

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**Model alergického astmatu a hodnocení
parametrů respiračních funkcí**

(Diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Suchánková, Ph.D.

Hradec Králové, 2006

Hana RADOVÁ

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Janě Suchánkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracování této diplomové práce, dále PharmDr. Marii Vopršalové, CSc., Mgr. Martině Kottové a Jitce Michlové za laskavou pomoc a spolupráci a všem ostatním, kteří mi byli jakkoliv nápomocni.

OBSAH

I.	ÚVOD.....	6
II.	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
	1. Asthma bronchiale.....	10
	1.1 Patofyziologie.....	11
	1.2 Buňky uplatňující se na chronickém alergickém zánětu.....	13
	1.3 Mediátory chronického alergického zánětu.....	20
	2. Přehled současné antiastmatické léčby.....	27
	3. Hodnocení funkcí respiračního systému.....	30
	3.1 Plicní rezistence.....	30
	4. Experimentální práce.....	33
	4.1 Etické zásady práce se zvířaty.....	34
	4.2 Laboratorní zvířata.....	36
III.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	44
	1. Použitý materiál.....	45
	2. Metodika.....	47
IV.	VÝSLEDKY.....	52
	1. Sledování hmotnosti zvířat.....	53
	2. Sledování bronchiální reaktivity.....	53
V.	DISKUZE.....	65
VI.	ZÁVĚR.....	70
VII.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AP-1	aktivační protein-1
APC	antigen prezentující buňka
Ach	acetylcholin
BAL	bronchoalveolární laváž
C3a	složka aktivovaného komplementu C3a
C5a	složka aktivovaného komplementu C5a
CD znaky	cluster of differentiation – označení lymfocytárních antigenů
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CysLT ₁	receptor pro leukotrieny
ECP	eozinofilní kationický protein
EGF	epidermální růstový faktor
EPO	eozinofilní peroxidáza
EPX/EDN	eozinofily produkovaný neurotoxin
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
FEV ₁	jednosekundová vitální kapacita plic
FGF	fibroblastový růstový faktor
G-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů
GINA	Global Initiative for Asthma
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
15-HETE	15-hydroxytetraenoická kyselina
His	histamin
hsp	heat shock protein (číslo označuje molekulovou hmotnost)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
ICAM	intercelulární AM
IFN γ	interferon γ
IgE	imunoglobulin E
IL	interleukiny
IUPS	International Union of Physiological Sciences
LT	leukotrieny
MadCAM	selektin
MBP	hlavní bazický protein

MCP	monocytární chemotaktické proteiny patřící mezi CC chemokiny
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP-9	proteáza neutrofilů
MPO	myeloperoxidáza
NFκB	nukleární faktor kappa B
NK	přirození zabíječi (natural killers)
NS	nesenzibilizovaná zvířata
OA	ovalbumin
PaCO ₂	parciální tlak CO ₂
PAF	destičky aktivující faktor (platelet activating factor)
PDGF	destičkový růstový faktor
PEF	peak expiratory flow
PG	prostaglandiny
RANTES	Regulated on Activation, T-lymphocyte Expressed and Secreted
S	senzibilizovaná zvířata
SCF	růstový faktor kmenových buněk (stem cell factor)
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF	transformující růstový faktor
Th	pomocné T-lymfocyty
TNF	tumor nekrotizující faktor
TX	tromboxany
VCAM-1	integrin
VLA	very late (activation) antigen

I. ÚVOD

Respirační onemocnění představují v dnešní době velké nebezpečí pro celou populaci. Významným onemocněním dýchacího systému je asthma bronchiale. Toto onemocnění přitahovalo i v minulosti velkou pozornost a zůstává stále zásadním klinickým problémem v průmyslových zemích. To je také hlavním důvodem k rozvoji výzkumu právě v této oblasti. Epidemiologické studie porovnávající srovnatelnou metodikou výskyt astmatu mezi 70. a 80. léty ukázaly až dvojnásobný vzestup prevalence astmatu ve srovnatelných populačních vzorcích. (8)

Celosvětový počet astmatiků je odhadován na 150 milionů a jejich výskyt stále stoupá. Tento trend je patrný i v České republice. Celková prevalence astmatu v ČR se odhaduje na více než 5 %. V dětské populaci již prevalence přesáhla 10 %. Úmrtnost na astma je v ČR tradičně velmi nízká a v posledních 10 letech kolísá kolem 1/100 000 obyvatel. Problémem však zůstává pozdní diagnostika a nedostatečná léčba asthma bronchiale. Odhaduje se, že v ČR je stále nepoznáno asi 250 000 astmatiků. Neléčené astma vede později k ireverzibilním funkčním změnám zhoršujícím výkonnost pacienta. Zvýšené riziko vzniku astmatu je nejvíce v rodinách, kde se vyskytují alergická onemocnění, především alergická rýma. (8)

Pokrok ve farmacii a v medicíně je do značné míry závislý na experimentech prováděných na zvířatech. Experimenty *in vivo* zde mají stále nezastupitelnou roli, neboť ve srovnání s pokusy *in vitro* nebo pokusy na izolovaných orgánech poskytují možnost zapojení komplexu reakcí a fyziologických regulací v rámci celého organismu. Zvláště patrný je jejich význam při ověřování účinku potenciálních léků. Základním předpokladem pro ověření zkoumané hypotézy jsou vhodně zvolený model a uspořádání pokusu, zajištění definovaných podmínek (včetně zvířat ze standardního chovu), výběr řádně propracované metodiky, standardní provádění pokusu, včetně použití negativní a/nebo pozitivní kontroly a správné vyhodnocení a interpretace výsledků. K experimentálním účelům se užívá mnoho živočišných druhů, zejména však myši, potkanů, morčat, králíků, opic, psů, ovcí atd. (10) Problém představuje značná ekonomická náročnost těchto experimentů a také etické hledisko práce se zvířaty. Výzkumný pracovník musí vždy hledět na zvíře jako na živého tvora a řídit se základními etickými pravidly pro práci se zvířaty, především koncepcí 3R. Všechny pokusy na zvířatech prováděné na Farmaceutické fakultě probíhají až po schválení etickou komisí. (23)

Cílem mojí diplomové práce byla optimalizace modelu alergického astmatu.

1. Porovnávali jsme tři druhy zvířat – potkany Wistar, potkany Brown Norway a morčata.
2. U morčat jsme hledali vhodnou bronchokonstrikční látku, která by po kumulativním i.v. podání umožnila stanovit plicní rezistenci a tím určit reaktivitu plic na bronchokonstrikční podnět.
3. Navození zkoumaného modelu jsme u každého druhu ověřovali srovnáním s kontrolní skupinou nealergických zvířat.

II. TEORETICKÁ ČÁST

1. Asthma bronchiale

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky (zejména mastocyty, eozinofily a T-lymfocyty) a buněčné částice. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně nebo vlivem léčby (definice dle GINA = Global Initiative for Asthma).

Více než polovina onemocnění astmatem je spojena s atopií jedince, která je geneticky determinována. Počet atopiků v naší populaci se odhaduje přibližně na 1/3. (17) Genetická predispozice v kombinaci s nepříznivými faktory (induktory) ze zevního prostředí se uplatňuje již od 22. týdne nitroděložního života. Fenotypickým znakem je chronický eozinofilní zánět v dýchacích cestách s poškozením epitelu a rozvojem časných strukturálních změn a s patofyziologickými projevy bronchiální hyperreaktivitu, na které má svůj podíl i dysfunkce hladkých svalů průdušek. Kontakt se specifickými (např. alergenem) i nespecifickými (např. tělesná námaha, cigaretový kouř, smog) spouštěči vede k akutním příznakům astmatu (tzv. časná fáze) s projevy bronchokonstrikce, edému, zvýšené mukózní sekrece, kašle a k amplifikaci zánětu. Výsledkem pozdě diagnostikovaného a pozdě léčeného zánětu je strukturální přestavba dýchacích cest s proliferací buněk, zbytněním extracelulární matrix a zmnožením a změnou funkce hladkého svalu (tzv. pozdní fáze). Strukturální změny způsobí zafixování původně reverzibilní obstrukce. Zánětlivé změny jsou v dýchacích cestách přítomny trvale a je možno je prokázat i v době, kdy je nemoc asymptomatická. Klinickými projevy astmatu jsou příznaky a exacerbace (astmatické záchvaty). Lehké exacerbace jsou zvládnutelné samotnými nemocnými, těžké exacerbace vyžadují urgentní vyhledání zdravotnické pomoci, často podání systémových kortikosteroidů a případně hospitalizaci. Jako časté jsou označeny exacerbace vyskytující se více než 2×ročně po 3 po sobě jdoucích letech. (8)

Klasifikace astmatu prošla v minulých letech mnohými změnami. Mnoho autorů stále rozděluje astma na „extrinsic“ (alergické) a „intrinsic“ (nealergické), v závislosti na tom, zda zánět a hyperreaktivita dýchacích cest jsou zprostředkovány imunoglobulinem E (IgE). Podle závažnosti klinických symptomů, doby výskytu příznaků a jejich frekvence lze asthma bronchiale rozdělit na intermitentní a perzistující a dále podle stupně závažnosti na lehké, středně těžké a těžké. (15)

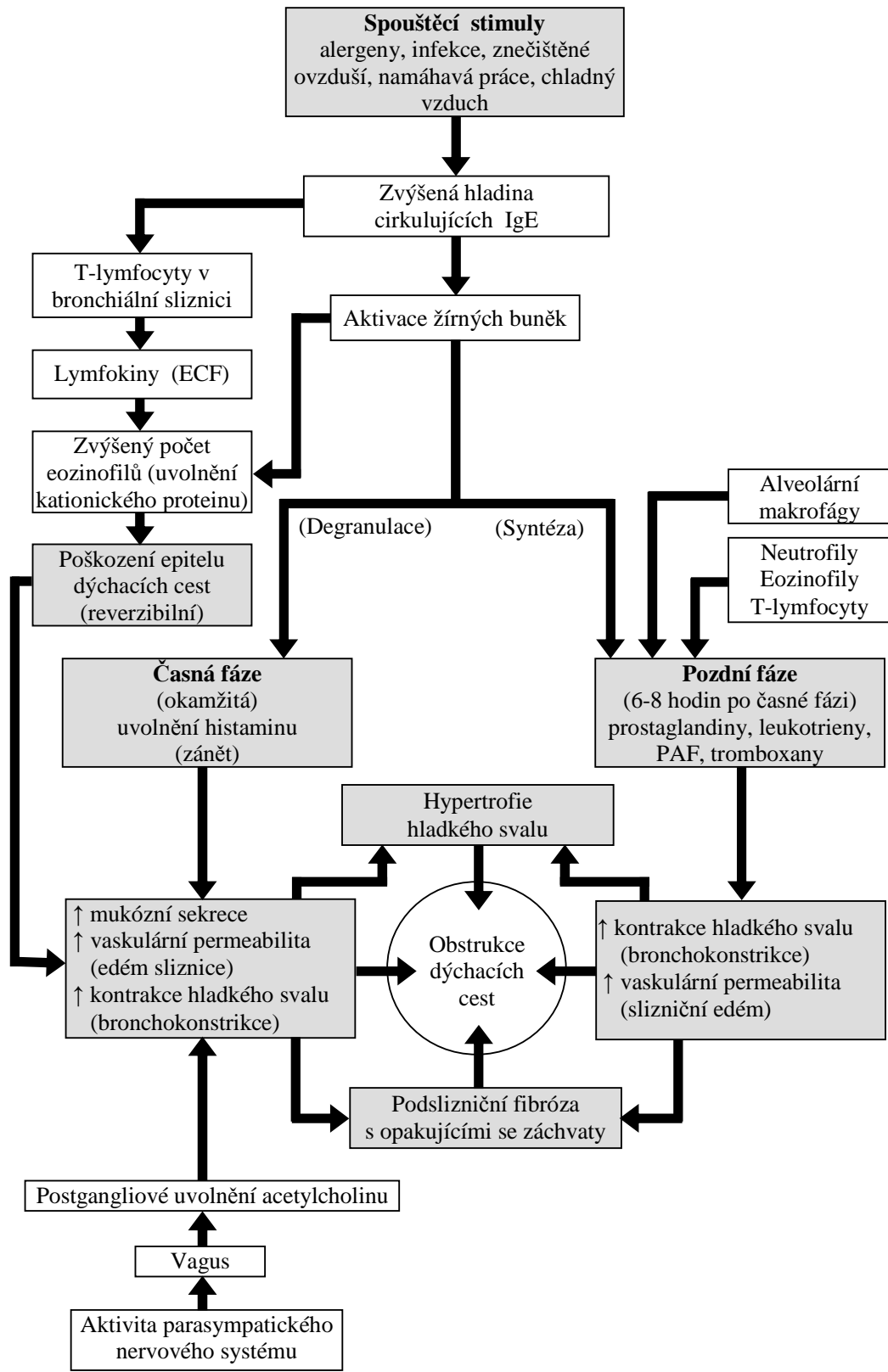
1.1 Patofyziologie

Jak již bylo řečeno, zánět, který má za následek hyperreaktivitu dýchacích cest, je hlavním patologickým rysem astmatu. Nejdůležitější ze zánětlivých mediátorů, které se uvolňují během astmatického záchvatu, jsou histamin, prostaglandiny a leukotrieny. Navíc chemotaktické faktory jsou tvořeny také během bronchiální infiltrace (zaplavování) neutrofily, eozinofily a lymfocyty. Výsledný zánětlivý proces vyúsťuje ve spasmus hladkých bronchiálních svalů, překrvení, zvýšenou vaskulární permeabilitu, edém, zbytnělou sliznici, narušenou mukociliární funkci, ztlušťování stěny dýchacích cest a zvýšenou kontraktilitu hladkých bronchiálních svalů. Tyto změny, v kombinaci s poškozením epitelálních buněk způsobeným infiltrací eozinofilů, vyvolávají hyperreaktivitu dýchacích cest, jejich obstrukci a ve výsledku mohou vést k ireverzibilnímu poškození dýchacích cest. (15)

