Farmacie 3-06 29.5.2006 13:35 Str. 120
proLékaře.cz | 30.8.2025

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE
Ročník LV – Číslo 3 – KVĚTEN 2006

TESTOVÁNÍ NOVĚ SYNTETIZOVANÉ LÁTKY S POTENCIONÁLNÍM ß$_3$-ADRENERGNĚ AGONISTICKÝM ÚČINKEM

KRČMÁŘ J., KOTOLOVÁ H., VESELÁ L., CSÖLLEI J.[1], GONĚC T.[1], KARPÍŠEK M., BARTOŠOVÁ L., NEČAS J.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav humánní farmakologie a toxikologie
[1]Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav chemických léčiv

SOUHRN

Testování nově syntetizované látky s potencionálním ß$_3$-adrenergně agonistickým účinkem

Agonisté ß3-adrenergních receptorů jsou látky, které stimulují lipolýzu v bílé tukové tkáni a termogenezi v hnědé tukové tkáni, čehož by mohlo být využito při léčbě obezity a s ní spojeného metabolického syndromu. Cílem této práce bylo zhodnotit vliv šestitýdenního p.o. podávání látky B496 – ethylesteru (4-{2-[(2hydroxy-3-(4--ethylkarbamoyl)fenoxypropyl)amino]ethyl}fenoxy) octové kyseliny ve formě ve vodě rozpustného hydrochloridu laboratorním potkanům kmene Wistar samčího pohlaví krmených hypertučnou dietou na koncentrace glukosy, triacylglyceridů, celkového cholesterolu a leptinu v séru a na váhový přírůstek. Zvířata byla rozdělena na skupinu léčenou látkou B496 a na skupinu kontrolní. Léčené skupině byla látka B496 rozpuštěna v destilované vodě v koncentraci 5 mg/1 kg vody. Testovaná látka B496 při dlouhodobém podávání laboratorním potkanům významně snižuje sérové koncentrace glukosy (-26 %, p<0,01), triacylglyceridů (-21 %, p<0,05) a leptinu (-43 %, p<0,01). Dále byl zkoumán vliv jednorázového i.p. podání (1 mg/kg hmotnosti zvířete) nově syntetizované látky B496 a látky BRL-37344 na koncentrace sérového leptinu u inbredních myší C57Bl/6J. Látka BRL-37344 vedla ke statisticky významnému snížení koncentrace leptinu v séru (-55 %, p<0,001). Takové snížení se nepodařilo prokázat u testované látky B496.

K l í č o v á s l o v a: ß$_3$-adrenergní agonista – aryloxypropanolaminy – leptin – BRL-37344

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 120–123

SUMMARY

Study of a Newly Synthesized Substance with a Potential to Stimulate ß$_3$-Adrenergic Receptors

ß$_3$-adrenoreceptor agonists can stimulate lipolysis in the white adipose tissue and thermogenesis in the brown adipose tissue. These activities could be useful in the treatment of obesity and the associated metabolic syndrome. The effects of six-week oral administration of the newly synthesized substance B496 (methyl-4-[2--[2-hydroxy-3-(4-ethylcarbamoyl)phenoxyprophyl]amino]etyl)-phenoxyacetate hydrochloride) on serum glucose, triglycerides, total cholesterol, and leptin levels were studied in male Wistar rats fed with a high-fat diet. The animals were divided into a group treated with B496 (5 mg dissolved in 1 litre of water) and a control group. The results indicated a significant reduction in serum glucose levels (-26 %, p<0,01), triacylglyceride levels (-21 %, p<0,05) and leptin levels (-43 %, p<0,01). Further the effect of a single intraperitoneal dose (1 mg/kg) of B496 and BRL-37344 on serum leptin levels in the C57Bl/6J mouse was investigated. Administration of BRL-37344 resulted in a significant decrease in serum leptin levels (-55 %, p<0,001). This reduction was not demonstrated by newly synthesized substance B496.

