

**Universita Karlova**

**2. lékařská fakulta**



**VLIV RŮZNÝCH EXPERIMENTÁLNÍCH,  
DIAGNOSTICKÝCH A  
TERAPEUTICKÝCH ZÁSAHŮ NA  
BUŇKY EPITELU DÝCHACÍCH CEST**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Praha 2007**

**MUDr. Jiří Uhlík**

Děkuji paní profesorce MUDr. Václavě Konrádové, DrSc., své školitelce, za odborné vedení během celého postgraduálního studia i za významnou pomoc při sepisování disertační práce. Děkuji rovněž panu docentovi MVDr. Luďkovi Vajnerovi, CSc., vedoucímu Ústavu histologie a embryologie UK 2.LF v Praze, za podporu, kterou mi poskytl během studia, i za podnětné připomínky k disertační práci. Poděkování dále náleží odborně-technickým pracovnícům Ústavu histologie a embryologie UK 2.LF Karolíně Boháčkové, Heleně Kačerové a Marii Valentové za spolupráci při realizaci našich experimentů, zpracování získaného materiálu a konečném vyhotovení práce.

Práce vznikla s podporou grantu 79/97 Grantové agentury University Karlovy v Praze a výzkumných záměrů 111300002 a 111300003 Ministerstva školství České republiky.

# Obsah

I. Úvod	5
II. Materiál a metodika	13
III. Výsledky a diskuse	24
A. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů zdravých kontrolních králíků	24
Diskuse	33
B. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po celkové aplikaci acetylcholinu	36
1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 minut po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu	36
2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 minut po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu	42
3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 minut po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu	46
4) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 minut po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu	50
Diskuse	54
C. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci adrenalinu	61
1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 min po aplikaci 10 µg/kg adrenalinu	61
2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 min po aplikaci 10 µg/kg adrenalinu	67
Diskuse	73

D. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po inhalační aplikaci léků ze skupiny bronchospasmolytik a kortikosteroidů	78
1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek preparátu Placebo Inhaler obsahujícího samotné propelenty	78
2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek bronchospasmolytického preparátu Ventolin Inhaler (200 µg salbutamolu)	84
3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek preparátu Becotide Inhaler (100 µg dipropionátu beklometazonu) ze skupiny inhalačních kortikosteroidů	89
Diskuse	95
E. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci bronchospasmolytika aminophyllinu	103
Diskuse	110
F. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po perorální aplikaci mukolytika ambroxolu	113
Diskuse	119
G. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po čtyřdenní hypoxii	122
1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů králíků po 4 dnech strávených v normobarické komoře s normálním obsahem kyslíku v atmosféře (normoxie)	122
2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů králíků po	

4 dnech strávených v normobarické komoře s obsahem kyslíku v atmosféře sníženým na 10% (hypoxie)	128
Diskuse	134
IV. Závěry	138
1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po celkové aplikaci acetylcholinu	138
2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci adrenalinu	141
3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po inhalační aplikaci léků ze skupiny bronchospasmolytik a kortikosteroidů	142
4) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci bronchospasmolytika aminophyllinu	145
5) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po perorální aplikaci mukolytika ambroxolu	146
6) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po čtyřdenní hypoxii	148
7) Závěrečné srovnání výsledků studií	149
V. Literatura	157

# I. Úvod

Buňky epitelu dýchacích cest jsou prvními buňkami, které přicházejí do kontaktu s vdechovaným vzduchem, a tím i s nejrůznějšími látkami v něm obsaženými. Současně s rozvojem moderní společnosti stoupá i spektrum látek, které se ve vzduchu nalézají. Jedná se jednak o látky prokazatelně škodlivé, jednak o příměsi bez jasného vlivu na organismus. Inhalační cestou se také podávají některé léky, které by měly mít účinek příznivý.

Existuje také celá řada látek, které ovlivňují epitel dýchacího systému i po aplikaci jinými cestami. Jedná se především o látky obsažené ve vodě a potravě a také o léky nebo diagnostické preparáty široce používané v klinické praxi. Proto studium působení jednotlivých látek nebo experimentálních zásahů na epitel dýchacích cest nabývá v poslední době na významu.

Při řešení úkolů stanovených plánem postgraduálního studia jsme navázali na obsáhlé experimentální studie epitelu dýchacích cest, které byly na Ústavu histologie a embryologie UK 2.LF řešeny v předcházejících letech. Jednalo se většinou o experimentální studie ultrastruktury epitelu trachey po aplikaci různých škodlivin a léků a po provedení některých terapeutických nebo diagnostických zákroků.

Na základě srovnání epitelu dýchacích cest různých živočišných druhů (Pavelka a spol. 1976, Breeze a Wheldon 1977, Gail a Lenfant 1983) byl z nabídky dostupných experimentálních zvířat nejprve vybrán nejvhodnější model, jehož epitel dýchacích cest by se co nejvíce podobal epitelu lidskému. Po provedení počátečních studií (Konrádová 1966) došlo k volbě králíka, neboť u králíků chovaných ve standardních podmínkách je, podobně jako u člověka, výstelka trachey a bronchů tvořena víceřadým cylindrickým epitelem, kde počtem výrazně převažují buňky řasinkové nad sekrečními buňkami pohárkovými. U dalších běžně dostupných laboratorních zvířat, hlodavců (myš, potkan,

křeček, morče), je epitel velkých dýchacích cest bohatší na sekreční buňky, které jsou často morfologicky odlišné od pohárkových buněk a obsahují v cytoplazmě elektronově denzní sekreční granula serózního typu. U králíků byl také popsán výskyt podobných sekrečních buněk v tracheálním epitelu, ale jen pokud byli chováni za striktně bezmikrobních podmínek (germ free) (Plopper a spol. 1983a).

Již v sedmdesátých letech minulého století se ukázala nutnost kvantitativního přístupu k hodnocení ultrastrukturálních nálezů. První podrobné kvantitativní hodnocení epitelu dýchacích cest provedli Jeffery a Reid (1975) u potkana. Na tuto práci pak navázala řada autorů u dalších druhů laboratorních zvířat, konkrétně u myši (Pack a spol. 1980, 1981), křečka (Becci a spol. 1978a,b,c, McDowell a spol. 1979, 1983a,b, Hess a spol. 1981) a fretky (Robinson a spol. 1986). Kvantitativním hodnocením epitelu dýchacích cest ovcí, opic a králíků se zabývala podrobně skupina autorů na universitě v kalifornském Davisu (Mariassy a Plopper 1983, 1984, Plopper a spol. 1983a,b, 1984, Wilson a spol. 1984, Tyler a Plopper 1985).

Rovněž na našem pracovišti došlo k vypracování komplexní metodiky kvantitativního hodnocení ultrastrukturálních nálezů v epitelu trachey králíků (Konrádová a Šrajter 1987, Konrádová 1991). Metodika se zaměřuje zejména na hodnocení funkčního stavu pohárkových buněk a řasinkového lemu a posouzení výskytu morfologických známek narušení toku hlenu v dýchacích cestách (Yoneda 1976, Sturgess 1977, Hulbert a spol. 1982, Menco 1989, Stratman a spol. 1991, Wanner a spol. 1996).

V rámci studia vlivu škodlivin na epitel dýchacích cest bylo na našem ústavu provedeno hodnocení ultrastruktury epitelu trachey králíků po inhalaci aerosolu koloidních roztoků těžkých kovů (Konrádová 1968a,b, 1972), prachových částic (Konrádová a Bencko 1975, 1976) a látek snižujících povrchovou tenzi (Konrádová a

spol. 1978). Z široké palety léků užívaných v klinické praxi pro léčbu onemocnění dýchacích cest byla pro studium jejich vlivu na ultrastrukturu epitelu trachey vybrána řada mukolytik (Konrádová a spol. 1979a, 1980, 1982a,b, 1983, 1985a-d, 1986a,b, 1996a), antitussik (Konrádová 1990), inhalačních bronchospasmolytik (Konrádová a spol. 1990a, 1996b, 1997, 1998a, 1999a, 2000), lokálních anestetik (Konrádová a spol. 1998b), xanthinových bronchospasmolytických preparátů (Konrádová a spol. 2001a) a inhalačních kortikosteroidů (Uhlík a spol. 2007). Dále byla hodnocena ultrastruktura tracheálního epitelu po inhalaci aerosolu fyziologického roztoku a pro srovnání i aerosolu speciální minerální vody (Konrádová a spol. 1979b, 2001b,c, 2003a, Uhlík a spol. 2002a), inhalaci koncentrovaného kyslíku, hyperoxické směsi plynů nebo naopak hypoxické atmosféry (Konrádová a spol. 1988, 2002, 2003b), bronchoalveolární laváži (Konrádová a spol. 1990b,c) nebo intratracheální aplikaci vodných kontrastních látek užívaných pro tracheobronchografii (Konrádová a spol. 1990d, 1992, 1995, 1996c,d, Uhlík a Tůma 1998). V rámci studia neurohumorální regulace sekreční činnosti pohárkových buněk tracheálního epitelu byl zhodnocen vliv intravenózně aplikovaného adrenalinu, acetylcholinu a atropinu na ultrastrukturu epitelu trachey (Konrádová a spol. 1996e,f,g, 1998c, 1999b).

V roce 1996 jsme se rozhodli rozšířit naše studie epitelu dýchacích cest na distální úseky dýchacích cest - terminální bronchioly. K tomuto rozhodnutí nás vedla skutečnost, že tyto úseky dýchacích cest jsou u člověka, ale i u králíků, které používáme jako model pro studium tracheálního epitelu, vystlány jednovrstevným epitelem v němž jsou hlen-secernující pohárkové buňky nahrazeny Clara buňkami. Tyto buňky, které popsal poprvé Max Clara v roce 1937 (Clara 1937), vykazují řadu pozoruhodných vlastností.

V sekrečních granulech Clara buněk, která jsou morfologicky podobná



sekrečním granulům serózních buněk, bylo identifikováno několik proteinů. Hlavním sekrečním produktem Clara buněk člověka, ale i hlodavců a králíků, je protein označovaný podle své molekulové hmotnosti jako protein CC10 (Singh a spol. 1988a). Někdy se můžeme setkat se synonymy názvu tohoto proteinu, jako například protein CC-16 nebo CCSP (Clara cell secretory protein) (Walker a spol. 1989, Cardoso a spol. 1993, Ten Have-Opbroek a De Vries 1993, Xu a spol. 1998). Tento protein je u člověka i králíka syntetizován nejen v Clara buňkách, ale i v buňkách endometria a prostaty, kde je prokazován pod názvem uteroglobin, UP1 (urine protein 1), HP1 (human protein 1) nebo pouze P1 (protein 1) (Hermans a Bernard 1996, Zaviačič a spol. 1997). Protein CC10 je  $\alpha$ -mikroprotein skládající se ze dvou identických řetězců 70 aminokyselin spojených pomocí dvou disulfidových můstků, jehož kompletní sekvence již byla odhalena a jehož gen byl u člověka lokalizován na 11. chromosomu (Singh a spol. 1988b). Protein CC10 má imunosupresivní, protizánětlivé a antioxidační účinky založené na inhibici aktivity cytoplazmatické fosfolipázy  $A_2$ , klíčového enzymu v syntéze kyseliny arachidonové, prostaglandinů a leukotrienů. Inhibice aktivity fosfolipázy  $A_2$  by také mohla omezovat degradaci fosfolipidů obsažených v plicním surfaktantu (Johnston a spol. 1999, Lensmar a spol. 2000). Dále byla zjištěna schopnost molekuly proteinu CC10 vázat některé cizorodé látky včetně polychlorovaných bifenyly, což by mohlo mít úzký vztah k předpokládaným detoxifikačním funkcím Clara buněk (Hermans a Bernard 1999). V poslední době se ukázala možnost použití stanovení proteinu CC-10 v séru, moči a v tekutině získané při bronchoalveolární laváži jako markeru poškození Clara buněk a alveolo-kapilární bariéry (Hermans a spol. 1999, Halatek a spol. 2003, 2005, Van Miert a spol. 2005, Andersson a spol. 2007). Sekreční granula Clara buněk obsahují dále skupinu proteinů asociovaných se surfaktantem (SP-A, SP-B, SP-D), které jsou produkovány zároveň v pneumocytech typu II a jsou

nedílnou součástí plicního surfaktantu (Weaver a Whitset 1991). Byla prokázána i důležitá role těchto proteinů v obranné reakci při bakteriální infekci (Reid 1998).

Dále byl studován obsah a metabolická aktivita tubulů hladkého endoplazmatického retikula, které jsou zvláště v apikálních oblastech Clara buněk velice bohatě vyvinuty. Byla zde prokázána přítomnost enzymatického systému cytochromu P-450 (Plopper a spol. 1987, Walker a spol. 1989, Fanucchi a spol. 1997), který je jedním z důležitých systémů metabolizujících cizorodé látky. Tento systém hraje významnou roli v neutralizaci některých škodlivin vstupujících do organismu inhalační cestou. Na druhé straně však intermediální metabolity některých látek, jako je naftalen nebo 4-ipomeanol, způsobují poškození samotných Clara buněk (Buckpitt a spol. 1992, Plopper a spol. 1992a,b, 1994a, Chichester a spol. 1993, Smiley-Jewell a spol. 1998, West a spol. 2001). Byla však vyzorována i určitá míra tolerance Clara buněk k poškození naftalenem po opakované inhalaci, která byla zřejmě způsobena zvýšenou expresí jiného enzymu –  $\gamma$ -glutamylcystein syntetázy (West a spol. 2003).

Předmětem zájmu je i předpokládaná pluripotence Clara buněk. Po poškození epitelu potkaních terminálních bronchiolů došlo v první fázi k proliferaci Clara buněk, z nichž některé se později diferencovaly v buňky řasinkové (Evans a spol. 1976, 1978). Tato vlastnost Clara buněk může vést i ke vzniku plicních tumorů (Plopper a spol. 1983b, Brody a spol. 1987, Rhodes a spol. 1990, Massaro a spol. 1994).

Byla také zjištěna schopnost Clara buněk měnit charakter svého sekretu i způsob sekrece. Po antigenní stimulaci myší pomocí inhalace aerosolu ovalbuminu (Evans a spol. 2004) nebo po intratracheální aplikaci bakteriálního endotoxinu potkanům (Harkema a Wagner 2005) došlo v Clara buňkách k tvorbě a následné sekreci hlenu. Byly přineseny důkazy o tom, že Clara buňky mohou uvolňovat svůj sekret jak

merokrinním, tak apokrinním způsobem (Stinson a Loosli 1978, Hung a spol. 1982, Peão a spol. 1993).

Abychom mohli srovnávat účinek jednotlivých experimentálních zásahů na epitel terminálních bronchiolů, vypracovali jsme metodu kvantitativního hodnocení ultrastruktury tohoto epitelu. Naše metoda vychází ze zkušeností získaných při kvantitativním hodnocení tracheálního epitelu. Hodnotíme poměrné zastoupení jednotlivých typů buněk v epitelu terminálních bronchiolů a zaměřujeme se na hodnocení funkčního stavu sekrečních Clara buněk. Sledujeme přítomnost sekrečních granul v jejich cytoplazmě a pomocí analyzátoru obrazu počítáme a měříme sekreční granula a pro srovnání také mitochondrie v supranukleární cytoplazmě Clara buněk. Metodu jsme nejprve aplikovali na epitel terminálních bronchiolů kontrolních králíků, kteří nebyli vystaveni žádnému experimentálnímu zákroku.

Naše studie působení různých látek na epitel terminálních bronchiolů králíků jsme zahájili hodnocením vlivu celkové aplikace acetylcholinu. Navázali jsme na práce hodnotící vliv aplikace téže látky na epitel trachey (Konrádová a spol. 1996e,f). Vzhledem k tomu, že v epitelu trachey jsme pozorovali velice rychlou reakci sekrečních buněk, aplikovali jsme intravenózně acetylcholin ve dvou dávkách a materiál jsme odebírali ve dvou časových intervalech. V dalším období jsme pak pokračovali ve studiu neurohumorální regulace epitelu terminálních bronchiolů hodnocením vlivu intravenózní aplikace adrenalinu. Rovněž zde jsme vycházeli z hodnocení ultrastruktury trachey po aplikaci téže látky (Konrádová a spol. 1999b), a proto jsme zvolili opět odběr materiálu ve dvou časových intervalech. Zvláště po aplikaci acetylcholinu jsme očekávali výraznou stimulaci sekrečních buněk i změny v distribuci buněk epitelu.

Ve spolupráci s odborníky z respiračního oddělení Pediatrické kliniky UK 2.LF a FN v Motole jsme pokračovali ve studiu vlivu různých léků používaných při terapii

nemocí respiračního traktu na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest. Nejprve jsme se zaměřili na hodnocení reakce epitelu terminálních bronchiolů na inhalační aplikaci aerosolů. Abychom mohli posoudit vliv účinné látky, zhodnotili jsme napřed epitel po inhalaci samotných propelentů používaných v tlakových nádobkách. Dále jsme navázali na předchozí studie hodnotící vliv několika inhalačních bronchospasmolytických působících léků jak ze skupiny  $\beta_2$  sympatikomimetik, tak také parasympatikolytik na epitel trachey (Konrádová a spol. 1990a, 1996b, 1997, 1998a, 1999a, 2000). Z použitých látek jsme si pro studium vlivu na epitel terminálních bronchiolů vybrali  $\beta_2$  adrenergní bronchospasmolytikum salbutamol, jehož působení na epitel trachey bylo nejvýraznější. V poslední době jsou nejpoužívanějšími léky při léčbě bronchiálního astmatu i obstrukční plicní choroby inhalační kortikosteroidy. Provedli jsme proto experiment srovnávající působení inhalačního beklometazonu na epitel trachey i terminálních bronchiolů.

Posoudili jsme také vliv intravenózní aplikace xanthinového bronchospasmolytika aminophyllinu, jenž měl velice silný stimulační účinek na epitel trachey (Konrádová a spol. 2001a).

Rozšířili jsme také naše studie zabývající se reakcí epitelu dýchacích cest na aplikaci mukolytických působících léků (Konrádová a spol. 1979a, 1980, 1982a,b, 1983, 1985a-d, 1986a,b, 1996a). Posoudili jsme vliv v současnosti nejužívanějšího mukolytika ambroxolu na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů. Tato látka měla shodou okolností nejnápadnější efekt na epitel trachey ze všech šesti studovaných mukolytik.

Vystavení experimentálních zvířat působení hypoxie patří k hojně používaným metodám při řadě morfologických i fyziologických studiích. Tyto studie jsou většinou zaměřeny na změny ve struktuře plicních cév. Méně pozornosti bylo dosud věnováno vlivu hypoxie na epitel lemující dýchací cesty a plicní alveoly. Reakce epitelu se však

může podílet na změnách pozorovaných v plicním parenchymu. V epitelu dýchacích cest a dokonce i v Clara buňkách byla pozorována exprese NO syntázy produkující velice účinnou vasoaktivní látku oxid dusnatý (Shaul a spol. 1994, Xue a spol. 1994), jehož podíl na hypoxických plicních změnách je obecně znám (Hampl a Herget 2000, Hampl a spol. 2006), a endotelinu-1 způsobujícího kontrakci plicních artérií v akutní hypoxii (Laporte a spol. 1996, Aguirre a spol. 2000). Usoudili jsme, že tyto faktory uvolněné ze stimulovaných nebo poškozených epitelových buněk v průběhu subakutní hypoxie by mohly ovlivnit okolní tkáň. V návaznosti na vyšetření epitelu trachey po působení čtyřdenní subakutní normobarické hypoxie (Konrádová a spol. 2002) jsme provedli i vyhodnocení epitelu terminálních bronchiolů po stejném experimentálním zákroku. Abychom mohli odlišit vliv hypoxie od vlivu samotného pobytu v normobarické komoře, provedli jsme tentýž experiment také v normoxické atmosféře.

## II. Materiál a metodika

V našich studiích jsme jako pokusná zvířata užili celkem 42 SPF samců králíka domácího plemene novozélandský bílý o hmotnosti 1 500 až 3 000 g, kteří klinicky nejevili známky onemocnění (dodavatel Anlab, Praha, ČR, chovatel Charles River, Sulzfeld, Německo). Volili jsme SPF kvalitu experimentálních zvířat, abychom předešli eventuálním změnám epitelu dýchacích cest způsobeným patogenními mikroorganismy. Po převzetí od dopravce jsme chovali králíky ve vlastním zvěřinci, který je speciálně akreditován pro chov králíků a izolován od kontaktu s jinými laboratorními zvířaty. Králíci měli přístup ke granulované potravě a vodě *ad libitum*, denně byli kontrolováni a ošetřováni.

Veškeré bolestivé experimentální zákroky a odběry byly prováděny v celkové anestézii, které jsme dosahovali 20 až 30 minut po intramuskulárním podání směsi ketaminu (Narkamon 5% inj., Léčiva, Praha, ČR) v dávce 35 mg/kg hmotnosti a xylazinu (Rometar 2% inj. ad usum vet., Spofa, Praha, ČR) v dávce 5 mg/kg hmotnosti (Hess a spol. 1984). 10 minut před výkonem byla oblast preparace podkožně infiltrována prokainem (Procain 1% inj., Léčiva, Praha, ČR).

Ketamin navozuje disociativní anestézii s výraznou analgezií a stimulací kardiovaskulárního systému bez útlumu dýchání. Interferuje s membránovými účinky excitačního neurotransmiteru kyseliny glutamové na receptory N-metyl-d-asparágové kyseliny pro excitační aminokyseliny (Trevor a Miller 1994). Účinky xylazinu se projevují analgezií, sedací a centrální myorelaxací. V tlumivých centrálních účincích se xylazin projevuje jako antineurotikum (Baggot 1994).

Pro studium ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů jsme v celkové anestézii otevřeli hrudník experimentálních králíků a vypreparovali plíce. Pomocí

plastové kanyly zavedené do hlavního bronchu jsme pravou plíci ihned perfundovali 5% glutaraldehydem (Merck, Hohenbrunn bei München, Německo) v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,2). Současně jsme transversálně rozřízli dolní lalok perfundované plíce, takže fixační roztok volně vytékal a nedocházelo k nežádoucímu přeplnění plíce. Poté jsme z řezné plochy odebrali částičky tkáně do stejného fixačního roztoku, jaký jsme použili pro perfuzi. Materiál jsme fixovali v tomto roztoku 90 minut a dále jsme 60 minut dofixovávali ve 2% OsO<sub>4</sub> (JMC, Hertfordshire, Velká Británie) v 0,1 M kakodylátovém pufru (pH 7,4). Odvodňovali jsme alkoholem stoupající koncentrace, projasňovali jsme propylenoxidem (Fluka, Buchs, Švýcarsko) a zalévali jsme do směsi Durcupanu ACM (Fluka, Buchs, Švýcarsko) a Eponu 812 (Serva, Heidelberg, Německo). Bločky v želatinových kapslích jsme polymerizovali při teplotě 60°C 3 dny.

Na polotenkových řezech barvených toluidinovou modří (1% toluidinová modř v 9,46% vodném roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) jsme vyhledávali terminální bronchioly a vhodné oblasti jsme krájeli na ultramikrotomu Ultratome Nova (LKB, Broma, Švédsko). Ultratenké řezy na měděných sítkách jsme kontrastovali 2% uranylacetátem a dále citrátem olova dle Reynoldse (1963). Vzorky jsme pozorovali na elektronovém mikroskopu JEM 100 C (Jeol, Tokio, Japonsko). Elektronogramy jsme pořizovali na filmy Agfa Scientia EM Film (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgie) a vyvolávali standardní fotografickou metodou.

Ve všech případech jsme prováděli kvantitativní hodnocení nálezů v epitelu terminálních bronchiolů pocházejících ze 3 zdrojů. Zaměřili jsme se na poměrné zastoupení jednotlivých druhů buněk v epitelu a na funkční stav Clara buněk. Na stínítku elektronového mikroskopu jsme identifikovali a počítali všechny epitelové buňky přítomné v ultratenkém řezu terminálního bronchiolu, které dosahovaly od bazální laminy až k lumen terminálního bronchiolu a které měly na řezu zachyceno

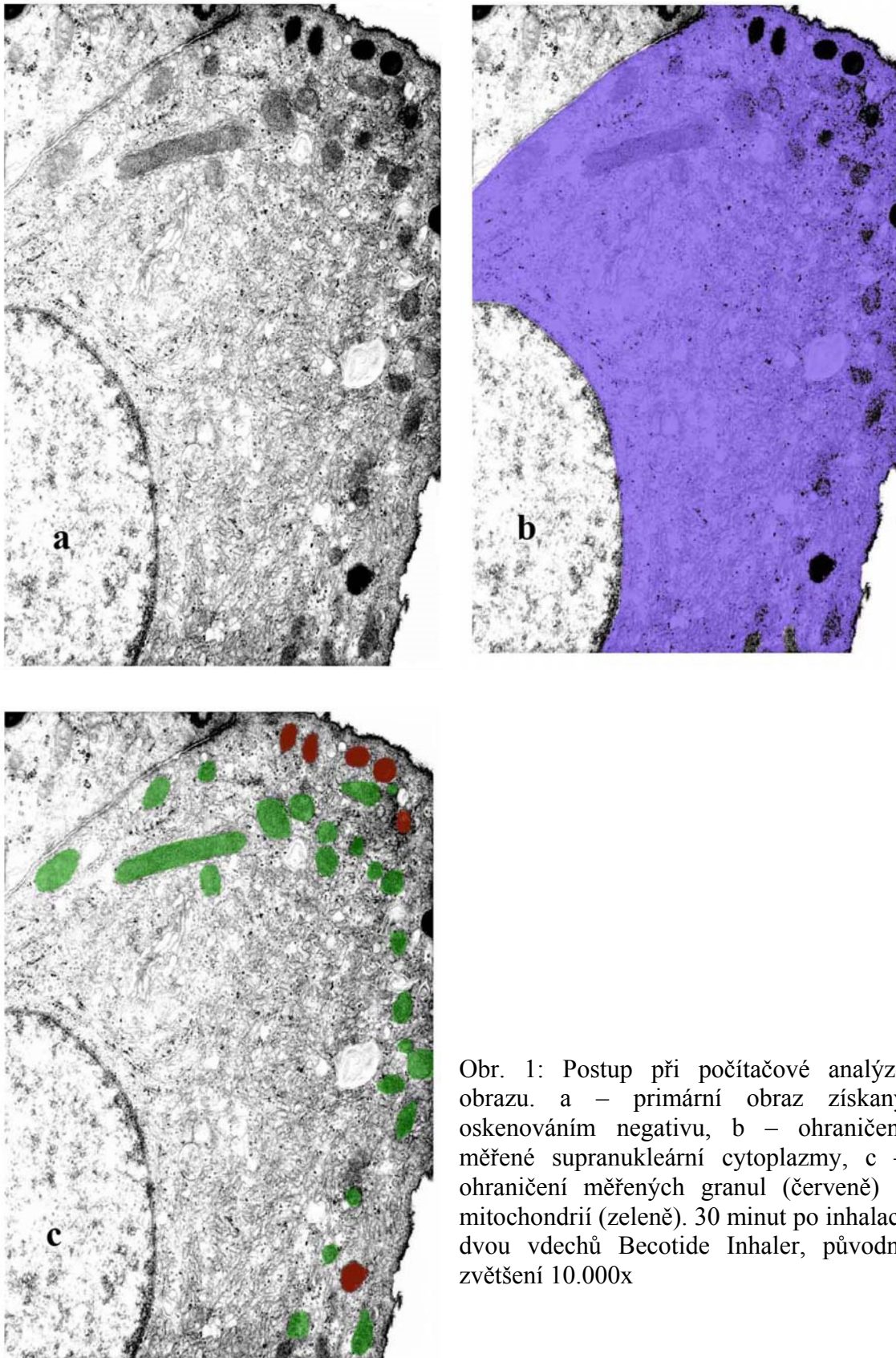
jádro. U Clara buněk jsme pak posuzovali přítomnost či nepřítomnost sekrečních granul. Abychom se vyhnuli opakovanému hodnocení jedné buňky, užívali jsme pro kvantitativní hodnocení vždy jen 1 síťku z bločku, na níž jsme v jednotlivých ultratenkých řezech hodnotili různé úseky epitelu terminálního bronchiolu. U každého zvířete jsme takto hodnotili všechny terminální bronchioly, které se nám podařilo zachytit.

Z elektronogramů zobrazujících supranukleární oblast Clara buněk jsme náhodně vybrali přibližně 40 záběrů od každého zvířete. Pomocí skeneru a s využitím softwaru Lucia G (Laboratory Imaging, Praha, ČR) jsme pak negativy převedli do digitální podoby s kalibrací podle originálního zvětšení (obr. 1a). Na digitalizovaných elektronogramech jsme změřili pomocí analyzátoru obrazu Lucia plochu cytoplazmy (obr. 1b) a v této ploše jsme hodnotili počet sekrečních granul, velikost sekrečních granul a pro srovnání rovněž počet a velikost mitochondrií (obr. 1c). Brali jsme v úvahu pouze granula a mitochondrie, které byly celé uvnitř obrazu. Pokud granula nebo mitochondrie přesahovaly hranice obrazu, vynechávali jsme jejich obsah při primárním měření plochy cytoplazmy.

Statistické zpracování výsledků jsme provedli ve spolupráci s RNDr. Jarmilou Zocovou a později Mgr. Janou Adáškovou z Ústavu aplikací matematiky a výpočetní techniky Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Relativní hodnoty 2 kategorií buněk nacházejících se v epitelu terminálních bronchiolů a 2 funkčních stavů Clara buněk (přítomnost nebo nepřítomnost sekrečních granul v cytoplazmě) byly hodnoceny  $\chi^2$ -testem homogenity ve frekvenčních tabulkách. Aby byly specifikovány kategorie způsobující odchylku od hypotézy homogenity, byly užity adjustované standardizované odchylky. Pro zjištění statistické významnosti nálezů hodnocených pomocí obrazové



analýzy jsme použili dvouvýběrový t-test a jeho neparametrickou obdobu - Mann-Whitneyův test. Jako minimální hranici statistické významnosti jsme zvolili  $p = 0,05$ .



Obr. 1: Postup při počítačové analýze obrazu. a – primární obraz získaný oskenováním negativu, b – ohraničení měřené supranukleární cytoplazmy, c – ohraničení měřených granul (červeně) a mitochondrií (zeleně). 30 minut po inhalaci dvou vdechů Becotide Inhaler, původní zvětšení 10.000x

Pro kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů kontrolních králíků jsme u 3 zvířat zhodnotili celkem 284 řasinkových a 317 Clara buněk. Při analýze obrazu jsme zhodnotili celkem 2767,3  $\mu\text{m}^2$  supranukleární cytoplazmy Clara buněk (tab.1).

Tab. 1: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) kontrolních králíků (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	č.1	č.2	č.3	$\Sigma$
Celkový počet buněk	250	173	178	601
Řasinkové buňky	127	77	80	284
Clara buňky celkem	123	96	98	317
Clara buňky s granuly	79	73	81	233
Clara buňky bez granul	44	23	17	84
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	1192,5	753,9	820,9	2767,3
Počet granul	112	169	145	426
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	21,7	18,9	20,3	60,9
Počet mitochondrií	1346	420	406	2172
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	183,7	120,8	94,6	399,1

Při studiu odpovědi epitelu terminálních bronchiolů králíků na intravenózní aplikaci acetylcholinu jsme užili celkem 12 králíků. Užili jsme stejné dávky acetylcholinu a stejné časové intervaly mezi aplikací a odběrem materiálu jako ve studii vlivu acetylcholinu na epitel trachey (Konrádová a spol. 1996e,f). Šesti králíkům jsme v celkové anestézii aplikovali i.v. 0,1 mg, dalším šesti zvířatům 0,5 mg acetylcholinu ve formě chloridu (Acetylcholinum ophthalmicum Dispersa, Ciba, Niederwangen, Belgie). Materiál pro elektronově mikroskopické studie jsme odebírali vždy od 3 králíků 5 minut a 20 minut po aplikaci obou dávek acetylcholinu. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy v jednotlivých experimentálních skupinách jsou shrnuta v tabulce č. 2.

Tab. 2: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 0,1 a 0,5 mg acetylcholinu (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	Acetylcholin 0,1 mg 5 min				Acetylcholin 0,1 mg 20 min			
	č.4	č.5	č.6	Σ	č.7	č.8	č.9	Σ
Celkový počet buněk	117	140	56	313	108	206	309	623
Řasinkové buňky	52	62	24	138	32	84	136	252
Clara buňky	65	78	32	175	76	122	173	371
Clara buňky s granuly	55	70	22	147	63	108	119	290
Clara buňky bez granul	10	8	10	28	13	14	54	81
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	580,9	352,8	705,4	1639,1	725,8	982,6	525,2	2233,6
Počet granul	110	142	65	317	149	227	71	447
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	14	9,4	8	31,4	14,5	27,6	7,5	49,6
Počet mitochondrií	487	494	551	1532	799	760	760	2319
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	96,8	55,4	96,3	248,5	89,6	129,5	82,2	301,3
Číslo králíka	Acetylcholin 0,5 mg 5 min				Acetylcholin 0,5 mg 20 min			
	č.10	č.11	č.12	Σ	č.13	č.14	č.15	Σ
Celkový počet buněk	139	122	200	461	48	99	53	200
Řasinkové buňky	51	43	102	196	17	49	33	99
Clara buňky	88	79	98	265	31	50	20	101
Clara buňky s granuly	77	48	90	215	11	37	16	64
Clara buňky bez granul	11	31	8	50	20	13	4	37
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	1364,6	787,3	1262,6	3414,5	1021,8	870,4	1179,8	3072
Počet granul	132	117	452	701	13	199	160	372
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	14,2	6,9	50,2	71,3	1,3	23,1	13,3	37,7
Počet mitochondrií	863	822	1024	2709	950	712	811	2473
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	198,2	107,8	176,3	482,3	158,3	176,5	252,7	587,5

Při hodnocení reakce epitelu terminálních bronchiolů na intravenózní aplikaci adrenalinu jsme použili celkem 6 králíků. Všem zvířatům jsme pomalu nitrožilně aplikovali adrenalin ve formě hydrochloridu (Adrenalin Léčiva inj., Léčiva, Praha, ČR) v dávce 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tělesné hmotnosti. Tuto dávku jsme zvolili jako dávku doporučenou pro léčbu akutních kardiovaskulárních a respiračních stavů u lidských pacientů. Materiál pro elektronově mikroskopické vyšetření jsme odebírali u tří králíků za 5 minut a u dalších tří za 20 minut po ukončení aplikace adrenalinu. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy v jednotlivých experimentálních skupinách

jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tab. 3: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci adrenalinu v dávce 10 µg/kg (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	Adrenalin 10 µg/kg 5 minut				Adrenalin 10 µg/kg 20 minut			
	č.16	č.17	č.18	Σ	č.19	č.20	č.21	Σ
Celkový počet buněk	302	131	264	697	211	274	182	667
Řasinkové buňky	132	59	127	318	85	122	76	283
Clara buňky celkem	170	72	137	379	126	152	106	384
Clara buňky s granuly	125	55	104	318	87	105	87	279
Clara buňky bez granul	45	17	33	95	39	47	19	105
Měřená plocha cytoplazmy CB (µm <sup>2</sup> )	519,1	386,8	958,8	1864,7	733	642,9	654,9	2030,8
Počet granul	75	67	202	344	102	96	94	292
Celková plocha granul (µm <sup>2</sup> )	6,8	11,4	23,6	41,8	6,8	10,9	13,1	30,8
Počet mitochondrií	511	203	858	1572	525	746	474	1745
Celková plocha mitochondrií (µm <sup>2</sup> )	112,6	55,2	147,3	315,1	92,9	93,5	82,3	268,7

Při hodnocení vlivu inhalace bronchospasmolytického salbutamolu na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů jsme podali třem králíkům 2 dávky přípravku Ventolin Inhaler (Glaxo, Aranda de Duero, Španělsko) z originální tlakové nádoby, na jejíž vyústění jsme nasadili plastový 16-G intravenózní katetr (vnější průměr 1,7 mm, vnitřní průměr 1,3 mm, délka 6,5 cm). Katetr jsme zavedli v celkové anestézii hluboko do ústní dutiny a sprej jsme aplikovali při spontánním nádechu zvířete. Dvě dávky spreje obsahují 200 µg salbutamolu (1(3-hydroxymethyl-4-hydroxy)-fenyl-2-(1,1'-dimethyl)-ethylamino-ethanol) ve formě sulfátu, což je doporučovaná jednorázová dávka pro děti i dospělé. Materiál k elektronově mikroskopickému vyšetření jsme odebírali po 30 minutách od podání Ventolinu. Abychom mohli srovnat působení účinné látky – salbutamolu s účinkem vehikul přidávaných do tlakových nádobek (kyselina olejová, trichlorofluorometan, dichlorodifluorometan), použili jsme u dalších 3 králíků stejným způsobem sprej Placebo Inhaler od stejného výrobce, který obsahuje pouze propelenty a používá se

k nácviiku inhalační techniky u nových pacientů. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy v jednotlivých experimentálních skupinách jsou shrnuty v tabulce č. 4.

Tab. 4: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 30 minut po inhalaci dvou dávek sprejů Placebo Inhaler a Ventolin Inhaler (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	Placebo Inhaler				Ventolin Inhaler			
	č.22	č.23	č.24	Σ	č.25	č.26	č.27	Σ
Celkový počet buněk	176	116	158	450	122	243	172	537
Řasinkové buňky	75	52	70	197	58	114	88	260
Clara buňky celkem	101	64	88	253	64	129	84	277
Clara buňky s granuly	72	60	76	208	47	98	73	218
Clara buňky bez granul	29	4	12	45	17	31	11	59
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	1172,6	1240,9	1506,9	3920,4	1358,1	1305,5	1217,5	3881,1
Počet granul	145	274	257	676	245	194	214	653
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	18,6	37,3	29,8	85,7	22,8	12,7	25,1	60,6
Počet mitochondrií	851	882	1327	3060	1719	1520	948	4187
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	121,2	146,8	217,5	485,5	164,9	218,8	170,9	554,6

Pro vyšetření působení inhalačního kortikosteroidu beklometazonu na epitel terminálních bronchiolů jsme třem králíkům aplikovali 2 dávky spreje Becotide Inhaler (Glaxo, Greenford, Velká Británie) stejným způsobem, jako jsme podali Ventolin. Každá dávka léku obsahuje 50  $\mu\text{g}$  beklometazonu ve formě dipropionátu, králíci tedy inhalovali 100  $\mu\text{g}$  tohoto kortikosteroidu. Tato dávka je doporučovaná jako vhodná pro malé děti (Kelly 2003). Materiál k elektronově mikroskopickému vyšetření jsme odebírali po 30 minutách od podání Becotidu. Vzhledem k tomu, že užitý přípravek je od stejného výrobce a obsahuje stejné propelenty, jako Placebo Inhaler použitý v předchozím pokusu, sloužily nálezy od králíků po aplikaci tohoto spreje pro posouzení vlivu účinné látky i v tomto pokusu. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy u králíků po inhalaci Becotidu jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Tab. 5: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 30 minut po inhalaci dvou dávek spreje Becotide Inhaler (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	č.28	č.29	č.30	Σ
Celkový počet buněk	336	157	143	336
Řasinkové buňky	160	73	63	160
Clara buňky celkem	176	84	80	176
Clara buňky s granuly	137	82	53	137
Clara buňky bez granul	39	2	27	39
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	1027,2	969,6	840,2	2837
Počet granul	137	159	149	445
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	14,8	18	12,1	44,9
Počet mitochondrií	1173	1125	1076	3374
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	107,3	144,4	120,7	372,4

Pro studium ultrastruktury epitelu králíků po intravenózní aplikaci bronchospasmolytického xanthinového derivátu aminophyllinu jsme použili celkem 3 králíky. V celkové anestézii jsme jim intravenózně aplikovali aminophyllin [(1,3-dimethylxantin)<sub>2</sub>.ethylendiamin] v dávce 5 mg/kg hmotnosti (Syntophyllin inj., Hoechst-Biotika, Martin, Slovensko). Tato dávka je doporučovaná jako jednorázová dávka pro dětské pacienty při úvodu intravenózní léčby bronchiální obstrukce. Materiál k elektronově mikroskopickému vyšetření jsme odebírali po 30 minutách od podání aminophyllinu. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy u jednotlivých králíků jsou shrnuty v tabulce č. 6.

Tab. 6: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 30 minut po intravenózní aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg hmotnosti (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	č.31	č.32	č.33	Σ
Celkový počet buněk	183	252	229	664
Řasinkové buňky	99	106	107	312
Clara buňky celkem	84	146	122	352
Clara buňky s granuly	77	135	101	313
Clara buňky bez granul	7	11	21	39
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	1106,3	924,8	718,8	2749,9
Počet granul	352	456	267	1075
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	45,7	47,2	51,5	144,4
Počet mitochondrií	814	1311	782	2907
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	149,1	108,4	105,8	363,3

Ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů králíků po aplikaci mukolytický působící látky ambroxolu jsme hodnotili u 3 zvířat. Králíkům jsme perorálně podali 1 ml preparátu Mucosolvan sol. (Boehringer Ingelheim International GmbH, Ingelheim am Rhein, Německo), který obsahuje 7,5 mg účinné látky (2-amino-3,5-dibromo-N-[trans-4-hydroxycyklohexyl]benzylamin). Zvířata byla při aplikaci bdělá a roztok ochotně přijímala z injekční stříkačky. Materiál pro elektronově mikroskopické vyšetření jsme odebírali v celkové anestézii 20 minut po aplikaci. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy u jednotlivých zvířat uvádí tabulka č. 7.

Tab. 7: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků 20 minut po perorální aplikaci 1 ml roztoku Mucosolvanu (7,5 mg ambroxolu) (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	č.34	č.35	č.36	Σ
Celkový počet buněk	101	263	78	442
Řasinkové buňky	47	119	40	206
Clara buňky celkem	54	144	38	236
Clara buňky s granuly	52	95	31	178
Clara buňky bez granul	2	49	7	58
Měřená plocha cytoplazmy CB ( $\mu\text{m}^2$ )	523,4	1017,7	358,7	1899,8
Počet granul	189	198	80	467
Celková plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	21,2	13,9	10,7	45,8
Počet mitochondrií	678	1074	330	2082
Celková plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	81,1	136,1	60,4	276,6

Při hodnocení vlivu hypoxie na epitel terminálních bronchiolů jsme použili celkem 6 králíků. Tři králíci byli umístěni na 4 dny (96 hodin) v samostatných klecích do vzduchotěsně uzavřené normobarické komory, v níž byla udržována pomocí systému pump a detektorů atmosféra o obsahu kyslíku 10% (Hampl a Herget 1990). Chybějící kyslík byl doplněn dusíkem. Vydechovaný kysličník uhličitý byl jímán hydroxidem draselným a natronovým vápnem, takže jeho obsah nepřekročil 1%. Teplota v komoře se po celou dobu expozice hypoxii pohybovala okolo 23°C a relativní vlhkost atmosféry v komoře byla 100%. Zvířata jsme jednou denně kontrolovali a současně jsme doplňovali granulované krmivo a vodu a vyměňovali podestýlku. Tento zásah netrval

déle než 15 minut. Ihned po opětovném uzavření komory jsme pomocí stlačeného dusíku vrátili složení atmosféry na hypoxickou hodnotu. Po ukončení hypoxické expozice jsme králíky ihned po vynětí z komory uvedli do celkové anestézie a odebrali jsme vzorky pro elektronovou mikroskopii. Abychom posoudili vliv samotného pobytu v komoře, především poměrně vysoké teploty a vlhkosti, na stav epitelu dýchacích cest, provedli jsme ještě stejný postup s dalšími třemi králíky, jen atmosféra v komoře byla po celou dobu normální (21% kyslíku). Tuto skupinu označujeme jako „normoxickou“. Počty hodnocených buněk a data získaná z obrazové analýzy u obou skupin králíků uvádí tabulka č. 8.

Tab. 8: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk (CB) králíků po čtyřdenním pobytu v normobarické komoře za normoxických a hypoxických (10% O<sub>2</sub>) podmínek (absolutní hodnoty)

Číslo králíka	Normoxie				Hypoxie			
	č.37	č.38	č.39	Σ	č.40	č.41	č.42	Σ
Celkový počet buněk	235	168	178	581	236	138	157	531
Řasinkové buňky	100	85	98	283	102	63	61	226
Clara buňky celkem	135	83	80	298	134	75	96	305
Clara buňky s granuly	114	69	72	255	110	71	84	265
Clara buňky bez granul	21	14	8	43	24	4	12	40
Měřená plocha cytoplazmy CB (μm <sup>2</sup> )	864,5	817	1023,3	2704,8	1156,2	955,2	743	2854,4
Počet granul	129	244	218	591	239	365	79	683
Celková plocha granul (μm <sup>2</sup> )	15,2	27	23,4	65,3	44,1	56,5	9,3	109,9
Počet mitochondrií	692	1150	879	2721	1038	933	410	2381
Celková plocha mitochondrií (μm <sup>2</sup> )	119	103	154,3	376,3	122,1	127,2	111,3	360,6



### **III. Výsledky a diskuse**

#### **A. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů zdravých kontrolních králíků**

Terminální bronchioly zdravých kontrolních králíků vystýlal jednovrstevný epitel, v němž se téměř pravidelně střídaly kubické až nízce cylindrické buňky řasinkové a vysoce cylindrické Clara buňky (obr. 2). Clara buňky se vyklenovaly vysoko do lumina bronchiolů a svými širokými apikálními částmi často téměř zakrývaly povrchy buněk řasinkových (obr. 3).

Apikální spojovací komplexy mezi epitelovými buňkami byly dobře vyvinuté, četné desmosomy se vyskytovaly i v hlubších partiích buněk. Intercelulární prostory byly proto velice úzké (obr. 3). Volné buňky jsme v mezibuněčných prostorech epitelu nenalezli.

Epitelové buňky široce nasedaly na dobře vyvinutou bazální laminu. Pod bazální laminou následovala vrstvička vazivové tkáně (lamina propria mucosae) obsahující hlavně fibroblasty, elastická a retikulární vlákna. Elastická vlákna často tvořila mohutné masy bezprostředně pod bazální laminou. Pod lamina propria jsme nacházeli nesouvislou vrstvu hladké svaloviny (obr. 4).

Řasinkové buňky tvořily  $47,3 \pm 3,6\%$  buněk epitelu terminálních bronchiolů. Byly kubického až nízce cylindrického tvaru. Jejich kulaté jádro s vysokým obsahem euchromatinu bylo umístěno bazálně nebo ve středu buňky. Cytoplazma řasinkových buněk byla elektronově lucidnější než cytoplazma Clara buněk. Obsahovala hojně mitochondrie s elektronově denzní matrix a dobře vytvořenými a četnými kristami. Mitochondrie byly obvykle štíhlé, protáhlé, s dlouhou osou orientovanou většinou paralelně s apiko-bazální osou buňky. Nejvíce mitochondrií jsme nacházeli v apikální

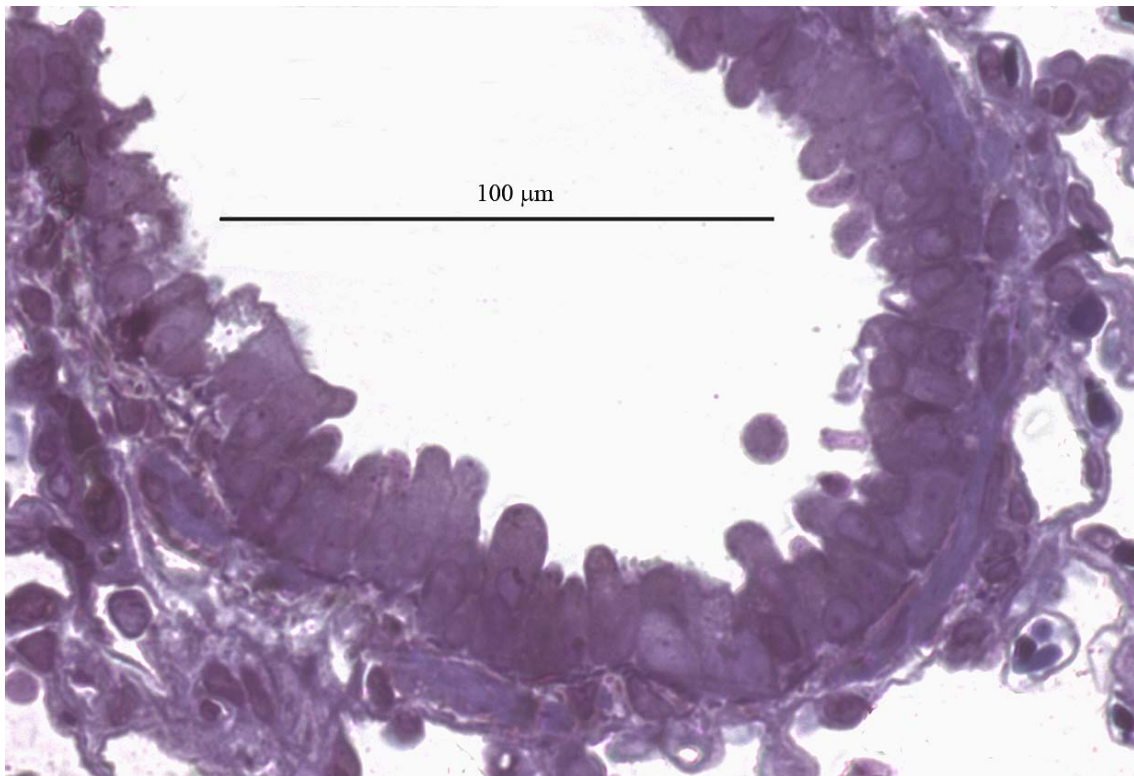
oblasti cytoplazmy (obr. 3, 5). V cytoplazmě se dále vyskytovaly četné volné ribosomy nebo polyribosomy. Často jsme pozorovali drobné, elektronově denzní lysosomální transportní vezikuly nebo i větší, membránou ohraničené útvary obsahující heterogenní materiál. Pravidelným nálezem zvláště v apikálních oblastech cytoplazmy byla multivezikulární tělíska a pinocytotické vezikuly (obr. 6). Dále jsme pozorovali difúzně rozmístěné, izolované cisterny granulárního endoplazmatického retikula, nepřilíš vyvinutý systém tubulů hladkého endoplazmatického retikula vyplněný elektronově lucidním materiálem, poměrně málo vyvinutý Golgiho komplex. Vzácným nálezem byly rozsáhlé intracytoplazmatické řasinkové vakuoly (obr. 7). Velice dobře byl v řasinkových buňkách vyvinut cytoskelet. Setkávali jsme se s hustou sítí cytoplazmatických filament, zvláště v apikální cytoplazmě, a s hojnými, difúzně uspořádanými, dlouhými mikrotubuly rovněž hlavně v oblasti apexu buňky. Na apikálním povrchu řasinkových buněk byl vyvinut ciliární aparát obvyklé struktury. Počet řasinek na řasinkových buňkách v terminálních bronchiolách byl však výrazně menší než ve velkých dýchacích cestách. Jedna řasinková buňka nesla pouze několik desítek kinocilií. Mezi řasinkami vybíhaly z apikálního povrchu také mikroklky, které počtem převažovaly nad řasinkami zvláště v okrajových oblastech apikálního povrchu (obr. 5). Vysoké vyklenutí sousedních Clara buněk často způsobilo značné omezení prostoru pro řasinky, což vedlo k jejich vzájemnému stlačení i častému šikmému postavení.

Clara buňky reprezentovaly zbývající 52,7 ± 3,6% epitelových buněk. Byly cylindrického tvaru. Jejich apikální části se vyklenovaly vysoko do lumina terminálního bronchiolu. Apexy Clara buněk byly buď zakončeny ostrým kónusem, nebo byly oblé, někdy se dokonce směrem k povrchu rozšiřovaly. Vždy však vysoko přesahovaly apikální povrchy okolních řasinkových buněk, často přesahovaly i celé kinocilie (obr.

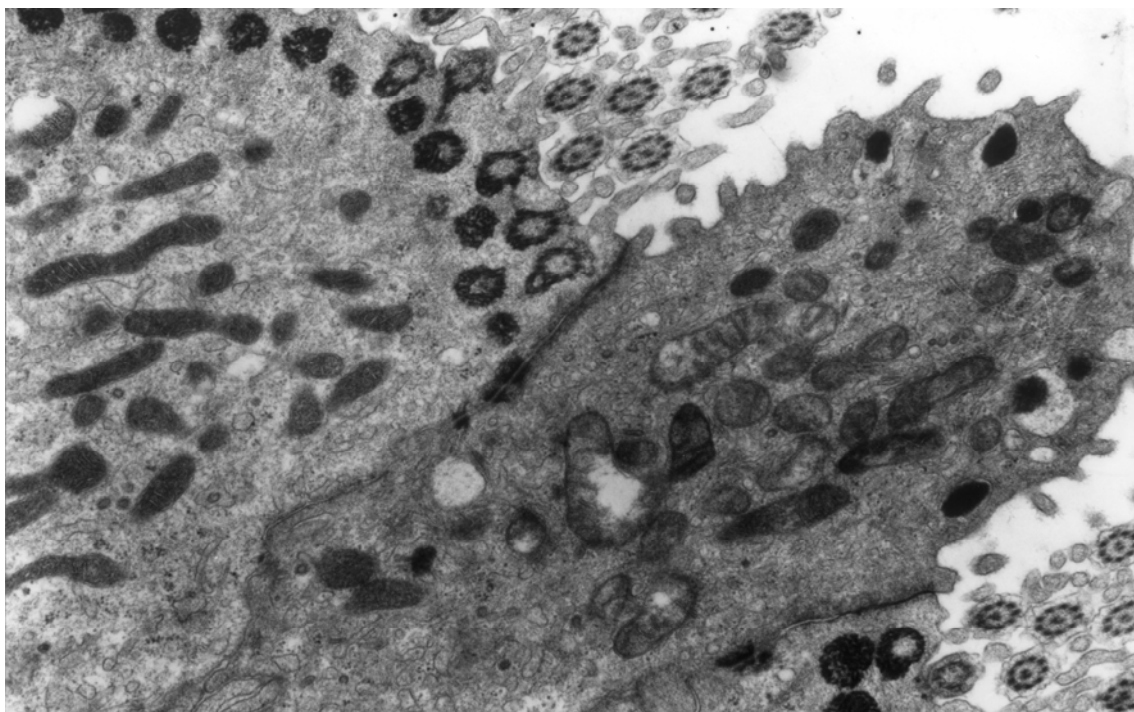
2). Rozšiřující se oblé apikální části Clara buněk se k sobě někdy nad řasinkovou buňkou ležící mezi nimi přibližovaly na malou vzdálenost a řasinkovou buňku tak prakticky izolovaly od lumina. Apikální povrch byl někdy hladký, jindy vybíhal v krátké široké výběžky charakteru mikrokloků (obr. 8). Oválné jádro Clara buněk, často s hlubokými záhyby a bohaté na euchromatin, bylo umístěno bazálně (obr. 9). Cytoplazma byla obvykle elektronově denznější než cytoplazma řasinkových buněk. Velice nápadně bylo vyvinuto hladké endoplazmatické retikulum, jehož tubuly vyplněné středně elektronově denzním materiálem byly nejhojnější v apikálních oblastech buňky (obr. 8, 10, 11). Bohatě vytvořené paralelně uspořádané cisterny granulárního endoplazmatického retikula byly umístěny spíše v bazálních oblastech cytoplazmy (obr. 9). Někdy jsme pozorovali cirkulárně seskupené cisterny granulárního endoplazmatického retikula kolem jádra i volně v cytoplazmě. Cisterny byly obvykle úzké, bez známek střežení produktu. Golgiho komplex nebyl příliš rozsáhlý. Hojně byly v cytoplazmě Clara buněk zastoupeny mitochondrie (obr. 8, 10, 11). Kromě mitochondrií běžné velikosti s dobře vyvinutými kristami jsme nacházeli i velké mitochondrie s elektronově lucidnější, jemně granulární matrix. Jejich tvar byl sférický nebo oválný, mitochondriální kristy byly méně vyvinuté. Nejvíce jich bylo umístěno v apikální oblasti cytoplazmy. V  $73,5 \pm 9,4\%$  Clara buněk se vyskytovala sekreční granula. Byla obvykle oválná nebo lehce nepravidelného tvaru, s vysoce elektronově denzním, homogenním obsahem (obr. 8, 10). V některých granulech se objevila excentricky umístěná, drobná, sférická, elektronově lucidní oblast. Vzácně jsme nacházeli také granula s elektronově lucidním obsahem. Většina granul se vyskytovala v apikální oblasti buňky těsně pod povrchovou buněčnou membránou. Byla ale často nalezena i v bazální části cytoplazmy. Počítačovou analýzou vybraných polí supranukleární cytoplazmy Clara buněk jsme napočítali  $0,17 \pm 0,07$  granul a  $0,73 \pm 0,35$

mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Sekreční granula měla průměrnou plochu  $0,15 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ , mitochondrie pak  $0,22 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$ .

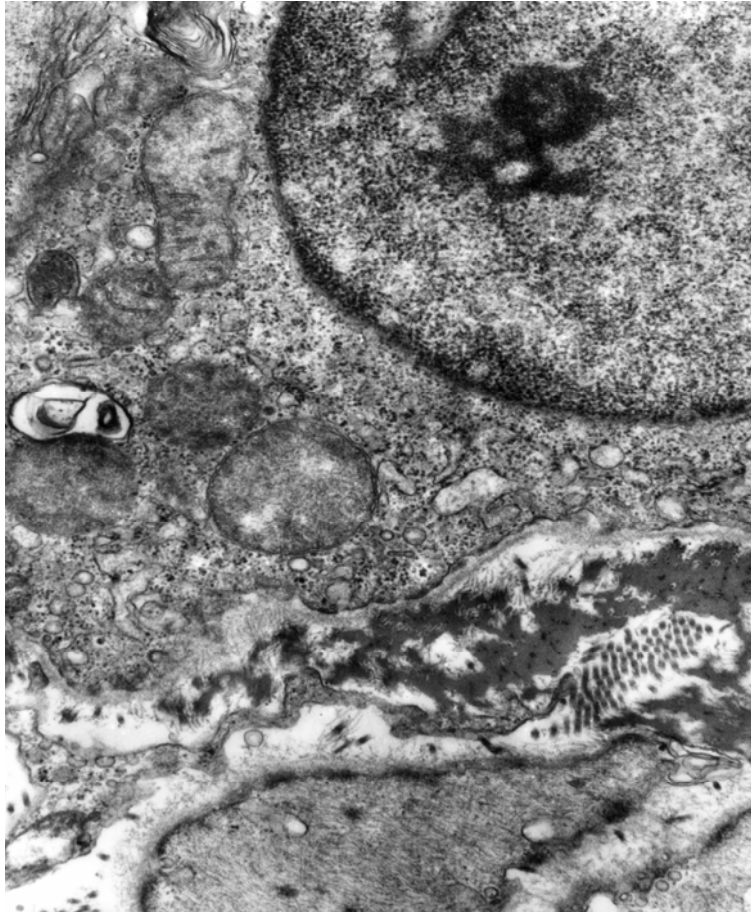
Řasinkový lem v pravém slova smyslu jsme nad epitelem terminálních bronchiolů nenacházeli. Řasinkové buňky byly jednak nízké a jednak od sebe vzájemně oddělené četnými Clara buňkami. Mohli jsme proto pozorovat pouze jednotlivé trsy řasinek nad separovanými řasinkovými buňkami (obr. 2, 3). Často jsme pozorovali různým způsobem alterované řasinky. Jednalo se o patologické řasinky s vyšším obsahem cytoplazmy kolem axonémy nebo vzácněji o malformované řasinky s odlišným počtem nebo uspořádáním elementů v axonémě.