Výsledná obstrukce dýchacích cest zvyšuje rezistenci k proudu vzduchu a snižuje proudění vzduchu (flow rates), v první řadě proud vydechovaného vzduchu (expiratory flow). Narušený výdech způsobuje hyperinflaci distálně od obstrukce a zvyšuje dechovou práci. Z důvodů oblastních rozdílů v rezistenci dýchacích cest je distribuce vdechovaného vzduchu nerovnoměrná a větší část vdechovaného vzduchu proudí do částí s menším odporem. (15)

Hyperventilace může být zprostředkována receptory jako odpověď na zvýšený objem plic v důsledku obstrukce a následného hromadění vzduchu v plicích. Intrapleurální a alveolární plyn způsobuje tlak a sníženou perfúzi alveolů. Zvýšený alveolární tlak, snížená ventilace a snížená perfúze vedou k variabilnímu a nerovnoměrnému vztahu ventilace – perfúze v různých částech plic. Výsledkem je hypoxémie bez retence CO_2 (hyperkapnie). Hypoxémie dále zvyšuje hyperventilaci stimulací dýchacího centra, takže se snižuje PaCO_2 a zvyšuje se pH (respirační alkalóza). Jakmile se zhorší obstrukce, zvýší se počet nedostatečně ventilovaných a prokrvených alveolů, vzroste retence CO_2 a rozvine se respirační acidóza. (15)

Nejjednodušší způsob zjištění bronchiální hyperreakivity je měření PEF (peak expiratory flow), jehož hodnoty u pacientů v různé míře (podle stupně postižení) kolísají i v době mezi záchvaty. Dokonalejší je zjištění hodnot FEV_1 (tj. objemu usilovně vydechnutého vzduchu během první sekundy po předchozí maximální inspiraci) bronchomotorickými testy. (17)



Obr. č. 1 Schéma patofyziologie asthma bronchiale. Převzato z Huether, McCance, 2000.

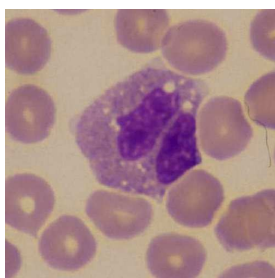
1.2 Buňky uplatňující se na chronickém alergickém zánětu

Na patogenezi asthma bronchiale se podílí řada buněk. Těmi nejdůležitějšími z nich jsou:

1. Eozinofilní granulocyty
2. Mastocyty
3. T-lymfocyty
4. Neutrofilní granulocyty
5. Bazofilní granulocyty

1. EOZINOFILNÍ GRANULOCYTY

Eozinofily patří mezi leukocyty obsahující červená hrubá granula a dvojlaločné jádro. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 12-17 μm a v kostní dřeni jsou zastoupeny 3,0-3,5 %. Cirkulující eozinofily, kterých je okolo 1-2 % ze všech cirkulujících leukocytů, představují jen nepatrný podíl z jejich celkového množství v organismu. Eozinofily obsahují primární cytoplazmatická granula, která jsou kulatá. Typickým znakem, kterým se eozinofily odlišují od ostatních buněk, jsou jejich specifická neboli sekundární cytoplazmatická granula. Fagocytární aktivita eozinofilů je poměrně slabá. Hlavní roli hrají při alergických a parazitárních onemocněních, při nichž se jejich počet zvyšuje. Hromadí se v místech pronikání alergenů a parazitů do těla (plíce, trávicí ústrojí) a fagocytují komplexy alergen-protilátka. (13)



Obr. č. 2 Eozinofil. Obrázek byl pořízen na katedře farmakologie, Lékařská fakulta, Univerzita Valencie

Většina z celkového počtu eozinofilů v organismu se nachází v tkáních, a to i tehdy, když jejich počet v periferní krvi není vysoký. Bylo zjištěno, že nejčastějším místem, kde se nacházejí lidské eozinofily, jsou cylindrické povrchové epitely, které jsou

vystaveny negativním vlivům životního prostředí. U hlodavců byly eozinofily nalezeny také v děloze během březosti nebo v období léčby estrogenem, a také v kůži. (16)

Eozinofily jsou potentní efektorové buňky zánětu uvolňující mediátory a cytotoxické granulární proteiny. Syntetizovanými mediátory jsou lipidy (PAF), ikosanoidy (LTC₄, LTD₄, LTE₄), peptidy a cytokiny (TGF α , TGF β , IL-1, IL-3, GM-CSF). Granula eozinofilů se dělí na dvě populace:

1. peroxidáza-pozitivní granula
2. granula charakterizovaná obsahem krystaloidů, tvořené jedním ze čtyř eozinofilních proteinů – ECP, EPO, EPX/EDN, MBP.

Krystaloidní jádro granul obsahuje hlavní bazický protein a v matrix se nacházejí ribonukleázy – ECP a EPO a EPX/EDN, které se uvolňují degranulací. Přehled základních eozinofilních mediátorů uvádí tab. č. 1. (16)

Granulární mediátory	
• bazické proteiny	MBP, ECP, EDN, EPO
• enzymy	arylsulfatáza, histamináza, fosfolipáza, nespecifické esterázy, hexosaminidáza
• cytokiny	IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, TGF α , TGF β , TNF α
• chemokiny	MIP- α , RANTES, eotaxin
Mediátory vytvořené v buněčné stěně	LTC ₄ , PAF, 15-HETE, PGE ₁ , PGF ₂ , TXB ₂

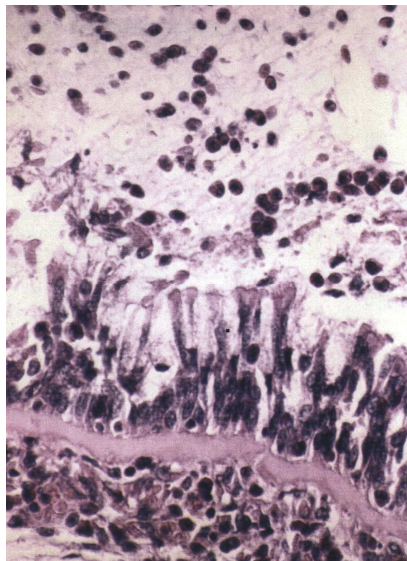
Tabulka č. 1 Přehled základních eozinofilních mediátorů. Převzato z Kopřiva, 2003.

Eozinofilii a akumulaci eozinofilů ve tkáních vyvolávají závažné choroby – alergické nemoci, parazitární infekce a nádorová onemocnění. Zánět dýchacích cest u asthma bronchiale je charakterizován přetrvávající perzistující akumulací eozinofilů, které jsou aktivovány a podílejí se na rozvoji chronického alergického zánětu. (7) Hlavní úlohu hrají v rozvoji pozdní alergické odpovědi. Existuje těsná asociace mezi eozinofilii a klinickým obrazem onemocnění, což dále koreluje s aktivací T-lymfocytů a produkcí specifických cytokinů. Eozinofilie v periferní krvi v časném dětství je často spojena s rozvojem atopické choroby. Z výše uvedeného se zdá, že eozinofilie u asthma bronchiale je výsledkem narušeného normálního poločasu života eozinofilů prostřednictvím exprese mechanismů blokujících programovanou buněčnou smrt – tedy apoptózu. Vlastní funkce eozinofilů jsou regulovány cytokiny: GM-CSF, IL-3, IL-5 a IFN γ , které prodlužují přežívání eozinofilů, neboť potlačují proces apoptózy. Zvýšení

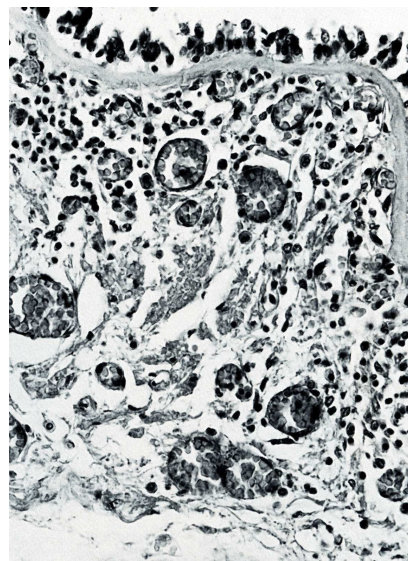
aktivity apoptózy eozinofilů je ve shodě se zlepšením klinického stavu a odezněním eozinofilního zánětu. Proapoptotickou aktivitu u eozinofilů vykazují TNF α , IL-1 β , TGF β i lipopolysacharid, naopak antiapoptotickou aktivitu mají např. povrchové molekuly hsp 27, hsp 70 (heat shock protein) a CD 40. (16)

Svou aktivitou se eozinofily podílejí i na remodelingu tkání, což vede až k ireverzibilním změnám. Eozinofily, stejně jako jiné typy leukocytů tvořené v kostní dřeni z myeloidních prekurzorů, nejsou přítomny v nadbytku v klidovém stavu v periférii. Jak místní tkáňové signály, tak i systémové prozánětlivé signály při zánětlivé odpovědi, jsou schopny vyvolat vyplavení eozinofilů z kostní dřene a eozinofilii v periferní krvi, a následně i eozinofilii v dolních dýchacích cestách, což je charakteristickým rysem asthma bronchiale. Mezi solubilními signály má mimořádnou úlohu v rozvoji eozinofilie v dolních dýchacích cestách IL-5, což je eozinopoetický růstový faktor vyvolávající diferenciaci a zrání eozinofilů. Je i eozinofilním chemotaktickým faktorem a prodlužuje přežívání eozinofilů. (16)

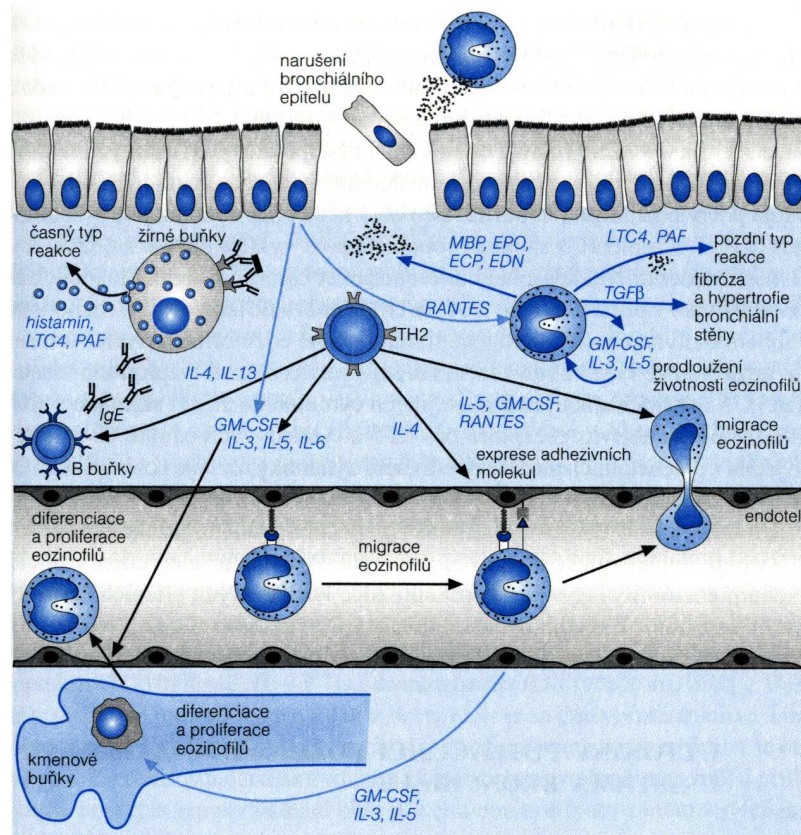
Eozinofily nejsou jen efektorové buňky alergického zánětu, ale chovají se i jako APCs (antigen prezentující buňky) a ovlivňují alergickou odpověď jako Th2. Zvyšují tvorbu Th2 cytokinů a ovlivňují reaktivitu imunitního systému k alergické reakci. (16)



Obr. č. 3 Sliznice bronchu s výraznou hlenovou pohárkově buněčnou metaplazií. Převzato z Kopřiva, 2003.



Obr. č. 4 Velmi těžké astma; pod bazální membránou jsou vidět překrvené cévy a buňky zánětu. Převzato z Hasleton, 1996.



Obr. č. 5 Postavení eozinofilů v patogenezi asthma bronchiale. Převzato z Kopřiva, 2003.

2. MASTOCYTY

Žírné buňky – mastocyty – jsou tkáňové buňky nacházející se na rozhraní těla a vnějšího prostředí, s význačnou rolí v zánětu zprostředkovaném imunoglobulinem E. Jde o heterogenní populaci buněk lišících se navzájem svým tvarem a velikostí (průměr 10-30 μm) a obsahujících v cytoplasmě elektronově denzní granula.

