg/kg) a hodnotili jsme bronchiální odpověď na kumulativně podávaný serotonin. Bezprostředně po zhodnocení plicní reaktivity jsme zvíře usmrtili předávkováním anestetika, šetrně vyjmuli plíce a odebrali tekutinu bronchoalveolární laváže (BALF) ke stanovení celkového a diferenciálního počtu buněk. U vybraných zvířat byla provedena histopatologická analýza plic.

➤ Při studiu relaxačního účinku testovaných látek *in vitro* jsme použili klasickou metodu izolované průdušnice. Izolovaná potkaní trachea byla nejprve rozdělena na dvě části. Každý tracheální prstenec byl poté rozříznut v místě protilehlém tracheálnímu hladkému svalu a upevněn v Schulerově nádobce pod počáteční zátěží 1g tak, aby byla možná relaxace i kontrakce hladkého svalu. Relaxace nebo kontrakce byla registrována isometrickým převodníkem a zaznamenána na zapisovači (Ugo Basile, Itálie). Vhodné podmínky zajišťoval Krebs-Henseleitův roztok temperovaný na 37 °C a okysličený karbogenem (95 % O₂, 5 % CO₂) po celou dobu pokusu. Schéma pokusu: trachea byla prekontrahována karbacholem (10⁻⁵ M). Následně byl testován relaxační účinek osmi kumulativně podaných koncentrací testované látky. Za maximální byla považována relaxace navozená teofylinem (3×10⁻³ M), který zároveň představoval pozitivní kontrolu. Pokles tonu tracheálního hladkého svalu jsme považovali za relaxační účinek a jeho rozsah byl vyjádřen jako procento z maximální relaxace. Pro každou testovanou látku byla pomocí nelineární regrese (GraphPad Prism 5) určena hodnota ED₅₀, tedy dávka, která navodí 50 % relaxaci prekontrahované trachey zvolenou látkou.

VÝSLEDKY:

➤ Při studiu účinku látek metodou *in vivo* jsme zjistili, že aplikace serotoninu jednu hodinu po antigen challenge vedla k vyvolání bronchokonstrikční odpovědi závislé na dávce. Tuto odpověď jsme zaznamenali u všech skupin a rozdíly nebyly statisticky významné. Serotonin aplikovaný za 24 hodin po antigen challenge navodil u pozitivní kontroly signifikantní nárůst overflow ve srovnání s negativní kontrolou. Ve skupině potkanů premedikovaných α-tokoferolem jsme zaznamenali tendenci k nižšímu nárůstu, který ale nebyl v porovnání s pozitivní kontrolou statisticky významný. V BALF odebraném za jednu hodinu po challenge ovalbuminem nebo fyziologickým roztokem jsme

ne našli žádný statisticky významný rozdíl v celkovém ani diferenciálním počtu buněk. V BALF odebraném za 24 hodin jsme u pozitivní kontroly prokázali signifikantní nárůst celkového počtu buněk, eozinofilů a neutrofilů ve srovnání s negativní kontrolou. U potkanů premedikovaných α -tokoferolem jsme našli tendenci k nižšímu nárůstu celkového počtu buněk, neutrofilů a eozinofilů, ale v porovnání s pozitivní kontrolou nebyl pokles tohoto nárůstu statisticky významný. Histopatologická analýza plicní tkáně odhalila zánětlivé změny a hypertrofii hladkého svalu bronchiolů u premedikovaných zvířat i pozitivní kontroly. Mezi těmito skupinami nebyly zjištěny rozdíly.

