

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

SLEDOVÁNÍ ÚČINKŮ CHINAZOLINOVÝCH ALKALOIDŮ
Z JUSTICIA ADHATODA

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce:

PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové 2012

Mgr. Pavla Žampachová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....

Touto cestou si dovoluji poděkovat PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení při zpracování tématu rigorózní práce, za ochotu a čas, který mi věnovala při konzultacích a za věcné připomínky k formální i obsahové stránce této práce.

Abstrakt v českém jazyce

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Pavla Žampachová

Konzultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Název rigorózní práce: Sledování účinků chinazolinových alkaloidů z *Justicia adhatoda*

Cílem našeho experimentu bylo hodnocení relaxační aktivity přírodních látek získaných z *Justicia adhatoda* metodikou in vitro na izolované průdušnici potkana. Konkrétně jsme testovali: standardizovaný ethanolický extrakt z *Justicia adhatoda*, vasicin a vasicinon. Jako standardní látku jsme použili teofylin. Teofylin také zároveň sloužil k navození maximální relaxace trachey. Experiment byl proveden u samců potkana kmene Wistar o hmotnosti 250–300 g. Schéma experimentu probíhalo v tomto sledu: navození kontrakce trachey podáním roztoku karbacholu (10^{-5} M), následovala kumulativní podání jednotlivých dávek testované látky, nakonec byl aplikován teofylin (3×10^{-3} M) k navození maximální relaxace trachey. Každou naměřenou hodnotu relaxace testovaných látek jsme porovnávali s touto maximální relaxací navozenou teofylinem a vyjádřili procentuálně. Získané hodnoty byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 5, kdy jsme pro každou testovanou látku získali DRC křivku metodou nelineární regrese a hodnotu $EC_{50} \pm SEM$ ($\mu\text{mol/l}$). Takto jsme stanovili hodnotu EC_{50} pro zvolenou standardní látku a následně EC_{50} pro všechny testované látky. Ze získaných výsledků vyplývá, že testované chinazolinové alkaloidy (vasicin, vasicinon) a standardizovaný ethanolický extrakt z drogy JA, vykazují relaxační aktivitu na izolovanou tracheu potkana kontrahovanou karbacholem. Standardizovaný ethanolický extrakt JA a vasicin mají vyšší bronchodilatační aktivitu než standardní látka teofylin, aktivita vasicinonu je nižší než aktivita použitého standardu. Nejvyšší účinek jsme zaznamenali u ethanolického extraktu JA, který je zároveň vyšší než součet účinků jednotlivých alkaloidů.

Abstrakt v anglickém jazyce

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Pavla Žampachová

Supervisor: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Title of rigorous thesis: Effects evaluation of quinazolin alkaloids from *Justicia adhatoda*

The aim of our experiment was the evaluation of a relaxing activity of natural substances obtained from *Justicia adhatoda* by an in vitro method on an isolated trachea of rats. Specifically, we tested: a standardized ethanol extract from *Justicia adhatoda*, vasicine and vasicinone. As a standard substance, we used theophylline. Theophylline was also used for inducing maximal relaxation of a trachea. Our experiment was carried out on rat males of Wistar tribe, weight between 250–300 g. The scheme of our experiment was in following sequence: inducing trachea contractions by giving a carbachol solution (10^{-5} M), a cumulative intake of separate doses of a tested substance ensued; finally, theophylline (3×10^{-3} M) was used for inducing maximal trachea relaxation. Every measured value of relaxation of tested substances was compared to maximal relaxation by theophylline and issued with percentage. Acquired values were compiled by GraphPad Prism 5 program. Through this program, for every tested substance, we gained a DRC curve by a non-linear regression method and figure $EC_{50} \pm SEM$ ($\mu\text{mol/l}$). Thus, we set the value EC_{50} for a selected standard substance and consequently EC_{50} for all tested substances. From gained results follow that tested quinazoline alkaloids (vasicine, vasicinone) and a standardized ethanol extract from drug JA, show relaxing activity on an isolated trachea of a rat with carbachol. A standardized ethanol extract of JA and vasicine have higher bronchitis activity than a standard substance of theophylline, activity of vasicinone is lower than used standard. The highest effect was recorded in an ethanol extract JA which was also higher than a summation of individual alkaloids.

OBSAH

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1. JUSTICIA ADHATODA.....	12
3.1.1. <i>Taxonomie</i>	12
3.1.2. <i>Synonyma</i>	13
3.1.3. <i>Výskyt</i>	13
3.1.4. <i>Používané drogy a lékové formy</i>	13
3.1.5. <i>Tradiční užití</i>	14
3.1.6. <i>Popis rostliny</i>	15
3.1.7. <i>Pěstování, fyzikální podmínky pro růst</i>	19
3.1.8. <i>Obsahové látky</i>	19
3.1.9. <i>Veterinární užití</i>	20
3.1.10. <i>Jiná využití</i>	20
3.1.11. <i>Komerční produkty</i>	21
3.2. VASICIN, VASICINON.....	22
3.2.1. <i>Izolace a identifikace</i>	22
3.2.2. <i>Farmakologie</i>	25
3.2.3. <i>Farmakologické studie</i>	28
3.2.4. <i>Toxikologické studie</i>	32
3.2.5. <i>Syntetické deriváty chinazolinu</i>	34
3.3. TEOFYLIN	43
3.3.1. <i>Chemické vlastnosti</i>	43
3.3.2. <i>Farmakodynamika</i>	43
3.3.3. <i>Farmakokinetika</i>	44
3.3.4. <i>Interakce</i>	45
3.3.5. <i>Nežádoucí účinky a kontraindikace</i>	46
3.3.6. <i>Dávkování</i>	47
3.4. ETICKÉ ZÁSADY PRÁCE SE ZVÍŘATY.....	48
3.5. LABORATORNÍ POTKAN	49
3.5.1. <i>Taxonomie</i>	49
3.5.2. <i>Zevní popis</i>	50
3.5.3. <i>Dýchací systém</i>	50
4. CÍL PRÁCE	53
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	54

5.1. MATERIÁL A METODIKA.....	54
5.1.1. Chemikálie	54
5.1.2. Pomůcky a přístroje	54
5.1.3. Pokusná zvířata.....	55
5.1.4. Testované látky.....	55
5.1.5. Metodika izolované průdušnice in vitro	56
6. VÝSLEDKY	59
7. DISKUZE.....	62
8. ZÁVĚR.....	64
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	65

1. Seznam použitých zkratek

95-4	2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on
a.	artérie
ALP	sérová alkalická fosfatasa
BAV	bioavailability; biologická dostupnost
br.	bronchus
CaCl ₂	chlorid vápenatý
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CAT	katalasa
CCl ₄	tetrachlormethan
CdCl ₂	chlorid kademnatý
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
CNS	centrální nervový systém
DRC	dose-response curve; křivka „dávka – účinek“
E.coli	Escherichia coli
ED ₅₀ (EC ₅₀)	dosis (concentration) effectiva media; dávka (koncentrace), která vyvolá specifikovaný účinek u 50 % jedinců
GIT	gastrointestinální trakt
GSH	glutathion (γ-glutamylcysteinylglycin)
Gy	gray; jednotka absorbované dávky ionizujícího záření
H. contotus	Haemonchus contotus
H ₂ SO ₄	kyselina sírová

HCl	kyselina chlorovodíková
Hg	rtuť
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPTLC	vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie (high-performance thin layer chromatography)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IC ₅₀	inhibition concentration; množství (koncentrace) látky potřebné k 50% inhibici enzymu
i.m.	intramuskulární způsob podání
i.p.	intraperitoneální způsob podání
i.v.	intravenózní způsob podání
JA	Justicia adhatoda
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
LD ₅₀	dosis lethalis media; množství látky, které je smrtelné pro 50% jedinců
LPO	lipooxygenasa
m.	musculus; sval
MDA	malonyldialdehyd
MgSO ₄ ·7H ₂ O	heptahydrát síranu hořečnatého
MIC	minimální inhibiční koncentrace
n.	nervus; nerv
NaCl	chlorid sodný

NaHCO ₃	hydrogenuhličitan sodný
NH ₄ OH	hydroxid amonný
O. circumcinta	Ostertagia circumcinta
O. columbianum	Oesophagostomum columbianum
p.o.	perorální způsob podání
PDEs	enzymy cyklické nukleotid fosfodiesterasy
PGE	prostaglandin E
RLX	6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on
s.c.	subkutánní způsob podání
SGOT	sérová glutamát oxalacetát transaminasa
SGPT	sérová glutamát pyruvát transaminasa
St.	Staphylococcus (aureus/epidermis)
Str.	Streptococcus (faecalis)
T _{1/2}	biologický poločas; doba, za kterou poklesne množství látky v těle na polovinu
TBC	tuberkulóza
tbl.	tableta
v.	vena; žíla
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XO	xantinoxidasa

2. ÚVOD

Fytoterapie představovala v dávných dobách obvyklou formu léčby. V dnešní době je vnímána jako jedna z možností alternativní medicíny a hraje důležitou roli spíše v prevenci onemocnění nebo jako doprovodná léčba k farmakoterapii. Přírodní látky však mají i dnes svou nezastupitelnou roli a slouží jako zdroj nových sloučenin a jejich derivátů, které jsou testovány pro svůj „očekávaný účinek“ ve snaze najít látku účinnější, příp. látku s méně vyznačenými nežádoucími účinky. V této práci jsou zmíněny nejen látky přírodního charakteru – obsahové látky rostliny *Justicia adhatoda* – ale i syntetizované deriváty chinazolinových alkaloidů – nejvýznamnějších obsahových látek této rostliny.

Vasicin a vasicinon jsou chinazolinové alkaloidy získávané zejména z rostliny *Justicia adhatoda* (Acanthaceae). Alkaloidy se vyskytují ve všech částech rostliny, s největším podílem v listech. První izolaci molekuly vasicinu provedli Sen a Ghos v roce 1924. Molekula vasicinu jako taková je poměrně dobře prozkoumaná, ale dosud není s jistotou objasněn její mechanismus účinku. Oba alkaloidy jsou v přírodních podmínkách opticky aktivní, přičemž účinnější je L-forma u obou alkaloidů, během extrakce však racemizují. Rostlina je původní v Indii, kde je hojně využívána v domorodém tradičním léčitelství, dnes je ale rozšířená po celé tropické oblasti jihovýchodní Asie až do nadmořské výšky 1300 m. Vyznačuje se širokým spektrem farmakologických účinků, nachází uplatnění zejména při onemocnění dýchacích cest, dále se využívá její protizánětlivý, uterotonický a lokálně hemostatický účinek.^{1, 8, 30}

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Justicia adhatoda

Justicia adhatoda (Acanthaceae) je keř rozšířený ve všech tropických oblastech jihovýchodní Asie.¹ Rostlina je oblíbená především v Indii, kde se užívá díky svému širokému spektru farmakologických účinků v tradičním systému léčitelství Áyurvéda, zejména pro léčbu různých onemocnění dýchacího ústrojí u dětí i dospělých. Od dávných časů se pro své léčebné účinky používají všechny části rostliny v různých lékových formách. Výzkum ukázal, že je Justicia adhatoda (dále JA) důležitým zdrojem farmakologicky a medicínsky prospěšných chemických komponent, z nichž nejstudovanější sloučeninu představuje vasicin.² Koncem 20. století se objevilo také několik vědeckých zpráv o abortivních účincích vasicinu a alkaloidů získaných z této rostliny, což vedlo k hodnocení drogy i z hlediska bezpečnosti a k provedení toxikologických studií.³

3.1.1. Taxonomie

Říše	Plantae
Kmen	Magnoliophyta
Třída	Rosopsida
Podtřída	Lamiidae
Řád	Lamiales
Čeleď	Acanthaceae
Podčeleď	Acanthoideae
Rod	Justicia / Adhatoda
Druh	Justicia adhatoda
	Adhatoda vasica ^{4,5}

3.1.2. Synonyma

Nejčastěji používaná synonyma jsou: Adhatoda vasica, Adhatoda zeylanica, Vasaka, Malabar Nut, Malabar-Nut-Tree, Adulsa, malabarský ořech, Adatodai.^{6,7}

V Indii se používají také místní názvy, např. Vasa, Shwetavasa, Arusa, Bansa, Basak, Bangra, Aradusi, Adusoge, Pavate, Bajkar, Bahekar, Basuth, Bhenkar, Arus, Basinga, Adalodakam, Aranbida, Bakaspati, Basung, Pavettai, Addasaramu, Huth Adhatoda, Monechma pilosella, Siphonoglossa dipteracantha.^{6,7}

3.1.3. Výskyt

JA je keř rozšířený ve všech tropických oblastech jihovýchodní Asie.¹ Přirozeně se vyskytuje především v Indii, dále v Nepálu, Pákistánu, Číně, Malajsii, na Srí Lance, ve Vietnamu a Indonésii.⁸ Z evropských zemí se nachází v Německu.² Příznivá jsou pro ni mírná a tropická pásma, často osídluje planiny, pustiny, a to až do nadmořské výšky 1300 metrů.⁸

3.1.4. Používané drogy a lékové formy

V léčebných aplikacích se používají listy, květy, kořeny a kůra kmene.⁹ Nejčastěji se používají listy, přičemž droga zahrnuje čerstvé nebo sušené listy, často ve směsi se stopkami nebo jinými nadzemními částmi rostliny. Prášková droga je šedavě hnědá a hořce chutnající s charakteristickou vůní. Cizí organická hmota by neměla přesáhnout 2 %.⁷

Drogu lze podávat lokálně, perorálně nebo inhalačně v různých hořce chutnajících lékových formách. Kořeny, listy a natě jsou základem pro prachy, protože listy jsou po usušení křehké. Odvary se obvykle připravují vařením listů, natí, kořenů nebo jako kombinace různých rostlinných orgánů (někdy se přidává trochu soli nebo medu ke zmírnění hořké chuti).⁸ Lokálně se aplikují zahřáté listy jako obklady, prach vařený v sezamovém oleji (při infekcích ucha a ke stavění krvácení), pasta z listů, šťáva z listů.^{7,10} Perorálně lze podávat odvar z listů, šťávu z listů a květů, nálev, alkoholický nebo vodný extrakt, sirup.^{7,11,12} Příkladem inhalační aplikace je kouření suchých listů ve formě cigarety.⁷ Tekutý extrakt, tinktura a šťáva získaná pomačkáním čerstvých listů

tlakem jsou oficiální v Indii a východních koloniích (*The Indian Pharmacopoeia, 1955*).^{3, 12}

3.1.5. Tradiční užití

Rostlina se používá v domorodém systému lékařství Áyurvéda a Unani více než 2000 let pro léčbu různých onemocnění, zejména dýchacího ústrojí.³

*Áyurvédský systém lékařství má v Indii své kořeny ve 3. tisíciletí př. Kr. Podle legendy se v jedné himalájské jeskyni setkali nejmoudřejší muži Indie, kteří hovořili o svých léčebných uměních. Tito muži přicestovali z různých částí Indie a přinesli s sebou domorodé znalosti léčivých bylin, které se dosud předávaly ústní formou. Na tomto velkém setkání spojili své znalosti do společného díla, které nazvali "Áyurvéda" (slovo „ayus“ znamená „život“ a slovo „veda“ znamená „poznání“). Áyurvéda chápe lidské zdraví jako harmonii mezi tělem, myslí a osudem. Zabývá se proto nejen zdravím tělesným, ale také duševním a duchovním. Díky tradici systému Áyurvéda se mnoho postupů přípravy bylinných léčiv zachovalo dodnes. Áyurvédské bylinné směsi, podobně jako čínské, jsou kombinací mnoha různých bylin, které působí navzájem synergicky, jednotlivé byliny se používají jen zřídka. Dnes je schopno nabídnout na trhu bylinná léčiva na základě autentických znalostí áyurvédských lékařů pouze několik bylinářských společností, jako je například Nature's Sunshine. Tato léčiva lze užívat bez lékařského předpisu.*¹³

JA se v indickém léčitelství používá po tisíce let především k léčbě onemocnění dýchacích cest – bronchitid, astmatu, tuberkulózy, kašle a jiných symptomů nachlazení. Zde se využívá její expektorační, bronchodilatační a mukolytické aktivity. Medicína Áyurvéda označuje tuto bylinu jako rostlinu se spazmolytickými, expektoračními a krev čistícími účinky a používá ji v mnoha indikacích, např. horečka, zvracení, žíznivost, srdeční potíže, ztráta paměti, leukoderma, žloutenka, nádory, gonorrhoea, lepra, zanícení očí, potlačení krvácení – peptické vředy, hemoroidy, krvácení z dásní.⁹ Droga má také účinek protizánětlivý, analgetický, kardiotonický a uterotonický.¹⁴ Pro své antibakteriální a protizánětlivé vlastnosti se může aplikovat ve formě obkladu z listů na zranění nebo na klouby k ulehčení od revmatických potíží.⁹ Pastu z listů lze aplikovat na břicho k úpravě močových poruch.¹⁰ Rostlinu tradičně využívají porodní asistentky v době porodu ke stimulaci stahů dělohy, po porodu napomáhá zavinutí dělohy a stavět krvácení.¹⁵

Alkaloidy i jiné složky byly testovány podle mezinárodně přijatých metodických směrníc proti původcům průjmů, jako jsou E. coli, Salmonella enteritidis, Shigella dysenteriae, Campylobacter jejuni. Efekt nebyl dostatečný, ale vynikající byl proti Pseudomonas aeruginosa, původci zánětů močových cest a ran.¹⁶ Podle některých

zdrojů vykazuje antibakteriální účinek alkoholický extrakt z listů a kořenů proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, vodný extrakt působí pouze proti *St. aureus*.² Methanolický extrakt z listů vykazuje silný antibakteriální účinek proti *Pseudomonas aeruginosa*, dále také proti G+ bakterii *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *St. epidermis* a G- bakterii *E. coli*.¹⁰ Fytoterapie tedy nabízí možnost využívat drogy při dlouhodobé antibiotické léčbě jako adjuvans nebo ji použít při menším osazení mikroby jako monoterapii. Ta je výhodná zejména u starých pacientů a u komorbidit.¹⁶

Drogu používají také evropští praktičtí lékaři. V Anglii se užívá tekutý extrakt a tinktura jako spazmolytikum, expektorans a antipyretikum (působí také proti periodické horečce při tyfu a záškrtu). V Německu slouží listy jako expektorans a spazmolytikum (léčba běžného nachlazení, chřipky, bronchitidy, suchého kašle, černého kašle, senné rýmy, astmatu, sinusitidy, při revmatismu, dně, močových kamenech a při kataru žaludku).³

Časté využití této drogy vyústilo v její zahrnutí do příručky WHO – *The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care* – která drogu doporučuje ke ztekuování sputa, k léčbě kašle, astmatu a krvácejících hemoroidů.³

3.1.6. Popis rostliny

JA je trvalý, stálezelený keř, který patří do čeledi Acanthaceae (paznehtníkovité) a vyrůstá do výšky 1 – 3 m (viz Obr. 1a, 1b).