Žírné buňky pocházejí z kmenových buněk kostní dřeně a jejich hlavním růstovým a diferenačním faktorem je faktor kmenových buněk (SCF = stem cell factor). (16)

Mastocyty jsou jedny z prvních buněk aktivovaných při zánětu. Jejich základní funkcí je obrana proti parazitárním infekcím a mají významnou roli v regulaci imunitní odpovědi. Byly prokázány v místech probíhajícího alergického zánětu – kůži, plicích atd., kde jsou zodpovědné za časný typ přecitlivělosti a jsou hlavními efektorovými buňkami alergických chorob. Zralé aktivované mastocyty uvolňují preformované a nově tvořené mediátory časně fáze (histamin, LTC_4 , PGD_2) a svou tvorbou PAF, cytokinů

(IL-3 až IL-6, IL-13, TNF α , enzymů atd.) se podílejí i na rozvoji chronického alergického zánětu. (16)

Navázaným alergenem se spouští mechanismus degranulace. Tato reakce může být spuštěna specifickými alergeny, ale i anti-IgE protilátkami. Kromě těchto imunitních mechanismů mohou degranulaci vyvolat i fyzikální faktory (vysoká teplota, ionizující záření), chemické látky (toxiny, jedy, proteázy) a endogenní mediátory (tkáňové proteinázy, neutrofilní a eozinofilní kationtové proteiny). (16)

Mezi nejdůležitější mediátory uvolňované z granul žírných buněk patří: histamin, heparin, ATP, destičky aktivující faktor, leukotrieny a prostaglandiny, které vyvolávají prostup tekutiny a humorálních složek plazmy do místa zánětu a jsou chemotaktickými faktory pro další buňky zánětu (neutrofilny, eozinofily). Kromě toho, žírné buňky tvoří také mnoho cytokinů (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IL-9, IL-10, IL-13, chemokiny MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1), čímž působí také více prozánětlivě a předurčuje je to k významné roli v rozvoji zánětu. (16)

3. T-LYMFOCYTY

Z kmenových pluripotentních buněk pro lymfopoezu se během embryonálního vývoje oddělují progenitorové buňky linie T a B. Na základě genetické informace a podnětů z vnějšího prostředí se naivní T-lymfocyty (Th0) diferencují na fenotypické populace Th1, Th2 a Th3 podílející se na specifické imunitní odpovědi. (16)

Pro vznik Th1 lymfocytů je nezbytný styk s infikovanými nebo jinak aktivovanými makrofágy a dendritickými buňkami, které tvoří také IL-12, jenž je významným diferenciačním faktorem pro Th1 lymfocyty. Th1 lymfocyty tvoří IFN γ a TNF β , které aktivují makrofágy a podílejí se na rozvoji pozdního typu přecitlivělosti. Th1 lymfocyty neaktivují však pouze makrofágy, ale vyvolávají též tvorbu protilátek opsonizačních, komplement – fixačních a protilátek podílejících se na protilátkově závislé buněčné cytotoxicitě. (16)

Základní funkcí Th2 lymfocytů je spolupráce s B-lymfocyty, které byly předem stimulovány antigenem. Zralé Th2 lymfocyty dodávají B-lymfocytům potřebné signály prostřednictvím secernovaných i membránově vázaných cytokinů. Th2 lymfocyty tvoří cytokiny interleukinů IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 a IL-13 podílejících se rozhodujícím způsobem na rozvoji mechanismu alergické reakce. (16)

Velmi důležité je regulační působení mnoha cytokinů produkovaných Th lymfocyty: IFN γ působí stimulačně na Th1 buňky, ale inhibičně na Th2 buňky. Naopak cytokiny

IL-4, IL-10 a IL-13 produkované Th2 lymfocyty působí stimulačně na Th2 a inhibičně na Th1 lymfocyty a potlačují různé aktivity makrofágů. (16)

Asthma bronchiale je charakterizováno chronickým zánětem a hyperreaktivitou dýchacích cest vyvolávanými alergen-specifickými Th2 lymfocyty. Th1 jsou jejich funkčními antagonisty, a proto tedy Th1 odpověď může zabránit rozvoji atopie i asthma bronchiale. Th2 lymfocyty uvolňují IL-4 a IL-5, které mají roli v regulaci tvorby IgE a růstu, diferenciaci a přestupu mastocytů, bazofilů a eozinofilů z krevního řečiště. IFN γ tvořený Th1 lymfocyty potlačuje proliferaci a diferenciaci Th2 lymfocytů i tvorbu IgE. Imunoterapie alergických nemocí a asthma bronchiale snižuje tvorbu IL-4 alergen-specifickými Th2 lymfocyty a zvyšuje tvorbu IFN γ alergen-specifickými Th1 lymfocyty. V současnosti předpokládáme, že aktivita Th1/Th2 lymfocytů v patogenezi chronického zánětu u asthma bronchiale je komplexem aktivit obou populací Th lymfocytů. (16)

Oba systémy Th1 a Th2 jsou v dynamické rovnováze a zablokování tvorby cytokinů jedné subpopulace nebo nekontrolovaná stimulace druhé subpopulace může vést k rozvoji imunopatologického mechanismu (alergické reakce, zánětu nebo autoimunity). (16)

4. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Neutrofilní granulocyty jsou převažujícím druhem cirkulujících leukocytů. Jsou odpovědné především za obranu těla proti pronikajícím mikroorganismům a hlavní měrou se podílejí na rozvoji akutního zánětu.

Vznikají z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni. Jejich proliferaci a diferenciaci stimulují G-CSF, GM-CSF a IL-3. (16)

Jádro neutrofilu bývá členěno na 2-5 segmentů a v jejich cytoplasmě se nacházejí drobná granula, která se zbarvují růžově.

Na epiteliálních površích zdravých tkání, jež jsou v kontaktu s vnějším prostředím, jsou přítomny minimálně a jejich počet se zvyšuje po zahájení zánětlivého procesu. Mezi buněčné zdroje neutrofilních chemotaktických faktorů patří bakterie, makrofágy, lymfocyty, trombocyty a žírné buňky. (16)

Při úmrtí neutrofilu nebo vylití obsahu cytoplasmatického granula do extracelulárního prostoru, se může obsah cytoplasmatických granul uvolnit mimo buňku. Tato extracelulární degranulace může významně ovlivnit průběh zánětu, neboť uvolněné neutrofilní neutrální a kyselé proteázy mohou společně aktivovat komplement,

podílet se na tvorbě kininů, zvyšovat propustnost cév a štěpit elastin, kolagen a další proteiny. Takto se mohou neutrofilové uplatňovat negativně v průběhu zánětu – poškozením vlastní tkáně. (16)

Neutrofilové jsou prvním typem buněk, které vcestovávají do plic po reakci s alergenem, ale tento influx je časově omezený jen na časovou odpověď. Na druhé straně i nealergické podněty vyvolávající asthma bronchiale, např. ozon a oxidy dusíku podněcují přestup neutrofilů do dýchacích cest. (16)

Zvýšené počty neutrofilů byly v BAL prokázány i během dušnosti bez známek infekce. Zdá se, že neutrofilie zjištěná u těchto pacientů je odrazem probíhajícího smíšeného zánětu, který by mohl být výrazem geneticky podmíněné predispozice. (16)

Neutrofilové tvoří velké množství mediátorů – metabolity kyseliny arachidonové (LTB₄, PAF, TXA₂ a LTA₄), cytokiny (IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, TGFβ), proteázy (elastázu, kolagenázu, MMP-9), mikrobicidní látky (laktoferin, MPO, lyzozym) a kyslíkové radikály (superoxid, H₂O₂, OH a NO). (16)

5. BAZOFILNÍ GRANULOCYTY

V 90. letech 20. století byla potvrzena efektorová funkce bazofilů v patogenezi zánětu. Tyto buňky obsahují velká množství mediátorů zánětu (např. histaminu, leukotrienu C₄, PAF) a jsou významným zdrojem zánětlivých cytokinů (IL-4, IL-13, MIP-1α, IL-8). (16)

Bazofily jsou cirkulující granulocyty s mnohými funkčními vlastnostmi tkáňových žírných buněk, v tkáních se však běžně nevyskytují. Jejich cytoplasmatická granula obsahují histamin. U asthma bronchiale byly prokázány v bronchiální sliznici. Při exacerbaci astmatu se zvyšuje počet zralých cirkulujících bazofilů i jejich progenitorů ve sputu a krvi. Jsou známy dva typy degranulace bazofilů:

- Anafylaktická degranulace, která je mediována imunoglobulinem E, je masivní, překotná, uvolnění všech granul probíhá současně a svého vrcholu dosahuje během několika minut.
- Pozvolná degranulace, která může být pokračováním degranulace anafylaktické.

Bazofil může být aktivován přímo, bez závislosti na IgE nebo jeho aktivace může být zprostředkována pomocí IgE. Po jeho aktivaci dochází k uvolnění preformovaných zásobních mediátorů – histaminu, leukotrienu C₄ a faktoru aktivujícího destičky. Bazofil je také schopen uvolňovat IL-4, IL-13, MIP-1α a IL-8 a dále působí

na makrofágy, u kterých též zvyšuje expresi CD23 na povrchu, schopnost prezentovat antigen a schopnost zabíjet nádorové buňky. (16)

Na rozvoji chronického alergického zánětu se podílejí i další buňky, např. monocyty/makrofágy, NK buňky, B-lymfocyty, trombocyty či endoteliální buňky, jejich role však není rozhodující.

1.3 Mediátory chronického alergického zánětu

Jak již bylo zmíněno, na rozvoji zánětlivé reakce se zúčastňuje mnoho buněk. Tyto buňky uvolňují v místě infekce nebo poškozené tkáně mediátory regulující přestup a aktivitu dalších buněk.

1. Exogenní a endogenní mediátory

Zánětlivé mediátory jsou rozpustné molekuly, které mohou působit jak místně – v ložisku infekce nebo poškozené tkáně, tak i v odlehlých strukturách. Můžeme je schematicky rozdělit na exogenní a endogenní mediátory.

- a) Mezi *exogenní mediátory* patří různé produkty bakterií a toxiny.
- b) *Endogenní mediátory* jsou tvořeny imunitním systémem a enzymovými multisystémy, podílejícími se na regulaci zánětu, ale i homeostázy, komplementovým, hemokoagulačním, fibrinolytickým a kininovým systémem. Složky těchto enzymových systémů jsou v plazmě v neaktivní formě a různé podněty vyvolávají kaskádovou aktivaci jednotlivých složek. Významnou úlohu v tvorbě zánětlivých mediátorů mají i makrofágy, které jsou spolu s neutrofilými hlavními fagocytujícími buňkami. Bazofily i žírné buňky mají malou fagocytární aktivitu, ale společně s trombocyty a endotelovými buňkami uvolňují vazoaktivní mediátory. Na regulaci cévní reaktivity v opožděné fázi se významně podílejí prostaglandiny a leukotrieny. Tvorbu edému ovlivňují mediátory s vazodilatačním účinkem (histamin, bradykinin, PGE₂, PGI₂, C3a, C5a). (16)

Mediátory zánětu jsou uvolňovány buňkami jako reakce na jejich podráždění – aktivaci antigenním podnětem. Podle funkce můžeme mediátory dělit na:

1. Vazoaktivní mediátory, které vyvolávají zvýšenou přilnavost buněk na endoteliích a jejich zvýšenou propustnost do místa zánětu.
2. Chemotaktické mediátory (chemoatraktanty), které přitahují – lákají výkonné buňky do místa zánětu.
3. Ostatní (enzymy, proteoglykany, kyslíkové radikály, oxidační látky atd.), které ovlivňují rozsah a trvání alergického zánětu.