➤ Sledováním účinku přírodních chinazolinových alkaloidů (vasicinu, vasicinonu, standardizovaného extraktu z *Justicia adhatoda*) jsme prokázali relaxační aktivitu u všech testovaných derivátů. Standardizovaný extrakt a vasicinon relaxovaly izolovanou tracheu signifikantně více než teofylin, vasicinon vykazoval signifikantně nižší relaxační aktivitu ve srovnání s teofylinem. Zkoumáním účinku 4-hydroxychinazolinu a jeho jednoduchých derivátů se prokázalo, že struktury z této skupiny nebyly příliš účinné - žádný ze čtyř testovaných derivátů nevykazoval vyšší relaxační aktivitu než teofylin. Druhá testovaná skupina syntetických látek (deriváty chinazolinu s etylaminovým fragmentem) byla úspěšnější – dvě ze tří testovaných látek byly signifikantně účinnější než teofylin. Poslední testovaná skupina (deriváty chinazolinu s etoxy-, etylsulfanylovým nebo propoxy- fragmentem) byla jednoznačně nejúspěšnější. Všechny pět testovaných látek mělo v porovnání s teofylinem signifikantně vyšší relaxační účinek.

ZÁVĚR:

➤ V provedeném *in vivo* experimentu suplementace α -tokoferolem neovlivnila hyperreaktivitu dýchacích cest, infiltraci zánětlivých buněk ani histologické změny v porovnání s kontrolními skupinami. U premedikovaných zvířat jsme sice pozorovali tendenci k nižší hyperreaktivitě dýchacích cest a k nižšímu nárůstu celkového počtu buněk, eozinofilů a neutrofilů, nicméně tyto změny nebyly statisticky významné. V tomto experimentu neměla premedikace antioxidantem působícím α -tokoferolem signifikantní vliv na bronchiální reaktivitu ani viditelně neovlivnila histologické nálezy, nicméně potenciální terapeutickou hodnotu α -tokoferolu nelze vyloučit.

➤ V provedeném *in vitro* experimentu jsme prokázali relaxační účinek jak u testovaných přírodních chinazolinových alkaloidů, tak u většiny zkoumaných

syntetických derivátů. Nejúspěšnější skupinou ze všech navrhovaných a testovaných látek byly syntetické deriváty chinazolinu s etoxy-, etylaminovým nebo propoxy-fragmentem.

BACKGROUND:

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways in which a number of cells and cellular elements play a role. It is a lifetime disease which is not completely curable. Many factors contribute to the pathogenesis of asthma, oxidative stress being an important one. In healthy humans, the toxicity of free radicals is inhibited by enzymatic and non-enzymatic systems. In asthmatics, the function of these endogenous systems is impaired. Despite treatment, asthma morbidity and mortality steadily increases. The search for new drugs can be based on the knowledge of the pathological changes associated with the disease, and can also be inspired by folk medicine. As regards the latter approach, new, more potent substances could be obtained by isolation and chemical modification of natural products. The aim of this doctoral thesis was to elucidate the effects of selected substances on the respiratory system of rats by *in vivo* and *in vitro* methods. We investigated the effects of orally administered α -tocopherol on the lung response in an *in vivo* rat model of allergic asthma. The second part of this thesis deals with natural quinazoline alkaloids (*Justicia adhatoda* standardized extract, vasicine, vasicinone) and their synthetic analogues, and their relaxant effects on an isolated rat trachea. The relaxant effects of these compounds were compared with theophylline, a standard drug used in asthma treatment.

METHOD:

➤ *In vivo* study: classical experimental rat model of allergic asthma was used. All animals were actively sensitized with ovalbumin OA (1 mg) and aluminium hydroxide (100 mg) suspended in saline solution (1 ml) intraperitoneally injected into each rat. The injection was repeated for three consecutive days. Sensitized animals were used in the experiments on the 21st day after sensitization. In the meantime, the rats were treated with α -tocopherol (400 mg/kg/day – treated group) or the vehicle (positive control group, negative control group) for 10 days. One hour after the last α -tocopherol or vehicle administration, the animals were exposed to ovalbumin aerosol (100 mg per 2 ml of saline). The sham group (negative control group) was challenged with saline. After 1 or 24 h from the antigen challenge, the animals were anaesthetized with pentobarbital (45 mg/kg i.p.). A heparinized catheter was inserted into the right jugular vein for i.v. drug administration. After the tracheostomy, the trachea was cannulated and connected