Kmeny jsou zelenavě hnědé, robustní, v mládí pýřité, postupně olysávají.

Listy jsou jednoduché, řapíkaté, bez palistů, kožovitého vzhledu. Mají eliptický tvar, jsou krátce zašpičatělé až tupé a dosahují 5–25 cm délky a 2–9 cm šířky. Báze je protažená, olysávající, někdy ale zůstává trvale pýřitá naspodu na žilkách, řapíky jsou drobně pýřité a 0,5–3 cm dlouhé.^{2, 7, 17} Příčný řez listem ukazuje dvě vrstvy buněk palisády s diacytickými průduchy, na obou površích listu se objevují žlázové i nežlázové trichomy.



Obr. 1a Justicia adhatoda, celkový pohled

Obr. 1b Vrcholové části rostliny

Převzato z: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id152163/?taxonid=192878> (Obr. 1a)

RACHANA et al.: Review & Future Perspectives of Using Vasicine, and Related Compounds. Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011; 86. (Obr. 1b)

V mezofylu jsou přítomny podlouhlé cystolity, jehlicovité a hranolovité tvary krystalů šťavelanu vápenatého.² Počet trichomů a cystolitů se liší v různých rostlinných vzorcích.¹² Oblast střední žilky listu tvoří 4–6 vrstev kolenchymu těsně pod pokožkou a 3–5 cévních svazků, největší je svazek centrální.² Při sušení listy získávají zelenohnědou barvu, mají hořkou chuť a vůni podobnou silnému čaji.⁹ Využití léčivých účinků rostliny ohrožuje skvrnitost listů způsobená houbou *Rhizoctonia solani*. Choroba postihuje listy všeho stáří, nejvíce však starší listy. Příznaky začínají jako drobné, kulaté, světle hnědé body, které se rozrůstají a nabývají nepravidelného kulovitěho tvaru. Skvrny mají neohrazené okraje, mohou splývat a střed každé skvrny obsahuje světle zbarvenou tečku ve svém středu. Prudká infekce končí defoliací.¹⁸

Květy rostou v krátkých a hustých, terminálních a úžlabních latnatých klasech (viz Obr. 2) dlouhých 2–8 cm, stopky dorůstají 2–15 cm.¹⁷ Květy jsou bisexuální, zygomorfni (monosymetrické) a obvykle jsou spojeny s nápadnými, často jasně zbarvenými listy.⁶ Listy jsou vejčité až eliptické nebo obvejčité, špičaté, lysé nebo drobně pýřité, o velikosti 10–20 mm délky a 5–12 mm šířky. Listence jsou podlouhle kopinaté a podobné kališním listům.

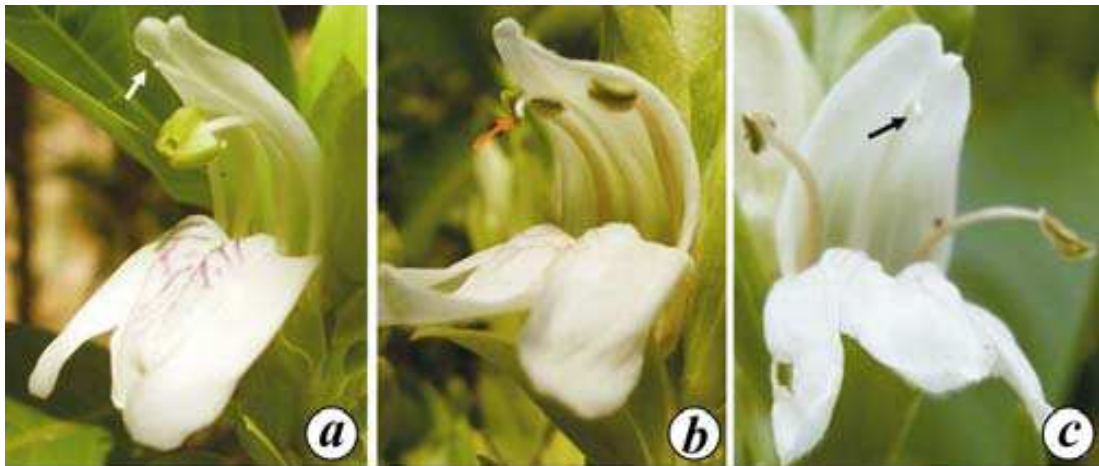


Obr. 2 Květenství *Justicia adhatoda*.

Převzato z: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id152161/?taxonid=192878>

Kalich se skládá z 5 vzájemně srostlých laloků. Je drobně pýřitý, o velikosti asi 8 mm. Laloky jsou kopinaté, ocasovité, s bledým okrajem. Korunu tvoří dva pysky, většinou bíle zbarveny s purpurovými proužky, může být lysá nebo pýřitá, její velikost se pohybuje kolem 3 cm.¹⁷ Oba pysky splývají a tvoří okvětní trubičku.¹⁹ Trubka je krátká (15 mm) a široká, horní pysk hákovitý a spodní tvoří tři vejčité laloky s příčným pruhem.¹⁷ Na středním laloku dolního pysku se nachází fialový nektar, který směřuje paprskovitě směrem k okvětní trubce.¹⁹ Androceum se obvykle skládá ze čtyř párových tyčinek, gyneceum ze dvou pestíků, čnělky a vrchního semeníku se dvěma pouzdry.

V každém pouzdře se skrývá od 2 do 10 semen v jedné nebo ve dvou vertikálních řadách. Prašníky nevynikají. Na bázi semeníku se nachází kruhová medníková lamela (nektarium). Plodem je pukající tobolka, která dřevnatí, je pýřitá a dosahuje velikosti 25 – 40 mm. Semenná stopka nebo vlákno každého semene je uzpůsobená do formovaného metacího háčku, který během puknutí vystřeluje semena ven.^{6,17} JA kvete v cyklických intervalech po celý rok, i když počet květů vyprodukovaných v každém cyklu je omezený. Vrchol rozkvětu trvá od ledna do března, kdy je celá rostlina pokrytá velkým množstvím květů. Květy mají životnost tři až pět dní, jsou protandrické a procházejí třemi fázemi: samčí, oboupohlavní a samičí. Samčí fáze trvá 24–30 hodin. Ihned po otevření květu jsou jedinými funkčními reprodukčními orgány prašníky. Čnělka je umístěna blízko horního pysku s distálně špičatou a nevnímavou bliznou. Tyčinky směřují dolů a prašníky jsou zduřelé, umístěné pod bliznou a čnělkou (viz Obr. 3a). Životaschopnost pylu v tomto stádiu se pohybuje kolem 80 %.



Obr. 3 Detail květu JA.

Obr. 3a čnělka s bliznou blízko horního pysku, tyčinky směřují dolů a prašníky jsou zduřelé; Obr. 3b čnělka se zakřivuje směrem dolů a směřuje bliznu dolů; Obr. 3c blizna směřuje dolů, tyčinky s prašníky se vychylují. Převzato z: www.ias.ac.in-curr sci-feb102009-408.pdf.

Samčí stádium plynule přechází v krátkodobou fázi bisexuální. Čnělka se zakřivuje směrem dolů a směřuje bliznu také směrem dolů (viz Obr. 3b). Blizna se nyní stává vnímavou. Prašníky zůstávají ve stejné pozici jako v samčí fázi a jsou stále zduřelé. Během bisexuální fáze se redukuje životaschopnost pylu na 27,52% (+/- 6,20 %). Bisexuální fáze trvá mezi 10 a 12 hodinami. Později se květy funkčně stávají samičími. V této fázi prašníky nenabízejí žádný pyl, květy se svrašťují, vysušují a postupně se tyčinky s prašníky vychylují směrem ven (viz Obr. 3c). Ačkoli prašníky udrží většinu pylových zrn, nejsou v ochablých květech schopny života. Blizna je stále vnímavá a směřuje dolů. Samičí fáze trvá od 24 do 32 hodin u opylovaných květů, u neopylovaných květů pokračuje po dalších 48 hodin. Květy JA nabízejí jak pyl, tak nektar.¹⁹

Fáze	Samčí	Oboupohlavní	Samičí
Doba kvetení (hod) (+/- 4 hod)	0 - 30	30 - 40	40 - 72
Doba trvání (hod) (+/- 4 hod)	30	10	32
Povaha čnělky a blizny	čnělka přímá blizna distálně terminální	terminální část čnělky zakřivená blizna směřuje dolů	terminální část čnělky zakřivená blizna směřuje dolů
Vnímavost blizny	není vnímavá	vnímavá	vnímavá
Povaha prašníku	čerstvý, zelený, zduřelý s hojným životaschopným pylem	mírně vybledlý, ale zduřelý s malým množstvím životaschopného pylu	seschlý, hnědý, bez životaschopného pylu; tyčinky se vysuší a rozestoupí

Tab. 1 Struktura květu během jednotlivých fází květu.

Převzato z: www.ias.ac.in-curr sci-feb102009-408.pdf

3.1.7. Pěstování, fyzikální podmínky pro růst

Rostlinu lze pěstovat v domácích podmínkách. Někdy se pěstuje jako živý plot, ale žádné systematické pěstování se neujalo. Snadno se rozmnožuje pomocí semen nebo řízků odebraných z rostliny v předjaří až začátkem léta. Potřebuje vlhkost, ale výhodnější je pro ni ji zalévat jednou týdně důkladně než mírně každý den. Vyžaduje plné slunce anebo alespoň šestihodinovou expozici slunečnímu svitu denně. JA preferuje hlinitopísčitou až hlinitou půdu s hodnotou pH 5,5–7,5.^{6, 7, 20}

3.1.8. Obsahové látky

V různém měřítku jsou ve všech rostlinných částech přítomny chinazolinové alkaloidy vasicin a vasicinon, přičemž maximální koncentrace dosahují v listech (45–95 % podílu alkaloidů tvoří vasicin).^{15, 21} Produkce vasicinu v různých oblastech Indie kolísá mezi 0,0541 – 1,105%.³ V zahraničních vzorcích byl stanoven výnos alkaloidu až na 2,18 % sušiny, přičemž více než polovinu tvořila D-forma a zbytek D-,L-forma (racemát). Vasicin je provázen L-vasicinonem.⁷ Další obsahové látky v jednotlivých orgánech rostliny jsou následující:

Listy jsou zdrojem **pyrrochinazolinových alkaloidů** vasikol, peganin, deoxyvasicin, deoxyvasicinon, další alkaloidy vyskytující se v menší míře jsou adhatonin, adhatodin, anisotin, desmethoxyaniflorin, 3-hydroxyanisotin, 7-methoxyvasicinon, vasikolin, vasikolinon, N-oxid vasicinu, maionton.^{2, 3, 7, 10, 15} Z listů izolované minoritní alkaloidy (vasicinol, vasicinon, deoxyvasicin, deoxyvasicinon) a vasicin vykazují sezónní změny procentuálního podílu. Listy sebrané v březnu až dubnu obsahují vyšší procento minoritních alkaloidů, zatímco sebrané v červnu až září mají vyšší obsah vasicinu.⁷ Dalšími složkami jsou **steroidy**, **betain**, **mastné kyseliny a uhlovodíky** (směs více než 50 sloučenin) a podle některých zdrojů také **vitamín C** a **karotenoidy**.^{3, 10, 22}

Květy obsahují **alkaloidy** (kromě vasicinu a vasicinonu také vasikol), **triterpeny** (α -amyrin, oankosterol, epitaraxerol), **flavonoidy** (astragalin, kaempferol, apigenin, vitexin, isovitexin, violantin, o-xylosylvitexin, rhamnosylvitexin), **uhlovodíky** (keton 2'-hydroxy-4-glykosyloxychalkon) a **esenciální oleje** (v silici květu více než 36 sloučenin, hlavní složkou je 4-heptanon).^{2, 3, 10}

Kořeny také obsahují **alkaloidy** (vasicinolon, vasicinol, adhatonin, vasikol, deoxyvasicin), **steroidy** (daukosterol), **karbohydráty** a **uhlovodíky**.^{3, 7}

3.1.9. Veterinární užití

Listy a oddenky JA nacházejí uplatnění ve veterinární medicíně, konkrétně u přežvýkavců, a to k terapii kašle a nachlazení a obecně k léčbě nemocí jako např. absces, antrax, choroby hrdla, astma, TBC, žloutenka, svrab, kopřivka, revmatismus, hematurie, infekční aborty.¹⁰

3.1.10. Jiná využití

Některé indické kmene využívají také potravní hodnotu rostliny, kdy měkké listy a květy upravují jako zeleninu.³ Alkoholický extrakt má pesticidní účinek, pryskyřice v listech působí jako insekticidum.^{8, 23} Dřevo kmene je měkké a vytváří dobré uhlí pro střelný prach.⁹

3.1.11. Komerční produkty

Áyurvédské bylinné směsi jsou kombinací mnoha různých bylin, které působí navzájem synergicky.¹³ Jako příklad poslouží několik komerčně dostupných přípravků:

KanJang, ústní roztok: -fixní kombinace standardizovaných extraktů *Echinacea purpurea*, *JA*, *Eleuterococcus senticosus*.²⁴

AstmaProtect, tbl.: -standardizované extrakty *JA*, *Desmondium ascendens*, *Minthostachys setosa*, *Spondias mombin*

BronchoProtect, pastilky: -standardizované extrakty *JA*, *Desmondium ascendens*, *Minthostachys setosa*, *Spondias mombin*, *Ocimum sanctum*

BronchoProtect, elixír: -stejně složení jako BronchoProtect, navíc obsahuje *Aspalanthus linearis* extrakt.²⁵

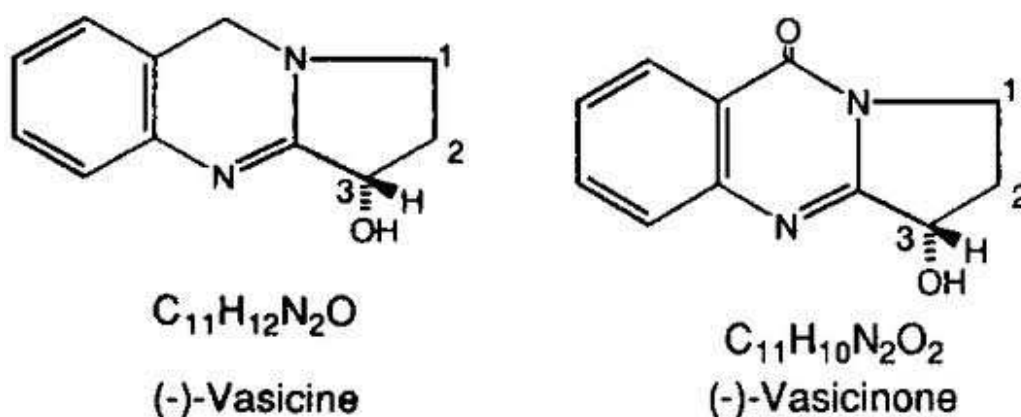
Sirup proti kašli G. C. M.-N: -standardizované extrakty *JA*, *Clerodendron serratum*, *Costus speciosus*, *Ocimum sanctum*, *Pistacia integerrima*, *Terminalia belerica*, *Emblica officinalis*, mentol, tymol, kafr.²⁶

Ayur Elixir 13 Kanakasawaya: -standardizované extrakty *JA*, *Solanum xanthocarpum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Messua ferrea*, *Premna herbacea*.²⁷

Broncho protektor – elixír pro koně: -standardizované extrakty *JA*, *Minthostachys setosa*, *Desmondium ascendens*, *Ocimum sanctum*, *Aspalanthus linearis*, *Spondias mombin*.²⁸

3.2. Vasicin, vasicinon

Farmakologicky nejvíce studovaná chemická komponenta rostliny JA je hořký chinazolinový alkaloid vasicin (syn. peganin), v menší míře také jeho metabolit vasicinon (viz Obr. 4).^{3,8} Systematický název vasicinu je 1,2,3,9-tetrahydropyrrolo[2,1-b]chinazolin-3-ol. V poloze 3 má vasicin chirální centrum. Předpokládá se, že účinným stereoizomerem izolovaným z rostliny je (-)(3S nebo také L)-forma, (+)-forma vasicinu se označuje jako peganin a je izolován z jiných rostlinných druhů (např. *Peganum hermala*, zdroj halucinogenních harmalinových alkaloidů).^{8,29} Při laboratorní syntéze mají sklon k produkci obě formy. Stejně jako u vasicinu je (-)-forma vasicinonu účinnější než jeho racemická forma.⁸ Bod tání vasicinu se pohybuje v rozmezí 197–198°C a bod tání vasicinonu v rozmezí 201–202 °C.²¹



Obr. 4 Struktura vasicinu a vasicinonu (absolutní konfigurace 3S)

Převzato z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0957416695004122>.

3.2.1. Izolace a identifikace

Molekulu vasicinu poprvé izolovali Sen a Ghos v roce 1924. Ačkoli je hlavním zdrojem pro získání majoritních alkaloidů JA, byly pro izolaci vasicinu zpracovány také další rostliny. Ghosal et al. (1975) izoloval vasicin z rostliny *Sida cordifolia*. Susag et al. (2003) izolovali vasicin ze dvou druhů *Afrogalega*: *Galega battiscombei* a *Galega lindblomi*. Bagchi et al. (2003) oznámili jeho izolaci z *Adhatoda beddomei* a obsah vasicinu porovnávali s *Adhatoda zeylanica/vasica* (JA). Podle jejich výsledků vykazuje JA velké sezónní výkyvy vasicinu po celý rok (v rozmezí 1,22 %–2,57 % dvakrát ročně). Khaliq et al. izoloval peganin/vasicin hydrochlorid ze semen *Peganum hermala* v dihydrované formě.³⁰

HPTLC

HPTLC (vysoce účinná tenkovrstvá chromatografie): metoda je velmi jednoduchá, citlivá, ekonomická a vhodná pro současnou analýzu vasicinu a vasicinonu.