Mezi nejvýznamnější endogenní mediátory zánětlivých reakcí patří histamin, prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny, destičky aktivující faktor (PAF), bradykinin, tachykininy, serotonin, eozinofilní chemotaktický faktor, tryptáza, heparin a toxické kyslíkové radikály. (16)

HISTAMIN

Je tvořen a skladován v žírných buňkách a bazofilních granulocytech. Z buněk je uvolňován po jejich imunologické aktivaci po navázání antigenu na imunoglobuliny E, nacházející se na jejich povrchu, ale i neimunologickými mechanismy, např. zhmožděním tkání, působením toxinů (hadího jedu) či proteolytických enzymů. Histamin působí prostřednictvím receptorů H_1 , jejichž aktivace vyvolává kontrakci hladké svaloviny bronchů, střeva a dělohy, zvýšení propustnosti postkapilárních venul, plicní vazokonstrikci, zvýšení tvorby hlenu na nosní sliznici, zvýšení nitrobuněčných hladin cGMP, zvýšení chemotaxe leukocytů a tvorby prostaglandinů v plicní tkáni, dále H_2 a H_3 . (16)

PROSTAGLANDINY

Prostaglandiny jsou výsledným produktem štěpení kyseliny arachidonové cyklooxygenázou 1 a 2. V dýchacích cestách vyvolává $PGF_{2\alpha}$ bronchokonstrikci a obstrukci jak horních, tak i středních dýchacích cest. Je chemoatraktantem neutrofilních leukocytů. U astmatiků byly prokázány v bronchoalveolární laváži jeho zvýšené hladiny. Naproti tomu PGE_2 ovlivňuje aktivitu endoteliálních a epiteliálních buněk v dýchacích cestách a potlačuje zánětlivé projevy. (16)

TROMBOXANY

Tromboxany jsou též metabolity kyseliny arachidonové a vyvolávají kontrakci hladkých svalů i dýchacích cest. (16)

LEUKOTRIENY

Jsou produkty metabolismu kyseliny arachidonové. Ovlivňují bronchokonstrikci, zvyšují sekreci hlenu a mikrovaskulární permeabilitu. Významně se též podílejí na mechanismech vyvolávajících bronchiální obstrukci. Jsou tvořeny převážně žírnými buňkami a buňkami zánětu – makrofágy, monocyty, eozinofily a bazofily. U pacientů s atopickým asthma bronchiale bylo prokázáno dvakrát vyšší zastoupení 5-lipoxygenázy, 5-lipoxygenázy aktivačního proteinu, LTA_4 hydrolázy a čtyřikrát více exprese LTC_4 syntázy. V experimentu byla též potvrzena tvorba leukotrienů buňkami ve sliznici dýchacích cest astmatiků po stimulaci alergenem, fyzikálními vlivy (chladným vzduchem nebo námahou) i oxidem siřičitým. (16)

Aktivita leukotrienů v patogenezi asthma bronchiale společně s dalšími faktory vyvolává:

1. Vzestup cévní permeability a rozvoj edému – v dýchacích cestách jsou tyto příčinou vzniku obstrukce dýchacích cest.
2. Produkci hlenu.
3. Bronchokonstrikci – leukotrienové receptory $CysLT_1$ jsou na povrchu žírných buněk, makrofágů, buněk hladkého svalstva, monocytů, B-lymfocytů, ale i eozinofilů. V průběhu časné alergické reakce po přemostění dvou molekul IgE antigenem na povrchu žírných buněk dochází k uvolnění mediátorů, následně i leukotrienů, které se pak váží na $CysLT_1$ receptor (autokrinní proces) na povrchu mastocytů. Tento autokrinní signál následně vede opět ke zvýšené tvorbě leukotrienů a jejich uvolnění, což uzavírá „cysteinylový circulus vitiosus mastocytů“ v rámci alergické reakce a reguluje tak funkci mastocytů a částečně i buněk hladkého svalstva parakrinně uvolněnými leukotrieny.
4. Buněčnou infiltraci – LTB_4 má silný chemotaktický účinek na neutrofilů, ale menší na eozinofily. Leukotrieny dále zvyšují expresi tachykininů na epitelu.

DESTIČKY AKTIVUJÍCÍ FAKTOR (PAF)

V průběhu zánětlivé reakce zvyšuje tvorbu IL-1, IL-2 a TNF α v makrofázích, aktivuje NK buňky, zvyšuje fagocytózu neutrofilů, vyvolává agregaci trombocytů a stimuluje uvolnění mediátorů z granul trombocytů, neutrofilů a eozinofilů (LTC₄ a LTD₄). V současné době je považován za nejdůležitější chemoatraktant pro eozinofily. (16)

ADENOSIN

Je uvolňován z žírných buněk v průběhu degranulace. Vyvolává vazokonstrikci a zvyšuje uvolnění mediátorů z žírných buněk zprostředkované imunoglobuliny E. (16)

KOMPLEMENTOVÝ SYSTÉM

Složky aktivovaného komplementu vyvolávají kontrakci hladké svaloviny, degranulaci žírných buněk a bazofilů s následným uvolněním histaminu a vazoaktivních látek. (16)

SEROTONIN

Serotonin (5-hydroxytryptamin) se nachází především v trombocytech. Zvyšuje uvolnění histaminu a permeabilitu kapilár a kontrakci hladkého svalstva. (16)

2. Cytokiny

Většina cytokinů působí pleiotropně – na několik druhů buněk, často kaskádovitě – jeden cytokin indukuje tvorbu druhého a celý cytokinový systém je do určité míry redundantní – jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými. Cytokinová síť udržuje buněčné funkce i orgány ve vzájemné funkční rovnováze. Cytokiny mohou působit navzájem synergicky, např. IL-18 a IL-12 na tvorbu interferonu γ nebo antagonisticky – např. cytokiny IL-4 a IL-12. (16)

TUMOR NEKROTIZUJÍCÍ FAKTOR ALFA

Patří mezi cytokiny akutní zánětlivé reakce a je tvořen bezprostředně po iniciální stimulaci imunitního systému převážně mononukleárními fagocyty (makrofágy, Kupfferovými buňkami), ale i T a B lymfocyty, žírnými buňkami či buňkami endokrinního systému. (16)

PRORŮSTOVÉ CYTOKINY

- a) Transformující růstové faktory – do této kategorie můžeme zařadit TGF α a TGF β , který je v průběhu eozinofilního zánětu u asthma bronchiale tvořen převážně zánětlivými buňkami v těsné blízkosti bazální membrány bronchiálního epitelu. Tyto látky se podílejí i na procesu remodelace u asthma bronchiale.
- b) Polypeptidové růstové faktory – např. fibroblastové růstové faktory (FGF), epidermální růstový faktor (EGF) či z destiček derivovaný růstový faktor (PDGF). (16)

INTERLEUKINY

Interleukiny jsou skupinou cytokinů, které se významně podílejí na patogenezi zánětu. Mezi ty nejdůležitější patří IL-4, IL-5 (ten je proliferačním a diferenciacním faktorem pro eozinofily, potlačuje proces apoptózy a tím významným způsobem ovlivňuje dynamiku i závažnost chronického eozinofilního zánětu), IL-6, IL-9 (podporuje diferenciaci žírných buněk i sekreci hlenu v dýchacích cestách), IL-10 (je významným inhibitorem eozinofilního zánětu, neboť snižuje uvolňování eozinofilních chemotaktických chemokinů (eotaxinu a RANTES) a tvorbu IL-5, a tím zkracuje přežívání eozinofilů), IL-11 (v rámci eozinofilního zánětu se podílí na rozvoji subepiteliální fibrózy, obstrukci dýchacích cest a stupni bronchiální hyperreaktivity), IL-12 (potlačuje vývoj a tvorbu cytokinů Th2 lymfocyty a hraje klíčovou roli při navození rovnováhy mezi Th1 a Th2 lymfocyty, čímž potlačuje tvorbu IgE a dále snižuje eozinofilii v periferní krvi i ve sputu), IL-13, IL-16 (je významným chemotaktickým faktorem pro eozinofily, Th lymfocyty a mastocyty a je tvořen u astmatiků epiteliálními buňkami během zánětlivé reakce), IL-17 a IL-18 (ten potlačuje tvorbu cytokinů Th2 lymfocyty). (16)

CHEMOKINY

Aktivovaný komplementový systém (C5a) a TNF α stimulují makrofágy k sekreci chemokinů.

Interleukin 8 je nejlépe definovaným představitelem této skupiny. Je chemotaktický pro neutrofile, T-lymfocyty a bazofily a potlačuje uvolnění histaminu z mastocytů.

Dále do této skupiny řadíme eotaxin, který je chemoatraktantem pro eozinofily, zvyšuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů, což přispívá též k rozvoji zánětu bronchiální sliznice, atrahuje i bazofily do místa eozinofilního zánětu a je významným aktivátorem T-lymfocytů.

RANTES je chemotaktickým faktorem pro monocyty, makrofágy, lymfocyty, NK buňky a eozinofily. Zvyšuje také uvolnění histaminu. (16)

TRANSKRIPČNÍ FAKTORY

Transkripční faktory jsou proteiny, které po navázání na promotor (regulační jednotku) různých genů stimulují nebo inhibují jejich transkripci. Většina těchto genů kóduje molekuly, které se významně podílejí v procesu zánětlivé odpovědi. Mezi transkripční faktory zařazujeme nukleární faktor kappa B – NFκB, aktivační protein-1 – AP-1, transkripční faktor aktivující signální transdukci – STAT, i glukokortikoidové receptory v cytoplasmě buněk. Faktory, které zhoršují průběh asthma bronchiale, vyvolávají aktivaci NFκB. TNF i IL-1 jsou samy schopny aktivovat NFκB, a to je pravděpodobně jeden z důvodů chronicity zánětu u asthma bronchiale. (16)

ADHEZIVNÍ MOLEKULY A MEZIBUNĚČNÉ REAKCE

Adhezivní molekuly hrají významnou úlohu při mezibuněčných interakcích imunitního systému a významně ovlivňují dynamiku zánětlivé odpovědi. Nejvýznamnější je adhezivní molekula CD44. Když je poškozen epitel dýchacích cest, dochází u astmatiků k nadměrné expresi CD44. CD44 významně ovlivňuje aktivitu chemokinů a růstových faktorů v poškozeném epitelu.

Adhezivní molekuly se společně s chemokiny účastní procesu migrace leukocytů z krevní periferie do ložiska zánětu. (16)

INTEGRINY

Integriny jsou membránové glykoproteiny, jejichž významným rysem je existence v aktivním i inaktivním stavu. Klasickým příkladem je molekula CD14. Podskupina β_1 integrinů zahrnuje řadu receptorů, které váží kolagen, laminin, fibronektin a jsou sem řazeny i tzv. VLA (very late activation) antigeny. Do podskupiny β_2 integrinů řadíme CD11/CD18 integriny. (16)

MOLEKULY IMUNOGLOBULINOVÉ VELKORODINY

Slouží jako ligandy pro integriny (ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1 atd.), selektiny (MadCAM atd.), pro antigeny MHC (CD4, CD8 atd.) a jiné membránové receptory (CD2, CD152 atd.). Na epitelálních buňkách je u astmatiků zvýšená exprese molekul ICAM-1.

SELEKTINY

Pro selektiny je charakteristická vazba sacharidových ligandů na povrchu endotelových buněk či leukocytů. Zatím jsou definovány L-selektin, E-selektin a P-selektin, které se podílejí na interakcích spojených s migrací leukocytů endotelem. (16)

Výzkum zabývající se asthma bronchiale je zaměřen převážně na prozánětlivé mechanismy spouštějící zánětlivý proces a protizánětlivou léčbu. Méně pozornosti je věnováno porozumění endogenním protizánětlivým procesům, které by mohly ovlivnit aktivitu zánětu u asthma bronchiale. Je možné, že právě tyto inhibiční mechanismy jsou nedostačující, a proto dochází k rozvoji zánětlivé reakce nebo až k přechodu do chronického zánětu a strukturálním změnám v dýchacích cestách. Monitorování aktivity inhibičních mechanismů by mohlo být přínosem pro hodnocení závažnosti asthma bronchiale či určení odlišnosti probíhajícího onemocnění mezi jednotlivými pacienty. Toto zjištění by mohlo vést k novým léčebným postupům a k vývoji léků aktivujících endogenní inhibitory zánětu nebo napodobujících jejich vlastnosti. Tento směr výzkumu nových léků je atraktivní, protože takové léky by mohly vést k normalizaci aktivity protizánětlivých mechanismů organismu a měly by minimální vedlejší účinky.

Zatím jsou známy tyto protizánětlivé endogenní inhibitory u asthma bronchiale: kortisol, prostaglandin E₂, vazoaktivní intestinální peptid, adrenomedulin a cytokiny IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, antagonist IL-1 receptoru, IFN γ a TGF β . Stále přibývají poznatky, že u asthma bronchiale je snížena protizánětlivá a imunomodulační aktivita některých cytokinů či snížena jejich tvorba. Nabízí se proto otázka, zda nedostatečná aktivita protizánětlivých cytokinů vyvolává závažnější průběh asthma bronchiale a perzistenci chronického eozinofilního zánětu v dýchacích cestách? (16)

2. Přehled současné antiastmatické léčby

Léčba astmatu vychází z příznaků a patofyziologie onemocnění. Jejím základem jsou tři přístupy:

1. Zabránit expozici antigenu.
2. Dilatovat zúžené bronchy.
3. Potlačit zánět a hyperreaktivitu dýchacích cest. (3)

Léčiva používaná při profylaxi a terapii asthma bronchiale se nazývají antiastmatika. Podle mechanismu účinku jde o bronchodilatancia, dále o látky, které tlumí zánět a hyperreaktivitu bronchů a o látky, které mají v podstatě pomocný význam. (17)

I. Bronchodilatancia

1. β_2 -sympatomimetika
 - a) Krátkodobě účinná – jsou určeny pro zvládnutí akutních příznaků, nebo jako profylaxe pozátěžových astmatických příznaků. Řadíme sem: fenoterol, salbutamol, terbutalin, hexoprenalin*.
 - b) Dlouhodobě účinná – používají se převážně u nočních projevů astmatu nebo v terapii perzistujícího astmatu jako doplněk dlouhodobé protizánětlivé terapie. Do této skupiny patří: salmeterol, formoterol, klenbuterol, prokaterol, bambuterol*, salbutamol – retardovaná forma.
 - c) Neselektivní sympatomimetika – tato skupina již ztratila dřívější význam v léčbě astmatu, lze sem však zařadit adrenalin, efedrin, isoprenalin a orciprenalin*. (17)
2. Antagonisté muskarinových receptorů – parasymptolytika blokující M-receptory brání účinku acetylcholinu, který se může při zvýšené parasymptomimetické aktivitě podílet na spazmu bronchiálního svalstva. Patří sem: ipratropium, oxitropium*, tiotropium a durmanové přípravky*. K terapii astmatu se dnes však používá pouze ipratropium, tiotropium se uplatňuje spíše při léčbě CHOPN. (17)