Obr. 2: Terminální bronchiolus s typickým uspořádáním epitelu. Kontrolní králík, polotenkový řez, toluidinová modř, obj. 40x

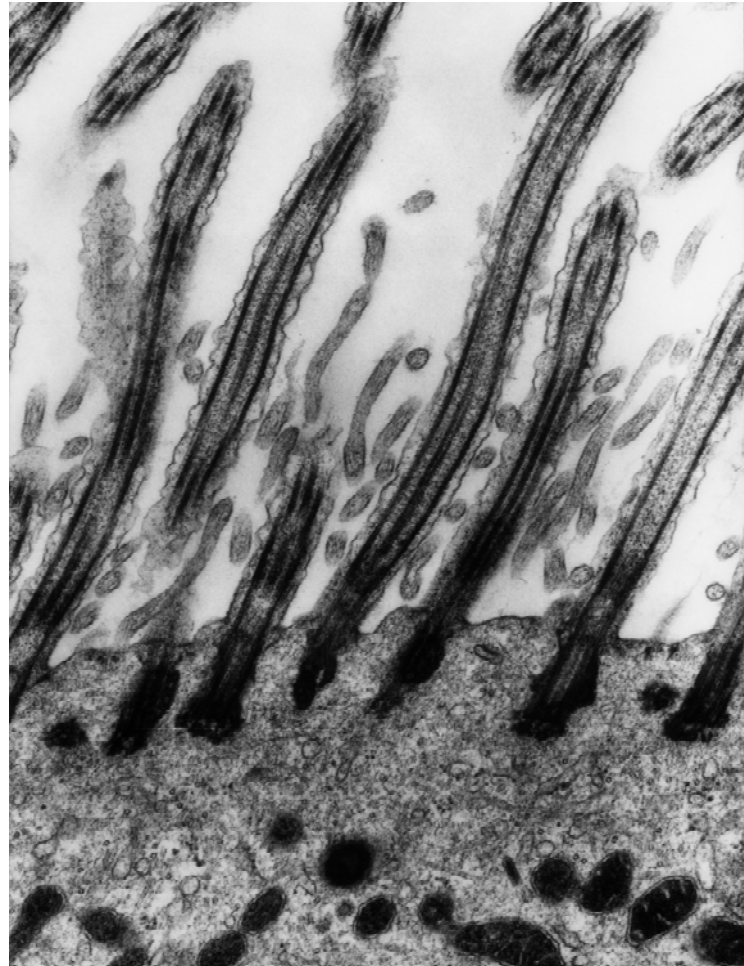


Obr. 3: Apikální oblast epitelu terminálního bronchiolu s částmi dvou řasinkových buněk a jedné Clara buňky s typickým zastoupením cytoplazmatických struktur. Kontrolní králík, původní zvětšení 10.000x



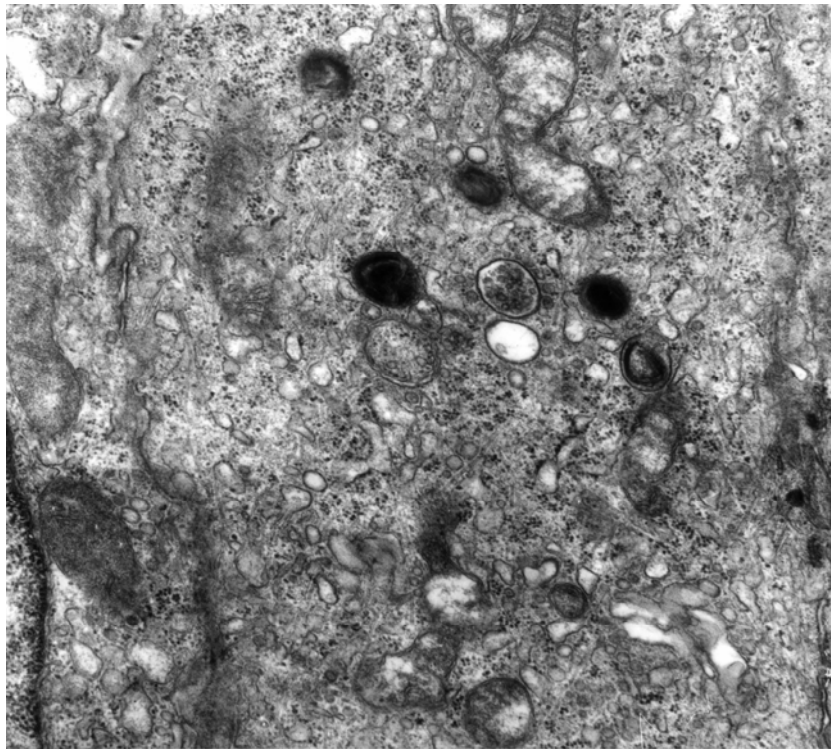
1  $\mu$ m

Obr. 4: Bazální oblast epitelu terminálního bronchiolu, bazální lamina, lamina propria mucosae a část hladké svalové buňky. Kontrolní králík, původní zvětšení 10.000x



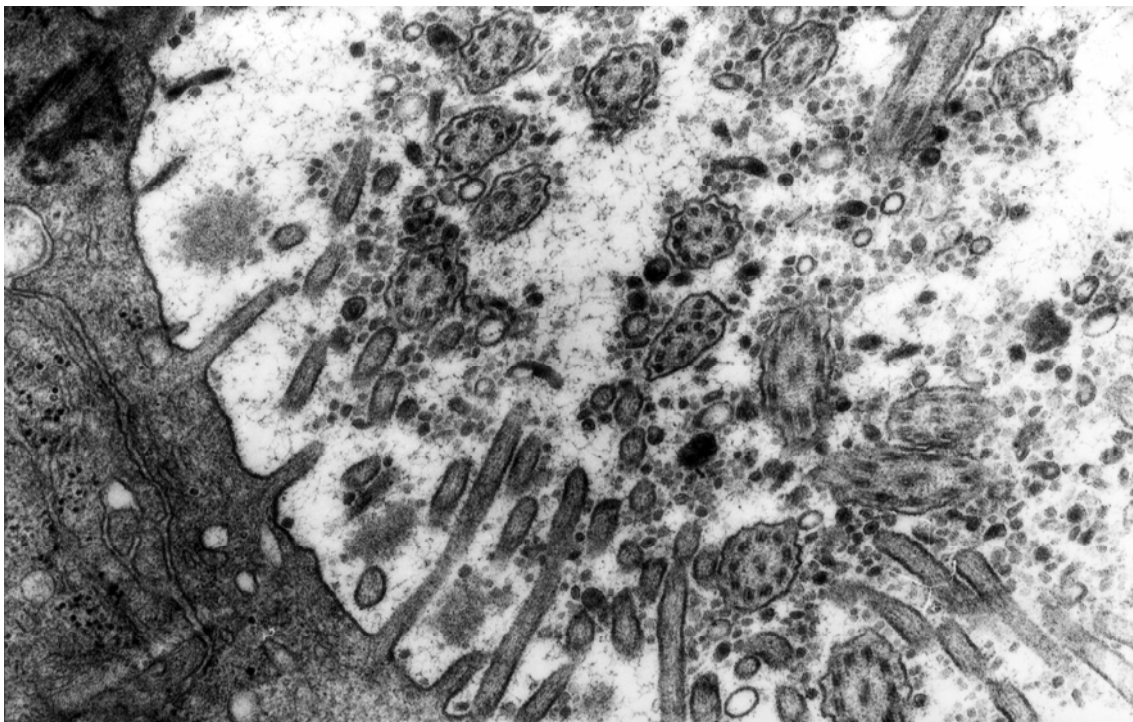
1  $\mu$ m

Obr. 5: Apikální povrch řasinkové buňky s pravidelným uspořádáním kinocilií. Kontrolní králík, původní zvětšení 15.000x



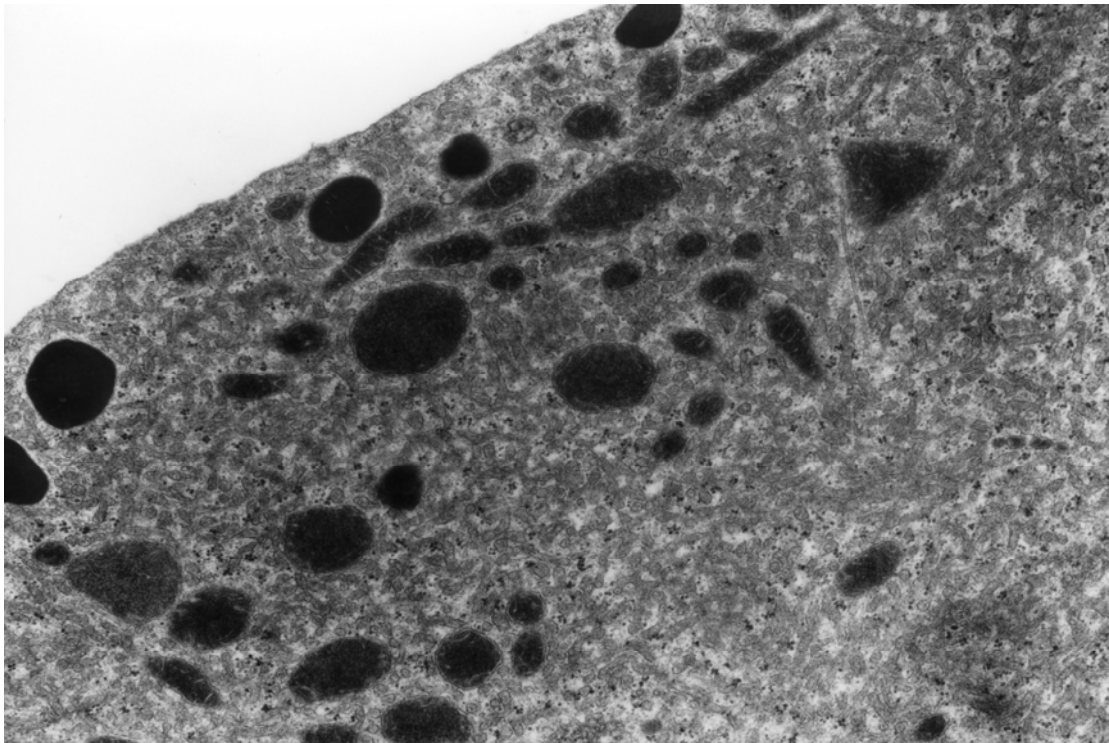
1 μm

Obr. 6: Hlubší oblast cytoplazmy řasinkové buňky obsahující vezikuly s heterogenním obsahem a multivezikulární tělíska. Kontrolní králík, původní zvětšení 10.000x



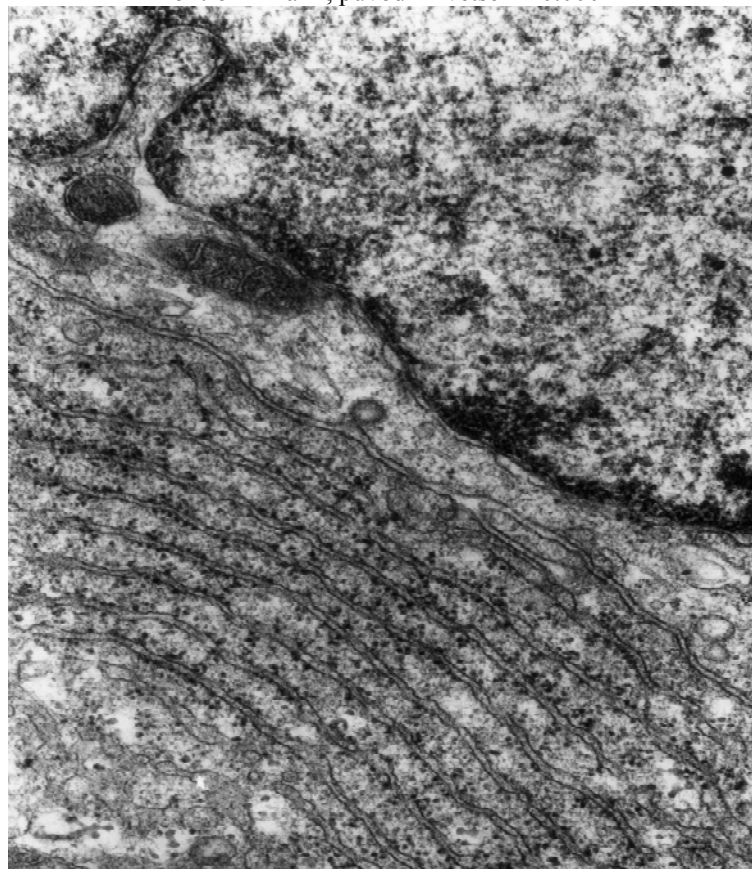
1 μm

Obr. 7: Intracytoplazmatická řasinková vakuola v cytoplazmě řasinkové buňky obsahující intaktní i malformované kinocilie, mikrotubuly a jemný fibrogranulární materiál. Kontrolní králík, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu\text{m}$

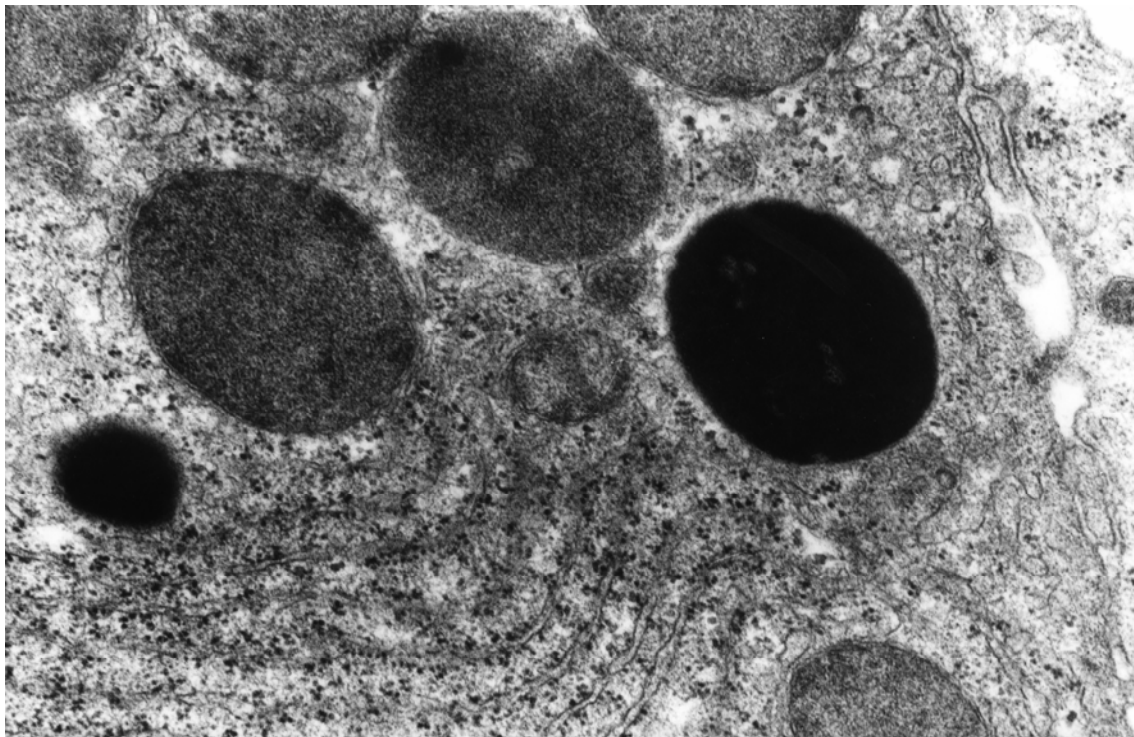
Obr. 8: Apikální část Clara buňky se sekrečními granuly a s četnými mitochondriemi různé velikosti. Kontrolní králik, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu\text{m}$

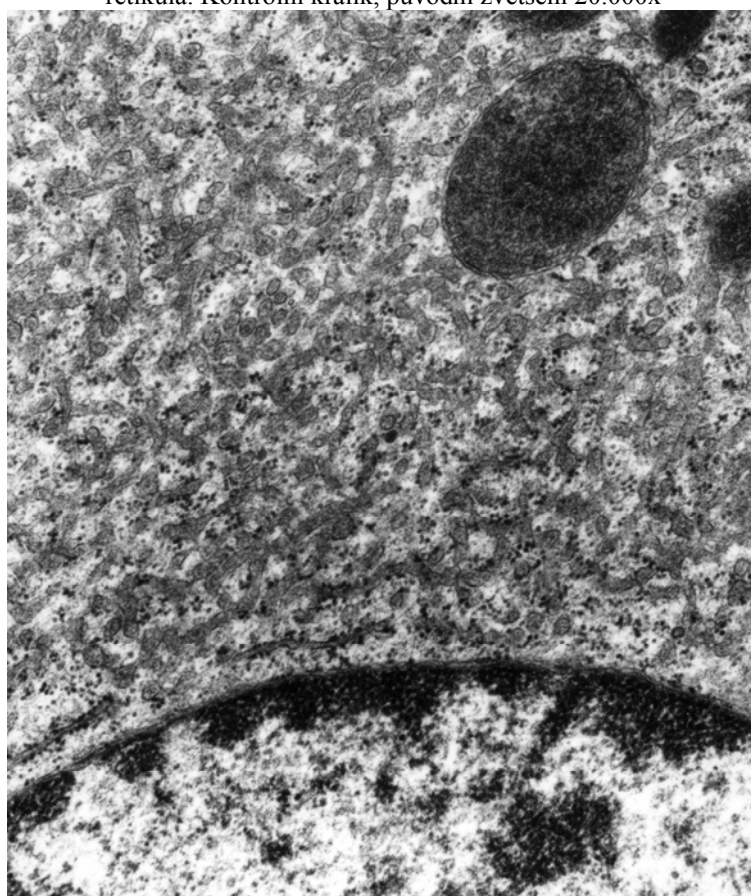
Obr. 9: Část jádra a bazální oblast cytoplazmy Clara buňky s paralelně uspořádanými cisternami granulárního endoplazmatického retikula. Kontrolní králik, původní zvětšení 20.000x





1  $\mu$ m

Obr. 10: Perinukleární oblast cytoplazmy Clara buňky s elektronově denzními sekrečními granuly, sférickými mitochondriemi a paralelně uspořádanými cisternami granulárního endoplazmatického retikula. Kontrolní králík, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

Obr. 11: Část jádra a supranukleární oblast cytoplazmy Clara buňky s typickým hladkým endoplazmatickým retikulem a mitochondriemi. Kontrolní králík, původní zvětšení 15.000x

## Diskuse

Mezidruhové rozdíly v ultrastruktuře buněk epitelu terminálních bronchiolů, především Clara buněk, byly již tématem několika srovnávacích studií. V rozsáhlé studii srovnávající ultrastrukturu Clara buněk u 17 resp. 15 druhů savců rozdělil Plopper tyto buňky do 3 typů (Plopper 1983, Plopper a spol. 1980a). Do prvního typu řadil cylindrické Clara buňky s apikální částí cytoplazmy prominující nad úroveň okolního epitelu, s četnými elektronově denzními sekrečními granuly, s výrazně vyvinutým hladkým endoplazmatickým retikulem v oblasti apexu, s dobře vyvinutým granulárním endoplazmatickým retikulem v bazální cytoplazmě, s nepříliš hojnými inkluzemi glykogenu a s četnými mitochondriemi. Takovéto Clara buňky našel Plopper se spolupracovníky u králíka, myši, křečka, potkana, morčete, prasete, koně, ovce a lamy. Charakter Clara buněk prvního typu je většinou dalších autorů považován za typický pro tyto buňky bez ohledu na živočišný druh (Kilburn 1974, Jeffery 1983, Gail a Lenfant 1983). Druhý typ Clara buněk podle Plopperovy klasifikace se vyznačuje spíše kubickým tvarem bez apikální cytoplazmatické projekce, velmi dobře vyvinutým granulárním endoplazmatickým retikulem, málo vyvinutým hladkým endoplazmatickým retikulem a glykogenem a hojnými sekrečními granuly. Tento typ Plopper popsal u primátů včetně člověka. Nejnápadnějším znakem třetího typu Clara buněk je velké množství glykogenu, který téměř vyplňuje cytoplazmu. Tyto buňky nemají příliš hojná sekreční granula, endoplazmatické retikulum ani mitochondrie a Plopper je našel se u psa, kočky, skotu a fretky. Tyto mezidruhové rozdíly potvrdil ve své srovnávací studii také Smith se spolupracovníky (Smith a spol. 1979). V naší studii jsme rovněž potvrdili Plopperův nálezný a zařadili jsme Clara buňky králíků do jeho první skupiny.

Ultrastruktura buněk epitelu terminálních bronchiolů králíků byla popsána nejen v uvedených srovnávacích studiích, ale i v řadě dalších prací (Kilburn 1974, Breeze a Wheldon 1977, Jeffery 1983, Gail a Lenfant 1983, Plopper a spol. 1980b). Naše nálezy se shodují s uvedenými popisy tohoto epitelu. Pouze Smith (1979) uvedl nález dilatovaných tubulů hladkého endoplazmatického retikula u zdravých kontrolních králíků. Tento nález však my hodnotíme již jako známku patologické alterace Clara buněk a tento náš názor potvrzují i další autoři (Harkema a spol. 1993, Plopper a spol. 1994b). V Clara buňkách zdravých kontrolních králíků jsme našli nápadně velké, sférické mitochondrie se světlou matrix a jen malým počtem krist. Tyto mitochondrie se v Clara buňkách vyskytovaly současně s mitochondriemi běžných rozměrů protáhlého tvaru, s tmavší matrix a větším počtem krist. Tento náš nález je v souladu s nálezy u králíků několika autorů (Plopper a spol. 1980a,b, Plopper 1983, Smith a spol. 1979). Přítomnost velkých, světlých mitochondrií byla popisována také v Clara buňkách myši, morčete, kočky, prasete a pískomila (Plopper a spol. 1980 a,b,c, Smith a spol. 1979, Spicer a spol. 1990). Spicer se spolupracovníky popsali dokonce v Clara buňkách pískomila ještě třetí tzv. obrovské mitochondrie nebo megamitochondrie veliké 2-3  $\mu\text{m}$  v průměru. Tento nález vysvětlili jako jednu z adaptací buněk pískomila na život v extrémních pouštních podmínkách. U řady savců včetně člověka však nebyly velké mitochondrie popisovány (Plopper a spol. 1980a,b,c, Plopper 1983, Smith a spol. 1979). Jiní autoři považují existenci dvou typů mitochondrií v Clara buňkách za obecný jev bez ohledu na živočišný druh (Kilburn 1974, Breeze a Wheldon 1977).

Kvantitativní přístup k studiu ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů využilo již několik autorů. Jejich nálezy se liší podle živočišných druhů. Mezidruhové rozdíly v zastoupení jednotlivých buněk v epitelu terminálních bronchiolů byly rozpracovány především v srovnávacích studiích Ploppera a spolupracovníků, kde se

percentuální zastoupení neřasinkových Clara buněk pohybuje od přibližně 50% u křečka a skotu až po téměř 100% u kočky a psa (Plopper a spol. 1980b,c, Plopper 1983). U králíků se zastoupení řasinkových buněk v epitelu terminálních bronchiolů pohybuje kolem 35% a neřasinkových resp. Clara buněk kolem 65% (Plopper a spol. 1980b, Plopper 1983, Hyde a spol. 1983). V poslední práci však uvedl Plopper rovnoměrné zastoupení obou buněčných typů (48,7% řasinkových, 47,3% Clara a 3,9% jiných nebo nezařaditelných buněk) (Plopper a spol. 1983a), což je již v souladu s našimi výsledky.

Nálezy v epitelu trachey zdravých kontrolních králíků (Konrádová 1966), které jsme použili pro srovnání s nálezy v epitelu terminálních bronchiolů, se neliší od dalších popisů ultrastruktury tohoto epitelu (Pavelka a spol. 1976, Nordin 1977). Typický byl relativně malý počet pohárkových buněk a jejich izolovaný výskyt. Také stupeň stimulace pohárkových buněk byl minimální, pouze 3% z nich uvolňovalo hlen z jednotlivých apikálně uložených sekrečních granul. V pravidelném řasinkovém lemu, který lemoval epitel trachey, bylo celkem 1,2% alterovaných kinocilií. U kontrolních zdravých myší našli Ranga a Kleinerman srovnatelný počet alterovaných řasinek - 1,5% (Ranga a Kleinerman 1981), naproti tomu Bryan alterované řasinky v tracheálním řasinkovém lemu myší nenalezl vůbec (Bryan 1983). Nález 0,4% malformovaných řasinek v řasinkovém lemu trachey zdravých králíků se blíží odhadu zastoupení malformovaných řasinek v řasinkovém lemu trachey zdravých morčat (0,1%) (Dalen 1981), poněkud vyšší zastoupení malformovaných řasinek bylo popsáno v tracheálním řasinkovém lemu psa (Wilsman a spol. 1987).

## **B. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po celkové aplikaci acetylcholinu**

### **1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 minut po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu**

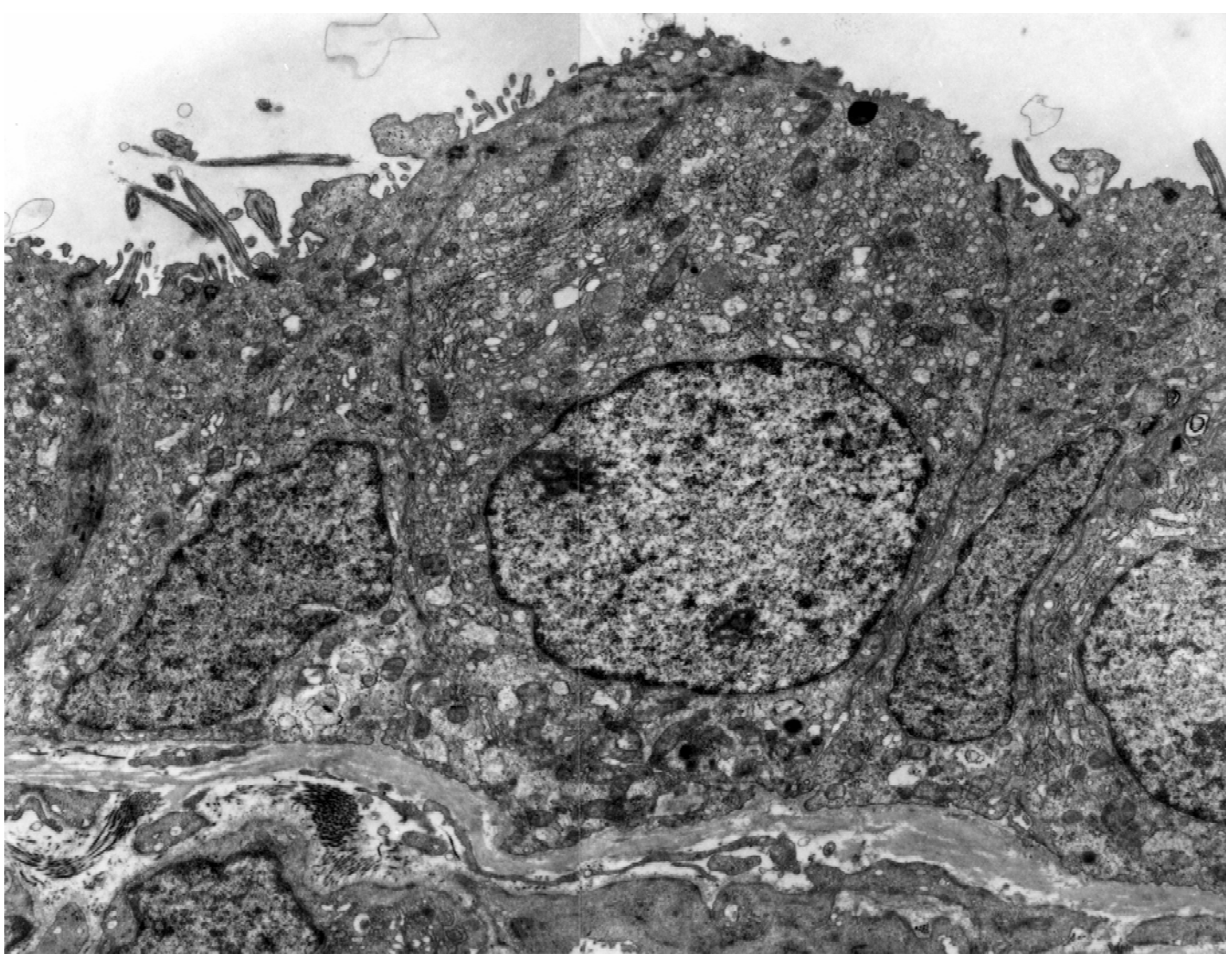
Pět minut po aplikaci 0,5 mg acetylcholinu jsme v terminálních bronchiolích našli alterovaný jednovrstevný epitel obsahující řasinkové a Clara buňky (obr. 12). Řasinkové buňky tvořily  $42,5 \pm 8,9\%$  buněk epitelu, Clara buňky pak představovaly zbývajících  $57,5 \pm 8,9\%$  (tab. 9, graf 1). Intercelulární prostory byly úzké a apikální spojovací komplexy zůstaly intaktní (obr. 13).

Řasinkové buňky obsahovaly v cytoplazmě rozsáhlé lysosomy a četné drobnější vezikuly. Jejich mitochondrie byly alterované s elektronově lucidním obsahem a narušeným systémem krist. Cisterny Golgiho komplexu byly dilatované (obr. 14). Na apikálních površích řasinkových buněk jsme pozorovali tvorbu cytoplazmatických protruzí, do nichž byly často zavzaty rozpadající se axonémy kinocilií (obr. 15). Častý byl i výskyt méně poškozených, patologických řasinek, kde dochází k lokálnímu zduření nebo se objevují drobné vezikuly mezi axonémou a řasinkovou membránou.

Hlavním nálezem v Clara buňkách byla dilatace tubulů hladkého endoplazmatického retikula, jež byla v jednotlivých buňkách různě výrazná. V některých Clara buňkách jsme našli extrémně dilatované prostory a cytoplazma buněk jevila známky vakuolární degenerace (obr. 16). U těchto buněk někdy docházelo k narušení apikální buněčné membrány a zbytky výrazně alterované cytoplazmy Clara buněk jsme našli i nad epitelem v luminu terminálních bronchiolů (obr. 17). V méně poškozených Clara buňkách jsme často našli alterované mitochondrie a dilatované prostory granulárního endoplazmatického retikula (obr. 18).  $81,1 \pm 16,8\%$  Clara buněk

obsahovalo v cytoplazmě sekreční granula (tab. 9, graf 2). Pouze ojediněle jsme pozorovali známky sekrece, kdy se sekreční granula přikládala svou membránou velice těsně k apikální buněčné membráně nebo se na apikálních površích buněk tvořily drobné cytoplazmatické výběžky obsahující granula (obr. 19).

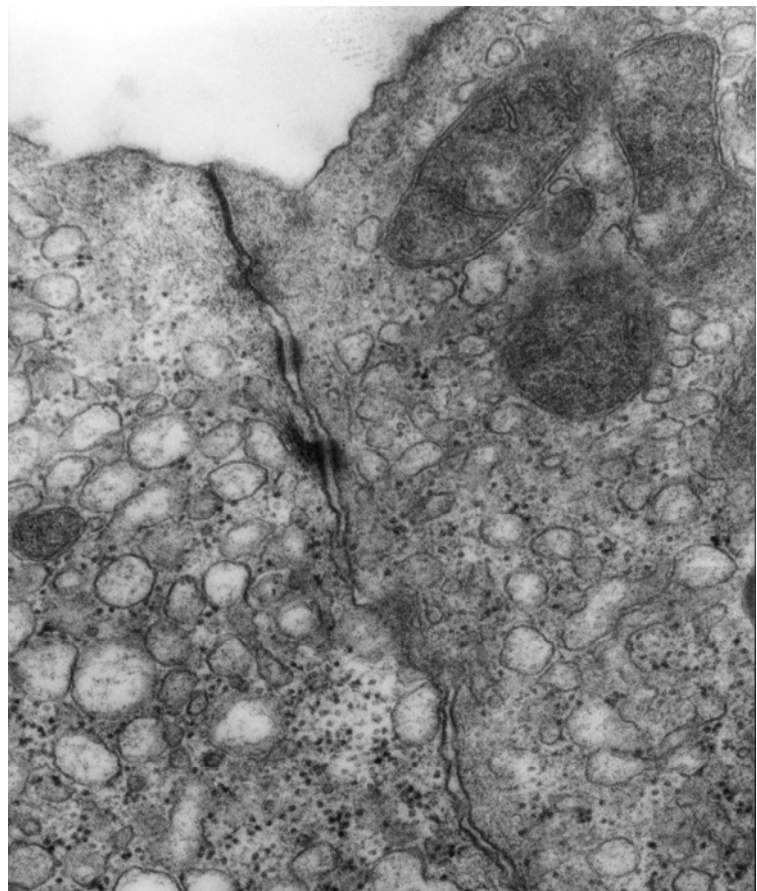
V supranukleární cytoplazmě Clara buněk jsme napočítali  $0,20 \pm 0,14$  granul a  $0,83 \pm 0,21$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Sekreční granula měla průměrnou plochu  $0,09 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ , mitochondrie pak  $0,18 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  (tab. 9).



1  $\mu$ m

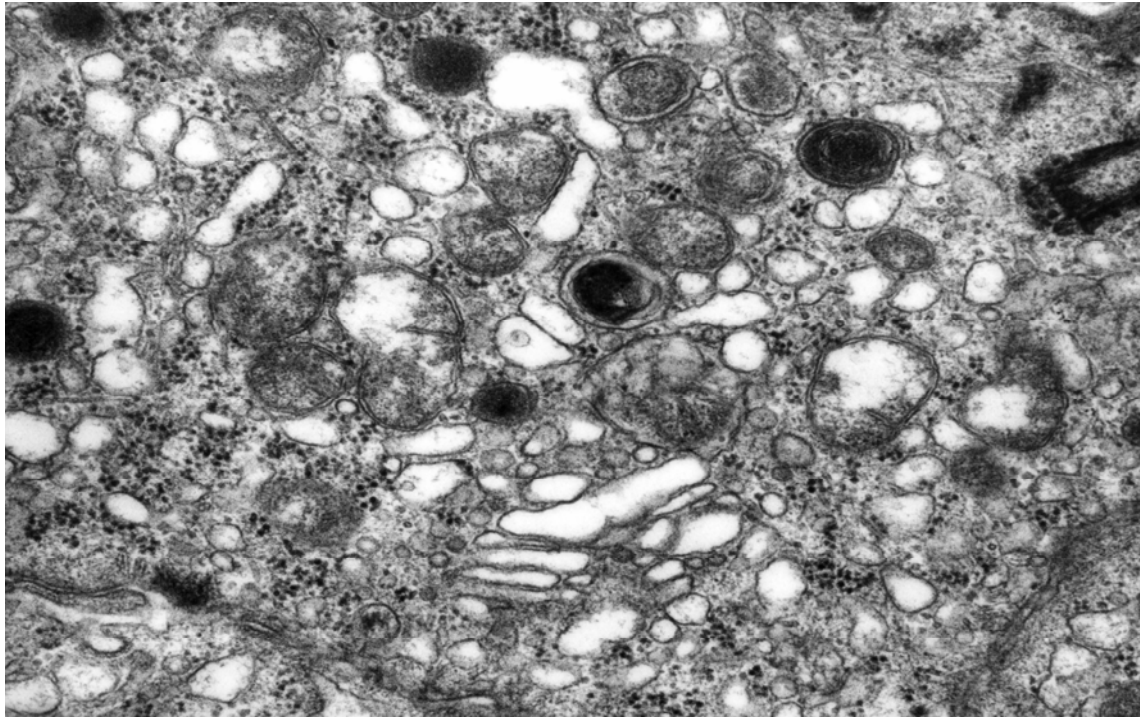
Obr. 12: Úsek epitelu terminálního bronchiolu obsahující jednu Clara buňku a dvě řasinkové buňky. Na povrchu řasinkových buněk se nacházejí drobné cytoplazmatické protruze narušující pravidelné uspořádání řasinek, cytoplazma Clara buňky obsahuje dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula.

5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 4.000x



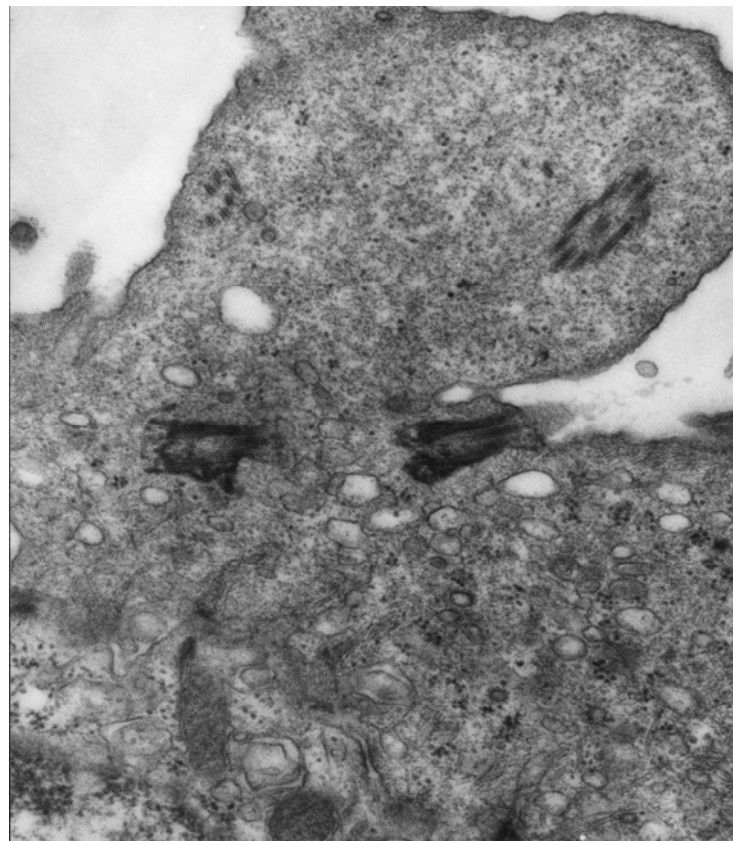
1  $\mu$ m

Obr. 13: Intaktní apikální spojovací komplex mezi dvěma lehce alterovanými Clara buňkami, 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

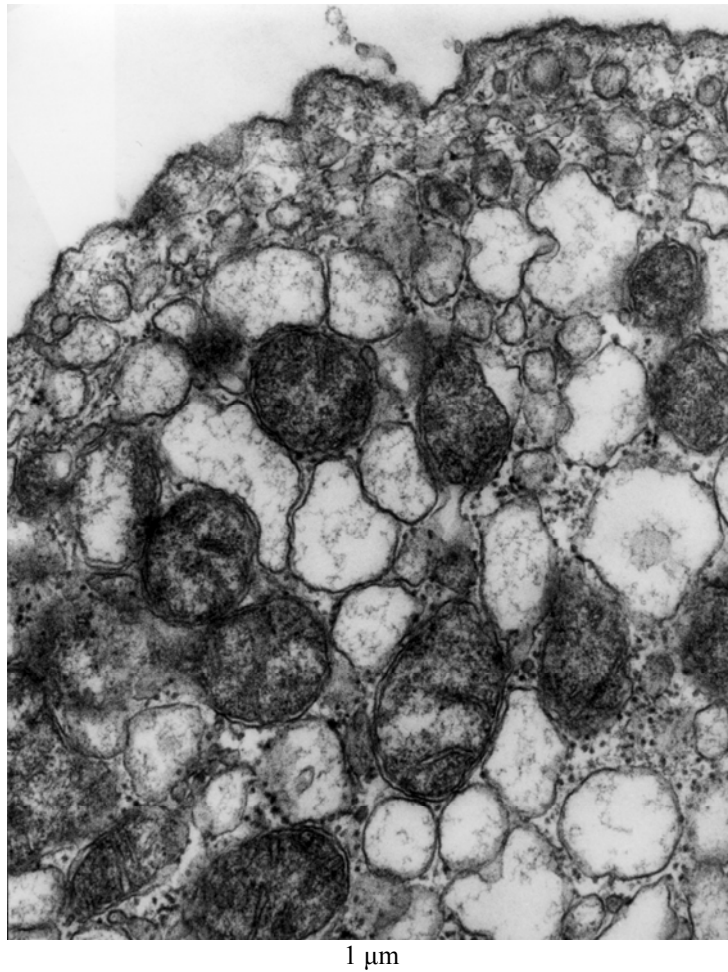
Obr. 14: Lysosomy s heterogenním obsahem, alterované mitochondrie a dilatované cisterny Golgiho komplexu i endoplazmatického retikula v cytoplazmě alterované řasinkové buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



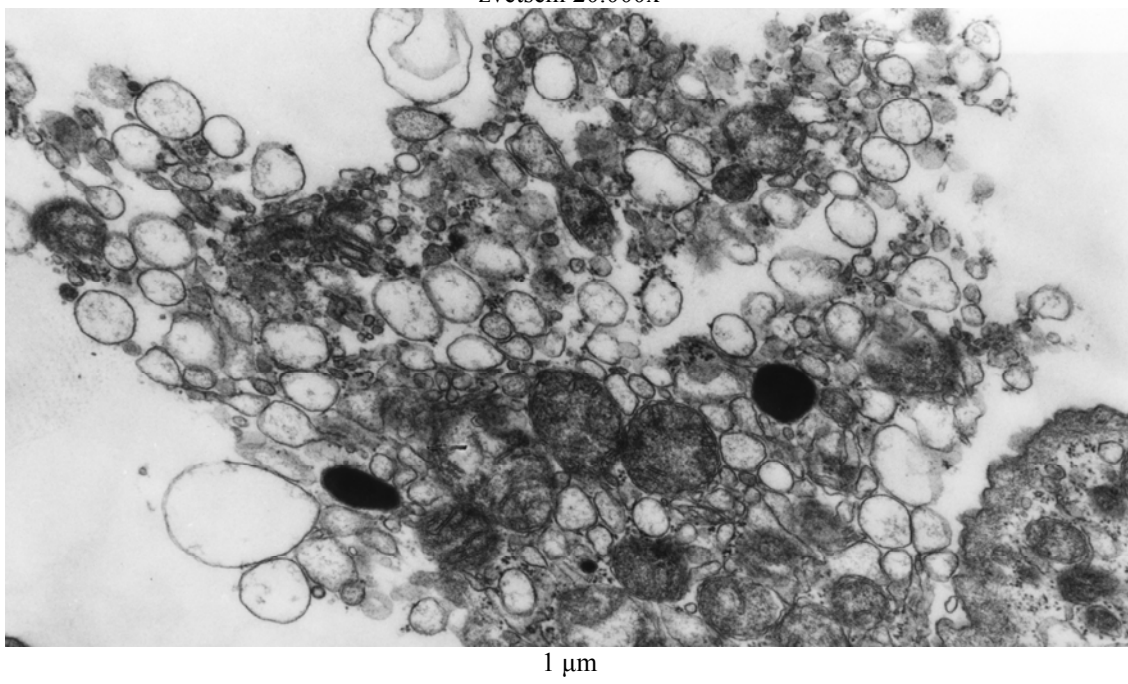
1  $\mu$ m

Obr. 15: Cytoplazmatická protruze na apikálním povrchu řasinkové buňky obsahující rozpadající se axonémy dvou zanikajících řasinek. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

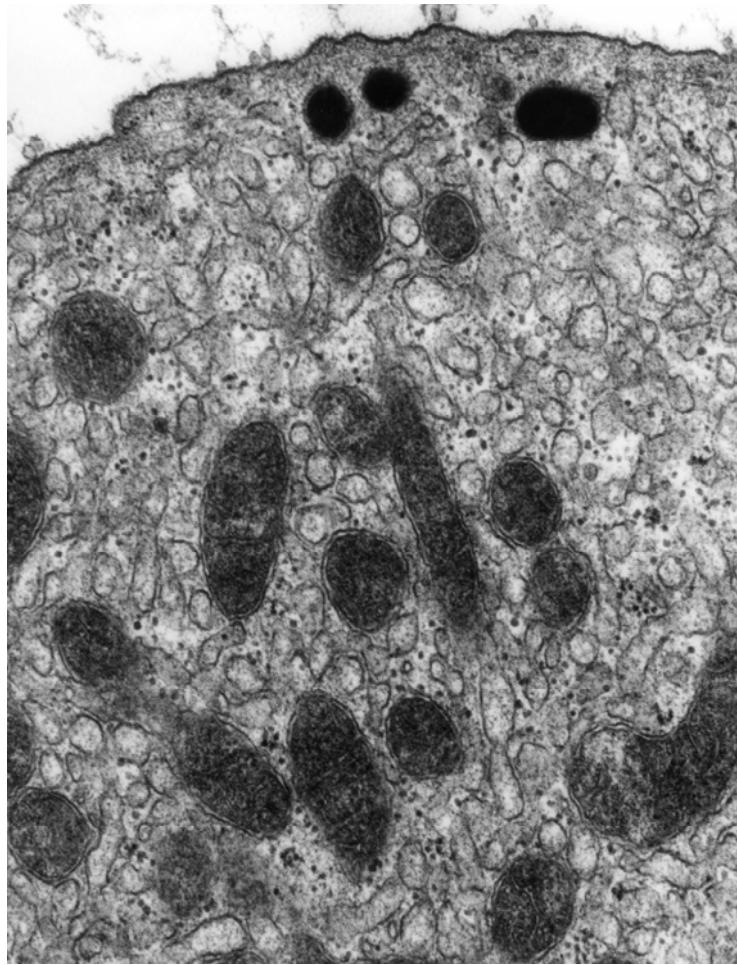




Obr. 16: Výrazně dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a mírně alterované mitochondrie v apikální cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

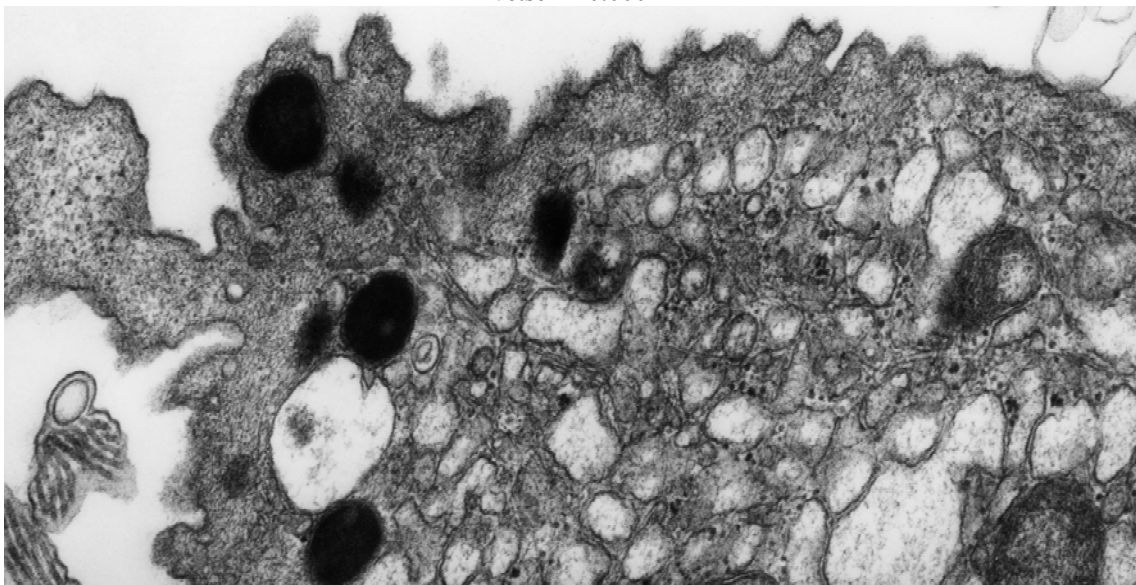


Obr. 17: Zbytky alterované cytoplazmy Clara buňky v lumenu terminálního bronchiolu. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu$ m

Obr. 18: Sekreční granula, dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a lehce alterované mitochondrie v apikální cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

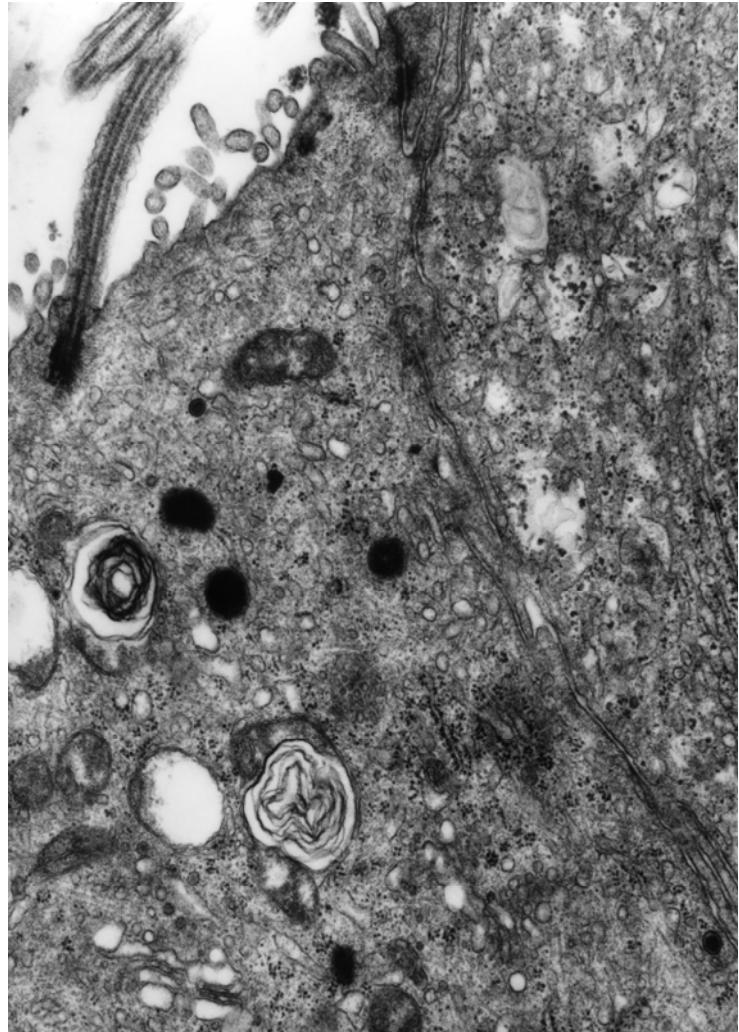
Obr. 19: Cytoplazmatické protruze, z nichž jedna obsahuje sekreční granulum, na apikálním povrchu alterované Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

## **2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 minut po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu**

Dvacet minut po aplikaci 0,5 mg acetylcholinu se celkový vzhled epitelu terminálních bronchiolů neměnil. V epitelu jsme našli  $49,5 \pm 13,5\%$  řasinkových buněk a  $50,5 \pm 13,5\%$  Clara buněk (tab. 9, graf 1). Intercelulární prostory zůstaly úzké a apikální spojovací komplexy intaktní (obr. 20).

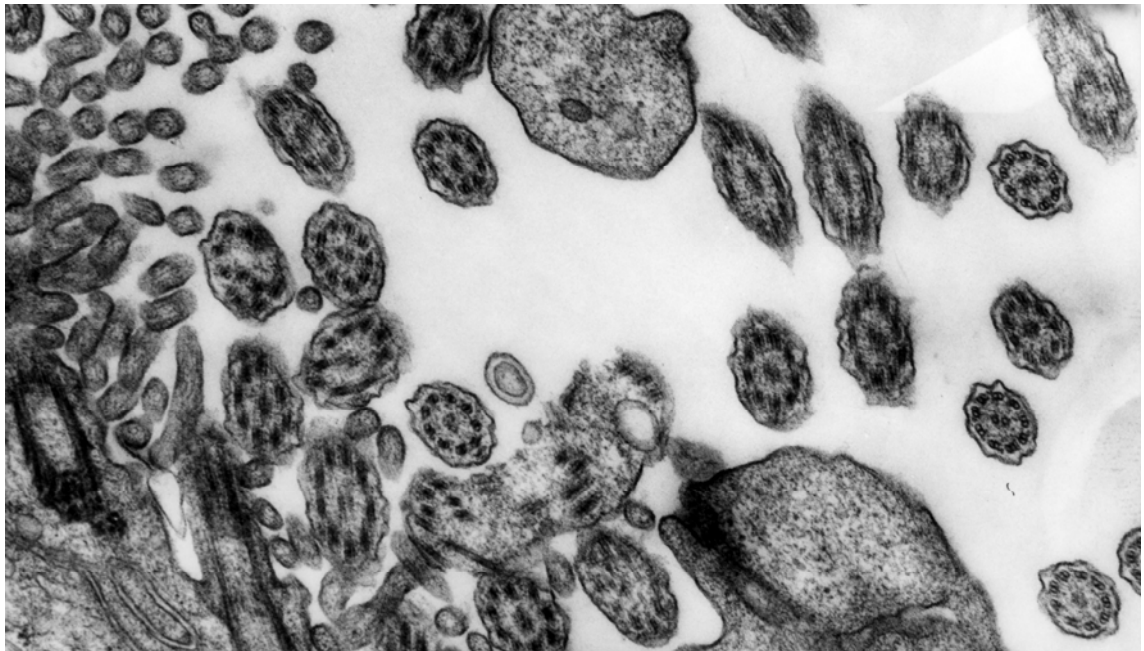
Řasinkové buňky obsahovaly již jen mírně alterované mitochondrie, dilatované cisterny Golgiho komplexu a drobné vezikuly. Zvláště hojné byly lysosomy (obr. 20). Pozorovali jsme i výskyt malých intracytoplazmatických řasinkových vakuol. Na apikálních površích řasinkových buněk jsme stále pozorovali cytoplazmatické protruze, v nichž se rozpadaly axonémy části kinocilií (obr. 21). Častěji než u předchozí skupiny jsme zaznamenali výskyt diferencujících se řasinkových buněk (obr. 22).

Clara buňky obsahovaly stále dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, jejich dilatace však již nedosahovala takového stupně jako v předchozí skupině (obr. 23). Mezi jednotlivými Clara buňkami byly opět rozdíly v rozsahu dilatace hladkého endoplazmatického retikula (obr. 24). Sekreční granula jsme našli jen v  $63,4 \pm 24,1\%$  Clara buněk (tab. 9, graf 2). Na apikálních površích jsme často pozorovali tvorbu protruzí obsahujících sekreční granula nebo přítomnost granul v kontaktu s buněčnou membránou (obr. 25). V supranukleární cytoplazmě Clara buněk jsme našli  $0,13 \pm 0,11$  granul a  $0,81 \pm 0,12$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Sekreční granula měla průměrnou plochu  $0,10 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ , mitochondrie  $0,24 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$  (tab. 9).



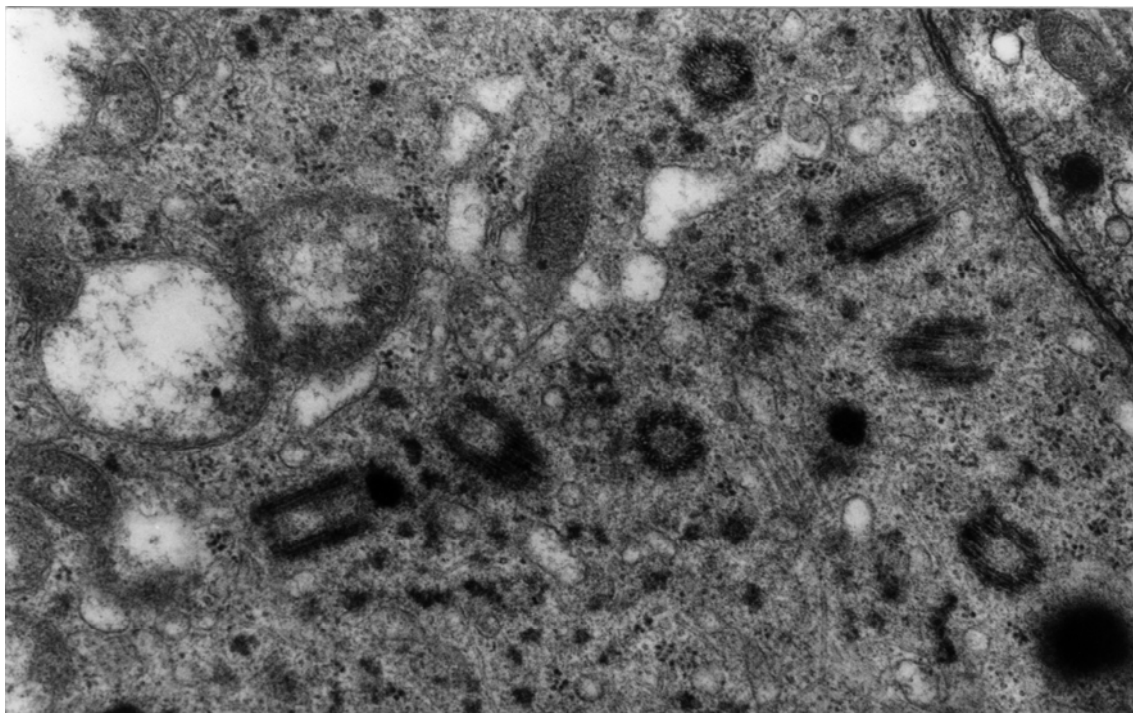
1 μm

Obr. 20: Intaktní apikální spojovací komplex mezi řasinkovou a Clara buňkou. Řasinková buňka obsahuje četné lysosomy s heterogenním obsahem, dilatovaný Golgiho komplex a alterované mitochondrie. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 10.000x



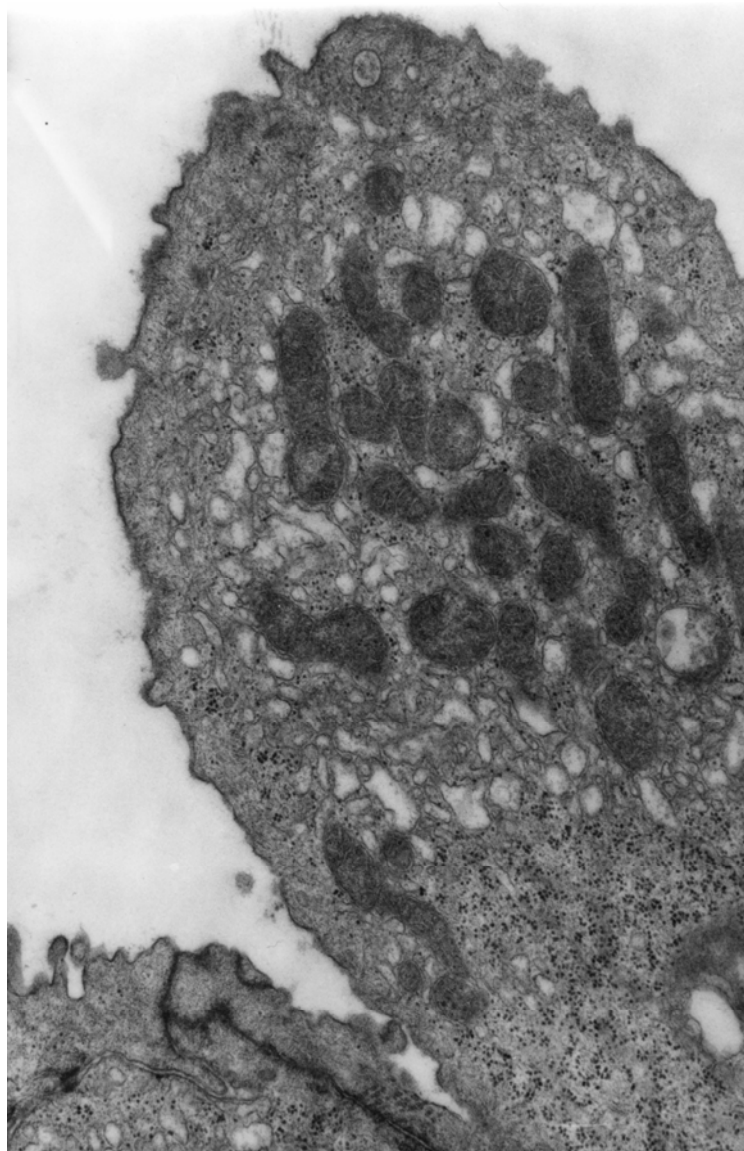
1 μm

Obr. 21: Cytoplazmatické protruze na apikálním povrchu řasinkové buňky, v nichž se rozpadají axonémy řasinek. Byla zde zachycena i malformovaná řasinka, kde došlo k výrazné dislokaci elementů axonémy. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



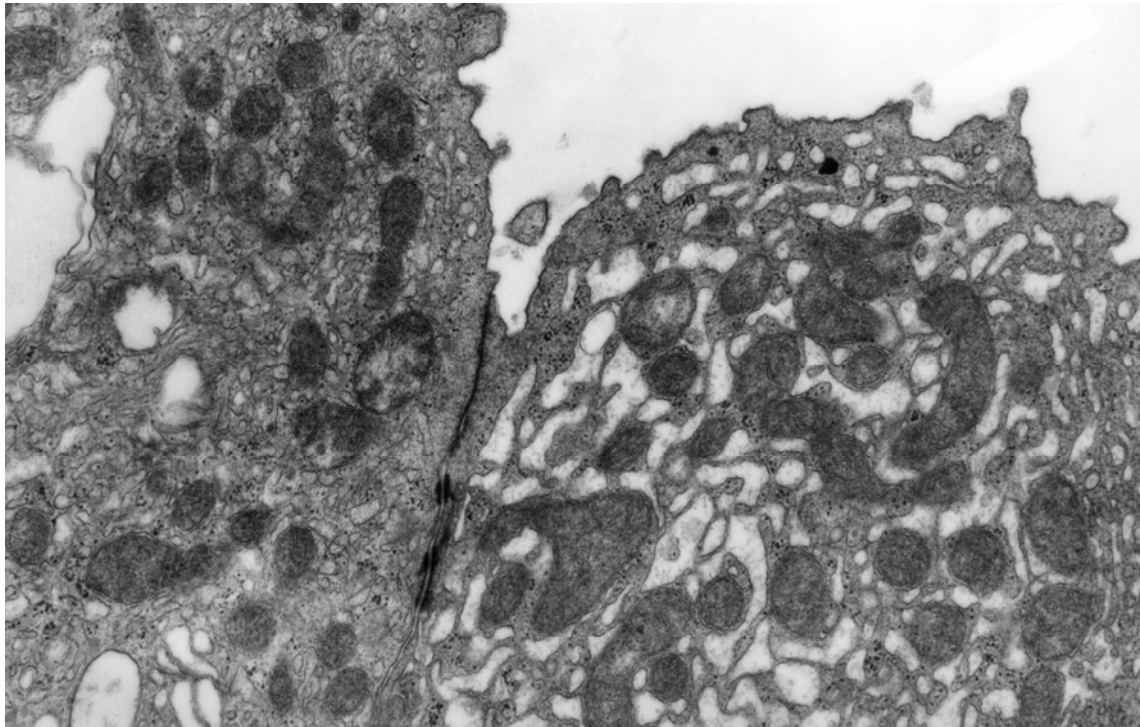
1  $\mu$ m

Obr. 22: Část cytoplazmy diferencující se řasinkové buňky s nepravidelně uspořádanými bazálními tělísky budoucích kinocilií. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



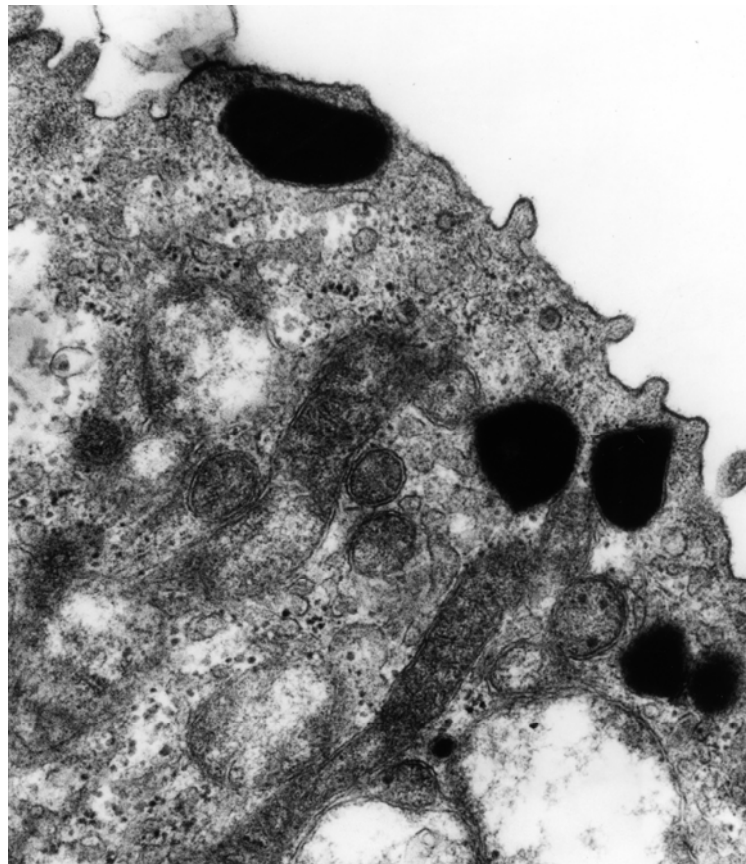
1  $\mu$ m

Obr. 23: Apikální část cytoplazmy Clara buňky s dilatovanými tubuly hladkého endoplazmatického retikula a lehce alterovanými mitochondriemi. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 10.000x



1 μm

Obr. 24: Apikální část cytoplazmy dvou sousedních Clara buněk s rozdílným stupněm dilatace tubulů hladkého endoplazmatického retikula a alterace mitochondrií. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 10.000x



1 μm

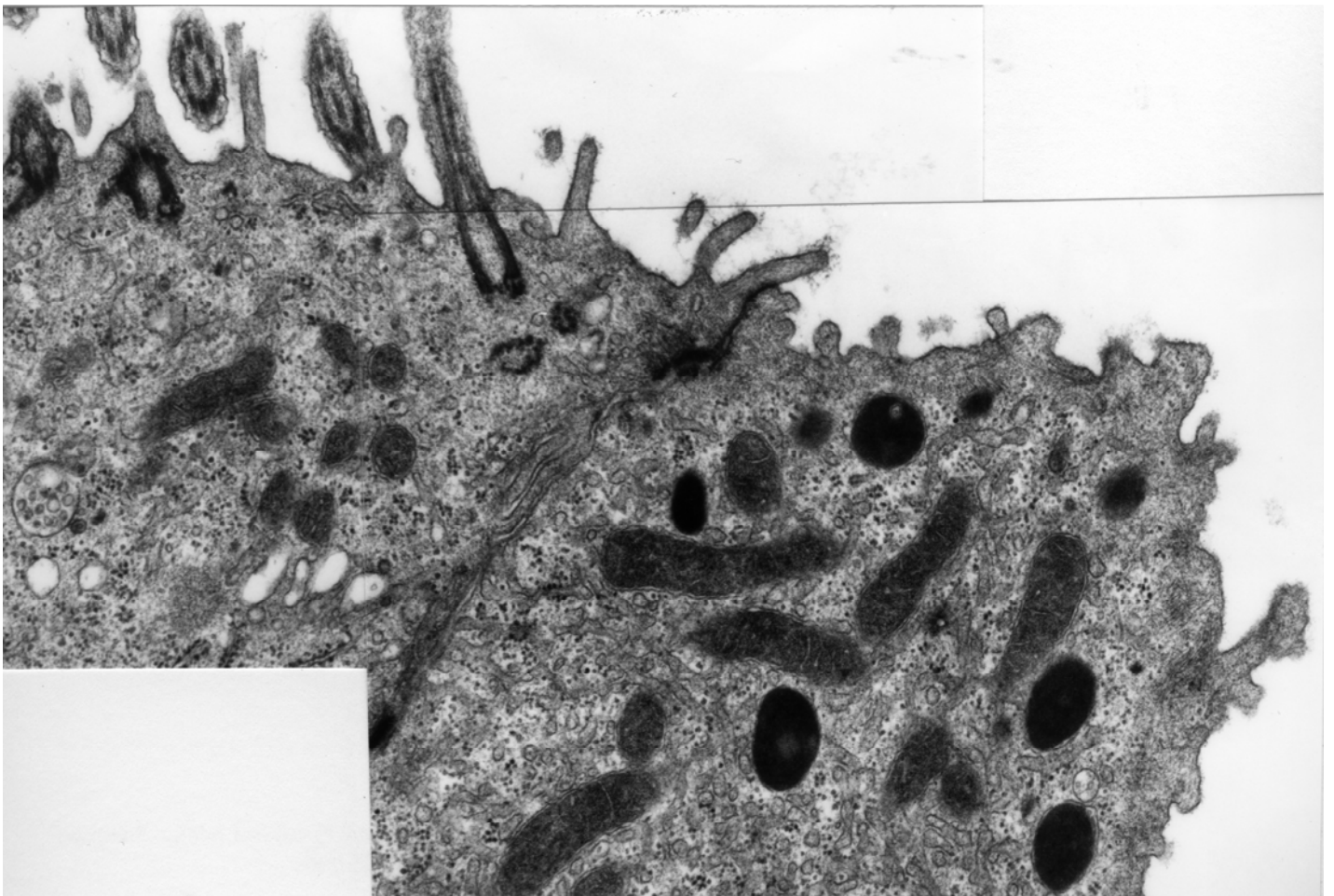
Obr. 25: Sekreční granula v apikální části alterované cytoplazmy Clara buňky. Jedno z nich je v těsném kontaktu s buněčnou membránou. 20 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

### **3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 minut po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu**

Pět minut po aplikaci 0,1 mg acetylcholinu jsme našli v terminálních bronchiolích králíků jen mírně alterovaný epitel (obr. 26) složený z  $44,1 \pm 0,9\%$  řasinkových buněk a  $55,9 \pm 0,9\%$  Clara buněk (tab. 9, graf 1).

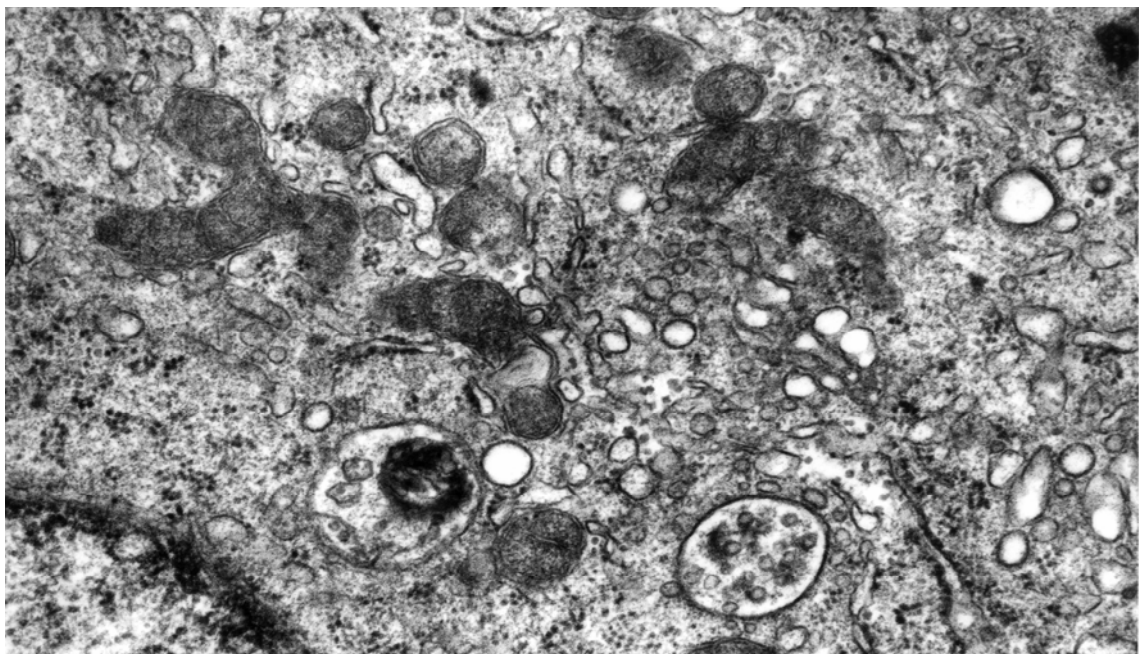
V cytoplazmě řasinkových buněk jsme pozorovali mírné zmnožení lysosomů, multivezikulárních tělísek a drobných vezikul (obr. 27). Golgiho komplex byl často dilatován (obr. 28).

V cytoplazmě některých Clara buněk jsme našli lehkou dilataci tubulů hladkého endoplazmatického retikula (obr. 29), mitochondrie byly intaktní nebo jen lehce alterované (obr. 30).  $84,0 \pm 11,5\%$  Clara buněk obsahovalo v cytoplazmě elektronově denzní sekreční granula (tab. 9, graf 2). Výskyt morfologických známek uvolňování sekretu byl výjimečný (obr. 31). Analýzou obrazu jsme v supranukleární cytoplazmě Clara buněk napočítali  $0,23 \pm 0,16$  granul a  $1,01 \pm 0,34$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Průměrná plocha sekrečních granul byla  $0,11 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ , průměrná plocha mitochondrií pak  $0,16 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  (tab. 9).