Standardy alkaloidů se získávají ze suchých rozmělněných listů JA (1 kg) extrahovaných s ethanolem, extrakt se upravuje podle Gupta a Jain a izoluje se alkaloidová frakce (2,40 g). Tato frakce podléhá sloupcové chromatografii přes silikagel použitím směsi chloroform a methanol stoupající polarity. Totožnost vasicinu a vasicinonu se potvrdila porovnáním jejich spektrálních dat s předchozími ohlášenými údaji.

Rostlinný materiál pro analýzu se získal ze vzduchem usušených (30–50°C) rozmělněných listů, stonků a kořenů JA (každý po 1,0 g), které se odděleně extrahovaly s 3 × 20 ml methanolu obsahujícím 20 % (v/v) NH₄OH. Extrakty se koncentrovaly pod vakuem a před HPTLC analýzou se doplnily methanolem do objemu 20 ml.

Chromatografie byla provedená na silikagelu 60GF₂₅₄ HPTLC skleněných deskách (20 × 20 cm, tloušťka vrstvy 300 μm) s vizualizací pod UV při λ 270 a 281 nm. Pro kvantitativní stanovení alkaloidů byly analýzy různých vzorků opakovány třikrát. Průměrný obsah vasicinu a vasicinonu v listech, stoncích a kořenech jsou uvedeny v tabulce 2.²¹

Rostlinná část	Vasicin (% sušiny)	Vasicinon (% sušiny)
Listy	0,65	0,047
Nať	0,31	0,027
Kořeny	0,062	0,0013

Tab. 2 Obsah alkaloidů vasicin a vasicinon v různých částech *J. adhatoda*.

Převzato z: DAS CH., POI R., CHOWDHURY A.: HPTLC determination of vasicine and vasicinone in *Adhatoda vasica*, *Phytochemical analysis* 2005, 16: 91.

HPLC

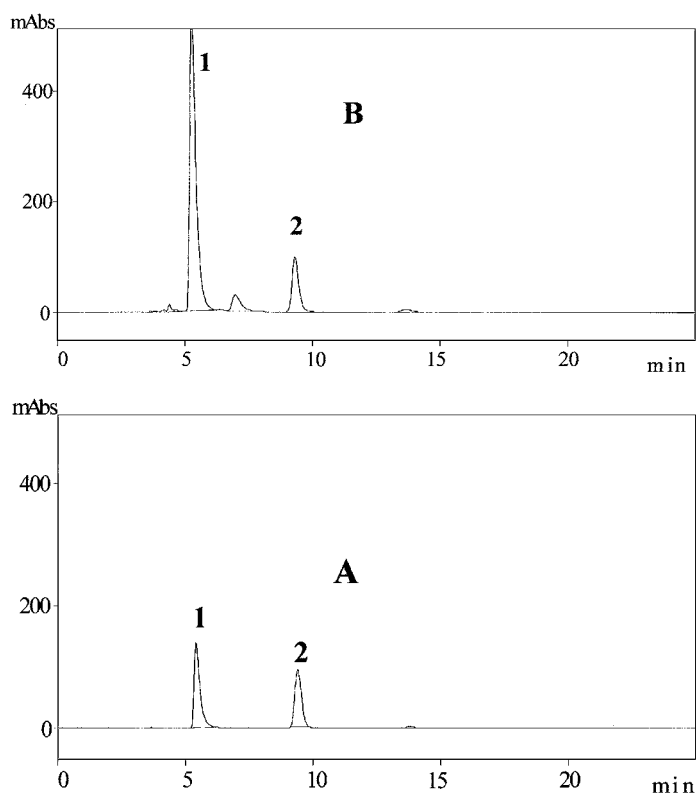
HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie): jednoduchá, rychlá, přesná a citlivá analytická metoda s dobrou mírou čistoty píku pro současné stanovení obou alkaloidů.

Standardy alkaloidů se získaly extrakcí práškových listů JA (1,50 kg)

s ethanolem. Filtrát se odtučnil, extrahoval se s chloroformem až k výnosu 4,0 g surových alkaloidů. Čistý vasicin a vasicinon se získaly sloupcovou chromatografií přes silikagel použitím směsi chloroform:methanol:ethylacetát se stoupající polaritou (viz Obr. 5). Sloučeniny byly potvrzeny spektrální analýzou.

Pro přípravu vzorků se použily na vzduchu sušené práškované listy JA (1 g) a extrahovaly se s chloroformem (3×10 ml). Extrakt se zfiltruje, koncentruje pod vakuem, extrahuje s 5% kyselinou octovou (3×5 ml), odtuční se použitím hexanu, alkalizuje se amoniakem a extrahuje s chloroformem (3×10 ml), koncentruje se pod vakuem až do přípravy 1,0 ml v methanolu a filtruje se přes Millipore filtr pro HPLC analýzu.

Chromatografie byla provedena na gradientovém přístroji HPLC Shimadzu. Solventy se filtrovaly přes Millipore systém a analýza proběhla na Merck Hibar koloně C18. Parametry měření: složení mobilní fáze bylo acetonitril: 0,1M fosfátový pufr: ledová kyselina octová (15:85:1 v/v/v), pH 3,9, průtoková rychlost 0,70 ml/min, teplota kolony 26°C, UV detektor při λ 300 nm.³¹



Obr. 5 Separace směsi čistého vasicinu a vasicinonu (1mg/ml) (A) a extrakt z listu JA (B).
Převzato z: http://kr.cimap.res.in/bitstream/123456789/60/1/J_Journal_Liquid_Chromatography_Related_Technologies_24%20_153.pdf.

3.2.2. Farmakologie

Výzkumy vasicinu prokázaly jeho bronchodilatační účinek (srovnatelný s teofylinem) *in vivo* a *in vitro*. Vasicinon podle většiny zdrojů vykazuje bronchodilataci *in vitro*, ale *in vivo* působí bronchokonstrikci, která je pravděpodobně způsobena biotransformací látky *in vivo* (Gupta et al., 1977; Cambridge et al., 1972; Lahiri a Pradhan, 1964). Při použití směsi obou alkaloidů v poměru 1:1 je výsledný účinek výrazně bronchodilatační. Zatímco Amin et al. (1959) tvrdí, že vasicin působí bronchokonstrikci a vasicinon bronchodilataci.^{12, 30}

Vasicin se také vyznačuje silnou stimulační aktivitou dechu, dále hypotenzivním účinkem a depresorickým účinkem na srdce. Vasicinon tyto vlastnosti postrádá (viz Farmakologické studie, Gupta et al.). Použitím směsi vasicinu a vasicinonu se srdečně depresorický účinek výrazně snižuje. Vasicinon (D-,L-forma) nevykazuje žádný účinek na izolované srdce, ale pravděpodobně působí L-forma jako slabé kardiostimulans.¹²

Farmakodynamika

JA působí jako induktor enzymů účinných při metabolismu xenobiotik. Sloučeniny připravené chemickou modifikací molekuly vasicinu inhibují degranulaci žírných buněk a tedy uvolňování histaminu, snižují aktivitu cAMP fosfodiesterasy a lipoxygenasy a inhibují vychytávání vápníku.²²

Vlastní mechanismus příznivého účinku drogy JA na respirační trakt spočívá pravděpodobně v působení účinných látek jako kompetitivní antagonisté inhibující účinky acetylcholinu na presynaptické membráně nervových zakončení vláken bloudivého nervu (*n. vagus*) v dýchacích cestách. Tímto způsobem dochází k relaxaci hladké svaloviny dýchacích cest, k jejich uvolnění a ke zvýšení sekrece hlenu.²⁹

V současné době ale nejsou dostatečné informace, které by vypovídaly o přesném mechanismu účinku.³²

Farmakokinetika

Cleason et al. ve své práci uvádí, že se vasicin podávaný *i.m.* v dávce 20 mg/kg tělesné hmotnosti, dobře absorbuje a dosahuje maximální koncentrace kolem 50 µg/ml

v krvi a kolem 10 µg/ml v amniotické tekutině gravidních i negravidních samic potkana. Po *i.v.* podání látky potkanům a myším byly nejvyšší koncentrace vasicinu nalezeny v uteru během 5 minut po aplikaci a maximální hladiny bylo dosaženo po 10 minutách. Biologický poločas vasicinu po *i.v.* podání byl 5 min, po *i.m.* 90 min a po *s.c.* aplikaci 2 hodiny. Studie na absorpci a distribuci vasicinu u myší po *i.v.*, *i.m.* a *s.c.* podání vykazují podobný výsledek jako u potkanů. Po *p.o.* aplikaci je koncentrace vasicinu v uteru velmi nízká. Amla et al. (1987) vedli experiment u zdravých lidí a studovali farmakokinetiku vasicinu. Aplikované bolusy 1,5 mg/kg *i.v.* dosáhly maximální hladiny v 15. min (65 ± 5 µmol/l) a hned po 4 hodinách dosahovaly 1/3 vrcholu. Ram et al. (2007) pak stanovili jako místo absorpce tenké střevo (duodenum).³⁰

Vasicin se metabolizuje v játrech na vasicinon a další metabolity, které velkou mírou podléhají jaternímu first-pass efektu a jsou důležitou cestou eliminace vasicinu. Vasicin a jeho metabolity se vylučují převážně močí. Po *i.v.* aplikaci vasicinu se během 18 hodin vyloučí kolem 55% produktů, po *i.m.* aplikaci během 22 hodin a po *p.o.* podání se vyloučí kolem 18% produktů vasicinu během 24 hodin.³

Průměrná dávka extraktu je dvakrát denně 250 mg, je však vhodnější dávku upravit individuálně (vhodná dávka závisí na několika faktorech, zejména na věku a zdravotním stavu uživatele).^{22, 32} Jiný zdroj uvádí následující dávkování: tekutý extrakt 2–5 ml, šťáva z listů 1–20 ml, šťáva z květů 10–20 ml, koncentrát z kořene 40–80 ml (pro blíže nespecifikované použití).¹⁰ Pro expektorační účinky je doporučeno dávkování 1–2 g drogy ve formě kapalného extraktu (1–2 ml) nebo sirupu (2–4 ml).⁷ Při dodržování doporučeného dávkování nejsou hlášeny žádné nežádoucí účinky, požití nadměrného množství drogy způsobuje iritaci trávicího traktu, průjem, zvracení.^{10, 15} WHO zaznamenává ve svém manuálu *The Use of Traditional Medicine in Primary Health Care*, že je rostlina netoxická, nezmiňuje žádná omezení k jejímu užití a dokonce ji doporučuje jako první pomoc v základní lékařské péči pro děti a dospělé, a to i dlouhodobě.³ Podle několika zdrojů působí extrakt rostliny jako abortivum, proto je jeho užití kontraindikováno v těhotenství.²² Jiné zdroje uvádí jako kontraindikaci obstrukce žlučových cest a hypersenzitivitu k droze.¹²

Dash et al. (2010) provedli studii k porovnání farmakokinetického profilu Vasa Swaras (šťáva z listů JA) s čistým vasicinem a vasicinonem při *p.o.* podání potkanům. Studie byla provedena na samcích potkana Sprague-Dawley ve stáří 12–16 týdnů o hmotnosti $348,44 \pm 40,02$ g. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin, každá po 6 zvířatech.

První skupině zvířat podávali Vasa Swaras, druhé skupině vasicin, třetí skupině vasicinon a čtvrté skupině vasicin i vasicinon. Ke každému vzorku se přidalo 25 μ l vnitřního standardu o koncentraci 12 μ l/ml. Efektivní dávka vasicinu u potkana byla 1,25 mg/kg. V daných intervalech se odebíraly vzorky krve z *v. jugularis*. Vzorky se po úpravě vyhodnotily chromatograficky. Z časového poklesu hladin byly vypočítány jednotlivé farmakokinetické parametry (viz. Tab. 3).

Skupiny	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (hod)	AUC_{0-t} (ng h/ml)	K_{el} (hod ⁻¹)	$t_{1/2}$ (hod)	CL_T (l/hod)	V_d (l)
1 (vasicin)	449,5±16,1	0,45±0,007	67529,38±3694,5 6	3,635±0,7 2	0,19±0,004	10,76±1,2 7	2,96±0,86
1 (vasicinon)	214,1±15,6	0,45±0,002	22505,25±2187,5 4	0,45±0,14	1,54±0,98	1,19±0,23	2,67±0,47
2 (vasicin)	211,7±10,8	0,30±0,005	22237,00±1641,1 5	0,77±0,12	0,90±0,11	6,89±1,76	8,99±1,89
2 (vasicinon)	126,4±5,2	0,30±0,001	6371,63±257,85	0,86±0,17	0,81±0,08	8,08±1,57	9,42±1,22
3 (vasicinon)	-	-	-	-	-	-	-
4 (vasicin)	241,3±15,3	0,30±0,002	12863,13±882,47	0,87±0,07	0,80±0,14	13,45±1,2 2	15,55±1,4 3
4 (vasicinon)	158,6±24,0	0,30±0,007	7917,00±242,82	0,99±0,13	0,69±0,07	7,54±0,89	7,58±1,07

Skupina 3: koncentrace vasicinu v plazmě je nižší než mez detekce u všech 6 zvířat.

Tab. 3 Farmakokinetické parametry vasicinu a vasicinonu u potkanů po *p.o.* podání Vasa Swaras a čistého vasicinu a vasicinonu.

Aplikace: skupina 1 Vasa Swaras; skupina 2 vasicin; skupina 3 vasicinon; skupina 4 vasicin + vasicinon. Ke každému vzorku byl přidán vnitřní standard. Převzato z: DASH R.P., CHAUHAN B.F., ANANDJIWALA S., NIVSARKAR M.: Comparative pharmacokinetics profile of Vasa Swaras with vasicine and vasicinone, Chromatographia 2010, 71: 614.

Podle výsledků se vasicin a vasicinon řídí kinetikou 1. řádu, kdy dochází k rychlé fázi absorpce následované pomalou fází eliminace. Ve farmakokinetickém profilu se pozoroval výrazný rozdíl po *p.o.* podání Vasa Swaras a jednotlivých izolovaných složek vasicinu a vasicinonu. Bylo zjištěno, že biodostupnost (BAV) vasicinu a vasicinonu je vyšší z Vasa Swaras než je BAV samotných alkaloidů. Tato změna BAV se může přisuzovat přítomnosti dalších sloučenin ve šťávě z listů, které pravděpodobně zabraňují metabolismu vasicinu a vasicinonu. Tyto sloučeniny mohou vykazovat bližší vztah a rychlejší kompetici o drogu metabolickými enzymy.³³

3.2.3. Farmakologické studie

Gupta et al. (1977) poukázali na kardiodepresorický účinek vasicinu v dávce 5,0; 7,5 a 10mg/kg *i.v.* a na jeho schopnost snižovat krevní tlak o 45; 50 a 55 mm Hg z původního krevního tlaku u psů. Tento účinek trval 70; 95 a 130 minut v tomto pořadí. Při testování vasicinu na izolovaném srdci v dávce 300 µg vykazoval patrný negativně inotropní a negativně chronotropní aktivitu a snižoval koronární průtok (při podání 1 mg vasicinu dochází ke snížení průtoku o 20–30 %). Vasicinon tuto aktivitu v podobných dávkách nevykazoval. V případě krevní perfúze cév bylo zjištěno, že vasicin má přímý vazodilatační účinek. Po aplikaci 50; 100 a 200 µg vasicinu se perfúze cév zvýšila průměrně o 0,60; 1,30 a 1,80 ml/min z počátečního průměrného průtoku 3,20 ml/min.³⁰

Dhuley et al. (1999) hodnotili antitusický účinek extraktu z listu JA u anestezovaných morčat a králíků proti kašli navozenému dráždivým aerosolem *p.o.* podání, mechanicky a elektricky *pro i.v.* podání. Experimenty byly provedeny na samcích morčat Haffkine (400–450 g) a samcích norských bílých králíků (3–3,50 kg). Zvířatům byla podána jednotlivá dávka alkoholického extraktu JA nebo kodeinu jako standardu. Antitusická aktivita se vypočetla porovnáním počtu záchvatů kašle před a po aplikaci drogy. Podle dosažených výsledků má extrakt JA lepší antitusickou aktivitu při *p.o.* podání než při *i.v.* aplikaci a při periferní stimulaci kašle. Antitusická aktivita *p.o.* aplikaci je srovnatelná s kodeinem (hodnoty ED₅₀ ukazuje Tab. 4). Jako iritační agens působila 5% kyselina citronová; 2,80 % NH₄OH; 0,5 N H₂SO₄.³⁴

Sloučeniny	ED ₅₀ (mg/kg, p.o.)		
	5% kys. citronová	2,8% NH ₄ OH	0,5 N H ₂ SO ₄
Extrakt JA	75,6 (70,5 - 84,6)	200,0 (175,3 - 250,4)	125,8 (98,4 - 140,6)
Kodein	66,8 (59,0 - 76,5)	195,0 (153,6 - 275,5)	106,5 (89,4 - 130,7)

Tab. 4 Účinek extraktu JA a kodeinu na kašel vyvolaný iritačními aerosoly u morčat. Převzato z DHULEY J.N.: Antitussive effect of Adhatoda vasica extract on mechanical or chemical stimulation-induced coughing in animals, Journal of ethnopharmacology 1999,67; 363