to a Hugo Sachs ventilator (90 breaths/min, 10 ml/kg). The animals were premedicated by an i.v. succinylcholine and propranolol injection and the bronchial responsiveness to cumulative i.v. 5-HT administration (5–50 µg/kg) was assessed. After the measurement of the lung responsiveness, the rats were sacrificed with an overdose of pentobarbital. The lungs were removed and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was pooled in order to evaluate total and differential cell count. Histopathological examination of the rat lungs was done.

➤ *In vitro* study: to verify the relaxant activity of the tested substances, the classical experimental model of isolated rat trachea was used. The isolated trachea was cut into two rings. Each ring was then cut opened opposite to the tracheal smooth muscle and mounted under initial tension of 1 g in the Schuler Organ Bath in such a way that free relaxation or contraction of the smooth muscle was possible. The relaxation or contraction of the tracheal smooth muscle was registered by an isometric transducer and recorded (Ugo Basile, Italy). Adequate conditions were guaranteed by the Krebs-Henseleit solution maintained under constant temperature of 37 °C. The tissue specific holder includes an integrated frit at the back of the holder which allows carbogène (a gas mixture containing 5 % CO₂ and 95 % O₂) to pass continuously through the Krebs-Henseleit solution. The trachea was precontracted by carbachol (10⁻⁵ M). The relaxant effects of eight cumulative concentrations of each tested compound were examined. The maximal relaxation was induced by theophylline (3×10⁻³ M), which was also used as a positive control. A decrease in the tone of the tracheal smooth muscle was considered as a relaxant effect and was expressed as a percentage of change in proportion to the maximum relaxation. The ED₅₀ of each tested compound, which is defined as the concentration producing 50 % relaxation of the precontracted trachea by the used agonist, was calculated using the non-linear regression method (GraphPad Prism).

RESULTS:

➤ *In vivo* method: one hour after allergen challenge, i.v. serotonin administration induced a dose-related bronchoconstrictor response in all rats. No differences in the bronchospasm were found among the groups. Within 24 h after antigen challenge, i.v. cumulative administration of serotonin induced a dose-dependent and significant increase in overflow volume in the positive control group compared with

the negative control group. In tocopherol premedicated animals, no significant changes were found. A tendency to an antihyperresponsiveness effect was observed in comparison with the positive control. In the BALF collected one hour after saline or ovalbumin exposure, no differences in the total cell count were found among the groups. Similarly, no changes were found in the differential cell count. Twenty-four hours after antigen exposure, the positive control group showed a significantly higher total number of cells in the BALF compared with the negative control. The increase in the total cell number was not significantly changed by tocopherol, even though there was a tendency towards lower values. The differential cell count showed an increase in eosinophils and a significant increase in neutrophils in the positive control group BALF compared to the negative control. The increased percentage of eosinophils and neutrophils showed a diminishing trend in the tocopherol-treated rats but the difference was insignificant. The histopathological examination of both positive control and tocopherol-treated animals showed inflammatory changes compared with negative control. In the treated animals, no differences in quantitative and qualitative parameters were found in comparison with the positive group.

➤ *In vitro* method: we found out that all tested natural quinazoline alkaloids (*Justicia adhatoda* standardized extract, vasicine, vasicinone) had a relaxant activity on isolated rat trachea. The standardized extract and vasicine had a significantly higher relaxant effect than theophylline. Vasicinone showed a significantly lower relaxant activity than the standard. Subsequent evaluation of the relaxant effects of simple derivatives of quinazolin-4-ol showed that the structures from this group were not very potent. None of these four tested derivatives had a significantly higher activity in comparison to theophylline. The second synthetic group tested (quinazoline derivatives with an ethylamine fragment) was more successful – two out of the three tested compounds were significantly more efficient than theophylline. The derivatives of the last group tested (quinazoline derivatives bearing ethoxy, ethylsulfanyl and propoxy fragments) were the most potent ones. All five tested derivatives had a significantly higher relaxant activity than the standard.