3. Metylxantiny – mechanismu účinku této skupiny není zcela jasný, předpokládají se však tyto mechanismy: inhibice fosfodiesterázy I-IV a antagonistické působení na adenosinové receptory. Nejvíce se používají: teofylin, aminofylin a etofylin. (17)

II. Látky snižující zánět a hyperreaktivitu bronchů

1. Kortikoidy – zasahují do patogeneze vzniku a rozvoje asthma bronchiale, resp. tlumí jeho dominantní, zánětlivou složku.
 - a) Inhalačně podávané – nejsou určeny ke zvládnutí akutních příznaků, ale k pravidelné dlouhodobé léčbě. Nejsou proto vhodné při těžkých formách perzistujícího astmatu (včetně status asthmaticus), kdy jsou potřebné velmi rychle působící intenzivní léčebné zásahy. Řadíme sem: beklometazon, budesonid, flutikazon, triamcinolon, flunisolid*, mometazon.
 - b) Systémově podávané – celkové podávání kortikosteroidů přichází v úvahu u těžkých astmatických stavů, kdy ke zvládnutí onemocnění nepostačují inhalační kortikoidy a další léčiva. V tomto případě se používají metylprednisolon a prednison. (17)
2. Imunopropylaktika – jejich účinek spočívá ve stabilizaci membrán senzibilizovaných žírných buněk. Tato léčiva jsou určena pro preventivní, udržovací léčbu lehkého a středně těžkého perzistujícího astmatu. V léčbě akutních příznaků jsou neúčinná. Můžeme sem zařadit: kromolyn, nedokromil a ketotifen (tato látka patří zároveň i do skupiny antihistaminik). (17)

III. Další farmaka – tyto skupiny představují nové možnosti v léčbě astmatu.

1. Antileukotrieny – jsou to látky antagonistující tvorbu nebo účinky leukotrienů, z nichž některé mají spazmogenní účinek a zvyšují vaskulární permeabilitu.
 - a) Antagonisté leukotrienových receptorů – nejvíce se používají zafirlukast, montelukast, pranlukast*, verlukast* a MK 571*.
 - b) Inhibitory 5-lipoxygenázy – lze sem zařadit látky docebenon*, piriprost*, zileuton*. (17)

2. Antagonisté H₁-receptorů – např. ketotifen (17)
3. Hyposenzibilizační alergeny – jsou to přípravky obsahující alergenové extrakty, určené k diagnostickým kožním testům nebo ke specifické imunoterapii. (17)

V současné době se začíná objevovat také nový způsob léčby asthma bronchiale. Vzhledem k tomu, že významnou úlohu v patogenezi astmatu hrají pomocné lymfocyty Th1 a zejména pak Th2, je proto logickou snahou najít způsob, jak ovlivnit diferenciaci Th0 na Th1, resp. zamezit vzniku Th2. Na myších modelech bylo dosti přesvědčivě ukázáno, že podnětem k diferenciaci Th0 na Th2 je interleukin IL-12, a proto se ukazuje právě tento mediátor vážným kandidátem na cílovou molekulu racionální terapie astmatu. Přestože jde o otázku budoucnosti (příliš mnoho otázek zatím zůstává nevyjasněno), již dnes se uvažuje o dvou strategiích léčby: Protože mnoho klinických poznatků ukazuje, že k deviaci imunitní odpovědi (z normální na alergickou) dochází v raném dětství, uvažuje se o možnosti imunizovat rizikové děti směsí antigenů, o jejichž podílu na alergizaci se ví (kočičí alergeny, alergeny roztočů atd.), v kombinaci s IL-12. Tím by mělo být dosaženo trvalého posunu k Th1 typu imunitní odpovědi. Efektivnost ani bezpečnost takové strategie však zatím nebyla zkoumána. Druhou možností je pak substituční léčba astmatiků interleukinem IL-12. (14)

Pozn.: Léčivé látky označené symbolem * nejsou zatím na českém trhu dostupné k běžné terapii.

3. Hodnocení funkcí respiračního systému

Hodnocení funkcí respiračního systému lze provádět různými metodami, mezi které patří např. spirometrie, pletysmografie (referenční metoda měření odporů, která umožňuje měření dechové práce a compliance), bronchomotorické testy, bronchoskopie atd. (7) Patří sem i řada *in vivo* metod na laboratorních zvířatech. U experimentálních zvířat je velmi oblíbená a uznávaná metoda měření plicní rezistence.

3.1 Plicní rezistence

Síla, kterou v průběhu aktivní činnosti vyvíjejí dýchací svaly, se do značné míry spotřebovává na překonávání různých odporů dýchacích cest. Mezi ně patří elastický odpor tkáně plic i hrudníku a neelastický, tzv. dynamický odpor vůči proudění vzduchu v průběhu vdechu i výdechu. Síla, potřebná k překonání elastického odporu se měří na vrcholu inspiria nebo expiria, tj. v okamžiku, kdy ustává proudění vzduchu, a tedy za absence dynamického odporu. Elastický odpor je úměrný velikosti vdechnutého objemu vzduchu (V) a konstantě poddajnosti (K): (22)

$$p = K \times V$$

Při vdechu tedy musí svaly překonávat dynamický odpor dýchacích cest a plicní tkáně. Dynamický odpor v sobě zahrnuje tři složky:

1. Odpor způsobený setrvačností hmoty (molekul vzduchu, tkání) proti začátku a ukončení pohybu, respektive proti změnám jeho směru. Za normálních okolností činí asi jen 2 % dynamického odporu. Uplatňuje se zejména při změně dechové fáze, tj. inspiria na expirium a naopak. (22)
2. Viskózní odpor, daný deformací plic (pleurálních listů, plicních laloků atd.), se zvětšuje se vzrůstajícím průtokem vzduchu jak v inspiriu, tak v expiriu. Při klidném dýchání činí asi 18 % dynamického odporu. (22) Součtem odporů vzniklých třením struktur plic a hrudníku a odporu setrvačného dostaneme odpor plicní tkáně, který je zbytkem dynamických odporů (po odečtení odporu dýchacích cest od celkového odporu plic) a představuje tedy zbývajících 20 %.
3. Odpor je dán odporem dýchacích cest, kterými proudí vzduch. Vzniká třením molekul vzduchu o sebe a o stěny dýchacích cest. Tento odpor představuje asi 80 % celkového odporu a zvyšuje se za různých patologických okolností, zejména při stenóze a obstrukci. Odpor dýchacích cest je primárně určen

průsvitem bronchů a bronchiolů; mění se se čtvrtou mocninou jejich poloměru. Méně pak závisí na rychlosti proudu vzduchu. (22)

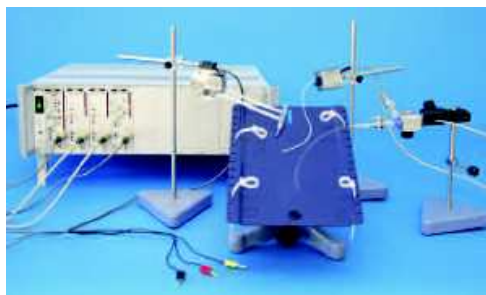
Průsvit dýchacích cest ovlivňuje řada faktorů:

- a) Kromě sympatické a parasympatické inervace buněk hladké svaloviny může být tonus hladké svaloviny bronchů a bronchiolů ovlivněn mnoha mediátory. Např. histamin, který se uvolňuje při alergických reakcích ze žírných buněk plicního intersticia, má přímé bronchokonstrikční účinky.
- b) Některé dráždivé látky, které jsou příčinou reflexní bronchokonstrikce zprostředkované parasympatikem (prach, kouř, SO₂, kyselé částice smogu), mohou mít i přímé lokální bronchokonstrikční účinky.
- c) Edematosní prosakování sliznic dýchacích cest a nadměrné množství hlenu vede ke zmenšení jejich průsvitu a tím ke zvýšení odporu.
- d) Udržování volného průsvitu průdušek napomáhá elastický tah tkání, které se na ně upínají. Při úbytku těchto elastických sil dochází snáze k zúžení průsvitu.
- e) Cizí těleso v dýchacích cestách, obstrukce bronchů procesem pronikajícím do lumen či stlačení z okolí, může být další příčinou zmenšení průsvitu. (21)

Odpor dýchacích cest (airway resistance R_{aw}) je přímo úměrný alveolárnímu tlaku (p_A) a nepřímo úměrný průtoku vzduchu v dýchacích cestách (V). Normální hodnoty R_{aw} u člověka v průběhu klidného dýchání jsou 0,1 až 0,2 kPa.l⁻¹.s⁻¹. (22)

Plicní rezistenci lze měřit experimentálně i u zvířat pomocí speciální aparatury, která je napojena na příslušný vyhodnocovací software. Při krátkodobých studiích je anestetizované zvíře umístěno na operačním stolku, provedena tracheotomie a intubace a zvíře je napojeno na umělou ventilaci. Proud ventilovaného vzduchu (respiratory flow) je měřen pneumotachometrem (např. „Fleisch tube“) a diferenčním tlakovým transducerem. Kromě toho je snímán i ezofageální tlak pomocí tlakového transduceru (MPX nebo P75). Tyto dva signály umožňují výpočet respiračních parametrů, z nichž nejvýznamnějšími jsou plicní rezistence (kterou tvoří z 80 % odpor dýchacích cest a z 20 % odpor plicní tkáně), a dynamická compliance (= elasticita respiračního

systemu). Pro zaznamenávání a vyhodnocení získaných hodnot se používá software, např. HSE-HA Pulmodyn. (9)



Obr. č. 6 Přístroj na měření plicní rezistence. Převzato z www.harvardapparatus.com

4. Experimentální práce

Experimentální práce záleží na mnoha různých aspektech. Především jde o výběr odpovídajících metod. Výběr metody a její vyhodnocení musí být pokud možno nejpřesnější. Měřené hodnoty by neměly být ovlivněny dalšími faktory a stejně tak musíme vyloučit systémové chyby. (10)

V medicíně a ve farmacii se provádějí v zásadě dva typy pokusů: *in vitro* a *in vivo*. Pokusy *in vitro* se neprovádějí na živých zvířatech nebo člověku, ale na orgánech nebo tkáních, se kterými se pracuje mimo organismus. (10)

Rychlý rozvoj a rozšíření technologie *in vitro* ve výzkumu a testování je založen na jejích vědeckých a etických přednostech jako jsou nižší náklady a rychlejší tempo vyšetřování, např. při hodnocení toxicity, možnost opakování testů a samotná etická výhoda nepoužívání zvířat *in vivo*. (6)

POKUSY IN VITRO

In vitro pokusy rozdělujeme na:

Pokusy na izolovaných orgánech: Izolovaný orgán je umístěn v roztoku s přesně definovaným obsahem kyslíku a živin a se stálou teplotou. Je to např. Ringerův roztok, Tyrodův roztok atd. Všechny pokusy na izolovaných orgánech jsou modelem a jsou používány proto, že jsou jednodušší než experimenty *in vivo*. Umožňují rychlé získání výsledků, které se vždy musí dále ověřit v pokusech na zvířatech, protože jim chybí základní věc – fyziologická regulace v rámci celého organismu. Důležité je, že *in vitro* model je poměrně velmi jasně definovaný, pokusy jsou přesné, nejsou drahé a jsou relativně rychlé. Jsou vhodné např. pro různé farmakologické studie a pro demonstrace některých funkcí. (10)

Pokusy na tkáňových kulturách: Jsou pokusy na živých buňkách, které rostou v kultivačním médiu. Jestliže buňky, např. neurony, nejsou schopné se dělit, je možno užívat nádorovou tkáň, která roste z těchto buněk, anebo fetální tkáň, která má větší schopnost se dělit. Tkáňové kultury jsou užívány k experimentům na buněčné úrovni zejména v molekulární biologii. Ve fyziologii se s nimi můžeme setkat při studiu funkce receptorů a membránových kanálů, při použití techniky terčíkového zámku (patch-clamp), při imunohistochemii atd. Opět jsou detailně studovány jevy na buněčné, subbuněčné a molekulární úrovni. (10)

POKUSY IN VIVO

Jde o studie na zvířatech, které mohou být buď krátkodobé – akutní, nebo dlouhodobé – chronické. Základním předpokladem pro ověření zkoumané hypotézy jsou vhodně zvolený model a uspořádání pokusu, zajištění definovaných podmínek (včetně zvířat ze standardního chovu), použití negativní a/nebo pozitivní kontroly a správné vyhodnocení a interpretace výsledků. (10)

Experimenty *in vivo* mají stále nezastupitelnou roli ve farmakologii, zvláště patrný je jejich význam při ověřování účinku potenciálních léků. K tomuto účelu se užívá především myši, ale i dalších živočišných druhů, např. potkanů, morčat, králíků, opic, psů, ovcí atd. Ekonomická náročnost těchto experimentů je však značná. (10)

4.1 Etické zásady práce se zvířaty

Při práci se zvířaty je nutno dodržovat etiku experimentální práce. Ke zvířeti musíme přistupovat jako k živému tvorů, který nám slouží jako pomocník při odstraňování potíží a bolestí člověka. Experiment musíme volit a naplánovat tak, abychom zvířeti působili co nejmenší bolest. Světová společnost fyziologických věd (IUPS – International Union of Physiological Sciences) vydala k tomuto problému závazné předpisy. V některých státech (Anglie, Francie) a i v České republice existují spolky pro ochranu zvířat, které velmi přísně kontrolují dodržování těchto předpisů a zásad. Obecně při práci se zvířaty je nutné dodržovat Helsinskou a Edinburghskou deklaraci, předpisy Ministerstva zemědělství ČR a zákon na ochranu zvířat 246/1992 Sb., v platném znění. (10)

Zásada 3R

Když roku 1959 vyhlásil prof. Russel program "tří R" (**R**eduction, **R**eplacement, **R**efinement), netušil, že plného významu začne nabývat teprve o dvě desetiletí později. Dnešní dobou je teze "tří R" základní zásadou odpovědného přístupu v experimentální práci. Výklad "tří R" se stále rozšiřuje a mění podle dosažených pokroků. (11)

1. Reduction

Snížení počtu (reduction) pokusných zvířat je dosahováno především vlastním projektováním pokusu, výběrem vhodných druhů a kmenů laboratorních zvířat, užitím biomodelů, adekvátních statistických postupů a sdílením používaných pokusných zvířat.