1 μm

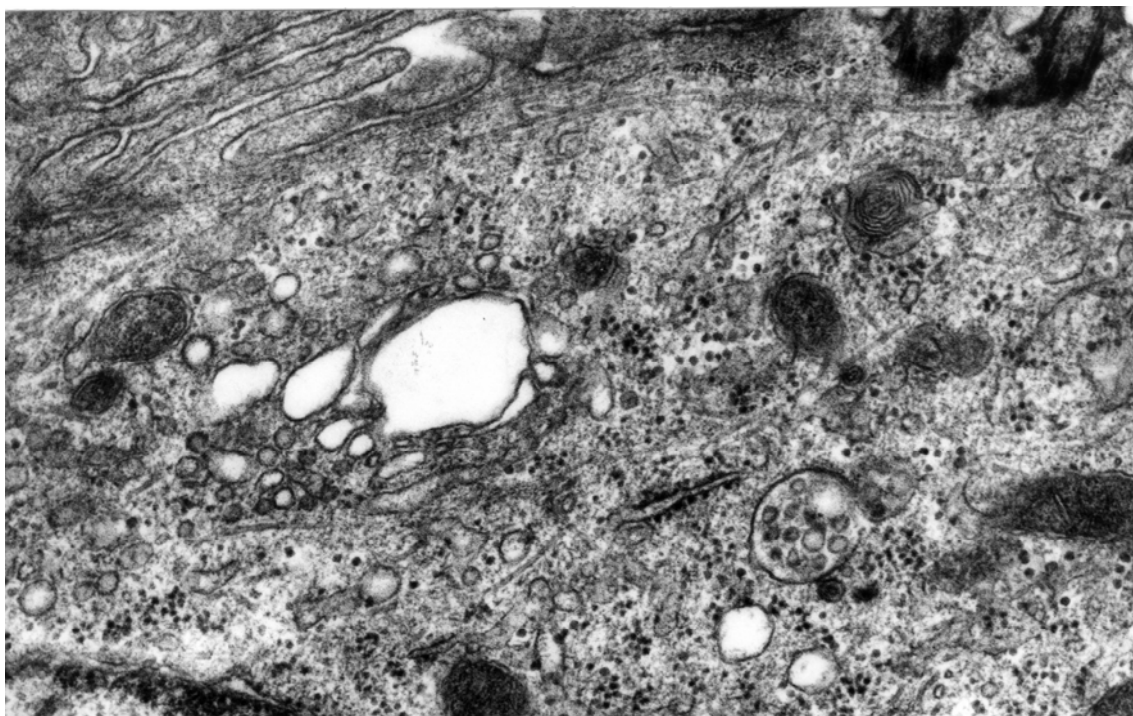
Obr. 26: Apikální část řasinkové a Clara buňky. Řasinková buňka obsahuje multivezikulární tělísko a dilatované cisterny Golgiho komplexu, Clara buňka je intaktní. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 15.000x



1 μm

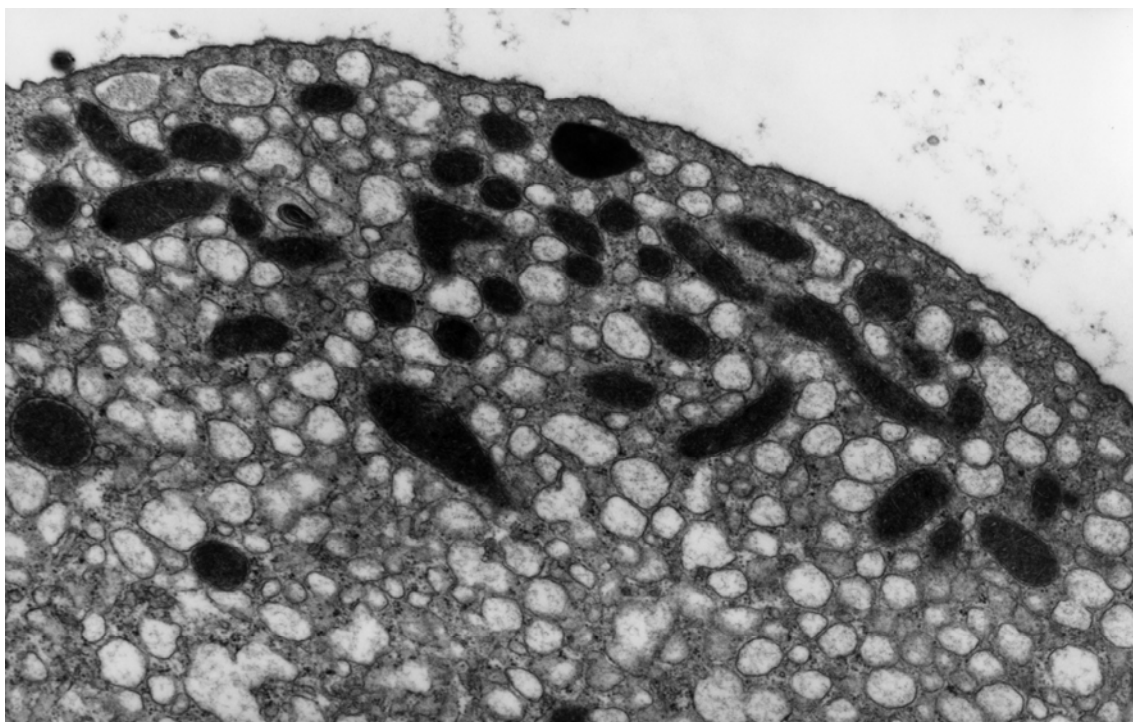
Obr. 27: Lysosom s heterogenním obsahem, multivezikulární tělísko a zmnožené drobné vezikuly v cytoplazmě řasinkové buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x





1  $\mu$ m

Obr. 28: Dilatovaný Golgiho komplex a multivezikulární tělísko v cytoplazmě řasinkové buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 25.000x

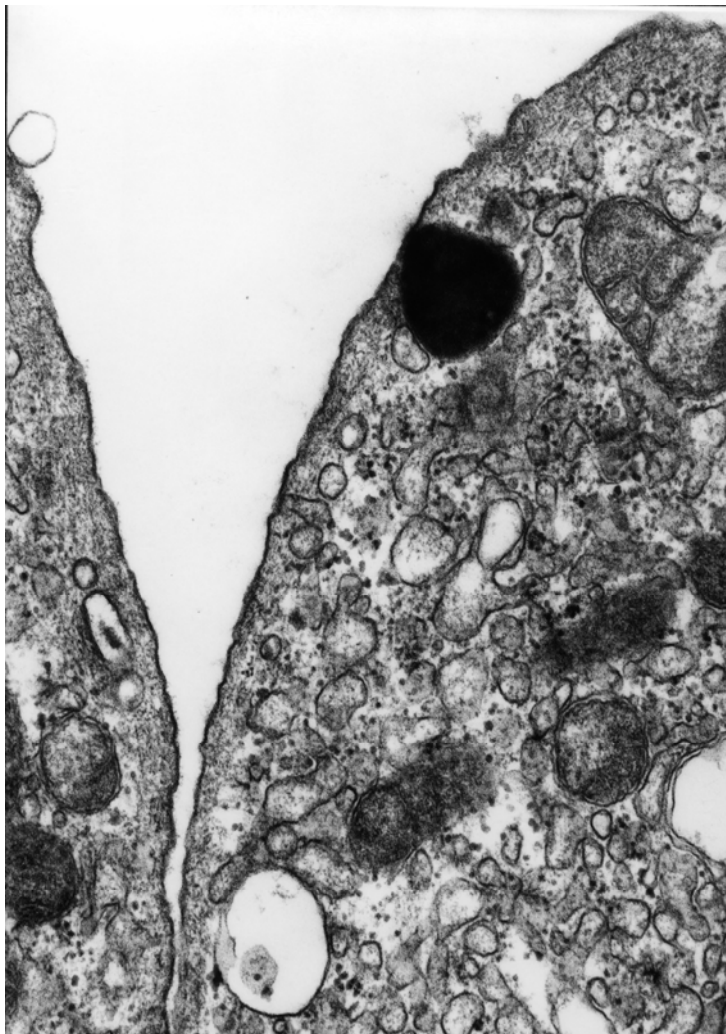
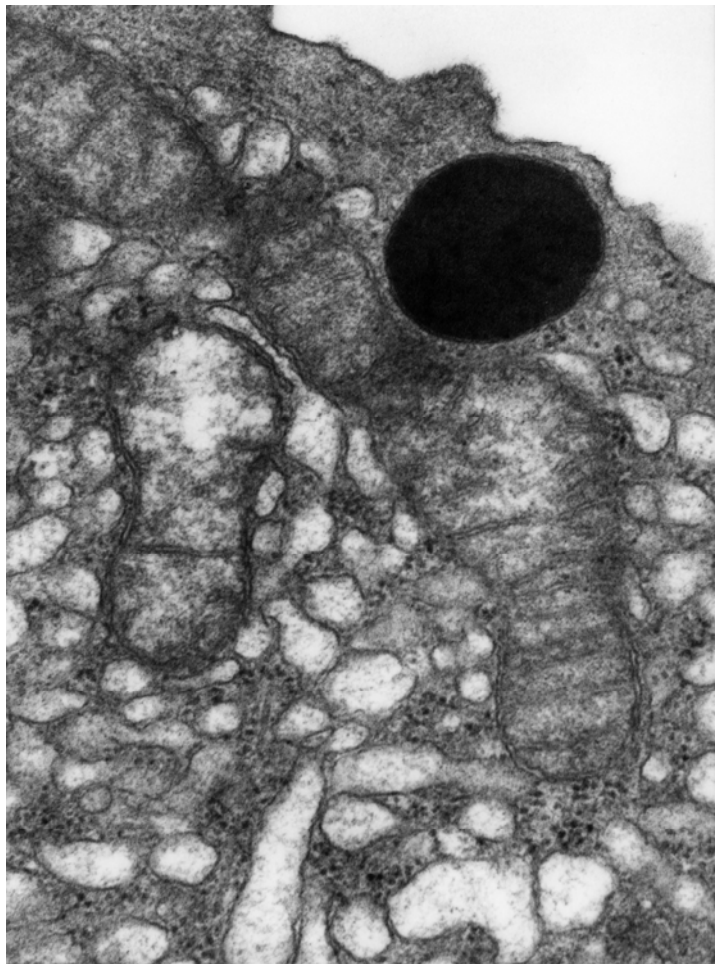


1  $\mu$ m

Obr. 29: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, sekreční granulum a intaktní mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 10.000x

1  $\mu\text{m}$

Obr. 30: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, sekreční granulum a lehce alterované mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 25.000x



1  $\mu\text{m}$

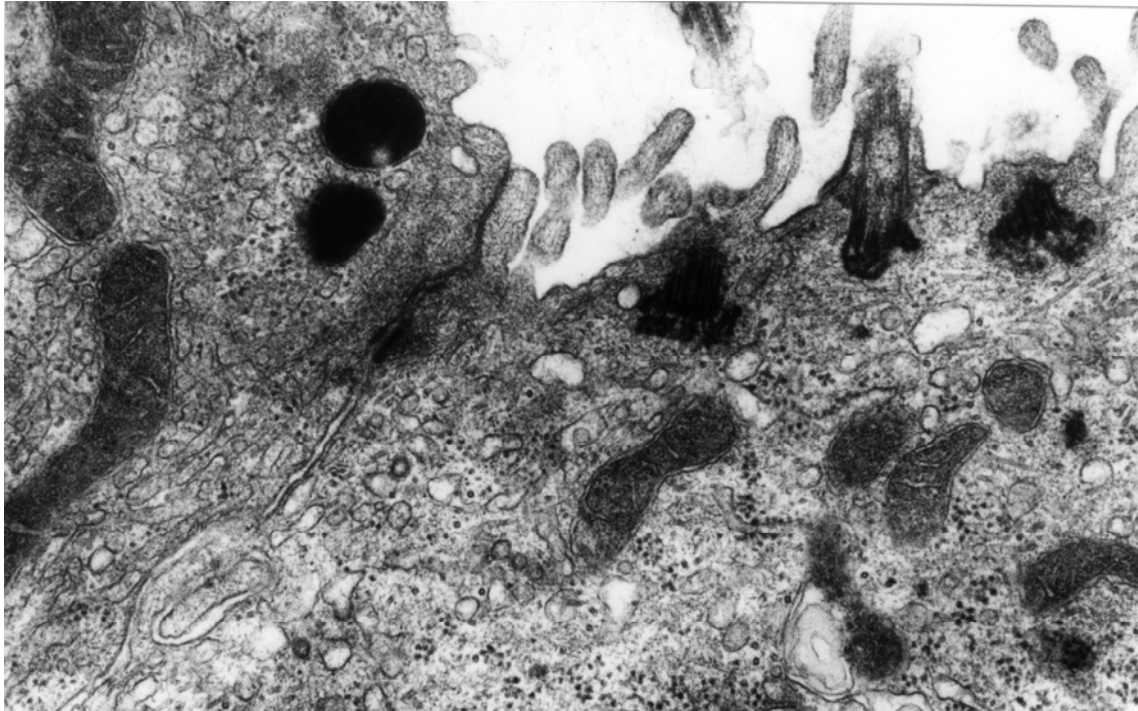
Obr. 31: Sekreční granulum splývající s buněčnou membránou a lehce alterované mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

#### **4) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 minut po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu**

Dvacet minut po aplikaci 0,1 mg acetylcholinu byl epitel terminálních bronchiolů téměř bez známek patologické alterace (obr. 32). V epitelu jsme napočítali  $40,4 \pm 8,1\%$  řasinkových buněk a  $59,6 \pm 8,1$  Clara buněk (tab. 9, graf 1).

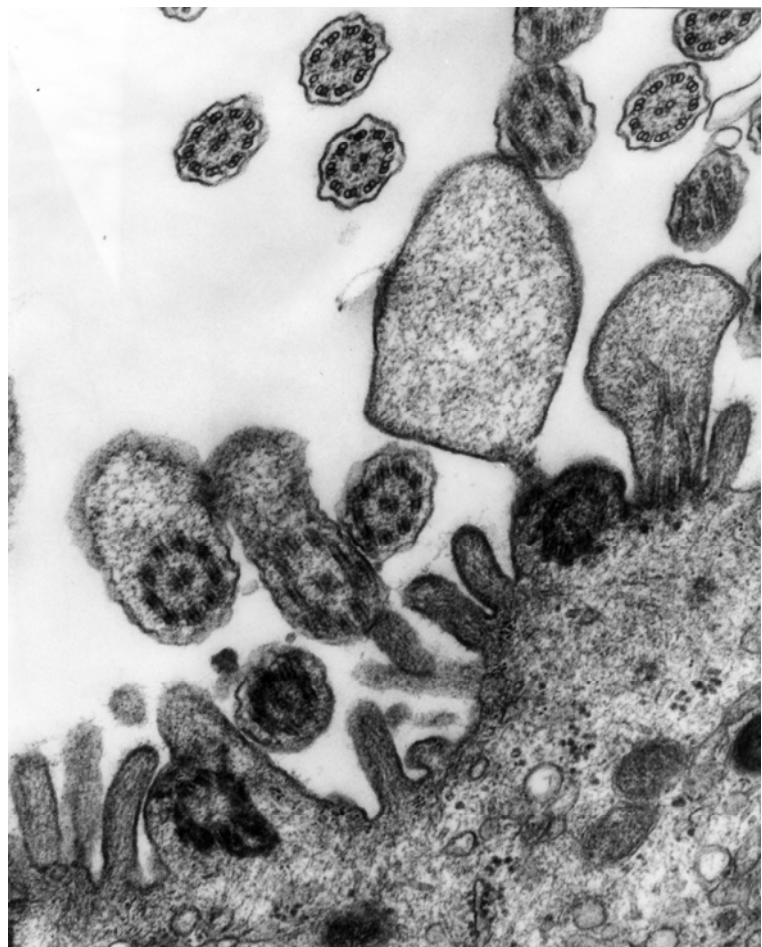
Na apikálních površích řasinkových buněk se tvořily poměrně četné drobné cytoplazmatické protruze (obr. 33). V cytoplazmě řasinkových buněk jsme pozorovali lysosomy s heterogenním obsahem (obr. 34).

V jinak intaktní cytoplazmě Clara buněk jsme vzácně pozorovali známky exocytózy obsahu sekrečních granul (obr. 35). Z celkového množství Clara buněk  $78,2 \pm 10,4\%$  obsahovalo ve své cytoplazmě sekreční granula (tab. 9, graf 2). V supranukleární cytoplazmě Clara buněk jsme napočítali  $0,19 \pm 0,05$  granul a  $1,11 \pm 0,34$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Průměrná plocha sekrečních granul byla  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$ , průměrná plocha mitochondrií pak  $0,13 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$  (tab. 9).



1 μm

Obr. 32: Intaktní spojovací komplex mezi apikálními částmi řasinkové a Clara buňky. Řasinková buňka obsahuje zmnnožené drobné vezikuly. 20 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x

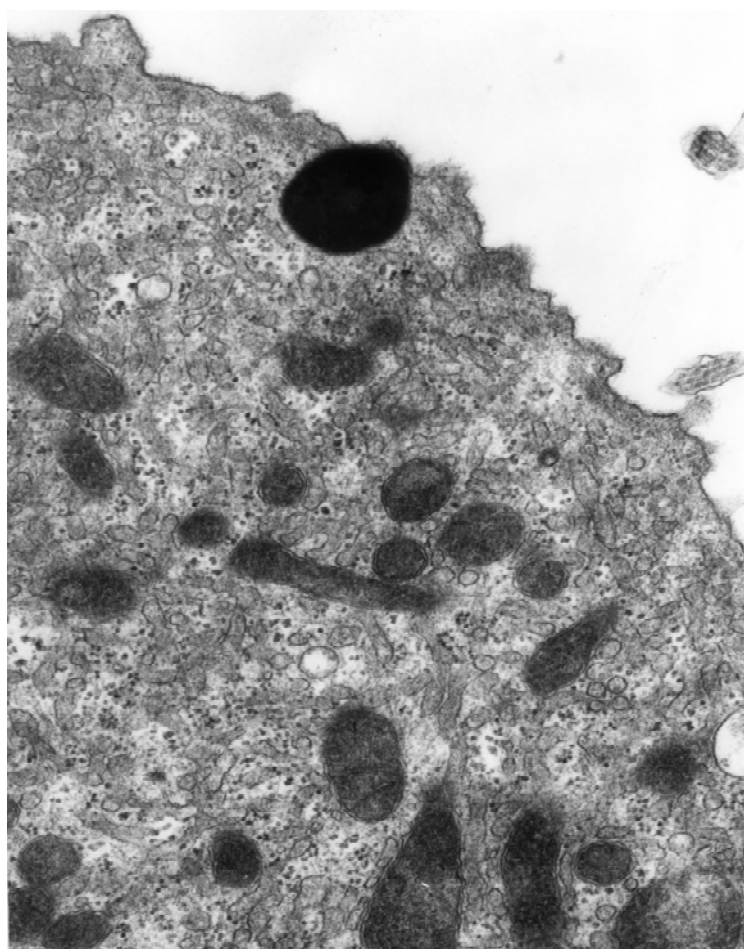
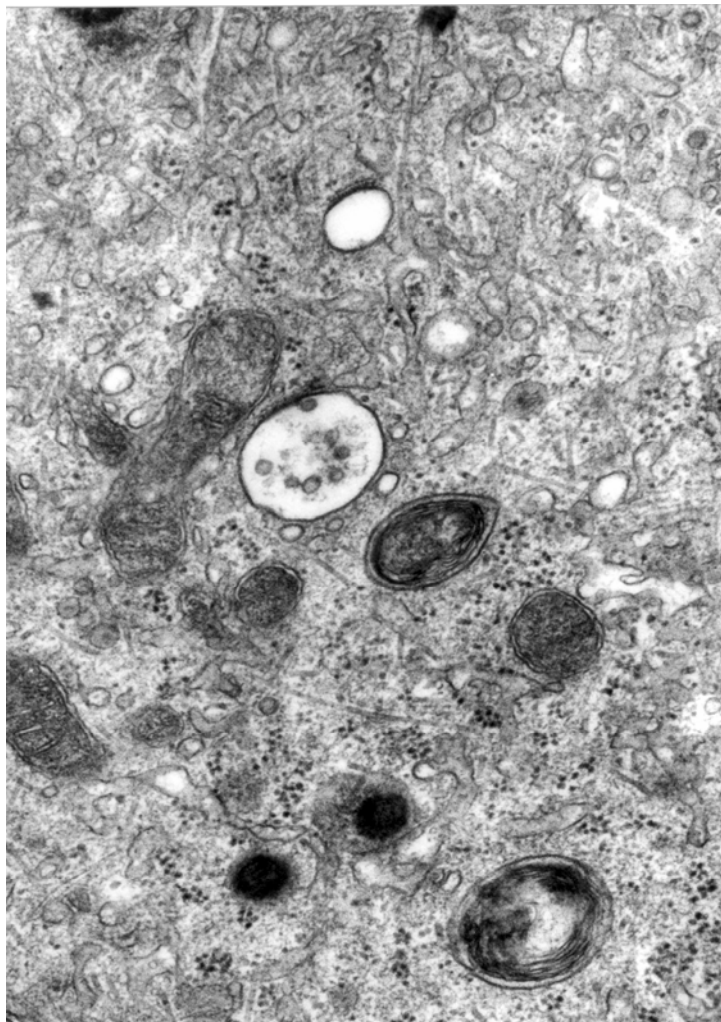


1 μm

Obr. 33: Drobné cytoplazmatické protruze narušující pravidelné uspořádání řasinek na apikálním povrchu řasinkové buňky. Některé obsahují axonémy zanikajících kinocilií. 20 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 25.000x

1  $\mu$ m

Obr. 34: Lysosomy s heterogenním obsahem a multivezikulární tělísko v cytoplazmě řasinkové buňky. 20 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

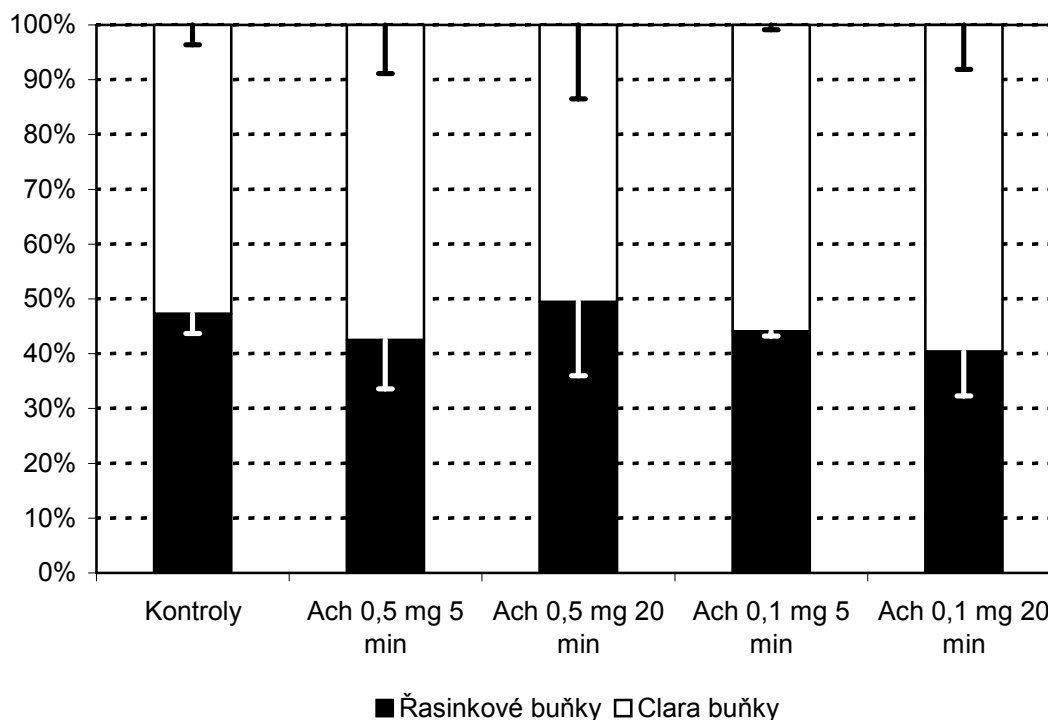
Obr. 35: Sekreční granulum splývající s buněčnou membránou v intaktní cytoplazmě Clara buňky. 20 min po i.v. aplikaci 0,1 mg acetylcholinu, původní zvětšení 15.000x

Tab. 9: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 0,5 a 0,1 mg acetylcholinu

	Kontroly	Acetylcholin 0,5 mg 5 min	Acetylcholin 0,5 mg 20 min	Acetylcholin 0,1 mg 5 min	Acetylcholin 0,1 mg 20 min
Řasinkové buňky (%)	47,3 ± 3,6	42,5 ± 8,9	49,5 ± 13,5	44,1 ± 0,9	40,4 ± 8,1
Clara buňky (%)	52,7 ± 3,6	57,5 ± 8,9	50,5 ± 13,5	55,9 ± 0,9	59,6 ± 8,1
Clara buňky s granuly (%)	73,5 ± 9,4	81,1 ± 16,8	63,4 ± 24,1	*84,0 ± 11,5	78,2 ± 10,4
Clara buňky bez granul (%)	26,5 ± 9,4	18,9 ± 16,8	36,6 ± 24,1	*16 ± 11,5	21,8 ± 10,4
Počet granul/ $\mu\text{m}^2$	0,17 ± 0,07	0,20 ± 0,14	0,13 ± 0,11	0,23 ± 0,16	0,19 ± 0,05
Počet mitochondrií/ $\mu\text{m}^2$	0,73 ± 0,35	0,83 ± 0,21	0,81 ± 0,12	1,01 ± 0,34	1,11 ± 0,34
Plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	0,15 ± 0,04	#0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	0,22 ± 0,08	0,18 ± 0,05	0,24 ± 0,07	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,04

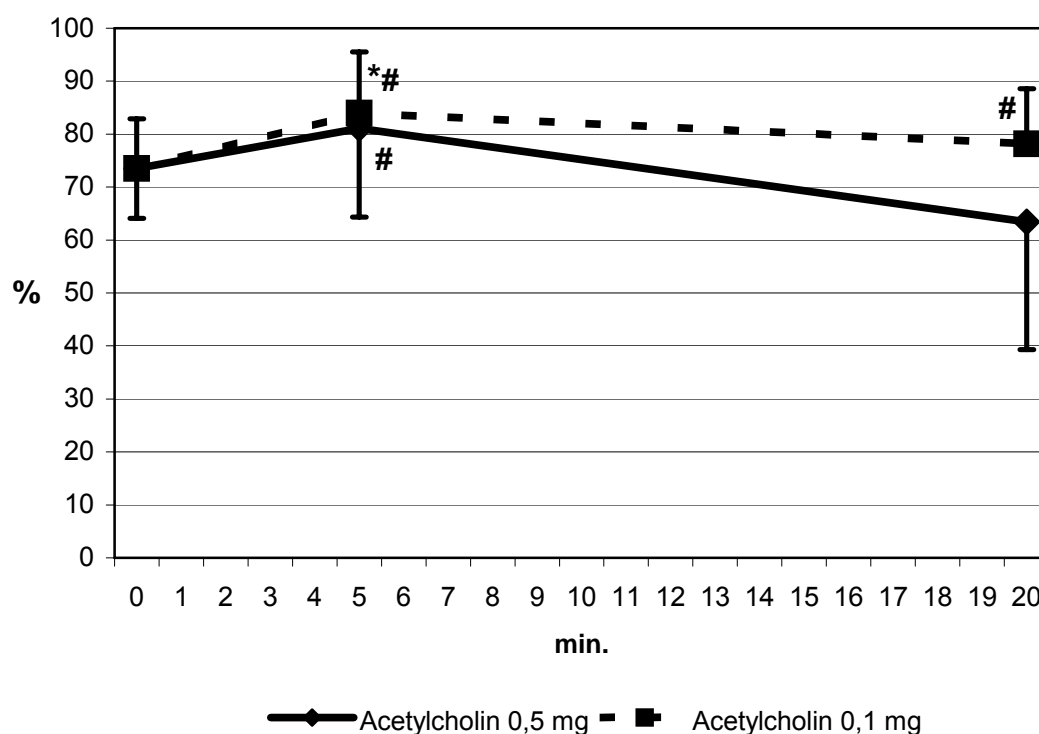
N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, hodnoty označené \* se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,01$ , hodnota označená # se statisticky významně liší od hodnoty u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,05$ , hodnoty spojené čarou se vzájemně statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,01$ .

Graf 1: Zastoupení dvou základních typů buněk v epitelu terminálních bronchiolů králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 0,5 a 0,1 mg acetylcholinu (Ach)



N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

Graf 2: Relativní počet Clara buněk obsahujících sekreční granula u králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 0,5 a 0,1 mg acetylcholinu



N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, hodnota označená \* se statisticky významně liší od hodnoty u kontrolních králíků (čas 0) na hladině významnosti  $p < 0,01$ , hodnoty označené # se statisticky významně liší od hodnoty u králíků 20 minut po aplikaci 0,5 mg acetylcholinu na hladině významnosti  $p < 0,01$

## Diskuse

Studiem neurohumorální regulace činnosti epitelových struktur v dýchacích cestách se zabývala řada autorů. Hlavní zájem se soustředil především na regulaci sekreční funkce pohárkových buněk a submukózních žlázek vyskytujících se ve stěnách větších dýchacích cest, které se podílejí hlavní měrou na celkovém množství sekretu produkovaného v dýchacích cestách. Zejména v okolí submukózních žlázek byla nalezena nervová zakončení obsahující různé neuromediátory jak na úrovni světelného, tak i elektronového mikroskopu (Laitinen a spol. 1985, Rogers a Dewar 1990, Ricci a spol. 1997).

Působení cholinergní stimulace na strukturu i funkci sekrečních epitelových buněk bylo popsáno již několika autory. Většinou se však jednalo o buňky secernující

hlen, zpravidla o buňky pohárkové v epitelu střeva nebo dýchacích cest. Specian a Neutra (1980) a později také Phillips a Wilson (1993) prokázali, že aplikace acetylcholinu *in vivo* i *in vitro* na střevní sliznici králíků a potkanů vede nejen k rychlému vyprázdnění pohárkových buněk ve střevním epitelu, ale i ke změně mechanismu jejich sekrece. Roumagnac a Laboisse (1987) zjistili, že přidání acetylcholinu vede ke zvýšení sekrece hleny v orgánových kulturách získaných z buněk lidského karcinomu tlustého střeva. Vliv cholinergní stimulace na proces sekrece pohárkových buněk v dýchacích cestách morčat studovali Tokuyama se spolupracovníky (Tokuyama a spol. 1990). Po stimulaci cervikálních nervů vagi zjistili na úrovni světelné mikroskopie pokles náplně pohárkových buněk v průdušnici a velkých bronších ukazující na stimulaci těchto buněk k vyprazdňování sekretu. Tuto reakci bylo možno zcela inhibovat premedikací atropinem. V elektronově mikroskopické studii použili Newman se spolupracovníky izolované morčecí průdušnice *in vitro*. Po krátké stimulaci acetylcholinem pozorovali urychlení exocytózy obsahu granul pohárkových buněk včetně splývání granul a apokrinní sekrece (Newman a spol. 1996). Podobné nálezy popsali i Oshima se spolupracovníky pomocí dvojfotonové konfokální mikroskopie v morčecích nosních žlázkách. Tito autoři pozorovali velmi rychlý vzestup intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  v sekrečních buňkách (Oshima a spol. 2005). Kamijo se spolupracovníky studovali pomocí videomikroskopu exocytózu sekretu z pohárkových buněk a žlázek v nosní sliznici potkana po aplikaci různých neurotransmiterů *in vitro* (Kamijo a spol. 1993). Rovněž v této studii autoři zaznamenali výraznou sekreční odpověď na aplikaci acetylcholinu, kterou bylo možno zablokovat současným podáním atropinu. V další studii Steel a Hanrahan (1997) zjistili pokles koncentrace glykokonjugátů v suspenzi tracheálních buněk křečků *in vitro* signalizující opět stimulaci sekrečních buněk k vylučování sekretu po aplikaci



karbacholu - cholinergního agonisty. Inglis se spolupracovníky popsali stimulaci sekrece submukózních bronchiálních žlázek prasat během 5 až 10 sekund po aplikaci acetylcholinu *in situ* a návrat k bazálnímu stavu sekrece po 1 minutě (Inglis a spol. 1997). Jiná skupina autorů (Fung a spol. 1992) zjistila *in vivo* vzestup koncentrace glykokonjugátů v tekutině získané výplachem trachey koček po elektrické stimulaci n. vagus i po aplikaci pilokarpinu (*in situ* i celkově). V této studii autoři poukázali na to, že cholinergní stimulace sekrečních buněk trachey je sice hlavním mechanismem funkce parasymptiku, není ale mechanismem jediným. Neschopnost atropinu plně zablockovat stimulaci sekrečních buněk k vylučování sekretu poukázala na současnou přítomnost tzv. non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) mechanismu parasymptické stimulace (Ramnarine a Rogers 1994), kde mediátorem může být například VIP nebo NO (Lacroix a spol. 1998). Podobné výsledky při použití měření koncentrace sulfátových skupin v supernatantu tkáňové kultury i v tekutině získané výplachem trachey fretek po aplikaci acetylcholinu nebo elektrické stimulaci n. vagus publikovali i Ramnarine se spolupracovníky (Ramnarine a spol. 1996). Tato skupina autorů odhalila pomocí specifických antagonistů, že hlavními receptory zodpovědnými za cholinergní stimulaci vylučování sekretu buňkami epitelu i žlázek trachey fretek jsou muskarinové receptory M<sub>3</sub>.

V ojediné studii zabývající se vlivem cholinergní stimulace na Clara buňky došlo k pozoruhodnému rozporu. Po podání cholinergně působícího pilokarpinu potkanům *in vivo* došlo během 1 hodiny k téměř 50% poklesu „volume density“ sekrečních granul v cytoplazmě Clara buněk, což autoři interpretovali jako známku stimulované sekrece. Po další hodině se tato hodnota vrátila na výchozí úroveň. Současné podání atropinu tento účinek zcela zablockovalo (Massaro a spol. 1979). Tento nález potvrdila i Dodge se svými spolupracovníky na úrovni laserové konfokální

mikroskopie (Dodge a spol. 1994). Při použití perfundovaných potkaních plic však došlo během hodiny po přidání pilokarpinu do perfuzátu k mírnému vzestupu „volume density“ sekrečních granul, což by znamenalo spíše inhibici sekrece (Massaro a spol. 1981). Naopak Yoneda (1977) ve své studii uvedl výrazný vzestup „volume density“ sekrečních granul v cytoplazmě Clara buněk 30 minut až 2 hodiny po subkutánním podání pilokarpinu potkanům a následný pokles na výchozí hodnoty po 4 hodinách od aplikace. Popsal rovněž výskyt morfologických známek vylučování sekretu a patologickou alteraci jak Clara buněk, tak i okolních buněk řasinkových. Za určitý druh cholinergní stimulace by se dalo také považovat použití inhalace insekticidu obsahující 2 inhibitory acetylcholinesterázy. V tomto experimentu autoři pozorovali po hodinové inhalaci insekticidu zvýšení počtu CC-10 pozitivních buněk v potkaních bronchiolích a naopak jejich úbytek po pětidenním opakovaném podávání insekticidu. Popsali i změny ultrastruktury Clara buněk. V akutní fázi šlo o tvorbu apikálních cytoplazmatických protruzí a zduření mitochondrií, po delší expozici pak o zmenšení mitochondrií, vymizení sekrečních granul z některých Clara buněk i o úplnou degeneraci Clara buněk (Elia a spol. 2000).

Několik prací se věnovalo vlivu cholinergní stimulace na pneumocyty typu II a jejich produkci plicního surfaktantu. V kultuře embryonálních kuřecích pneumocytů typu II nedošlo k stimulaci produkce surfaktantu po aplikaci karbacholu (Sullivan a Orgeig 2001). Naopak při stimulaci fetálních morčecích plic acetylcholinem došlo k zvýšené produkci tekutiny. Autoři prokázali pomocí specifických antagonistů nejen účast  $M_3$  receptorů, ale i spoluúčast  $\alpha$ -adrenergních (nikoli však  $\beta$ -adrenergních) receptorů na cholinergní stimulaci. Vyslovili hypotézu o aktivaci plicních neuroendokrinních buněk produkujících katecholaminy (Woods a spol. 1996).

Méně pozornosti věnovali autoři vlivu acetylcholinu na řasinkové buňky.

Salathe se spolupracovníky zjistili zrychlení frekvence pohybu řasinek a zvýšení produkce  $\text{Ca}^{2+}$  izolovanými ovčimi řasinkovými buňkami po přidání acetylcholinu do živného média. Pomocí specifických antagonistů potvrdili předpokládanou účast  $M_3$  receptorů na těchto změnách (Salathe a spol. 1997). K podobným výsledkům dospěli i Zagoory se svými spolupracovníky v tkáňových kulturách sliznice žabího jícnu (Zagoory a spol. 2001).

Reakcí epitelu trachey králíků na aplikaci acetylcholinu jsme se na úrovni elektronové mikroskopie zabývali na našem pracovišti (Konrádová a spol. 1996e,f). Použili jsme stejné dávky studované látky i shodné časové intervaly mezi aplikací acetylcholinu a odběrem materiálu jako v současné studii. Podle očekávání bylo působení acetylcholinu zaměřeno především na pohárkové buňky. Aplikace acetylcholinu stimulovala pohárkové buňky k vydávání sekretu a urychlovala mechanismus jejich sekrece. Stimulované pohárkové buňky většinou široce komunikovaly s lumenem dýchacích cest a hlen byl uvolňován současně z většího počtu apikálně uložených granul. Jako známka přechodu k apokrinnímu způsobu sekrece se od buněk oddělovaly celé skupinky hlenových granul spolu s malým množstvím cytoplazmy. Docházelo také k lavinovité tvorbě komunikací mezi sousedními hlenovými granuly, což předcházelo téměř současnému vyprázdnění hlenu obsaženého v buňce. Aplikace acetylcholinu také poškozovala pohárkové buňky. Nadměrně stimulované buňky se po urychleném vyprázdnění sekretu již většinou nezapojovaly do dalších sekrečních cyklů, ale degenerovaly a byly z epitelu vylučovány. Po podání obou dávek acetylcholinu bylo stimulováno k vydávání sekretu více než 90% všech pohárkových buněk. Po aplikaci menší dávky acetylcholinu měl průběh reakce prolongovanější charakter. Jako následek masivní stimulace a následné degenerace pohárkových buněk jsme 20 minut po aplikaci 0,5 mg acetylcholinu pozorovali známky

masivní diferenciaci nových sekrečních elementů a došlo i ke změně v distribuci pohárkových buněk a ke vzniku intraepitelových hlenových žlázek.

Tracheální řasinkové buňky byly aplikací acetylcholinu ovlivněny méně. Stejně jako v epitelu terminálních bronchiolů jsme pozorovali vznik apikálních cytoplazmatických protruzí, zvýšený výskyt drobných vezikul a lysosomů, lehkou dilataci cisteren Golgiho komplexu a granulárního endoplazmatického retikula a alteraci mitochondrií. Dvacet minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu jsme zaznamenali vyšší výskyt diferencujících se řasinkových buněk jak v epitelu trachey, tak v epitelu terminálních bronchiolů.

Reakce sekrečních Clara buněk v epitelu terminálních bronchiolů byla výrazně odlišná od reakce pohárkových buněk epitelu trachey. Hlavní odezvou na aplikaci acetylcholinu byla patologická alterace cytoplazmy podobně, jako bylo pozorováno po aplikaci různých toxických sloučenin (naftalen, 4-ipomeanol, trichloretylen, glutaraldehyd) (Plopper a spol. 1992a,b, 1994a, Van Winkle a spol. 1995, Lakritz a spol. 1996, Giovanetti a spol. 1998, Halatek a spol. 2003) nebo inhalaci ozónu (Harkema a spol. 1993, Plopper a spol. 1994b). Hodnocení funkčního stavu Clara buněk přineslo zjištění, že po aplikaci obou dávek acetylcholinu docházelo v první fázi k hromadění sekrečních granúl v cytoplazmě a vylučování sekretu spíše stagnovalo. Ve skupině králíků, jimž jsme aplikovali 0,1 mg acetylcholinu, došlo dokonce ke statisticky významnému vzestupu ( $p < 0,01$ ) počtu těchto buněk ve srovnání s kontrolami. V další fázi pak nastoupila mírná stimulace vylučování sekretu Clara buněk, přičemž 20 minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu byl pokles počtu buněk obsahujících sekreční granula statisticky významný ( $p < 0,01$ ) ve srovnání se všemi ostatními experimentálními skupinami. Obrazová analýza cytoplazmy Clara buněk přinesla statisticky významný ( $p < 0,05$  proti kontrolám) pokles průměrné velikosti granúl u

králíků, jejichž plíce byly odebrány 5 minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu. Tento nálezn lze rovněž vysvětlit mírnou stimulací Clara buněk, která vedla k rychlejší produkci drobnějších sekrečních granul. Při kvantitativním hodnocení zastoupení jednotlivých typů buněk v epitelu terminálních bronchiolů jsme nenalezli známky proliferace některého z druhů buněk u žádné experimentální skupiny.

Na rozdíl od hlen-secernujících pohárkových buněk nebo sekrečních buněk žlázek ve stěnách dýchacích cest, kde reakce na aplikaci acetylcholinu byla silná a rychlá, jsme v epitelu terminálních bronchiolů pozorovali jen méně výrazné, nicméně statisticky významné změny v sekreční aktivitě Clara buněk. Nabízí se určitá podobnost s nejednoznačnou a relativně pomalou reakcí potkaních Clara buněk na aplikaci pilokarpinu (Massaro a spol. 1981, Yoneda 1977) nebo inhalaci insekticidu s obsahem inhibitorů acetylcholinesterázy (Elia a spol. 2000) i s nevýraznou reakcí pneumocytů II. typu (Woods a spol. 1996, Sullivan a Orgeig 2001). K vysvětlení by mohla přispět i studie, jejíž autoři pomocí několika metod prokázali u koní významně nižší hustotu muskarinových receptorů v plicní tkáni než v průdušnici a bronších (Abraham a spol. 2007).

## **C. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci adrenalinu**

### **1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 5 min po aplikaci 10 µg/kg adrenalinu**

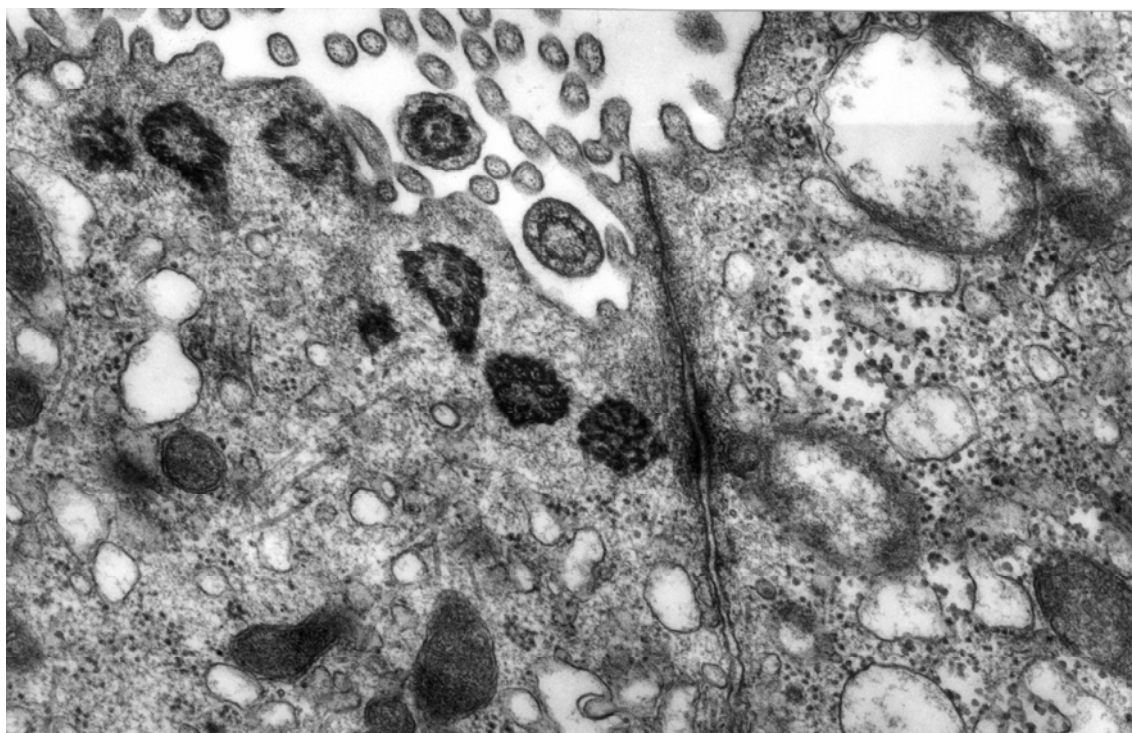
Pět minut po aplikaci adrenalinu byly terminální bronchioly experimentálních zvířat vystlány jednovrstevným epitelem složeným z  $45,6 \pm 2,3\%$  buněk řasinkových a  $54,4 \pm 2,3\%$  Clara buněk (tab. 10, graf 3). Apikální spojovací komplexy byly intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké (obr. 36).

Řasinkové buňky obsahovaly v kortikální oblasti intaktní cytoplazmu. Řasinky měly většinou normální strukturu, pozorovali jsme však i alterované kinocilie s vyšším obsahem cytoplazmy mezi axonémou a řasinkovou membránou (obr. 37). Velmi vzácně se objevovaly i drobné apikální cytoplazmatické protruze, jež ojediněle obsahovaly axonémy 1-2 zanikajících řasinek. V hlubších oblastech cytoplazmy řasinkových buněk jsme nacházeli mírně dilatované prostory Golgiho komplexu i cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Objevovaly se zde ve větší míře než u kontrolních zvířat drobné vezikuly a malé lysosomy s většinou heterogenním obsahem (obr. 38). Pozorovali jsme i výskyt rozsáhlejších fokálních cytoplazmatických degradací. V některých řasinkových buňkách jevíly mitochondrie známky edému a narušení vnitřní struktury (obr. 37 - 38). Nalezli jsme i diferencující se řasinkové buňky s morfologickými projevy ciliogeneze (obr. 39).

Cytoplazma Clara buněk obsahovala středně dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula (obr. 40), rovněž cisterny Golgiho komplexu a granulárního endoplazmatického retikula byly objemnější než u kontrolních zvířat (obr. 41). Mitochondrie jevíly podobné známky patologické alterace jako u buněk řasinkových

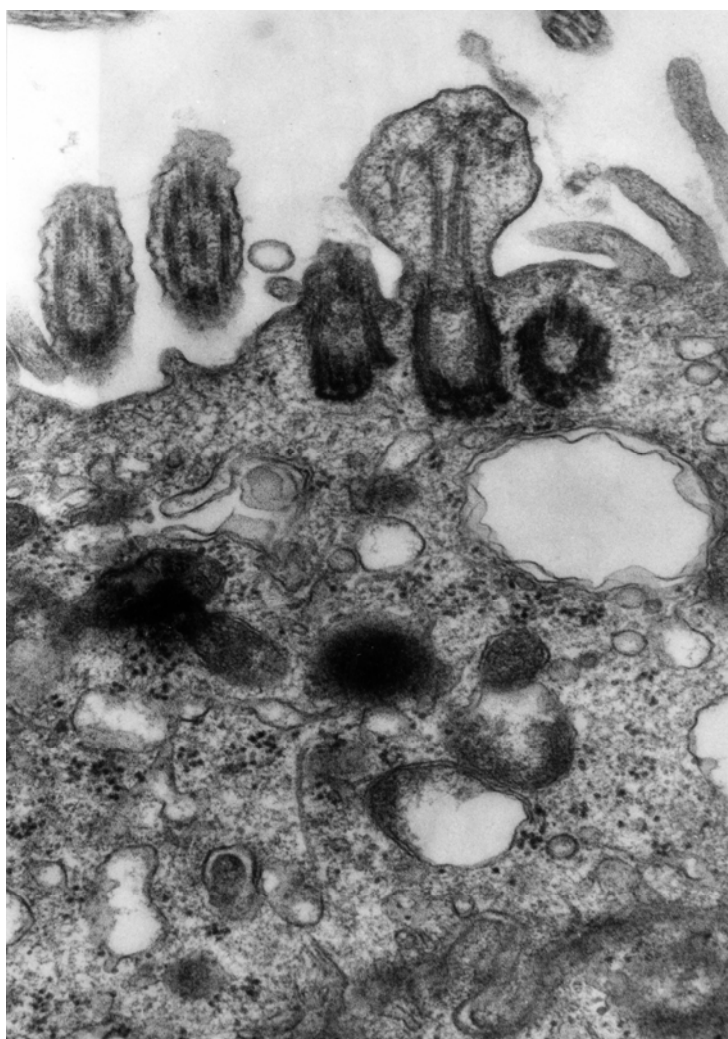
(obr. 40, 42).  $74,9 \pm 1,6\%$  Clara buněk obsahovalo v cytoplazmě sekreční granula, ve zbývajících  $25,1 \pm 1,6\%$  Clara buněk jsme granula nenalezli (tab.10, graf 4). Často jsme zachytili známky vylučování sekretu - elektronově denzní, oválná nebo sférická granula se nacházela v kontaktu s apikální buněčnou membránou (obr. 42) nebo byla zavzata do apikálních cytoplazmatických protruzí vznikajících na površích Clara buněk. Na apikálních površích Clara buněk jsme nalézali i zbytky vyprázdněných sekrečních granul, tak zvané  $\Omega$  profily (Newman a spol. 1996, Oshima a spol. 2005) (obr. 43). Jako známky apokrinní sekrece se nad epitelem objevovala i volná sekreční granula obalená tenkou vrstvičkou cytoplazmy a buněčnou membránou.

Pomocí analyzátoru obrazu Lucia jsme v supranukleární cytoplazmě Clara buněk napočítali  $0,18 \pm 0,03$  granul a  $0,80 \pm 0,24$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Sekreční granula měla průměrnou plochu  $0,13 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ , mitochondrie pak  $0,22 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  (tab. 10).



1  $\mu$ m

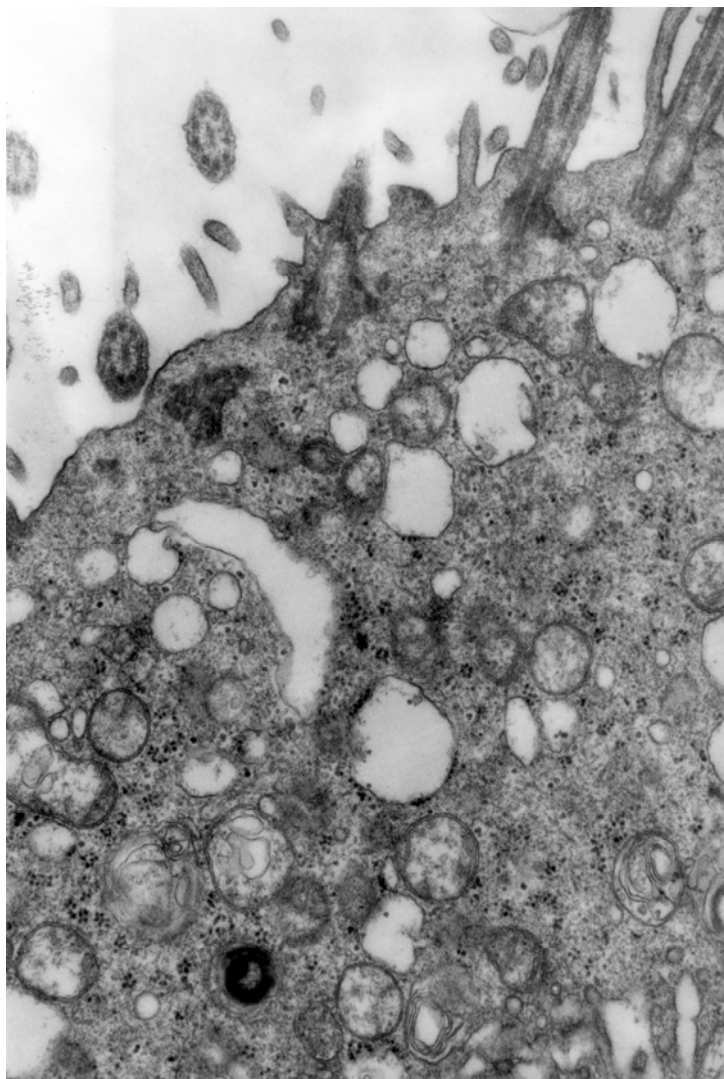
Obr. 36: Intaktní apikální spojovací komplex mezi řasinkovou a Clara buňkou. V cytoplasmě řasinkové buňky jsou zmnoženy drobné vezikuly, v cytoplasmě Clara buňky se nacházejí dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a výrazně alterované mitochondrie. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu$ g/kg adrenalinu, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

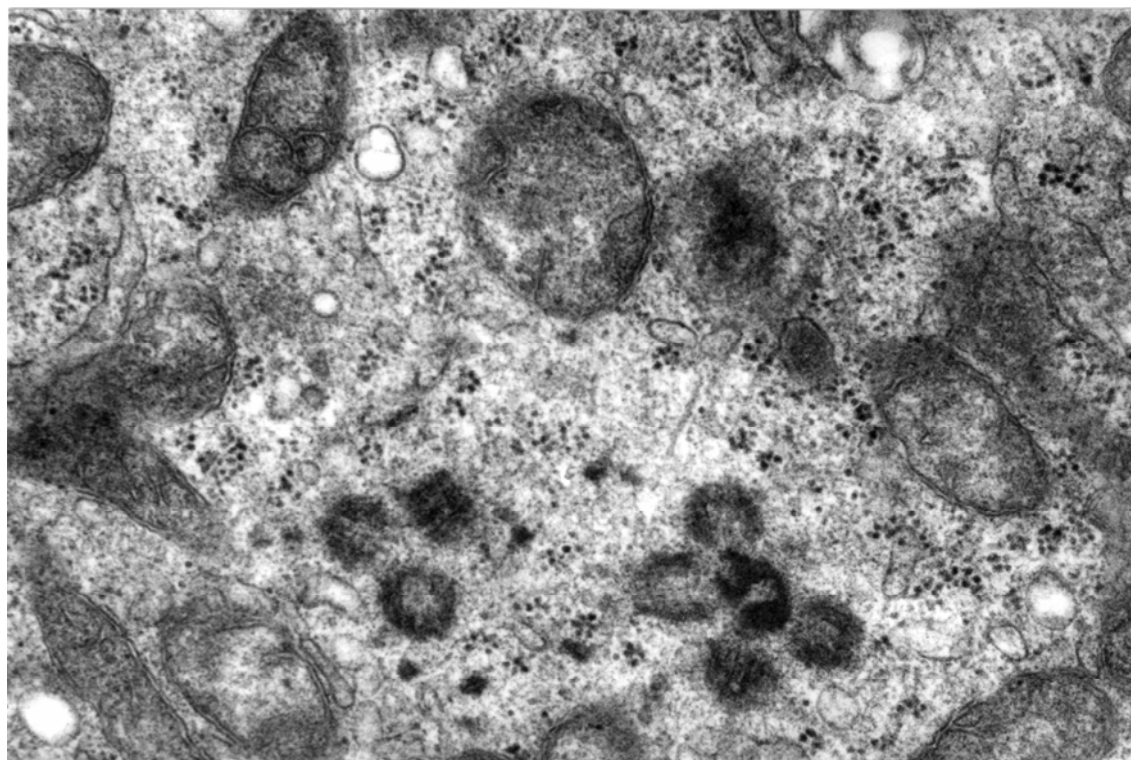
Obr. 37: Patologická řasinka s vyšším obsahem cytoplazmy mezi axonémou a řasinkovou membránou na apikálním povrchu řasinkové buňky. V cytoplasmě buňky se nacházejí lysosomy a výrazně alterované mitochondrie. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu$ g/kg adrenalinu, původní zvětšení 20.000x





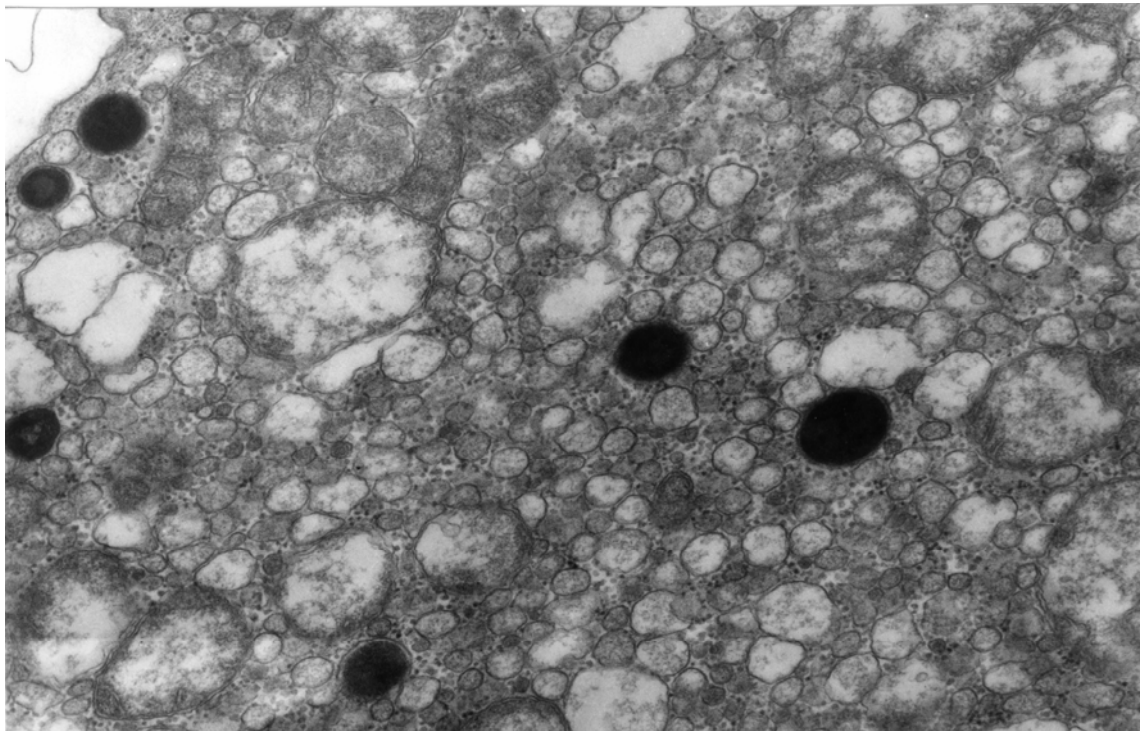
1  $\mu$ m

Obr. 38: Drobné vezikuly, zmnožené lysosomy a alterované mitochondrie v cytoplazmě řasinkové buňky. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu$ g/kg adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



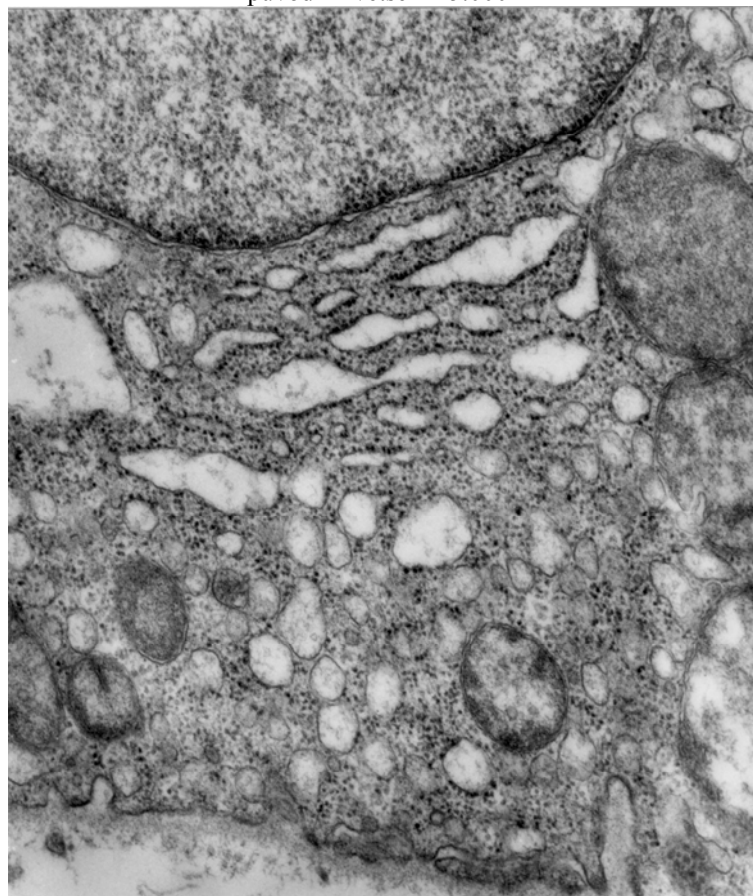
1  $\mu$ m

Obr. 39: Diferencující se řasinková buňka obsahující v cytoplazmě deuterosom, kolem něhož dochází k alternativní produkci centriolů. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu$ g/kg adrenalinu, původní zvětšení 25.000x



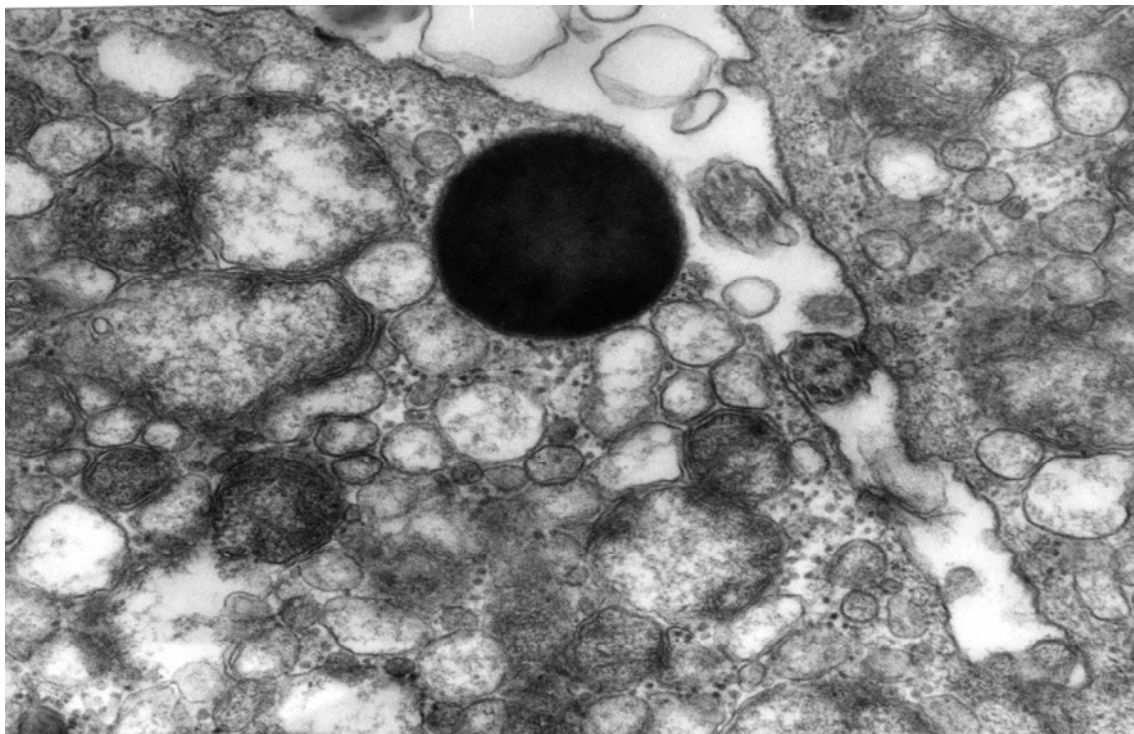
1  $\mu\text{m}$

Obr. 40: Sekreční granula, středně dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a silně alterované mitochondrie v apikální cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



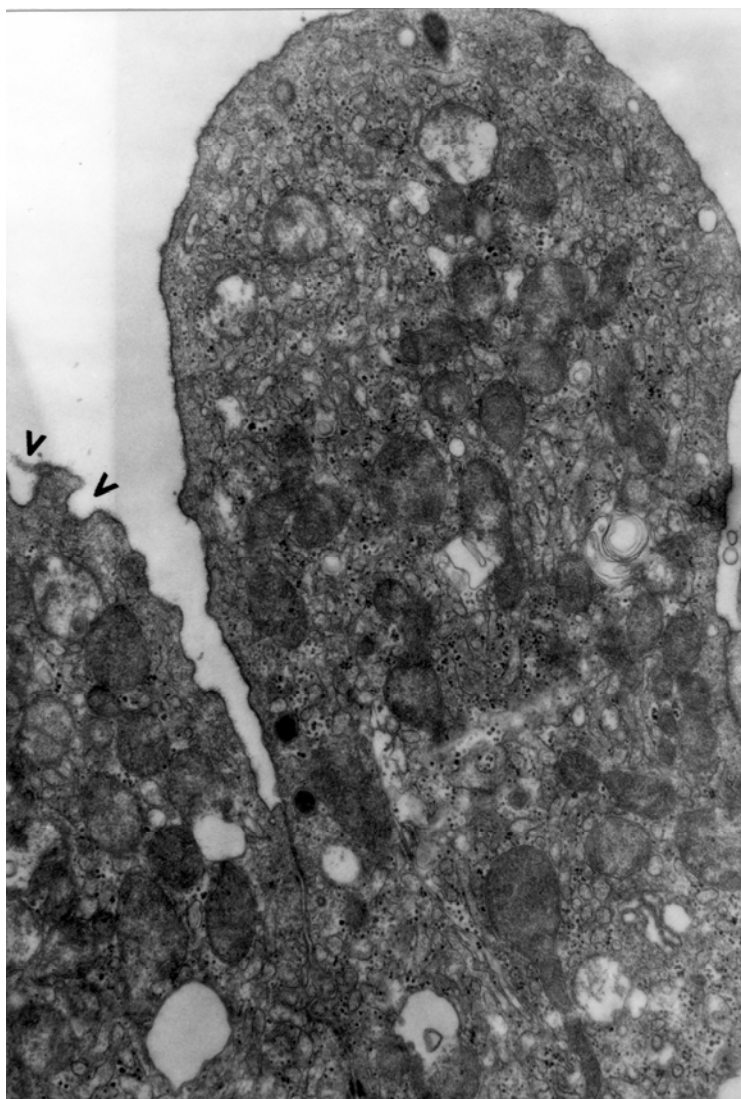
1  $\mu\text{m}$

Obr. 41: Dilatované cisterny granulárního endoplazmatického retikula v bazální cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



1 μm

Obr. 42: Sekreční granulum splávající s buněčnou membránou, středně dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a alterované mitochondrie v apikální cytoplazmě Clara buňky. 5 min po i.v. aplikaci 10 μg/kg adrenalinu, původní zvětšení 25.000x



1 μm

Obr. 43: Apikální části dvou Clara buněk. Na povrchu jedné z nich jsou zřetelné známky proběhlé exocytózy obsahu sekrečních granul - Ω profily (v). 5 min po i.v. aplikaci 10 μg/kg adrenalinu, původní zvětšení 10.000x

## **2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 min po aplikaci 10 µg/kg adrenalinu**

Dvacet minut po aplikaci adrenalinu jsme v terminálních bronchiolích králíků nalézali alterovaný jednovrstevný epitel tvořený  $42,4 \pm 2,1\%$  buněk řasinkových a  $57,6 \pm 2,1\%$  Clara buněk (tab. 10, graf 3). Apikální spojovací komplexy byly stále intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké (obr. 44).