K e y w o r d s: ß$_3$-adrenoreceptor agonist – aryloxypropanolamines – leptin – BRL-37344

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 120–123 *Má*

Úvod

ß$_3$-adrenergní receptor je protein o 408 aminokyselinách sedmkrát procházející buněčnou membránou spřažený s G-proteinem aktivujícím adenylát-cyklasu. Stimulací tohoto receptoru dojde k aktivaci cAMP-závislé lipasy, vyšší produkci uncoupling protein-1 (UCP-1) v tukové tkáni a vyšší inzulínosenzitivitě. Takovéto působení vede k redukci tělesné hmotnosti a ke zlepšení diabetických symptomů u mnoha zvířecích modelů obezity a diabetu [1)].

ß$_3$-adrenergní receptory se primárně nacházejí v tukové tkáni a zprostředkovávají množství metabolických funkcí včetně lipolýzy a termogeneze [2)]. ß$_3$-adrenergní m-RNA byla také detekována v gastrointestinálním trak-

proLékaře.cz | 30.9.2025

tu (žlučník, žaludek, tenké i tlusté střevo), v kardiovaskulárním traktu, močovém měchýři, prostatě a děloze [3–6]. V GIT $ß_3$-adrenergní receptory kontrolují relaxaci hladkého svalstva, průtok krve a žaludeční sekreci. Nové poznatky naznačují, že stimulace adrenergních receptorů v CNS vede ke snížení příjmu potravy [7]. Kardiální $ß_3$-adrenergní receptory po stimulaci zprostředkovaly negativně inotropní efekt na lidské srdeční komory [4].

Po identifikaci $ß_3$-adrenergního receptoru molekulárně biologickými metodami a jeho naklonování v roce 1989 J. A. Emorinem [8] došlo k syntéze většího počtu $ß_3$-adrenergních agonistů. Tyto látky můžeme podle chemické struktury rozdělit do dvou základních skupin: arylethanolaminy a aryloxypropanoly. V současné době se zdá, že tyto látky mohou být nejvíce přínosné v léčbě obezity a non-insulín dependentního diabetu. Klíčovým se zdá být vývoj vysoce selektivního $ß_3$-adrenergního agonisty, který by postrádal kardiovaskulární nebo jiné účinky způsobené ovlivněním $ß_1$ nebo $ß_2$ receptorů [1]. Další možné terapeutické využití se předpokládá při léčbě benigní hyperplazie prostaty, dysfunkce močového měchýře (časté močení, močová inkontinence), spazmů v oblasti gastrointestinálního traktu a snad i deprese.

Dříve byla adipocytům přisuzována pouze pasivní role při energetické homeostáze. Teprve nedávno byla rozpoznána jejich endokrinní funkce rozhodující pro řízení energetické rovnováhy. Tuková tkáň vylučuje několik mediátorů ovlivňujících insulínovou rezistenci, jako je například leptin, tumor necrosis factor-α, interleukin-6, adiponectin a resistin [8].

Leptin je hormon účinně působící na energetickou homeostázu snížením energetického příjmu a zvýšením energetického výdeje. Je produkován především adipocyty a jeho syntéza i sérové hladiny dlouhodobě korelují s množstvím tukové tkáně [9]. Krátkodobě může být syntéza leptinu ovlivněna jak ve smyslu zvýšení, tak i snížení, řadou biologických faktorů jako odpověď na změnu nutričního stavu. Výsledkem je stav, kdy syntéza přestává odpovídat množství tukové tkáně v těle. Mezi známé modulátory patří $ß_3$-adrenergní agonisté, kyselina retinová, hladovění, jež akutně redukují genovou expresi leptinu v tukové tkáni i jeho sérové hladiny. Naopak glukokortikoidy a příjem potravy po hladovění expresi leptinu zvyšují [10].