CONCLUSION:

➤ Based on *in vivo* experiments, we can conclude that orally administered α -tocopherol did not significantly influence bronchial hyperresponsiveness or inflammatory cells infiltration. Histopathological analysis revealed that the inflammation and the hypertrophy of the smooth muscle occurred in both groups, with no differences having been found. The airway hyperresponsiveness to 5-HT observed in antigen-challenged sensitized rats tended to decrease after the administration of α -tocopherol. After α -tocopherol administration, a decreasing tendency in neutrophil and eosinophil numbers was observed in comparison to positive control. Even though these changes were statistically insignificant, a possible therapeutical potential of α -tocopherol should not be ruled out.

➤ Based on *in vitro* experiments, we can conclude that all tested natural quinazoline alkaloids and most of the synthetic derivatives had a relaxant effect on isolated rat trachea. The most successful derivatives of the tested substances were synthetic quinazoline derivatives with ethyloxy, ethylamine and propyloxy fragments.

XI. PŘÍLOHY

Příloha 1A PREVENTIVNÍ ANTIASMATIKA – inhalační kortikosteroidy				
Název látky	Léky s látkou	Síla [µg]	Poznámka	
BECLOMETASON	BECLOFORTE INHALER [®]	250		
	BECLOMET EASYHALER [®]	200		
	BECODISKS [®]	100, 200, 400		
	BECOTIDE INHALER [®]	50		
	CLENIL [®] Jet	250		
	CLENIL [®] Spray	50, 100, 250		
	ECOBEC [®]	50, 100, 250		
	ECOBEC EASI-BREATHE [®]	50, 100, 250		
	ECOBEC EASI-BREATHE TRIO [®]	50, 100, 250		
	COMBAIR [®]	100/6	fixní kombinace beclometason/formoterol	
FORMODUAL [®]				
BUDESONID	BUDESONIDE-INGERS INHAL [®]	100, 200, 400, 800		
	BUDIAIR [®]	200		
	BUDIAIR [®] JET	200		
	GIONA EASYHALER [®]	100, 200, 400		
	MIFLONID [®]	200, 400		
	PULMAX [®]	100, 200, 400		
	PULMICORT [®]	-		0,5 mg/ml, aplikován nebulizerem
	PULMICORT TURBOHALER [®]	100, 200, 400		
	RIBUSPIR [®]	200		
	RIBUSPIR [®] JET	200		
	SYMBICORT TURBOHALER [®]	100/6, 200/6, 400/12		fixní kombinace budesonid/formoterol
	CICLESONID	ALVESCO INHALER [®]	80, 160	
FLUTICASON	FLIXOTIDE INHALER N [®]	50, 125, 250		

	FLIXOTIDE DISCUS [®]	100, 250, 500	
	FLIXOTIDE NEBULE [®]	-	0,5 mg/ml, 2 mg/ml , aplikován nebulizerem
	DUASPIR DISKUS [®]	50/100, 50/250, 50/500	fixní kombinace flutikason/salmeterol
	SERETIDE INHALER [®]	25/50, 25/125, 25/250	
	SERETIDE DISKUS [®]	50/100, 50/250, 50/500	
MOMETASON	ASMANEX	200, 400	