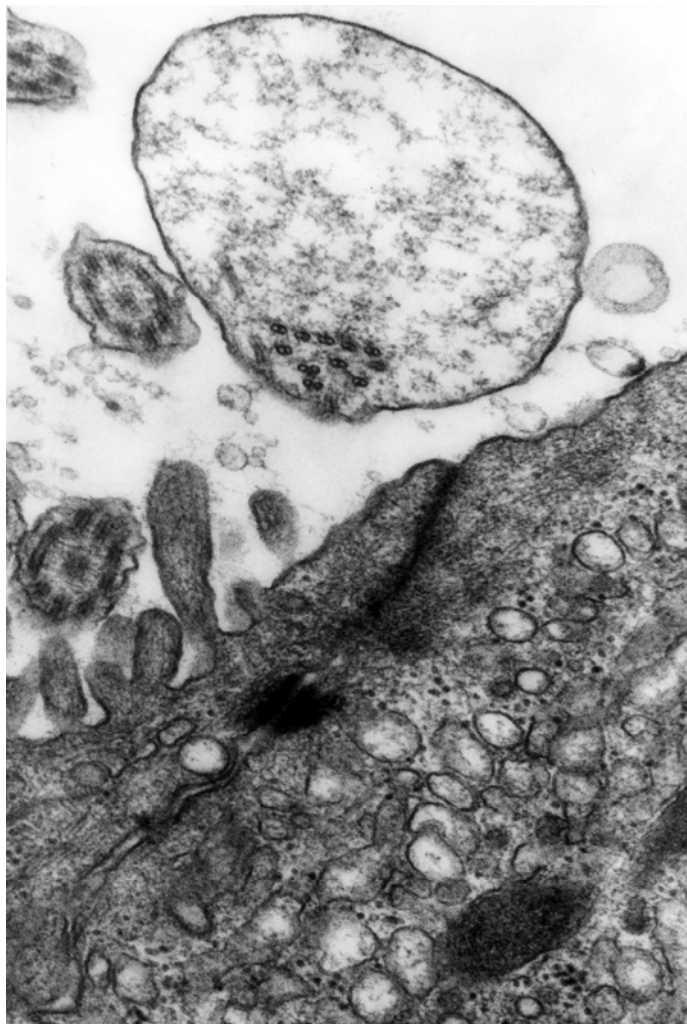
Řasinkové buňky tvořily častěji apikální cytoplazmatické protruze. Byly-li v těchto protruzích zavzaty axonémy řasinek, docházelo k jejich degeneraci a rozpadu (obr. 45). Častěji než v předcházející experimentální skupině jsme nacházeli na apikálních površích řasinkových buněk alterované, patologické kinocilie, v nichž docházelo k edému a zmnožení cytoplazmy mezi axonémou a vlastní řasinkovou membránou. V hlubších oblastech cytoplazmy řasinkových buněk jsme opět nacházeli dilatované prostory Golgiho komplexu i granulárního endoplazmatického retikula, zmnožení drobných vezikul a lysosomů (obr. 45). Zaznamenali jsme opět výskyt větších fokálních cytoplazmatických degradací. Mitochondrie některých řasinkových buněk vykazovaly známky patologické alterace (obr. 45).

V cytoplazmě Clara buněk jsme pozorovali pokročilejší stupeň dilatace tubulů hladkého endoplazmatického retikula i cisteren granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu než v předcházející skupině (obr. 46, 47). Mitochondrie byly naopak alterovány mírněji, stupeň jejich edému byl menší (obr. 46 - 48). Sekreční granula jsme našli v  $72,7 \pm 7,6\%$  Clara buněk, zbývajících  $27,3 \pm 7,6\%$  Clara buněk granula neobsahovalo (tab. 10, graf 4). Stále se objevovaly početné známky vylučování obsahu sekrečních granul, a to jak granula těsně přiložená k apikální buněčné membráně, tak obsažená v apikálních cytoplazmatických protruzích (obr. 48). Zbytky alterované cytoplazmy Clara buněk obsahující sekreční granula, silně dilatované tubuly

hladkého endoplazmatického retikula i alterované mitochondrie jsme občas nacházeli volně nad epitelem v luminu terminálních bronchiolů (obr. 49).

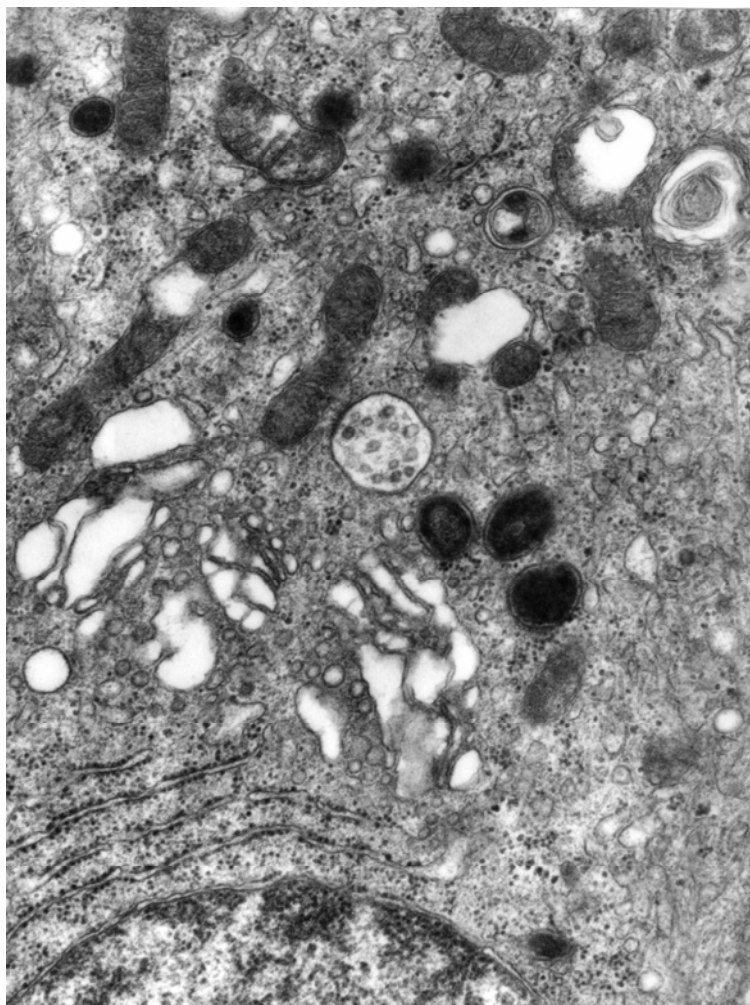
V supranukleární cytoplazmě Clara buněk jsme objevili  $0,14 \pm 0,01$  granul a  $0,87 \pm 0,25$  mitochondrií na  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy. Průměrná plocha sekrečních granul byla  $0,11 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ , průměrná plocha mitochondrií činila  $0,16 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$  (tab. 10).

Dvacet minut po aplikaci adrenalinu jsme pozorovali lehce zvýšený výskyt diferencujících se epitelových buněk, hlavně diferencujících se buňky řasinkové zachycené v různých stádiích procesu ciliogeneze.



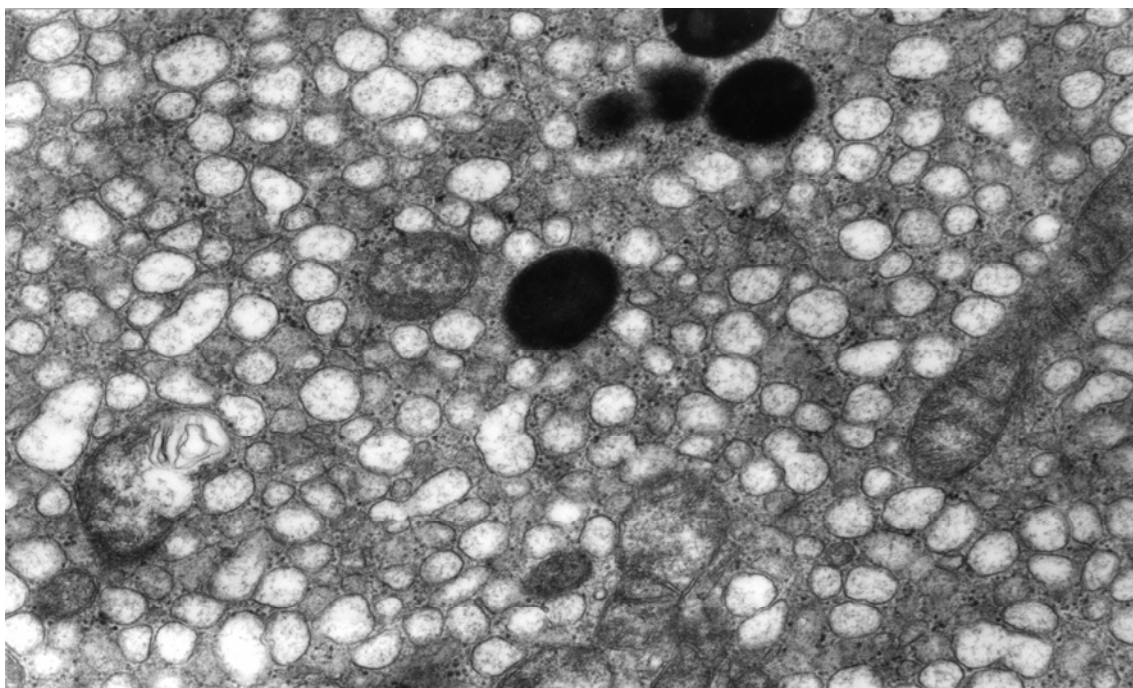
1 μm

Obr. 44: Intaktní apikální spojovací komplex mezi řasinkovou a Clara buňkou. Nad epitelem je zachycena apikální cytoplazmatická protruze obsahující rozpadající se axonému zanikající řasinky. 20 min po i.v. aplikaci 10 μg/kg adrenalinu, původní zvětšení 25.000x



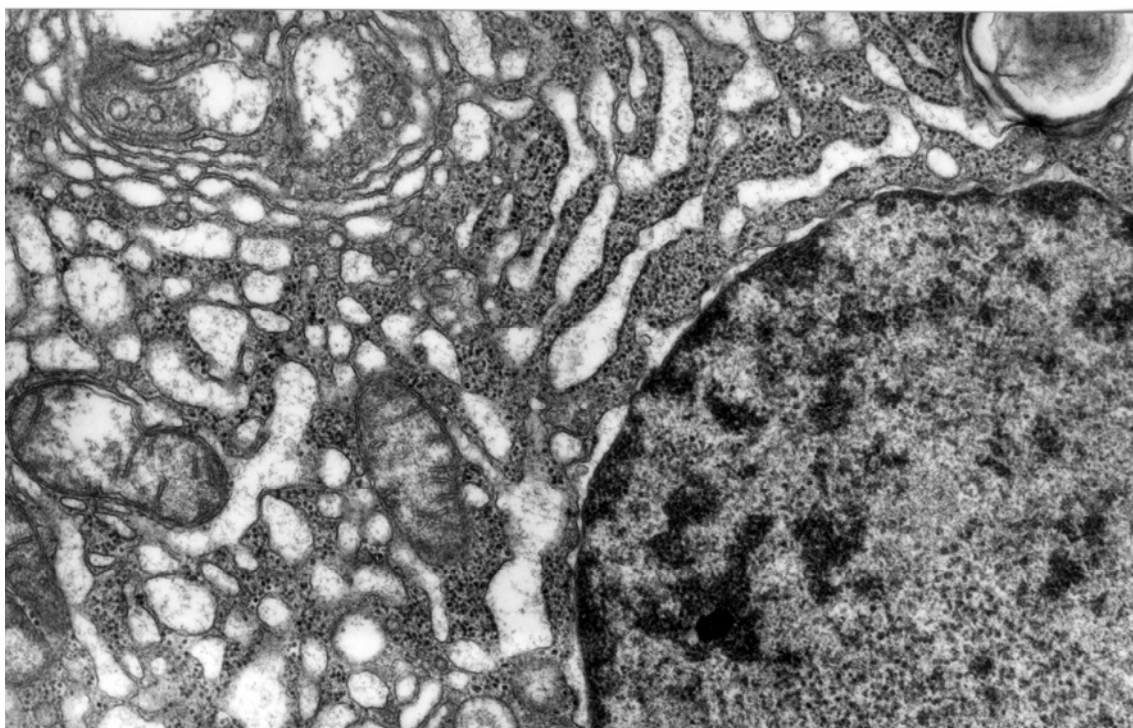
1 μm

Obr. 45: Dilatovaný Golgiho komplex, zmnožené lysosomy, multivezikulární tělísko a alterované mitochondrie v cytoplazmě řasinkové buňky. 20 min po i.v. aplikaci 10 μg/kg adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



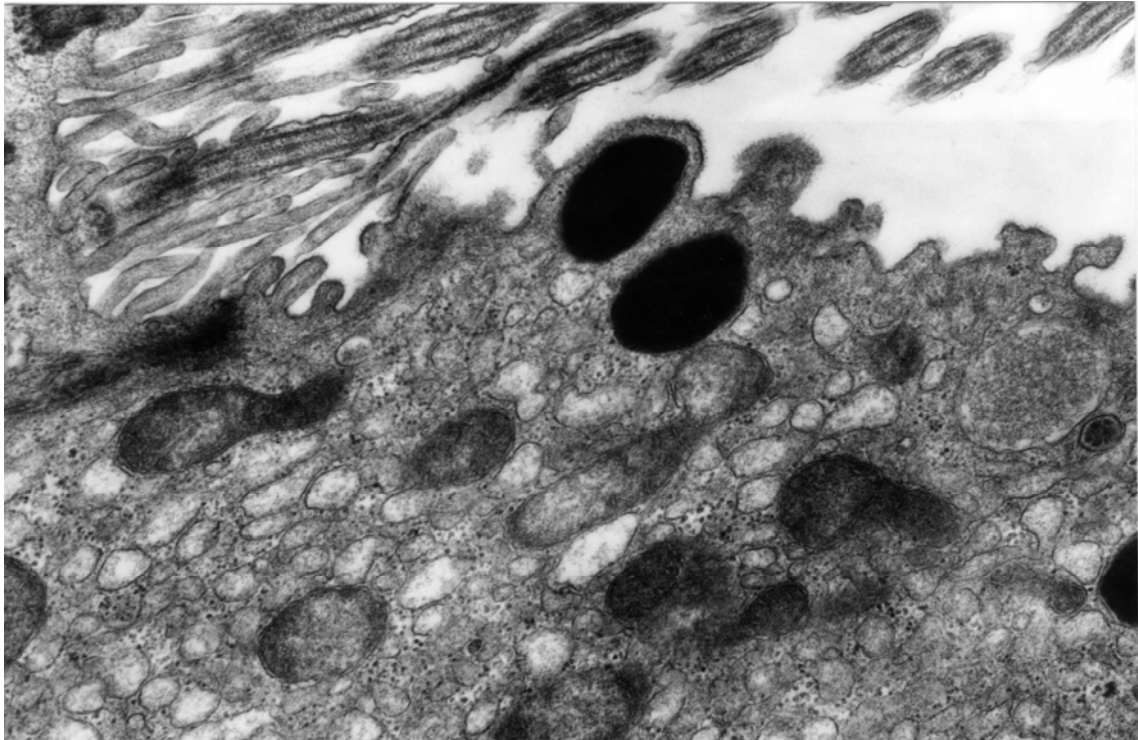
1  $\mu\text{m}$

Obr. 46: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, sekreční granula a alterované mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. 20 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g/kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



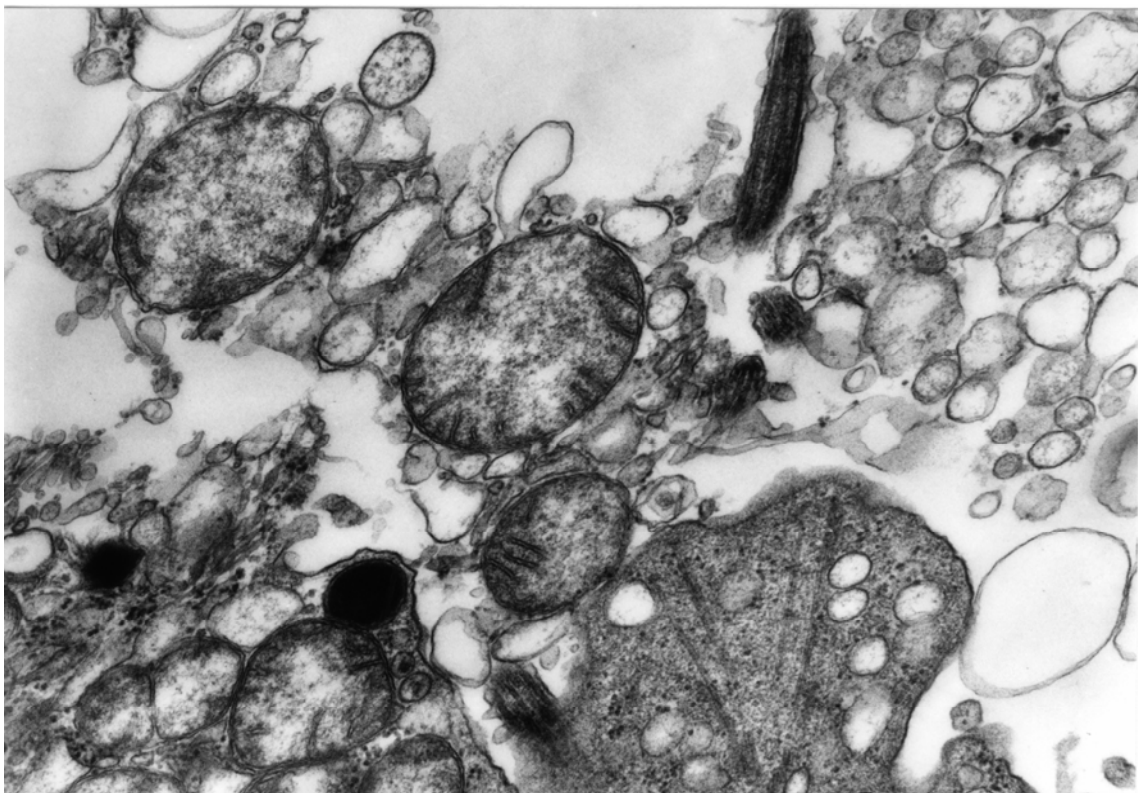
1  $\mu\text{m}$

Obr. 47: Dilatované prostory hladkého i granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu v perinukleární cytoplazmě Clara buňky. 20 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g/kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



1  $\mu\text{m}$

Obr. 48: Apikální část Clara buňky se sekrečním granulem umístěným v drobné cytoplazmatické protruzi. 20 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g/kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x



1  $\mu\text{m}$

Obr. 49: Narušení apikální buněčné membrány Clara buňky s uvolněním části alterované cytoplazmy do lumina terminálního bronchiolu. 20 min po i.v. aplikaci 10  $\mu\text{g/kg}$  adrenalinu, původní zvětšení 15.000x

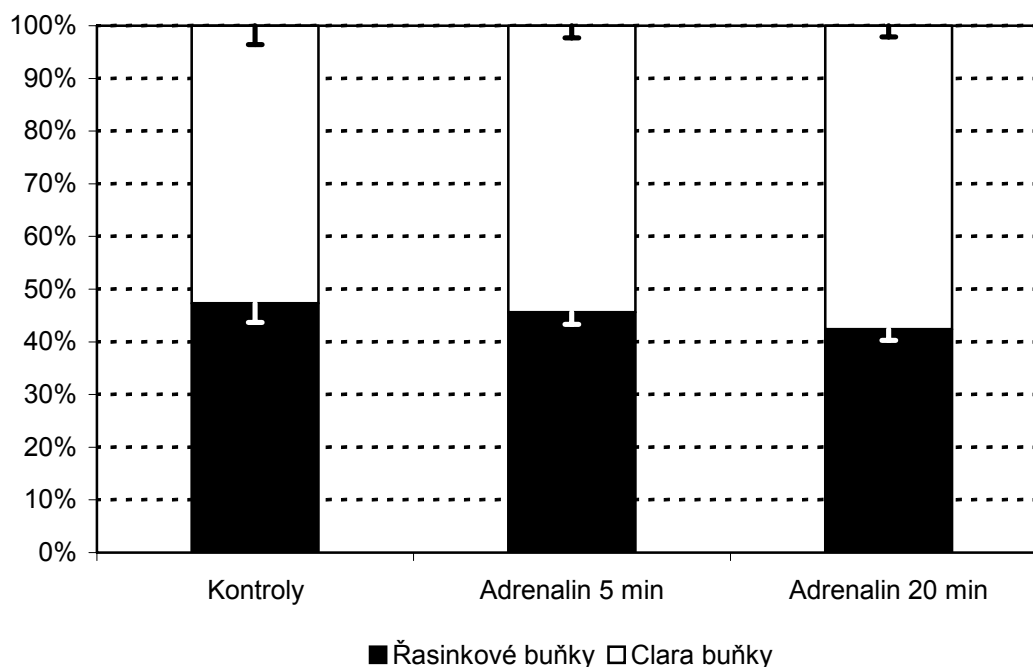


Tab. 10: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci adrenalinu v dávce 10 µg/kg

	Kontroly	Adrenalin 10 µg/kg 5 minut	Adrenalin 10 µg/kg 20 minut
Řasinkové buňky (%)	47,3 ± 3,6	45,6 ± 2,3	42,4 ± 2,1
Clara buňky (%)	52,7 ± 3,6	54,4 ± 2,3	57,6 ± 2,1
Clara buňky s granuly (%)	73,5 ± 9,4	74,9 ± 1,6	72,7 ± 7,6
Clara buňky bez granul (%)	26,5 ± 9,4	25,1 ± 1,6	27,3 ± 7,6
Počet granul/µm <sup>2</sup>	0,17 ± 0,07	0,18 ± 0,03	0,14 ± 0,01
Počet mitochondrií/µm <sup>2</sup>	0,73 ± 0,35	0,80 ± 0,24	0,87 ± 0,25
Plocha granul (µm <sup>2</sup> )	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,04
Plocha mitochondrií (µm <sup>2</sup> )	0,22 ± 0,08	0,22 ± 0,05	0,16 ± 0,03

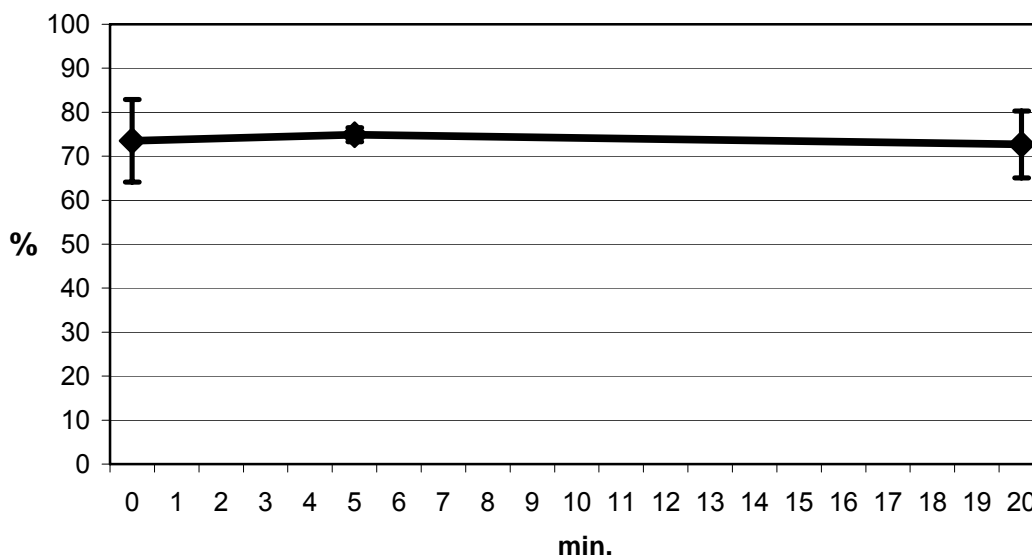
N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

Graf 3: Zastoupení dvou základních typů buněk v epitelu terminálních bronchiolů králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 10 µg/kg adrenalinu



N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

Graf 4: Relativní počet Clara buněk obsahujících sekreční granula u králíků 5 a 20 minut po intravenózní aplikaci 10 µg/kg adrenalinu



N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD

## Diskuse

Vliv adrenergní stimulace na vylučování sekretu epitelovými buňkami a submukózními žlázkami dýchacích cest byl studován podobně jako vliv stimulace cholinergní. Opět se většina studií soustředila na větší extrapulmonální dýchací cesty. Na úrovni světelného i elektronového mikroskopu byla v lidském materiálu prokázána přítomnost nepříliš početných adrenergních nervových zakončení v blízkosti submukózních žlázek, nikoli však přímo v epitelu vystýlajícím dýchací cesty (Pack a Richardson 1984, Laitinen 1985). Autoradiograficky byly lokalizovány  $\beta$  adrenergní receptory na membráně sekrečních buněk submukózních žlázek v dýchacích cestách člověka (Carstairs a spol. 1985) i na membráně epitelových buněk vystýlajících tracheu morčat (Goldie a spol. 1995). Borson a jeho spolupracovníci v obsáhlé studii hodnotící vliv různých neuromediátorů a jejich specifických antagonistů na produkci sekretu v izolovaných průdušnicích fretek zjistili stimulační efekt aplikace noradrenalinu jak při inhibici  $\alpha$ , tak i  $\beta$  adrenergních receptorů (Borson a spol. 1984). K podobným výsledkům dospěl i Gashi se spolupracovníky v elektronově mikroskopické studii vlivu

$\beta$  adrenergního isoproterenolu na mucinózní buňky fretčích tracheálních žlázek (Gashi a spol. 1989). Tokuyama a jeho kolektiv pozorovali při elektrické stimulaci nn. vagi morčat omezení uvolňování sekretu z tracheálních a bronchiálních pohárkových buněk po zablokování  $\beta$  adrenergních, ale nikoliv  $\alpha$  adrenergních receptorů (Tokuyama a spol. 1990). Usoudili, že nn. vagi obsahují kromě cholinergních parasympatických vláken i vlákna adrenergní. Dále byl zjištěn rozdíl mezi stimulací  $\alpha$  a  $\beta$  adrenergních receptorů, kdy působení  $\alpha$  adrenergních agonistů vyvolávalo v submukózních žlázkách trachey koček a frettek vylučování řídkého serózního sekretu, zatímco  $\beta$  adrenergní agonisté stimulovaly k vylučování sekretu především mucinózní buňky (Phipps a spol. 1980, Basbaum a spol. 1981, 1990).

V elektronově mikroskopické studii hodnotící vliv  $\beta$  adrenergně působícího isoproterenolu na sekreci Clara buněk potkanů byl pozorován pokles „volume density“ sekrečních granul za 1 h po aplikaci této látky jak *in vivo*, tak v izolovaných perfundovaných plicích. Autoři interpretovali tento nález jako úbytek granul, tedy stimulaci Clara buněk k sekreci. Efekt isoproterenolu bylo možné téměř úplně zablokovat  $\beta$  blokátorem propranololem (Massaro a spol. 1979, 1981). Autoři ještě doplnili studii přímým průkazem  $\beta$  adrenergních receptorů na membráně Clara buněk (Massaro a Davis 1984). V další studii s perfundovanými potkaními plícemi prokázala tato skupina autorů ještě podobný účinek  $\alpha$  adrenergního  $\alpha$ -fenylefrinu, jenž bylo možné zablokovat  $\alpha$  adrenergním antagonistou fentolaminem (Massaro a spol. 1982). K podobným výsledkům dospěli i Aryal se spolupracovníky u myši. Isoproterenol aplikovaný intraperitoneálně stimuloval Clara buňky jak k vylučování obsahu sekrečních granul, tak k tvorbě a oddělování cytoplazmatických protruzí. Na rozdíl od předchozí studie nedošlo k zablokování tohoto účinku současným podáním propranololu. Autoři pozorovali také častý výskyt degenerativních změn cytoplazmy

Clara buněk (Aryal a spol. 2003).

V naší předcházející studii jsme studovali vliv intravenózní aplikace adrenalinu, který působí na oba typy adrenergických receptorů, na epitel trachey (Konrádová a spol. 1999b). Použili jsme stejnou dávku i stejné časové intervaly mezi podáním a odběrem tkáně jako v pokusu s terminálními bronchioly. Pohárkové buňky epitelu trachey byly aplikací adrenalinu nadměrně stimulovány. V obou experimentálních skupinách (5 a 20 minut po podání adrenalinu) došlo ke statisticky významnému ( $p < 0,01$ ) zvýšení jak celkového počtu stimulovaných, tak i degenerovaných pohárkových buněk. Zaznamenali jsme změnu mechanismu sekrece. Pozorovali jsme jak merokrinní způsob sekrece, tak i přechod k makroapokrinnímu způsobu vylučování sekretu, kdy byly od buněk oddělovány celé skupinky hlenových granul. Setkali jsme se také s nejurychlenějším způsobem sekrece, kdy po lavinovité tvorbě komunikací mezi sousedními sekrečními granuly dochází k téměř současnému vyprázdnění všech hlenových granul v buňce (Neutra a Schaffer 1977, Kurosumi a spol. 1981, Newman a spol. 1996). Pohárkové buňky byly podáním adrenalinu zřejmě také výrazně poškozovány. 70% z nich se po urychleném vyprázdnění sekretu již nezapojilo do dalších sekrečních cyklů, ale degenerovalo a bylo urychleně z epitelu vylučováno. Stupeň poškození sekrečních elementů byl ve srovnání s kontrolami statisticky významně vyšší ( $p < 0,01$ ) 20 min po aplikaci. Po aplikaci adrenalinu jsme zaznamenali lehký nárůst počtu diferencujících se pohárkových buněk. V průběhu 20 minut po aplikaci adrenalinu však nedošlo k významné změně distribuce pohárkových buněk v epitelu. Lehké zvýšení počtu pohárkových buněk uspořádaných ve skupinkách nebylo statisticky významné.

Odpověď Clara buněk na aplikaci adrenalinu můžeme srovnat s odpovědí těchto buněk na aplikaci různých škodlivin. Výskyt známek patologické alterace Clara buněk,

mezi které řadíme především alteraci mitochondrií a různý stupeň dilatace prostorů endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu, se podobal nálezům po parenterální aplikaci polycyklických aromatických sloučenin (naftalen, 4-ipomeanol) (Plopper a spol. 1992a,b, 1994a, Van Winkle a spol. 1995, Lakritz a spol. 1996), inhalaci trichlorethylenu (Giovanetti a spol. 1998) nebo inhalaci ozonu (Harkema a spol. 1993, Plopper a spol. 1994b). Znamky patologické alterace cytoplazmy pozorovali i Aryal se spolupracovníky po aplikaci isoproterenolu (Aryal a spol. 2003). Na rozdíl od této studie i od další studie s isoproterenolem (Massaro a spol. 1979, 1981) se námi pozorované morfologické známky vylučování sekretu Clara buněk neodrazilo ve statisticky významném poklesu relativního počtu Clara buněk obsahujících sekreční granula ani v počtu granul nalezených v cytoplazmě Clara buněk pomocí analýzy obrazu.

Studium vlivu adrenergního působení na řasinkové buňky přineslo rozporuplné výsledky. Zatímco ve velkých dýchacích cestách potkanů, křečků a koček došlo po aplikaci adrenergních látek k výraznému zrychlení frekvence pohybu řasinek (Iravani a Melville 1974), v malých dýchacích cestách lidských dobrovolníků nedošlo po perorálním podání  $\beta_2$  adrenergně působícího terbutalinu ke změně rychlosti mukociliárního transportu (Svartengren a spol. 1998). V naší studii byly řasinkové buňky aplikací adrenalinu méně poškozeny než buňky sekreční jak v epitelu trachey (Konrádová a spol. 1999b), tak terminálních bronchiolů. V první fázi pokusu jsme téměř nepozorovali alteraci kortikálních oblastí jejich cytoplazmy. 20 min po podání adrenalinu byla tvorba apikálních cytoplazmatických protruzí již více vyjádřena a v těchto cytoplazmatických útvarech jsme výjimečně našli i izolované axonémy zanikajících kinocilií. V hlubších partiích cytoplazmy řasinkových buněk jsme jako projevy patologické alterace pozorovali mírné zmnožení drobných vakuol, lysozomů,

dilataci prostorů endoplazmatického retikula i Golgiho komplexu. Znamky poškození byly výraznější 20 min po aplikaci. Diferencující se řasinkové buňky jsme v epitelu našli jen zřídka.

Nevýrazná reakce Clara buněk epitelu terminálních bronchiolů na aplikaci adrenalinu ostře kontrastuje s reakcí pohárkových buněk epitelu trachey. Tyto nálezy vedou k závěru, že neurohumorální regulace funkce sekrečních buněk se v různých úsecích dýchacích cest výrazně liší, jak dokládá i studie Van Scotta a jeho spolupracovníků (1995), kteří v tkáňových kulturách prokázali rozdíly mezi reakcí Clara buněk a buněk tracheálního epitelu po ovlivnění isoproterenolem.

## D. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po inhalační aplikaci léků ze skupiny bronchospasmolytik a kortikosteroidů

### 1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek preparátu Placebo Inhaler obsahujícího samotné propelenty

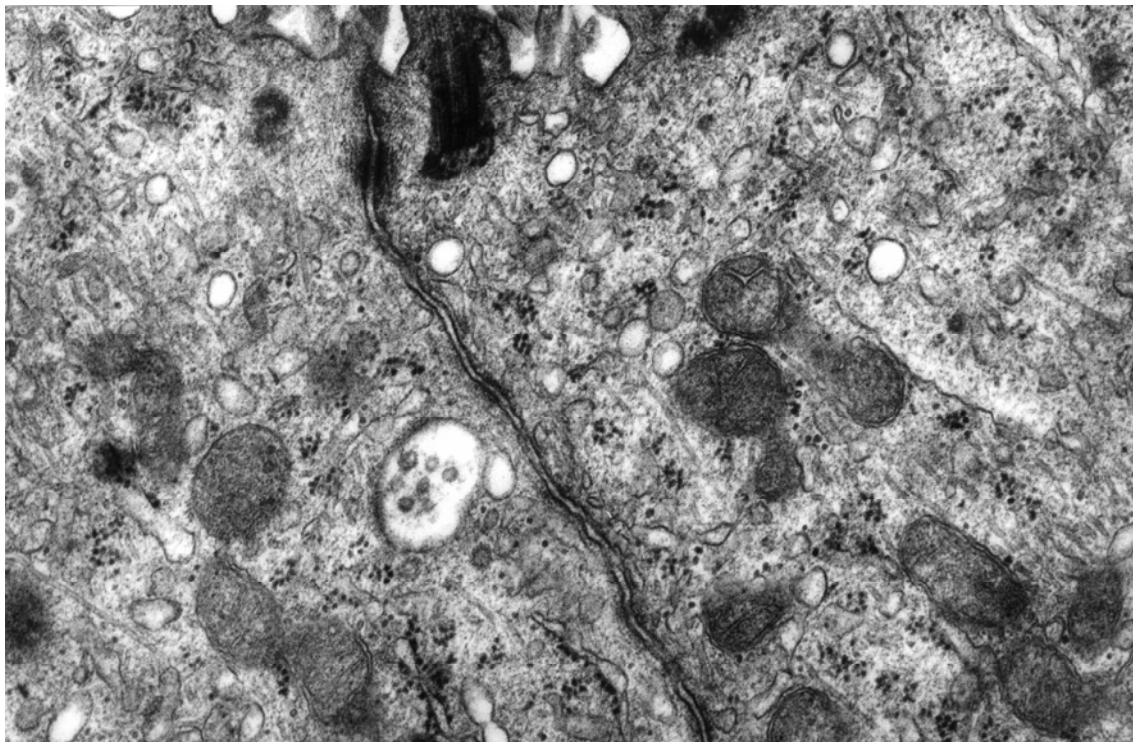
Epitel terminálních bronchiolů se po inhalaci samotných propelentů skládal z  $43,8 \pm 1,2$  % řasinkových buněk a  $56,2 \pm 1,2$  % Clara buněk (tab. 11, 12). Apikální spojovací komplexy byly intaktní (obr. 50), mezibuněčné prostory zůstaly úzké. Všechny epitelové buňky široce nasedaly na dobře vyvinutou bazální laminu (obr. 51).

Řasinkové buňky jevíly mírné známky patologické alterace. Na jejich apikálních površích jsme výjimečně zachytili tvorbu malých cytoplazmatických protruzí, které narušovaly pravidelné uspořádání řasinek, ale obvykle nedocházelo k inkorporaci axoném (obr. 52). V hlubších oblastech jsme pozorovali zvýšený počet heterogenních lysosomů a multivezikulárních tělísek (obr. 50, 53, 54). Cisterny Golgiho komplexu byly často dilatované (obr. 53, 54), některé mitochondrie byly alterované (obr. 54).

Přibližně polovina sekrečních Clara buněk byla intaktní. Jejich apikální cytoplazma obsahovala četné úzké tubuly hladkého endoplazmatického retikula vyplněné středně elektronově denzním obsahem, velké mitochondrie a elektronově denzní sekreční granula. Často jsme pozorovali úseky malého Golgiho komplexu. Výjimečně jsme zachytili i větší granula vyplněná fibrogranulárním obsahem podobným obsahu mucinózních granul (obr. 55). Perinukleární a bazální části těchto buněk obsahovaly úzké, paralelně uspořádané cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Zbývající Clara buňky jevíly známky patologické alterace (obr. 56). Obsahovaly dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula vyplněné elektronově lucidním obsahem, cisterny granulárního endoplazmatického retikula byly

rozšířené a mitochondrie alterované. Patologické změny byly v jednotlivých buňkách různě vyjádřeny (obr. 57), ale zcela degenerované Clara buňky jsme nenalezli. Elektronově denzní sekreční granula jsme pozorovali v  $82,2 \pm 11,6$  % Clara buněk (tab. 11, 12). Granula byla většinou strádána v cytoplazmě. Jen velmi vzácně jsme pozorovali morfologické známky vylučování jejich obsahu. Počítačová analýza obrazu odhalila  $0,17 \pm 0,05$  sekrečních granul a  $0,77 \pm 0,09$  mitochondrií na  $1 \mu\text{m}^2$  supranukleární cytoplazmy. Jejich průměrná plocha byla  $0,13 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$  a  $0,16 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$  (Tab. 11, 12).





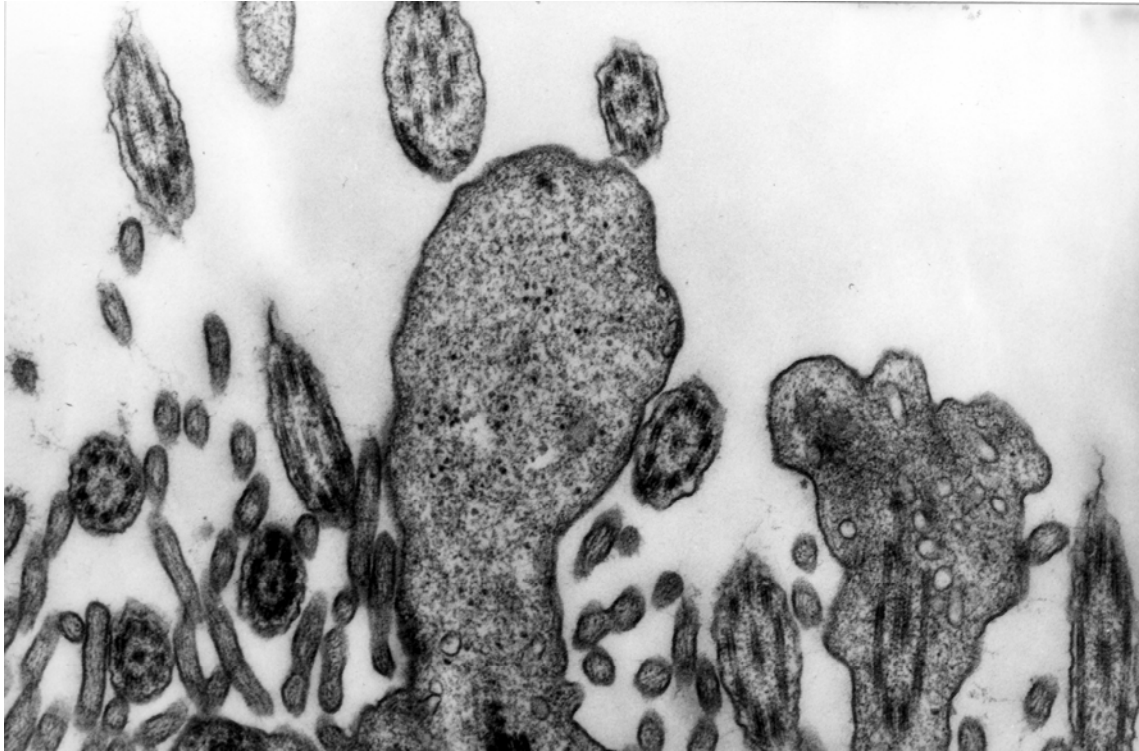
1 μm

Obr. 50: Intaktní spojovací komplex mezi dvěma řasinkovými buňkami, z nichž jedna obsahuje nápadné multivezikulární tělísko. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 20.000x



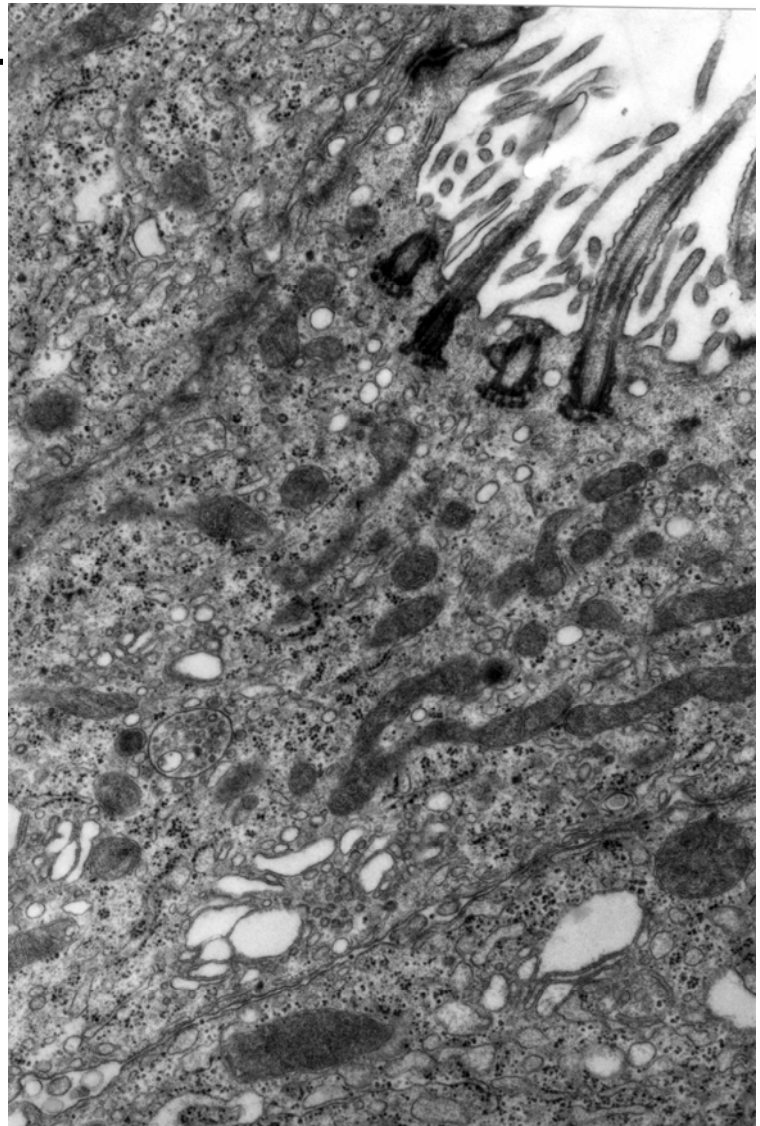
1 μm

Obr. 51: Souvislá bazální lamina lemující bazální povrch řasinkové buňky, lamina propria mucosae a hladká svalovina stěny terminálního bronchiolu. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 10.000x



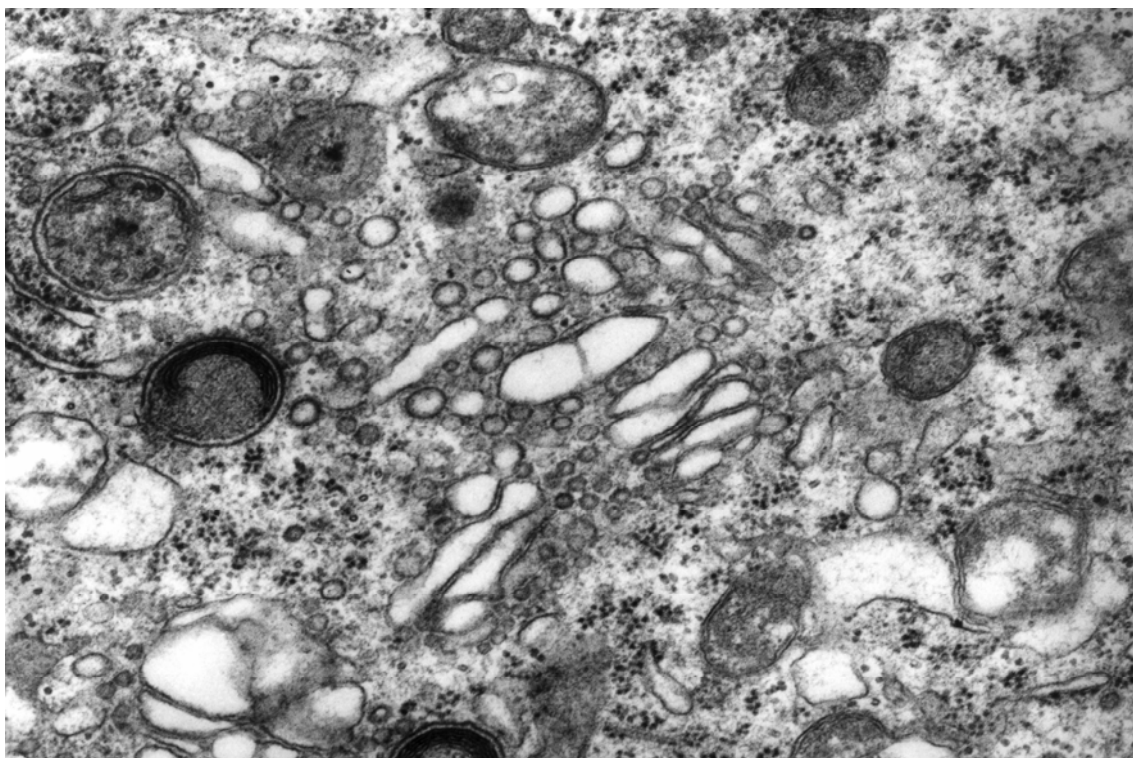
1 μm

Obr. 52: Dvě apikální cytoplazmatické protruze na povrchu řasinkové buňky. Jedna z nich obsahuje axonému zanikající kinocilie. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 20.000x



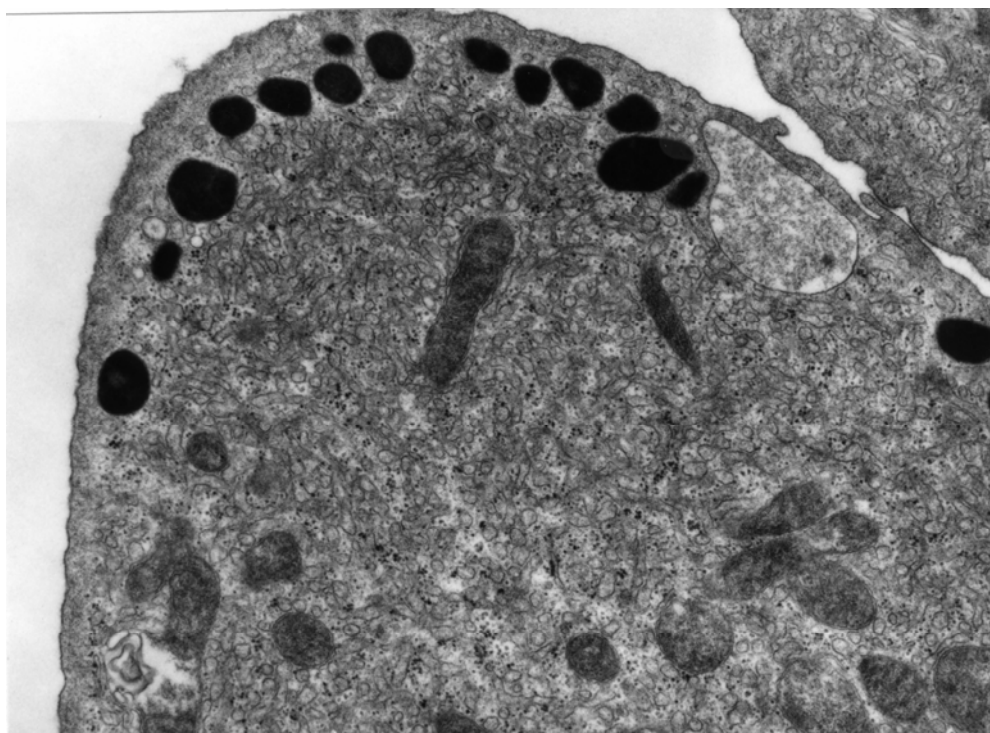
1 μm

Obr. 53: Multivezikulární tělísko a dilatovaný Golgiho komplex v řasinkové buňce. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 10.000x



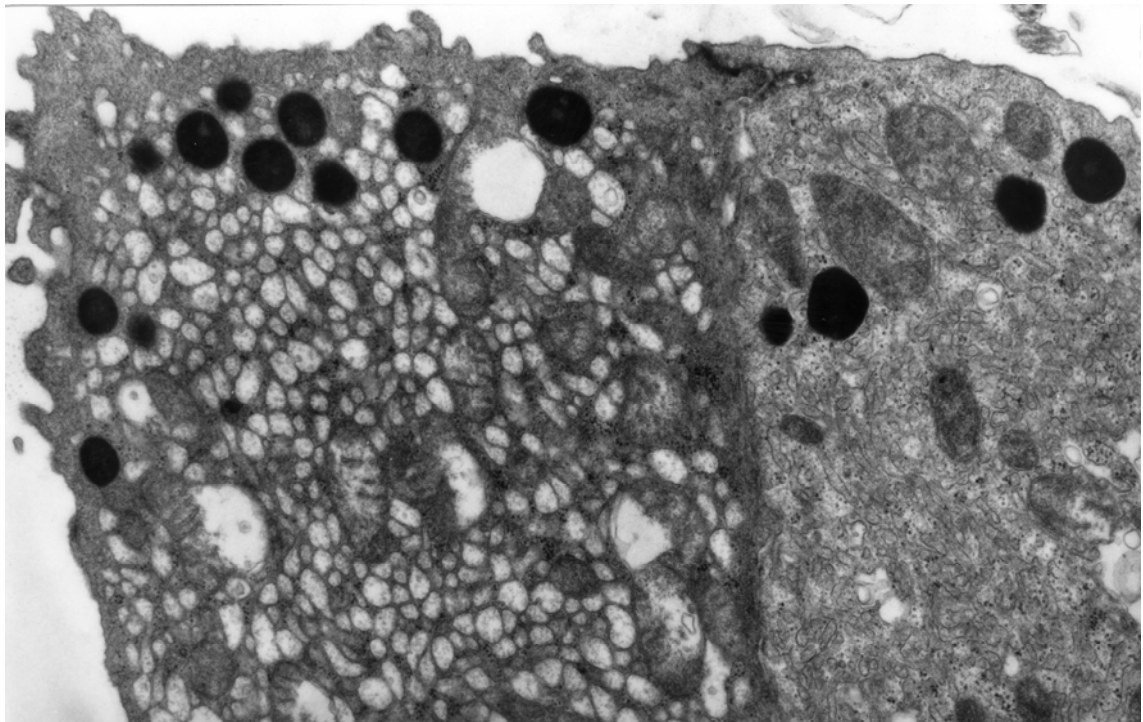
1  $\mu$ m

Obr. 54: Lysosom, dilatovaný Golgiho komplex a alterované mitochondrie v cytoplazmě řasinkové buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 20.000x



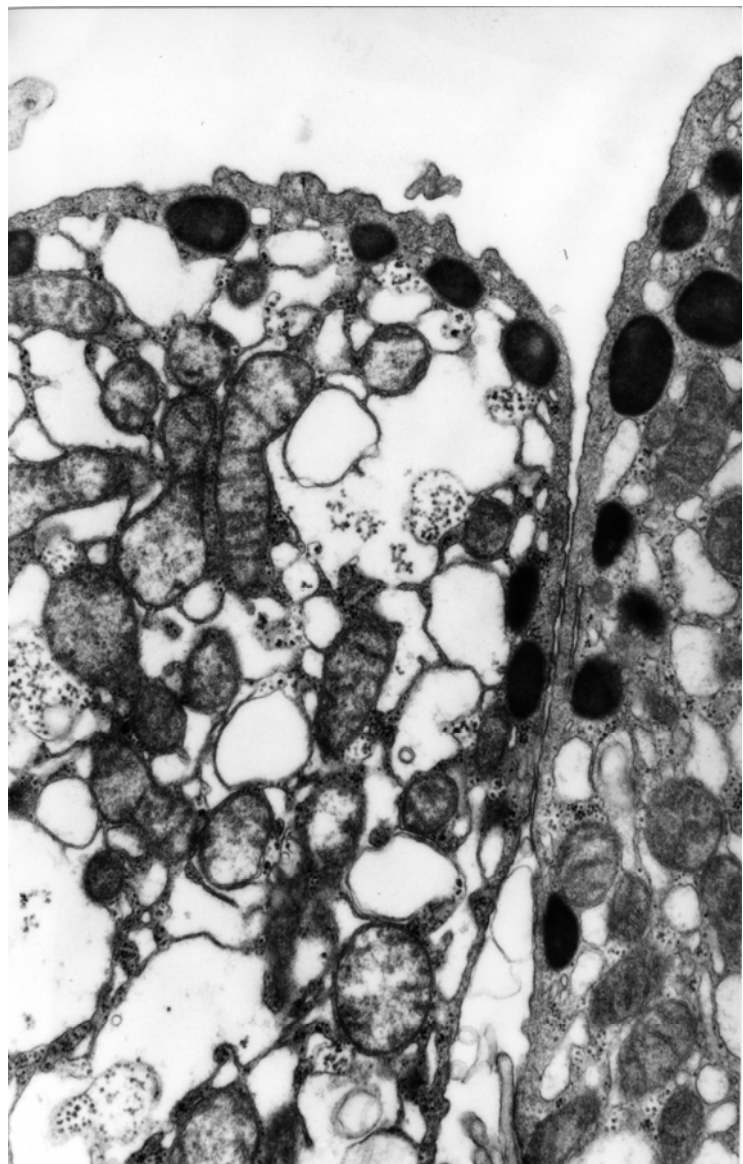
1  $\mu$ m

Obr. 55: Ojediné granulum s fibrogranulárním obsahem v cytoplazmě intaktní Clara buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu\text{m}$

Obr. 56: Apikální část dvou Clara buněk, z nichž pravá je intaktní a v levé pozorujeme dilataci tubulů hladkého endoplazmatického retikula a alteraci mitochondrií. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu\text{m}$

Obr. 57: Apikální část dvou alterovaných Clara buněk s různým stupněm dilatace tubulů hladkého endoplazmatického retikula a alterace mitochondrií. 30 min po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler, původní zvětšení 10.000x

## **2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek bronchospasmolytického preparátu Ventolin Inhaler (200 µg salbutamolu)**

Terminální bronchioly 30 minut po inhalaci Ventolinu vystýlal jednovrstevný epitel složený z nízkých řasinkových buněk a vysokých cylindrických Clara buněk. Zastoupení obou buněčných typů bylo  $48,4 \pm 2,3$  % buněk řasinkových a  $51,6 \pm 2,3$  % Clara buněk (tab. 11). Úzké mezibuněčné prostory neobsahovaly žádné volné buňky, mezibuněčné spoje byly dobře vytvořené (obr. 58), bazální lamina pod epitelem byla souvislá (obr. 59).

V řasinkových buňkách jsme pozorovali mírné zmnožení lysosomů a drobných vezikul (obr. 58, 60), jež se soustřeďovaly především v apikální oblasti cytoplazmy. Došlo rovněž k mírné dilataci cisteren Golgiho komplexu a granulárního endoplazmatického retikula (obr. 61) a ojediněle k lehké alteraci mitochondrií (obr. 60). Jen vzácně jsme pozorovali tvorbu apikálních cytoplazmatických protruzí (obr. 58).

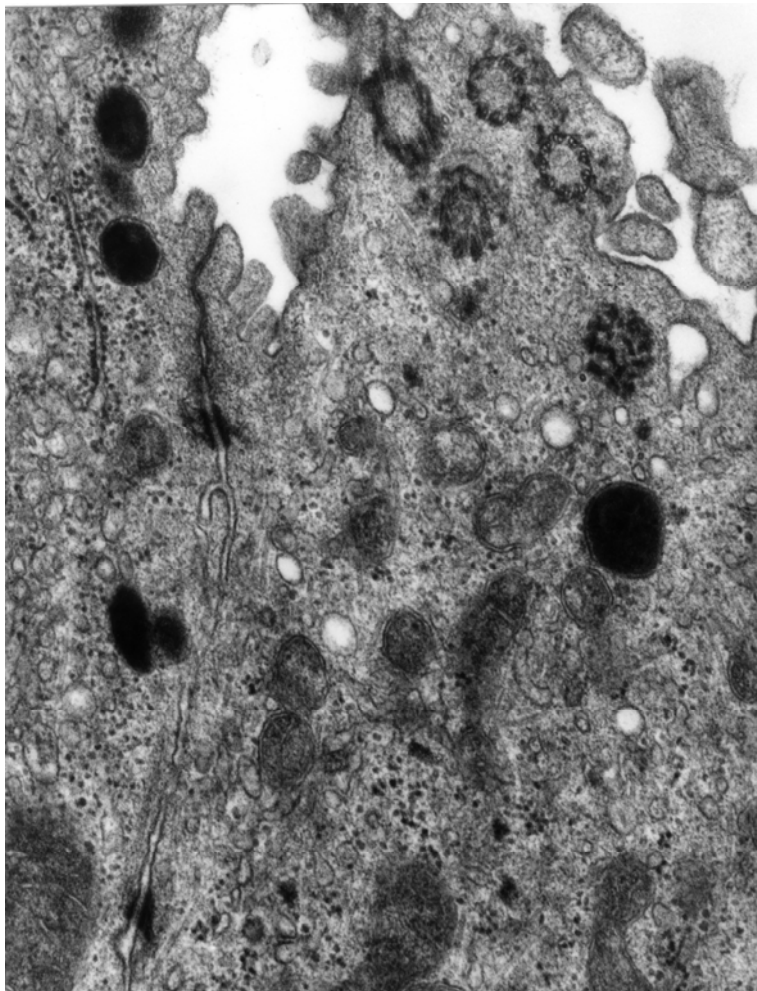
V cytoplazmě některých Clara buněk došlo po inhalaci salbutamolu pouze k velmi lehké dilataci tubulů hladkého endoplazmatického retikula a cisteren Golgiho komplexu. Rovněž zde došlo ke zmnožení sekundárních lysosomů (obr. 62). Pozorovali jsme však i Clara buňky zcela bez jakýchkoliv známek alterace (obr. 63). Elektronově denzní, drobná sekreční granula byla umístěna hlavně pod apikální buněčnou membránou, ale známky exocytózy jejich obsahu jsme nepozorovali (obr. 62, 63). Počet Clara buněk obsahujících sekreční granula byl po inhalaci Ventolinu  $78,7 \pm 7,2$  % (tab. 11). Obrazová analýza prokázala, že počet granul na jednotce plochy cytoplazmy Clara buněk se oproti kontrolám ani oproti předchozí experimentální skupině nezměnil, dosahoval  $0,17 \pm 0,02$  na  $\mu\text{m}^2$ . Došlo však ke zmenšení jejich průměrné velikosti na  $0,09 \pm 0,03$   $\mu\text{m}^2$ . Po aplikaci salbutamolu došlo v Clara buňkách ke zmnožení

mitochondrií na  $1,07 \pm 0,26$  na  $\mu\text{m}^2$ , mitochondrie měly průměrnou plochu  $0,14 \pm 0,04$   $\mu\text{m}^2$  (Tab. 11).