Jahangir et al. (2006) hodnotili antioxidační a antiklastogenní působení extraktu JA na CdCl₂ navozený renální oxidační stres a genotoxicitu u myší. Extrakt JA se

podával osmitýdenním samcům myši (20–25 g) ve dvou dávkách (50 a 100 mg/kg) 7 po sobě jdoucích dní před aplikací CdCl₂ (5 mg/kg tělesné hmotnosti, *i.p.*). Všechna zvířata byla 24 hodin po intoxikaci usmrcena, odstranily se ledviny a stehenní kosti. Kostní dřev ze stehenní kosti se zpracovala pro mikronukleus test a ledvinová tkáň pro stanovení hladin enzymů. *I.p.* injekce CdCl₂ má za následek nadprodukcii buněčných oxidantů a doprovodné zvýšení xantinoxidasy (XO) se snížením obsahu renálního glutathionu a inhibicí katalasy (CAT) a jiných glutathion závislých enzymů. GSH je často považován za první linii obrany proti oxidativnímu poškození. U zvířat ošetřených před expozicí záření extraktem JA došlo k obnově antioxidačního systému s doprovodnou inhibicí malonyldialdehydu (MDA) a snížení aktivity XO. Dále byl významně obnoven GSH a druhotné enzymy. Rostlinné produkty inhibují karcinogenezi modulací II. fáze biotransformace enzymů (konjugace GSH s různými elektrofilny) a hrají důležitou roli v detoxikaci xenobiotik.³⁵

Kumar et al. (2004) se ve své studii zabývali radiomodulačním vlivem ethanolického extraktu z listů JA proti radiací navozeným změnám periferní krve myši v různých post-radiačních intervalech mezi 6 hodinami až 30 dny (manifestace poškození tkáně savců se dobře odráží v periferní krvi). Pro daný výzkum byli použiti 6–8 týdnů staří samci myši s tělesnou hmotností 25±2 g. Myši byly rozděleny do 6 skupin, každá po 10 zvířatech a dostávaly extrakt z listu JA (200, 400, 600, 800, 1000 a 1200 mg/kg/den) 7 po sobě jdoucích dní. 30 min po poslední dávce byla zvířata vystavena celotělové expozici γ -záření (8,0 Gy). Myši vystavené radiaci bez předchozího podání extraktu JA jevíly známky nemoci z ozáření jako nechutenství, letargie, zježené chlupy a průjem; u těchto zvířat došlo k výraznému poklesu hematologických složek a během 25 dnů po iradiaci zemřela. Zvířata, kterým se podával extrakt JA (800 mg/kg/den) vykazovala 81,25 % přežití až do 30. dne po expozici a u hematologických hodnot se zaznamenalo jejich postupné obnovování.³⁶

Alkoholický extrakt JA byl také testován Kumarem et al. (2007) proti radiací navozeným abnormalitám v rámci histologických změn ve varlatech, redukce hladin glutathionu (GSH), lipooxygenasy (LPO), kyselých a alkalických fosfatů a chromozomální alterace u myši. Myši vystavené záření 8 Gy vykazovaly nemoc z ozáření včetně značných změn v histologii varlat a chromozomálních aberací v dřev kostních buněk se 100% úmrtností během 22 dní. Při *p.o.* podání ethanolického extraktu JA v dávce 800 mg/kg tělesné hmotnosti 15 po sobě následujících dní před ozáření se úmrtnost těchto myši snižovala na 70 % ve 30 dnech. V porovnání s neošetřenými

zvířaty se významně snížil stupeň poškození architektury tkáně varlat, z biochemického hlediska došlo ve varlatech a játrech ke snížení hladin LPO, zvýšení GSH a hladin alkalické fosfatasy, hladiny kyselých fosfatasy se snížily. Z uvedeného vyplývají značné radioprotektivní účinky extraktu JA na varlata myši.³⁷

Ethanolický extrakt JA použil ve své studii Pandit et al. (2004) a potvrdil antioxidační působení extraktu na tetrachlormethanem (CCl₄) navozenou hepatotoxicitu u potkanů. Hepatoprotektivní studie se uskutečnila na dospělých samcích potkanů kmene Wistar (150–175 g), ti byli rozděleni do 5 skupin, každá po 6 zvířatech. Dávkování extraktu z listů JA bylo stanoveno na 100 a 200 mg/kg, *p.o.* po dobu 9 dnů, stejnou dobu se podával standard silymarin (25 mg/kg, *p.o.*). 48 hodin po poslední aplikaci CCl₄ (CCl₄:olivový olej v poměru 1:1, 1ml/kg, *s.c.*) byla zvířata usmrcena a byla jim odebrána krev pro stanovení enzymů (sérová glutamát oxalacetát transaminasa - SGOT, sérová glutamát pyruvát transaminasa - SGPT, sérová alkalická fosfatasa - ALP). CCl₄ se v játrech metabolizuje na vysoce reaktivní trichlormethylový radikál, který způsobuje oxidaci mastných kyselin přítomných v cytoplazmatické membráně fosfolipidů a způsobuje funkční a morfologické změny v buněčné membráně. Tyto změny se projeví zvýšením markerů sérových enzymů (SGOT, SGPT, ALP) u potkanů, kterým se podával CCl₄. U zvířat ošetřených extraktem z listů JA a standardem silymarinem došlo k výrazné redukci jaterních enzymů v závislosti na dávce.³⁸

Hepatoprotektivní působení vodného extraktu z listu JA na D-galaktosaminem indukované jaterní poškození u myši v dávkách 50–100 mg/kg, *p.o.* dokazuje také studie provedená Bhattacharyya et al.³⁹

Yadav et al. (2008) navázali na lidové léčení kmene Naga v Indii a testovali na potkanech anticestodální aktivitu methanolického extraktu z listu JA proti modelu *Hymenolepis diminuta* (dospělci i nedospělé formy). Účinnost se určila sledováním počtu vajíček hlísty na gram fekálií a procentuálního podílu přeživších červů. Výsledek ukázal silnou aktivitu methanolického extraktu v dávce 800 mg/kg proti dospělým červům, kde se počet vajíček na gram fekálií snížil na 79,57 % a procentuální podíl přeživších červů byl 16,60%. Tyto hodnoty ukazují vyšší účinnost extraktu než jednotlivé dávky použitého standardu (praziquantel; 5 mg/kg). U nedospělých červů působil extrakt významnou redukcí procentuálního podílu přeživších červů (ze 100% u kontrolní skupiny na 20% při dávce 800 mg/kg extraktu).⁴⁰ Al-Shaibani et al. (2008) studovali ovocidní a larvocidní vlastnosti ethanolického a vodného extraktu z JA

o koncentraci 25–50 mg/ml proti hlísticím ovcí *in vitro*. Účinněji působil ethanolický extrakt v závislosti na dávce. Co se týče ovocidního působení, byly nejnižší hodnoty ED₅₀ zaznamenány proti vajíčkům *O.circumcincta* (12,59 a 11,48 mg/ml pro ethanolický a vodný extrakt v tomto pořadí); nejvyšší hodnoty ED₅₀ proti vajíčkům *Chaberita ovina* (18,2 mg/ml pro oba extrakty z JA). Hodnoty ED₅₀ při hodnocení larvicidního účinku byly podobné. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny proti larvám *O. columbianum* (19,5 a 18,62 mg/ml) a nejnižší proti larvám *H. contotus* (15,14 a 12,88 mg/ml pro vodný a ethanolický extrakt v tomto pořadí).³⁰

Díky širokému spektru farmakologických účinků byly provedeny studie týkající se dalších léčivých vlastností JA.

Esenciální oleje z listů způsobují relaxaci hladkého svalstva. Methanolický extrakt z celé rostliny měl při testování na králících antialergickou a antiastmatickou aktivitu. Extrakt se podával inhalačně (6 mg/zvíře) nebo intragastricky (2,5 mg/kg).³

Pro zjištění a porovnání protizánětlivého účinku různých frakcí obsahových látek JA byly jednotlivé frakce (methanolvý extrakt, nealkaloidní frakce, saponiny) podrobeny chorioallantoin – membránovému testu. Alkaloidová frakce vykazuje silný protizánětlivý účinek srovnatelný s hydrokortizonem, a to v dávce 50 µg/tbl. Methanolický extrakt a další frakce mají výrazně nižší účinnost.¹ Ve studii provedené na morčatech působily alkaloidy proti alergeny navozené bronchiální obstrukci v dávce 10 mg/kg aerosolu.²²

Odvar z listů aktivuje enzym trypsin v *in vitro* studiích a tak stimuluje proces trávení.² U psů se testoval cholagogní účinek vasicinu (5 mg/kg). Jeho dlouhodobé podávání mělo za následek zvýšení vylučované žluči o 40–100%, se sklonem k ředění žluči a zvýšení exkrece bilirubinu.

Methanolický extrakt vykazuje antibakteriální aktivitu proti *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 16 411 g/ml) a působí dobře také proti G+ bakteriím *Str. faecalis*, *St. aureus*, *St. epidermis* a G- bakterii *E. coli*. V jiných experimentech se rostlina testovala na inhibici bakteriální populace neupravené vody (*in vitro*). Růst bakteriální populace byl potlačen z 82% při pH = 7 a při pH = 6,5 byly potlačeny různé koliformní bakterie.¹⁰ Vodný extrakt je účinný proti mikrobiální flóře izolované od pacientů trpících gingivitidou.³

Ethanolický extrakt z listů JA po *p.o.* podání působil u potkanů hypoglykemicky, nedusíkatý základ listů podávaný *p.o.* ve formě suspenze v dávce 25 mg/kg působil krátkodobé snížení glykémie u králíků.^{2,3} Podle Gao et al. (2008) vasicin a vasicinol kompetitivně inhibuje střevní α -glukosidasu potkana (tím přeměnu sacharosy na glukosu) s hodnotami IC₅₀ 125 μ M pro vasicin a 250 μ M pro vasicinol. Ilango et al. (2009) hodnotili hypoglykemickou aktivitu různých extraktů z JA (chloroformový, methanolický, hexanový). Chloroformový a methanolický extrakt z JA, 200 mg/kg, redukuje hladiny glukosy v krvi a moči.³⁰

V malé studii se na rány u telat (12–18 měsíců) přikládala prášková droga, alkoholický a chloroformový extrakt JA. U ošetřených zvířat se pozorovalo lepší hojení ran. Ze 3. na 30. den se ve vzorcích biopsie významně zvýšil poměr kolagenu, elastinu, hydroxyprolinu, hexosaminu a zinku. Nejúčinnější byl alkoholický extrakt JA.¹⁰

Polosyntetické deriváty vasicinu bromhexin a ambroxol patří mezi široce používaná mukolytika a mají inhibiční účinek na *Mycobacterium tuberculosis* závislý na pH. Navíc mají schopnost se kumulovat v makrofázích, zvyšují hladinu lysozymu v průduškových sekretech a dále zvyšují hladinu rifampicinu v plicní tkáni a sputu. Lze je tedy využít jako podpůrná antituberkulotika.^{2,10}

Vasicin má uterotonický účinek u různých biologických druhů, včetně člověka. Bylo dokázáno, že účinek závisí na hormonálním stavu uteru (vliv estrogenů; účinek je pravděpodobně zprostředkován uvolněním prostaglandinů). Vasicin vyvolává rytmické kontrakce myometria u gravidní i negravidní dělohy a tento účinek je srovnatelný s oxytocinem a metherginem.^{3,10}

3.2.4. Toxikologické studie

Akutní toxicita vasicinu byla po jednotlivém podání mírná. Byla sledována u myší a potkanů, hodnoty LD₅₀ jsou uvedeny v Tab. 5.³ Wakhlo et al. (1980) sledovali bezpečnost užití vasicinu také u člověka. Podávali vasicin 24 dobrovolnicím ve 2.–8. dni šestinedělí v dávce 0,5–16 mg *i.v.* v 500 ml fyziologického roztoku po dobu 3 hodin. Vasicin byl dobře tolerován, nevykazoval žádné nežádoucí účinky v klinických pozorováních, biochemických a hematologických vyšetřeních, ani v ledvinných a jaterních funkčních testech provedených před, během a po podání vasicinu. Experiment potvrdil uterotonický účinek.³⁰

Cesta podání	Myši	Potkani
p.o.	290	640
i.p.	125	115
s.c.	200	335
i.v.	79	-

Tab.5 Hodnoty LD₅₀ vasicinu (mg/kg).

Převzato z: CLEASON, MALMFORS, WIKMAN, BRUHN: Adhatoda vasica: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data, Journal of Ethnopharmacology 2000, 72: 11

Pro zjištění subakutní toxicity byl po dobu 14 dní podáván vasicin potkanům a psům. Potkanům - 6 samic, 6 samců v každé skupině - se vasicin podával v dávkách 10, 25 a 50 mg/kg, s.c. a v dávkách 20 a 100 mg/kg, p.o. Psům - 2 samci a 2 samice v každé skupině – se vasicin aplikoval s.c. v dávkách 3,50 a 17,50 mg/kg a pro p.o. podání byla zvolena dávka 35 mg/kg. Kontrolní skupině byl podáván fyziologický roztok. Všechna zvířata byla během zkoušení pozorována, byl proveden rozbor krve a histopatologická analýza důležitých orgánů. Žádné závažné nepříznivé účinky nebyly zaznamenány u žádného druhu.

Studie chronické toxicity vasicinu byly prováděny na potkanech a opicích po dobu 6 měsíců. Vasicin byl denně podáván p.o. čtyřem skupinám potkanů (v každé 10 samic a 10 samců, dávkování 1; 2,5; 5 a 10 mg/kg) a čtyřem skupinám opic Macac rhesus (2 samci a 2 samice ve skupině, dávkování 0; 5; 10 a 20 mg/kg). U obou druhů bylo provedeno klinické pozorování, chemický rozbor a histopatologická analýza důležitých orgánů. Mortalita zvířat byla srovnatelná s kontrolními skupinami, pouze samci potkanů vykazovali větší míru mortality v závislosti na dávce. Hematologický a biochemický rozbor ukázal výsledky v rámci normálních fyziologických mezí. Pitva a histopatologická analýza neodhalily žádné abnormality.

Uterotonická aktivita vasicinu vedla k jeho testování jako abortiva, tedy k testování reprodukční toxicity.

Zabřeznutým samicím potkana (10 v každé skupině) se podávalo 5 – 15 mg/kg vasicinu, i.p. v 8. nebo 16. dni gestace. Výsledky nepoukázaly žádný vliv vasicinu na implantaci nebo porod. K zesílení účinku vasicinu došlo po premedikaci estradiolem.

Abortivní účinek byl pozorován u křečků (10 v každé skupině), kteří dostávali vasicin

v dávce 2,50 a 5 mg/kg, *i.p.* v 7.–9. dni a 10.–12. dni gravidity nebo u morčat (ve skupině 3–10 zvířat v různém stupni gravidity), která dostávala vasicin v dávce 5 a 10 mg/kg, *i.p.* po dobu 3 dnů.

Zkouška byla provedena také u králíků, kterým se aplikoval vasicin *i.p.* nebo *i.m.* (2,50; 5 a 10 mg/kg) nebo *p.o.* (20 mg/kg) v 10.–12., 17.–19. nebo 22.–24. dni gestace. Zvířata byla denně pozorována, nevykazovala žádné vaginální krvácení. Abortivní účinek byl pozorován u více než poloviny zvířat po parenterálním podání, po *p.o.* podání nebyl pozorován žádný účinek.

Otázka reprodukční toxicity vasicinu je velmi diskutovaná, přesto není podána jednoznačná odpověď. Výsledky různých podobných studií jsou protikladné a mnoho provedených studií nebylo v souladu s obecně uznávanými směrnici; experimenty jsou nedostatečně popsány, využívají malý počet zvířat, chybí kvalitativní kontroly, případně je použita špatná metodika (např. intraperitoneální podání u gravidních zvířat, nedostatek zvířat v kontrolní skupině, neuvedení velikosti podané dávky apod.). Abortivní účinek byl pozorovaný převážně v *in vitro* experimentech po intraamniotickém podání. Nicméně, nepřítomnost tohoto účinku po jiných cestách podání ukazuje, že účinek by mohl být dosažen pouze v relativně vysokých koncentracích. Ačkoli se názory na riziko potratu liší, obecně se doporučuje přípravky s obsahem extraktu JA nepoužívat v těhotenství.³

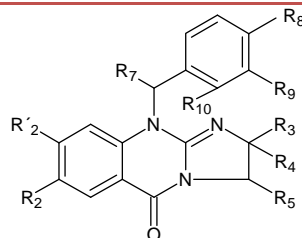
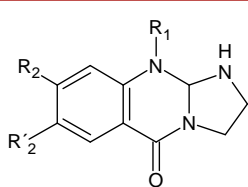
U potkanů a králíků byly provedeny studie teratogenity vasicinu. Skupinám spářených potkanů se podával vasicin (2,5; 5 a 10 mg/kg), *i.p.* v 1.–7., 8.–15. a 18.–22. dni březosti. Mláďata se pozorovala až do dospělosti, kdy se náhodně páří. Březím zvířatům se podával vasicin (2,5 mg/kg), *i.p.* od 1. do 20. dne gravidity. U mláďat první a druhé generace se neprojevovaly teratogenní nebo jiné nežádoucí účinky. Podobné výsledky byly získány při podávání vasicinu králíkům (1,25; 2,50 a 5 mg/kg), *i.p.*, kdy nebyly zjištěny žádné abnormality u mláďat první a druhé generace.³

3.2.5. Syntetické deriváty chinazolinu

Ve snaze najít sloučeninu s lepšími bronchodilatačními účinky, příp. s méně vyznačenými nežádoucími účinky, bylo provedeno několik experimentálních studií zabývajících se vztahem struktura a účinek u různých derivátů chinazolinu.

Jednu z prvních studií s chinazolinovými deriváty za účelem získat nové bronchodilatans provedl Hardtmann et al. již v roce 1975. Zabývali se syntézou a účinkem 10-substituovaných derivátů 2,3-dihydro[2,1-b]chinazolin-5(10H)-onu.