Příloha 1B PREVENTIVNÍ ANTIASMTATIKA – inhalační β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem				
Název látky	Léky s látkou	Síla [μ g]		Poznámka
FORMOTEROL	ATIMOS [®]	12		
	FORADIL [®]	12		
	FORAIR [®]	12		
	FORMANO [®]	12		
	FORMESCO [®]	12		
	FORMOTEROL EASYHALER [®]	12		
	FORMOTEROL- RATIOFARM [®]	12		
	FORMOVENT [®]	12		
	OXIS TURBOHALER [®]	4.5, 9		
	SYMBICORT TURBOHALER [®]	100/6, 200/6, 400/12		
	COMBAIR [®]	100/6		fixní kombinace
	FORMODUAL [®]	100/6		beclometason/formoterol
SALMETEROL	SEREVENT DISKUS [®]	50		
	SEREVENT INHALER [®]	25		
	DUASPIR DISKUS [®] SERETIDE INHALER [®] SERETIDE DISKUS [®]	<i>viz tab. 1A</i>		
	PREVENTIVNÍ ANTIASMTATIKA – perorální β_2 mimetika s dlouhodobým účinkem			
CLENBUTEROL	SPIOSENT [®]	1 μ g/1 ml	sirup	β_2 mimetika s krátkodobým účinkem, podávají se ale po 12 hodinách → nejsou určena k léčbě akutního bronchospasmu
		20 μ g/1 tbl.	tablety	
PROCATEROL	LONTERMIN [®]	5 μ g/1 ml	sirup	
		50 μ g/tbl.	tablety	

Příloha 1C PREVENTIVNÍ ANTIASMATIKA – kromony			
Název látky	Léky s látkou	Síla [mg]	Poznámka
NEDOKROMIL	TILADE MINT [®]	2	pouze inhalačně (nevstřebává se z GIT)
	KETOTIFEN	1 mg/5 ml	sirup
KETOTIFEN	KETOF [®]	1 mg/5 ml	sirup
	KETOTIFEN AL [®]	1	kapsle

Příloha 1D PREVENTIVNÍ ANTIASMATIKA - antihistaminika II. generace			
Název látky	Léky s látkou	Síla [mg]	Poznámka
DES Loratadin	AERINAZE [®]	2,5	tablety
	AERIUS [®]	0,5mg/ml	sirup, roztok
		2,5, 5	tablety
	AZOMYR [®]	0,5mg/ml	sirup, roztok
		2,5, 5	tablety
	NEOCLARITYN [®]	0,5mg/ml	sirup, roztok
2,5, 5		tablety	
LEVOcetirizin	XYZAL [®]	5	tablety
RUPATADIN	TAMALIS [®]	10	tablety

při léčbě samotného astmatu se nepoužívají
→
pouze podpůrná léčba při koexistenci alergické rýmy a astmatu

Příloha 1E PREVENTIVNÍ ANTIASMATIKA - antileukotrieny			
Název látky	Léky s látkou	Síla [mg]	Poznámka
MONTELUKAST	MONTELUCAST TEVA	4 a 5	žvýkácké tablety
		10	potahované tablety
	SINGULAIR 4 MINI [®]	4	žvýkácké tablety
	SINGULAIR 5 JUNIOR [®]	5	
MONTELUKAST	SINGULAIR 10 [®]	10	potahované tablety
	ZAFIRLUKAST	ACCOLATE [®]	20

Příloha 1F PREVENTIVNÍ ANTIASMTATIKA - léčiva používaná při SIT			
Léková forma	Léky s látkou	Poznámka	
injekční	ALUTARD SQ [®]	Jednotlivá léčiva jsou dodávána v soupravách, které jsou kompletovány v sestavách dle různých koncentrací. Biologická aktivita je dána koncentrací alergenů a je vyjádřena v jednotkách SQ (standard quality) na 1 ml suspenze, v jednotkách JSK (jednotky standardní aktivity) na 1 ml suspenze, v jednotkách PNU (jednotky proteinového dusíku) na 1 ml suspenze, jednotkách STU (Standard Treatment Units) na 1 ml suspenze a v jednotkách IR (index reaktivity) na 1 ml suspenze. Koncentrace každého přípravku stoupají od nejnižších (iniciální léčba) až k nejvyšším (udržovací léčba).	
	H-AL DEPOT [®]		MITES
			POLLENS
	H-AL INSECTS [®]		
	H-AL INJ [®]		
	PHOSTAL [®]		
sublinguální	H-AL INSECTS PER OS [®]		
	H-AL PER OS [®]		
	H-AL POLLENS PER OS [®]		
	H-AL (MIT, MYC, DUS, DMX, BAC) PER OS [®]		
	PANGRAMIN-SLIT [®]		
	STALORAL [®] , STALORAL 300 [®]		