Tab. 11: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 30 minut po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler a Ventolin Inhaler

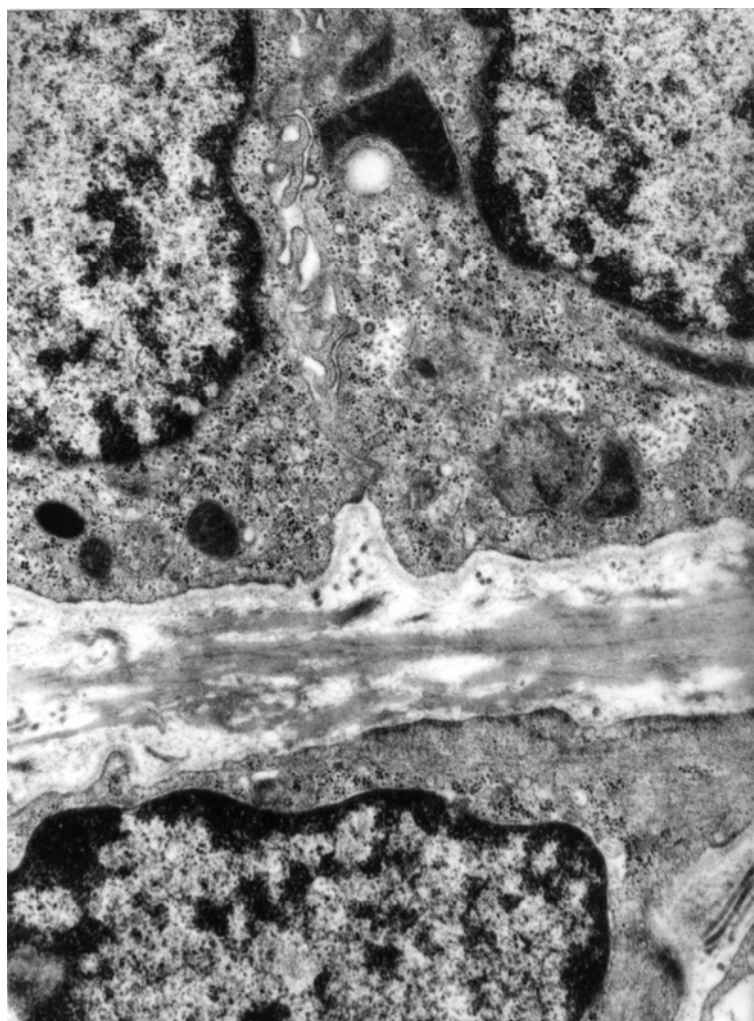
	Kontroly	Placebo Inhaler	Ventolin Inhaler
Řasinkové buňky (%)	$47,3 \pm 3,6$	$43,8 \pm 1,2$	$48,4 \pm 2,3$
Clara buňky (%)	$52,7 \pm 3,6$	$56,2 \pm 1,2$	$51,6 \pm 2,3$
Clara buňky s granuly (%)	$73,5 \pm 9,4$	$\#82,2 \pm 11,6$	$78,7 \pm 7,2$
Clara buňky bez granul (%)	$26,5 \pm 9,4$	$\#17,8 \pm 11,6$	$21,3 \pm 7,2$
Počet granul/ $\mu\text{m}^2$	$0,17 \pm 0,07$	$0,17 \pm 0,05$	$0,17 \pm 0,02$
Počet mitochondrií/ $\mu\text{m}^2$	$0,73 \pm 0,35$	$0,77 \pm 0,09$	$1,07 \pm 0,26$
Plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	$0,15 \pm 0,04$	$0,13 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,03$
Plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	$0,22 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,04$

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD, hodnoty označené # se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,05$



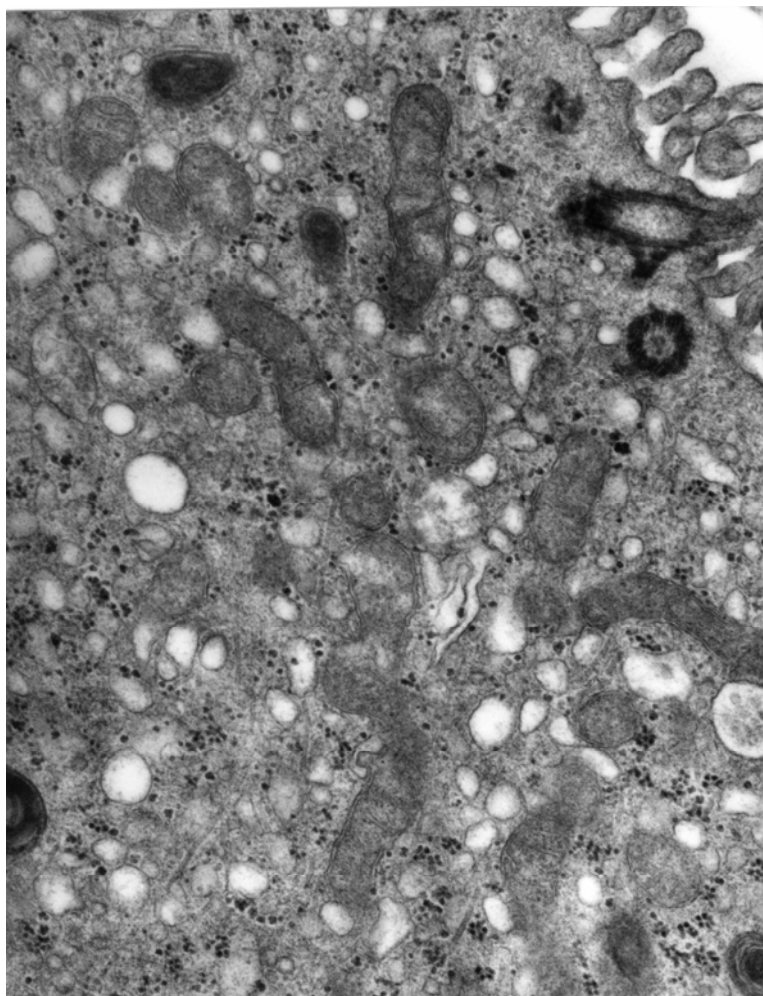
1  $\mu$ m

Obr. 58: Intaktní spojovací komplex mezi Clara buňkou a řasinkovou buňkou. Řasinková buňka vytváří apikální cytoplazmatickou protruzi a obsahuje nápadný lysosom. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 20.000x



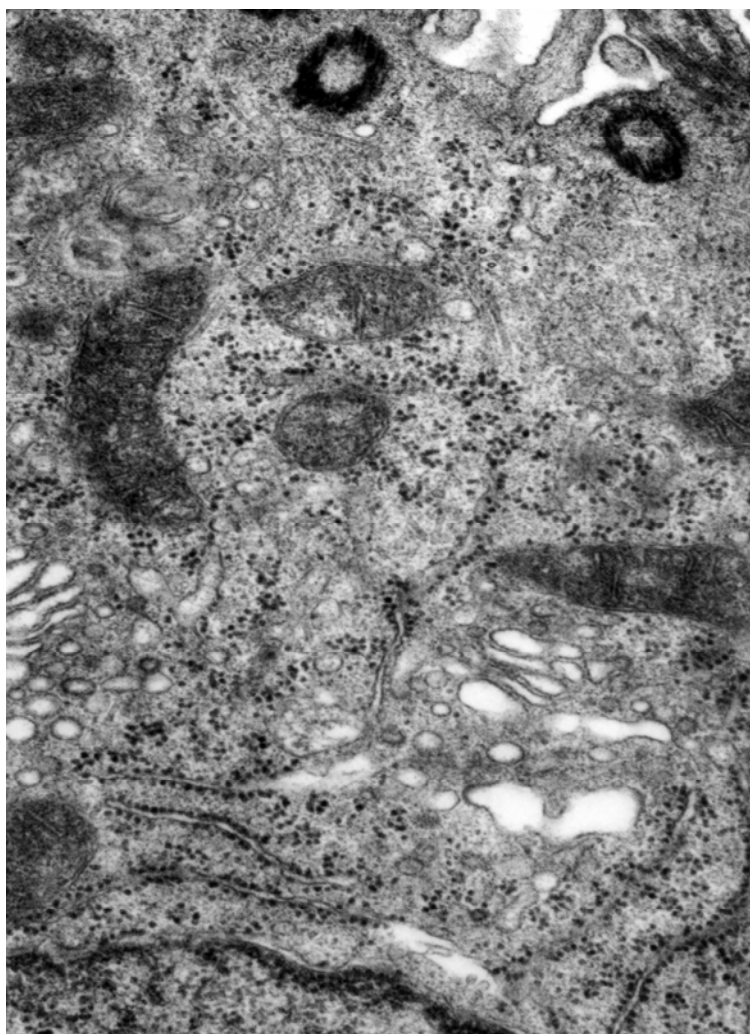
1  $\mu$ m

Obr. 59: Souvislá bazální lamina lemující bazální povrch dvou epitelových buněk a typické uspořádání dalších vrstev stěny terminálního bronchiolu. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu$ m

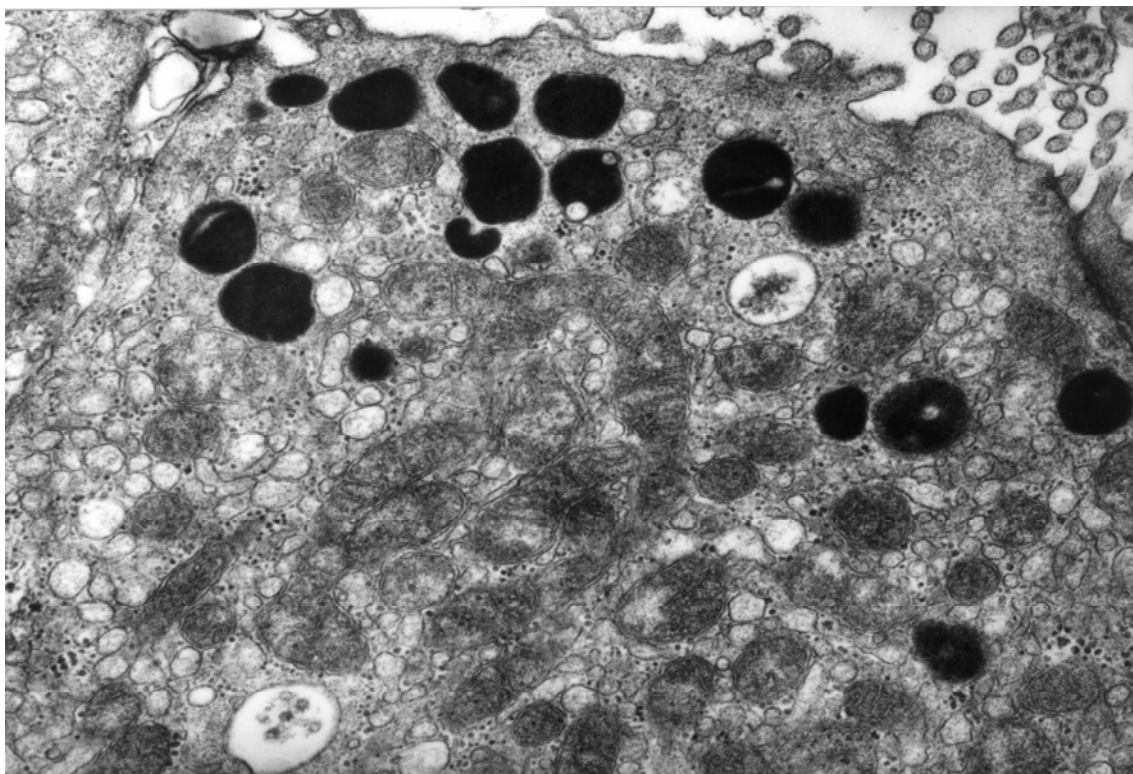
Obr. 60: Drobné vezikuly, lysosomy a lehce alterované mitochondrie v cytoplazmě řasinkové buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 15.000x



1  $\mu$ m

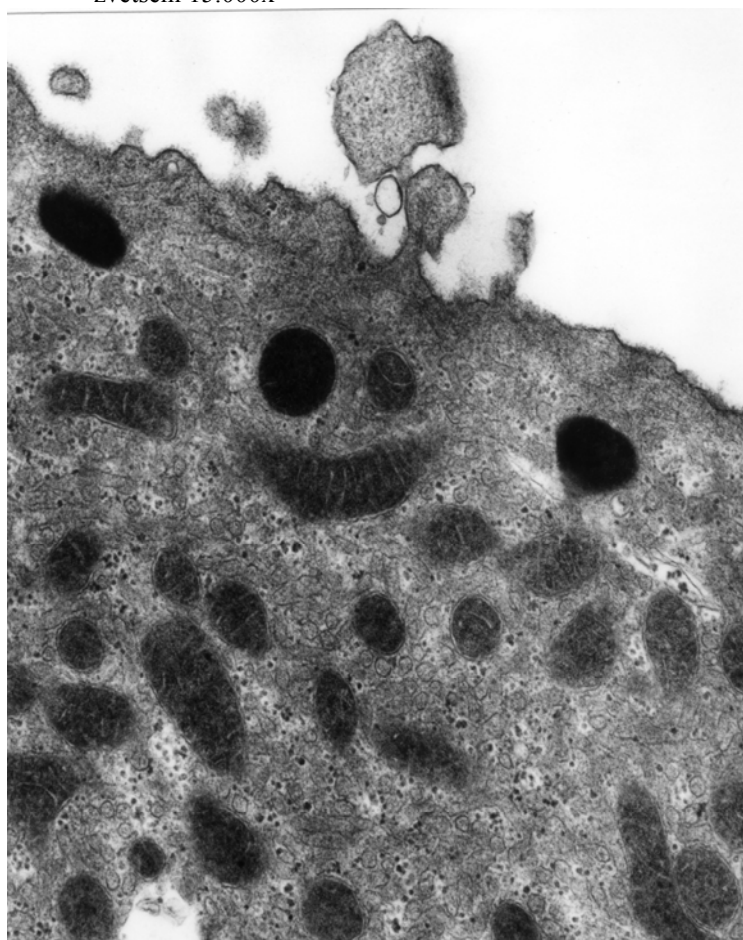
Obr. 61: Lehce dilatované cisterny Golgiho komplexu a granulárního endoplazmatického retikula v cytoplazmě řasinkové buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 20.000x





1  $\mu$ m

Obr. 62: Lehce dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, multivezikulární tělíska, četná granula a mitochondrie v apikální části Clara buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 15.000x



1  $\mu$ m

Obr. 63: Drobná cytoplazmatická protruze na apikální části jinak intaktní Clara buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Ventolinu, původní zvětšení 15.000x

### **3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek preparátu Becotide Inhaler (100 µg dipropionátu beklometazonu) ze skupiny inhalačních kortikosteroidů**

Terminální bronchioly králíků 30 minut po inhalaci Becotidu byly vystlány jednovrstevným epitelem složeným z  $46,5 \pm 1,9$  % řasinkových buněk a z  $53,5 \pm 1,9$  % Clara buněk, které se téměř pravidelně střídaly (obr. 64, tab. 12). Buňky ležely na dobře vyvinuté bazální lamině, apikální spojovací komplexy byly intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké (obr. 65).

Řasinkové buňky jevíly známky mírné patologické alterace v hlubších oblastech cytoplazmy. Jejich Golgiho komplexy byly dilatované (obr. 66) a počet drobných vezikul, multivezikulárních tělísek a heterogenních lysosomů se zvýšil (obr. 67). V některých řasinkových buňkách došlo k dilataci perinukleární cisterny a alteraci mitochondrií (obr. 67). Apikální povrchy řasinkových buněk nesoucí trsy řasinek byly většinou intaktní (obr. 66).

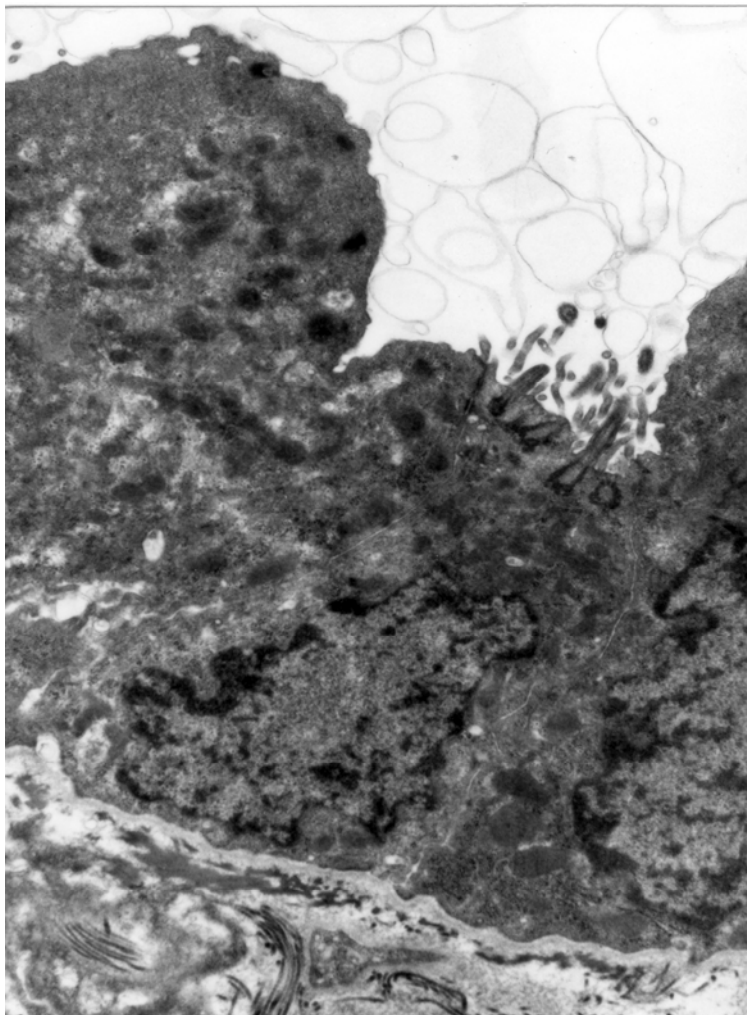
Většina Clara buněk nevykazovala žádné známky patologické alterace. V jejich cytoplazmě převládaly úzké tubuly hladkého endoplazmatického retikula, četné velké, středně elektronově denzní mitochondrie a vysoce elektronově denzní sekreční granula umístěná především v apikální oblasti (obr. 68). Některé Clara buňky obsahovaly dilatované prostory hladkého endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu (obr. 69). Občas jsme v epitelu pozorovali degenerující Clara buňky s vakuolizovanou cytoplazmou, alterovanými mitochondriemi a poškozenými jádry (obr. 70). Zbytky uvolněných degenerovaných buněk jsme zaznamenali i volně v luminu terminálních bronchiolů (obr. 71). Sekreční granula jsme pozorovali v  $80,0 \pm 10,6$  % Clara buněk (tab. 12). Byla většinou střeďána v cytoplazmě. Pomocí počítačové obrazové analýzy jsme našli v supranukleární cytoplazmě Clara buněk  $0,16 \pm 0,02$  sekrečních granul a

1,19 ± 0,08 mitochondrií na 1 μm<sup>2</sup>. Průměrná plocha granul byla 0,10 ± 0,02 μm<sup>2</sup>; mitochondrie měřily v průměru 0,11 ± 0,02 μm<sup>2</sup> (Tab. 12).

Tab. 12: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 30 minut po inhalaci dvou dávek Placebo Inhaler a Becotide Inhaler (relativní hodnoty)

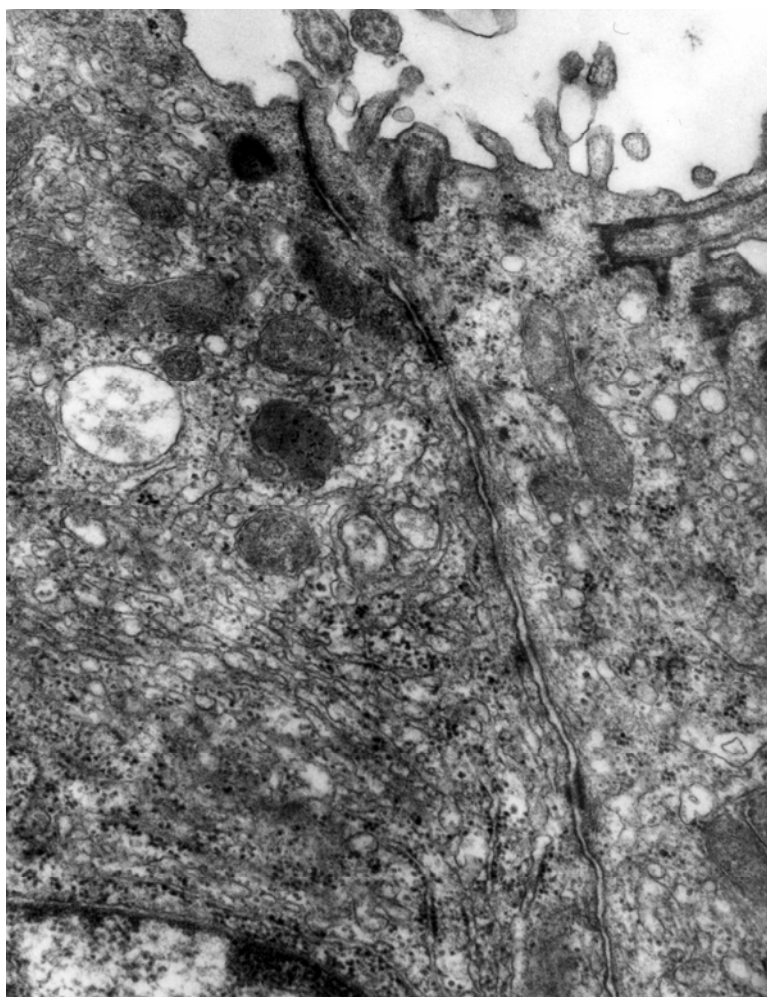
	Kontroly	Placebo Inhaler	Becotide Inhaler
Řasinkové buňky (%)	47,3 ± 3,6	43,8 ± 1,2	46,5 ± 1,9
Clara buňky (%)	52,7 ± 3,6	56,2 ± 1,2	53,5 ± 1,9
Clara buňky s granuly (%)	73,5 ± 9,4	#82,2 ± 11,6	#80,0 ± 10,6
Clara buňky bez granul (%)	26,5 ± 9,4	#17,8 ± 11,6	#20,0 ± 10,6
Počet granul/μm <sup>2</sup>	0,17 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,16 ± 0,02
Počet mitochondrií/μm <sup>2</sup>	0,73 ± 0,35	0,77 ± 0,09	#1,19 ± 0,08
Plocha granul (μm <sup>2</sup> )	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,02
Plocha mitochondrií (μm <sup>2</sup> )	0,22 ± 0,08	0,16 ± 0,01	#0,11 ± 0,02

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, hodnoty označené # se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti p < 0,05, hodnoty spojené čarou se vzájemně statisticky významně liší na hladině významnosti p < 0,05



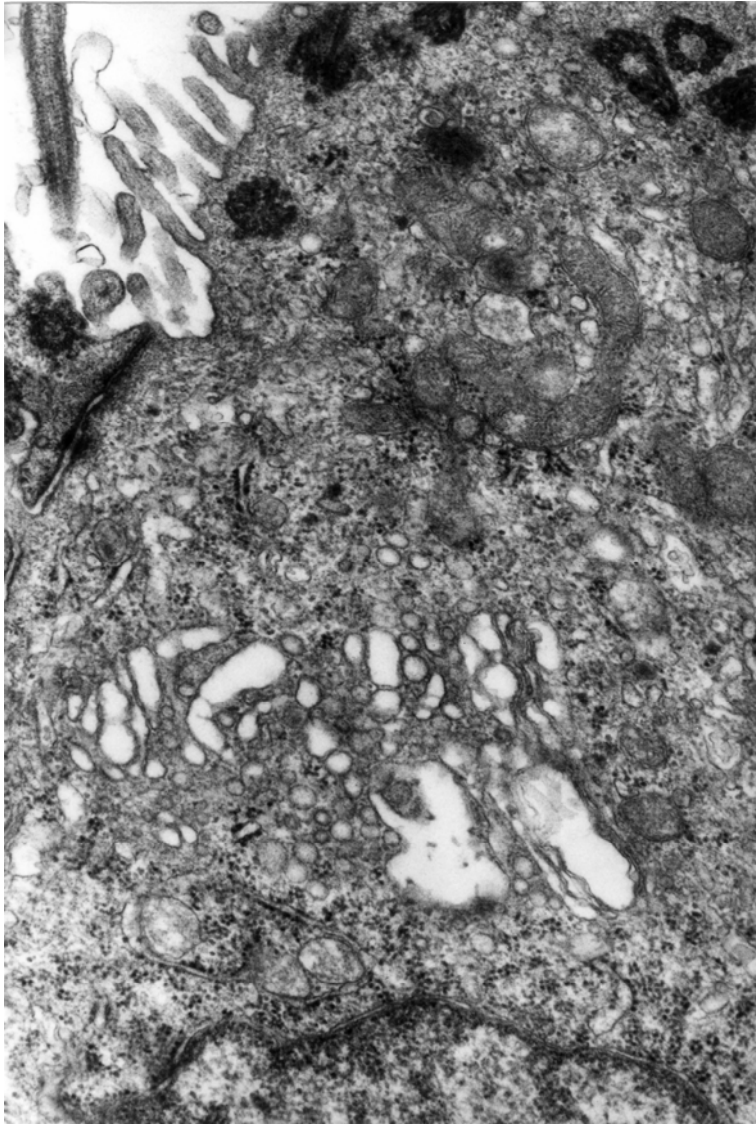
1  $\mu$ m

Obr. 64: Úsek intaktního epitelu a lamina propria mucosae terminálního bronchiolu. V luminu jsou zbytky membrán degenerovaných buněk. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 6.000x



1  $\mu$ m

Obr. 65: Intaktní spojovací komplex mezi Clara buňkou a řasinkovou buňkou. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x

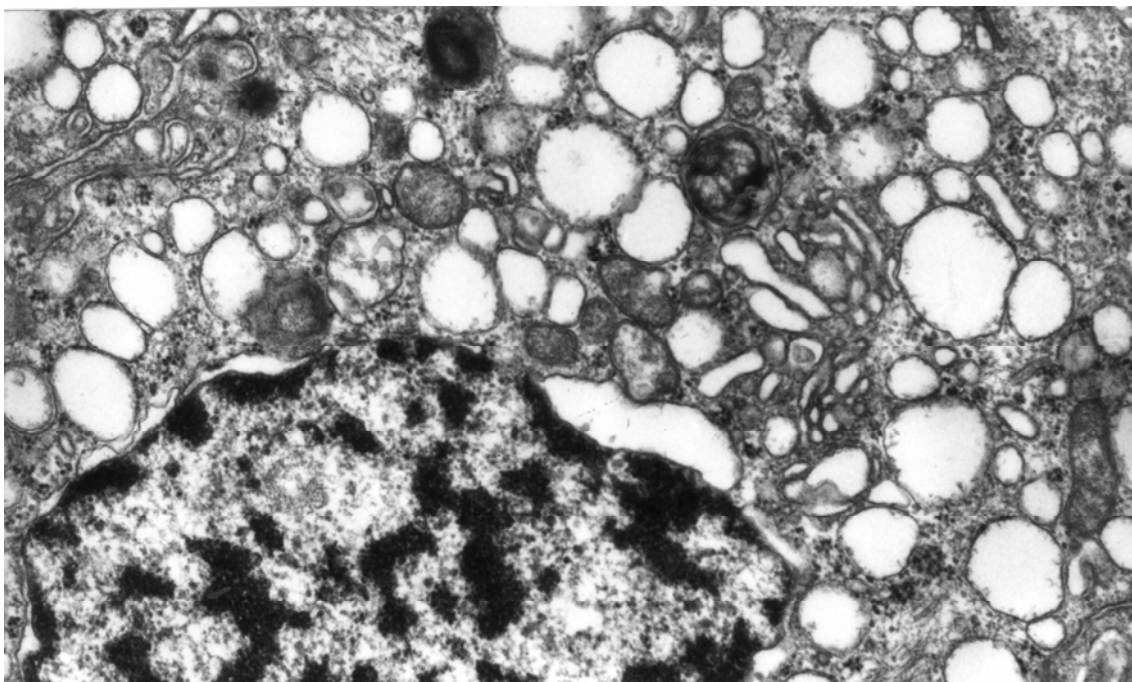


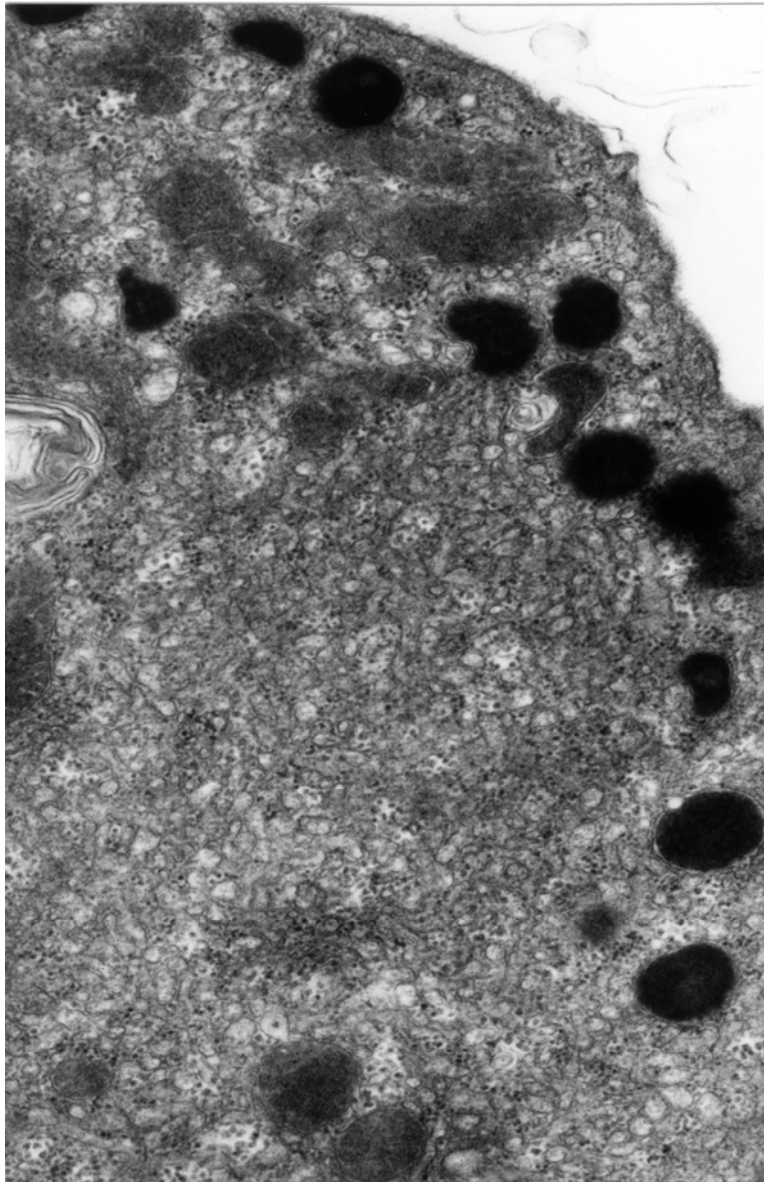
1  $\mu$ m

Obr. 66: Dilatovaný Golgiho komplex v jinak intaktní cytoplazmě řasinkové buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x

1  $\mu$ m

Obr. 67: Dilatovaná perinukleární cisterna, zmnožené vezikuly, heterogenní lysosomy a alterované mitochondrie v cytoplazmě řasinkové buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x



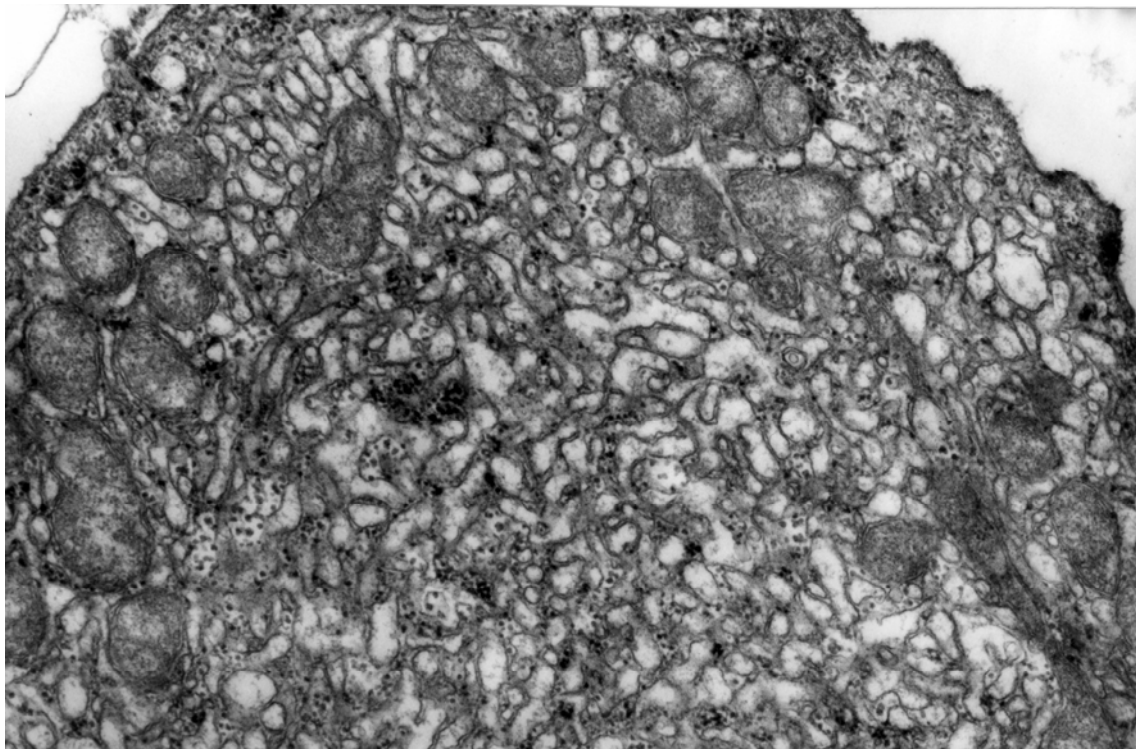


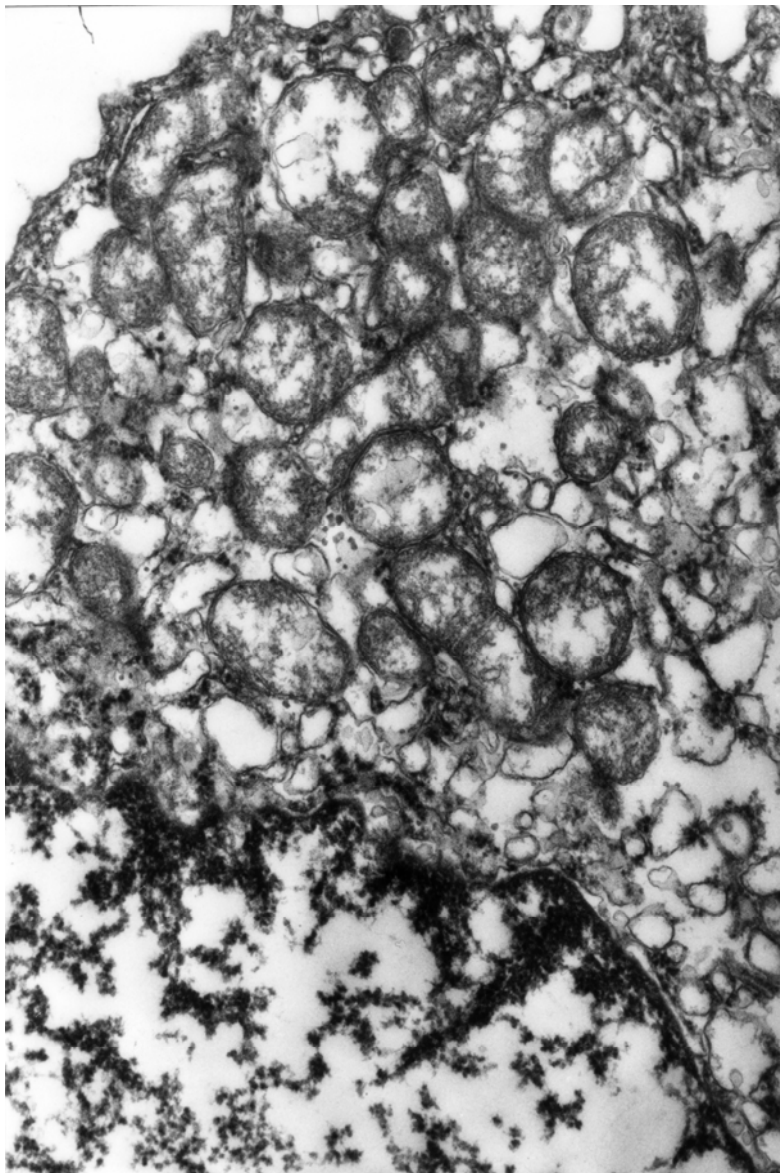
1  $\mu\text{m}$

Obr. 68: Intaktní cytoplazma Clara buňky s četnými sekrečními granuly, mitochondriemi a úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x

1  $\mu\text{m}$

Obr. 69: Lehce dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a četné mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x



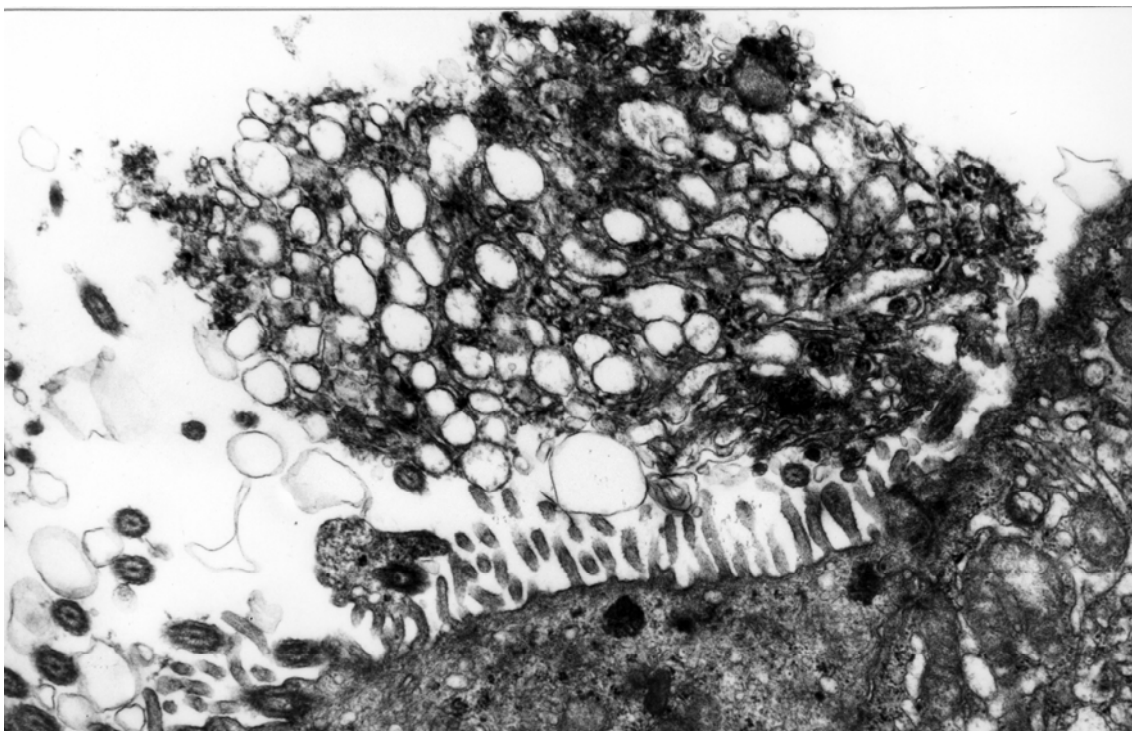


1  $\mu\text{m}$

Obr. 70: Výrazně dilatovaná tubuly hladkého endoplazmatického retikula, alterované mitochondrie a poškozené jádro Clara buňky. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 15.000x

1  $\mu\text{m}$

Obr. 71: Zbytky degenerované cytoplazmy Clara buňky nad epitelem terminálního bronchiolu. 30 min po inhalaci dvou dávek Becotidu, původní zvětšení 10.000x



## Diskuse

Vzhledem k tomu, že inhalační aplikace léků patří v poslední době k velice oblíbeným formám terapie respiračních onemocnění, především bronchiálního astmatu a chronické plicní obstrukční nemoci, objevily se práce studující vliv různých inhalačně podaných látek na dýchací cesty. Autoři se začali zamýšlet nad otázkou, do jaké míry jsou inhalační aerosoly schopné proniknout do dýchacích cest a do plicních alveolů. Studie s monodisperzními bronchodilatačními aerosoly ukázaly, že optimální velikost kapének pro léčbu nemocí dýchacích cest je okolo 3  $\mu\text{m}$ . Větší kapénky (5 - 6  $\mu\text{m}$ ) se většinou usazovaly v orofaryngu a menší kapénky (1,5  $\mu\text{m}$ ) pronikaly ve zvýšené míře až do alveolů (Howarth 2001, Usmani a spol. 2005). Standardní dávkovací nádoby (MDI dávkovače) pracující na bázi stlačených chlorofluoruhlodíků (freonů) vytvářejí aerosol o průměrné velikosti kapének (MMAD - mass median aerodynamic diameter) 3,5 – 4  $\mu\text{m}$  (Kelly 2003). Katetr, který jsme použili jako nástavec na standardní vyústění dávkovače, nepochybně modifikoval velikost kapének. Hess a jeho spolupracovníci použili stejným způsobem jako my 10 cm dlouhý 19-G intravenózní katetr a naměřili velikost kapének  $3,14 \pm 0,61 \mu\text{m}$  (Hess a spol. 1995). V jiné studii byla naměřena MMAD kapének vycházejících z 19-SWG katetru dlouhého 22 cm  $2,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$  (Taylor a spol. 1993). Náš katetr byl lehce silnější a kratší než oba použité ve zmíněných studiích, nicméně se domníváme, že velikost kapének aerosolu se pohybovala mezi hodnotami 1 – 5  $\mu\text{m}$ , což jsou hodnoty uváděné jako hraniční pro použitelnost při inhalační terapii (Taylor a spol. 1993).

Působením aerosolu salbutamolu na sliznici dýchacích cest se na úrovni světelné mikroskopie zabýval Spahr-Schopfer se spolupracovníky (Spahr-Schopfer a spol. 1994). Ve své studii srovnali morfologický obraz dýchacích cest ve třech etážích (trachea, velký bronchus a malý bronchus) a plicní tkáň králíků 3 hodiny po



intratracheální aplikaci 20 dávek Ventolinu i Placebo Inhaleru pomocí 19-G katetru zavedeného do endotracheální rourky. Nalezli rozsáhlé známky patologické alterace jak epitelu, tak i hlubších vrstev stěny po aplikaci obou sprejů, vždy však výraznější po aplikaci Ventolinu. Patologické změny byly nejvýraznější v průdušnici a jejich skóre se snižovalo směrem do periferie, v malých bronších už bylo poškození sliznice statisticky významně odlišné od kontrol pouze po aplikaci Ventolinu a ne Placeba. Plicní tkáň byla intaktní. Pomocí dalších experimentů autoři usoudili, že hlavní vinu za poškození epitelu nese kyselina olejová, která je v náplni tlakových nádobek používaná jako surfaktant, nevysvětlili tím však výraznější alteraci sliznice po podání Ventolinu než po podání Placeba. Podobnou studii uspořádala skupina autorů vedená Shortenem (Shorten a spol. 1995), která použila rovněž Ventolin Inhaler a aplikovala ho intubovaným králíkům nejen 19-G katetrem zavedeným do endotracheální rourky (i.t.), ale také přímo do trubice ventilátoru. Autoři použili 5 standardních dávek Ventolinu a za hodinu od i.t. aplikace pozorovali rovněž patologickou alteraci sliznice, jejíž stupeň se snižoval se vzdáleností příslušného úseku dýchacích cest od místa aplikace. Naopak po aplikaci až 20 dávek Ventolinu do trubice ventilátoru nepozorovali žádné signifikantní změny epitelu. V následující studii stejné skupiny autorů, jejíž hlavním cílem bylo kvantifikovat průnik salbutamolu do plic pomocí radioaktivního značení, byl stupeň alterace sliznice výrazně menší. Autoři se tento rozdíl snažili vysvětlit trochu jiným uspořádáním pokusu (Shorten a spol. 2000).

Zvýšení počtu sekrečních buněk v epitelu trachey i intrapulmonálních dýchacích cest popsaly Jones a Reid (1979) u potkanů po opakovaném subkutánním podání salbutamolu. Toto zvýšení bylo podstatně menší než po aplikaci jiného  $\beta$  adrenergního preparátu isoproterenolu. Podobnou mírnou hyperplasií pohárkových buněk popsali u potkanů po čtyřtýdenním subkutánním podávání salbutamolu i Kamachi a spol. (2001).

Naopak výraznou proliferaci tracheálních epitelových buněk zjistili u myší po dlouhodobé inhalaci salbutamolu Tamaoki se spolupracovníky (Tamaoki a spol. 2004).

Po jednorázové inhalaci 500 µg salbutamolu byla u lidských dobrovolníků zaznamenána zrychlená mukociliární clearance (Lafortuna a Fazio 1984), po inhalaci 200 µg nebylo zrychlení signifikantní (Guleria a spol. 2003). Podobné výsledky byly pozorovány i u ovcí po jednorázové aplikaci dvou jiných  $\beta_2$  adrenergických bronchospasmolytik – salmeterolu a albuterolu (Sabater a spol. 2005). Naopak terbutalin nezlepšil mukociliární clearance u astmatických pacientů (Daviskas a spol. 2005).

V naší studii věnované vlivu salbutamolu a dalších inhalačních bronchospasmolytik na epitel trachey (Konrádová a spol. 1997, 1998a, 2000) jsme použili Ventolin Inhaler a Placebo Inhaler ve stejné dávce a podané stejným způsobem jako v současném pokusu. Inhalace Ventolinu vyvolala stimulaci 91% pohárkových buněk, zatímco po inhalaci přípravku Placebo Inhaler došlo k vyprázdňování pouze 12% sekrečních elementů. Inhalace Ventolinu také výrazně ovlivnila mechanismus sekrece hlenu. Často jsme pozorovali oddělování celých skupin hlenových granul od buněk, což považujeme za známku apokrinního způsobu sekrece. V četných buňkách byl pozorován rozpad membrán oddělujících sousední hlenová granula umožňující prakticky současné vyprázdnění celého hlenového obsahu z buňky.

Inhalace Ventolinu nejen nadměrně stimulovala, ale také poškodila pohárkové buňky. Ve většině případů se pohárkové buňky po vyprázdnění hlenu nevracely do sekrečního cyklu, ale degenerovaly. Třicet minut po aplikaci Ventolinu tvořily degenerované buňky 79% sekrečních elementů a byly postupně uvolňovány z epitelu. Zbytky jejich vysoce elektronové denzní cytoplazmy jsme často pozorovali v oblasti

řasinkového lemu. Po aplikaci Placebo Inhaler degenerovala pouze 4% pohárkových buněk.

Třicet minut po aplikaci Ventolinu jsme zaznamenali výskyt početných diferencujících se sekrečních buněk. Distribuce pohárkových buněk v epitelu se však ještě nezměnila. Počet pohárkových buněk uspořádaných do skupin se nelišil statisticky významně od kontrolních hodnot. Po aplikaci Placebo Inhaler nedošlo ani k zvýšení počtu diferencujících se sekrečních buněk.

Po aplikaci obou aerosolů byly řasinkové buňky ovlivněny méně než buňky pohárkové. Po inhalaci Ventolinu jsme pozorovali alteraci a edém kortikálních částí cytoplazmy řasinkových buněk s tvorbou apikálních protruzí spojenou s destrukcí početných řasinek. I v hlubších oblastech cytoplazmy jsme pozorovali známky patologické alterace. Po aplikaci Placebo Inhaler byly tyto změny výrazně mírnější.

Po inhalaci Ventolinu jsme pozorovali v oblasti tracheálního řasinkového lemu vrstvy kondenzovaného sekretu a četné bakterie. Tyto nálezy považujeme za morfologické známky narušení samočisticí schopnosti epitelu (Yoneda 1976, Sturgess 1977, Konrádová 1991, Stratmann a spol. 1991, Konrádová a spol. 1996e, Wanner a spol. 1996, Geiser a spol. 1997). Po inhalaci Placebo Inhaler nedošlo ke vzniku podobných známek.

Podle klasifikace stupně poškození epitelu trachey, kterou máme vytvořenu na základě předcházejících pokusů (Konrádová 1991), jsme hodnotili poškození vyvolané inhalací dvou dávek Ventolinu jako středně až velmi závažné. Tento náš závěr je v souladu s pozorováním Spahr-Schopfera a spol. (1994) a Shortena a spol. (1995), kteří ovšem použili výrazně vyšší dávky. Naopak inhalace stejné dávky preparátu Placebo Inhaler vyvolala jen mírné narušení epitelu. Nemohli jsme tedy potvrdit názor těchto

autorů, že hlavním viníkem poškození epitelu jsou propelenty obsažené v tlakových nádobkách, zvláště kyselina olejová.

V terminálních bronchiolech byla situace poněkud odlišná. Clara buňky byly aplikací obou aerosolů alterovány, ne však stimulovány k vylučování sekretu. Převažovaly naopak známky střádání sekretu. Počet Clara buněk obsahujících granula v cytoplasmě se zvýšil po inhalaci obou sprejů, po inhalaci Placebo Inhaler dokonce statisticky významně ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolami. Počet granul na jednotce plochy cytoplazmy Clara buněk se však nezměnil. Jejich průměrná velikost se sice snížila, zvláště po inhalaci Ventolinu, ale statisticky významný rozdíl nevznikl. Po aplikaci Ventolinu jsme pozorovali zvýšení počtu průměrně drobnějších mitochondrií v supranukleární cytoplasmě, ale ani zde nebyl rozdíl statisticky významný. U žádné skupiny jsme nepozorovali nárůst morfologických známek vylučování sekretu. Poškození Clara buněk aplikací obou sprejů bylo vyjádřené nerovnoměrně, nikdy však nevedlo k vyslovené degeneraci buněk. Rovněž alterace řasinkových buněk byla jen mírná. Takovéto poškození pozorovatelné na ultrastrukturální úrovni nemusí být zřetelné na úrovni světelné mikroskopie. Lze tedy říci, že se naše nálezy shodují s nálezy Spahr-Schopfera a spol. (1994) a Shortena a spol. (1995), kteří po aplikaci několikanásobně vyšších dávek aerosolů pozorovali v malých bronších jen mírné poškození epitelu.

Přímý účinek glukokortikoidů na epitel dýchacích cest byl studován hlavně *in vitro*. Autoři těchto studií dospěli k velice rozporuplným závěrům. Dorscheid a jeho spolupracovníci (Dorscheid a spol. 2001, White a Dorscheid 2002) našli poškození a apoptózu kultury buněk epitelu dýchacích cest vystavené působení čtyř glukokortikoidů včetně beklometazonu. Naopak Wen a jeho skupina (Wen a spol. 1997) popsali inhibici apoptózy v kultuře plicních epitelových buněk po přidání dexametazonu do

kultivačního média. Podobné výsledky byly pozorovány také po aplikaci budesonidu (Pelaia a spol. 2003).

Experimentální studie věnující se účinku glukokortikoidů na epitel dýchacích cest u zvířecích modelů jsou vzácné. Pavlovic a spol. (1998) popsali snížení počtu a výšky tracheálních epitelových buněk u potkanů vystavených intramuskulárním injekcím triamcinolonu po dobu 7 dní. Dorscheidovy výsledky *in vitro* byly podpořeny studií *in vivo* na myších, jimž byl 2 až 4 týdny intraperitoneálně aplikován dexametazon. Autoři popsali odlučování a apoptózu epitelových buněk jak v malých, tak ve velkých dýchacích cestách (Dorscheid a spol. 2003). Týdenní pravidelná inhalace aerosolu budesonidu vedla u myší k proliferaci bronchiolárních Clara buněk a ke zvýšení počtu mitochondrií v jejich cytoplazmě (Roth a spol. 2007). Zajímavý byl nálezn u potkanů po adrenalectomii (Elia a spol. 2003). Sedm dní po zákroku došlo ke zmenšení jejich Clara buněk a ke snížení počtu sekrečních granul v cytoplazmě. Po substitučním podávání dexametazonu se ultrastrukturální obraz Clara buněk vrátil k normálu.

U lidských dobrovolníků – pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí – nebyla pozorována změna mukociliární clearance po jednorázové inhalaci ani 200 µg ani 250 µg beklometazonu (Fazio a Lafortuna 1986, Guleria a spol. 2003).

V našem experimentu jsme u týchž králíků 30 minut po inhalačním podání dvou dávek Becotidu studovali kromě výstelky terminálních bronchiolů i epitel trachey. Použili jsme stejnou metodu kvantitativního hodnocení ultrastruktury tracheálního epitelu jako v předchozích experimentech (Konrádová 1991). Cílovými buňkami pro působení beklometazonu byly opět buňky pohárkové. Došlo ke stimulaci 71% buněk, což byla hodnota statisticky významně odlišná jak od kontrolních zvířat, tak od zvířat, jimž byl aplikován Placebo Inhaler. Rovněž mechanismus sekrece hlenu byl ovlivněn. Pozorovali jsme známky apokrinní sekrece i urychlené splývání sekrečních granul

s následným vyloučením celého hlenového obsahu z buňky. Nadměrně stimulované buňky po vyprázdnění hlenu degenerovaly, jejich počet činil 58% ze všech nalezených pohárkových buněk. Po aplikaci Becotidu jsme pozorovali 2% diferencujících se sekrečních elementů a ve srovnání s kontrolami i se zvířaty po aplikaci Placebo Inhaler téměř dvojnásobné zvýšení počtu pohárkových buněk uspořádaných do skupinek.

Tracheální řasinkové buňky byly ovlivněny aplikací Becotidu podobně, jako tytéž buňky v epitelu terminálních bronchiolů. Na jejich apikálních površích jsme pozorovali jen drobné cytoplazmatické protruze, jež někdy obsahovaly axonémy zanikajících řasinek. V cytoplazmě jsme zaznamenali zvýšený výskyt drobných vezikul a lysosomů a mírnou dilataci cisteren granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu. V některých řasinkových buňkách došlo k poškození mitochondrií. Výjimečně jsme našli intracytoplazmatické řasinkové vakuoly.

Rovněž po inhalaci Becotidu jsme našli morfologické známky narušené samočisticí schopnosti tracheálního epitelu. Mezi řasinkami jsme pozorovali mohutné vrstvy kondenzovaného sekretu. Podle naší klasifikace stupně poškození epitelu trachey (Konrádová 1991) jsme hodnotili poškození vyvolané inhalací dvou dávek Becotidu jako středně závažné.

Nejnápadnějším nálezem v bronchiolárních Clara buňkách byly známky patologické alterace. Po aplikaci Becotidu jsme, na rozdíl od skupiny králíků po aplikaci Placebo Inhaler, pozorovali i degeneraci Clara buněk a jejich odlučování z epitelu. Naopak morfologické známky vylučování sekretu byly vzácné. Sekreční granula byla v buňkách stádána. Počet buněk obsahujících granula byl, stejně jako po inhalaci Placebo Inhaler, signifikantně vyšší ( $p < 0,05$ ) než u kontrol. Průměrný počet sekrečních granul v supranukleární cytoplazmě se nezměnil. Granula byla v průměru menší než u kontrol a u zvířat po aplikaci Placebo Inhaler. Naopak počet mitochondrií

statisticky významně ( $p < 0,05$ ) stoupl a jejich průměrná velikost klesla oproti oběma skupinám. Tento nálezn lze vysvětlit výraznějšími známkami patologické alterace cytoplazmy. Je také možné, že se stejně jako v Rothově studii (Roth a spol. 2007) projevila schopnost glukokortikoidů stimulovat biogenezi mitochondrií (Weber a spol. 2002).

Rozdíl v nálezech v epitelu trachey a terminálních bronchiolů v obou experimentech lze částečně vysvětlit distribucí aerosolu v dýchacích cestách. Přestože jsme přesvědčení, že inhalovaný aerosol dosáhl při použití naší techniky i periferních dýchacích cest, je obsah inhalovaných kapek ve vdechnutém vzduchu nepochybně nižší ve vzdálenějších a užších úsecích bronchiálního stromu než v průdušnici. Tento názor potvrdila druhá studie Shortena a spol. (2000), kteří pomocí radioaktivního značení studovali průnik aerosolu salbutamolu do periferie králičích plic. Rozdílná je však také biologická reaktivita sekrečních elementů v obou vyšetřovaných úsecích.

Značná vzájemná podobnost reakce sekrečních buněk v obou studovaných oblastech epitelu na aplikaci zcela rozdílných inhalačních preparátů je vysvětlitelná nálezem Baraniuka a jeho spolupracovníků (Baraniuk a spol. 1997), kteří popsali indukci funkce  $\beta_2$  adrenergických receptorů v lidské nosní sliznici po aplikaci beklometazonu. Rovněž Rodrigo (2006) ve své rešerši klinických studií, které se věnovaly akutnímu účinku inhalačních kortikosteroidů, poukázal na možnou synergii kortikosteroidů a adrenergických bronchodilatačních preparátů.

## E. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci bronchospasmolytika aminophyllinu

### **Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 30 min po intravenózní aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg hmotnosti**

Třicet minut po i.v. aplikaci aminophyllinu lemoval terminální bronchioly králíků jednovrstevný cylindrický epitel, v němž se střídaly nižší buňky řasinkové a vysoké Clara buňky. Apikální komplexy byly intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké (obr. 72). Baze epitelu ležela na dobře vytvořené bazální lamině, pod níž se nacházela téměř souvislá vrstva elastických vláken (obr. 73).

Řasinkové buňky tvořily  $47,0 \pm 6,1\%$  buněk epitelu (tab. 13). Cytoplazma řasinkových buněk byla v kortikální oblasti nezměněna. Řasinky, které jsme pozorovali na apikálních površích, byly většinou intaktní, pozorovali jsme však i alterované kinocilie s vyšším obsahem cytoplazmy mezi axonémou a řasinkovou membránou. Vzácně se objevovaly i drobné apikální cytoplazmatické protruze, axonémy zanikajících řasinek jsme v nich však obvykle nezaznamenali (obr. 74). V hlubších oblastech cytoplazmy řasinkových buněk jsme nacházeli zmnožené drobné vakuoly a malé lysosomy s většinou heterogenním obsahem. Mitochondrie některých řasinkových buněk jevíly známky patologické alterace. Často jsme pozorovali dilatované prostory Golgiho komplexu. Ojedinele jsme našli diferencující se řasinkové buňky s vyvíjejícími se bazálními tělisky kinocilií dosud rozptýlenými v cytoplazmě (obr. 75).

Zbývajících  $53,0 \pm 6,1\%$  epitelových buněk tvořily Clara buňky (tab. 13). Některé obsahovaly zcela intaktní cytoplazmu s početnými, typicky úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula nahromaděnými především v apikální oblasti a vyplněnými středně elektronově denzním obsahem (obr. 76), dále s velkými



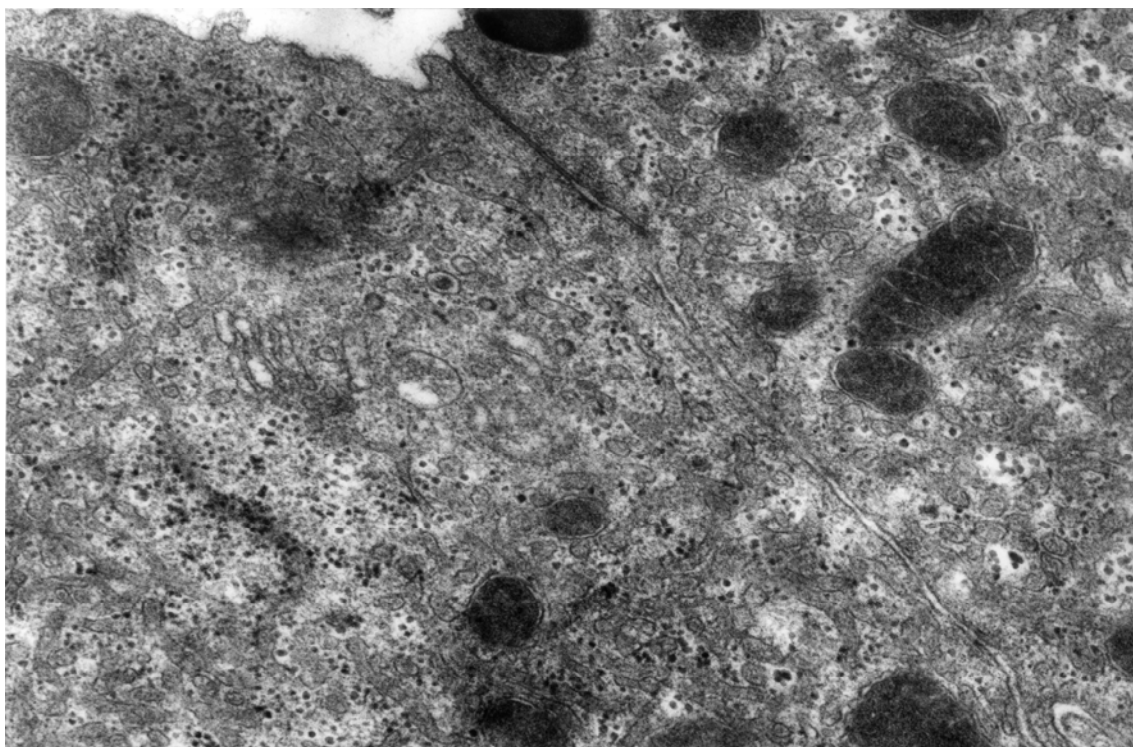
mitochondriemi a dobře vyvinutými cisternami granulárního endoplazmatického retikula uloženými bazálně. Jiné Clara buňky jevíly různý stupeň patologické alterace. Jejich cytoplazma byla v apikální části vyplněna dilatovanými tubuly hladkého endoplazmatického retikula s elektronově lucidním obsahem, mitochondrie byly světlé, zduřelé, cisterny granulárního endoplazmatického retikula i Golgiho komplexu byly mírné dilatované (obr. 77). Pomocí analyzátoru obrazu jsme napočítali průměrně  $1,08 \pm 0,34$  mitochondrií na  $1 \mu\text{m}^2$  plochy cytoplazmy Clara buněk (tab. 13), jejich průměrná plocha byla  $0,13 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ .

Sekreční granula byla obsažena v  $88,9 \pm 5,4\%$  Clara buněk (tab. 13). Granula byla umístěna především v apikálních částech cytoplazmy. Jejich obsah byl obvykle výrazně elektronově denzní, pozorovali jsme ale i ojedinělá světlejší granula. Na  $1 \mu\text{m}^2$  cytoplazmy Clara buněk jsme našli průměrně  $0,39 \pm 0,09$  granula (tab. 13). Průměrná plocha sekrečních granul byla  $0,14 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ . Poměrně často jsme pozorovali morfologické známky vylučování sekretu. Na apikálních površích Clara buněk jsme našli granula v kontaktu s buněčnou membránou, drobné cytoplazmatické protruze obsahující sekreční granula a zaznamenali jsme i uvolněná granula obklopená tenkým lem cytoplazmy v luminu bronchiolů (obr. 78). Nad některými alterovanými Clara buňkami jsme pozorovali sekreční granula i jiné součásti cytoplazmy uvolněné do lumina (obr. 79).