Všechny syntetizované sloučeniny podlely biologickému testování jejich aktivity na morčatech, u kterých byl navozen bronchospasmus inhalací aerosolu obsahujícího histamin. Sloučeniny se silnější bronchodilatační aktivitou než referenční substance (teofylin, 60 mg/kg, *p.o.*) byly vybrány pro další testování (doba působení, vývoj tolerance). Výsledky těchto podrobnějších farmakologických výzkumů ukázaly, že sloučenina 10-benzyl-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]chinazolin-5(10H)-on (**44**) je pětkrát účinnější a sloučenina 10-(4-fluorbenzyl)-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]chinazolin-5(10H)-on (**14**) je desetkrát účinnější než teofylin (struktura obou sloučenin viz Tab. 6). Doba působení obou substancí je srovnatelná s teofylinem, maximální plazmatické koncentrace je po *p.o.* podání dosaženo během 30–60 min a účinek trvá přibližně 3–4 hodiny. V dalším experimentu (anafylaktické mikrošoky navozené vaječným albuminem) vykazoval derivát **14** přibližně čtyřikrát silnější účinek než teofylin nebo derivát **44** (mají srovnatelný účinek). Vzhledem k vyšší pozorované aktivitě obou agens ve studii u histaminem navozeného bronchospasmu se předpokládá jejich antihistaminový účinek. Fakt, že derivát **14** a teofylin působily na dávce závislou relaxaci tracheálních proužků morčete, dokazuje přímý relaxační účinek derivátů na hladkou svalovinu bronchů. V tomto testu vykazoval derivát **14** asi třikrát vyšší účinnost než teofylin. Působení derivátu **14** přes β -adrenergní receptory bylo vyloučeno přidáním propranololu, který neměl na relaxaci žádný vliv.



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

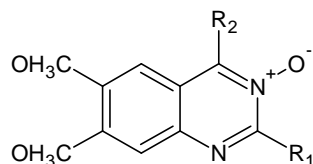
Tab. 6 Nejúčinnější syntetizované deriváty **14** a **44**. Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 44

Hodnocení nežádoucích účinků se týká především kardiovaskulární a centrální nervové soustavy. Derivát **14** způsobuje výrazný pokles krevního tlaku po *i.v.* aplikaci, ale oproti aminofylinu nezpůsobuje na dávce závislé nežádoucí účinky na srdeční funkci. Teofylin

vyvolal pokles funkce CNS a zvyšoval lokomoční aktivitu u testovaných myší v dávce 1,6 mg/kg, *p.o.*, derivát **14** podobných příznaků dosáhl až při dávce 102,4 mg/kg, *p.o.*

Ze vztahu struktury a účinku 10-substituovaných derivátů chinazolinu vyplývá, že maximální aktivity je dosaženo u derivátů, které mají kruh C pětičlenný. Předmětem výzkumu byla především obměna R₁ na dusíku chinazolinu. V případě, že R₁ = alkyl, -OCH₃, dochází ke snížení účinku, substitucí fenylu dokonce k jeho ztrátě, ale náhrada benzylem vede k mnohem vyšší aktivitě (**44**). Účinek se ještě zvýšil p-substitucí atomy halogenů na benzylu (**14**). Mírná aktivita byla zjištěna u sloučenin, kde R₁ = alken s dlouhým řetězcem nebo cykloalkylmethyl; rozvětvením alkylového řetězce se aktivita zvýší. Velmi dobrý vliv na aktivitu mělo zavedení jedné methylenové skupiny mezi N a fenylou skupinu (**44**), další prodlužování řetězce vede ke snižování účinku. Substituce kruhu A halogenem má variabilní vliv na aktivitu.⁴¹

V roce 1990 se Combs et al. zaměřili na syntézu a bronchodilatační účinky vybraných 2,4-dialkyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxidů (viz Tab. 7). Cílem výzkumu bylo najít deriváty strukturně podobné teofylinu, ale bez nežádoucích kardiostimulačních a centrálně stimulačních účinků. Bronchodilatační aktivitu studovali na morčatech, 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 se hodnotily na skupině psů premedikovaných pilokarpinem (0,75 mg/kg, *i.p.*). Bronchodilatační účinek derivátů odvozených od základní sloučeniny 2-ethyl-4-methyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxidu se vzrůstajícím počtem atomů uhlíku v poloze 2 nejprve stoupal (s maximem aktivity u 3–4 uhlíkatého řetězce) a posléze klesal. S prodlužující se délkou řetězce se snižoval kardiovaskulární účinek základního derivátu. Nejvyšší účinek vykazovaly deriváty 4-methyl-2-isopropyl-6,7-dimethoxychinazolin-3oxid (**20**) a 4-methyl-2-isobutyl-6,7-dimethoxychinazolin-3-oxid (**21**). Kardiovaskulární nežádoucí účinky těchto derivátů byly ve srovnání s teofylinem podstatně nižší. Na rozdíl od teofylinu působily oba deriváty (100 mg/kg, *p.o.*) mírný útlum CNS u myší.⁴²

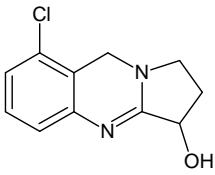
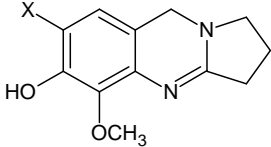


Sloučenina	R ₁	R ₂
20	isopropyl	methyl
21	isobutyl	methyl

Tab. 7 Sloučeniny 20 a 21.

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 45.

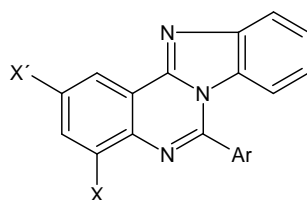
Hledáním nových antihistaminik a bronchodilatancí z řady trisubstituovaných derivátů deoxyvasicinu se zabýval Ojo et al. (1996). Zjistili, že (DL)-vasicin podávaný *i.v.* nevykazoval žádné bronchodilatační účinky až do dávky 5 mg/kg. Žádný účinek nevykazoval ani (DL)-7-methoxyvasicinový analog. Methylendioxydeoxyvasicin byl jako antagonist histaminem indukovaných kontrakcí jen málo účinný. Jako výchozí látka pro syntézu účinnějších analogů posloužil derivát (DL)-8-chlorvasicin, protože vykazoval vyšší účinek (v dávce 25 mg/kg) a zároveň nižší toxicitu než (DL)-vasicin. Bronchodilatační aktivita syntetizovaných trisubstituovaných derivátů deoxyvasicinu byla hodnocena v *in vitro* a *in vivo* experimentech. Ligandy 17a-d a (DL)-8-chlorvasicin vyvolávaly v *in vitro* experimentu relaxaci závislou na dávce. Experimenty *in vivo* tyto účinky potvrdily. Chlorderivát (**17b**) vykazoval stejnou bronchodilatační aktivitu jako fluorderivát (**17c**). Bronchodilatační vlastnosti bromderivátu (**17a**) a jodderivátu (**17d**) byly srovnatelné, přičemž měly oba deriváty přibližně dvakrát nižší aktivitu než **17b** a **17c** (viz Tab. 8).

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

Tab. 8 Vzorec (DL)-8-chlorvasicinu asloučenin 17_{a-d}.

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 43.

Bahekar, Rao se od roku 1999 několik let zabývali studiem vybraných derivátů imidazo[1,2-*c*]chinazolinů. V prvním experimentu 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**). Obě sloučeniny (viz Tab. 9) se vyznačují pouze mírnou aktivitou *in vitro*, aktivita *in vivo* nebyla nalezena vůbec.



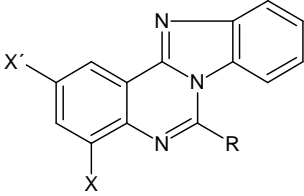
	X	X'	Ar
4a	H	H	C ₆ H ₅
4b	H	Br	C ₆ H ₅

Tab. 9 Vzorce testovaných derivátů 6-aryl-benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů.

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 48.

O rok později se věnovali hodnocení bronchodilatační aktivity dvou skupin 6-substituovaných derivátů benzimidazo[1,2-*c*]chinazolinů (Ia-p a IIa-l; viz Tab. 10). U všech testovaných sloučenin byl potvrzen účinek na *in vitro* i *in vivo* modelech. Ze studia vztahu struktury a účinku vyplývá, že 6-alkyl substituované deriváty skupiny II jsou účinnější, pokud obsahují delší alkylový řetězec a deriváty skupiny I vykazují vyšší

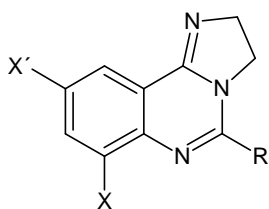
aktivitu, pokud obsahují elektronegativní substituent v poloze 4. Podle autorů je nejúčinnější sloučenina 10-jod-6-propylbenzimidazo[1,2-c]chinazolin (ze sk. II).⁴²

	X, X'	R
	Ia-p	H, Br, I
	IIa-l	H, Br, I

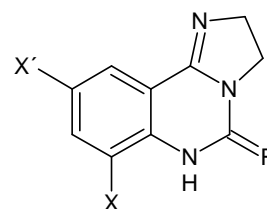
Tab. 10 Struktura testovaných derivátů benzimidazo[1,2-c]chinazolinů.

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami in vivo a in vitro. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 48.

V roce 2001 syntetizovali Bahekar a Rao 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazoliny (**Va-l**); 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin-5(6H)-thiony (**VIIIa-d**) a jejich oxoanalogy (**IXa-d**). Titulní sloučeniny řady V, VIII a IX (viz. Tab. 11) byly hodnoceny z hlediska bronchodilatačního účinku použitím metodik *in vitro* i *in vivo*. U všech sloučenin byla bronchodilatační aktivita potvrzena. Na základě sledování vztahů struktura - účinek bylo zjištěno, že aktivita 5-alkyl substituovaných sloučenin V se zvyšuje s prodlužujícím se alkylovým řetězcem. Sloučeniny skupin VIII a IX byly méně silné a náhrada síry kyslíkem nevykázala žádný významný efekt na biologickou aktivitu. Mezi testovanými sloučeninami měla nejsilnější bronchodilatační účinek sloučenina 5-propyl-9-jod-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]chinazolin.⁴³



Vzorec V



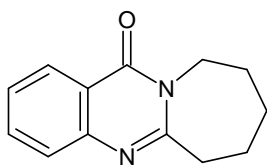
Vzorec VIII, IX

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

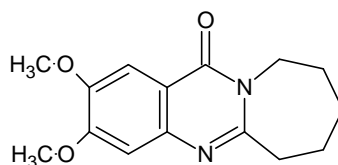
Tab. 11 Vzorce testovaných derivátů 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolinů (Va-l), 2,3-dihydroimidazo[1,2-*c*]chinazolin-5-(6*H*)-thionů (VIIIa-d) a jejich oxoanalogů (IXa-d).

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami in vivo a in vitro. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 4.

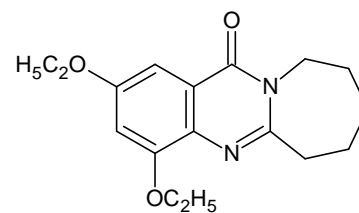
Johri a Zutsi v roce 2000 představili profil látky 6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-*b*]chinazolin-12-on, označované jako RLX (viz. Obr. 6). Účinek látky RLX se sledoval na degranulaci žírných buněk, na uvolnění histaminu a PGE, uptake vápníku a na aktivitě cAMP fosfodiesterasy a enzymů lipoxygenasy v mezenterálních a peritoneálních žírných buňkách a v homogenizované plicní tkáni u potkanů při systémové anafylaxi. RLX v dávkách 10 a 20 mg/kg inhibuje antigenem navozenou degranulaci mastocytů a uvolňování histaminu z cílových tkání. Dále autoři uvádí zvýšení koncentrace PGE a potlačení uptake vápníku peritoneálními mastocyty. Snížil se také účinek cAMP fosfodiesterasy a lipoxygenasy v plicích. Mezi jeho vlastnosti patří dlouhá doba působení po *p.o.* podání a podle výsledků by RLX mohl být stejně účinný jako kromoglykan sodný a aminofylin.⁴⁴



Obr. 6 RLX



Obr. 7 Dimethoxy-RLX



Obr. 8 95-4

Převzato z: KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami *in vivo* a *in vitro*. Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 46.

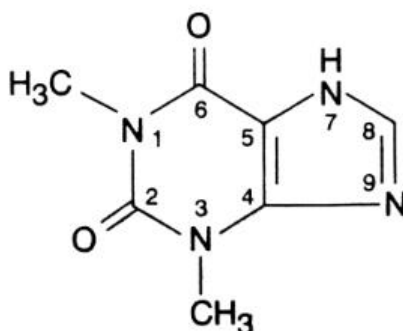
V roce 2002 Jindal et al. syntetizovali tricyklické sloučeniny přemostěné dusíkem. Výchozí látkou pro syntézu testovaných derivátů byl 2,3,4,5-tetrahydroazepino[2,1-b] chinazolin-11(1H)-on (**3**, RLX - uvádí jiné číslování struktury než předchozí autoři). Ve svých úvahách vycházeli také ze struktury papaverinu, který má přímý relaxační účinek na hladkou svalovinu, a zavedli do tricyklické struktury methoxyfunkce do poloh 8 a 9, vzniká tedy sloučenina 2,3,4,5-tetrahydroazepino[2,1-b]-8,9-dimethoxychinazolin-11(1H)-on (**7**; viz. Obr. 7). Syntetizované deriváty **7–22** se hodnotily z hlediska bronchodilatační aktivity *in vitro* použitím izolovaného řetězce trachey morčat kontrahované acetylcholinem (1 mg/ml). Jako standardní drogy posloužily teofylin a aminofylin (30 µg/ml). Nejlepších výsledků dosáhl derivát **7** (20 µg/ml), který byl třikrát silnější než teofylin a aminofylin, navodil vyšší relaxaci než RLX (30 µg/ml). Za zvýšení účinku je pravděpodobně odpovědné zavedení methoxyskupin do poloh 8 a 9.⁴⁵

Syntézou chinazolinových derivátů pro hodnocení bronchodilatačních a protialergických účinků se zabýval také Zabeer et al. v roce 2006. Z testované řady sloučenin měl nejlepší požadované vlastnosti derivát 2,4-diethoxy-6,7,8,9,10,12-hexahydroazepino[2,1-b]chinazolin-12-on, označovaný jako 95-4 (viz Obr. 8). Relaxační účinek se projevil na kontrahované izolované trachei a bronchiálním stromu i na hladké svalovině střeva. Bronchodilatace pravděpodobně není zprostředkována β -adrenergními receptory. Porovnáním kumulativních DRC křivek samostatně podávaného histaminu nebo acetylcholinu s DRC křivkami, kdy byl spolu a histaminem nebo acetylcholinem podáván derivát 95-4, bylo zjištěno, že 95-4 působí na hladkou svalovinu přímo a nespecificky. 95-4 se ukázal být účinnější než teofylin, ale méně

účinný než salbutamol v závislosti na dávce. Testováním derivátu na několika experimentálních modelech bylo zjištěno, že derivát postrádá antialergické účinky.⁴⁶

3.3. Teofylin

Teofylin, kofein a teobromin jsou přirozeně se vyskytující alkaloidy, z chemického a terapeutického hlediska patří mezi methylxantiny. Teofylin se řadí k nejlevnějším lékům užívaných k léčbě astmatu a díky tomu zůstává běžně užívaným lékem v této indikaci v mnoha zemích. V průmyslově vyspělých zemích je nahrazován především inhalačními glukokortikoidy, β_2 -sympatomimetiky, antileukotrieny.



Obr. 9 Struktura teofylinu

Převzato z: <http://www.drugs.com/pro/theophylline.html>.

3.3.1. Chemické vlastnosti

Teofylin (1,3-dimethylxantin; viz. Obr. 9) a xantiny obecně se vyznačují špatnou rozpustností ve vodě. Rozpustnost se obvykle zvyšuje tvorbou solí (cholin teofylinát - oxtrifylin) nebo tvorbou komplexů s různými sloučeninami; nejdůležitější z těchto komplexů je aminofylin (komplex teofylinu s ethylendiaminem). Tyto soli nebo disociované komplexy poskytují mateřské methylxantiny. Ze vztahů struktury a účinku vyplývá, že jsou účinnější deriváty, které jsou substituovány v poloze 1 nebo neobsahují substituenty v poloze 7. Xantiny s většími nepolárními substituenty v polohách 1 a 3 mají obvykle vyšší aktivitu. Zavedení aromatické, cyklohexylové nebo cyklopentylové skupiny do polohy 8 značně zvyšuje afinitu k adenosinovým receptorům, ale snižuje inhibici fosfodiesterasy.⁴⁷

3.3.2. Farmakodynamika

Mechanismus účinku není zcela jasný. Pravděpodobně působí inhibici fosfodiesterasy I – IV.^{48, 49} Enzymy cyklické nukleotid fosfodiesterasy (PDEs) katalyzují rozklad cAMP a cGMP na 5'-AMP a 5'-GMP. Inhibice PDEs pak vede k

hromadění cAMP a cGMP, čímž se zvyšuje transdukce signálu těmito cestami. Teofylin a jiné methylxantiny inhibují podtypy PDE relativně neselektivně.⁴⁷ Další vysvětlení mechanismu účinku spočívá v působení teofylinu a methylxantinů jako kompetitivních antagonistů adenosinu na jeho receptorech (zejména A₁), ale to neplatí pro všechny xantiny (např. enprofylin tento účinek nemá).^{48, 49} Dalším diskutovaným mechanismem je antagonismus receptorů prostaglandinu a účinek na intracelulární koncentrace kalcia. Tyto účinky se však projevují pouze při vysokých dávkách teofylinu.⁵⁰

Účinky na dýchací systém

Teofylin účinně relaxuje hladkou svalovinu dýchacích cest, proto se řadí mezi bronchodilancia a stimuluje dechové centrum. V terapeutických koncentracích se vyznačuje také protizánětlivým účinkem. Aktivace A_{2B} podtypu adenosinových receptorů vyvolává některé prozánětlivé účinky, teofylin a enprofylin jsou silnými kompetitivními antagonisty A_{2B} adenosinových receptorů. Teofylin také inhibuje syntézu a sekreci zánětlivých mediátorů buněk, včetně bazofilů a mastocytů. Tento účinek je pravděpodobně způsoben inhibicí PDE a může být napodobován léky, které selektivně inhibují isoenzym PDE IV. Teofylin tlumí pozdní astmatickou fázi, podle všeho ale neovlivňuje bronchiální hyperreaktivitu.^{47, 49}