Příloha 2A PREVENTIVNÍ A ÚLEVOVÁ ANTIASMTATIKA – systémové kortikosteroidy			
Název látky	Léky s látkou	Síla [mg]	Poznámka
METYLPREDNISOLON	MEDROL [®]	4, 16, 32, 100	tbl; udržovací terapie i akutní exacerpace
	SOLU-MEDROL [®]	40, 125, 250, 500, 1000	prášek pro přípravu inj. sol.; udržovací terapie i akutní exacerpace
	DEPO-MEDROL [®]	40	inj. sus.; udržovací terapie
PREDNISON	PREDNISON LÉČIVA [®]	5, 20	tbl; udržovací terapie i akutní exacerpace
	RECTODELT [®]	100/čípek	akutní exacerpace
TRIAMCINOLON	TRIAMCINOLON LÉČIVA [®]	4	tbl; udržovací terapie i akutní exacerpace

Příloha 2B PREVENTIVNÍ A ÚLEVOVÁ ANTIASMTATIKA – metylxantiny			
Název látky	Léky s látkou	Síla [mg]	Poznámka
TEOFYLIN	AFONILUM SR [®]	125, 250, 375, 500	retardované tablety; používají se jako prevence a léčba náhlých stavů dušnosti
	EUPHYLLIN CR N [®]	100, 200, 300, 400	
	THEOPLUS [®]	100, 300	
AMINOFYLIN	SYNTOPHYLLIN [®]	24/1 ml	Inj. sol.
		100	Tablety
	AMINOPHYLLINUM RETARD LEK [®]	350	Retardované tablety

Příloha 3A ÚLEVOVÁ ANTIASMTATIKA – inhalační a perorální sympatomimetika s krátkodobým účinkem			
Název látky	Léky s látkou	Síla	Poznámka
SALBUTAMOL (ALBUTEROL)	BUVENTOL EASYHALER [®]	100, 200 µg	inhalační přípravek
	ECOSAL EASI-BREATHE [®]	100 µg	
	ECOSAL EASI-BREATHE TRIO [®] ECOSAL INHALER [®]		
	SALBUTAMOL WZF POLFA [®]	2 mg, 4 mg	tablety
	VENTOLIN [®]	2 mg/5 ml	sirup
	VENTOLIN DISKUS [®]	200 µg	inhalační přípravek
	VENTOLIN INHALER N [®]	100 µg	
	VENTOLIN ROZTOK K INHALACI [®]	5mg/1 ml	
TERBUTALIN	BRICANYL [®]	0,5mg/1 ml	inj. sol.
	BRICANYL TURBOHALER [®]	0,5 mg	prášek pro inhalaci
FENOTEROL	BEROTEC N [®]	100 µg	inhalační přípravek
	BERODUAL [®]	10/5 µg	Fixní kombinace fenoterol/ ipratropium
	BERODUAL INHALETTEN [®]	100/40 µg	
	BERODUAL N [®]	50/20 µg	

Příloha 3B ÚLEVOVÁ ANTIASMTATIKA – inhalační anticholinergika			
Název látky	Léky s látkou	Síla	Poznámka
IPRATROPIUM	ATROVENT [®]	20 µg	inhalační přípravek
	ATROVENT 0,025 % [®]	250 µg/1 ml	
	ATROVENT INHALETTEN [®]	200 µg	
	ATROVENT N [®]	20 µg	
	BERODUAL [®]	<i>viz tab. 3A</i>	
	BERODUAL INHALETTEN [®]		
	BERODUAL N [®]		