Tab. 13: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 30 minut po intravenózní aplikaci 5 mg/kg aminophyllinu

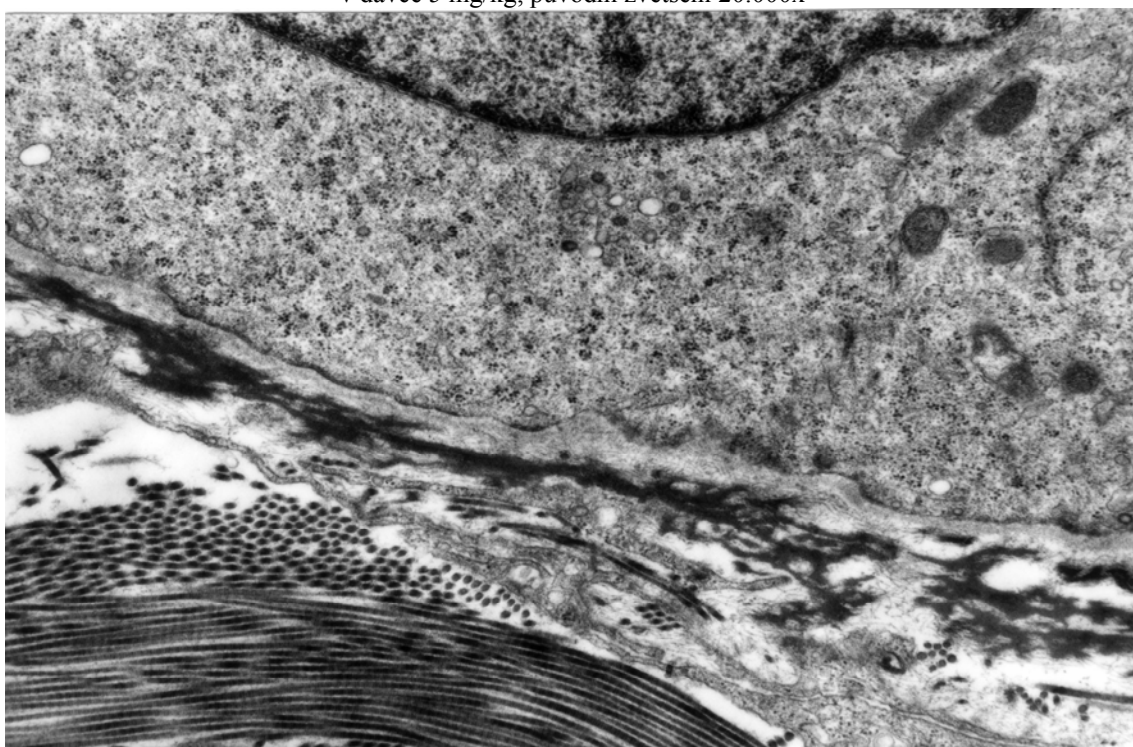
	Kontroly	Aminophyllin
Řasinkové buňky (%)	47,3 ± 3,6	47,0 ± 6,1
Clara buňky (%)	52,7 ± 3,6	53,0 ± 6,1
Clara buňky s granuly (%)	73,5 ± 9,4	*88,9 ± 5,4
Clara buňky bez granul (%)	26,5 ± 9,4	*11,1 ± 5,4
Počet granul/ $\mu\text{m}^2$	0,17 ± 0,07	#0,39 ± 0,09
Počet mitochondrií/ $\mu\text{m}^2$	0,73 ± 0,35	1,08 ± 0,34
Plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	0,15 ± 0,04	0,14 ± 0,05
Plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	0,22 ± 0,08	0,13 ± 0,05

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, hodnoty označené \* se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,01$ , hodnota označená # se statisticky významně liší od hodnoty u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,05$



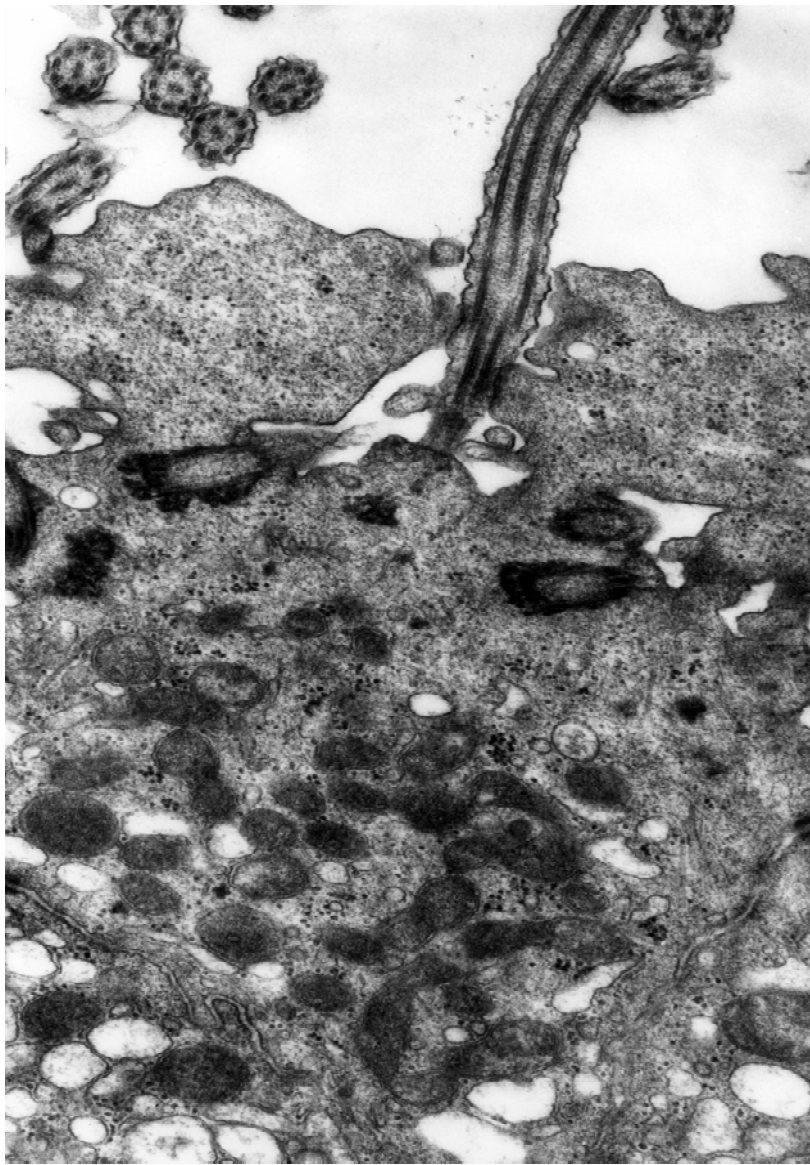
1  $\mu\text{m}$

Obr. 72: Intaktní spojovací komplex mezi dvěma Clara buňkami. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 20.000x



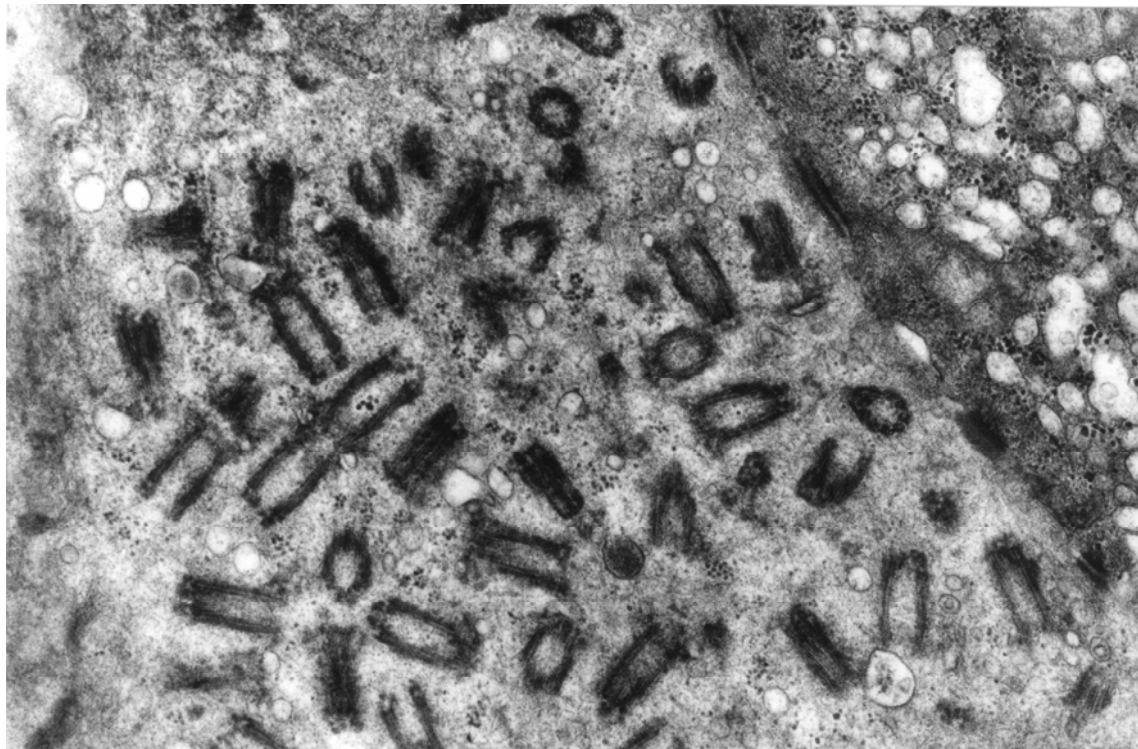
1  $\mu\text{m}$

Obr. 73: Souvislá bazální lamina a vrstva elastických vláken lemující bazální povrch řasinkové buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 10.000x



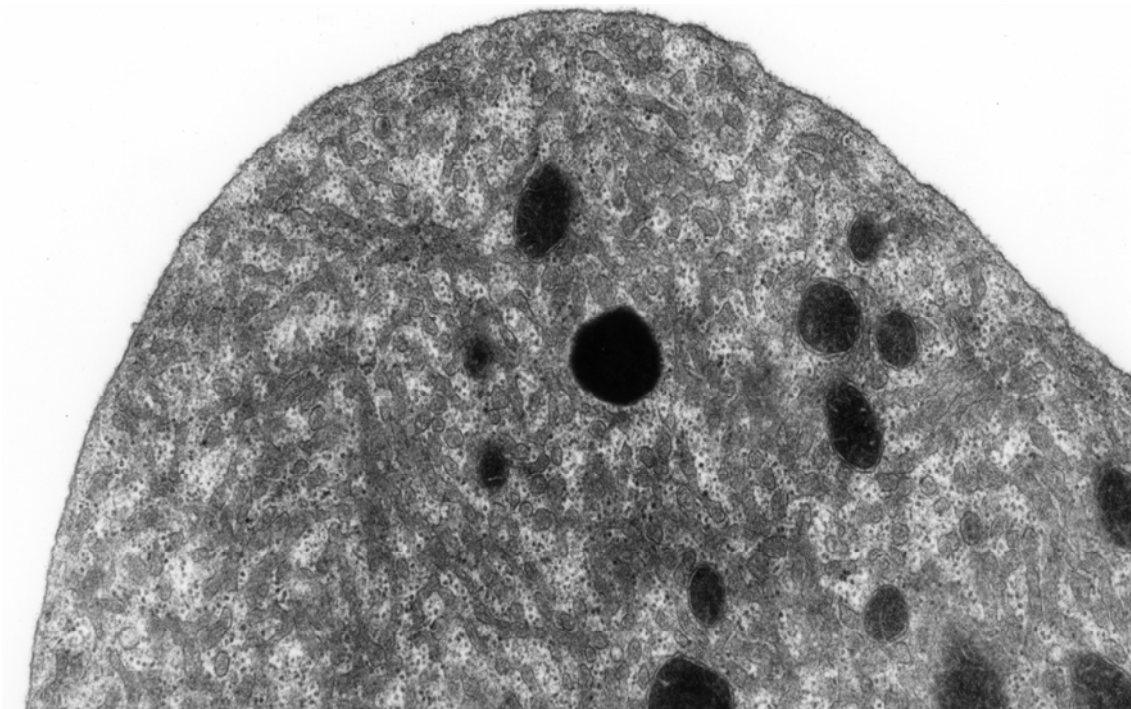
1  $\mu$ m

Obr. 74: Drobné apikální cytoplazmatické protruze na povrchu řasinkové buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 15.000x



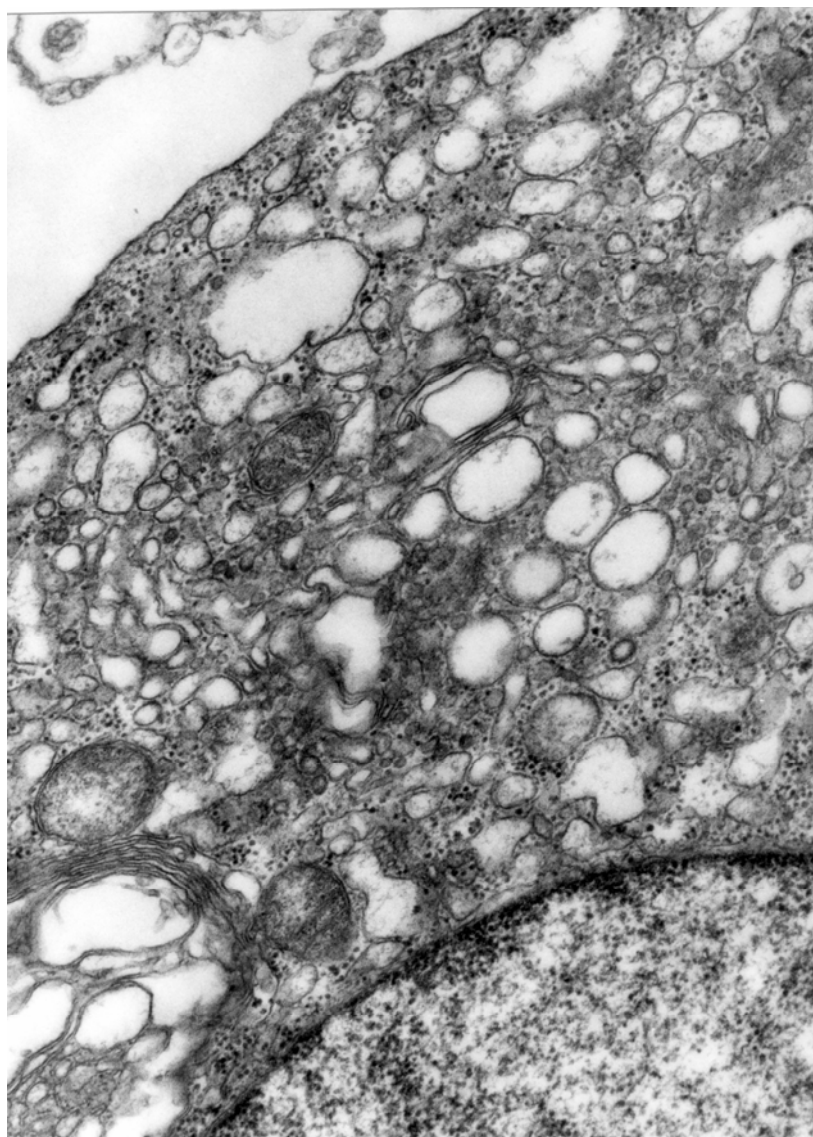
1  $\mu$ m

Obr. 75: Četná vyvíjející se bazální tělíska v apikální části diferencující se řasinkové buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 15.000x



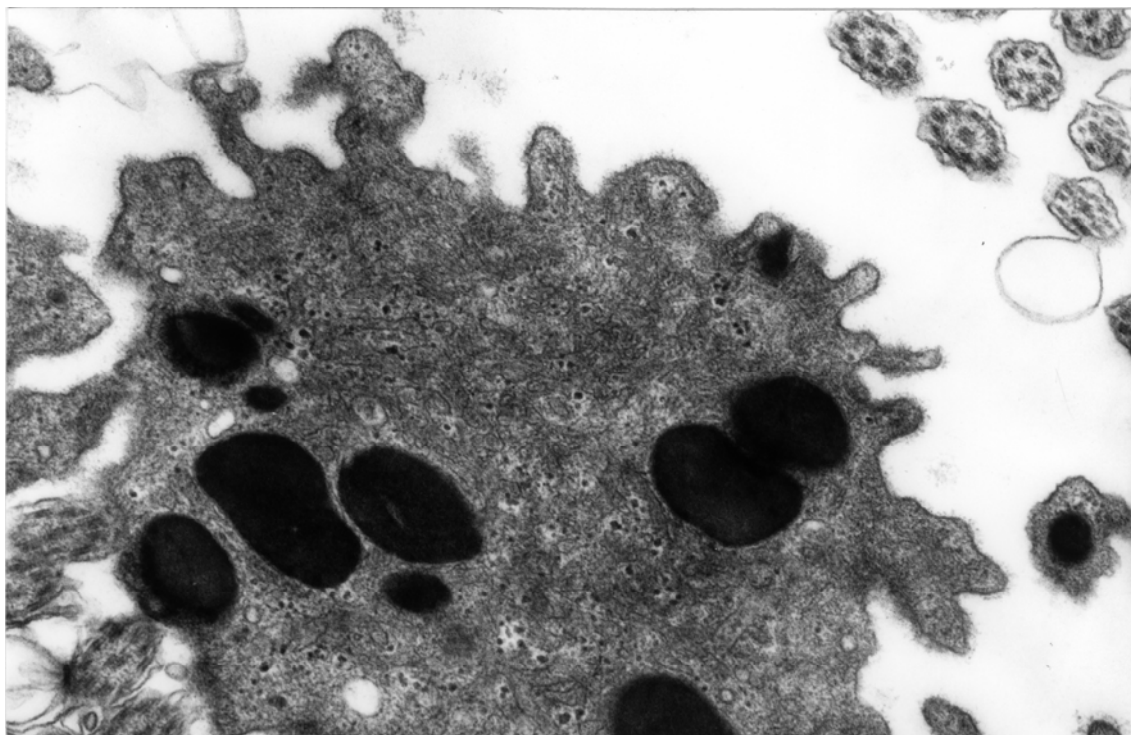
1  $\mu\text{m}$

Obr. 76: Intaktní cytoplazma apikální části Clara buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 15.000x



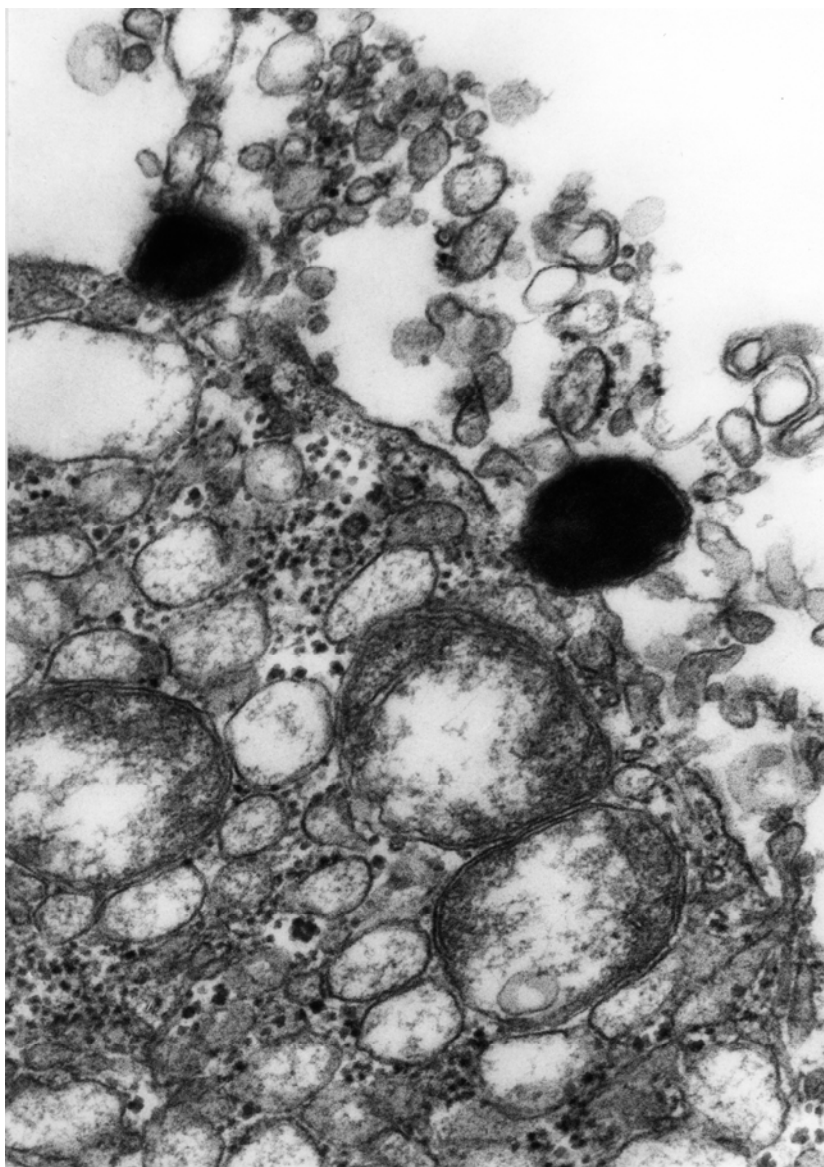
1  $\mu\text{m}$

Obr. 77: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu v cytoplazmě Clara buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 15.000x



1  $\mu$ m

Obr. 78: Sekreční granula v apikální části Clara buňky. Některá z nich splývají s buněčnou membránou, jedno je zachyceno v apikální cytoplazmatické protruzi. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

Obr. 79: Uvolňování sekrečních granul i jiných součástí cytoplazmy z alterované Clara buňky. 30 minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg, původní zvětšení 25.000x

## Diskuse

V literatuře se objevují studie zabývající se vlivem bronchospasmolyticky účinkujících methylxanthinů a jiných inhibitorů fosfodiesterázy na epitel dýchacích cest velice sporadicky. Několik prací se věnovalo vlivu těchto látek na mukociliární transport. Po aplikaci aminophyllinu došlo ke zrychlení transportu v průdušnici a velkých bronších psů (Serafini a spol. 1976), zrychlení frekvence pohybu řasinek bylo pozorováno i v králičích průdušnicích po aplikaci několika selektivních inhibitorů fosfodiesterázy (Cervin a Lindgren 1998). Ještě méně je známo o vlivu methylxanthinů na sekreční aktivitu buněk epitelu dýchacích cest. Zatímco Barbieri a Barsigian (1985) nepozorovali žádný účinek aplikace theophyllinu na sekreci glykokonjugátů v tracheální sliznici psů, Wagner a spol. (1996) zaznamenali zvýšení sekrece hlenu v orgánové kultuře tracheální sliznice potkanů po aplikaci několika látek z této skupiny. Pomocí selektivních inhibitorů zjistili, že zásadní izoformou fosfodiesterázy stimulující sekreci je PDE-IV.

V předcházející studii, v níž jsme se zabývali ultrastrukturálními změnami epitelu trachey po intravenózní aplikaci aminophyllinu ve stejné dávce jako v současné práci (Konrádová a spol. 2001a), došlo především k stimulaci sekrečních buněk pohárkových. I.v. aplikace aminophyllinu je velmi výrazně stimulovala k vydávání sekretu a zároveň i poškozovala. Většina buněk po urychleném vyprázdnění sekretu degenerovala. Reakce sekrečních elementů byla velmi rychlá. Patnáct minut po aplikaci aminophyllinu tvořily vyprázdněné pohárkové buňky více než 90% sekrečních elementů. Degenerované buňky byly velmi rychle z epitelu vylučovány. Zbytky jejich elektronově denzní cytoplazmy jsme v první fázi často nacházeli volně nad epitelem v oblasti řasinkového lemu. Třicet minut po aplikaci tvořily degenerované pohárkové buňky méně než 1% všech sekrečních buněk v epitelu. Části jejich cytoplazmy byly

odstraněny i z oblasti řasinkového lemu. Již 15 min po podání aminophyllinu jsme zaznamenali výskyt diferencujících se pohárkových buněk. Třicet minut po aplikaci tvořily diferencující se pohárkové buňky více než 97% sekrečních elementů v epitelu. Vzhledem k tomu, že diferencující se pohárkové buňky si zachovávají schopnost dělení, měnila se současně s jejich vyšším výskytem i distribuce sekrečních elementů v epitelu. Ke konci sledovaného období vytvářela drobné intraepitelové hlenové žlázy více než 1/5 sekrečních elementů.

Charakter epitelu terminálních bronchiolů zůstal třicet minut po i.v. aplikaci aminophyllinu v dávce 5 mg/kg hmotnosti nezměněn. Nedošlo k rozšíření mezibuněčných prostor ani k rozvolnění apikálních spojovacích komplexů. Nezměnilo se ani zastoupení epitelových buněk. Epitel byl stále tvořen téměř pravidelně uspořádanými řasinkovými a Clara buňkami. Na rozdíl od trachey tedy aplikace aminophyllinu nestimulovala některé epitelové buňky terminálních bronchiolů k zvýšené proliferaci.

V ultrastruktuře jednotlivých epitelových buněk však došlo k změnám. Řasinkové buňky byly aplikací aminophyllinu postiženy jen mírně. Jejich kortikální část nesoucí řasinky zůstala téměř intaktní, v hlubších oblastech cytoplazmy jsme však pozorovali známky počínající patologické alterace. Tyto nálezy se zcela shodovaly s nálezy, jež jsme učinili po aplikaci aminophyllinu v řasinkových buňkách trachey (Konrádová a spol. 2001a).

Účinek aminophyllinu byl opět zaměřen především na sekreční buňky. I když alterované Clara buňky nebyly v epitelu rovnoměrně distribuovány, patologická alterace jejich cytoplazmy byla závažnější. Přestože mitochondrie některých Clara buněk vykazovaly známky alterace, nedošlo k statisticky významným změnám v jejich počtu ani velikosti. Výrazně byly Clara buňky stimulovány k produkci sekrečních granul.



Počet buněk obsahujících granula se statisticky významně zvýšil oproti nálezům u kontrolních zvířat ( $p < 0,01$ ), došlo i k výraznému nárůstu počtu sekrečních granul nalezených na jednotce plochy cytoplazmy Clara buněk ( $p < 0,05$ ). Naopak průměrná velikost granul se oproti kontrolním zvířatům nezměnila. Objevovaly se i známky urychleného uvolňování sekretu, i když převažovala spíše tendence buněk sekreční produkty hromadit a střídat.

Reakce Clara buněk tedy nebyla tak výrazná jako reakce tracheálních pohárkových buněk, nicméně statisticky významné změny jsme zaznamenali. Třicet minut po aplikaci aminophyllinu docházelo k zvýšené tvorbě sekrečních granul, k jejich hromadění v cytoplazmě, ale uvolňování sekretu nebylo příliš vyjádřeno. Část Clara buněk jevila známky patologické alterace, nedocházelo však k jejich degeneraci. Rovněž proliferace Clara buněk s výskytem jejich diferencujících se stádií nebyla pozorována.

Na základě našich nálezů můžeme konstatovat, že i.v. aplikace aminophyllinu v dávce 5 mg/kg hmotnosti stimuluje sekreční elementy epitelu dýchacích cest k zvýšené tvorbě a vylučování sekretu, charakter této reakce se však v různých etážích dýchacích cest liší.

## **F. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po perorální aplikaci mukolytika ambroxolu**

### **Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů u králíků 20 min po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu**

Dvacet minut po perorální aplikaci 1 ml preparátu Mucosolvan sol. s obsahem 7,5 mg ambroxolu lemoval terminální bronchioly králíků mírně alterovaný jednovrstevný cylindrický epitel obsahující řasinkové a Clara buňky. Apikální spojovací komplexy byly intaktní, mezibuněčné prostory zůstaly úzké (obr. 80). Buňky ležely na dobře vyvinuté bazální lamině (obr. 81).

Řasinkové buňky, které tvořily  $46,6 \pm 3,5\%$  epitelových buněk (tab. 14), jevíly známky patologické alterace především v hlubších oblastech cytoplazmy, kortikální oblasti byly poškozeny jen mírně. Jen vzácně jsme mohli pozorovat tvorbu drobných apikálních cytoplazmatických protruzí, které narušovaly pravidelné uspořádání kinocilií na apikálních površích řasinkových buněk (obr. 82). Rozsáhlejší protruze, které by zabíraly do svého obsahu celé skupiny řasinek, jsme nepozorovali. V hlubších částech cytoplazmy řasinkových buněk jsme někdy nalézali zmnožené drobné vezikuly, lysosomy s heterogenním obsahem a multivezikulární tělíska (obr. 83). Mitochondrie některých řasinkových buněk byly alterované, jevíly známky edému (obr. 82, 83). Cisterny Golgiho komplexu i granulárního endoplazmatického retikula byly mírně dilatované (obr. 83).

Clara buňky tvořící zbývající  $53,4 \pm 3,5\%$  epitelových elementů (tab. 14) reagovaly na aplikaci ambroxolu různě. Některé obsahovaly zcela intaktní cytoplazmu s početnými, typicky úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula se středně elektronově denzním obsahem nahromaděnými především v apikální oblasti (obr. 84),

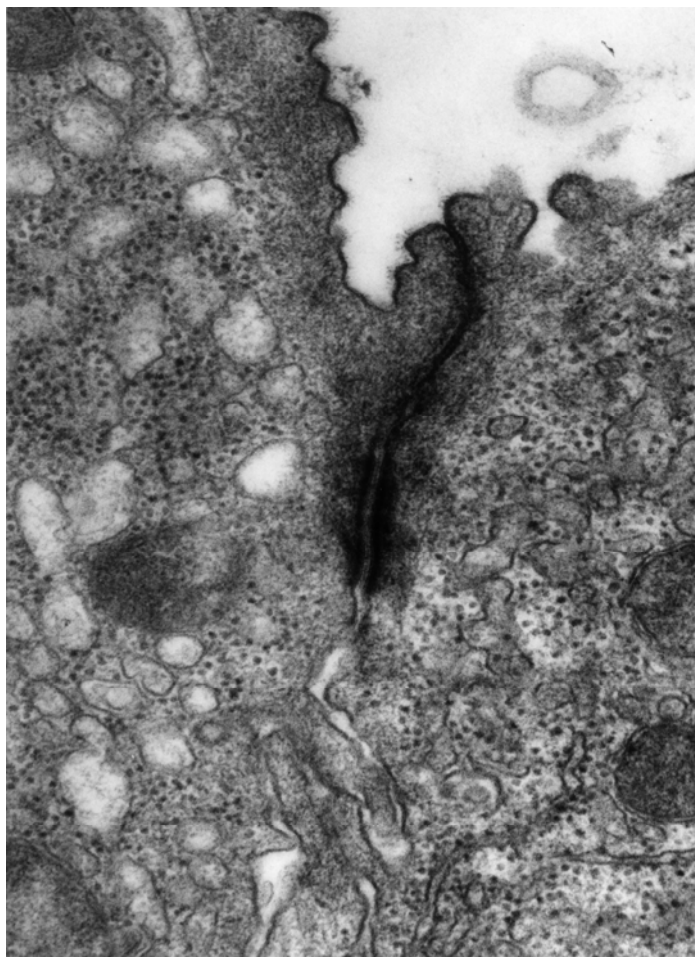
velkými mitochondriemi (obr. 84) a dobře vyvinutými cisternami granulárního endoplazmatického retikula uloženými bazálně (obr. 85). Sekreční granula byla umístěna především apikálně, byla poměrně drobná, jejich obsah byl výrazně elektronově denzní (obr. 84). Jiné Clara buňky jevíly různý stupeň patologické alterace. Jejich cytoplazma byla v apikální části vyplněna dilatovanými tubuly hladkého endoplazmatického retikula s elektronově lucidním obsahem (obr. 86), mitochondrie byly světlé, alterované (obr. 86), cisterny granulárního endoplazmatického retikula i Golgiho komplexu byly mírné dilatované. Na 1  $\mu\text{m}^2$  plochy supranukleární cytoplazmy Clara buněk jsme napočítali průměrně  $1,09 \pm 0,19$  mitochondrií, jejich průměrná plocha byla  $0,14 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$  (tab. 14).

$75,4 \pm 16,8\%$  Clara buněk obsahovalo ve své cytoplazmě sekreční granula (tab. 14). Na 1  $\mu\text{m}^2$  cytoplazmy Clara buněk jsme našli průměrně  $0,26 \pm 0,09$  granula. Průměrná plocha sekrečních granul byla  $0,11 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$  (tab. 14). Téměř jsme nepozorovali morfologické známky vylučování sekretu. Na apikálních površích Clara buněk jsme mohli občas nalézt drobné cytoplazmatické protruze, sekreční granula v nich však byla obsažena jen vzácně (obr. 87).

Tab. 14: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků 20 minut po perorální aplikaci 1 ml roztoku Mucosolvanu (7,5 mg ambroxolu)

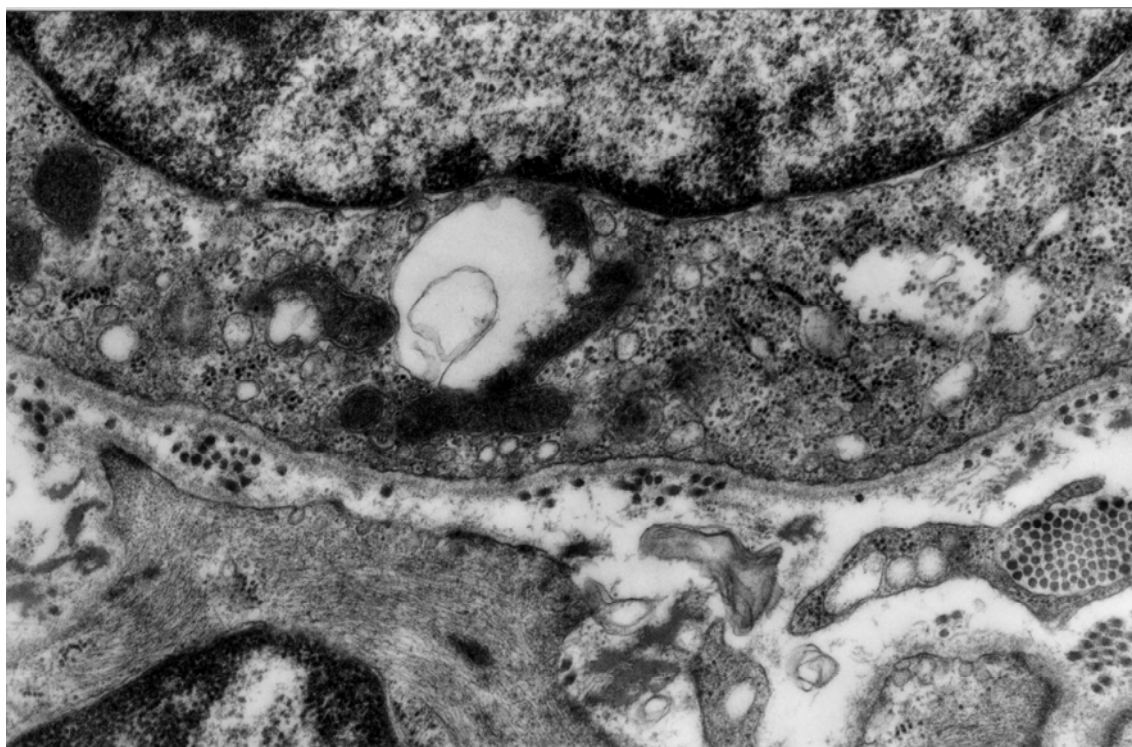
	Kontroly	Mucosolvan
Řasinkové buňky (%)	$47,3 \pm 3,6$	$46,6 \pm 3,5$
Clara buňky (%)	$52,7 \pm 3,6$	$53,3 \pm 3,5$
Clara buňky s granuly (%)	$73,5 \pm 9,4$	$75,4 \pm 16,8$
Clara buňky bez granul (%)	$26,5 \pm 9,4$	$24,6 \pm 16,8$
Počet granul/ $\mu\text{m}^2$	$0,17 \pm 0,07$	$0,26 \pm 0,09$
Počet mitochondrií/ $\mu\text{m}^2$	$0,73 \pm 0,35$	$1,09 \pm 0,19$
Plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	$0,15 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,03$
Plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	$0,22 \pm 0,08$	$0,14 \pm 0,04$

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD



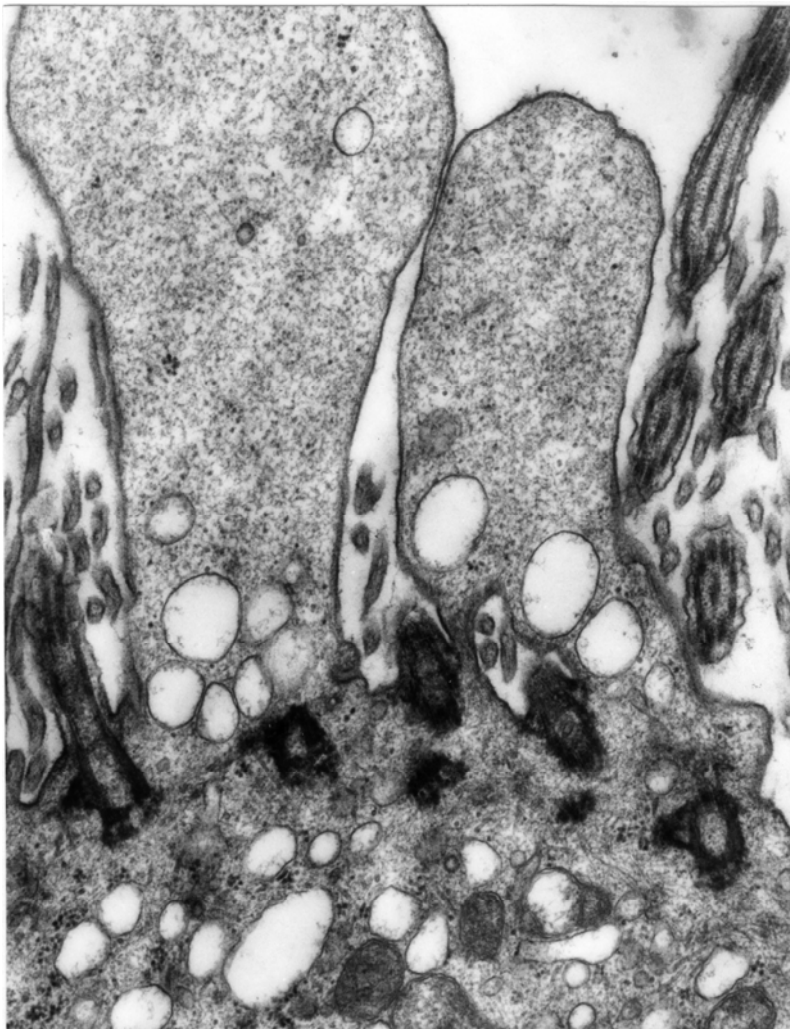
1  $\mu$ m

Obr. 80: Intaktní spojovací komplex mezi dvěma Clara buňkami. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 25.000x



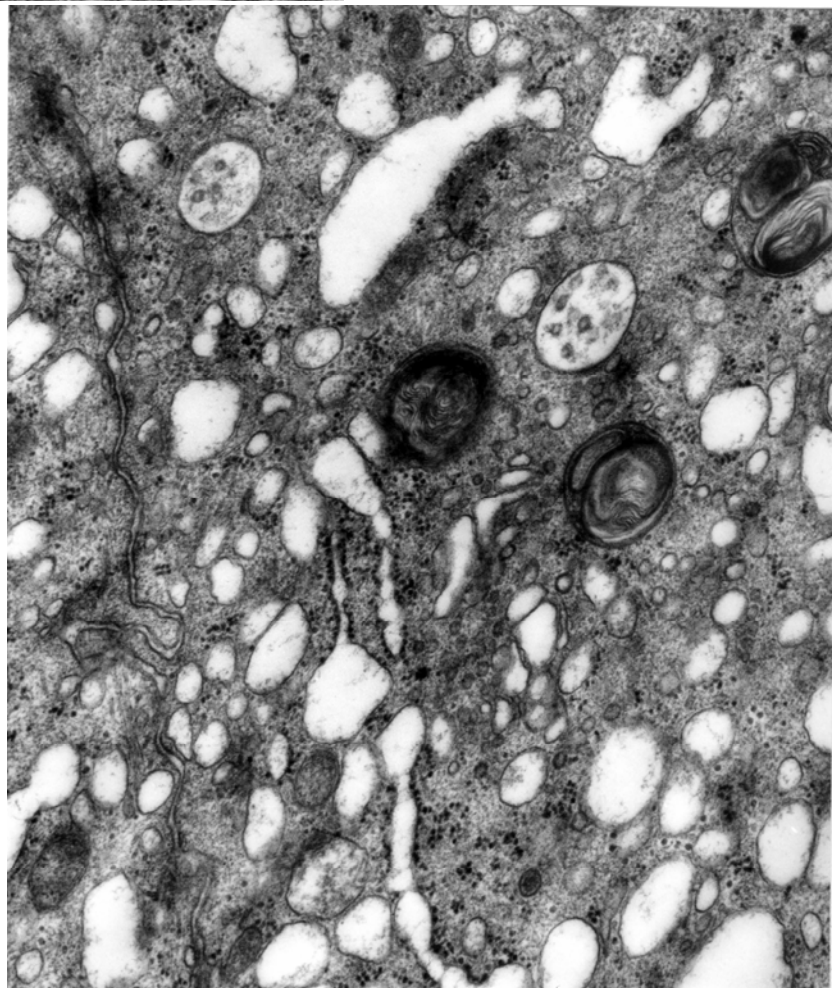
1  $\mu$ m

Obr. 81: Souvislá bazální lamina lemující bazální povrch epitelové buňky obsahující alterované mitochondrie. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 15.000x



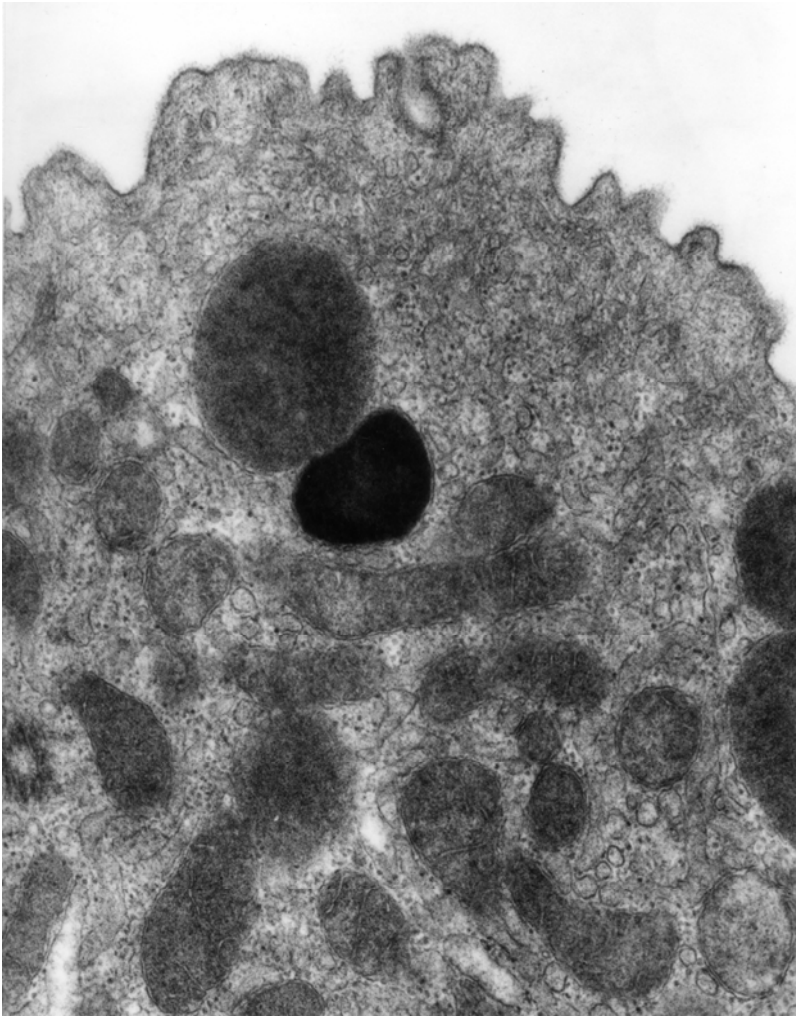
1  $\mu$ m

Obr. 82: Cytoplazmatické protruze na apikálném povrchu řasinkové buňky. Cytoplazma obsahuje zmnožené drobné vezikuly a alterované mitochondrie. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 15.000x



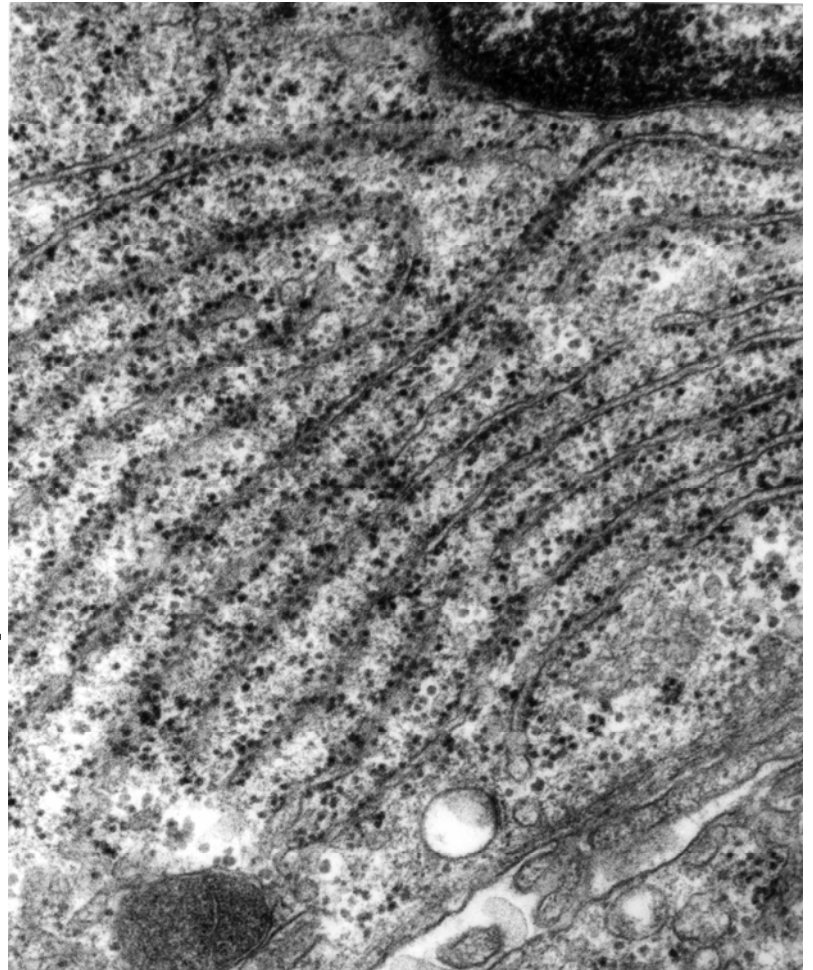
1  $\mu$ m

Obr. 83: Drobné vezikuly, lysosomy, multivezikulární tělíska a dilatované cisterny granulárního endoplazmatického retikula v cytoplazmě řasinkové buňky. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 15.000x



1 μm

Obr. 84: Intaktní cytoplazma Clara buňky s hojnými úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula, četnými mitochondriemi a sekrečním granulem. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 15.000x



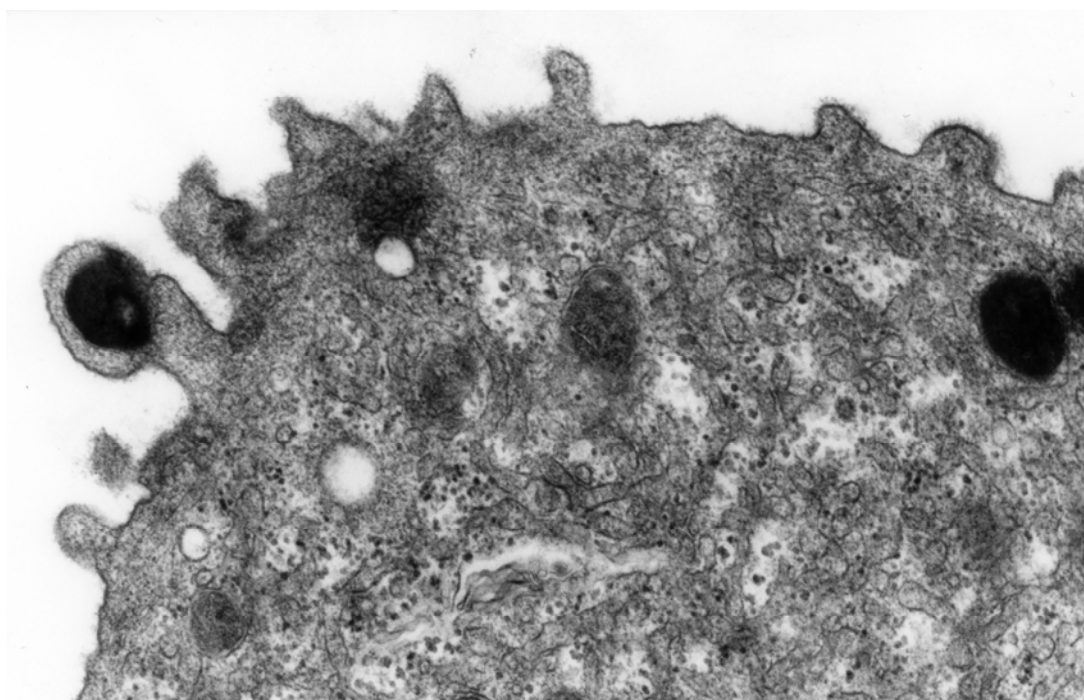
1 μm

Obr. 85: Paralelně uspořádané úzké cisterny granulárního endoplazmatického retikula v cytoplazmě Clara buňky. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 25.000x



1  $\mu$ m

Obr. 86: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, alterované mitochondrie a sekreční granula v cytoplasmě Clara buňky. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 20.000x



1  $\mu$ m

Obr. 87: Sekreční granulum v drobné cytoplazmatické protruzi na apikálním povrchu Clara buňky. 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg ambroxolu, původní zvětšení 20.000x

## Diskuse

Naše studie reakce epitelu terminálních bronchiolů na perorální podání ambroxolu navázala na rozsáhlé studie věnované vlivu různých mukolyticky působících léků na epitel trachey, které byly prováděny na našem pracovišti (Konrádová a spol. 1979a, 1980, 1982a,b, 1983, 1985a-d, 1986a,b, 1996a). Při srovnání reakce tracheálního epitelu na perorální aplikaci jedné běžné terapeutické dávky šesti různých mukolytik se jevila odpověď na podání ambroxolu jako nejvýraznější. Dvacet minut po perorální aplikaci 7,5 mg této látky byly stimulovány k vylučování sekretu téměř všechny pohárkové buňky (98%) a většina z nich po urychleném vyloučení sekretu degenerovala (83%). Nadměrná stimulace pohárkových buněk, které široce komunikovaly s lumenem dýchacích cest, vedla k velice výrazné redukci počtu řasinek vztaženému na jednotku plochy řasinkového lemu ( $3,6/\mu\text{m}^2$ ), přičemž 6,7% těchto kinocilií bylo alterovaných, většinou zanikajících. Přítomny byly rovněž nápadné morfologické známky narušení toku hlenu v dýchacích cestách (Konrádová a spol. 1985b, 1996).

Na rozdíl od uvedených studií zabývajících se reakcí epitelu trachey na aplikaci ambroxolu nedošlo ve výstelce terminálních bronchiolů 20 minut po perorální aplikaci 7,5 mg této látky ke stimulaci sekrečních elementů. Poměr mezi Clara buňkami obsahujícími sekreční granula v cytoplazmě a Clara buňkami bez sekrečních granul se statisticky významně nelišil od nálezů u kontrolních králíků. Po aplikaci ambroxolu byl sice napočítán v cytoplazmě Clara buněk vyšší počet průměrně menších granul, rozdíl však nebyl oproti kontrolám statisticky významný. Ani morfologické známky vylučování sekretu prakticky nebyly v cytoplazmě Clara buněk pozorovány. Nelišilo se ani zastoupení jednotlivých druhů buněk v epitelu. Došlo jen k nevýraznému poškození výstelky terminálních bronchiolů. Známky patologické alterace epitelových buněk se morfologicky nelišily od známek popsaných v předcházejících kapitolách, jejich rozsah



byl ale nerovnoměrný. Setkávali jsme se především u Clara buněk s různým rozsahem poškození cytoplazmy ve dvou sousedících buňkách. Lišil se jak stupeň dilatace tubulů hladkého endoplazmatického retikula, tak rozsah alterace mitochondrií.

V literatuře jsme našli jen minimum prací zabývajících se reakcí epitelových buněk na aplikaci ambroxolu. Přestože se jedná o látku měnící množství i charakter hlenu v dýchacích cestách, nenalezli jsme žádnou studii vlivu ambroxolu na pohárkové buňky nebo na submukózní žlázy dýchacích cest. Pouze Takahashi a jeho spolupracovníci okrajově zmínili ve dvou článcích, že ambroxol neměl žádný vliv na počet pohárkových buněk v potkaním tracheálním epitelu vystaveném působení isoproterenolu nebo bakteriálního endotoxinu (Takahashi a spol. 1998a,b). V kultuře lidských Calu-3 buněk analogických serózním buňkám submukózních žlázek byly zjištěny změny v transmembránovém transportu iontů po přidání ambroxolu do média (Hasegawa a spol. 2006). Ve své souhrnné studii o vlivu různých léků na mukociliární clearance se Houtmeyers a spol. (1999) vyjádřili o ambroxolu neurčitě. Tito autoři však upozornili na skutečnost, že hlavními cílovými buňkami ambroxolu by měly být pneumocyty typu II, v nichž by mělo docházet k stimulaci produkce surfaktantu. Skutečně se v nedávné době objevila studie, která tento názor potvrdila. Aplikace ambroxolu vyvolala výrazné zvýšení produkce surfaktantového proteinu SP-C v izolovaných pneumocytech typu II (Seifart a spol. 2005). Autoři této studie zároveň zjistili výrazně vyšší expresi podobného proteinu SP-B v Clara buňkách potkanů, jimž byl podán intraperitoneálně ambroxol v dávce 75 mg/kg. Vyslovili hypotézu, že proklamované protizánětlivé a antioxidační vlastnosti ambroxolu (Hong a spol. 2003, Su a spol. 2004) by mohly být způsobeny zvýšenou sekrecí SP-B, jehož podobné účinky byly rovněž popsány.

V našich dvou studiích věnovaných vlivu ambroxolu na epitel dýchacích cest

jsme zjistili výraznou sekreční stimulaci pohárkových buněk trachey 20 minut po perorálním podání 7,5 mg ambroxolu a naopak žádnou výraznou reakci Clara buněk v epitelu terminálních bronchiolů. Tento výsledek však neznamena, že by v sekrečních granulech Clara buněk nemohlo dojít ke zvýšení produkce zmiňovaného proteinu SP-B. Potvrdil se tak i náš názor, že sekreční aktivita Clara buněk, a tím i celková reakce epitelu terminálních bronchiolů, je řízena odlišnými faktory než sekreční činnost pohárkových buněk epitelu trachey.

## **G. Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po čtyřdenní hypoxii**

### **1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů králíků po 4 dnech strávených v normobarické komoře s normálním obsahem kyslíku v atmosféře (normoxie)**

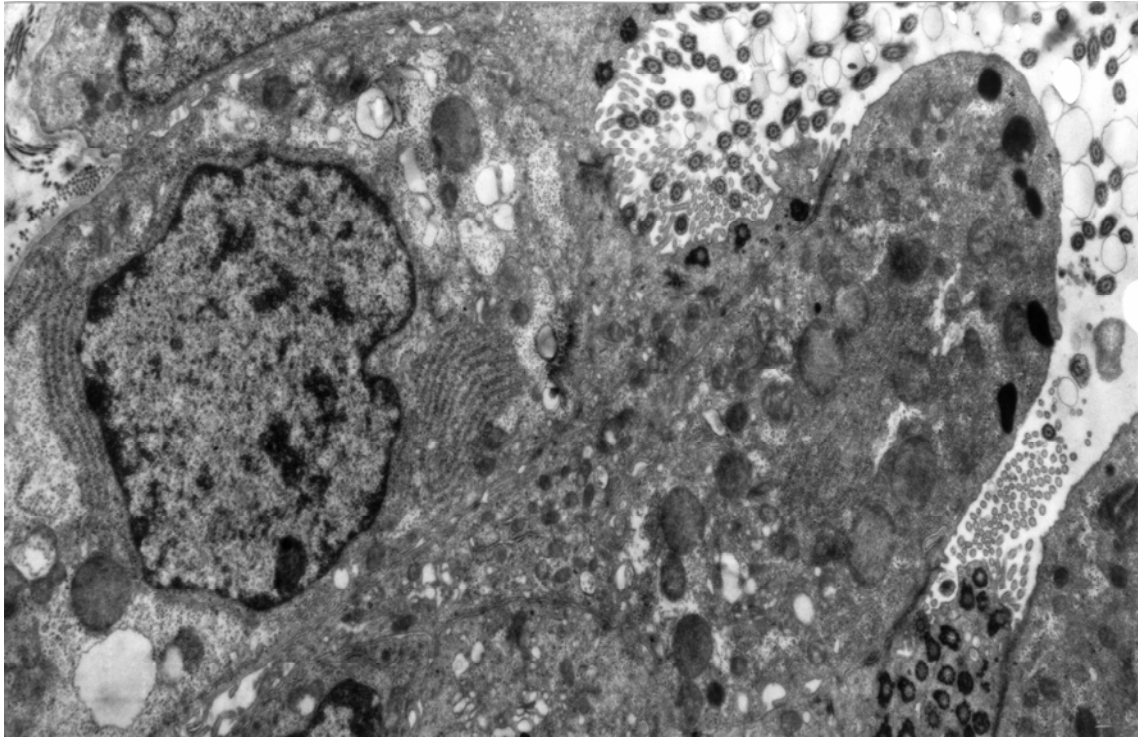
Terminální bronchioly králíků, kteří strávili 4 dny v téže komoře, v jaké probíhá expozice hypoxii, ale s normálním obsahem kyslíku v atmosféře, byly lemovány jednovrstevným epitelem složeným z  $48,7 \pm 6,4\%$  řasinkových buněk a  $51,3 \pm 6,4\%$  Clara buněk (tab. 15). Apikální spojovací komplexy byly intaktní, intercelulární prostory zůstaly úzké a neobsahovaly žádné volné buňky (obr. 88). Všechny epitelové buňky široce nasedaly na dobře vytvořenou bazální laminu. Vzácně jsme v epitelu objevili buňky difúzního neuroendokrinního systému typické svými drobnými, sférickými granuly s elektronově denzními středy typu „dense core vesicles“ (obr. 89).

V cytoplazmě řasinkových buněk jsme pozorovali známky mírného patologického poškození. Na jejich apikálních površích jsme zaznamenali tvorbu malých cytoplazmatických protruzí, které interferovaly s pravidelným uspořádáním řasinek a někdy do sebe zaujímaly volné řasinky, jež následně podléhaly degeneraci (obr. 90). V hlubších vrstvách cytoplazmy jsme našli zmnožené drobné vezikuly a multivezikulární tělíska. Cisterny Golgiho komplexu byly často lehce dilatované (obr. 91). V některých řasinkových buňkách jsme pozorovali alterované mitochondrie s nehomogenní, elektronově lucidní matrix (obr. 90).

Sekreční Clara buňky byly většinou intaktní. Jejich apikální cytoplazma byly vyplněna úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula, četnými mitochondriemi a relativně velkými, elektronově denzními granuly (obr. 92). Bazální oblasti těchto buněk obsahovaly úzké, paralelně uspořádané cisterny granulárního endoplazmatického

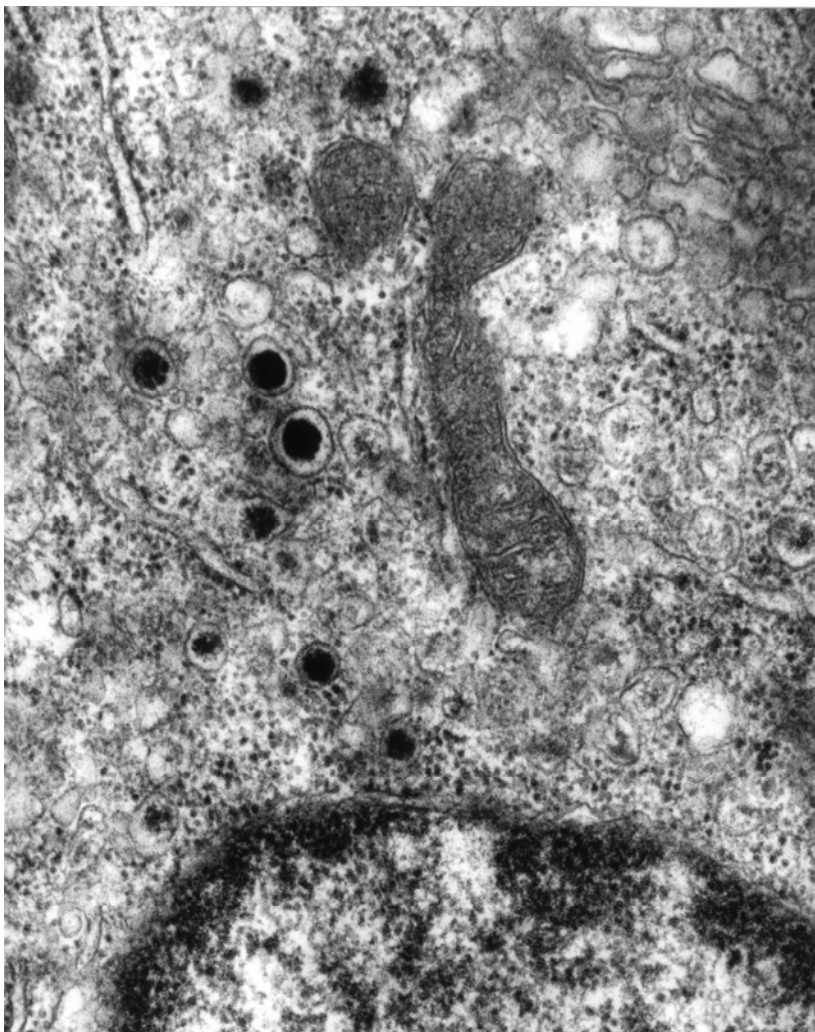
retikula. Pouze ojedinělé Clara buňky jevíly známky patologické alterace. Obsahovaly širší tubuly hladkého endoplazmatického retikula vyplněné elektronově lucidním obsahem a alterované mitochondrie (obr. 93, 94). Části jejich degenerované cytoplazmy jsme dokonce zastihli volně v luminu terminálních bronchiolů (obr. 95).

Elektronově denzní sekreční granula jsme našli v  $85,6 \pm 3,7\%$  Clara buněk (tab. 15). Granula byla většinou střídána v cytoplazmě, morfologické známky uvolňování jejich sekretu jsme pozorovali jen výjimečně. Jen několik granul jsme našli v těsném kontaktu s buněčnou membránou nebo uvnitř apikálních cytoplazmatických protruzí (obr. 96). Počítačová obrazová analýza odhalila průměrně  $0,22 \pm 0,08$  granul a  $1,02 \pm 0,34$  mitochondrií na  $1 \mu\text{m}^2$  supranukleární cytoplazmy. Jejich průměrná plocha byla  $0,11 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$  a  $0,15 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  (tab. 15).