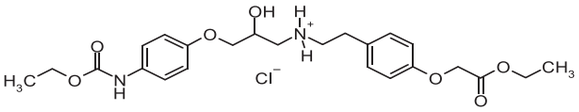
Látka B496 byla nově syntetizována v Ústavu chemických léčiv FaF VFU Brno. Totožnost látky byla ověřena pomocí NMR spektroskopie a hmotnostní spektroskopie. S ohledem na její chemickou strukturu u ní předpokládáme agonistické působení na $ß_3$-adrenergní receptory. Prezentovaná data jsou výsledkem vůbec prvního testování této látky.

POKUSNÁ ČÁST

Experiment č. 1

Předmětem výzkumu byl vliv dlouhodobého podávání látky B496 (I) na koncentrace glukosy, triacylglycerolů, celkového cholesterolu, leptinu v séru a na váhový přírůstek. Soubor zahrnoval 16 laboratorních potkanů kmene Wistar samčího pohlaví stejného stáří a srovnatelné hmotnosti (430±25 g).

Po týdenní aklimatizaci byl soubor metodou náhodného výběru rozdělen na dvě skupiny. Obě skupiny byly pro navození obezity krmeny speciální hypertučnou/hypercukernou dietou (45 % kalorií tvořených tuky, 35 % jednoduchými cukry) ad libitum. Kontrolní skupina byla napájena pitnou vodou ad libitum. Druhé skupině byla do destilované vody přimíchána látka B496 (5 mg/1kg vody).

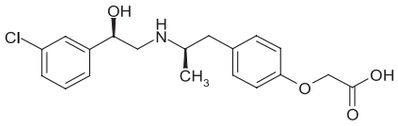


I. Chemická struktura testované látky B496

U potkanů byla 1x týdně sledována hmotnost. Po šesti týdnech byl zvířatům po 12 hodinách lačnění odebrán vzorek krve pro stanovení glykémie z boční ocasní žíly (přístroj pro stanovení koncentrace glukosy v krvi Glucocard II). Poté byli potkani v celkové anestezii (i.p. 0,5 ml/100 g tělesné hmotnosti směsi 1% roztoku ketaminu, *Narkamon® inj. Zentiva,* a 2% roztoku xylazinu, *Rometar® inj. Zentiva* v poměru 1:20) usmrceni exsanguinací ze srdce. Získané sérum bylo použito pro biochemické stanovení. Triacylglyceroly byly stanoveny za použití analyzátoru Advia 1650 firmy Bayer a soupravy firmy Lachema, celkový cholesterol byl stanoven na stejném přístroji setem firmy Biovendor. Leptin byl stanoven ELISA kitem firmy Biovendor. Projekt byl schválen a kontrolován etickou komisí při VFU Brno.

Experiment č. 2

V experimentu č. 2 byl zkoumán vliv jednorázového i.p. podání látky B496 na sérové koncentrace leptinu. Jako kontrolní látka ke sledování účinku $ß_3$-adrenergního agonisty na hladiny leptinu posloužila látka BRL 37444 (Sigma) (II), u které byla prokázána $ß_3$- agonistická aktivita.



II. Chemická struktura látky BRL 37344

Soubor zahrnoval celkem 24 inbredních myší C57Bl/6J samčího pohlaví stejného stáří a srovnatelné hmotnosti (24±2 g), které byly krmeny standardní dietou (dieta pro laboratorní zvířata SPF M1) a napájeny vodou ad libitum. Po týdenní aklimatizaci byl soubor metodou náhodného výběru rozdělen na tři skupiny (osm myší na skupinu). Myši dostali jednu i.p. injekci: 1. skupina – placeba (0,5 ml fyziologického roztoku), 2. skupina – látku BRL 37444 (1 mg/kg rozpuštěno v 0,5 ml fyz. roztoku), 3. skupina – látky B496 (1 mg/kg rozpuštěno v 0,5 ml fyziologického roztoku). Po 5 hodinách byl proveden odběr krve z boční ocasní žíly. Z centrifugací získaného séra byla pomocí ELISA kitu (Biovendor) určena koncentrace leptinu. Projekt byl schválen a kontrolován etickou komisí při VFU Brno.