Extrapulmonální účinky

K extrapulmonálním účinkům patří mírnější účinky kardiostimulační (má pozitivně chronotropní a pozitivně inotropní efekt), působí vazodilataci většiny cév a dilataci svaloviny trávicího traktu (včetně žlučových cest), působí diureticky a stimuluje CNS. Zlepšuje mukociliární clearance a zvyšuje sekreci HCl v žaludku.^{48, 49}

3.3.3. Farmakokinetika

Teofylin se po *p.o.* podání dobře absorbuje z trávicího traktu; pokud se podává v roztoku nebo neobalených tabletách, absorbuje se rychle a úplně. V nepřítomnosti jídla dosáhnou roztoky nebo neobalené tablety teofylinu maximální plazmatické koncentrace během 2 hodin. Přípravky s postupným uvolňováním teofylinu se podávají

v intervalech 8, 12 nebo 24 hodin. Rychlost a rozsah absorpce těchto lékových forem je individuální a ovlivňuje ji zejména strava a čas podání (jídlo obvykle zpomalí rychlost absorpce teofylinu, ale ne její rozsah; vysokosacharidová a nízkoproteinová strava snižuje vylučování teofylinu, zatímco nízkosacharidová, vysokoproteinová strava a grilované maso vylučování teofylinu zvyšuje). Poloha v leže nebo spánek mohou také redukovat rychlost nebo rozsah absorpce. Tyto faktory ztěžují udržování relativně konstantní hladiny teofylinu v plazmě v průběhu dne.⁴⁷ Terapeutické plazmatické koncentrace jsou 30 - 100 $\mu\text{mol/l}$, nad 110 $\mu\text{mol/l}$ se výrazně zvyšuje výskyt nežádoucích účinků (vzhledem k možnosti intoxikace je nutné monitorovat plazmatické koncentrace).⁴⁹

Teofylin se distribuuje do všech tělesných kompartmentů, prochází placentou a prostupuje do mateřského mléka. V_d se pohybuje mezi 0,40–0,60 l/kg. U nedonošených dětí jsou hodnoty V_d podstatně vyšší. Teofylin se váže na bílkoviny krevní plazmy, průměrně asi z 60 %, ale u novorozenců a dospělých s cirhózou jater je snižená asi na 40 %. Krevním řečištěm se látka dostává do všech částí organismu kromě tukové tkáně.^{47, 50}

Průměrný biologický poločas teofylinu je 8–9 hod, u malých dětí asi 3,50 hodiny.⁴⁷ Teofylin se eliminuje biotransformací v játrech (přibližně z 90 %) a v ledvinách. U dospělých je přibližně 7–13% látky vyloučeno močí v nezměněné podobě. U novorozenců je vyloučeno v nezměněné podobě asi 50 % a značná část ve formě kofeinu. Hlavními metabolity jsou kyselina 1,3-dimethylmočová (přibližně 40 %), 3-methylxantin (přibližně 36%) a kyselina 1-methylmočová (přibližně 17 %). Z těchto metabolitů je farmakologicky aktivní 3-methylxantin, ale méně než teofylin. Jaterní first-pass metabolismus kolísá značně individuálně; clearance, plazmatická koncentrace a eliminační poločas jsou tedy u jednotlivých pacientů velmi rozdílné. Hlavní faktory ovlivňující clearance teofylinu jsou věk, tělesná hmotnost, dieta, kouření (metabolismus teofylinu je u kuřáků mnohem rychlejší), specifická léčba, virová infekce, onemocnění a funkční poruchy srdce, plic nebo jater.^{48, 50}

3.3.4. Interakce

Podávání teofylinu je také ovlivněno přítomností dalších látek nebo onemocnění. Teofylin může zesílit účinky xantinů, kofeinu, β -sympatomimetik, diuretik.

Jeho zrychlené odbourávání nebo snížení biologické dostupnosti může nastat u kuřáků (např. kouření 1–2 krabičky denně zkrátí $T_{1/2}$ teofylinu na 4–5 hodin). Ke snížení hladiny teofylinu také dochází, pokud jsou současně podávány barbituráty (zejm. fenobarbital nebo pentobarbital), karbamazepin, fenytoin, rifampicin, primidon, sulfinpyrazon.^{49, 50}

Zpomalené odbourávání nebo zvýšení plazmatické hladiny teofylinu a tím zvýšené nebezpečí předávkování a vzrůst rizika nežádoucích toxických účinků může nastat při kombinaci teofylinu s následujícími léky: perorální kontraceptiva, makrolidová antibiotika, chinolony, imipenem, isonikotinhydrazid, tiabendazol, blokátory kalciových kanálů (např. verapamil, diltiazem), propranolol, mexiletin, propafenon, tiklopidin, cimetidin, allopurinol, INF α a vakcíny proti chřipce. Podle několika ojedinělých zpráv došlo k předávkování teofylinem při současném užívání ranitidinu. Protože nemůže být možnost interakce s jistotou vyloučena, je třeba obzvláště pečlivě u těchto pacientů stanovit potřebnou individuální dávku teofylinu.⁵⁰ Stav, které prodlužují $T_{1/2}$ teofylinu a tím zvyšují jeho plazmatické koncentrace jsou např. poruchy funkce jater (včetně alkoholiků), poruchy funkce ledvin, městnavá srdeční insuficience nebo CHOPN ($T_{1/2}$ může překročit i 24 hod).⁴⁹

3.3.5. Nežádoucí účinky a kontraindikace

Teofylin má relativně nízký terapeutický index. Mezi nejčastější nežádoucí účinky teofylinu patří bolest hlavy, palpitace, závratě, hypotenze, nauzea, zvracení, bolest na hrudi, průjem, zvýšená diuréza, změny koncentrací elektrolytů v séru (zvláště hypokalémie, zvýšení plazmatické koncentrace kalcia a kreatinu), neklid, třes končetin. U pacientů s individuální přecitlivělostí nebo při předávkování může nastat zesílení nežádoucích účinků (tyto projevy jsou přidružené s plazmatickými koncentracemi vyššími než 20 $\mu\text{g/ml}$). Bez jakýchkoli předchozích známek toxicity se můžou také vyskytovat fokální a generalizované záchvaty, náhlý pokles krevního tlaku, ventrikulární arytmie a závažné GIT obtíže.^{47, 50} Nežádoucí projevy se vyskytují zvláště po rychlé *i.v.* aplikaci, která může mít za následek až smrtící intoxikaci teofylinem. Pro minimalizaci toxických symptomů při *i.v.* podání se teofylin aplikuje pomalu (20–40 min).⁴⁷

Teofylin je kontraindikován u pacientů po právě prodělaném infarktu myokardu,

u pacientů s akutní tachyarytmií nebo při známé přecitlivělosti na teofylin. Relativní kontraindikace se vyskytuje u následujících stavů: nestabilní angina pectoris; sklon k tachyarytmiím; závažná hypertenze; hypertrofická obstrukční kardiomyopatie; hypertyreóza; anamnéza epileptických záchvatů; gastrický nebo duodenální vřed; porfyrie; porucha funkce jater nebo ledvin. Vzhledem k nedostatku údajů by se neměl teofylin podávat ženám v 1. trimestru těhotenství, v průběhu 2. a 3. trimestru jej lze podávat, pokud jeho přínos výrazně převyší možné riziko pro plod. Kojícím matkám je doporučeno podávat nejnižší možnou účinnou dávku teofylinu (pokud možno ihned po kojení); v případě potřeby užívání vyšších terapeutických dávek musí matka ukončit kojení.⁵⁰

3.3.6. Dávkování

Teofylin se dnes užívá převážně v retardovaných formách. Dávkování je vždy individuální, v závislosti na jeho účinnosti a tolerance u daného pacienta. V ideálním případě by mělo být dávkování stanoveno dle plazmatické koncentrace teofylinu (léčebný rozsah 8 - 20 µg/ml). Denní udržovací dávka teofylinu u dospělých je přibližně 11 - 13 mg/kg. Jednotlivé denní dávky by se měly užívat v pravidelných intervalech. Dávkování upravuje lékař v závislosti na stavu pacienta (viz kapitola Interakce).⁵⁰

3.4. Etické zásady práce se zvířaty

Rozvoj lékařské vědy je úzce svázán s užitím zvířat v experimentu. S rostoucím počtem experimentů a chovů pro tyto účely bylo potřeba omezit nebo odstranit nehumánní aspekty práce se zvířaty. V roce 1959 byla definována biologem W. Russellem a R. Burchem, v knize „*Principy humánních experimentálních technik*“ („*Principles of Humane Experimental Technique*“), koncepce tří „R“. Tři „R“ jsou počáteční písmena anglických slov: Reduction, Refinement, Replacement.⁵¹

Reduction (redukce, snížení)

Jakýkoli postup, který vede k dosažení stejného množství informací za použití nižšího počtu zvířat nebo k maximalizaci získaných informací z jednoho zvířete. Jedná se především o výběr vhodné metody a uspořádání experimentu, volba vhodného zvířecího modelu, kontrola faktorů životního prostředí užitelských zařízení a chovů, kvalita použitých zvířat, jejich zdravotní stav.

Refinement (zmírnění, zjemnění)

Vyjadřuje minimalizaci bolesti a utrpení, které zvíře prožívá a pozvednutí kvality jeho života. Vychází z biologických potřeb zvířete a jim odpovídající technologie chovu a podmínek životního prostředí tak, aby mohly být splněny veškeré požadavky příslušného druhu a udržena homeostáza organismu. Důležité je zacházení se zvířetem (klidná a jistá manipulace), volba anestezie k vyloučení bolesti či stresu, pooperační péče.

Replacement (náhrada)

V možných případech lze zvířata nahradit alternativními technikami - experimenty *in vitro*, videozáznamy, filmy, matematickými modely, atd., přičemž je dosažený výsledek na stejné nebo vyšší kvalitativní úrovni ve srovnání s pokusem na zvířeti.^{51, 52}

Tato přesná a srozumitelná formulace zásad pro užití zvířat v experimentu byla velkým přínosem k tvorbě legislativy v celé řadě zemí, včetně České republiky. Podmínky použití zvířat k pokusným účelům v ČR upravuje zákon ČNR 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, v platném znění a vyhláška ministerstva zemědělství č. 311/1997 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat.⁵¹

3.5. Laboratorní potkan

Na začátku druhé poloviny 19. století se již přímo hovoří o pokusech na zvířeti. První záznam o experimentálním využití potkanů pochází z roku 1856, kdy Waller a Philipeaux sledovali vliv adrenalectomie (do té doby byla k pokusům využívána především ochočená hospodářská zvířata). Zavedení potkanů a myší do laboratoří mělo mnoho výhod. Potkani se velmi dobře adaptovali v zajetí, rychle se množí a mají malé nároky na prostor, ustájení i potravu. Laboratorní potkan se stal základním živočichem biomedicínského výzkumu. Dnes jsou nejznámější tři kmeny potkanů: kmen Wistar albino (viz Obr. 10); kmen Sprague-Dawley; kmen Long-Evans. Odlišné kmeny a rody vykazují variabilitu v mnoha biologických parametrech včetně hematologických, biochemických i odpovědí k anestetikům. Tyto odlišnosti jsou také sledovány v kmenech a rodech od různých dodavatelů.⁵³



Obr. 10 Potkan kmene Wistar.

Převzato z: www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/old_research_models/outbred_rats.

3.5.1. Taxonomie

Říše	<i>Animalia</i>
Kmen	<i>Chordata</i>
Třída	<i>Mammalia</i>
Podtřída	<i>Rodentia</i>
Řád	<i>Myomorpha</i>
Rodina	<i>Muridae</i>
Rod	<i>Rattus</i>
Druh	<i>RattusNorvegicus</i> ⁵³

3.5.2. Zevní popis

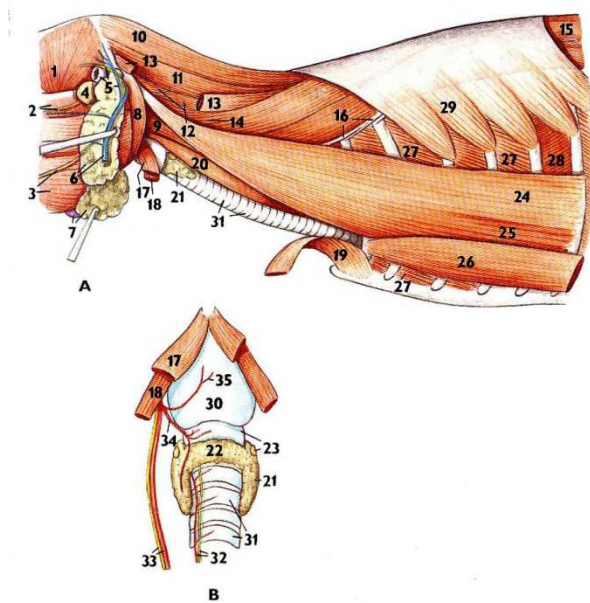
Laboratorní potkan má protáhlé tělo o velikosti do 30 cm, relativně malou rostrálně zašpičatělou hlavu a dlouhý ocas (přibližně 85 % délky těla). Průměrná hmotnost se pohybuje v rozmezí 250–600 g, u domestikovaných forem i více. U potkanů je výrazný pohlavní dimorfismus (samci bývají robustnější a těžší než samice, mají širší hlavu).^{54, 55} Tělo je při pohybu protáhlé, v klidové poloze shrbené. Je pokryté delší tuhou srstí (kromě čenichu, ocasu a nášlapných polštářů končetin). Kolem úst, na bradě a nad víčky jsou výrazné hmatové chlupy. V obličejové části hlavy vynikají růžové oči, jejichž víčka jsou dobře vyvinuta. Ve vnitřním koutku oka je uložena poloměsíčitá chrupavčitá mžurka. Nozdry jsou šterbinovité, otevřené do stran. Pod vodou se mohou uzavřít. Ušní boltce jsou tenké až průsvitné. Končetiny rozlišujeme hrudní a pánevní, obojí mají po pěti prstech. Hrudní končetiny jsou kratší a slabší než pánevní, slouží k hrabání, fixaci potravy a otírání chlupů na těle. Pánevní končetiny jsou podstatně delší než hrudní a uplatňují se zejména při pohybu.^{55, 56}

3.5.3. Dýchací systém

Dutina nosní (*cavum nasi*) je ohraničena obličejovými kostmi. Začíná naspodu zevního nosu nosními dírkami a ústí nozdrami do nosohltanu. Vlastní dutina nosní je tvořena kostěnými stěnami. Svislá přepážka je vpředu chrupavčitá, vzadu ji ohraničuje svislá ploténka kosti čichové a kost radličná. Z horní čelisti a čichové kosti odstupují dvě skořepky nosní. Ve dně nosní dutiny je po obou stranách chrupavky nosní přepážky funkční Jacobsonův orgán (*organum vomeronasale*).^{55, 56}

Hrtan (*larynx*) se skládá ze štítné chrupavky (*cartilago thyreoidea*), prstencové (*cartilago cricoidea*) a z chrupavek hlasivkových (*cartilago arytenoidea*), od kterých se táhnou směrem ke štítné chrupavce hlasové vazy. Hrtan odděluje od vchodu do jícnu chrupavčitá příklopka (*epiglottis*).⁵⁶

Průdušnice (*trachea*) je složena ze 24–30 dorsoventrálně oploštělých, ne zcela uzavřených prstenčitých chrupavek, které jsou navzájem spojeny vazivem a u dospělých jedinců mohou vápenatět. Dorsálně jsou chrupavky spojeny hladkým svalem (*m. trachealis*), který se na ně upíná zvenčí (viz Obr. 11). Průsvit průdušnice se postupně zmenšuje. Intrapulmonálně nemají bronchy chrupavčitou výstuž.^{55, 56}



Obr. 11 Uložení trachey

Převzato z: Popesko, Rajtová, Horák: Atlas anatómie malých laboratorných zvierat, Diel 2. Potkan, myš, chrček zlatý, Príroda Bratislava, 1990: 252.

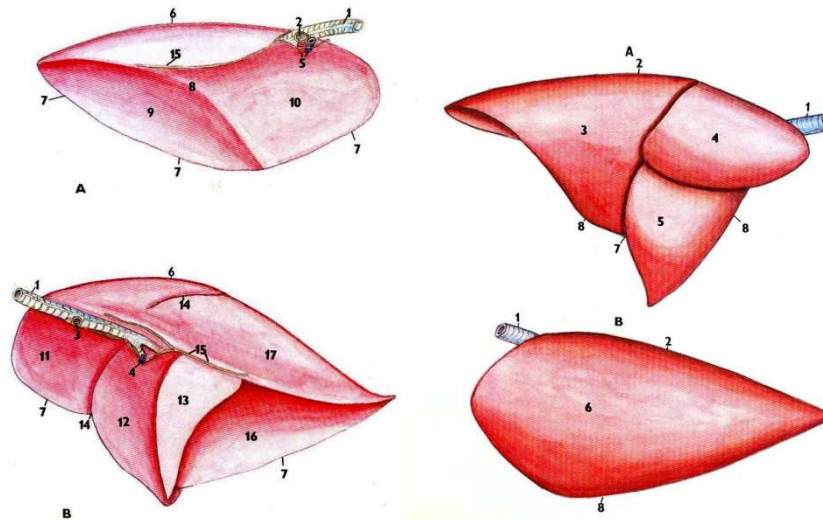
20 esophagus (hltan); 21, 22 glandula thyroidea (štítná žláza); 23 glandula parathyroidea, cartilago cricoidea (přístítná žláza, prstencová chrupavka); 30 cartilago thyroidea (štítná chrupavka); 31 trachea (průdušnice); 33 a. carotis communis, truncus vagosympathicus (společná krkavice, kmen

bloudivého a sympatického nervu); 34 a. thyroidea cranialis (kraniální štítná tepna).

Plíce (viz Obr. 12 a 13) se skládají z pravé (*pulmo dexter*) a levé plíce (*pulmo sinister*). Levá plíce je nečleněná a celkově menší.⁵⁵ Pravá plíce je tvořena čtyřmi laloky: kraniálním, středním, přídatným a kaudálním (*lobus superior, medius, accessorius et inferior*). Plicní cévy mají ve své stěně příčně pruhovaná svalová vlákna, která kontinuálně přecházejí do srdce. Plíce jsou při porodu nezralé a teprve po narození dochází k rozvoji alveolů, alveolárních duktulů a respiračních bronchiolů. Dokud nedojde k přestavbě plicní tkáně, probíhá výměna vzduchu přes stěny kanálků a sakulů, což trvá do 4. až 7. dne po narození. Respirační bronchioly jsou přítomny za 10 dní po narození.