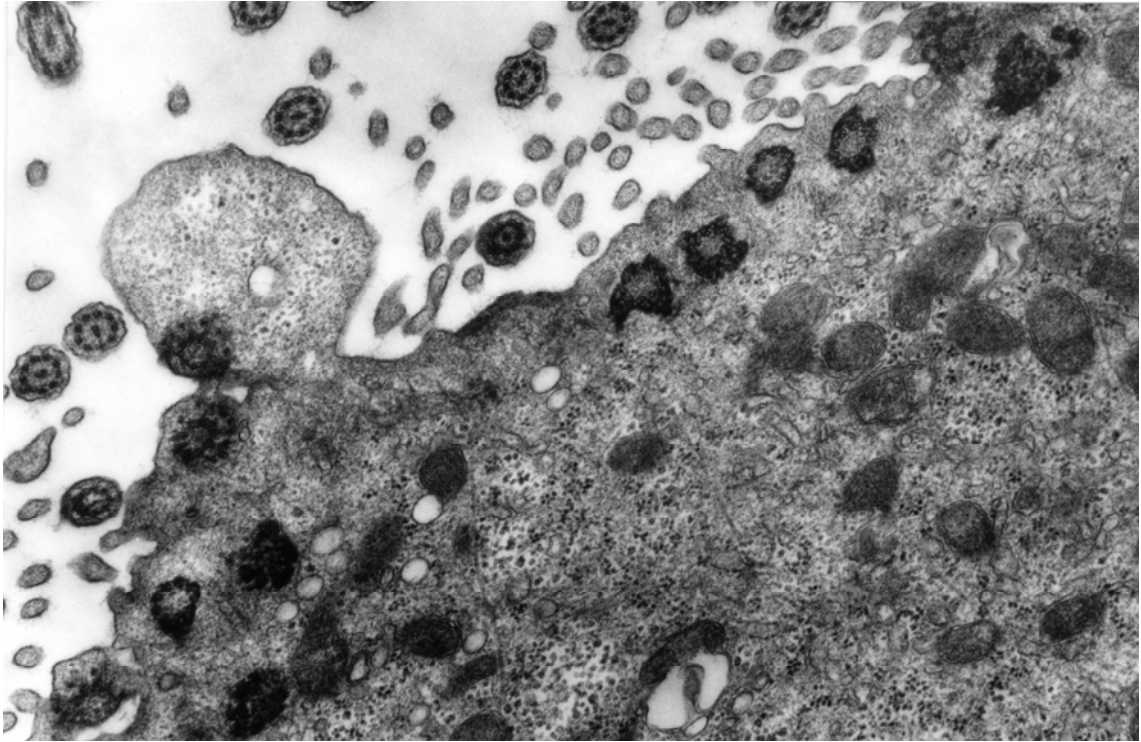
1  $\mu$ m

Obr. 88: Úsek epitelu terminálního bronchiolu obsahující řasinkovou a Clara buňku. Obě buňky jeví známky patologické alterace. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 5.000x



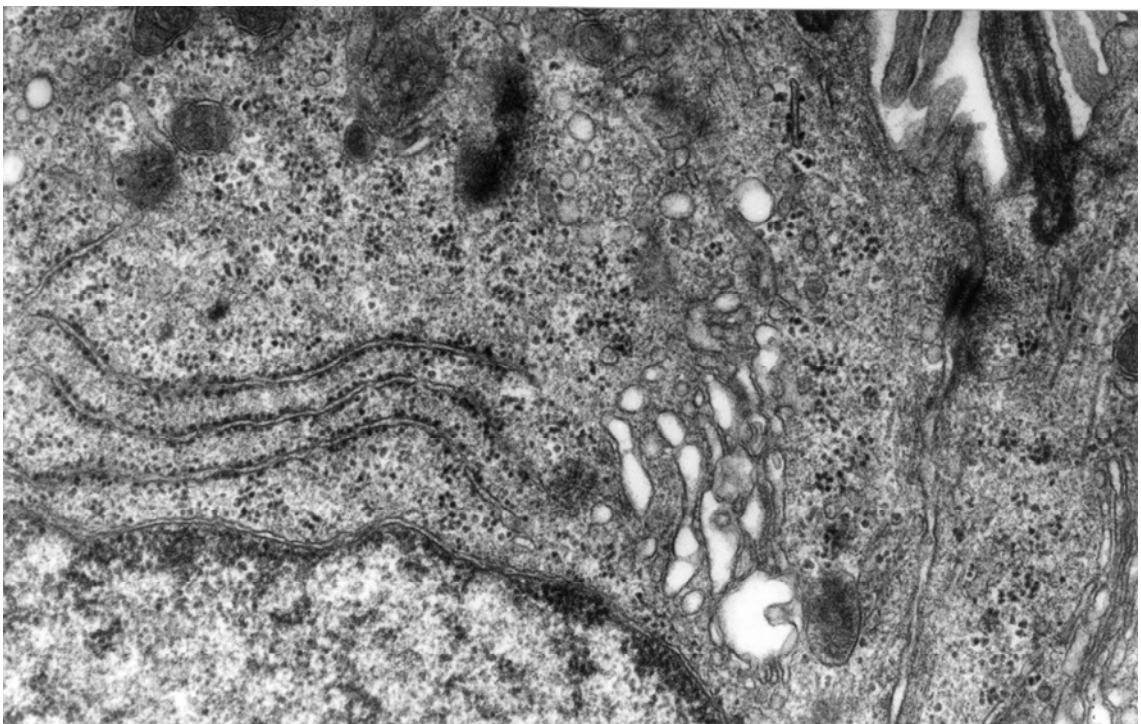
1  $\mu$ m

Obr. 89: Část buňky difúzního neuroendokrinního systému s granuly typu „dense core vesicles“. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 25.000x



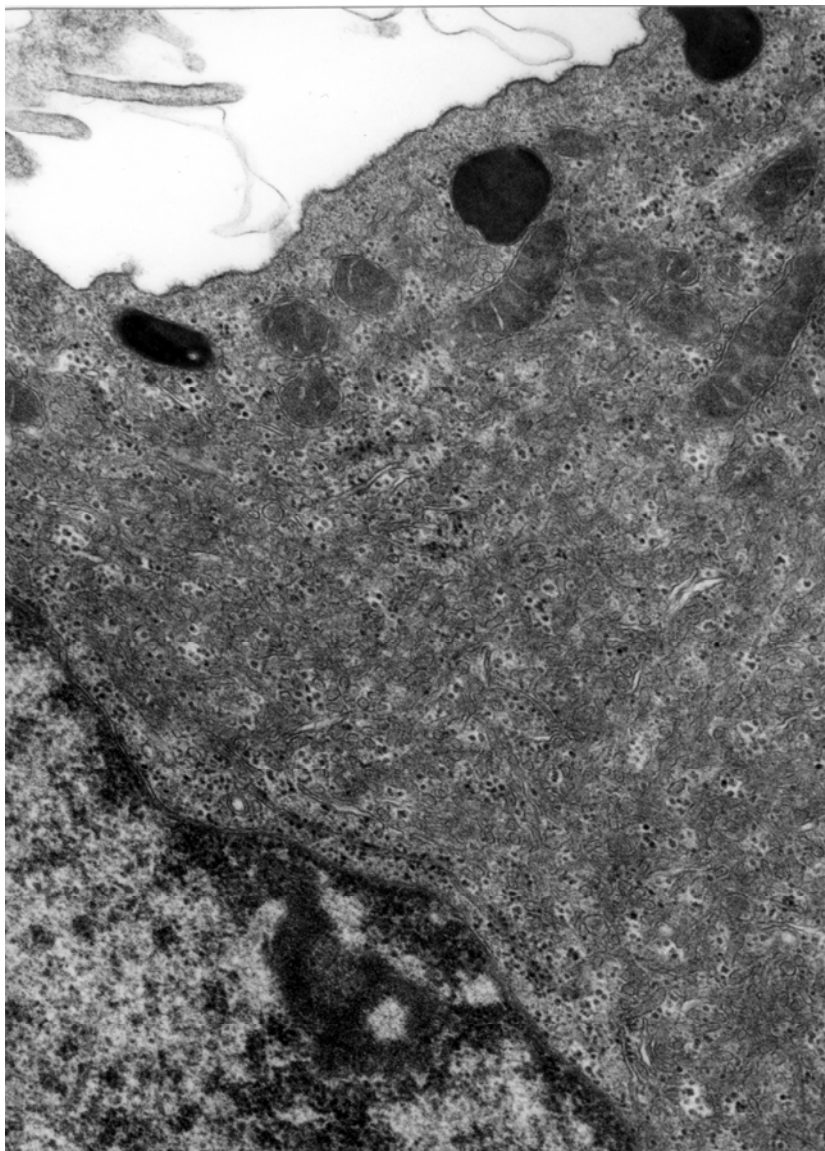
1 μm

Obr. 90: Cytoplazmatická protruze na apikálním povrchu řasinkové buňky obsahující izolovanou část ciliárního aparátu. Cytoplazma obsahuje lehce alterované mitochondrie. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 15.000x



1 μm

Obr. 91: Mírně dilatované cisterny Golgiho komplexu v cytoplazmě řasinkové buňky. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 20.000x

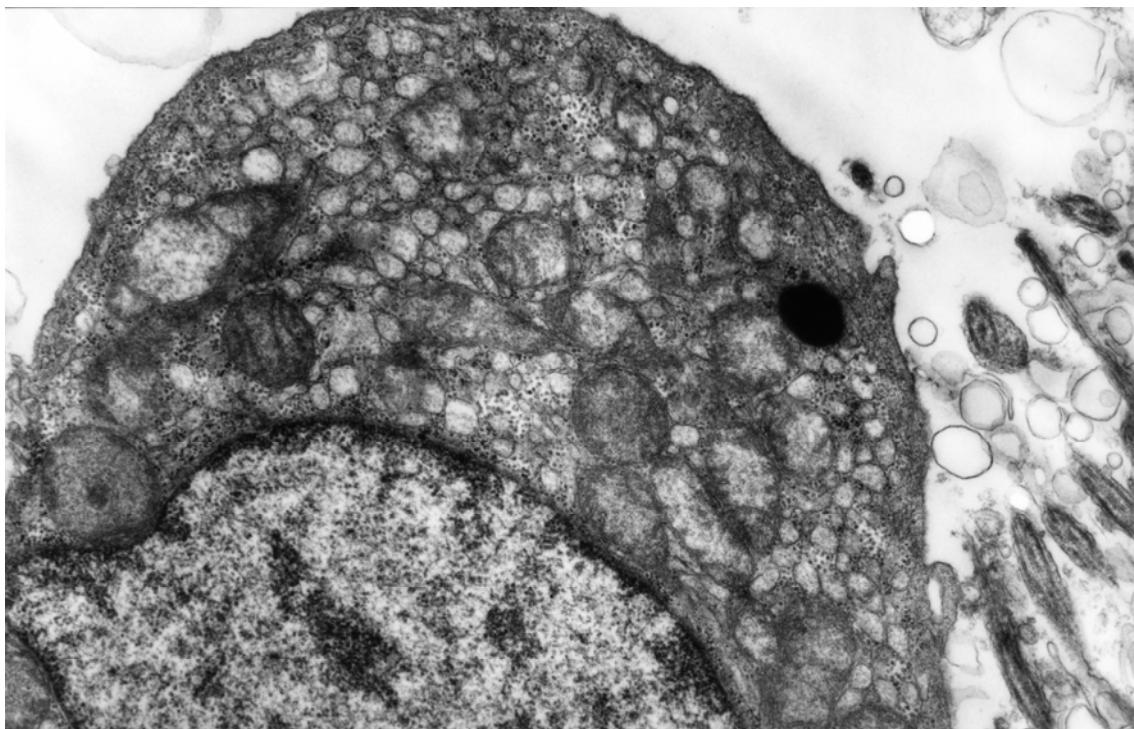


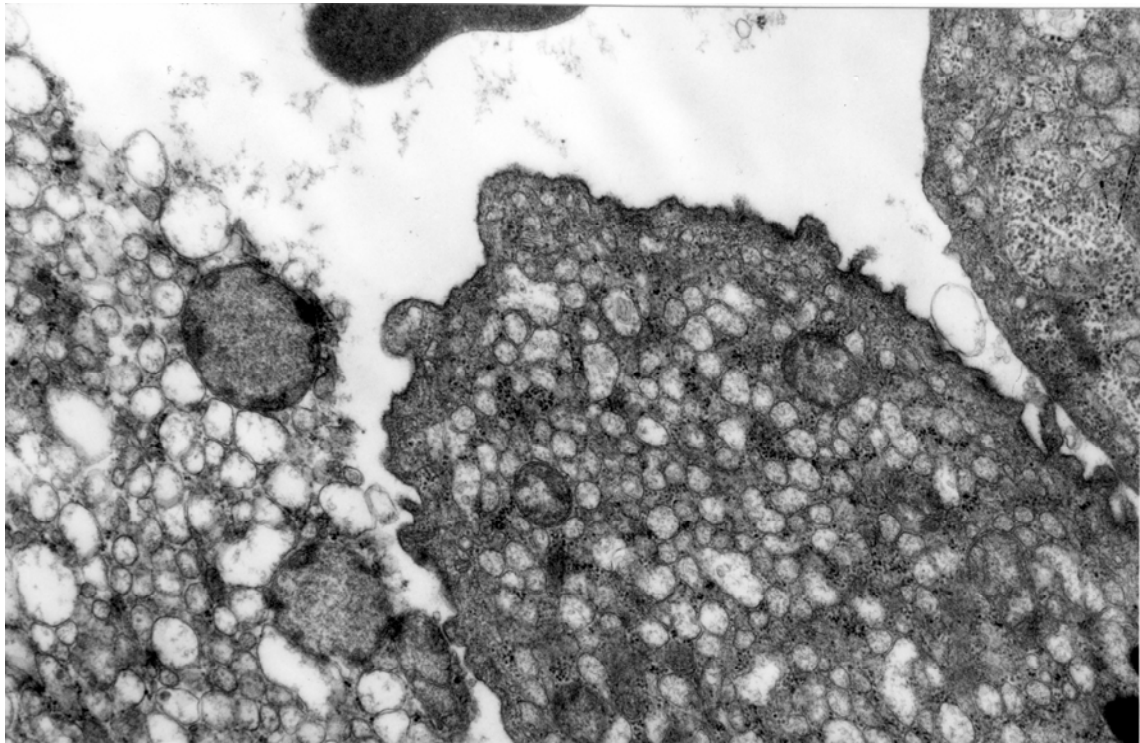
1  $\mu$ m

Obr. 92: Část intaktní Clara buňky s hojnými úzkými tubuly hladkého endoplazmatického retikula, mitochondriemi a sekrečními granuly. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 15.000x

1  $\mu$ m

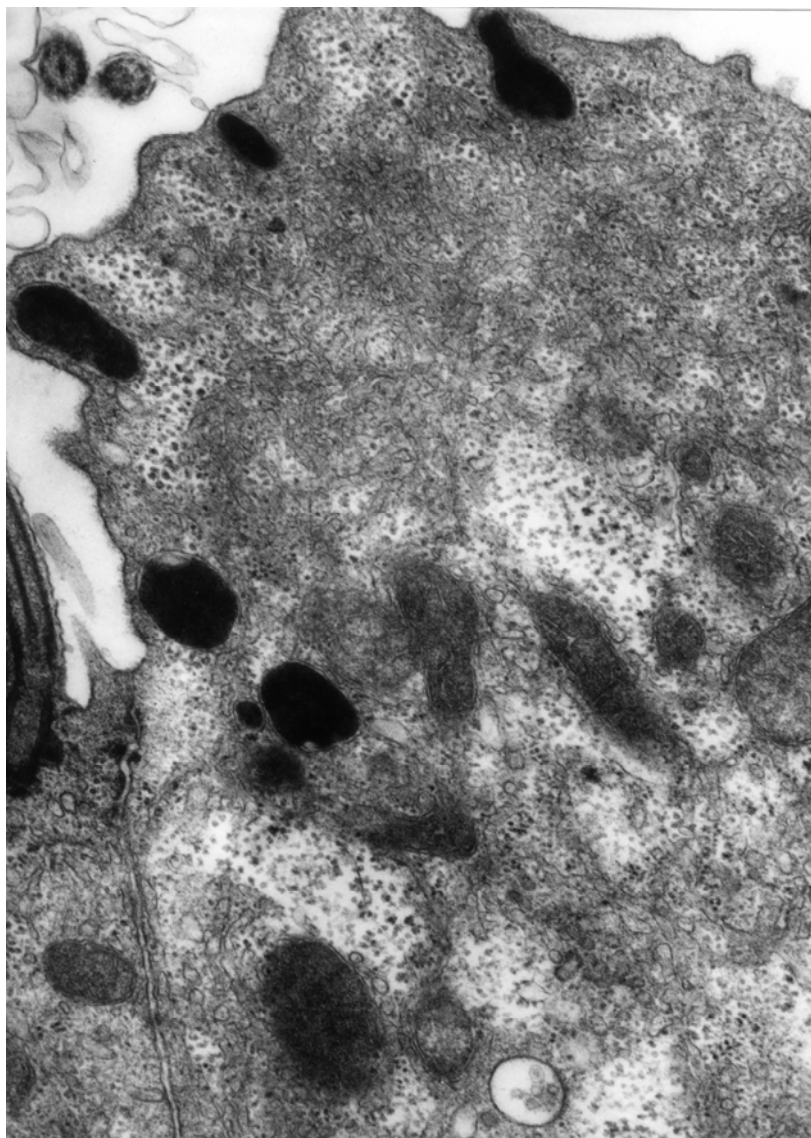
Obr. 93: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, alterované mitochondrie a sekreční granulum v cytoplasmě Clara buňky. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 10.000x





1  $\mu$ m

Obr. 94: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula a alterované mitochondrie v cytoplazmě Clara buňky. Část výrazně alterované cytoplazmy Clara buňky ležící volně v lumen terminálního bronchiolu. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 10.000x



1  $\mu$ m

Obr. 95: Sekreční granula umístěná těsně pod buněčnou membránou i v drobné cytoplazmatické protruzi na apikálním povrchu Clara buňky. Čtyřdenní pobyt v komoře za normoxických podmínek, původní zvětšení 15.000x



## **2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů králíků po 4 dnech strávených v normobarické komoře s obsahem kyslíku v atmosféře sníženým na 10% (hypoxie)**

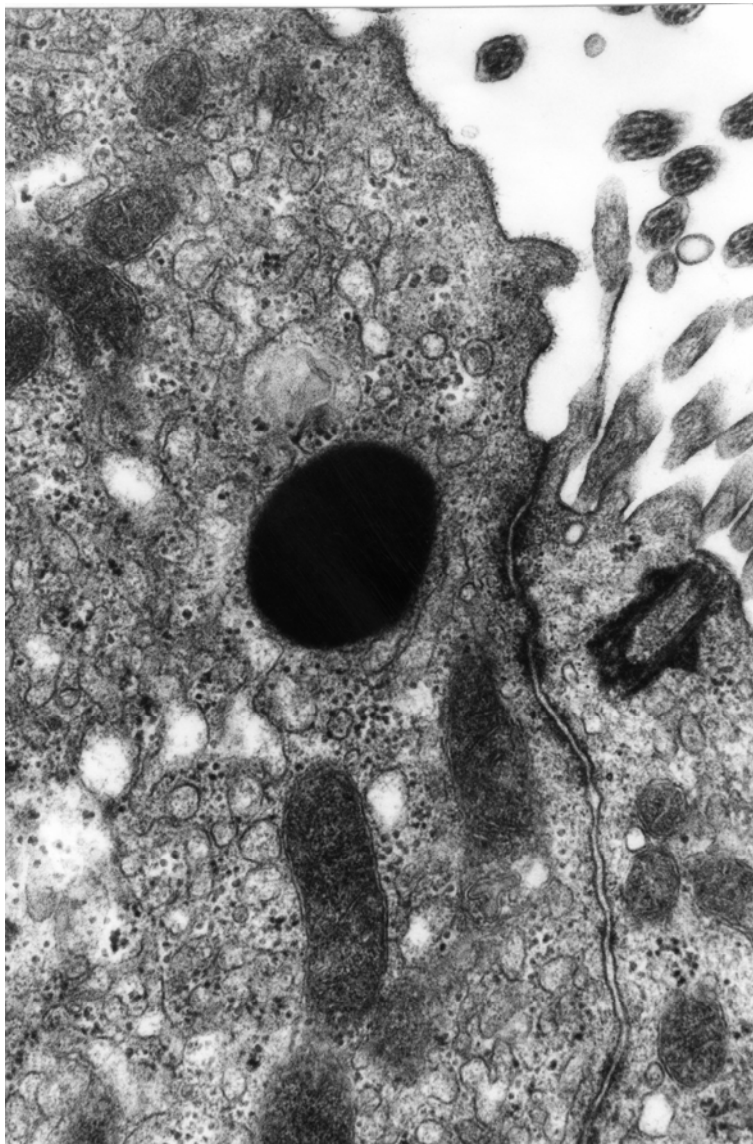
Terminální bronchioly králíků vystavených čtyřdenní normobarické hypoxii byly lemovány jednovrstevným epitelem, který se skládal z  $42,6 \pm 3,4\%$  řasinkových buněk a  $57,4 \pm 3,4\%$  Clara buněk (tab. 15). Apikální spojovací komplexy, intercelulární prostory i bazální povrch epitelu zůstaly beze změn ve srovnání s kontrolními zvířaty i s králíky, kteří strávili 4 dny v komoře za normoxických podmínek (obr. 96, 97). Rovněž zde jsme zaznamenali výskyt buněk difúzního neuroendokrinního systému.

Cytoplazma řasinkových buněk jevila výraznější známky patologické alterace. Na jejich apikálních površích jsme pozorovali obdobnou tvorbu cytoplazmatických protruzí jako v předcházející skupině (obr. 98). V hlubších oblastech cytoplazmy jsme zaznamenali zvýšený počet větších vezikul, multivezikulárních tělísek a různě velkých lysosomů s heterogenním obsahem (obr. 99). Cisterny Golgiho komplexu byly dilatované více než v předcházející skupině (obr. 99), výraznější byly i známky alterace mitochondrií (obr. 102).

Rovněž Clara buňky byly více alterované než tytéž buňky v předcházející skupině. Ve většině Clara buněk jsme pozorovali alteraci mitochondrií, jejichž matrix a systém krist byly nahrazeny elektronově lucidním fibrogranulárním materiálem nebo dokonce zcela vymizely (obr. 100, 101). V některých buňkách došlo k výrazné dilataci tubulů hladkého endoplazmatického retikula (obr. 101). Stejně jako u předchozí skupiny jsme pozorovali části degenerované cytoplazmy Clara buněk v luminu (obr. 102).

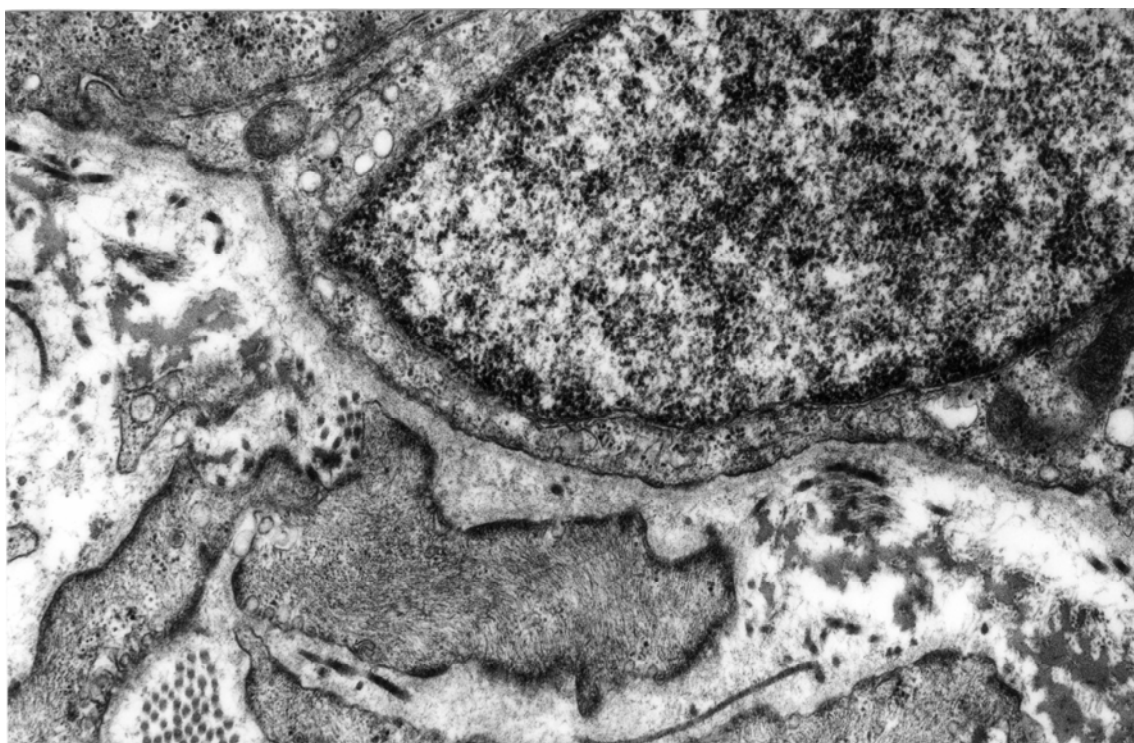
Sekreční granula jsme našli v  $86,9 \pm 6,5\%$  Clara buněk (tab. 15). Morfologické známky uvolňování jejich sekretu jsme zaznamenali jen vzácně (obr. 103). Granula byla většinou jen nashromážděna v apikálních oblastech cytoplazmy (obr. 100, 101). Výsledkem počítačové analýzy supranukleární cytoplazmy Clara buněk bylo  $0,23 \pm$

0,14 granul a  $0,81 \pm 0,23$  mitochondrií na  $1 \mu\text{m}^2$ . Granula měřila  $0,15 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ , průměrná plocha mitochondrií byla  $0,18 \pm 0,08 \mu\text{m}^2$  (tab. 15).



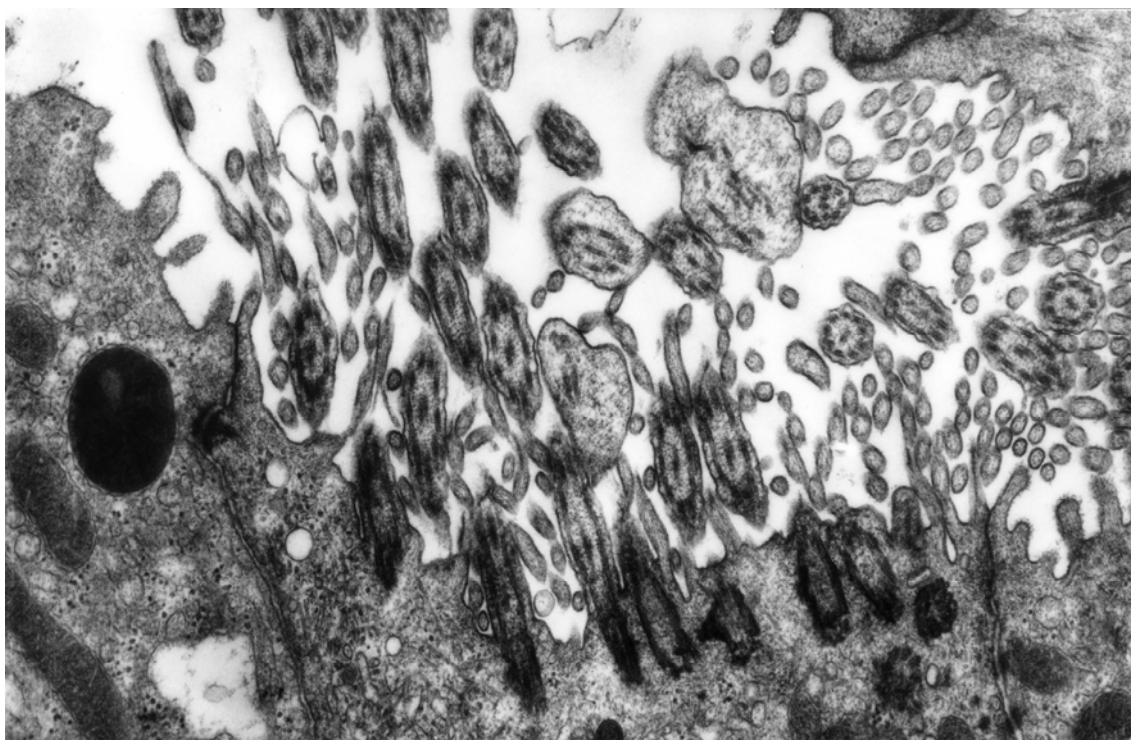
1  $\mu$ m

Obr. 96: Intaktní apikální spojovací komplex mezi Clara buňkou a řasinkovou buňkou. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 20.000x



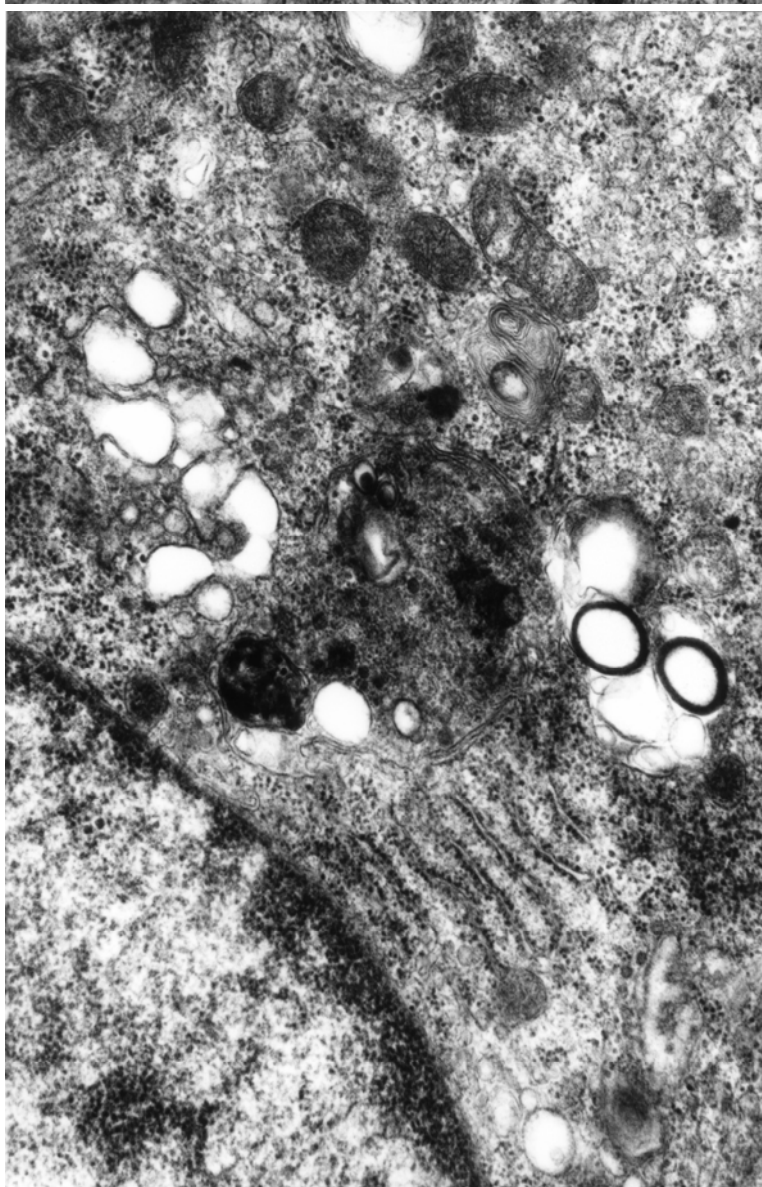
1  $\mu$ m

Obr. 97: Intaktní bazální povrch epitelu, lamina propria mucosae a část svaloviny terminálního bronchiolu. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 15.000x



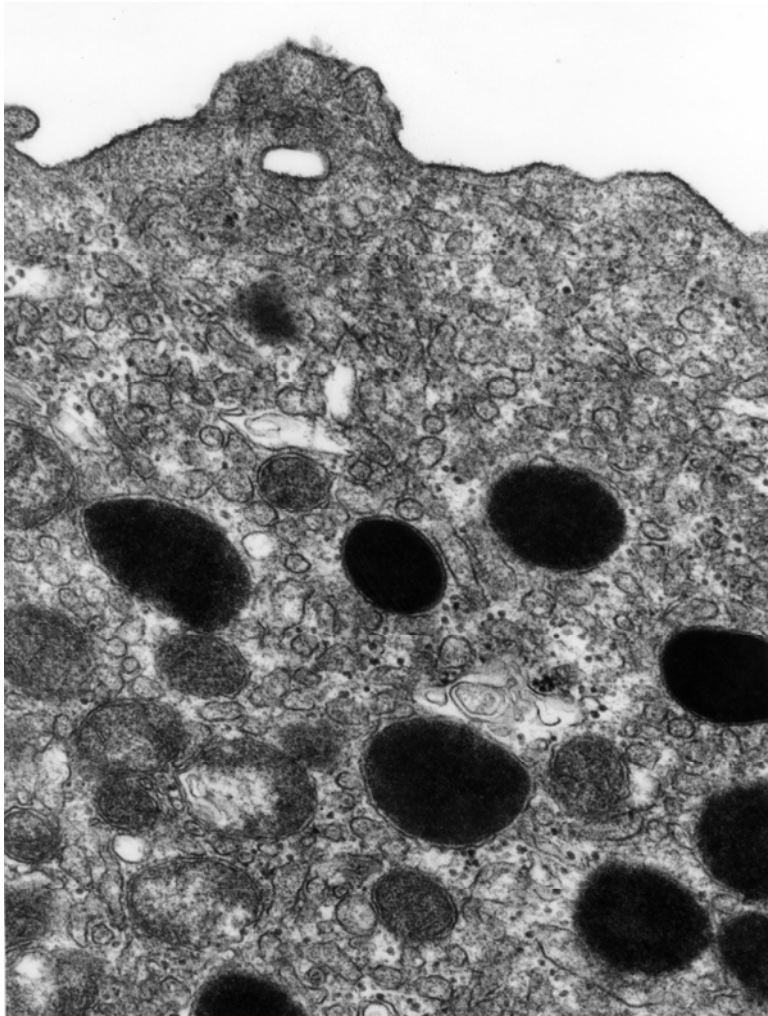
1  $\mu$ m

Obr. 98: Průřez několika drobnými apikálními cytoplazmatickými protruzemi obsahujícími rozpadající se axonémy nad řasinkovou buňkou. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 15.000x



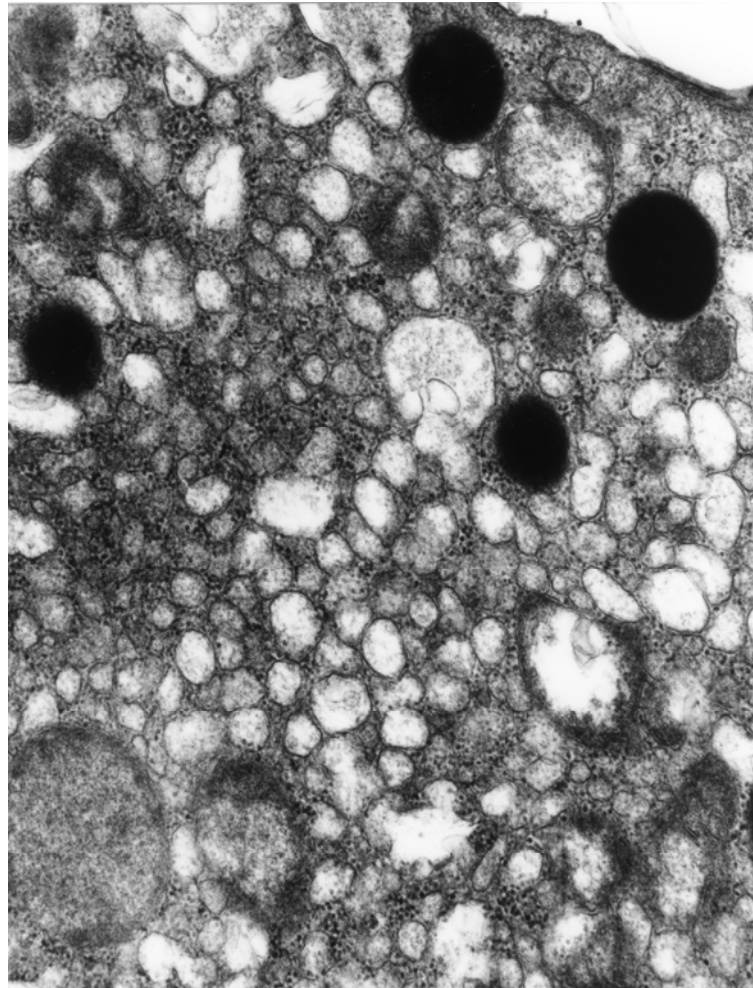
1  $\mu$ m

Obr. 99: Rozsáhlé lysosomy s heterogenním obsahem a dilatované cisterny Golgiho komplexu v cytoplasmě řasinkové buňky. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 15.000x



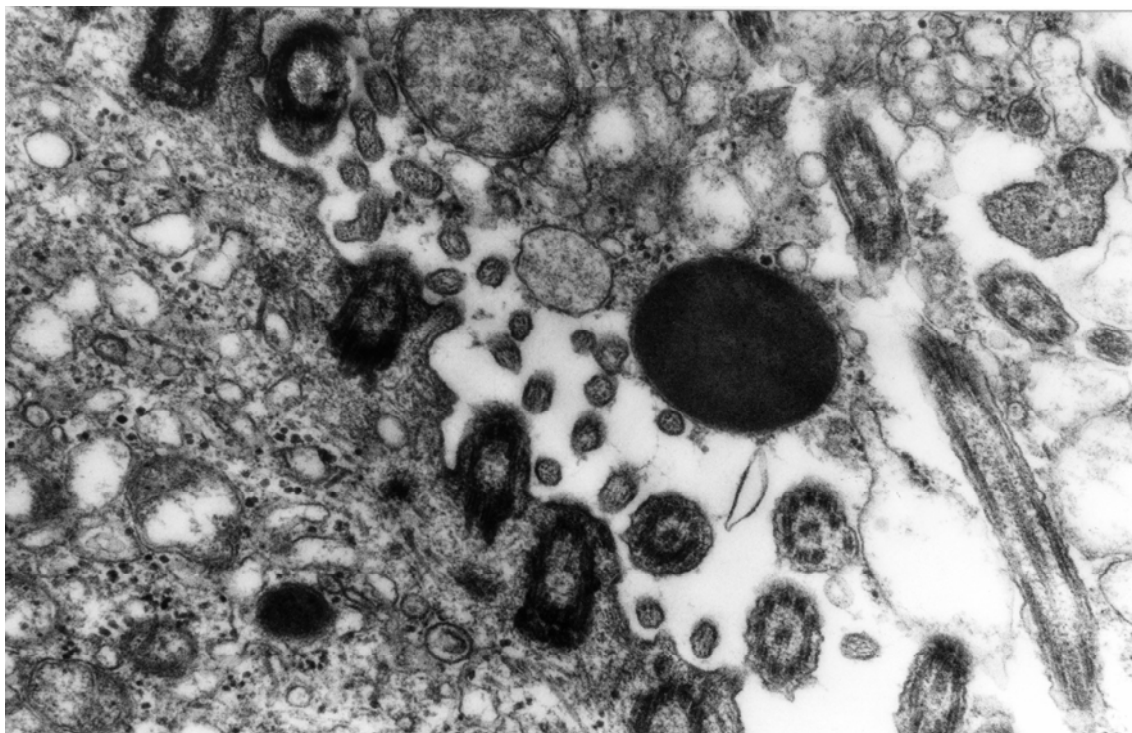
1  $\mu$ m

Obr. 100: Lehce alterované mitochondrie v jinak intaktní apikální cytoplazmě Clara buňky. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 20.000x



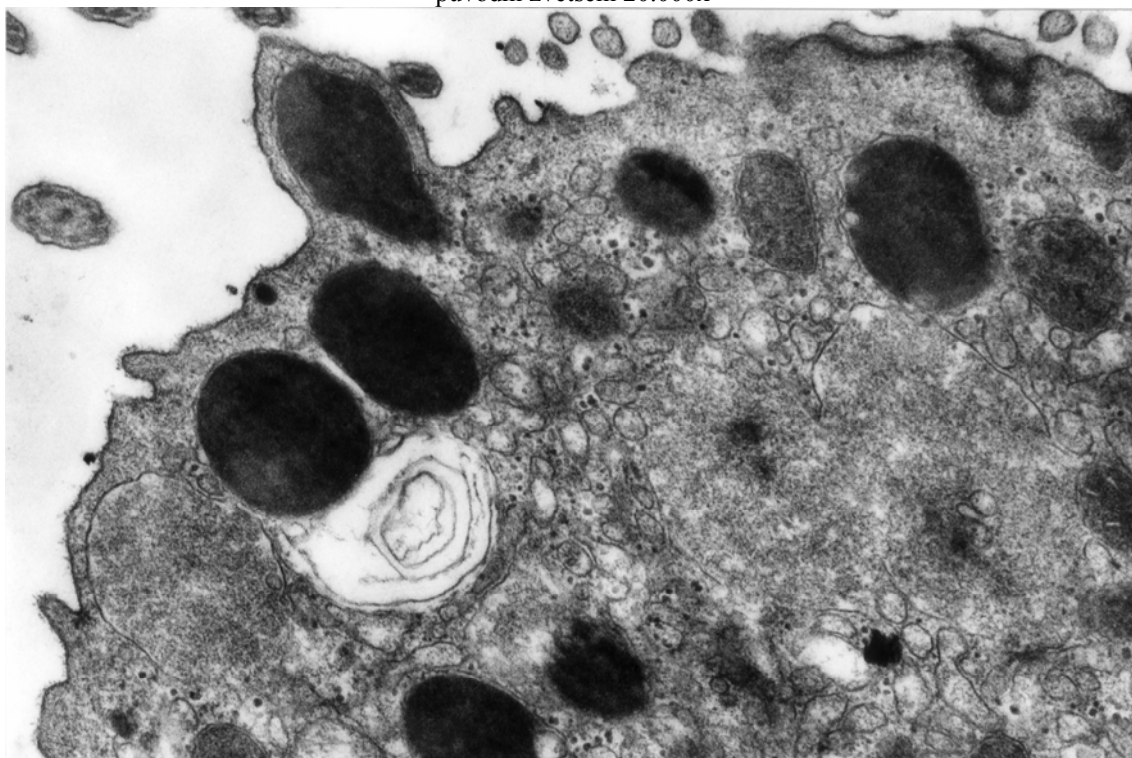
1  $\mu$ m

Obr. 101: Dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, alterované mitochondrie a sekreční granula v apikální části Clara buňky. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 15.000x



1 μm

Obr. 102: Části cytoplazmy alterované Clara buňky mezi řasinkami v luminu terminálního bronchiolu. Alterované mitochondrie v apikální cytoplazmě řasinkové buňky. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 20.000x



1 μm

Obr. 103: Sekreční granulum v drobné cytoplazmatické protruzi na apikálním povrchu Clara buňky. Čtyřdenní normobarická hypoxie, původní zvětšení 20.000x

Tab.15: Kvantitativní hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků po čtyřdenním pobytu v normobarické komoře s normálním (normoxie) nebo sníženým (10%, hypoxie) obsahem kyslíku v atmosféře

	Kontroly	Normoxie	Hypoxie
Řasinkové buňky (%)	47,3 ± 3,6	48,7 ± 6,4	42,6 ± 3,4
Clara buňky (%)	52,7 ± 3,6	51,3 ± 6,4	57,4 ± 3,4
Clara buňky s granuly (%)	73,5 ± 9,4	*85,6 ± 3,7	*86,9 ± 6,5
Clara buňky bez granul (%)	26,5 ± 9,4	*14,4 ± 3,7	*13,1 ± 6,5
Počet granul/ $\mu\text{m}^2$	0,17 ± 0,07	0,22 ± 0,08	0,23 ± 0,14
Počet mitochondrií/ $\mu\text{m}^2$	0,73 ± 0,35	1,02 ± 0,34	0,81 ± 0,23
Plocha granul ( $\mu\text{m}^2$ )	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,03
Plocha mitochondrií ( $\mu\text{m}^2$ )	0,22 ± 0,08	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,08

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD, hodnoty označené \* se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,01$ , hodnoty spojené čarou se vzájemně statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,05$

## Diskuse

Morfologické studie epitelu dýchacích cest nebo plicních alveolů u zvířat vystavených působení hypoxie nejsou časté. Je také problematické srovnávat výsledky těchto studií, protože hypoxické podmínky se na jednotlivých pracovištích obvykle výrazně liší. Hypoxie lze dosáhnout jednak snížením atmosférického tlaku (hypobarická hypoxie), jednak snížením obsahu kyslíku v dodávané směsi plynů za normálního atmosférického tlaku (normobarická hypoxie). Také délka expozice hypoxii se v jednotlivých studiích nalezených v literatuře pohybuje v širokém rozmezí od 6 hodin po 60 dní. Autoři se shodují na rozdělení experimentální hypoxie na akutní u pokusů trvajících maximálně 1 den, subakutní u pokusů s délkou trvání 3-4 dny a chronickou u pokusů delších.

Nejvíce autorů se věnovalo hodnocení vlivu hypoxie na pneumocyty typu II,

sekreční buňky plicních alveolů. Ve své ultrastrukturální studii popsala Sulkowska (1997) degranulaci těchto buněk u potkanů po subakutní (3 dny) hypobarické (380 mm Hg) hypoxii. Po delší hypoxii (10 a 30 dní) došlo k jejich hyperplasii. Po akutní (16 h) normobarické hypoxii (9% O<sub>2</sub>) byl pozorován pokles počtu a velikosti granul pneumocytů typu II u králíků (Réffy a spol. 1977). Rovněž v kultuře pneumocytů typu II byl zaznamenán postupný výrazný pokles exprese surfaktantového proteinu C, zvýšený výskyt apoptotických buněk a inhibice proliferace během dvoudenní hypoxie (1% O<sub>2</sub>) (Vaporidi a spol. 2005). Po krátkodobé (18 – 24 h) úplné anoxii pak byl pozorován v podobné buněčné kultuře i v kultuře lidských bronchiálních epitelových buněk nárůst syntézy a sekrece proteinu VEGF (Boussat a spol. 2000, Pham a spol. 2002). Tento experimentální nálezn vysvětlil vysokou koncentraci VEGF v tekutině vyplňující plicní alveoly pacientů s těžkým plicním edémem. Za podobných podmínek (1% O<sub>2</sub>) došlo také k redukci produkce endotelinu 1 (Crestani a spol. 1998).

V tracheálním epitelu hypoxických (normobarická hypoxie, 13% O<sub>2</sub>, 6 h) mladých králíků došlo ke snížení výskytu buněk difúzního neuroendokrinního systému (Echt a spol. 1982). Tomlinson a jeho spolupracovníci (Tomlinson a spol. 1999) pozorovali omezení transportu sodíku přes nosní epitel hypoxických (hypobarická hypoxie, 383 mm Hg, 24 h) potkanů. Autoři vysvětlili tento nálezn poškozením epitelu. Třítýdenní expozice potkanů normobarické hypoxii (10% O<sub>2</sub>) vyvolala zvýšenou imunoreaktivitu endotelinu 1 téměř ve všech buňkách lemujících malé dýchací cesty (Aguirre a spol. 2000). V nedávné studii popsali Kim a jeho spolupracovníci (Kim a spol. 2006) signifikantní snížení exprese heat-shock proteinu 70, zpomalení proliferační aktivity zjišťované na základě exprese proteinu Ki-67 a lehké zvýšení výskytu apoptózy v bronchiolárním epitelu myši po třítýdenní normobarické hypoxii (10% O<sub>2</sub>). Autoři v diskusi sami poukázali na možnost, že v akutní fázi hypoxie mohla být situace jiná,



třeba i opačná.

Ultrastrukturou Clara buněk potkanů vystavených dvanáctihodinové hypobarické hypoxii (265 mm Hg) se zabývali Smith a jeho spolupracovníci (Smith a spol. 1974). Popsali patologické změny cytoplazmy Clara buněk vedoucí až k jejich degeneraci. U potkanů, kteří strávili pět dní v hypobarické komoře (310 - 340 mm Hg), pozoroval Tsagareli se svou skupinou stimulaci Clara buněk k uvolňování sekretu. Delší expozice (15 - 60 dní) vyvolala akumulaci sekretu v cytoplazmě (Tsagareli a spol. 1988).

V naší studii věnované ultrastruktuře tracheálního epitelu u týčků králíků, jejichž terminální bronchioly byly hodnoceny v této práci, byla hlavním nálezem nadměrná stimulace a degenerace sekrečních pohárkových buněk následovaná masivní kompenzatorní diferenciací nových sekrečních elementů (Konrádová a spol. 2002). Králíci, kteří strávili 4 dny v komoře s atmosférou o normálním složení, měli v tracheálním epitelu pouze 4% pohárkových buněk bez známek stimulace. Zbývajících 96% buněk bylo stimulováno k vylučování sekretu, přičemž 92% pohárkových buněk bylo nalezeno již zcela vyprázdněných a degenerujících. Zbytky degenerovaných pohárkových buněk jsme často pozorovali v luminu. U králíků, kteří strávili 4 dny v téže komoře za hypoxických podmínek (10% O<sub>2</sub>), jsme našli jen 20% stimulovaných pohárkových buněk (13% ve fázi vyprázdňování sekretu a 7% zcela vyprázdněných), zato však 17% diferencujících se sekrečních elementů. Tento proces byl doprovázen hyperplasií sekrečních buněk vedoucí k tvorbě intraepiteliálních hlenových žlázek. Po čtyřdenním pobytu v komoře za normoxie stoupl výskyt pohárkových buněk uspořádaných do skupin dvojnásobně oproti kontrolám na 13%, po čtyřdenní hypoxii tvořilo skupinky již 60% sekrečních buněk. Tracheální řasinkové buňky nebyly pobyt v komoře výrazně poškozeny ani za normoxických, ani za

hypoxických podmínek. Pozorovali jsme jen ojedinělé apikální cytoplazmatické protruze a v hlubších oblastech cytoplazmy výskyt četnějších vezikul a lysosomů, dilataci cisteren granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu a mírnou alterací mitochondrií. V řasinkovém lemu došlo v obou skupinách k poklesu průměrného počtu řasinek na jednotce plochy, což vysvětlujeme masivní stimulací sousedních pohárkových buněk, které široce komunikovaly s lumenem a narušovaly tak pravidelnost řasinkového lemu.

Ultrastrukturální změny v epitelu terminálních bronchiolů, popsané v této práci, nebyly tak výrazné, ale byly v souladu s nálezy popsanými v epitelu trachey. Znamky poškození jsme našli jak v řasinkových, tak v Clara buňkách, ale vysloveně degenerativní změny se objevily jen v některých Clara buňkách. Pozorované signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) relativního počtu Clara buněk u hypoxických králíků oproti normoxické experimentální skupině může být odrazem jejich kompenzatorní proliferace. Ve srovnání s kontrolami signifikantně vyšší ( $p < 0,01$ ) zastoupení Clara buněk obsahujících sekreční granula u obou experimentálních skupin ukazuje na počáteční stádium jejich stimulace k produkci sekretu. Rovněž počítačová analýza supranukleární cytoplazmy Clara buněk naznačila zvýšení počtu granul u obou skupin, ačkoliv bez statistické významnosti.

## IV. Závěry

### 1) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po celkové aplikaci acetylcholinu

V experimentu jsme studovali ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů králíků 5 a 20 min po i.v. aplikaci 0,1 a 0,5 mg acetylcholinu. Působení acetylcholinu bylo především zaměřeno na sekreční Clara buňky, v jejichž cytoplazmě jsme zaznamenali známky patologické alterace podobně jako bylo pozorováno po aplikaci různých škodlivin. Hlavním nálezem v Clara buňkách byly dilatované tubuly hladkého endoplazmatického retikula, alterované mitochondrie a dilatované prostory granulárního endoplazmatického retikula. Patologická alterace Clara buněk byla nejvýraznější 5 minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu, kdy jsme v některých buňkách našli extrémně dilatované prostory hladkého endoplazmatického retikula a cytoplazma buněk jevila známky vakuolární degenerace. U těchto buněk někdy docházelo k narušení apikální buněčné membrány a zbytky výrazně alterované cytoplazmy Clara buněk jsme našli i nad epitelem v luminu terminálních bronchiolů. 20 minut po aplikaci menší dávky této látky nebyly známky patologické alterace cytoplazmy již přítomny.

5 min po aplikaci obou dávek acetylcholinu vylučování sekretu Clara buněk spíše stagnovalo a relativně přibývalo Clara buněk obsahujících sekreční granula. Ve skupině králíků, jimž jsme aplikovali 0,1 mg acetylcholinu, došlo ke statisticky významnému vzestupu počtu těchto buněk ve srovnání s kontrolami ( $p < 0,01$ ). 20 min po aplikaci acetylcholinu byly Clara buňky mírně stimulovány k vylučování sekretu, přičemž 20 min po aplikaci větší dávky acetylcholinu byl pokles počtu buněk obsahujících sekreční granula statisticky významný ( $p < 0,01$ ). V této experimentální skupině jsme pozorovali nápadně časté známky vyprazdňování obsahu sekrečních

granul z cytoplazmy Clara buněk. Granula se přikládala velice těsně k apikální buněčné membráně nebo se na apikálních površích buněk tvořily drobné cytoplazmatické výběžky obsahující granula. V ostatních experimentálních skupinách jsme tyto morfologické projevy sekrece pozorovali jen ojedinelé.

Obrazová analýza cytoplazmy Clara buněk přinesla statisticky významný ( $p < 0,05$  proti kontrolám) pokles průměrné velikosti granul u králíků, jejichž plíce byly odebrány 5 minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu. Tento nálezn lze rovněž vysvětlit mírnou stimulací Clara buněk, která vedla k rychlejší produkci drobnějších sekrečních granul.

Řasinkové buňky obsahovaly v cytoplazmě rozsáhlé lysozomy a četné drobnější vakuoly. Jejich mitochondrie byly alterované s elektronově lucidním obsahem a narušeným systémem krist. Cisterny Golgiho komplexu byly dilatované. Na apikálních površích řasinkových buněk jsme pozorovali tvorbu cytoplazmatických protruzí, do nichž byly často zavzaty rozpadající se axonémy kinocilií. Patologická alterace řasinkových buněk byla opět nejvíce vyjádřena 5 min po i.v. aplikaci 0,5 mg acetylcholinu a takřka neznatelná 20 min po aplikaci 0,1 mg acetylcholinu.

Při kvantitativním hodnocení zastoupení jednotlivých typů buněk v epitelu terminálních bronchiolů jsme nenalezli známky proliferace některého z druhů buněk u žádné experimentální skupiny.

Nálezy jsme mohli srovnat s našimi nedávnými výsledky studia vlivu aplikace stejných dávek acetylcholinu na ultrastrukturu epitelu trachey králíků. Aplikace acetylcholinu stimulovala pohárkové buňky k vydávání sekretu a urychlovala mechanismus jejich sekrece. Nadměrně stimulované buňky se po urychleném vyprázdnění sekretu již většinou nezapojovaly do dalších sekrečních cyklů, ale degenerovaly a byly z epitelu vylučovány. Po podání obou dávek acetylcholinu bylo

stimulováno k vydávání sekretu více než 90% všech pohárkových buněk. Po aplikaci menší dávky acetylcholinu měl průběh reakce prodlouženější charakter. Jako následek masivní stimulace a následné degenerace pohárkových buněk jsme 20 minut po aplikaci 0,5 mg acetylcholinu pozorovali známky masivní diferenciacie nových sekrečních elementů a došlo i ke změně v distribuci pohárkových buněk a ke vzniku intraepitelových hlenových žlázek. Tracheální řasinkové buňky byly aplikací acetylcholinu ovlivněny podobně jako v epitelu terminálních bronchiolů. Dvacet minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu jsme zaznamenali vyšší výskyt diferencujících se řasinkových buněk jak v epitelu trachey, tak v epitelu terminálních bronchiolů.

Na rozdíl od hlen-secernujících pohárkových buněk v epitelu trachey, kde reakce na aplikaci acetylcholinu byla výrazná a rychlá, jsme v epitelu terminálních bronchiolů pozorovali jen méně výrazné, nicméně statisticky významné změny v sekreční aktivitě Clara buněk.

Výsledky studia ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci acetylcholinu byly publikovány v časopise *Acta Veterinaria* (IF 0,227) (Uhlík a spol. 1999) a předneseny na 38. sjezdu České anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Olomouci (1.-3.9.1998). Srovnání s epitelem trachey bylo prezentováno ve formě panelu na 4<sup>th</sup> Multinational Congress on Electron Microscopy v maďarském Veszprému (5.-8.9.1999), na Výročním shromáždění Československé společnosti pro elektronovou mikroskopii v Českých Budějovicích (10.7.1998) a na Vědecké konferenci LF UK v Plzni (8.-9.10.1998)

## **2) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci adrenalinu**

V experimentu jsme studovali ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů 5 a 20 min po i.v. aplikaci 10 µg/kg adrenalinu. Aplikace adrenalinu, který působí na oba typy adrenergických receptorů, ovlivňovala zejména sekreční buňky. Odpověď Clara buněk na aplikaci adrenalinu byla obdobná jako po aplikaci různých škodlivin. Projevila se především patologickou alterací těchto buněk. Zatímco dilatace prostorů hladkého i granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu byla výraznější po 20 minutách od podání adrenalinu, mitochondrie byly více poškozené s nápadnějšími známkami edému hned po 5 minutách. Tento nálezn se však neprojevil na průměrné velikosti mitochondrií zjišťované obrazovou analýzou. Ačkoliv jsme v obou skupinách často nalézaly morfologické známky exocytózy obsahu sekrečních granul i apokrinního odlučování celých granul s lemem cytoplazmy, nedošlo ke statisticky významné změně relativního počtu Clara buněk obsahujících sekreční granula ani průměrného počtu a velikosti granul v cytoplazmě.

Řasinkové buňky byly aplikací adrenalinu méně poškozeny než buňky sekreční. Teprve 20 min po podání adrenalinu docházelo k tvorbě větších apikálních cytoplazmatických protruzí, kde jsme výjimečně našli i izolované axonémy zanikajících kinocilií. Také patologická alterace hlubších partií cytoplazmy řasinkových buněk byla výraznější 20 min po aplikaci. V této době jsme také pozorovali zvýšený výskyt diferencujících se řasinkových buněk..

Nevýrazná reakce Clara buněk epitelu terminálních bronchiolů na adrenergní stimulaci ostře kontrastuje s reakcí pohárkových buněk epitelu trachey na aplikaci stejné dávky adrenalinu, kterou jsme studovali v nedávné době a s kterou jsme naše nálezy srovnávali. Pohárkové buňky epitelu trachey byly aplikací adrenalinu nadměrně

stimulovány. Došlo i k změně mechanismu sekrece. Byl pozorován makroapokrinní způsob vylučování sekretu i téměř současné vyprazdňování všech hlenových granul z buňky. Poškození pohárkových buněk se po 20 minutách po aplikaci adrenalinu projevilo degenerací a vyloučením 70% sekrečních buněk z epitelu. Tyto nálezy i nálezy po aplikaci acetylcholinu vedou k závěru, že neurohumorální regulace funkce sekrečních buněk se v různých úsecích dýchacích cest výrazně liší.

Výsledky studia ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů po aplikaci adrenalinu byly publikovány v časopise *Acta Veterinaria* (IF 0,240) (Uhlík a spol. 2000) a předneseny na 38. sjezdu Slovenské anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Bratislavě (15.-18.9.1999). Srovnání vlivu adrenergní stimulace na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů a trachey bylo předneseno na 12<sup>th</sup> European Congress on Electron Microscopy v Brně (9.-14.7.2000).

### **3) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po inhalační aplikaci léků ze skupiny bronchospasmolytik a kortikosteroidů**

Studovali jsme ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů 30 min po inhalační aplikaci dvou dávek preparátů Ventolin Inhaler a Becotide Inhaler, léků používaných především pro léčbu bronchiálního astmatu. Ventolin obsahuje jako účinnou látku salbutamol, který patří do skupiny  $\beta_2$  sympatikomimetických bronchospasmolytik. Becotide obsahuje beklometazon ze skupiny inhalačních kortikosteroidů. Ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů po inhalaci obou léků jsme srovnali nejen s kontrolami, ale také s králíky, kteří inhalovali stejným způsobem 2 dávky preparátu Placebo Inhaler, který obsahuje pouze propelenty.

Clara buňky byly aplikací Ventolinu alterovány, ne však stimulovány k vylučování sekretu. Převažovaly naopak známky střádání sekretu. Podobný nález

jsme však zaznamenali i po aplikaci samotných propelentů. Počet Clara buněk obsahujících granula v cytoplazmě se zvýšil po inhalaci obou sprejů, po inhalaci Placebo Inhaler dokonce statisticky významně ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s kontrolami. Počet granul na jednotce plochy cytoplazmy Clara buněk se však nezměnil. Jejich průměrná velikost se sice snížila, zvláště po inhalaci Ventolinu, ale statisticky významný rozdíl nevznikl. Po aplikaci Ventolinu jsme pozorovali zvýšení počtu průměrně drobnějších mitochondrií v supranukleární cytoplazmě, ale ani zde nebyl rozdíl statisticky významný. Poškození Clara buněk aplikací obou sprejů bylo vyjádřené nerovnoměrně, nikdy však nevedlo k vyslovené degeneraci buněk. Rovněž alterace řasinkových buněk byla jen mírná.

Po aplikaci Becotidu jsme, na rozdíl od skupiny králíků po aplikaci Placebo Inhaler, pozorovali i degeneraci Clara buněk a jejich odlučování z epitelu. Naopak morfologické známky vylučování sekretu byly vzácné. Sekreční granula byla v buňkách střežena. Počet buněk obsahujících granula byl, stejně jako po inhalaci Placebo Inhaler, signifikantně vyšší ( $p < 0,05$ ) než u kontrol. Průměrný počet sekrečních granul v supranukleární cytoplazmě se nezměnil. Granula byla v průměru menší než u kontrol a u zvířat po aplikaci Placebo Inhaler. Naopak počet mitochondrií statisticky významně ( $p < 0,05$ ) stoupl a jejich průměrná velikost klesla oproti oběma skupinám. Tento nálezn lze vysvětlit výraznějšími známkami patologické alterace cytoplazmy, ale v úvahu připadá i možnost, že se projevila schopnost glukokortikoidů stimulovat biogenezi mitochondrií. Řasinkové buňky byly opět jen mírně alterované.

Rovněž zde jsme měli možnost srovnat naše nálezy s epitelem trachey po aplikaci těchto léků ve stejných dávkách. Inhalace Ventolinu i Becotidu vyvolala stimulaci většiny (91 a 71%) pohárkových buněk, zatímco po inhalaci přípravku Placebo Inhaler došlo k vyprazdňování pouze 12% sekrečních elementů. Inhalace obou



léků také výrazně ovlivnila mechanismus sekrece pohárkových buněk. Pozorovali jsme známky apokrinní sekrece i urychlené splývání sekrečních granul s následným vyloučením celého hlenového obsahu z buňky. Inhalace obou léků nejen nadměrně stimulovala, ale také poškodila pohárkové buňky. Třicet minut po jejich aplikaci tvořily degenerované buňky 79% a 58% sekrečních elementů a byly postupně uvolňovány z epitelu. Zbytky jejich vysoce elektronové denzní cytoplazmy jsme často pozorovali v oblasti řasinkového lemu. Po aplikaci Placebo Inhaler degenerovala pouze 4% pohárkových buněk. Třicet minut po podání obou léků jsme zaznamenali výskyt početných diferencujících se sekrečních buněk. Po inhalaci Becotidu jsme pozorovali i změny distribuce pohárkových buněk. Po aplikaci Placebo Inhaler nedošlo ani k zvýšení počtu diferencujících se sekrečních buněk.

Rozdíl v nálezech v epitelu trachey a terminálních bronchiolů v obou experimentech lze částečně vysvětlit distribucí aerosolu v dýchacích cestách. Přestože jsme přesvědčení, že inhalovaný aerosol dosáhl při použití naší techniky i periferních dýchacích cest, je obsah inhalovaných kapének ve vdechnutém vzduchu nepochybně nižší ve vzdálenějších a užších úsecích bronchiálního stromu než v průdušnici. Rozdílná je však také biologická reaktivita sekrečních elementů v obou vyšetřovaných úsecích.

Výsledky hodnocení vlivu inhalace salbutamolu na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů byly prezentovány jako poster na 43. sjezdu České anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Brně (4.-7.9.2005). Výsledky zkoumání vlivu inhalace beklometazonu na epitel terminálních bronchiolů byly předneseny na 42. sjezdu Slovenské anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Košicích (28.6.-1.7.2004), prezentovány jako poster na Studentské vědecké konferenci UK 2.LF v Praze (24.-25.5.2006) a publikovány ve srovnání s epitelem trachey v časopise *Ultrastructural Pathology* (IF 2005: 0,809) (Uhlík a spol. 2007).

#### **4) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po intravenózní aplikaci bronchospasmolytika aminophyllinu**

V experimentu jsme studovali ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů 30 min po i.v. aplikaci 5 mg/kg aminophyllinu, xanthinového derivátu s bronchodilatačními účinky používaného při terapii bronchiálního astmatu a chronické plicní obstrukční nemoci.

Účinek aminophyllinu byl opět zaměřen především na sekreční buňky, které byly výrazně stimulovány k produkci sekrečních granul. Počet buněk obsahujících granula se statisticky významně zvýšil oproti nálezům u kontrolních zvířat ( $p < 0,01$ ), došlo i k výraznému nárůstu počtu sekrečních granul nalezených na jednotce plochy cytoplazmy Clara buněk ( $p < 0,05$ ). Naopak průměrná velikost granul se oproti kontrolním zvířatům nezměnila. Objevovaly se i známky urychleného uvolňování sekretu, i když převažovala spíše tendence buněk sekreční produkty hromadit a střídat. Došlo také k alteraci cytoplazmy Clara buněk. Přestože mitochondrie některých Clara buněk vykazovaly známky alterace, nedošlo k výrazným změnám v jejich počtu ani velikosti. Řasinkové buňky byly aplikací aminophyllinu postiženy jen mírně. Jejich kortikální část nesoucí řasinkový lem zůstala téměř intaktní, v hlubších oblastech cytoplazmy jsme však pozorovali známky počínající patologické alterace.

V našem předchozím experimentu, kdy jsme hodnotili vliv aminophyllinu na tracheální epitel, byl účinek zaměřen zejména na buňky pohárkové. Jejich reakce byla velmi rychlá. Třicet minut po aplikaci jsme pozorovali již jen zbytky cytoplazmy degenerovaných pohárkových buněk v oblasti řasinkového lemu a v epitelu se vyskytovaly zejména buňky představující časná stadia diferenciací sekrečních elementů. Tyto buňky jevíly výrazné známky patologické alterace. V epitelu došlo i ke změně v distribuci sekrečních elementů, přičemž více než 1/5 sekrečních buněk

vytvářela drobné intraepitelové hlenové žlázy. Řasinkové buňky byly aplikací aminophyllinu ovlivněny podobně, jako v epitelu terminálních bronchiolů.

Reakce Clara buněk tedy nebyla tak výrazná jako reakce tracheálních pohárkových buněk, nicméně statisticky významné změny jsme zaznamenali. Na základě našich nálezů můžeme konstatovat, že i.v. aplikace aminophyllinu v dávce 5 mg/kg hmotnosti stimuluje sekreční elementy epitelu dýchacích cest k zvýšené tvorbě a vylučování sekretu, charakter této reakce se však v různých etážích dýchacích cest liší.

Výsledky studia vlivu intravenózní aplikace aminophyllinu na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů byly publikovány v časopise *Studia Pneumologica et Phthiseologica* (Uhlík a spol. 2002b) a předneseny na 39. sjezdu Slovenské anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Martině (4. – 6.7.2001) a na Studentské vědecké konferenci UK 2.LF v Praze (30.3.2001).

## **5) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po perorální aplikaci mukolytika ambroxolu**

V experimentu jsme studovali ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů 20 min po perorální aplikaci 1 ml mukolytického preparátu Mucosolvan sol., který obsahuje 7,5 mg ambroxolu.

Řasinkové buňky jevíly známky patologické alterace především v hlubších oblastech cytoplazmy, kde jsme u některých buněk nalézali zmnožené drobné vakuoly, lysozomy s heterogenním obsahem, multivezikulární tělíska, alterované mitochondrie a mírně dilatované cisterny Golgiho komplexu i granulárního endoplazmatického retikula. Kortikální oblasti řasinkových buněk byly poškozeny jen mírně.

Clara buňky reagovaly na aplikaci ambroxolu různě. Některé obsahovaly zcela intaktní cytoplazmu, jiné jevíly různý stupeň patologické alterace. Jejich cytoplazma

byla v apikální části vyplněna dilatovanými tubuly hladkého endoplazmatického retikula s elektronově lucidním obsahem, mitochondrie byly světlé, zduřelé, cisterny granulárního endoplazmatického retikula i Golgiho komplexu byly mírně dilatované. Morfologické známky vylučování sekretu jsme téměř nepozorovali. Poměr mezi Clara buňkami obsahujícími sekreční granula v cytoplazmě a Clara buňkami bez sekrečních granul se statisticky významně nelišil od nálezu u kontrolních králíků. Ani obrazová analýza supranukleární cytoplazmy Clara buněk nepřinesla statisticky významný výsledek.

Naše studie reakce epitelu terminálních bronchiolů na perorální podání ambroxolu navázala na rozsáhlé studie věnované vlivu různých mukolyticky působících léků na epitel trachey, které byly prováděny na našem pracovišti. Při srovnání reakce tracheálního epitelu na perorální aplikaci jedné běžné terapeutické dávky šesti různých mukolytik se jevila odpověď na podání ambroxolu jako nejvýraznější. Dvacet minut po perorální aplikaci 7,5 mg této látky byly stimulovány k vylučování sekretu téměř všechny pohárkové buňky (97,5%) a většina z nich po urychleném vyloučení sekretu degenerovala (83%). Nadměrná stimulace pohárkových buněk, které široce komunikovaly s lumenem dýchacích cest, vedla k velice výrazné redukci počtu řasinek vztaženému na jednotku plochy řasinkového lemu ( $3,6/\mu\text{m}^2$ ), přičemž 6,7% těchto kinocilií bylo alterovaných, většinou zanikajících. Přítomny byly rovněž nápadné morfologické známky narušení toku hlenu v dýchacích cestách.

Ve srovnání s touto reakcí pohárkových buněk v epitelu trachey byla reakce epitelu terminálních bronchiolů na aplikaci mukolytické látky ambroxolu nevýrazná. Potvrzuje to naši domněnku, že sekreční aktivita Clara buněk, a tím i celková reakce epitelu terminálních bronchiolů, může být řízena odlišnými faktory než sekreční činnost pohárkových buněk epitelu trachey.

Hodnocení ultrastruktury epitelu terminálních bronchiolů po aplikaci ambroxolu bylo publikováno v časopise Sborník lékařský (Uhlík a spol. 2001) a prezentováno jako panel na 39. sjezdu České anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Praze (10.-12.9.2000) a na British-Czech Paediatric Meeting v Praze (25.5.2001).

## **6) Ultrastruktura epitelu terminálních bronchiolů po čtyřdenní hypoxii**

Hodnotili jsme vliv subakutní normobarické hypoxie (10% O<sub>2</sub>) na epitel terminálních bronchiolů. Abychom posoudili vliv samotného pobytu v normobarické komoře, především vliv poměrně vysoké teploty a vlhkosti, provedli jsme ještě stejný experiment s dalšími zvířaty, jen atmosféra v komoře byla po celou dobu normální (21% O<sub>2</sub>).

Známky poškození jsme našli jak v řasinkových, tak v Clara buňkách, ale vysloveně degenerativní změny se objevily jen v některých Clara buňkách. Pozorované signifikantní zvýšení ( $p < 0,05$ ) relativního počtu Clara buněk u hypoxických králíků oproti normoxické experimentální skupině může být odrazem jejich kompenzatorní proliferace. Ve srovnání s kontrolami signifikantně vyšší ( $p < 0,01$ ) zastoupení Clara buněk obsahujících sekreční granula u obou experimentálních skupin ukazuje na počáteční stádium jejich stimulace k produkci sekretu. Rovněž počítačová analýza supranukleární cytoplazmy Clara buněk naznačila zvýšení počtu granul u obou skupin, ačkoliv bez statistické významnosti.

Opět jsme srovnali naše nálezy s ultrastrukturou tracheálního epitelu u týchž králíků, jejichž terminální bronchioly byly hodnoceny v této práci. Hlavním nálezem byla nadměrná stimulace a degenerace sekrečních pohárkových buněk následovaná masivní kompenzatorní diferenciací nových sekrečních elementů. Králíci, kteří strávili 4 dny v komoře s atmosférou o normálním složení, měli v tracheálním epitelu pouze 4%

pohárkových buněk bez známek stimulace. Zbývajících 96% buněk bylo stimulováno k vylučování sekretu, přičemž 92% pohárkových buněk bylo nalezeno již zcela vyprázdněných a degenerujících. U králíků, kteří strávili 4 dny v téže komoře za hypoxických podmínek, jsme našli jen 20% stimulovaných pohárkových buněk, zato však 17% diferencujících se sekrečních elementů. Tento proces byl doprovázen hyperplasií sekrečních buněk vedoucí k tvorbě intraepiteliálních hlenových žlázek.

Ultrastrukturální změny v epitelu terminálních bronchiolů, popsané v této práci, nejsou tak výrazné, ale jsou v souladu s nálezy popsanými v epitelu trachey. I zde jsme zaznamenali statisticky významnou stimulaci sekrečních buněk k produkci sekretu u obou experimentálních skupin. Hypoxické prostředí pouze zesílilo změny vyvolané samotným pobytem v komoře s nepřírozně vysokou teplotou a vlhkostí vzduchu.

Hodnocení vlivu hypoxie na epitel terminálních bronchiolů bylo publikováno v časopise Veterinární medicína (IF 0,621) (Uhlík a spol. 2005), částečně presentováno formou panelu na 40. sjezdu České anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Plzni (10.-12.9.2002) a předneseno na 41. sjezdu České anatomické společnosti s mezinárodní účastí v Hradci Králové (15.-17.9.2003). Srovnání s epitelem trachey bylo tématem posteru na konferenci Microscopy 2003 v Drážďanech (7.-12.9.2003).

## **7) Závěrečné srovnání výsledků studií**

Toto srovnání jsme provedli, abychom mohli určit obecnou reakci buněk epitelu terminálních bronchiolů na nejrůznější druhy zátěže. Porovnali jsme výsledky kvantitativního hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk, ultrastrukturální obraz epitelu v jednotlivých skupinách a vzájemné srovnání našich nálezů v terminálních bronchiolech s nálezy v epitelu trachey.