proLékaře.cz | 30.8.2025

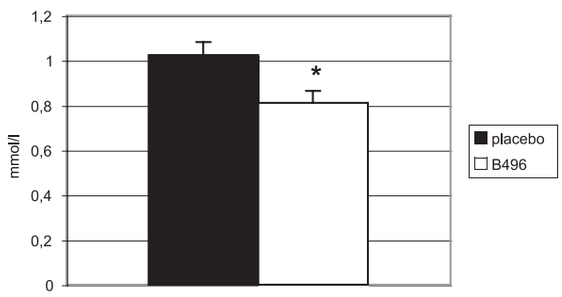
Statistika

Statistické výpočty byly provedeny v programu Microsoft Excel. Pro porovnání rozdílů mezi skupinami byl použit nepárový Studentův t-test. Data v grafech reprezentují průměry ± S.E. (směrodatná chyba průměru). Statistická významnost jednotlivých hodnot vůči placebu (nepárový t-test) je v grafech označena hvězdičkou: p<0,001***; p<0,01**; p<0,05*.

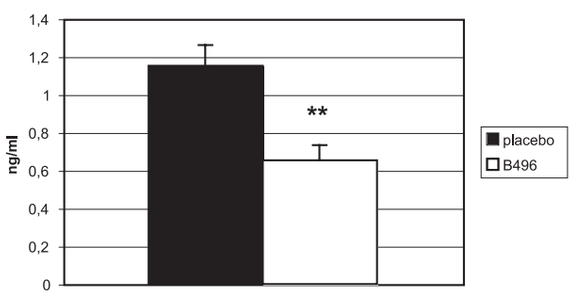
VÝSLEDKY A DISKUZE

Experiment č.1

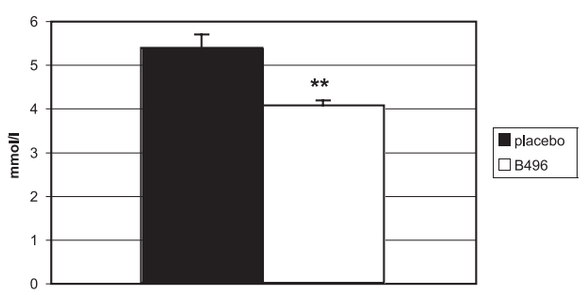
Různé experimentální pokusy ukázaly, že $ß_3$-adrenergní agonisté mají pozitivní vlastnosti na zvířecích modelech obezity. Zulet et al. [11] při léčbě hypercholesterolemických potkanů $ß_3$-adrenergním agonistou Trecadrinem prokázali největší efekt na hladinu triacylglycerolů a na množství tuku v organizmu.



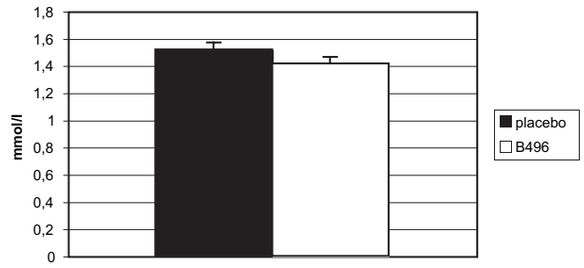
Obr. 1. Průměrné hodnoty (± S.E.) koncentrace triacylglycerolů v séru laboratorních potkanů po šestitýdenní léčbě