Řízení aktivity dýchacího ústrojí je zajištěno pomocí tkáňové výměny CO₂ v dýchacím centru v *medulla oblongata* a s účastí karotických tělísek. Karotická tělíska reagují na nízkou tenzi O₂ v krvi.

Potkani mají v plicích bohatou inervaci, vysokou aktivitu serotoninu a naopak nízkou aktivitu histaminu. Plicní cévy se zužují při odpovědi na acetylcholin. Bronchiální konstriktce je zajištěna vagovou inervací, není doplňována inervací adrenergní.⁵³



Obr. 12 Levá (A) a pravá (B) plíce: 1 trachea (průdušnice);

2 bronchus principalis dexter (pravá hlavní průduška);

3 br. principalis sinister (levá hlavní průduška); 4 v. pulmonalis (pravá plicní žíla); 5 a. et v. pulmonalis sinistra (levá plicní

6 margo dorsalis (dorzální okraj); 7 margo ventralis

okraj); 8 margo basalis (bazální okraj); 11 lobus cranialis

pulmonis dextri (kraniální lalok); 12 lobus medius pulmonis dextri

(střední lalok); 13 lobus accessorius pulmonis dextri (přídavný lalok); 16, 17 lobus caudalis pulmonis dextri (kaudální lalok)

Převzato z: Popesko, Rajtová, Horák: Atlas anatómie malých laboratorných zvierat, Diel 2. Potkan, myš, chrček zlatý, Príroda Bratislava, 1990; 264–5.

Obr. 13 Pravá (A) a levá (B) plíce: 1 trachea

(průdušnice); 2 margo dorsalis (dorzální okraj);

3 lobus caudalis pulmonis dextri; dextra

4 lobus cranialis pulmonis dextri; tepna a žíla);

5 lobus medialis pulmonis dextri;(ventrální

6 pulmo sinister (levá plíce);

7 incisura interlobalis (mezilalokový zářez);

8 margo ventralis (ventrální okraj)

4. CÍL PRÁCE

Hlavní cíle této rigorózní práce jsou shrnuty do několika následujících bodů:

- Hodnocení relaxační aktivity přírodních složek izolovaných z *Justicia adhatoda* (vasicin, vasicinon, ethanolový extrakt z *Justicia adhatoda*) na hladkou svalovinu izolované průdušnice potkana; stanovení ED₅₀.
Porovnání účinnosti in vitro testovaných látek se standardním léčivem teofylinem.
- Porovnání účinnosti chinazolinových alkaloidů vasicinu a vasicinonu.
- Určení nejúčinnější testované látky.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Materiál a metodika

5.1.1. Chemikálie

Chlorid sodný (NaCl), M_w 58,44; fa Penta Chrudim

Chlorid draselný ČsL 3 (KCl), M_w 74,56; fa Penta Chrudim

Síran hořečnatý heptahydrát ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), M_w 246,47; fa Lachema Brno

D-glukosa monohydrát p.a. ($C_{16}H_{12}O_6 \cdot H_2O$), M_w 198,17; fa Penta Chrudim

Chlorid vápenatý bezvodý práškový p.a. ($CaCl_2$), M_w 110,99; fa Lachema Brno

Hydrogenuhlíčan sodný ($NaHCO_3$), M_w 84,01; fa Penta Chrudim

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. (KH_2PO_4), M_w 136,09; fa Kulich Hradec Králové

Carbamoylcholin chloride 99% ($C_6H_{15}ClN_2O_2$), M_w 182,65; Sigma-Aldrich chemie
Germany

Theophylline anhydrous 99% ($C_7H_8N_4O_2$), M_w 180,17; Sigma-Aldrich chemie Germany

Destilovaná voda (H_2O), dostupná na katedře

5.1.2. Pomůcky a přístroje

Laboratorní váhy Kern, pomůcky k navažování

Laboratorní sklo

Operační stolek

Operační nástroje (nůžky, peán, pinzety, jehly ...)

Ligatury

Termostat

Plynová bomba s pneumoxidem (95 % O_2 , 5 % CO_2)

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

Vyhodnocovací systém (S.P.E.L. Advanced Kymograph Software, Experimetria Ltd.,
Budapešť, Maďarsko

5.1.3. Pokusná zvířata

K provedení experimentu byli vybráni samci laboratorního potkana kmene Wistar o hmotnosti 250–300 g (dodavatel BioTest s.r.o. Konárovice). Zvířata byla náhodně rozdělena do skupin a umístěna ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, kde byla chována dle standardních laboratorních podmínek - teplota ve viváriu 21°C, krmeni standardní peletovanou výživou, přístup k vodě *ad libitum*. Potkani byli ve viváriu aklimatizováni alespoň 10 dní před provedením experimentu. Před vlastním experimentem byla zvířata ponechána 24 hodin nalačno.

Pokusy byly provedeny v souladu se Z. č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.1.4. Testované látky

Standardizovaný ethanolický extrakt z JA, vasicin a vasicinon byly poskytnuty Katedrou farmaceutické botaniky a ekologie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Teofylin byl získán z komerčních zdrojů –firma Sigma-Aldrich chemie Germany .

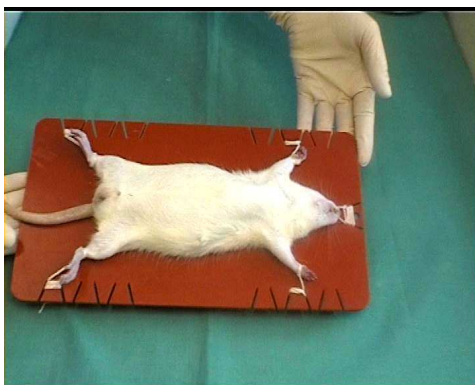
Všechny testované látky byly použity v koncentracích: 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; $2,5 \times 10^{-4}$; 5×10^{-4} ; $7,5 \times 10^{-4}$; 10^{-3} M.

Teofylin byl použit jako standard u kontrolní skupiny zvířat (ve stejných koncentracích jako přírodní látky) a zároveň u každé testované látky k navození maximální relaxace trachey v koncentraci 3×10^{-3} M.

5.1.5. Metodika izolované průdušnice in vitro

V den pokusu jsme vždy připravili 1 litr Krebs-Henseleitova živného roztoku (pH 7,8), který jsme použili pro čtyři vzorky izolované průdušnice potkana. Složení v (g/l): NaCl 6,8; KCl 0,35; NaHCO₃ 2,1; KH₂PO₄ 0,14; MgSO₄·7H₂O 0,29; glukosa 2,0; CaCl₂ bezvodý 0,28. Roztok jsme připravili rozpuštěním jednotlivých látek v destilované vodě a tyto roztoky následně smíchali. Roztok chloridu vápenatého jsme přidávali naposledy z toho důvodu, abychom zabránili vysrážení vápenatých solí, které jsou jen slabě rozpustné.

Laboratorního potkana kmene Wistar jsme usmrtili cervikální dislokací (chtěli jsme zabránit vlivu farmak na tracheu) a podstříhli jsme krční tepnu (*a. carotis*). Po vykrvení zvířete jsme ho přenesli na operační stůl a fixovali ho v poloze na zádech (viz Obr. 14). V oblasti střední části krku jsme odstříhali kožní řasu. Tupou preparací jsme odsunuli kůži, dále jsme tupě odpreparovali krční svaly, dokud se v operačním poli neobjevila trachea (viz Obr. 15). Tracheu jsme oddělili v oblasti bifurkace bronchiálního stromu na jedné straně a na straně druhé v oblasti štítné chrupavky. Vyoperovaný segment trachey jsme přenesli do Petriho misky s Krebs-Henseleitovým roztokem.



Obr. 14 Fixace potkana



Obr. 15 Odkrytí trachey

Převzato z: ŽIVNÁ H.: Základy práce s potkanem v laboratoři. CD-ROM.

Z trachey jsme odstranili přebytečnou tkáň. Středem podkovovitých chrupavek jsme ji vertikálně rozstříhli, aniž bychom poškodili hladkou svalovinu, kterou jsme tímto stříhem získali uprostřed preparátu. Takto upravenou tracheu jsme rozstříhli na čtyři přibližně stejné části. Do dvou protilehlých rohů každého preparátu jsme opatrně připevnili ligatury a přenesli jsme ho do Schulerovy nádoby na izolovaný orgán.

Nádobka byla naplněna Krebs-Henseleitovým živným roztokem (5 ml) vyhřívaným na 37°C a okysličován pneumoxidem.

Trachea byla v nádobce fixována ligaturou jedním koncem k fritě zásobující živný roztok pneumoxidem a druhým koncem k izotonickému transduceru spojenému s registračním zařízením. Výstupní zařízení aparatury (Multi chamber systém) tvořil počítač se speciálním softwarem (S.P.E.L. Advanced Kymograph Software), který provedl grafické vyhodnocení celého průběhu experimentu (viz Obr. 16).

Po umístění preparátu do Schulerovy nádobky jsme provedli zatížení pomocí 2,5 gramů. Preparát jsme nechali 30 minut stabilizovat, přičemž jsme každých 10 minut prováděli výměnu živného roztoku. Po uplynutí intervalu jsme zatížení snížili na 1 g a vyčkali, dokud se křivka na záznamu nestabilizovala. Následovalo vlastní testování.



Obr. 16 Celkový pohled na aparaturu na izolovaný orgán, vyhodnocovací zařízení

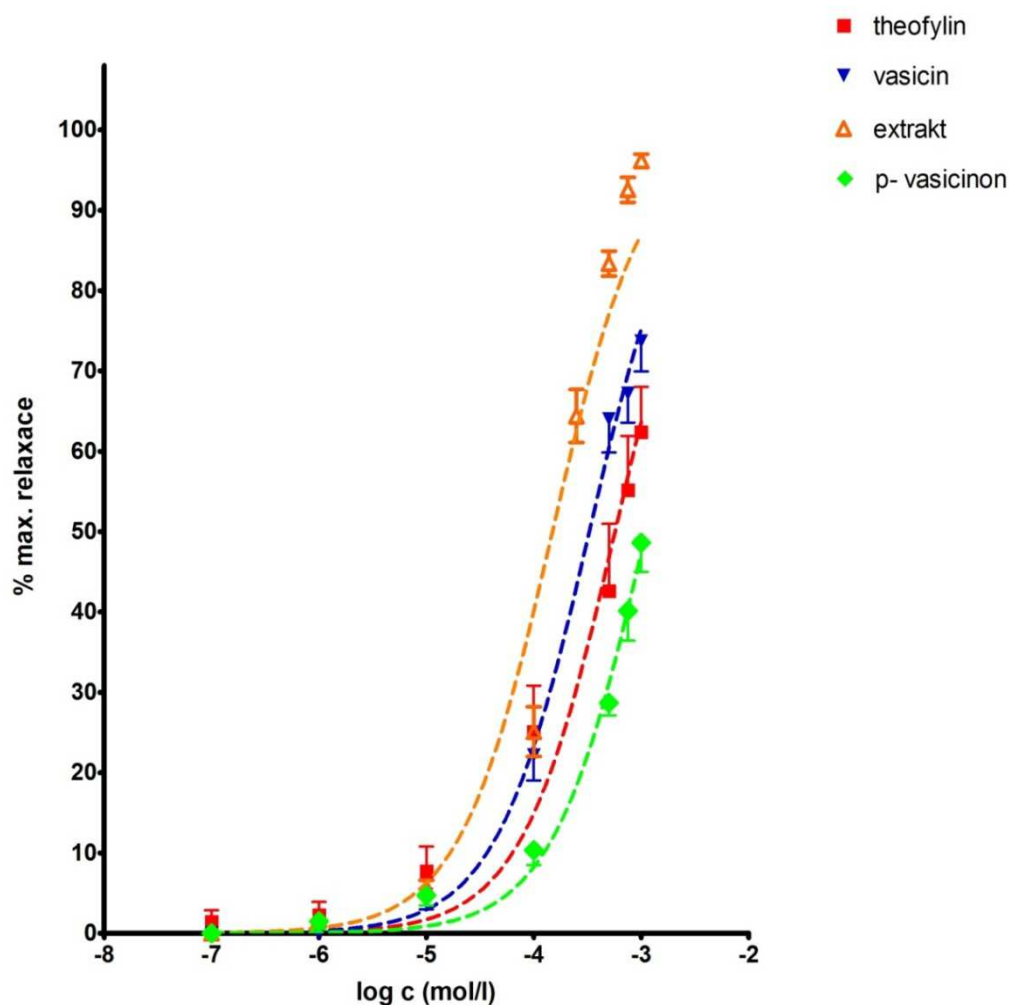
Vlastnosti trachey jsou individuální, proto jsme se snažili provádět experiment za standardních podmínek. Nejprve jsme do živného roztoku s izolovanou průdušnicí potkana aplikovali karbachol o koncentraci 10^{-5} M, po které následovala kontrakce hladké svaloviny trachey. Po ustálení odpovědi na aplikaci první dávky karbacholu jsme provedli výplach a aplikovali druhou dávku karbacholu (10^{-5} M). Odpověď na druhou dávku karbacholu byla výraznější a díky ní jsme dosáhli maximální kontrakce trachey potkana. Poté jsme přidávali kumulativní dávky roztoku testované látky ve vzrůstající koncentraci (vasicin, vasicinon, extrakt z JA jsme podávali v koncentracích: 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; $2,5 \times 10^{-4}$; 5×10^{-4} ; $7,5 \times 10^{-4}$; 10^{-3} M). Další dávku testované látky jsme podávali až po ustálení odpovědi hladkého svalstva trachey na dávku předchozí. Ke zhodnocení maximální relaxace daného preparátu jsme nakonec aplikovali teofylin o koncentraci

3×10^{-3} M. Každou naměřenou hodnotu relaxace testovaných látek jsme porovnávali s touto maximální relaxací navozenou teofylinem a vyjádřili procentuálně. Kontrolní skupinu tvořily preparáty trachey, ke kterým byla aplikována standardní látka – teofylin.

6. VÝSLEDKY

Relaxační účinek každé koncentrace jednotlivých testovaných látek byl vyjádřen jako procentuální změna vzhledem k maximální relaxaci získané podáním teofylinu (3×10^{-3} M). Získané hodnoty byly zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 5, kdy jsme získali graf vyjadřující vztah mezi dávkou a účinkem testovaných látek. Na ose X byly zaznamenány koncentrace testované látky (mol/l) a na ose Y relaxace tkáně (vyjádřená v %). Pro každou testovanou látku byla získána DRC křivka metodou nelineární regrese a hodnota $EC_{50} \pm SEM$ (mol/l). Tyto výsledky byly analyzovány pomocí one-way ANOVA testu. Rozdíly byly považovány za signifikantní, pokud $P \leq 0,05$.

Tímto způsobem jsme nejprve stanovili hodnotu EC_{50} pro zvolenou standardní látku, tedy teofylin, a následně EC_{50} pro všechny testované látky. Porovnání účinnosti testovaných látek izolovaných z JA a teofylinu vyjadřuje graf (viz Obr. 18 a 19) a z něj odečtené hodnoty $EC_{50} \pm SEM$ (mol/l) uvedené v Tab. 12.

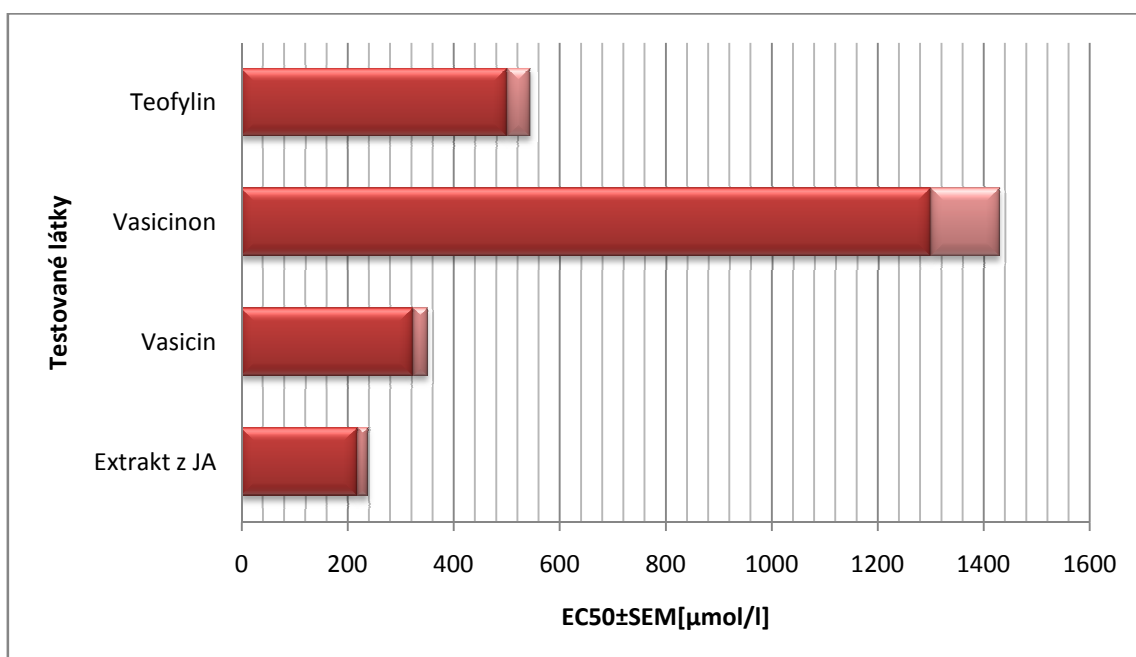


Obr. 17 DRC vyjadřující relaxační účinek testovaných látek na izolovanou tracheu potkana. Trachea byla prekontrahována karcholem (10^{-5} M), maximální relaxace byla navozena podáním teofylinu (3×10^{-3} M).