1) Srovnáme-li výsledky kvantitativního hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk ve všech sledovaných skupinách (tab. 16), můžeme si všimnout několika zajímavých skutečností:

a) Celkový charakter epitelu vyjádřený relativním zastoupením řasinkových a Clara buněk se nezměnil oproti kontrolním zvířatům v žádné ze skupin. Lze tedy říci, že žádný ze sledovaných zákroků nevyvolal v epitelu změny, které by vedly ke změně distribuce buněk, k jejich nadměrné degeneraci nebo naopak proliferaci. Ani z ultrastrukturálního popisu epitelu jednotlivých experimentálních skupin nevyplývá, že by některý ze zákroků způsobil výjimečné změny v uspořádání buněk nebo integritě epitelu. Vždy jsme popisovali jednovrstevný epitel s intaktními apikálními spojovacími komplexy, úzkými mezibuněčnými prostory a souvislou bazální laminou.

b) Obsah sekrečních granul v Clara buňkách, který jsme zvolili jako marker jejich sekreční aktivity, se v několika experimentálních skupinách lišil statisticky významně od kontrolních zvířat. Nejvyšší zastoupení Clara buněk obsahujících sekreční granula jsme našli v epitelu skupiny králíků, jimž byl intravenózně aplikován aminophyllin. U této skupiny jako u jediné došlo také ke statisticky významnému vzestupu průměrného počtu sekrečních granul v podrobně proměřeném vzorku supranukleární cytoplazmy. Pozorovali jsme i časté morfologické známky vylučování sekretu. Ačkoliv jsme podle výsledků předchozí studie vlivu aminophyllinu na epitel trachey očekávali výraznou stimulaci sekrečních buněk v této skupině, takto výrazný výsledek nás překvapil.

Tab. 16: Souhrnná tabulka výsledků kvantitativního hodnocení epitelu terminálních bronchiolů a funkčního stavu Clara buněk králíků všech studovaných skupin

	Kontroly	Ach 0,1 mg 5 min	Ach 0,1 mg 20 min	Ach 0,5 mg 5 min	Ach 0,5 mg 20 min	Adrenalin 5 min	Adrenalin 20 min	Placebo Inhaler	Ventolin Inhaler	Becotide Inhaler	Syntophyllin	Mucosolvan	Normoxie	Hypoxie
Řb (%)	47,3 ± 3,6	44,1 ± 0,9	40,4 ± 8,1	42,5 ± 8,9	49,5 ± 13,5	45,6 ± 2,3	42,4 ± 2,1	43,8 ± 1,2	48,4 ± 2,3	46,5 ± 1,9	47,0 ± 6,1	46,6 ± 3,5	48,7 ± 6,4 .....	42,6 ± 3,4 .....
Cb (%)	52,7 ± 3,6	55,9 ± 0,9	59,6 ± 8,1	57,5 ± 8,9	50,5 ± 13,5	54,4 ± 2,3	54,6 ± 2,1	56,2 ± 1,2	51,6 ± 2,3	53,5 ± 1,9	53,0 ± 6,1	53,3 ± 3,5	51,3 ± 6,4 .....	57,4 ± 3,4 .....
Cb+ (%)	73,5 ± 9,4	*84,0 ± 11,5	78,2 ± 10,4	81,1 ± 16,8	63,4 ± 24,1	74,9 ± 1,6	72,7 ± 7,6	#82,2 ± 11,6	78,7 ± 7,2	#80,0 ± 10,6	*88,9 ± 5,4	75,4 ± 16,8	*85,6 ± 3,7	*86,9 ± 6,5
Cb- (%)	26,5 ± 9,4	*16,0 ± 11,5	21,8 ± 10,4	18,9 ± 16,8	36,6 ± 24,1	25,1 ± 1,6	27,3 ± 7,6	#17,8 ± 11,6	21,3 ± 7,2	#20,0 ± 10,6	*11,1 ± 5,4	24,6 ± 16,8	*14,4 ± 3,7	*13,1 ± 6,5
Počet gr./μm <sup>2</sup>	0,17 ± 0,07	0,23 ± 0,16	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,14	0,13 ± 0,11	0,18 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,05	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,02	#0,39 ± 0,09	0,26 ± 0,09	0,22 ± 0,08	0,23 ± 0,14
Plocha gr. (μm <sup>2</sup> )	0,15 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,01	#0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,04	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,03
Počet mit./μm <sup>2</sup>	0,73 ± 0,35	1,01 ± 0,34	1,11 ± 0,34	0,83 ± 0,21	0,81 ± 0,12	0,80 ± 0,24	0,87 ± 0,25	0,77 ± 0,09	1,07 ± 0,26	#1,19 ± 0,08	1,08 ± 0,34	1,09 ± 0,19	1,02 ± 0,34	0,81 ± 0,23
Plocha mit.(μm <sup>2</sup> )	0,22 ± 0,08	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,24 ± 0,07	0,22 ± 0,05	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,14 ± 0,04	#0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,14 ± 0,04	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,08

N = 3, hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SD,

hodnoty označené \* se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,01$ ,

hodnoty označené # se statisticky významně liší od hodnot u kontrolních králíků na hladině významnosti  $p < 0,05$ ,

hodnoty spojené plnou čarou se vzájemně statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,01$ ,

hodnoty spojené přerušovanou čarou se vzájemně statisticky významně liší na hladině významnosti  $p < 0,05$ ,

Řb = řasinkové buňky, Cb = Clara buňky, Cb+ = Clara buňky s granuly, Cb- = Clara buňky bez granul, gr. = granula, mit. = mitochondrie



Vysoce statisticky významný rozdíl se v kategorii Clara buněk s granuly respektive bez granul objevil také ve skupinách zvířat, která strávila 4 dny v normobarické komoře ať již s normoxickou nebo hypoxickou atmosférou. V těchto skupinách se však tento rozdíl nepromítl významně do počítačové analýzy cytoplazmy.

Morfologické známky vylučování sekretu jsme pozorovali jen výjimečně. Stimulace Clara buněk k produkci a střádání sekretu u těchto skupin odpovídala našim předpokladům založeným na studiu reakce epitelu trachey na stejné experimentální procedury.

Poslední vysoce statisticky významný rozdíl v zastoupení Clara buněk obsahujících granula oproti kontrolám jsme zjistili u králíků, jejichž terminální bronchioly jsme odebrali 5 minut po aplikaci menší dávky (0,1 mg) acetylcholinu. Naopak 20 minut po aplikaci větší dávky (0,5 mg) acetylcholinu došlo k poklesu počtu Clara buněk obsahujících granula. Tento pokles sice nebyl statisticky významný oproti kontrolním zvířatům, ve srovnání se všemi ostatními skupinami králíků, jimž byl aplikován acetylcholin, však významný byl. V první fázi po aplikaci obou dávek acetylcholinu tedy docházelo spíše ke střádání sekretu v buňkách, přičemž menší dávkou acetylcholinu méně alterované Clara buňky střádaly aktivněji. V další fázi pak nastoupila stimulace Clara buněk k vylučování sekretu, které bylo po aplikaci větší dávky acetylcholinu intenzivnější. Obrazová analýza cytoplazmy Clara buněk přinesla statisticky významný pokles průměrné velikosti granul u králíků, jejichž plíce byly odebrány 5 minut po aplikaci větší dávky acetylcholinu. Tento nálezn lze rovněž vysvětlit urychlenou produkcí drobnějších sekrečních granul.

K našemu překvapení se námi pozorované morfologické známky vylučování sekretu Clara buněk v obou skupinách králíků, jimž jsme aplikovali adrenalin, neodrazily ve statisticky významné změně relativního počtu Clara buněk obsahujících

sekreční granula ani počtu granul nalezených v cytoplazmě Clara buněk pomocí analýzy obrazu. Alterace cytoplazmy, pozorovaná zejména 20 minut po aplikaci adrenalinu, zřejmě zabránila výraznější reakci.

Mírně, nicméně částečně statisticky významně zvýšený počet Clara buněk obsahujících granula po inhalaci salbutamolu, beklometazonu i samotných propelentů obsažených v tlakových nádobkách odpovídá mírnému střádání sekretu. Na rozdíl od epitelu trachey byly buňky epitelu terminálních bronchiolů inhalačním podáním léků více alterovány než stimulovány.

Překvapivě nenápadná byla reakce epitelu terminálních bronchiolů na perorální podání mukolytické látky ambroxolu. Na základě studií reakce tracheálního epitelu na aplikaci mukolytik jsme očekávali výraznější odpověď.

c) Průměrný počet a velikost mitochondrií, které jsme zjišťovali v náhodně zvoleném vzorku záběrů supranukleární cytoplazmy Clara buněk, se statisticky významně ( $p < 0,05$ ) změnily pouze ve skupině králíků, kteří inhalovali beklometazon. Došlo ke zvýšení počtu a ke zmenšení mitochondrií jak oproti kontrolním zvířatům, tak ve srovnání s králíky, kteří inhalovali samotné propelenty. Tento náález lze vysvětlit výraznějšími známkami patologické alterace cytoplazmy, ale v úvahu připadá i možnost, že se projevila schopnost glukokortikoidů stimulovat biogenezi mitochondrií.

2) Ve všech sledovaných skupinách došlo k výskytu známek patologické alterace epitelových buněk. Tyto známky jsme pozorovali jak v buňkách řasinkových, tak v Clara buňkách.

V řasinkových buňkách se jednalo buď o známky edému kortikální cytoplazmy, nebo o alteraci organel v hlubších oblastech buněk. Edém kortikální cytoplazmy, který se projevil tvorbou apikálních cytoplazmatických protruzí, které narušovaly uspořádání řasinek na apikálním povrchu a někdy zaujímaly do svého obsahu axonémy sousedních

kinocilií, jsme zaznamenali hlavně po intravenózní aplikaci acetylcholinu v obou dávkách, intravenózním podání adrenalinu, především po 20 minutách od aplikace, a u králíků, kteří strávili 4 dny v normobarické komoře jak s hypoxickou, tak s normoxickou atmosférou.

Alteraci hlubších oblastí cytoplazmy, která se projevovala tvorbou drobných vezikul, zvýšeným výskytem lysosomů s heterogenním obsahem a multivezikulárních tělísek, dilatací prostorů endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu a změnami mitochondrií, jsme našli ve všech experimentálních skupinách. Lišil se pouze stupeň poškození. Nejvýraznější známky alterace cytoplazmy řasinkových buněk jsme zaznamenali u králíků 5 minut po aplikaci vyšší dávky acetylcholinu, 20 minut po podání adrenalinu a po čtyřdenní hypoxii.

Poškození cytoplazmy Clara buněk se projevovalo především dilatací tubulů hladkého endoplazmatického retikula, které se u těchto buněk vyskytují hojně v apikální části. Dilatované tubuly někdy zcela vyplňovaly apikální části takto poškozených Clara buněk a docházelo pak i k rozpadu buněk a k uvolňování cytoplazmatických struktur do lumina terminálních bronchiolů. Tuto situaci jsme zaznamenali 5 minut po aplikaci vyšší dávky acetylcholinu, 20 minut po podání adrenalinu, 30 minut po inhalaci beklometazonu a po čtyřdenní hypoxii.

Dalšími projevy alterace v Clara buňkách byly dilatované prostory granulárního endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu a alterace mitochondrií. Tyto změny jsme pozorovali různě vyjádřené ve všech experimentálních skupinách. Zajímavým nálezem bylo, že někdy docházelo k diametrálně odlišnému stupni poškození dvou sousedních Clara buněk nebo jsme dokonce vedle alterované Clara buňky našli Clara buňku zcela intaktní.

3) Všechny naše nálezy v epitelu terminálních bronchiolů jsme porovnali

s nálezy v epitelu trachey. Někdy jsme porovnávali naše výsledky se staršími pracemi hodnotícími epitel trachey po totožném experimentálním zákroku, někdy jsme současně hodnotili epitel terminálních bronchiolů a trachey u týchž králíků. Vždy jsme museli konstatovat, že epitel trachey, především sekreční pohárkové buňky, reagoval na experimentální zásah podstatně výrazněji než epitel terminálních bronchiolů. V tracheálním epitelu jsme ve všech skupinách nalézali stimulaci pohárkových buněk k uvolňování sekretu, která často vedla k degeneraci vyprázdněných buněk a někdy i k následné diferenciaci nových sekrečních elementů projevující se změnou distribuce pohárkových buněk v epitelu. V epitelu terminálních bronchiolů jsme zaznamenali obvykle jen kvantitativní změny v distribuci sekrečních granul v Clara buňkách naznačující stimulaci buněk k produkci sekretu a jeho střídání, méně často jsme nacházeli morfologické známky uvolňování sekretu. V žádné skupině jsme nepozorovali významné změny v distribuci buněk v epitelu.

Ze studovaných experimentálních zákroků nejvíce stimulovalo Clara buňky intravenózní podání aminophyllinu a acetylcholinu a subakutní hypoxie. Naopak intravenózní podání adrenalinu a mukolytického ambroxolu nevyvolalo žádné kvantitativní změny v Clara buňkách. Pohárkové buňky byly stimulovány rovněž nejvíce po intravenózním podání aminophyllinu a acetylcholinu a po čtyřdenní hypoxii, kdy se objevovaly známky druhé fáze jejich stimulace, tedy nárůst počtu diferencujících se sekrečních elementů doprovázený změnou distribuce sekrečních buněk v epitelu.. Poměrně vysoký stupeň stimulace pohárkových buněk, kdy v epitelu převažovaly zcela vyprázdněné a degenerované elementy, jsme však zaznamenali i po intravenózní aplikaci adrenalinu, inhalaci salbutamolu a beklometazonu, perorálním podání ambroxolu i čtyřdenním pobytem v normobarické komoře s normoxickou atmosférou.

Z porovnání reakce buněk epitelu terminálních bronchiolů a buněk epitelu

trachey vyplývá, že zatímco řasinkové buňky reagovaly na použité experimentální zákroky různě vyjádřenou alterací, sekreční buňky byly obvykle stimulovány k tvorbě a uvolňování sekretu. Stupeň této reakce sekrečních buněk se však v obou studovaných etážích dýchacích cest významně lišil. U pohárkových buněk jsme vždy pozorovali rychlou stimulaci následovanou degenerací a eventuálně i diferenciací nových buněk se změnou jejich distribuce. U Clara buněk jsme zaznamenali jen v některých případech méně nápadnou stimulaci doprovázenou alterací cytoplazmy, ale jen vzácně degenerací a nikdy ne diferenciací nebo změnami distribuce. Sekreční aktivita Clara buněk, a tím i celková reakce epitelu terminálních bronchiolů, tedy může být řízena odlišnými faktory než sekreční činnost pohárkových buněk epitelu trachey.

## V. Literatura

1. Abraham, G., Kottke, C., Ammer, H., Dhein, S., Ungemach, F. R.: Segment-dependent expression of muscarinic acetylcholine receptors and G-protein coupling in equine respiratory tract. *Vet. Res. Com.* 31: 207-226, 2007.
2. Aguirre, J.I., Morrell, N.W., Long, L., Clift, P., Upton, P.D., Polak, J.M., Wilkins M.R.: Vascular remodelling and ET-1 expression in rat strains with different responses to chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278: L981-L987, 2000.
3. Andersson, L., Lundberg, P.-A., Barregard, L.: Methodological aspects on measurement of Clara cell protein in urine as a biomarker for airway toxicity, compared with serum levels. *J. Appl. Toxicol.* 27: 60-66, 2007.
4. Aryal, G., Kimula, Y., Koike, M.: Ultrastructure of Clara cells stimulated by isoproterenol. *J. Med. Dent. Sci.* 50: 195-202, 2003.
5. Baggot, J.D.: Několik aspektů veterinární farmakologie. In: Katzung, B.G. (Ed.): *Základní a klinická farmakologie*, H&H, Praha, 989-1001, 1994.
6. Baraniuk, J.N., Ali, M., Brody, D., Maniscalco, J., Gaumond, E., Fitzgerald, T., Wong, G., Yuta, A., Mak, J.C.W., Barnes, P.J., Bascom, R., Troost, T.: Glucocorticoids induce  $\beta$ 2-adrenergic receptor function in human nasal mucosa. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 55: 704-710, 1997.
7. Barbieri, E.J., Barsigian, C.: Cyclic nucleotides fail to affect mucus glycoconjugate secretion from canine tracheal explants. *J. Pharm. Pharmacol.* 37: 748-751, 1985.
8. Basbaum, C.B., Ueki, I., Brezina, L., Nadel, J.A.: Tracheal submucosal gland serous cells stimulated in vitro with adrenergic and cholinergic agonists. *Cell Tissue Res.* 220, 481-498, 1981.
9. Basbaum, C.B., Madison, J.M., Sommerhoff, C.P., Brown, J.K., Finkbeiner, W.E.: Receptors on airway gland cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: S141-S144, 1990.
10. Becci, P., McDowell, E.M., Trump, B.F.: The respiratory epithelium II. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 551-561, 1978a.
11. Becci, P., McDowell, E.M., Trump, B.F.: The respiratory epithelium IV. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 577-586, 1978b.
12. Becci, P., McDowell, E.M., Trump, B.F.: The respiratory epithelium VI. *J. Natl. Cancer Inst.* 61: 607-618, 1978c.
13. Borson, D.B., Charlin, M., Gold, B.D., Nadel, J.A.: Neural regulation of  $^{35}\text{SO}_4$ -macromolecule secretion from tracheal glands of ferrets. *J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol.* 57: 457-466, 1984.
14. Boussat, S., Eddahibi, S., Coste, A., Fataccioli, V., Gouge, M., Housset, B., Adnot, S., Maitre, B.: Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in human pulmonary epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L371-L378, 2000.
15. Breeze, R.G., Wheldon, E.B.: The cells of the pulmonary airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 116: 705-777, 1977.
16. Brody, A.R., Hook, G.E.R., Cameron, G.S., Jetten, A.M., Butterick, C.J., Nettesheim, P.: The differentiation capacity of Clara cells isolated from the lungs of rabbits. *Lab. Invest.* 57: 219-229, 1987.
17. Bryan, J.H.D.: Abnormal cilia in a male-sterile mutant mouse. *Virchows Arch. Path. Anat.* 400: 77-86, 1983.

18. Buckpitt, A., Buonarati, M., Avey, L.B., Chang, A.M., Motin, D., Plopper, C.G.: Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cell cytotoxicity. II. Comparison of stereoselectivity of naphthalene epoxidation in lung and nasal mucosa of mouse, hamster, rat and rhesus monkey. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 364-372, 1992.
19. Cardoso, W.V., Stewart, L.G., Pinkerton, K.E., Ji, C., Hook, G.E.R., Singh, G., Katyal, S.L., Thurlbeck, W.M., Plopper, C.G.: Secretory product expression during Clara cell differentiation in the rabbit and rat. *Am. J. Physiol.* 264: L543-L552, 1993.
20. Carstairs, J.R., Nimmo, A.J., Barnes, P.J.: Autoradiographic visualization of beta-adrenoreceptor subtypes in human lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 541, 1985.
21. Cervin, A., Lindgren, S.: The effect of selective phosphodiesterase inhibitors on mucociliary activity in the upper and lower airways in vitro. *Auris Nasus Larynx* 25: 269-276, 1998.
22. Chichester, C.H., Buckpitt, A.R., Chang, A., Plopper, C.G.: Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells. *Mol. Pharmacol.* 45: 664-672, 1993.
23. Clara, M.: Zur Histobiologie des Bronchialepithels. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 41: 321-347, 1937.
24. Crestani, B., Odoux, C., Rolland, C., Moldovan, F., Cornillet, P., Fiet, J., Aubier, M.: Hypoxia reduces endothelin production by rat alveolar type II cells in primary culture. *Eur. Respir. J.* 11: 392-399, 1998.
25. Dalen, H.: An ultrastructural study of primary cilia, abnormal cilia and ciliary knobs from the ciliated cells of the guinea-pig trachea. *Cell Tiss. Res.* 220: 685-697, 1981.
26. Daviskas, E., Anderson, S.D., Shaw, J., Eberl, S., Seale, J.P., Yang, I.A., Young, I.H.: Mucociliary clearance in patients with chronic asthma: Effects of  $\beta_2$  agonists. *Respirology* 10: 426-435, 2005.
27. Dodge, D.E., Plopper, C.G., Rucker, R.B.: Regulation of Clara cell 10 kD protein by pilocarpine: quantitative comparison of nonciliated cells in rat bronchi and bronchioles based on laser scanning confocal microscopy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10: 259-270, 1994.
28. Dorscheid, D.R., Wojcik, K.R., Sun, S., Marroquin, B., White, S.R.: Apoptosis of airway epithelial cells induced by corticosteroids. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 1939-1947, 2001.
29. Dorscheid, D.R., Low, E., Conforti, A., Shifrin, S., Sperling, A.I., White, S.R.: Corticosteroid-induced apoptosis in mouse airway epithelium: Effect in normal airways and after allergen-induced airway inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111: 360-366, 2003.
30. Echt, R., Ross, L.M., Roth, R.A., Paersall, A.D.: The effect of carbon monoxide and hypoxic hypoxia on amine-containing cells in the tracheal epithelium of young rabbits. *Cell Tissue Res.* 224: 129-135, 1982.
31. Elia, J., Aoki, A., Maldonado, C.A.: Response of bronchiolar Clara cells induced by a domestic insecticide. Analysis of CC10 kDa protein content. *Histochem. Cell Biol.* 113: 125-133, 2000.
32. Elia, J., Aoki, A., Maldonado, C.A.: Regulation of uteroglobin/Clara cell protein expression after acute lung exposure to an organophosphoreted insecticide. *Histochem. Cell Biol.* 120: 33-39, 2003.
33. Evans, C.M., Williams, O.W., Tuvim, M.J., Nigam, R., Mixides, G.P., Blackburn, M.R., DeMayo, F.J., Burns, A.R., Smith, C., Reynolds, S.D., Stripp, B.R., Dickey,

- B.R.: Mucin is produced by Clara cells in the proximal airways of antigen-challenged mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 31: 382-394, 2004.
34. Evans, M.J., Johnson, L.V., Stephens, R.J., Freeman, G.: Renewal of the terminal bronchiolar epithelium in the rat following exposure to NO<sub>2</sub> or O<sub>3</sub>. *Lab. Invest.* 35: 246-257, 1976.
  35. Evans, M.J., Cabral-Anderson, L., Freeman, G.: Role of the Clara cell in renewal of the bronchiolar epithelium. *Lab. Invest.* 38: 648-655, 1978.
  36. Fanucchi, M.C., Murphy, M.E., Buckpitt, A.R., Philpot, A.R., Plopper, C.G.: Pulmonary cytochrome P450 monooxygenase and Clara cell differentiation in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17: 302-314, 1997
  37. Fazio, F., Lafortuna, C.L.: Beclomethasone dipropionate does not affect mucociliary clearance in patients with chronic obstructive lung disease. *Respiration* 50: 62-65, 1986.
  38. Fung, D.C.K., Beacock, D.J., Richardson, P.S.: Vagal control of mucus glycoconjugate secretion into the feline trachea. *J. Physiol.* 453: 435-447, 1992.
  39. Gail, D.B., Lenfant, C.J.M.: Cells of the lung: biology and clinical implications. *Am. Rev. Respir. Dis.* 127: 366-387, 1983
  40. Gashi, A.A., Nadel, J.A., Basbaum, C.B.: Tracheal gland mucous cells stimulated *in vitro* with adrenergic and cholinergic drugs. *Tissue Cell* 21: 59-67, 1989.
  41. Geiser, M., Imhof, V., Siegenthaler, W., Grunder, R., Gehr, P.: Ultrastructure of the aqueous lining layer in hamster airways. *Microsc. Res. Tech.* 36: 428-437, 1997.
  42. Giovanetti, A., Rossi, L., Mancuso, M., Lombardi, C. C., Marasco, M. R., Manna, F., Altavista, P., Massa, E. M.: Analysis of lung damage induced by trichloroethylene inhalation in mice fed diets with low, normal, and high copper content. *Toxicol. Pathol.* 26: 628-635, 1998.
  43. Goldie, R.G., Lulich, K.M., Paterson, J.W.: Bronchodilators: beta-agonists. *Med. J. Austr.* 162: 100-102, 1995.
  44. Guleria, R., Singh, R.T., Sinha, S., Padhy, K., Gupta, K., Pande, J.N.: Effect of single inhalation of a salbutamol, ipratropium bromide and beclomethasone on mucociliary clearance in patients with chronic obstructive airway disease. *Indian J. Chest Dis. Allied. Sci.* 45: 241-246, 2003.
  45. Halatek, T., Opalska, B., Swiercz, R., Palczynski, C., Gorski, P., Rydzynski, K.: Glutaraldehyde inhalation exposure of rats: effects on lung morphology, Clara-cell protein, and hyaluronic acid levels in BAL. *Inhal. Toxicol.* 15: 85-97, 2003.
  46. Halatek, T., Gromadzinska, J., Wasowicz, W., Rydzynski, K.: Serum Clara-cell protein and  $\beta_2$ -microglobulin as early markers of occupational exposure to nitric oxides. *Inhal. Toxicol.* 17: 87-97, 2005.
  47. Hampl, V., Herget, J.: Perinatal hypoxia increases hypoxic pulmonary vasoconstriction in adult rats recovering from chronic exposure to hypoxia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142: 619-624, 1990.
  48. Hampl, V., Herget, J.: Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev.* 80: 1337-1372, 2000.
  49. Hampl, V., Bíbová, J., Baňasová, A., Uhlík, J., Míková, D., Hnilíčková, O., Lachmanová, V., Herget, J.: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 290, L11-L20, 2006.
  50. Harkema, J.R., Plopper, C.G., Hyde, D.M., St George, J.A., Wilson, D.W., Dungworth, D.L.: Response of macaque bronchiolar epithelium to ambient concentrations of ozone. *Am. J. Pathol.* 143: 857-866, 1993.



51. Harkema, J.R., Wagner, J.G.: Epithelial and inflammatory responses in the airways of laboratory rats coexposed to ozone and biogenic substances. Enhancement of toxicant-induced airway injury. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57: 129-141, 2005.
52. Hasegawa, I., Niisato, N., Iwasaki, Y., Marunaka, Y.: Ambroxol-induced modification of ion transport in human airway Calu-3 epithelia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 475-482, 2006.
53. Hermans, C., Bernard, A.: Clara cell protein (CC16) characteristics and potential applications as biomarker of lung toxicity. *Biomarkers* 1, 3-8, 1996.
54. Hermans, C., Bernard, A.: Lung epithelium-specific proteins. Characteristic and potential application as markers. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159: 646-678, 1999.
55. Hermans, C., Knoop, B., Wiedig, M., Aarsalane, K., Toubeau, G., Falmagne, P., Bernard, A.: Clara cell protein as a marker of Clara cell damage and bronchoalveolar blood barrier permeability. *Eur. Respir. J.* 13: 1014-1021, 1999.
56. Hess, D., Fisher, D., Peterfreund, R.A., Kacmarek, R.M.: The delivery of aerosolized steroids from MDIs with nozzle extensions: quantitative laboratory evaluation of a method to improve aerosol delivery to intubated patients. *Intensive Care Med.* 21: 945-951, 1995.
57. Hess, F.G., McDowell, E.M., Trump, B.F.: The respiratory epithelium VIII. *Acta Cytol.* 25: 111-133, 1981.
58. Hess, L., Dvořáček, I., Svobodník, J.: *Anestézie laboratorních zvířat*, 196-197. Avicenum, Praha, 1984.
59. Hong, J.S., Ko, H.H., Han, E.S., Lee, C.S.: Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol. *Biocem. Pharmacol.* 66: 1297-1306, 2003.
60. Houtmeyers, E., Gosselink, R., Gayan-Ramirez, G., Decramer, M.: Effects of drugs on mucus clearance. *Eur. Respir. J.* 14: 452-467, 1999.
61. Howarth, P.H.: Why particle size should affect clinical response to inhaled therapy. *J. Aerosol Med.* 14 (suppl. 1): S27-S34, 2001.
62. Hulbert, W.C., Forster, B.B., Laird, W., Pihl, C.E., Walker, D.C.: An improved method for fixation of the respiratory epithelial surface with the mucous and surfactant layers. *Lab. Invest.* 47: 354-363, 1982.
63. Hung, K.S., Chapman, A.L., Hung, S.H., Menon, C.D.: Clara cell surface of the rat: scanning and transmission electron microscopic study. *Experientia* 38: 959-961, 1982.
64. Hyde, D.M., Plopper, C.G., Kass, P.H., Alley, J.L.: Estimation of cell numbers and volumes of bronchiolar epithelium during rabbit lung maturation. *Am. J. Anat.* 167: 359-370, 1983.
65. Inglis S.H., Corboz M.R., Taylor, A.E., Ballard, S.T.: In situ visualization of bronchial submucosal glands and their secretory response to acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 272: L203-L210, 1997.
66. Irvani, J., Melville, G. N.: Mucociliary function of the respiratory tract as influenced by drugs. *Respiration* 31, 350-357, 1974.
67. Jeffery, P.K.: Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: S14-S20, 1983.
68. Jeffery, P.K., Reid, L.: New observation of rat airway epithelium. *J. Anat.* 120: 295-320, 1975.
69. Johnston, C.J., Finkelstein, J.N., Oberdörster, G., Reynolds, S.D., Stripp, B.R.: Clara cell secretory protein-deficient mice differ from wild-type mice in

- inflammatory chemokine expression to oxygen and ozone, but not to endotoxin. *Exp. Lung Res.* 25: 7-21, 1999.
70. Jones, R., Reid, L.:  $\beta$ -agonists and secretory cell number and intracellular glycoprotein in airway epithelium. *Am. J. Pathol.* 95: 407-422, 1979.
  71. Kamachi, A., Munukata, M., Nasuhara, Y., Nishimura, M., Ohtsuka, Y., Amishima, M., Takahashi, T., Homma, Y., Kawakami, Y.: Enhancement of goblet cell hyperplasia and airway hyperresponsiveness by salbutamol in a rat model of atopic asthma. *Thorax* 56: 19-24, 2001.
  72. Kamijo, A., Terakawa, S., Hisamatsu, K.: Neurotransmitter-induced exocytosis in goblet and acinar cells of rat nasal mucosa studied by video microscopy. *Am. J. Physiol.* 265: L200-L209, 1993.
  73. Kelly, H.W.: Pharmaceutical characteristics that influence the clinical efficacy of inhaled corticosteroids. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 91: 326-334, 2003.
  74. Kilburn, K.H.: Functional morphology of the distal lung. *International Review of Cytology* 37: 153-269, 1974.
  75. Kim, E.K., Park, J.D., Shim, S.Y., Kim, H.S., Kim, B.I., Choi, J.H., Kim, J.E.: Effect of chronic hypoxia on proliferation, apoptosis, and HSP70 expression in mouse bronchiolar epithelial cells. *Physiol. Res.* 55: 405-411, 2006.
  76. Konrádová, V.: The ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbit. *Folia Morphol.* 14: 210-214, 1966.
  77. Konrádová, V.: The ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits following the inhalation of aerosols of colloidal solutions of heavy metals. I. Changes in the ultrastructure of the tracheal epithelium after 2-hour inhalation of colloidal solutions of iron and silver. *Folia Morphol.* 16: 258-264, 1968a.
  78. Konrádová, V.: The ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits following the inhalation of aerosols of colloidal solutions of heavy metals. II. Signs of cell alteration in the epithelium after 8-hour inhalation of colloidal solution of iron and silver. *Folia Morphol.* 16: 265-271, 1968b.
  79. Konrádová, V.: The ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits following the inhalation of aerosols of colloidal solutions of heavy metals. III. A contribution to the study of the regeneration of the tracheal epithelium. *Folia Morphol.* 20: 389-396, 1972.
  80. Konrádová, V.: Vliv aplikace jedné terapeutické dávky Intussinu na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest. *Čs. pediatrie* 45: 350-352, 1990.
  81. Konrádová, V.: Quantitative evaluation of the degree of damage to tracheal epithelium. *Funct. Dev. Morphol.* 1: 47-50, 1991.
  82. Konrádová, V., Bencko, V.: Mechanical damage to rabbit tracheal epithelium from inhaling inert pyrite dust of needle-like structure. Part I. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.* 19: 279-285, 1975.
  83. Konrádová, V., Bencko, V.: Mechanical damage to rabbit tracheal epithelium from inhaling inert pyrite dust of needle-like structure. Part II. *J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol.* 20: 385-391, 1976.
  84. Konrádová, V., Šrajer, J.: Quantitative evaluation of the ciliary border of the epithelium of the rabbit trachea and the human primary bronchus. *Folia Morphol.* 35: 67-74, 1987.
  85. Konrádová, V., Vávrová, V., Janota, J.: Effect of the inhalation of a surface tension-reducing substance (propylene glycol) on the ultrastructure of the epithelium of the respiratory passages in rabbits. *Folia Morphol.* 26: 28-34, 1978.
  86. Konrádová, V., Vávrová, V., Janota, J.: Influence of single and repeated inhalations of 4% Mistabron on the tracheal epithelium of rabbits. In: Baran, D.

- (Ed.): Recent advances in aerosol therapy. Brussels, Belgium, 31-39, 1979a.
87. Konrádová, V., Vávrová, V., Janota, J.: Ultrastructure of rabbit tracheal epithelium after the inhalation of physiological saline. *Folia Morphol.* 27: 94-98, 1979b.
  88. Konrádová, V., Vávrová, V., Janota, J.: Reaction of goblet cells in the tracheal epithelium to the stimulation with mucolytic agent. *Folia Morphol.* 28: 254-258, 1980.
  89. Konrádová, V., Vávrová, J., Janota, J.: Comparision of the effect of aerosol of four mucolytic solutions on the ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits. *Respiration* 43: 64-71, 1982a.
  90. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Effect of the oral mucolytics on the ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits. In: Baran, D. (Ed.): Proceedings of the 11th annual meeting European working group cystic fibrosis. Brussels, Belgium, 134-135, 1982b.
  91. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Ultrastructure of the tracheal epithelium after oral administration of Broncholysin (N-acetylcysteine). *Folia Morphol.* 31: 250-257, 1983.
  92. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Comparison of the effect of three oral mucolytics on the ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits. *Respiration* 48: 50-57, 1985a.
  93. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Reaction of the goblet cells in the rabbit tracheal epithelium to the oral administration of N-cyclohexyl-N-methyl-1,2-amino-3,5-dibrombenzyl ammonium chloride. *Folia Morphol.* 33: 27-33, 1985b.
  94. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Účinek perorální aplikace jedné terapeutické dávky různých mukolytik na ultrastrukturu epitelu trachey králíků. *Studia Pneumol. Phthiseol. Cechosl.* 45: 31-39, 1985c.
  95. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Dependance of the reaction of the goblet cells in the rabbit tracheal epithelium on the oral dose of the mucolytic agent. *Folia Morphol.* 33: 344-350, 1985d.
  96. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Regeneration of changes induced in rabbit tracheal epithelium by a single oral dose of a mucolytic agent. *Folia Morphol.* 34: 52-58, 1986a.
  97. Konrádová, V., Vávrová, V., Šulová, J.: Ultrastructure of the tracheal epithelium after oral administration of mucolytic agents. *Verh. Anat. Ges.* 80: 387-388, 1986b.
  98. Konrádová, V., Janota, J., Šulová, J.: Effects of 90% oxygen exposure on the ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits. *Respiration* 54: 24-32, 1988.
  99. Konrádová, V., Suková, B., Šulová, J.: Účinek jednorázové aplikace preparátu Berotecu na ultrastrukturu epitelu dychacích cest. *Studia Pneumol. Phthiseol. Cechosl.* 50: 505-511, 1990a.
  100. Konrádová, V., Kanta, J., Šulová, J.: Effect of the bronchoalveolar lavage on the ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits. *Respiration* 57: 14-20, 1990b.
  101. Konrádová, V., Kanta, J., Šulová, J.: Regeneration of changes produced in rabbit tracheal epithelium by saline lavage of the airways. *Folia Morphol.* 38: 28-37, 1990c.
  102. Konrádová, V., Tůma, S., Kanta, J.: The effect of Hexabrix tracheobronchography on the ultrastructure of the airway epithelium. *Pediatr. Radiol.* 20: 440-443, 1990d.

103. Konrádová, V., Tůma, S., Kanta, J., Šulová, J.: Ultrastructure of rabbit tracheal epithelium after the administration of Hexabrix - a hexaiodated contrast agent for tracheobronchography. *Funct. Dev. Morphol.* 2: 33-37, 1992.
104. Konrádová, V., Tůma, S., Uhlík, J., Zajícová, A., Zocová, J.: Ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* var. *edulis*) after intratracheal administration of two iodinated contrast agents. *Acta Vet. Brno* 64: 147-155, 1995.
105. Konrádová V., Uhlík J., Zajícová A., Vajner L., Zocová J.: Změny v oblasti řasinkového lemu epitelu dýchacích cest vyvolané perorální aplikací mukolytik. *Čs. pediat.* 51: 70-75, 1996a.
106. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Vliv jednorázové aplikace Ventolinu na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest. *Čs. Pediat.* 51, 725-728, 1996b.
107. Konrádová, V., Tůma, S., Uhlík, J., Vajner, L., Zajícová, A., Zocová, J.: Regeneration of injury of the rabbits' (*Oryctolagus cuniculus* var. *edulis*) tracheal epithelium due to the intratracheal administration of an iodinated contrast agent. *Acta Vet. Brno* 65, 143-150, 1996c.
108. Konrádová, V., Tůma, S., Uhlík, J., Zajícová, A.: Účinek tracheobronchografie vodnými jódoými kontrastními látkami na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest králíka. *Česká radiologie* 50, 316-322, 1996d.
109. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zajícová, A., Zocová, J.: Ultrastructure of the tracheal epithelium in rabbits after acetylcholine administration. *Folia Biol.* 42: 261-265, 1996e.
110. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Reaction of the goblet cells to the cholinergic stimulation. *Acta Vet. Brno* 65: 175-180 1996f.
111. Konrádová, V., Uhlík, J., Zocová, J., Zajícová, A.: Comparison of the effect of a high and low dose of atropine on the ultrastructure of the tracheal epithelium. *Respiration* 63: 150-154, 1996g.
112. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Effect of an adrenergic agonist and a cholinergic antagonist on the airway epithelium. *Vet. Med. - Czech* 42: 289-293, 1997.
113. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: The effect of two  $\beta_2$  adrenergic agonists on the ultrastructure of the airway epithelium in rabbits. *Vet. Med.-Czech.* 43: 187-192, 1998a.
114. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Vliv lokální anestezie na hodnocení ultrastrukturálních nálezů v epitelu velkých bronchů. *Otorinolaryngol. (Prague)* 47, 3, 159-164, 1998b.
115. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Vliv aplikace malé dávky atropinu na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest. *Otorinolaryngol. (Prague)* 47, 2, 92-95, 1998c.
116. Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., Zocová, J.: Srovnání účinku inhalace 2 vdechů Ventolinu a preparátu Placebo inhaler na epitel trachey. *Stud. Pneumol. Phthiseol.* 59: 33-34, 1999a.
117. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: The effect of adrenergic stimulation on the ultrastructure of the tracheal epithelium. *Biologia Bratislava* 54, Suppl.6: 169-175, 1999b.
118. Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., Zocová, J.: The efect of Placebo inhaler on the tracheal epithelium in rabbits. *Vet. Med. - Czech.* 45: 189-194, 2000.
119. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Zocová, J.: Účinek aplikace Syntophyllinu na ultrastrukturu epitelu dýchacích cest. *Stud. Pneumol. Phthiseol.* 61: 21-26,

- 2001a.
120. Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., Zocová, J.: Changes in tracheal epithelium during 24 hours after inhalation of mineral water. *Acta Vet. Brno* 70: 167-172, 2001b.
  121. Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., Zocová, J.: Tracheal epithelium of rabbits after repeated inhalations of mineral water aerosol. *Acta Vet. Brno* 70: 391-396, 2001c.
  122. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Herget, J., Adášková, J.: Exposure to hypoxia injures tracheal epithelium (ultrastructural study). *Vet. Med. (Praha)* 47: 270-276, 2002.
  123. Konrádová, V., Vajner, L., Uhlík, J., Zocová, J.: Comparison of the effect of aerosols of saline and mineral water on the tracheal epithelium. *Acta Vet. Brno* 72: 151-156, 2003a.
  124. Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., Herget, J., Adášková, J.: Mild hyperoxia induces moderate pathological alteration in airway epithelium (ultrastructural study). *Vet. Med. – Czech* 48: 313-320, 2003b.
  125. Kurosumi, K., Shibuichi, I., Tosaka, K.: Ultrastructural studies on the secretory mechanism of goblet cells in the jejunal epithelium. *Arch. Histol. Jpn.* 44: 263-284, 1981.
  126. Lacroix, J.S., Potter, E.K., McLachlan, E.: Nitric oxide and parasympathetic vascular and secretory control of the dog nasal mucosa. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 118: 257-263, 1998.
  127. Lafortuna, C.L., Fazio, F.: Acute effect of inhaled salbutamol on mucociliary clearance in health and chronic bronchitis. *Respiration* 45: 111-123, 1984.
  128. Laitinen, A.: Autonomic innervation of the human respiratory tract as revealed by histochemical and ultrastructural methods. *Eur. J. Resp. Dis.* 66, Suppl. 140: 5-42, 1985.
  129. Lakritz, J., Chang, A., Weir, A., Nishio, S., Hyde, D., Philpot, R., Buckpitt, A.R., Plopper, C.G.: Cellular and metabolic basis of Clara cell tolerance to multiple doses of cytochrome P450-activated cytotoxicants. I: Bronchiolar epithelial reorganization and expression of cytochrome P450 monooxygenases in mice exposed to multiple doses of naphthalene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 1408-1418, 1996.
  130. Laporte, J., D'Orleans-Juste, P., Sirois, P.: Guinea pig Clara cells secrete endothelin 1 through a phosphoramidon-sensitive pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14: 356-362, 1996.
  131. Lensmar, C., Nord, M., Gudmundsson, G.H., Roquet, A., Andersson, O., Jörnvall, H., Eklund, A., Grunewald, J., Agerberth, B.: Decreased pulmonary levels of the anti-inflammatory Clara cell 16 kDa protein after induction of airway inflammation in asthmatics. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 976-981, 2000.
  132. Mariassy, A.T., Plopper, C.G.: Tracheobronchial epithelium in sheep I. *Anat. Rec.* 205: 263-275, 1983.
  133. Mariassy, A.T., Plopper, C.G.: Tracheobronchial epithelium in sheep II. *Anat. Rec.* 209: 523-534, 1984.
  134. Massaro, G.D., Paris, M., Thet, L.A.: In vivo regulation of secretion of bronchiolar Clara cells in rats. *J. Clin. Invest.* 63: 167-172, 1979.
  135. Massaro, G.D., Fischman, C.M., Chiang, M.J., Amado, C., Massaro, D.: Regulation of secretion in Clara cells. Studies using the isolated perfused rat lung. *J. Clin. Invest.* 67: 345-351, 1981.
  136. Massaro, G.D., Amado, C., Clerch, L., Massaro, D.: Studies on the regulation of

- secretion in Clara cells with evidence for chemical nonautonomic mediation of the secretory response to increased ventilation in rat lungs. *J. Clin. Invest.* 70: 608-613, 1982.
137. Massaro, G.D., Davis, L.D.: Demonstration of  $\beta$ -adrenergic receptors in rat bronchiolar epithelial cells employing 9-amino-acridyl propranolol fluorescent microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 122-123, 1984.
  138. Massaro, G.D., Singh, G., Mason, R., Plopper, C.G., Malkinson, A.M., Gail, D.B.: Biology of the Clara cell. Conference report. *Am. J. Physiol.* 266: L101-L106, 1994.
  139. McDowell, E.M., Becci, P., Schürch, W., Trump, B.F.: The respiratory epithelium VII. *J. Natl. Cancer Inst.* 62: 995-1008, 1979.
  140. McDowell, E.M., Combs, J.W., Newkirk, C.: A quantitative light and electron microscopic study of hamster tracheal epithelium with special attention to so-called intermediate cells. *Exper. Lung Res.* 4: 205-226, 1983a.
  141. McDowell, E.M., Combs, J.W., Newkirk, C.: Changes in secretory cells of hamster tracheal epithelium in response to acute sublethal injury. *Exper. Lung Res.* 4: 227-243, 1983b.
  142. Menco, B.P.M.: Olfactory and nasal respiratory epithelial and foliate taste buds visualized with rapid freeze -substitution and lowicryl K11M embedding. *Scanning Microscopy* 3: 257-272, 1989.
  143. Neutra, M.R., Schaeffer, S.F.: Membrane interactions between adjacent mucous secretion granules. *J. Cell Biol.* 74: 983-991, 1977.
  144. Newman, T.M., Robichaud, A., Rogers, D.F.: Microanatomy of secretory granule release from guinea pig tracheal goblet cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 529-539, 1996.
  145. Nordin, U.: The trachea and cuff-induced tracheal injury. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 345: 7-70, 1977.
  146. Oshima, A., Kojima, T., Dejima, K., Hisa, Y., Kasai, H., Nemoto, T.: Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands. *Cell Calcium* 37: 349-357, 2005.
  147. Pack, K.J., Richardson, P.S.: The aminergic innervation of the human bronchus: a light and electron microscopic study. *J. Anat.* 138: 493-502, 1984.
  148. Pack, R.J., Al-Ugaily, L.H., Morris, G., Widicombe, J.G.: The distribution and structure of cells in the tracheal epithelium of the mouse. *Cell Tiss. Res.* 208: 65-84, 1980.
  149. Pack, R.J., Al-Ugaily, L.H., Morris, G.: The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse. *J. Anat.* 132: 71-84, 1981.
  150. Pavelka, M., Ronge, H.R., Stockinger, G.: Vergleichende Untersuchungen am Trachealepithel verschiedener Säuger. *Acta Anat.* 94: 262-282, 1976.
  151. Pavlovic, D., Viires, N., Zedda, C., Fournier, M., Aubier, M.: Effects of corticosteroids on epithelial structure and smooth muscle function of rat trachea. *Eur. Respir. J.* 11: 575-582, 1998.
  152. Peão, M.N.D., Águas, A.P., De Sá, C.M., Grande, N.R.: Anatomy of Clara cell secretion: surface changes observed by scanning electron microscopy. *J. Anat.* 183: 377-388, 1993.
  153. Pelaia, G., Cuda, G., Vatrella, A., Fratto, D., Grembiale, R.D., Tagliaferri, P., Maselli, R., Constanzo, F.S., Marsico, S.A.: Effects of transforming growth factor- $\beta$  and budesonide on mitogen-activated protein kinase activation and apoptosis in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:12-18, 2003.
  154. Pham, I., Uchida, T., Planes, C., Ware, L.B., Kaner, R., Matthay, M.A., Clerici,

- C.: Hypoxia upregulates VEGF expression in alveolar epithelial cells in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283: L1133-L1142, 2002.
155. Phillips, T.E., Wilson, J.: Morphometric analysis of mucous granule depletion and replenishment in rat colon. *Digest. Dis. Sci.* 38: 2299-2304, 1993.
  156. Phipps, R.J., Nadel, J.A., Davis, B.: Effect of alpha-adrenergic stimulation on mucus secretion and on ion transport in cat trachea in vitro. *Am. Rev. Respir. Dis.* 121, 359-365, 1980
  157. Plopper, C.G.: Comparative morphologic features of bronchiolar epithelial cells. The Clara cell. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128: S37-S41, 1983.
  158. Plopper, C.G., Hill, L.H., Mariassy, A.T.: Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: III. A study of man with comparison of 15 mammalian species. *Exp. Lung Res.* 1: 171-180, 1980a.
  159. Plopper, C.G., Mariassy, A.T., Hill, L.H.: Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: I. A comparison of rabbit, guinea pig, rat, hamster, and mouse. *Exp. Lung Res.* 1: 139-154, 1980b.
  160. Plopper, C.G., Mariassy, A.T., Hill, L.H.: Ultrastructure of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell of mammalian lung: II. A comparison of horse, steer, sheep, dog, and cat. *Exp. Lung Res.* 1: 155-169, 1980c.
  161. Plopper, C.G., Haselbo, J.E., Berger, W.J., Sonstegard, K. S., Nettesheim, P.: Distribution of nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cells in intra- and extrapulmonary airways of the rabbit. *Exp. Lung Res.* 4: 79-98, 1983a.
  162. Plopper, C.G., Alley, J.L., Serabjit-Singh, C.J., Philpot, R.M.: Cytodifferentiation of the nonciliated bronchiolar epithelial (Clara) cell during rabbit lung maturation: An ultrastructural and morphometric study. *Am. J. Anat.* 167: 329-357, 1983b.
  163. Plopper, C.G., St George, J.A., Nishio, S.J., Etchison, J.R., Nettesheim, P.: Carbohydrate cytochemistry of tracheobronchial airway epithelium of the rabbit. *J. Histochem. Cytochem.* 32: 209-218, 1984.
  164. Plopper, C.G., Craz, D.L., Kemp, L., Serabjit-Singh, C.J., Philpot, R.M.: Immunohistochemical demonstration of cytochrome P-450 monooxygenase in Clara cells throughout the tracheobronchial airways of the rabbit. *Exper. Lung Res.* 13: 59-68, 1987.
  165. Plopper, C.G., Macklin, J., Nishio, S.J., Hyde, D.M., Buckpitt, A.R.: Relationship of cytochrome P-450 activity to Clara cells cytotoxicity. III. Morphometric comparison of changes in the epithelial populations of terminal bronchioles and lobar bronchi in mice, hamsters, and rats after parenteral administration of naphthalene. *Lab. Invest.* 67: 553-565, 1992a.
  166. Plopper, C.G., Suverkropp, C., Morin, D., Nishio, S., Buckpitt, A.: Relationship of cytochrome P450 activity to Clara cell cytotoxicity. I. Histopathologic comparison of the respiratory tract of mice, rats and hamsters after parenteral administration of naphthalene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261: 353-363, 1992b.
  167. Plopper, C.G., Weir, A.J., Nishio, S.J., Chang, A., Voit, M., Philpot, R.M., Buckpitt, A.R.: Elevated susceptibility to 4-ipomeanol cytotoxicity in immature Clara cells of neonatal rabbits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 867-880, 1994a.
  168. Plopper, C.G., Chu, F., Haselton, C.J., Peake, J., Wu, J., Pinkerton, K.E.: Dose-dependent tolerance to ozone. I. Tracheobronchial epithelial reorganization in rats after 20 months' exposure. *Am. J. Pathol.* 144: 404-420, 1994b.
  169. Ramnarine, S.I., Rogers, D.F.: Non-adrenergic, non- cholinergic neural control of mucus secretion in airways. *Pulmonary Pharmacology* 7: 19-33, 1994.

170. Ramnarine, S.I., Haddad, E., Khawaja, A.M., Mak, J.C.W., Rogers, D.F.: On muscarinic control of neurogenic mucus secretion in ferret trachea. *J. Physiol.* 494: 577-586, 1996.
171. Ranga, V., Kleinerman, J.: A quantitative study of ciliary injury in the small airways of mice. *Exper. Lung Res.* 2: 49-55, 1981.
172. Réffy, A., Székely, O., Józsa, L.: Veränderungen der Granula in Pneumozyten vom Typ II entsprechend dem Sauerstoffgehalt des Luftraumes. *Z. Exper. Chirurg.* 10: 102-111, 1977.
173. Reid, K.B.M.: Functional roles of the lung surfactant proteins SP-A and SP-D in innate immunity. *Immunobiol.* 199: 200-207, 1998.
174. Reynolds, E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 203-212, 1963.
175. Rhodes, G.C., Kumar, R.K., Lykke, A.W.J., Tapsall, J.W.: Atypical differentiation of bronchiolar epithelial cells following experimental pneumonia. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 59: 343-347, 1990.
176. Ricci, A., Mariotta, A., Greco, S., Pallone, G., Papale, M., Bisetti, A.: Age-related changes of the noradrenergic innervation of rat tracheo-bronchial tree and pulmonary vasculature. *Mechanisms of Ageing and Development* 99: 245-255, 1997.
177. Robinson, N.P., Venning, L., Kyle, H., Widicombe, J.G.: Quantitation of the secretory cells of the ferret tracheobronchial tree. *J. Anat.* 145: 173-188, 1986.
178. Rodrigo, G.J.: Rapid effects of inhaled corticosteroids in acute asthma. *Chest* 130: 1301-1311, 2006.
179. Rogers, D.F., Dewar, A.: Neural control of airway mucus secretion. *Biomed. & Pharmacother.* 44: 447-453, 1990.
180. Roth, F.D., Quintar, A.A., Uribe Echevarría, E.M., Torres, A.I., Aoki, A., Maldonado, C.A.: Budesonide effects on Clara cells under normal and allergic inflammatory condition. *Histochem. Cell. Biol.* 127: 55-68, 2007.
181. Roumagnac, I., Laboisie, C.: A mucus-secreting human colonic epithelial cell line responsive to cholinergic stimulation. *Biol. Cell* 61: 65-68, 1987.
182. Sabater, J.R., Lee, T.A., Abraham, W.M.: Comparative effects of salmeterol, albuterol, and ipratropium on normal and impaired function in sheep. *Chest* 128: 3743-3749, 2005.
183. Salathe, M., Lipson, E.J., Ivonnet, P.I., Bookman, R.J.: Muscarinic signaling in ciliated epithelial cells: dual effect on  $Ca^{2+}$  and ciliary beating. *Am. J. Physiol.* 272: L301-L310, 1997.
184. Seifart, C., Clostermann, U., Seifart, U., Müller, B., Vogelmeier, C., von Wichert, P., Fehrenbach, H.: Cell-specific modulation of surfactant proteins by ambroxol treatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203: 27-35, 2005.
185. Serafini, S.M., Wanner, A., Michaelson, E.D.: Mucociliary transport in central and intermediate size airways: Effect of aminophyllin. *Bull. Europ. Physiopath. Resp.* 12: 415-422, 1976.
186. Shaul, P.W., North, A.J., Wu, L.C., Wells, L.B., Brannon, T.S., Lau, K.S., Michel, T., Margraf, L.R., Star, R.A.: Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J. Clin. Invest.* 94: 2231-2236, 1994.
187. Shorten, G.D., Dolovich, M., Eng, P., Lerman, J., Cutz, E.: Metered-dose inhaler salbutamol-induced tracheal epithelial lesions in intubated rabbits. *Chest* 108: 1668-1672, 1995.
188. Shorten, G.D., Dolovich, M., Kuang, A., Rhem, R., Gouda, B., Monkman, S.,



- Cutz, E., Lerman, J.: Safety and efficiency of metered dose inhaler delivery of salbutamol in the intubated rabbit. *Crit. Care Med.* 28: 1055-1058, 2000.
189. Singh, G., Singh, J., Katyal, S.L., Brown, W.E., Kramps, J.A., Paradis, I.L., Dauber, J.H., MacPherson, T.A., Squeglia, N.: Identification, cellular localization, isolation, and characterization of human Clara cell-specific 10 kD protein. *J. Histochem. Cytochem.* 36: 73-80, 1988a.
  190. Singh, G., Katyal, S.L., Brown, W.E., Phillips, S., Kennedy, A.L., Anthony, J., Squeglia, N.: Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10 kDa protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 950: 329-337, 1988b.
  191. Smiley-Jewell, S.M., Nishio, S.J., Weir, A.J., Plopper, C.G.: Neonatal Clara cell toxicity by 4-ipomeanol alters bronchiolar organization in adult rabbits. *Am. J. Physiol.* 274 (Lung Cell. Mol. Physiol. 18): L485-L498, 1998.
  192. Smith, M.N., Greengerg, S.D., Spjut, H.J.: The Clara cell: A comparative ultrastructural study in mammals. *Am. J. Anat.* 155: 15-30, 1979.
  193. Smith, P., Heath, D., Moosavi, H.: The Clara cell. *Thorax* 29: 147-163, 1974.
  194. Spahr-Schopfer, I.A., Lerman, J., Cutz, E., Newhouse, M.T., Dolovich, M.: Proximate delivery of a large experimental dose from salbutamol MDI induces epithelial airway lesions in intubated rabbits. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150: 790-794, 1994.
  195. Specian, R.D., Neutra, M.R.: Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J. Cell Biol.* 85: 626-640, 1980.
  196. Spicer, S.S., Parmley R.T., Boyd, L., Schulte, B.A.: Giant mitochondria distinct from enlarged mitochondria in secretory and ciliated cells of gerbil trachea and bronchioles. *Am. J. Anat.* 188: 269-281, 1990.
  197. Steel, D.M., Hanrahan, J.W.: Muscarinic-induced mucin secretion and intracellular signaling by hamster tracheal goblet cells. *Am. J. Physiol.* 272: L230-L237, 1997.
  198. Stinson, S.F., Loosli, C.G.: Ultrastructural evidence concerning the mode of secretion of electron-dense granules by Clara cells. *J. Anat.* 127: 291-298, 1978.
  199. Stratmann, U., Lehmann, R.R., Steinbach, T., Wessling, G.: Effect of sulphur dioxide inhalation on the respiratory tract of the rat. *Zbl. Hyg.* 192: 324-335, 1991.
  200. Sturgess, J.M.: The mucous lining of major bronchi in the rabbit lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115: 819-827, 1977.
  201. Su, X., Wang, L., Song, Y., Bai, C.: Inhibition of inflammatory responses by ambroxol, a mucolytic agent, in a murine model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Intensive Care Med.* 30: 133-140, 2004.
  202. Sulkowska, M.: Morphological studies of the lungs in chronic hypobaric hypoxia. *Pol. J. Pathol.* 48: 225-234, 1997.
  203. Sullivan, L.C., Orgeig, S.: Dexamethasone and epinephrine stimulate surfactant secretion in type II cells of embryonic chickens. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 281: R770-R777, 2001.
  204. Svartengren, K., Philipson, K., Svartengren, M., Camner, P.: Effect of adrenergic stimulation on clearance from small ciliated airways in healthy subjects. *Exp. Lung Res.* 24: 149-158, 1998.
  205. Takahashi, K., Mizuno, H., Ohno, H., Kai, H., Isohama, Y., Takahama, K., Nagaoka, S., Miyata, T.: Effects of SS320A, a new cysteine derivative, on the change in the number of goblet cells induced by isoproterenol in rat tracheal epithelium. *Jpn. J. Pharmacol.* 77: 71-77, 1998a.
  206. Takahashi, K., Mizuno, H., Ohno, H., Takeuchi, M., Nagaoka, S., Kai, H.,

- Miyata, T.: Effects of SS320A, a new cysteine derivative, on the change in the number of goblet cells induced by bacterial endotoxin in rat tracheal epithelium. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 5: 173-178, 1998b.
207. Tamaoki, J., Tagaya, E., Kawatani, K., Nakata, J., Endo, Y., Nagai, A.: Airway mucosal thickening and bronchial hyperresponsiveness induced by inhaled  $\beta_2$ -agonist in mice. *Chest* 126: 205-212, 2004.
  208. Taylor, R.H., Lerman, J., Chambers, C., Dolovich, M.: Dosing efficiency and particle-size characteristics of pressurized metered-dose inhaler aerosols in narrow catheters. *Chest* 103: 920-924, 1993.
  209. Ten Have-Opbroek, A.A.W., De Vries, E.C.P.: Clara cells differentiation in the mouse: Ultrastructural morphology and cytochemistry for surfactant protein A and Clara cell 10 kD protein. *Microsc. Res. Tech.* 26: 400-411, 1993.
  210. Tokuyama, K., Kuo, H., Rohde, J.A.L., Barnes, D.J., Rogers, D.F.: Neural control of goblet cell secretion in guinea pig airways. *Am. J. Physiol.* 259: L108-L115, 1990.
  211. Tomlinson, L.A., Carpenter, T.C., Baker, E.H., Bridges, J.B., Weil, J.V.: Hypoxia reduces airway epithelial sodium transport in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 277: L881-L886, 1999.
  212. Trevor, A.J., Miller, R.D.: Celková anestetika. In: Katzung, B.G. (Ed.): *Základní a klinická farmakologie*, H&H, Praha, 361-374, 1994.
  213. Tsagareli, Z.G., Gogiashvili, L.E., Sadunishvili, M.A.: Morphofunctional characteristics of Clara cells in hypoxia in rats from the data of scanning and transmission electron microscopy (v ruštině). *Biull. Eksp. Biol. Med.* 109: 363-365, 1988.
  214. Tyler, N.K., Plopper, C.G.: Morphology of distal conducting airways in rhesus monkey lungs. *Anat. Rec.* 211: 295-303, 1985.
  215. Uhlík, J., Tůma, S. Effect of intratracheal administration of iopamidol on the ultrastructure of the epithelium of terminal bronchioles in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* var. *edulis*). *Acta Vet. Brno* 67: 97-101, 1998.
  216. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Zocová, J.: Ultrastructure of the epithelium of terminal bronchioles in rabbits after the administration of acetylcholine. *Acta Vet. Brno* 68: 179-184, 1999.
  217. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Zocová, J.: Effects of epinephrine administration on epithelial ultrastructure of terminal bronchioles in rabbits. *Acta Vet. Brno* 69: 261-266, 2000.
  218. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Zocová, J.: The effect of a single oral administration of ambroxol on the ultrastructure of the epithelium of terminal bronchioles in rabbits. *Sborník lék.* 102: 227-231, 2001.
  219. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Adášková, J.: Ultrastructure of epithelium of terminal bronchioles in rabbits after inhalation of mineral water aerosol. *Acta Vet. Brno* 71: 283-288, 2002a.
  220. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Zocová, J.: Vliv intravenózní aplikace aminophyllinu na ultrastrukturu epitelu terminálních bronchiolů u králíků. *Stud. Pneumol. Phthiseol.* 62: 129-134, 2002b.
  221. Uhlík, J., Konrádová, V., Vajner, L., Adášková, J.: Normobaric hypoxia induces mild damage to epithelium of terminal bronchioles in rabbits (ultrastructural study). *Vet. Med. – Czech* 50: 432-438, 2005.
  222. Uhlík, J., Vajner, L., Adášková, J., Konrádová, V.: Effect of inhalation of single dose of beclomethasone on airway epithelium. *Ultrastr. Pathol.* 31, přijato do tisku, 2007.

223. Usmani, O.S., Biddiscombe, M.F., Barnes, P.J.: Regional lung deposition and bronchodilator response as a function of  $\beta_2$ -agonist particle size. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172: 1497-1504, 2005.
224. Van Miert, E., Dumont, X., Bernard, A.: CC16 as a marker of lung epithelial hyperpermeability in an acute model of rats exposed to mainstream cigarette smoke. *Toxicol. Lett.* 159: 115-123, 2005.
225. Van Scott, M.R., Penland, C.M., Welch, C.A., Lazarowski, E.:  $\beta$ -adrenergic regulation of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  secretion by Clara cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 344-351, 1995.
226. Van Winkle, L.S., Buckpitt, A.R., Nishio, S.J., Isaac, J.M., Plopper, C.G.: Cellular response in naphthalene-induced Clara cell injury and bronchiolar epithelial repair in mice. *Am. J. Physiol.* 269: L800-L818, 1995.
227. Vaporidi, K., Tsatsanis, C., Georgopoulos, D., Tsihchlis, P.N.: Effects of hypoxia and hypercapnia on surfactant protein expression, proliferation and apoptosis in A549 alveolar epithelial cells. *Life Sci.* 78: 284-293, 2005.
228. Wagner, U., Bredenbröcker, D., Fehrmann, H.C., Schwarz, F., Schudt, C., Von Wichert, P.: Effects of selective and non-selective phosphodiesterase inhibitors on tracheal mucus secretion in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 298: 265-270, 1996.
229. Walker, S.R., Hale, S., Malkinson, A.M., Mason, R.J.: Properties of isolated nonciliated bronchiolar cells from mouse lung. *Exp. Lung Res.* 15: 553-573, 1989.
230. Wanner, A., Salathé, M., O'Riordan, T.G.: Mucociliary clearance in the airways. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154: 1868-1902, 1996.
231. Weaver, T.E., Whitsett, J.A.: Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins. *Biochem. J.* 273, 249-264, 1991.
232. Weber, K., Brück, P., Mikes, Z., Küpper, J.H., Klingenspor, M., Wiesner, R.J.: Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology* 143: 177-184, 2002.
233. Wen, L., Madani, K., Fahrni, J.A., Duncan, S.R., Rosen, G.D.: Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN- $\gamma$  and Fas. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 273: L921-L929, 1997.
234. West, J.A.A., Pakenham, G., Morin, D., Fleschner, C.A., Buckpitt, A.R., Plopper, C.G.: Inhaled naphthalene causes dose dependent Clara cell cytotoxicity in mice but not in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 173: 114-119, 2001.
235. West, J.A.A., Van Winkle, L.S., Morin, D., Fleschner, C.A., Forman, H.J., Plopper, C.G.: Repeated inhalation exposures to the bioactivated cytotoxicant naphthalene (NA) produce airway-specific Clara cell tolerance in mice. *Toxicol. Sci.* 75: 161-168, 2003.
236. White, S.R., Dorscheid D.R.: Corticosteroid-induced apoptosis of airway epithelium. *Chest* 122: S278-S284, 2002.
237. Wilsman, N.J., Morrison, W.B., Farnum, C.E., Fox, L.E.: Microtubular protofilaments and subunits of the outer dynein arm in cilia from dogs with primary ciliary dyskinesia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 137-143, 1987.
238. Wilson, D.W., Plopper, C.G., Hyde, D.M.: The tracheobronchial epithelium of the bonnet monkey. *Am. J. Anat.* 171: 25-40, 1984.
239. Woods, B.A., Ng, W., Thakorlal, D., Liu, A.L., Perks, A.M.: Effects of acetylcholine on lung liquid production by in vitro lungs from fetal guinea pigs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 918-927, 1996.
240. Xu, P., Hashimoto, S., Miyazaki, H., Asabe, K., Shiraishi, S., Sueishi, K.: Morphometric analysis of the immunohistochemical expression of Clara cell

- 10-kDa protein and surfactant apoproteins A and B in the developing bronchi and bronchioles of human fetuses and neonates. *Virchows Arch.* 432: 17-25, 1998.
241. Xue, C., Rengasamy, A., Le Cras, T.D., Koberna, P.A., Dailey, G.C., Johns, R.A.: Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 267: L667-L678, 1994.
242. Yoneda, K.: Mucous blanket of rat bronchus. *Am. Rev. Respir. Dis.* 14: 837-842, 1976.
243. Yoneda, K.: Pilocarpine stimulation of the bronchiolar Clara cell secretion. *Lab. Invest.* 37: 447-452, 1977.
244. Zagoory, O., Braiman, A., Fheber, L., Priel, Z.: Role of calcium and calmodulin in ciliary stimulation induced by acetylcholine. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C100-C109, 2001.
245. Zaviačič, M., Danihel, L., Růžicková, M., Blažeková, J., Itoh, Y., Okutani, R., Kawai, T.: Immunohistochemical localization of human protein 1 in the female prostate (Skene's gland) and the male prostate. *Histochem. J.* 29: 219-227, 1997.