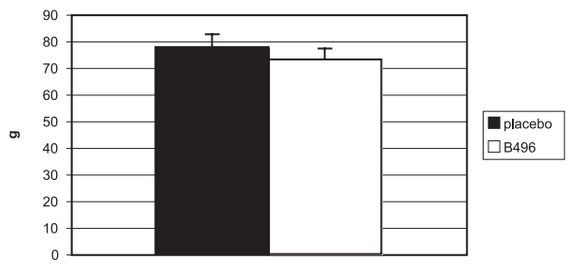
Obr. 2. Průměrné hodnoty (± S.E.) koncentrace leptinu v séru laboratorních potkanů po šestitýdenní léčbě látkou B496



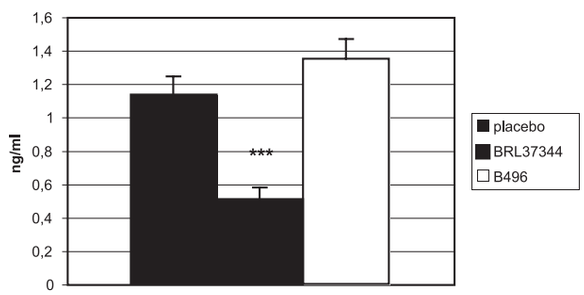
Obr. 3. Průměrné hodnoty (± S.E.) koncentrace glukózy v krvi laboratorních potkanů po šestitýdenní léčbě látkou B496



Obr. 4. Průměrné hodnoty (± S.E.) koncentrace cholesterolu v séru laboratorních potkanů po šestitýdenní léčbě látkou B496



Obr. 5. Průměrné hodnoty (± S.E.) hmotnostních přírůstků laboratorních potkanů po šestitýdenní léčbě látkou B496



Obr. 6. Průměrné hodnoty (± S.E.) koncentrace leptinu v séru laboratorních myší po jednorázové i.p. aplikaci

Také v našem pokusu jsme prokázali statisticky významné snížení (z 1,03 mmol/l na 0,81 mmol/l, p<0,05) hladin triacylglycerolů v séru zvířat léčených látkou B496 proti placebové skupině. Někteří autoři spojují takový výsledek se změnami tukové asimilace v trávicím traktu a se změnami ukládání a mobilizace v tukové tkání [12].

Sérová koncentrace leptinu, faktoru korelujícího s množstvím tukové tkáně v organizmu, byla statisticky velmi významně nižší (p<0,01) u skupiny léčené látkou B496 (1,15 ng/ml) oproti placebové skupině (0,66 ng/ml). Již dříve bylo popsáno, že $ß_3$-adrenergní agonisté zvyšují stupeň lipolýzy a snižují syntézu lipidů v tukové tkáni [13, 14].

Statisticky velmi významný pokles hodnot (z 5,4 mmol/l na 4,0 mmol/l, p<0,01) byl zaznamenán také u koncentrace glukózy v krvi.

proLékaře.cz | 30.9.2025

Co se týče hladiny cholesterolu v séru, po léčbě látkou B496 došlo ke statisticky nevýznamnému snížení hodnoty o 7 % (z 1,52 mmol/l na 1,42 mmol/l). Tyto výsledky naznačují, že testovaná látka B496 může mít terapeutický potenciál při léčbě obezity a s ním spojeného metabolického syndromu. Selektivita působení na ß receptorech bude dále zkoumána.

Ke statisticky významnému snížení nedošlo ani u celkového hmotnostního přírůstku za šest týdnů (placebo skupina:13,39 g, léčená skupina 11,26 g, -16 %). $ß_3$-adrenergní agonisté snižují pouze podíl tukové tkáně v organizmu, naproti tomu hmotnost ostatních tkání (převážně svalové) může vzrůst. $ß_3$-adrenergní agonisté u hlodavců upravují inzulínovou senzitivitu již v takových dávkách, respektive časovém intervalu, kdy ještě nedochází k ovlivnění tělesné hmotnosti [15].