Testovaná látka	n	EC ₅₀ ±SEM [μmol/l]	Statisticky významný rozdíl EC ₅₀ oproti teofylinu
Ethanolový extrakt z JA	4	218,3± 20,0	ano
Vasicin	6	322,8± 28,0	ano
Vasicinon	3	1300,2± 129,6	ano
Teofylin	8	500,0 ± 43,5	-

Tab. 12 Hodnoty EC₅₀ pro testované látky. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu. Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže P<0,05.

Ze získaných výsledků vyplývá, že testované chinazolinové alkaloidy (vasicin, vasicinon) a standardizovaný ethanolický extrakt z drogy JA, vykazují relaxační aktivitu na izolovanou tracheu potkana kontrahovanou karbacholem. Standardizovaný ethanolický extrakt JA a vasicin mají vyšší bronchodilatační aktivitu než standardní látka teofylin, aktivita vasicinonu je nižší než aktivita použitého standardu. Nejvyšší účinek jsme zaznamenali u ethanolického extraktu JA.



Obr. 18 Hodnoty EC₅₀ pro testované látky v zobrazení sloupcovými grafy. Statistická analýza byla provedena pomocí One-way ANOVA testu. Relaxační účinek je považován za signifikantní, jestliže P<0,05.

7. DISKUZE

Justicia adhatoda (Acanthaceae) se v indickém tradičním léčitelství užívá po tisíce let v různých hořce chutnajících lékových formách, a to zejména k léčbě onemocnění dýchacích cest.^{8,9} Za účinek jsou pravděpodobně odpovědny chinazolinové alkaloidy vasicin a vasicinon obsaženy v různé míře ve všech částech rostliny, přičemž nejvyšší obsah těchto alkaloidů je v listech (45–95% podílu tvoří vasicin).¹⁵

Podle dříve provedených studií se vasicin vyznačuje bronchodilatačním účinkem *in vivo* a *in vitro*; vasicinon má podle většiny zdrojů také účinek bronchodilatační *in vitro*, ale i bronchokonstrikční *in vivo* (Gupta et al., 1977; Cambridge et al., 1962; Lahiri a Pradhan, 1964). Pouze Amin et al. (1959) popsali bronchokonstrikční účinek vasicinu a bronchodilatační aktivitu vasicinonu.^{12,30} Naším hlavním cílem bylo ověřit, do jaké míry mají námi testované látky přírodního charakteru (vasicin, vasicinon, ethanolický extrakt z JA) schopnost relaxovat hladkou svalovinu průdušnice potkana. Metodikou *in vitro* na izolované průdušnici potkana se schématem pokusu: navození kontrakce podáním karbacholu (10^{-5} M) – kumulativní podání jednotlivých dávek testované látky – maximální relaxace navozená teofylinem (3×10^{-3} M), jsme prokázali relaxační aktivitu všech testovaných přírodních látek.

Dále je podle literatury (Padmawar; Gupta, 1977) bronchodilatační účinek vasicinu srovnatelný s teofylinem. Podle našich výsledků je relaxační aktivita vasicinu a ethanolického extraktu z JA dokonce vyšší oproti zvolenému standardu teofylinu.

Vasicinon vykazoval nižší aktivitu než standard a zároveň má tedy nižší aktivitu než vasicin. Nejvyšší účinek ze všech testovaných látek (včetně teofylinu) vykazoval standardizovaný ethanolický extrakt z JA. Jeho aktivita je vyšší než součet účinků jednotlivých alkaloidů. Tuto skutečnost lze vysvětlit přítomností dalších obsahových látek v extraktu. Ačkoli mají minoritní podíl, působí často synergicky a mohou potencovat vasicin v jeho aktivitě, případně mohou sloužit jako substrát pro metabolizující enzymy a poskytují tak vasicinu ochranu proti metabolickému rozkladu. Jeho aktivita se pak zvyšuje.

Doposud bylo syntetizováno mnoho derivátů chinazolinových alkaloidů a mnohé studie potvrdily široké spektrum farmakologických účinků, které se dokonce mnohdy vyrovnaly použitým standardům, ale doposud nejsou dostačující informace o

jeho přesném mechanismu účinku. (Příklady aktivit vasicinu - shrnutí z předchozího textu: bronchodilatační (srovnatelná s teofylinem), hypotenzivní, kardiodepresorická, antitusická (srovnatelná s kodeinem), antioxidační, hepatoprotektivní, anticestodální (srovnatelná s praziquantelem), protizánětlivá (srovnatelná s hydrokortizonem), antibakteriální, hypoglykemická, uterotonická (srovnatelná s oxytocinem a metherginem)). Podle provedených studií se vasicin, případně jeho deriváty, jeví jako bezpečné pro použití v terapii. Velmi citlivou a diskutovanou otázkou ovšem zůstává abortivní účinek vasicinu. I přes provedené studie není výsledek jednoznačný. Abortivní aktivita byla často pozorována v *in vitro* experimentech po intraamniotickém podání, po jiných cestách aplikace se účinek tento neprojevil. Je tedy pravděpodobné, že se abortivní účinek projeví pouze v relativně vysokých koncentracích. Obecně se ale doporučuje přípravky s obsahem JA nepoužívat v těhotenství.

Pro další využití JA je nezbytné prozkoumat mechanismus účinku aktivních složek (např. zda působí na hladkou svalovinu průdušnice přes β -receptory, či zda se na účinku podílí antagonismus vůči muskarinovým receptorům). Bronchodilatačně působící vasicin se stává výchozí strukturou pro syntézu nových účinnějších derivátů chinazolinových alkaloidů.

8. ZÁVĚR

Při testování chinazolinových alkaloidů (vasicin a vasicinon) a standardizovaného ethanolického extraktu z JA jsme dospěli k těmto závěrům:

- Všechny testované přírodní látky získané z JA vykazaly relaxační účinek na hladkou svalovinu izolované trachey potkana.
- U extraktu z JA a vasicinu byl prokázán vyšší relaxační účinek než u teofylinu.
- Vasicinon je méně účinný než vasicin.
- Extrakt z JA vykazoval vyšší relaxační aktivitu než součet účinků jednotlivých alkaloidů.

9. Seznam použité literatury

¹ CHAKRABORTY, BRANTNER: Study of alkaloids from *Adhatoda vasica* Nees on their antiinflammatory activity.

Dostupné z: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536385?ordinalpos=16&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum (březen 2008).

² AHMAD et al.: A phyto-pharmacological overview on *Adhatoda zeylanica* Medic. syn. *A. vasica* (Linn.) Nees.

Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/6358> (prosinec 2009).

³ CLEASON, MALMFORS, WIKMAN, BRUHN: *Adhatoda vasica*: a critical review of ethnopharmacological and toxicological data, *Journal of Ethnopharmacology* 2000, 72: 1–20.

⁴ *Justicia adhatoda*.

Dostupné z: [www.biblioteka.cz/\(S\(hkz2b03ovperiynymzlmwrmg\)\)/Pages/Systematika/DruhyDetail.aspx?ID_TabDruhyF=89282&AspxAutoDetectCookieSupport=1](http://www.biblioteka.cz/(S(hkz2b03ovperiynymzlmwrmg))/Pages/Systematika/DruhyDetail.aspx?ID_TabDruhyF=89282&AspxAutoDetectCookieSupport=1) (leden 2010).

⁵ Profil taxonu.

Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id192878/> (březen 2010).

⁶ *Justicia adhatoda* (*Adhatoda*).

Dostupné z: http://zipcodezoo.com/Plants/J/Justicia_adhatoda/ (listopad 2009).

⁷ *Adhatoda zeylanica*.

Dostupné z: <http://www.herbalnet.org/leaf/adhatoda%20zeylanica.htm> (prosinec 2009).

⁸ DYSART J.: *Vasaka*.

Dostupné z: <http://mason.gmu.edu/~jdysart/projects/plant/plant.htm> (prosinec 2009).

⁹ *Adhatoda Vasica* (Malabar Nut) - Health Benefits and Side Effects

Dostupné z: <http://www.herbal-supplement-resource.com/adhatoda-vasica.html> (prosinec 2009).

¹⁰ *Adhatoda vasica*.

Dostupné z: http://www.divineremedies.com/adhatoda_vasica.htm (duben 2009).

¹¹ *Adhatoda zeylanica* – hedge plant, an ornamental and herb (Internet)

Dostupné z: <http://www.hinduonnet.com/mag/2002/02/10/stories/2002021000290700.htm> (prosinec 2009).

¹² PADMAWAR A.: *Adhatoda vasica* Nees.

Dostupné z: <http://www.amrutaherbals.com/specifications/Vasaka/specification.htm> (březen 2009).

¹³ SVRŠEK J.: Stručná historie bylinářské medicíny.

Dostupné z: <http://natura.baf.cz/natura/2005/2/20050201.html> (březen 2010).

¹⁴ *Adhatoda vasica*.

Dostupné z: www.indusextracts.com/adhatoda-vasica.html (leden 2010).

¹⁵ Information about the herb *Adhatoda vasica*.

Dostupné z: http://www.globalherbalsupplies.com/herb_information/adhatoda_vasica.htm (duben 2009).

-
- ¹⁶ Antibiotika a léčivé rostliny. *Medicína* 1999, 10; 20
Dostupné z: http://www.zdrava-rodina.cz/med/med1099/med1099_35.html (březen 2010).
- ¹⁷ Adhatoda vasica.
Dostupné z: <http://databaze.dendrologie.cz/> (leden 2010).
- ¹⁸ VERMA O.P., SINGH N., SHARMA P.: First report of *Rhizoctonia solani* causing leaf spot of *Adhatoda vasica*.
Dostupné z: <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/ndr.php?id=014039> (duben 2009).
- ¹⁹ SHIVANNA K. R.: Pollination biology, breeding system and reproductive success of *Adhatoda vasica*, an important medicinal plant. *Current science* 2009, 3; 408 - 412.
Dostupné z: www.ias.ac.in-curr-sci-feb102009-408.pdf (prosinec 2009).
- ²⁰ How to Identify and Care for an *Adhatoda Justicia*.
Dostupné z: http://www.ehow.com/how_4557042_identify-care-adhatoda-justicia.html (prosinec 2009).
- ²¹ DAS CH., POI R., CHOWDHURY A.: HPTLC determination of vasicine and vasicinone in *Adhatoda vasica*, *Phytochemical analysis* 2005, 16: 90–92.
- ²² HORÁČKOVÁ K.: *Adhatoda vasica*.
Dostupné z: <http://www.avicenna.cz/admin/plugins/print/print.php?itemid=1037&template=print2> (září 2006).
- ²³ *Adhatoda vasica* leaf extract.
Dostupné z: <http://www.sbepl.com/adhatoda-vasica.html> (duben 2009).
- ²⁴ NARIMANIAN M., BADALYAN M., PANOSYAN V., GABRIELIAN E., PANOSSIAN A., WIKMAN G., WAGNER H.: Randomized trial of a fixed combination (KanJang) of herbal extracts containing *Adhatoda vasica*, *Echinacea purpurea* and *Eleutherococcus senticosus* in patients with upper respiratory tract infections.
Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16121513?ordinalpos=10&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum (březen 2009).
- ²⁵ *Adhatoda vasica*.
Dostupné z: <http://www.fytokomplexy.cz/herbar/0/Adhatoda-vasica.html> (březen 2009).
- ²⁶ Sirup proti kašli GCM-N.
Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/diagnoza/kasel/sirup-proti-kasli-gcm-n/> (květen 2012).
- ²⁷ Ayur Elixir 13 Kanakasawaya.
Dostupné z: <http://www.spektrumzdravi.cz/diagnoza/kasel/ayur-elixir-13-kanakasawaya/> (květen 2012).
- ²⁸ Broncho protektor – elixír pro koně.
Dostupné z: <http://www.zorrodominik.wbs.cz/PRODEJ---vetpripravky-a-krmidoplnky.html> (listopad 2010).
- ²⁹ PATOČKA J.: Vasicin, alkaloid *Adhatoda vasica*.
Dostupné z: <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=369> (listopad 2010).
- ³⁰ RACHANA, SUJATA B., MAMTA P., PRIYANKA K.M., SONAM S.: Review & Future Perspectives of Using Vasicine, and Related Compounds. *Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, 1:85–98.

³¹ SRIVASTAVA S., VERMA R.K., GUPTA M.M., SINGH S.C., KUMAR S.: HPLC determination of vasicine and vasicinone in *Adhatoda vasica* with photo diode array detection. *J.LIQ.CHROM.&REL. TECHNOL.* 2001, 24(2); 153-159.

Dostupné z: <http://kr.cimap.res.in/handle/123456789/60> (listopad 2010).

³² Malabar Nut.

Dostupné z: http://www.rxlist.com/malabar_nut/supplements.htm (prosinec 2009).

³³ DASH R.P., CHAUHAN B.F., ANANDJIWALA S., NIVSARKAR M.: Comparative pharmacokinetics profile of Vasa Swaras with vasicine and vasicinone, *Chromatographia* 2010, 71: 609–615.

³⁴ DHULEY J.N.: Antitussive effect of *Adhatoda vasica* extract on mechanical or chemical stimulation-induced coughing in animals, *Journal of ethnopharmacology* 1999,67; 361–365.

³⁵ JAHANGIR T., KHAN T.H., PRASAD L., SULTANA S.: Reversal of cadmium chloride-induced oxidative stress and genotoxicity by *Adhatoda vasica* extract in swiss albino mice, *Biological trace element research* 2006, 111; 217–228.

³⁶ KUMAR A., RAM J., SAMARTH R.M., KUMAR M.: Modulatory influence of *Adhatoda vasica* Nees leaf extract against gamma irradiation in swiss albino mice, *Phytomedicine* 2005, 12; 285–293.

³⁷ KUMAR M, SAMARTH R, KUMAR M, SELVAN SR, SAHARAN B, KUMAR A.: Protective effect of *Adhatoda vasica* Nees against radiation-induced damage at cellular, biochemical and chromosomal levels in Swiss albino mice.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965765?ordinalpos=6&itool=EntrezSystem2.PE>
ntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum (březen 2009).

³⁸ PANDIT S., SUR T.K., JANA U., DEBNATH P.K., SEN S., BHATTACHARYYA D.: Prevention of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats by *Adhatoda vasica* leaves.

Dostupné z: <http://www.ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2004;volume=36;issue=5;spage=312;epage=313;aulast=Pandit> (listopad 2009).

³⁹ BHATTACHARYYA D., PANDIT S., JANA U., SEN S., SUR T.K.: Hepatoprotective activity of *Adhatoda vasica* aqueous leaf extract on D-galactosamine-induced liver damage in rats.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752635?ordinalpos=14&itool=EntrezSystem2.PE>
ntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum (duben 2009)

⁴⁰ YADAV A.K., TANQPU V.: Anticestodal activity of *Adhatoda vasica* extract against *Hymenolepis diminuta* infections in rats.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691645?ordinalpos=2&itool=EntrezSystem2.PE>
ntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DefaultReportPanel.Pubmed_RVDocSum (březen 2009).

⁴¹ HARDTMANN G.E., KOLETAR G., PFISTER O.R.: Synthesis and biological evaluation of some 10-substituted 2,3-dihydroimidazo[2,1-b]quinazolin-5(10H)-ones, a new class of bronchodilators, *Journal of medicinal chemistry* 1975, 5; 447–453.

⁴² KOTTOVÁ M.: Studium účinků vybraných látek na respirační systém potkana metodami in vivo a in vitro, Dizertační práce, Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Hradec Králové, 2009: 44–49.

⁴³ BAHEKAR R.H., RAO A.R.: Synthesis, evaluation and structure-activity relationships of 5-alkyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazoline, 2,3-dihydroimidazo[1,2-c]quinazolin-5(6H)-thiones and their oxo-analogues as new potential bronchodilators.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11367868> (prosinec 2010).

-
- ⁴⁴ JOHRI R.K., ZUTSI U.: Mechanism of action of 6,7,8,9,10,12-hexahydro-azepino-[2,1-b]quinazolin-12-one-(RLX)- a novel bronchodilator.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919099> (prosinec 2010).
- ⁴⁵ JINDAL D.P., BHATTI R.S., AHLAWAT S., GUPTA R.: Synthesis and bronchodilatory activity of some nitrogen bridgehead compounds, *European Journal of medicinal chemistry* 2002, 37; 419–425.
- ⁴⁶ ZABEER, BHAGAT, GUPTA: Synthesis and bronchodilator activity of new quinazolin derivate.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430993> (prosinec 2010).
- ⁴⁷ HARDMAN, LIMBIRD, eds.: *The pharmacological basis of therapeutics*, 5. vydání, Goodman&Gilman's, McGraw-Hill, 2001: 743–747.
- ⁴⁸ FENDRICH Z. a kol.: *Farmakologie pro farmaceuty I*. 1. vydání, Karolinum, Praha, 2002: 116–117.
- ⁴⁹ LINCOVÁ, HASAN, FARGHALI: *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vydání, Galén, Praha, 2002: 338–339.
- ⁵⁰ Mikro-verze AISLP-ČR 2009.4.
- ⁵¹ Kolektiv pracovníků Ústavu patologické fyziologie LF MU: *Praktikum z patologické fyziologie*.
Dostupné z: is.muni.cz/do/1499/el/estud/lf/ps06/3050988/Praktikum_z_patologicke_fyziologie.pdf (listopad 2011).
- ⁵² JEBAVÝ L. a kol.: *Ochrana, chov a využití pokusných zvířat 1. díl*. 1. vydání, Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech, Brno, 2005: 14–15.
- ⁵³ ŽIVNÁ H.: *Základy práce s potkanem v laboratoři*. 1. vydání, Solichite, Hradec Králové, 2001: 13, 14, 19, 20, 22.
- ⁵⁴ Anatomie potkana.
Dostupné z: <http://www.theblackhole.estranky.cz/clanky/fyziologie-potkana/anatomie-potkana.html> (leden 2012).
- ⁵⁵ ČERVENÝ Č. a kol.: *Chov a využití pokusných zvířat*, 2. díl. *Základy morfologie laboratorních zvířat*. 1. vydání, Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech, Brno, 1999: 23, 24, 31–3.
- ⁵⁶ NEJEDLÝ K.: *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. 2. vydání, SPN, Praha, 1967: 290, 316–7.