

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 svaly. 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 okysličováný 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 svaly 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 nenašli 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 neúspěšnější. 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 antioxidačně 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. Neúspěšnější skupinou ze všech navrhovaných a testovaných látek byly syntetické deriváty chinazolinu s etoxy-, etylaminovým nebo propoxy-fragmentem.