Experiment č.2

Zhang et al. [10] a další autoři ukázali, že jednorázové podání $ß_3$-adrenergních agonistů vede ke snížení exprese leptinu v adipocytech a sérových hladin leptinu. Také v našem pokusu jsme prokázali, že aplikace jedné i.p. injekce látky BRL-37344, jedné z nejprostudovanější látky ze skupiny $ß_3$- adrenergních agonistů, vedla ke statisticky vysoce významnému snížení (z 1,133 ng/ml na 0,509 ng/ml, $p<0,001$) koncentrace leptinu v séru v porovnání s placebovou skupinou. Statisticky významný rozdíl se nepodařil prokázat u testované látky B496, naopak došlo k mírnému nárůstu (z 1,133 ng/ml na 1,348 ng/ml).

Za $ß_3$-adrenergně agonistické působení látky B496 je zodpovědná část molekuly, která představuje objemný substituent na dusíku, s charakteristickým ethylesterem fenoxyoctové kyseliny, který se v organizmu zřejmě štěpí na účinnou formu, fenoxyoctovou kyselinu. Zdá se, že látka B496 ve formě pro-léčiva není vhodná pro způsob testování cestou jednorázové parenterální aplikace. Pro další testování selektivity působení na ß receptorech (například na izolovaných adipocytech a izolovaných potkaních srdcích) bude zřejmě nutné syntetizovat tuto látku ve formě volné fenoxyoctové kyseliny.

Práce byla realizována s podporou výzkumného záměru FaF VFU č.163700003. Leptinové ELISA kity byly darovány firmou Biovendor.

LITERATURA

1. **Kordik, C. P., Reitz, A. B.:** J. Med. Chem., 1999; 42, 181-201.
2. **Berkowitz, D. E., Nardone, N. A., Smiley, R. M. et al.:** Eur. J. Pharmacol., 1995; 289, 223-228.
3. **Anthony, A., Schepelmann, S., Guillaume, J. L. et al:** Aliment. Pharmacol. Ther., 1998; 6, 519-525.
4. **Guatier, C., Langin, D., Belligand, J.:** Tips, 2000; 21, 426-432.
5. **Zamazali, Y., Takeda, H., Kahane, M. et al.:** Br. J. Pharmacol., 1998; 124, 593-599.
6. **Park, Y. C., Tomiyama, Y., Haykawa, K. et al.:** J. Urol., 2000; 164, 1364-1370.
7. **Tsuji, S., Bray, G. A.:** Phisiol. Behav., 1998; 63, 723-728.
8. **Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M. M. et al:** Science, 1989; 245, 1118-1121.
9. **Steppan, C. M., Lazar, M. A.:** Trends Endocrinol. Metab., 2002, 13, 18-23.
10. **Zhang Z., Matheny, M., Zolotukhin, S. et al.:** Biochim. et Bhiophys. Acta, 2002; 1584, 115-122.
11. **Zulet, M. A., Berraondo, B., Milagro, F. I., Martinez, J. A.:** Il Farmaco, 1999; 54, 710-712.
12. **Krief, S., Lonnquist, F., Raimbauolt, S. et al.:** J. Clin. Incest., 1993; 91, 344-349.
11. **Scarpace, P. J., Matheny, M., Zhang, Y. et al.:** Endokrinology, 2002; 143, 3026-3035.
12. **Ahima, R., Flier, J.:** Annu. Rev. Physiol., 2000; 62, 413-437.
13. **Collins, S., Surwit, R. S:** Recent. Prog. Horm. Res., 2001; 56, 309-328.
14. **Berraondo, B., Bonafonte, A., Fernández-Otero, M. P. at al.:** Eat. Weight Disord., 1997; 2, 130-137.
15. **Arch, J. R. S.:** Eur. J. Pharmacol., 2002; 440, 99-1007.

Došlo 11. 1. 2006.
Přijato ke zveřejnění 20. 3. 2006.

PharmDr. Josef Krčmář
Palackého1-3, 612 42 Brno
e-mail: krcmarj@vfu.cz