Z tohoto pohledu je navíc zřejmá souvislost mezi etickými požadavky a úsilím o genetickou a mikrobiologickou specifikaci laboratorních zvířat: správné a obecně platné výsledky se dají získat použitím malého počtu správných zvířat. Počet použitých pokusných zvířat se také snižuje díky lehčímu a lepšímu přístupu k informacím, například prostřednictvím internetu. (11)

2. Replacement

V možných případech je potřeba pokusné zvíře nahradit (replacement). Děje se tak využitím metodik *in vitro*, kam řadíme především práci s buněčnými a orgánovými kulturami, jak jsem již uvedla výše. Orgány pro kultivaci se pochopitelně získávají z živého jedince, ale z některých orgánů je možné vytvořit více kultur a především je možno zužítkovat všechny orgány pokusného zvířete, které se uplatní pro různé experimenty, např. v rámci jednoho ústavu. V některých pokusech mohou být obratlovci nahrazeni nižšími organismy: bezobratlými, mikroorganismy nebo rostlinami. Také vývoj technologií poskytuje cenné zdroje pro nahrazení. Jde především o počítačové simulace a zdokonalování imunologických technik. Hodnotné informace ve svém důsledku nahrazující pokusná zvířata poskytují epidemiologické studie a mapování. (11)

3. Refinement

Pokud je experiment na zvířeti vědecky nezbytný, musí být dodržena zásada "zjemnění" (refinement). Pod tímto pojmem se skrývají nároky na ustájení zvířat, na zvykání si zvířete na člověka (handling) a na šetrné zacházení. Pokusné zvíře má být chováno v takových podmínkách, které u něj nevyvolávají stres – zohledňuje se velikost klece, počet zvířat, světelný a krmný režim atd. V případě operačních zákroků je nevyhnutelné minimalizovat invazivnost, zajistit vyhovující operační analgezii a dostatečnou pooperační péči. Není-li to předmětem schváleného pokusu, nesmí být zvířeti způsobena bolest před, během ani po pokusu. Současné možnosti analgetické terapie jsou naprosto dostatečné pro splnění těchto požadavků. Rovněž v případech studia bolesti je nutné dbát na analgezii při výkonech, které nejsou spojeny se záměrným vyvoláním bolesti. (11)

(4. Responsibility)

Někdy se ke třem stávajícím R přidává čtvrté – responsibility. Je pod ním skryt odpovědný přístup k pokusným zvířatům a pokusům vůbec, odpovědný z pohledu jednotlivce i společnosti. Dále odpovědnost každého experimentátora nejen za sebe sama, ale rovněž za druhé, a v neposlední řadě jeho schopnost nést tíhu této odpovědnosti. (11)

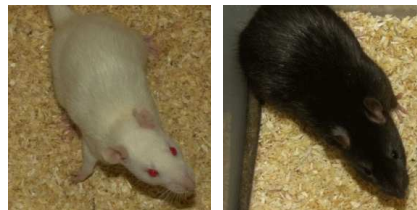
4.2 Laboratorní zvířata

Cílem mé diplomové práce bylo testování metodiky na dvou druzích laboratorních zvířat – laboratorním potkanovi (*Rattus norvegicus*) a morčeti domácím (*Cavia aperea*). Vzhledem k tomu, že se tato diplomová práce úzce zabývá respiračním traktem, při popisu obou použitých druhů mu bude věnována větší pozornost.

Laboratorní potkan

(*Rattus norvegicus*)

Zoologické zařazení: Třída: Mammalia
Řád: Rodentia
Čeleď: Muridae
Rod: Rattus
Druh: Rattus norvegicus

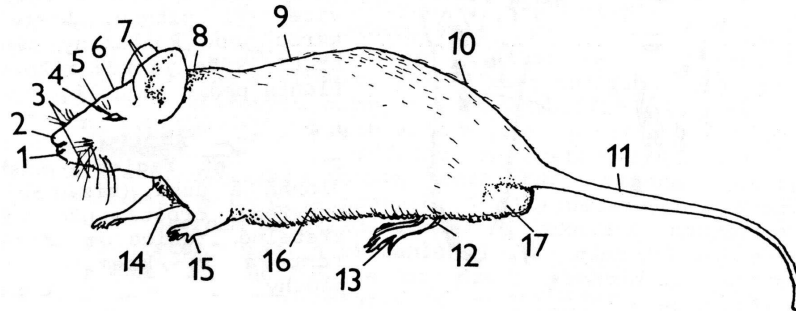


Obr. č. 7 Laboratorní potkan kmene Wistar a Long Evans.
Převzato z www.lf3.cuni.cz

Laboratorní potkan byl získán z divokého potkana. Na rozdíl od krysy se lépe adaptuje na laboratorní podmínky. Nejznámější jsou tři kmeny, ze kterých byla získána křížením většina dalších kmenů. Kmen Wistar albino (Filadelfie), kmen Sprague Dawley (Madison ve Wiskonsinu) a kmen Long-Evans, který se liší černým zbarvením hlavy, krku a dorzální části těla, tzv. kápí. Mezi kmeny mohou být podstatné rozdíly. (5)

Laboratorní potkan má protáhlé tělo s relativně malou rostrálně zašpičatělou hlavou. Tělo je pokryté delší tuhou srstí kromě čenichu, ocasu a nášlapných polštářů končetin. Kolem úst, na bradě a nad víčky jsou výrazné hmatové chlupy. Nozdry jsou šterbinovité a úzké. Oči u albinotických kmenů mají duhovku růžové barvy, víčka jsou zřetelně vyvinuta. Ušní boltce jsou tenké až průsvitné, málo ochlupené. Tělo je při pohybu protáhlé, ale v klidové poloze shrbené. Ocas je dlouhý (přibližně 40-50 % délky těla),

krytý zrohovatělými šupinami, pod nimiž řídce vyrůstají krátké nevýrazné chloupky. Hrudní končetiny jsou kratší a slabší než pánevní. Jsou používány též k hrabání, fixaci potravy i otírání chlupů na těle. Pánevní končetiny jsou podstatně větší než hrudní a uplatní se více při pohybu. (1)



Obr. č. 8 Schematický nákras s popisem částí těla samce laboratorního potkana. Převzato z Červený, 1999.

1 – os, 2 – nasus, 3 – pili tactiles, 4 – oculus, 5 – radix nasi, 6 – frons, 7 – auricula, 8 – nucha, 9 – dorsum, 10 – regio sacralis, 11 – cauda, 12 – membrum pelvinum, 13 – pes, 14 – membrum thoracicum, 15 – manus, 16 – abdomen, 17 – scrotum

Respirační systém (*Apparatus respiratorius*)

Cavum nasi začíná rostrálně štěrbinovitou nozdrou. Nosní i čichové skořepy jsou velké. Ve dně nosní dutiny, po obou stranách chrupavky nosní přepážky, je funkční *organum vomeronasale*. (1)

Trachea je složena asi z 24-30 dorsoventrálně oploštělých ne zcela uzavřených prsténčitých chrupavek, které mohou u dospělých a starých jedinců vápenatět. První kraniální chrupavkou je chrupavka štítná (*cartilago thyroidea*), pod ní se nachází chrupavka prstencová (*cartilago cricoidea*). Dorsálně je na chrupavkách vytvořen *m. trachealis*, upínající se na ně zvenčí. Intrapulmonálně nemají bronchy chrupavčitou výztuž. *Trachea* se v *bifurcatio tracheae* dělí na pravou a levou průdušku (*bronchus principalis dexter et sinister*). (1)

Pulmo tvoří levá a pravá plíce. Pravá plíce (*pulmo dexter*) je tvořena čtyřmi laloky: kraniálním, středním, přídatným a kaudálním (*lobus superior et medius et accessorius et inferior*). Levá plíce (*pulmo sinister*) je nečleněná a celkově menší. Plicní cévy mají ve své stěně příčně pruhovaná svalová vlákna, která kontinuálně přecházejí do srdce. Bronchiální konstriktce je zajištěna vagovou inervací, není doplňována adrengní inervací. Plíce jsou při porodu nezralé a teprve po narození dochází k rozvoji alveolů, alveolárních duktulů a respiračních bronchiolů. Dokud nedojde k přestavbě plicní tkáně,

výměna vzduchu probíhá přes stěny kanálků a sakulů, což trvá až do 4. až 7. dne po narození. Respirační bronchioly jsou u potkanů přítomny za 10 dní po narození. (23)

U potkana je nejméně deset morfologicky odlišných buněk identifikovaných v dýchacích cestách. Epiteliální sérozní buňka vylučuje produkt, který má viskozitu menší než produkt hlenovité buňky a je odpovědná za nízkou viskozitu vrstvy ciliární tekutiny, nalézané ve všech úrovních plic potkana. (23)

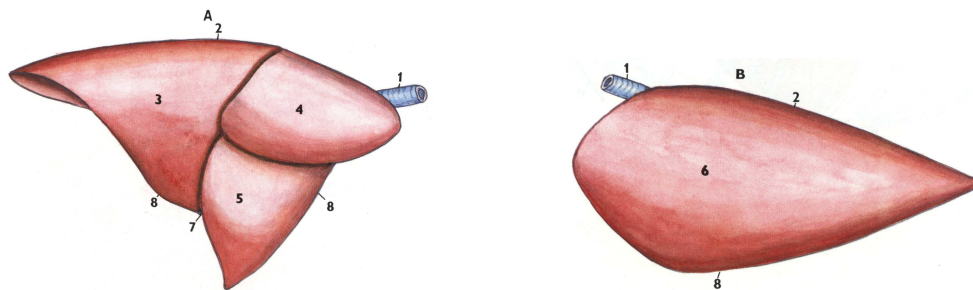
Řízení aktivity dýchacího ústrojí je zajištěno pomocí tkáňové výměny CO₂ v dýchacím centru v *medulla oblongata* a s účastí karotických tělísek. Karotická tělíska reagují na nízkou tenzi kyslíku v krvi. (23)

Cévní stěny jsou nejtenčí u potkana v plicní tepně a nejtlustší jsou v plicní žíle. Tato skutečnost je způsobena příčně pruhovanými svalovými vlákny (jsou podobná srdečním), která jsou nalézána ve stěnách intrapulmonálních cév. Toto uspořádání snadno umožňuje infekčnímu agens rozšířit se ze srdce, přes plicní žíly, do plic. (23)

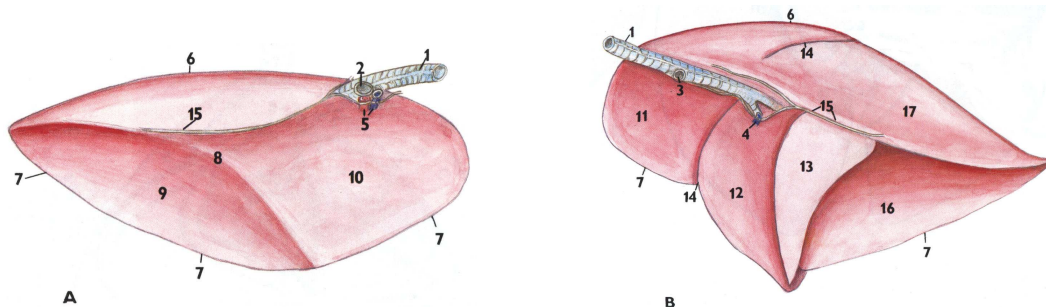
Podobně jako u člověka, prekapilární spoje v plicích se vyskytují jen v hilových oblastech plic. Plicní cévy se zužují při odpovědi na acetylcholin. (23)

Potkani mají v plicích bohatou inervaci, vysokou aktivitu serotoninu a naopak nízkou aktivitu histaminu. (23)

Stenovy žlázy leží v maxilárních sinusech a jsou totožné se solnými žlázami mořských ptáků. Žlázy regulují viskozitu mucinu a vlhkost vdechovaného vzduchu. (23)



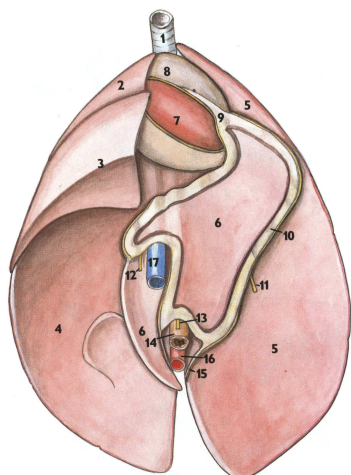
Obr. č. 9 Plice potkana z pravé (A) a levé (B) strany. Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 2. díl, 1990. 1 – trachea, 2 – *margo dorsalis obtusus*, 3 – *lobus caudalis pulmonis dextri*, 4 – *lobus cranialis pulmonis dextri*, 5 – *lobus medius pulmonis dextri*, 6 – *pulmo sinister*, 7 – *incisura interlobaris*, 8 – *margo ventralis*



Obr. č. 10 Levá (A) a pravá (B) polovina plic potkana při pohledu na mediastinální plochu.

Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 2. díl, 1990.

1 – trachea, 2 – bronchus principalis dexter, 3 – bronchus principalis sinister, 4 – v. pulmonalis dextra, 5 – a. et v. pulmonalis sinistra, 6 – margo dorsalis obtusus, 7 – margo ventralis acutus, 8 – margo basalis, 9 – facies diaphragmatica pulmonis sinistri, 10 – impressio cardiaca pulmonis sinistri, 11 – lobus cranialis pulmonis dextri, 12 – lobus medius pulmonis dextri, 13 – lobus accessorius pulmonis dextri, 14 – incisura cardiaca pulmonis dextri, 15 – insertio mediastini, 16, 17 – lobus caudalis pulmonis dextri, 16 – facies diaphragmatica pulmonis dextri



Obr. č. 11 Plice a srdce potkana při pohledu na bránicovou plochu.

Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 2. díl, 1990.

1 – trachea, 2 – lobus cranialis pulmonis dextri, 3 – lobus medius pulmonis dextri, 4 – lobus caudalis pulmonis dextri, 5 – pulmo sinister, 6 – lobus accessorius, 7 – cor, 8 – pericardium, 9 – lig. sternopericardiacum, 10 – mediastinum caudale, 11 – n. phrenicus sinister, 12 – n. phrenicus dexter, 13 – truncus vagalis ventralis, 14 – esophagus, 15 – insertio pleurae mediastinalis, 16 – aorta, 17 – v. cava caudalis

Hodnoty respiračního systému: (23)

Hmotnost plic	1,5 g/250 g hmotnosti těla potkana
Objem plic	2,1 ml/250 g hmotnosti těla potkana
Dechový objem	1,6 (0,6 – 2,0) ml
Dechová frekvence	90 (70 – 150) dechů za minutu
Průměr průdušnice	1,6 – 7,7 mm
Minutová ventilace	0,22 (0,16 – 0,24) l/minutu
Průměr alveolu (průměrně)	57 – 112 (70) μ m
Celkový povrch alveolů	7,5 m ² /400 g tělesné hmotnosti potkana

Tloušťka alveolo-kapilární bariéry	1,5 μm
Větvení alveolárních duktulů	2 – 5 větví
Průměr atrií	15 – 262 μm
Celková plicní kapacita	9,9 – 12,7 ml
Vitální kapacita	6,7 – 10,1 ml
Funkční reziduální kapacita	3,1 – 4,7 ml *
Reziduální objem	1,9 – 3,9 ml *

* 60-84 dní staří anestezovalí potkani.

Další průměrné hodnoty nejčastěji sledovaných parametrů adultních zvířat: (1)

Hmotnost samce	200-500 g
Hmotnost samice	250-350 g
Průměrná délka života samce	2-3 roky (max. 4 roky)
Průměrná délka života samice	2-3 roky (max. 4 roky)
Normální teplota těla	37,3 °C
Srdeční frekvence	260-600 min^{-1}
Množství krve	5-8 % tělesné hmotnosti
Arteriální krevní tlak systolický	12,67 kPa
Arteriální krevní tlak diastolický	12,13 kPa
Počet erytrocytů	5,5-10 $\text{mil} \cdot \text{mm}^{-3}$
Počet leukocytů	cca 12,5 tis . mm^{-3}
-neutrofilní granulocyty	18-36 %
-eozinofilní granulocyty	1-4 %
-bazofilní granulocyty	0-1 %
-lymfocyty	62-75 %
-monocyty	1-6 %
Počet trombocytů	cca 600 tis . mm^{-3}

Morče domácí

(*Cavia aperea varietas porcellus*)

Zoologické zařazení: Třída: Mammalia
Řád: Rodentia
Čeleď: Caviidae
Rod: *Cavia*
Druh: *Cavia aperea*



Obr. č. 12 Morče domácí. Převzato z Mettler, 1997.

Tělo je válcovité, kryté různobarevnou srstí. Hlava je široká a oválná. Ústa jsou malá, horní pysk je mohutnější než dolní a jeho ventrální polovina je zcela rozštěpená. Nos je kratší, tupý, ale výrazně rostrálně přesahuje dolní čelist. Oči jsou relativně velké, černé, u albínů červené. Uši má morče poměrně velké, posazené daleko od sebe po stranách hlavy. Jsou po obou stranách řídko ochlupené. Krk je krátký, silný a nevýrazný. Trup je široce válcovitý, hrudník široký. Hřbet je v klidu mírně dorsálně prohnutý, bez zřetelné hrudní kyfózy. V tříselné krajině je u samců i samic na každé straně patrná jedna mléčná bradavka. Pánev je širší, obdélníkovitá. Ocas je zcela rudimentární, tvořený maximálně 5-6 obratli. Hrudní končetiny jsou zřetelně kratší než pánevní a mají po čtyřech prstech. Pánevní končetiny jsou delší a mají 3 prsty. (1)

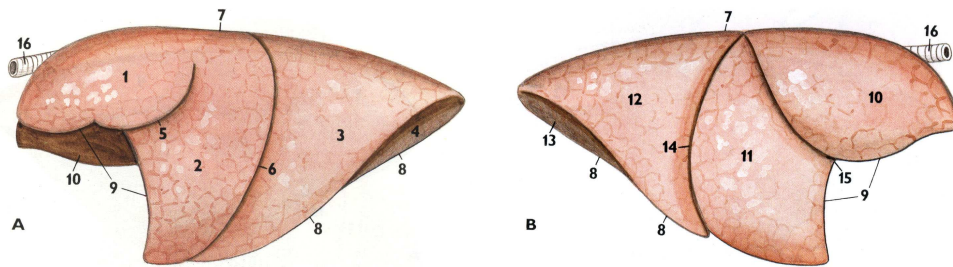
Respirační systém (*Apparatus respiratorius*)

Cavum nasi – v nosní dutině je vedle dorsální nosní skořepy výrazně členěná ventrální nosní skořepa. V kaudální části dutiny jsou uloženy další 3 velké kornoutovitě stočené čichové skořepy, které pokrývá zčásti membrana olfactoria. *Organum vomeronasale* je funkční a dobře vyvinuté. (1)

Trachea je dlouhá přibližně 3 cm o vnějším průměru asi 0,5 cm. Je tvořena chrupavkami ve tvaru podkovy, které ve stáří kalcifikují. Dorsálně ji uzavírá vazivo a *m. trachealis*, který přiléhá na sliznici *trachey*. V úrovni čtvrtého hrudního obratle se dělí na dva hlavní bronchy. (1)

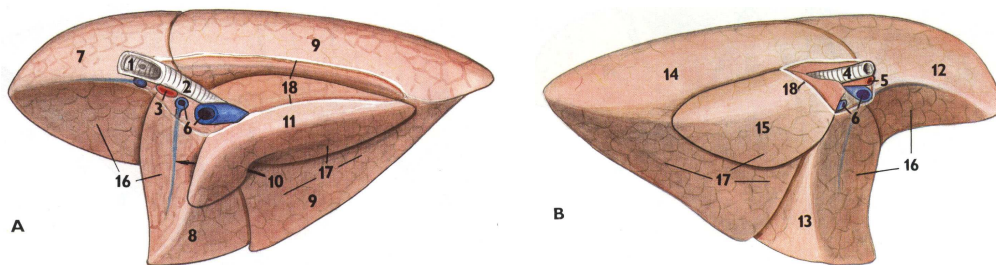
Pulmo – levá plíce je tvořena 2 základními laloky – *lobus cranialis et lobus caudalis*. *Lobus cranialis* se ještě dělí na *pars cranialis* a *pars caudalis*. Na levé plíci je z mediální strany napojen na levý hlavní bronchus třetí malý lalok – *lobus accessorius*

sinister. Pravá plíce je rozdělena ve 4 laloky – *lobus cranialis*, *lobus medius*, *lobus caudalis* a *lobus accessorius dexter*. Zářezy mezi jednotlivými laloky jsou velmi hluboké a dosahují zpravidla až k bronchům. (1)



Obr. č. 13 Plíce morčete při pohledu na levou (A) a pravou (B) plochu. Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 1. díl, 1990.

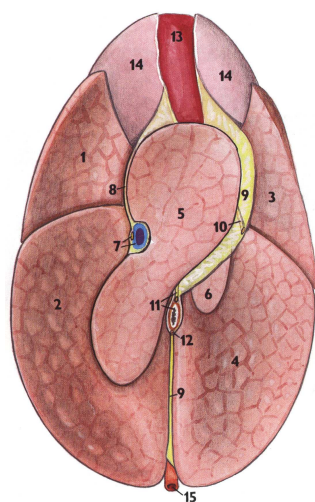
1,2,3 – *pulmo sinister, facies costalis*, 1 – *pars cranialis lobi cranialis*, 2 – *pars caudalis lobi cranialis*, 3,4 – *lobus caudalis*, 5 – *incisura cardiaca pulmonis sinistri*, 6 – *fissura interlobaris*, 7 – *margo dorsalis obtusus*, 8,9 – *margo acutus*, 8 – *margo basalis*, 9 – *margo ventralis*, 10, 11, 12 – *pulmo dexter, facies costalis*, 10 – *lobus cranialis*, 11 – *lobus medius*, 12,13 – *lobus caudalis*, 14 – *fissura interlobaris*, 15 – *incisura cardiaca pulmonis dextri*, 16 – *trachea*



Obr. č. 14 Pravá (A) a levá (B) polovina plic morčete při pohledu na mediastinální plochu.

Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 1. díl, 1990.

1 – *trachea*, 2 – *bronchus principalis dexter*, 3 – *a. pulmonalis dextra*, 4 – *bronchus principalis sinister*, 5 – *a. pulmonalis sinistra*, 6 – *vv. pulmonales*, 7 – *lobus cranialis pulmonis dextri*, 8 – *lobus medius pulmonis dextri*, 9 – *lobus caudalis pulmonis dextri*, 10 – *incisura v. cavae caudalis*, 11 – *lobus accessorius dexter*, 12 – *pars cranialis lobi cranialis pulmonis sinistri*, 13 – *pars caudalis lobi cranialis pulmonis sinistri*, 14 – *lobus caudalis pulmonis sinistri*, 15 – *lobus accessorius sinister*, 16 – *impressio cardiaca*, 17 – *facies diaphragmatica*, 18 – *insertio mediastini*



Obr. č. 15 Plíce a srdce morčete při pohledu na bránicovou plochu.

Převzato z Popesko, Rajtová, Horák, 1. díl, 1990.

- 1 – *lobus medius pulmonis dextri*,
 2 – *lobus caudalis pulmonis dextri*,
 3 – *pars caudalis lobi cranialis pulmonis sinistri*,
 4 – *lobus caudalis pulmonis sinistri*,
 5 – *lobus accessorius dexter*,
 6 – *lobus accessorius sinister*,
 7 – *v. cava caudalis, n. phrenicus dexter*,
 8 – *plica v. cavae caudalis*,
 9 – *mediastinum caudale*,
 10 – *n. phrenicus sinister*,
 11 – *esophagus, truncus vagalis ventralis*,
 12 – *truncus vagalis dorsalis*,
 13 – *apex cordis*,
 14 – *pericardium*,
 15 – *aorta descendens*

Některé průměrné hodnoty nejčastěji sledovaných parametrů adultních zvířat: (1)

Hmotnost samce	900-1500 g
Hmotnost samice	700-1300 g
Průměrná délka života samce	až 8 let (max. 15 let)
Průměrná délka života samice	2-3 roky (max. 8 let)
Normální teplota těla	38,3 °C
Srdeční frekvence	150-300 min ⁻¹
Dechová frekvence	70-150 min ⁻¹
Množství krve	5,8 % tělesné hmotnosti
Arteriální krevní tlak systolický	13,2 kPa
Arteriální krevní tlak diastolický	5,87 kPa
Počet erytrocytů	4,5 mil . mm ⁻³
Počet leukocytů	8-10 tis . mm ⁻³
-neutrofilní granulocyty	18-35 %
-eozinofilní granulocyty	1-5 %
-bazofilní granulocyty	3 %
-lymfocyty	55-80 %
-monocyty	3-12 %
Počet trombocytů	115 tis . mm ⁻³

III. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

1. Použitý materiál

a) Chemikálie

Acetylcholin, Fluka, 01030, LOT 367037/1 597

Fyziologický roztok

Heparin, LÉČIVA, 4050702

Histamin, Sigma – Aldrich, H-7250, LOT127H1167

Hydroxid hlinitý, Sigma – Aldrich, 11033 LOT20320

Ovalbumin, Sigma – Aldrich, A-5503, LOT71K7028

Pentobarbital, SPOFA, 41050590

Propranolol, Sigma – Aldrich, P-0884, LOT 02K1489

Sukcinylocholin, Sigma – Aldrich, S-8251, LOT 21K1659

Serotonin, Sigma – Aldrich, H-9523, LOT121K7059

Urethan, Sigma – Aldrich, U-2500, LOT 22K1248

b) Pomůcky

Cévní svorky (tzv. „buldočky“)

Injekční stříkačky

Jehly

Laboratorní sklo

Ligatury

Nůžky: rovné, zahnuté, oční

Operační stolek

Peán

Pinzety: rovné anatomické (bez zoubků na konci), chirurgické (tkáňové) se zoubky na konci, zahnuté bez zoubků na konci

Pipety

Polyethylenová kanyla

Skleněná tracheální kanyla

c) Přístroje

Aparatura pro měření plicní rezistence Hugo Sachs Elektronik s počítačovým výstupem

Laboratorní váhy Kern

d) Zvířata

Laboratorní potkan, kmen Wistar, průměrná hmotnost 310 g, dodavatel Biotest
Konárovice, Česká republika

Laboratorní potkan, kmen Brown Norway, průměrná hmotnost 210 g, dodavatel Anlab
Praha, Česká republika

Laboratorní morče, průměrná hmotnost 290 g, dodavatel Biotest Konárovice, Česká
republika

Zvířata byla umístěna ve viváriu FaF UK a chována za standardních laboratorních
podmínek. Projekt pokusu byl schválen etickou komisí FaF UK.

2. Metodika

a) Uspořádání pokusu

Po podání serotoninu, acetylcholinu a histaminu byla u zvířat měřena bronchiální reaktivita, pomocí parametru plicní rezistence. V experimentu byly použity 3 druhy zvířat – potkan Wistar, potkan Brown Norway a morče; jejich rozdělení uvádí následující tabulka:

POTKANI WISTAR	Nesenzibilizovaní (NS) – kontrolní skupina zvířat, která nebyla senzibilizovaná ovalbuminem; n = 3
	Senzibilizovaní (S) – skupina zvířat senzibilizovaných ovalbuminem; n = 4
POTKANI BROWN NORWAY	Nesenzibilizovaní (NS) – kontrolní skupina zvířat, která nebyla senzibilizovaná ovalbuminem; n = 3
	Senzibilizovaní (S) – skupina zvířat senzibilizovaných ovalbuminem; n = 7
MORČATA	Nesenzibilizovaní (NS) – kontrolní skupina zvířat, která nebyla senzibilizovaná ovalbuminem; n = 4
	Senzibilizovaní (S) – skupina zvířat senzibilizovaných ovalbuminem; n = 4

Tabulka č. 2 Rozdělení zvířat do skupin

b) Senzibilizace

Navození modelu alergického astmatu u zvířat bylo provedeno metodou podle Elwooda (2), která navozuje zvýšení protilátek typu IgE. Zvířeti byla intraperitoneálně podána dávka 1 mg ovalbuminu (OA) a 100 mg hydroxidu hlinitého $Al(OH)_3$ v 1 ml fyziologického roztoku. Tato aplikace byla opakována ve třech po sobě následujících dnech. Vlastní pokus pak následoval v rozmezí 21-30 dnů od podání první dávky OA. Během této doby bylo každý týden prováděno vážení zvířat a jejich hmotnosti zaznamenávány. Cílem bylo zjistit, zda zvířata prospívají a přibývají na hmotnosti.

Vlastnímu pokusu (za 21 dní po i.p. senzibilizaci OA) předcházela antigen challenge – inhalace aerosolu ovalbuminu (100 mg ovalbuminu/2 ml fyziologického roztoku u potkanů; 2 mg ovalbuminu/2 ml fyziologického roztoku u morčat) 24 hodin před experimentem. Systém používaný k inhalaci byl sestaven z průhledné plastové komory (o přibližném objemu 4 l), která byla napojena na trysku HSE nebulizátoru. Částice aerosolu vytvořené nebulizátorem byly menší než 10 μm a 60 % těchto částic

bylo menších než 2,5 μm (deklarováno výrobcem). Výkon nebulizátoru byl přibližně 18-20 ml/h.

Zvířata byla po určitou dobu umístěna do komory vyplněné aerosolem. Potkani byli vystaveni inhalaci do vyčerpání roztoku ovalbuminu, morčata, která jsou citlivější, po dobu 0,5-2 min v závislosti na reakci zvířete.



Obr. č. 16 HSE nebulizátor. Převzato z www.harvardapparatus.com

c) Anestezie

Anestezie byla všem zvířatům navozena intraperitoneálně. U potkanů kmene Wistar a Brown Norway byl použit pentobarbital v dávce 40-45 mg/kg. U morčat byl použit 30 % urethan v dávce 1,5 g/kg. V průběhu celého experimentu (cca 30 min) byla zvířata v chirurgické anestezii.

d) Kanylace v. jugularis externa

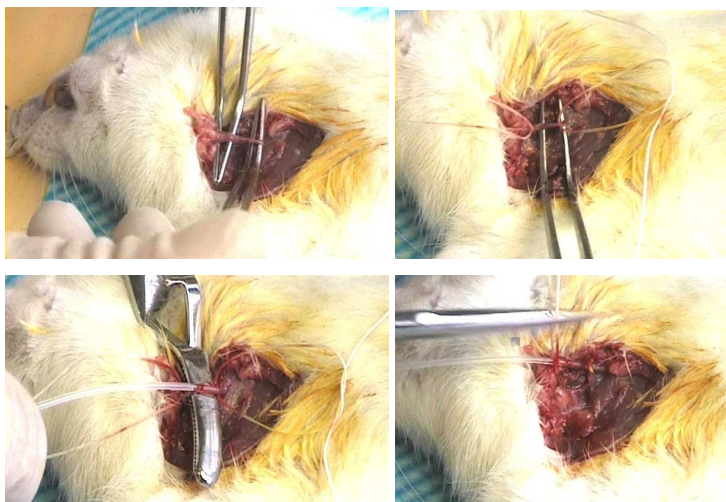
Zvíře v celkové anestezii bylo fixováno na operačním stolku v poloze na zádech, pomocí ligatur upevněných na končetinách a zachycením horních řezáků. Ligatury byly upevněny tak, aby bylo zvíře bezpečně fixováno, ale zároveň nebyly distálně ischemizovány končetiny.



Obr. č. 17 Potkan fixovaný na operačním stolku. Převzato z Živná, 2001

Pro zvýšení žilní náplně bylo zvíře na operačním stolku mírně skloněno hlavou dolů. Chirurgickou pinzetou jsme nadzvedli část kůže v oblasti budoucího operačního

pole a provedli rovnými nůžkami nástřih kůže. Nástřih byl veden sagitálně v oblasti *v. jugularis externa* v délce asi 2-3 cm. Pinzetami jsme tupě odpreparovali kůži od podkožního vaziva, čímž se nám obnažilo podkoží krku, pod kterým prosvítala *v. jugularis externa*. Pomocí zahnutých pinzet jsme žílu jemně vypreparovali a očistili od vaziva. Poté jsme připravili spodní a horní ligaturu. Horní ligaturou jsme žílu podvázali, na spodní jsme pouze připravili smyčku. Ostrými očními nůžkami byl proveden nástřih asi do třetiny *v. jugularis* a do vzniklého otvoru v žíle byla zasunuta kanyla naplněná heparinizovaným fyziologickým roztokem (k zábraně hemokoagulace). Kanylu v žíle jsme upevnili připravenou spodní ligaturou a horní ligaturou zafixovali. Zkontrolovali jsme, zda je možné provádět intravenózní podání, zejména zda v místě kanylace neuniká krev a nebo podávaný roztok.



Obr. č. 18-21 Preparace *v. jugularis externa* u potkana . Převzato z Živná, 2001

e) Tracheální kanylace

Pod slinnými žlázami je uložen nepárový *musculus digastricus*, který jsme rozstříhli ve střední čáře a odtáhli do stran. Pod *m. digastricus* se nachází *trachea*. *Tracheu* jsme opatrně vypreparovali, připravili pod ni dvě ligatury a v prostoru mezi nimi *tracheu* horizontálně nastříhli. Řez byl veden skrz *ligamentum tracheale (anulare)* mezi druhou a třetí tracheální chrupavkou (*cartilago trachealis*). Do vzniklého otvoru jsme zasunuli centrálním směrem skleněnou kanylu. Obě ligatury jsme utáhli. Centrální ligatura fixuje kanylu v průdušnici, periferní pak úplně uzavírá dýchací cesty. Zvíře tedy ventiluje pouze kanylou. Při správném provedení je po kanylaci zachována normální dechová

frekvence (u potkana 90-100 dechů/min, u morčat 60 dechů/min) i normální hloubka dýchání.

Přes tracheální kanylu bylo následně zvíře napojeno na dýchací přístroj Hugo Sachs (u potkanů byla nastavena dechová frekvence 90 dechů/min, u morčat 60 dechů/min a objem ventilovaného vzduchu 10 ml/kg hmotnosti). Vlastní respirace zvířete byla utlumena i.v. podáním sukcinylcholinu (2 mg/kg), který depolarizuje nervosvalovou ploténku na dobu několika minut. Jeho podání bylo provázeno křečovitými stahy svalstva celého těla (fascikulace) postupujícími od hlavy k dolním končetinám. Po proběhnutí této vlny stahů následovala relaxace svalstva, a proto byla v této chvíli důležitá umělá plicní ventilace z důvodu paralýzy dýchacích svalů.



Obr. č. 22 Vypreparovaná *trachea* (A) a zavedená tracheální kanyla (B). Převzato z www.lf3.cuni.cz
1 – rozstřižený *m. digastricus*, 2 – *cartilago thyroidea*, 3 – *trachea*

f) Aplikované látky

Přehled aplikovaných látek a jejich koncentrace u jednotlivých druhů zvířat uvádí následující tabulka:

Zvíře	Látka	Podávané koncentrace
POTKAN WISTAR	serotonin	5, 10, 20, 50 µg/kg
POTKAN BROWN NORWAY	serotonin	5, 10, 20, 50 µg/kg
MORČE	serotonin	5, 10, 20, 50 µg/kg
	acetylcholin	1, 5, 10, 20, 50 µg/kg
	histamin	0,1, 0,5, 1, 2, 5 µg/kg

Tabulka č. 3 Přehled aplikovaných látek a jejich koncentrace u jednotlivých druhů zvířat

Kromě výše uvedených látek jsme u potkana jednorázově ověřili, že nereaguje na histamin.

g) Měření bronchiální reaktivity

Bronchiální reaktivita byla hodnocena pomocí měření plicní rezistence pneumotachometrem „Fleisch tube“ a zaznamenávána pomocí diferenčního tlakového transduceru a softwaru HSE Pulmodyn. Nárůst plicní rezistence byl známkou bronchokonstrikce. Aby se zvýšila zaznamenaná odpověď, byl 5 min před prvním podáním zkoumané bronchokonstrikční látky zvířeti podán i.v. propranolol (1 mg/kg). Ze záznamu plicní rezistence byla po podání každé koncentrace následně odečtena maximální dosažená hodnota. Mezi podáním jednotlivých dávek byl ponechán odstup 3 min. Tento interval stačí k tomu, aby se hodnota plicní rezistence vrátila na bazální hodnotu. Po pokusu bylo zvíře usmrceno předávkováním anestezie.

IV. VÝSLEDKY

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí t-testu a změny považovány za signifikantní při $p \leq 0,05$. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota \pm SEM.

1. Sledování hmotnosti zvířat

Během pokusu všechna zvířata prospívala a vykazovala odpovídající váhový přírůstek.

2. Sledování bronchiální reaktivity

POTKANI KMENE WISTAR

Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 3 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 275$ g a skupina senzibilizovaná, ve které byla 4 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 330$ g.

Účinky intravenózně podávaného serotoninu na bronchiální reaktivitu potkanů kmene Wistar

Intravenózní podání serotoninu (5-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) vyvolalo u potkanů bronchokonstrikční odpověď závislou na podané dávce. Bronchospasmus u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl výraznější než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. Po podání poslední dávky serotoninu byl nárůst plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat $312,35 \pm 43,31$ % ($n = 3$) a u senzibilizovaných zvířat $392,58 \pm 48,95$ % ($n = 4$) vzhledem k bazální hodnotě (tabulka č. 4B a graf č. 1).

A.

cmH ₂ O/ml/sec	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
		5	10	20	50
NS	0,27 \pm 0,04	0,31 \pm 0,04	0,36 \pm 0,06	0,47 \pm 0,10	0,86 \pm 0,20
S	0,42 \pm 0,06	0,54 \pm 0,09	0,64 \pm 0,10	0,94 \pm 0,20	1,74 \pm 0,49

B.

%	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu (µg/kg)			
		5	10	20	50
NS	100,00±0,00	114,04±2,51	133,97±11,61	173,94±23,41	312,35±43,31
S	100,00±0,00	126,44±5,25	150,09±3,78	219,00±17,56	392,58±48,95

Tabulka č. 4 Průměrné hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu potkanům Wistar (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). Počet zvířat n = 7; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

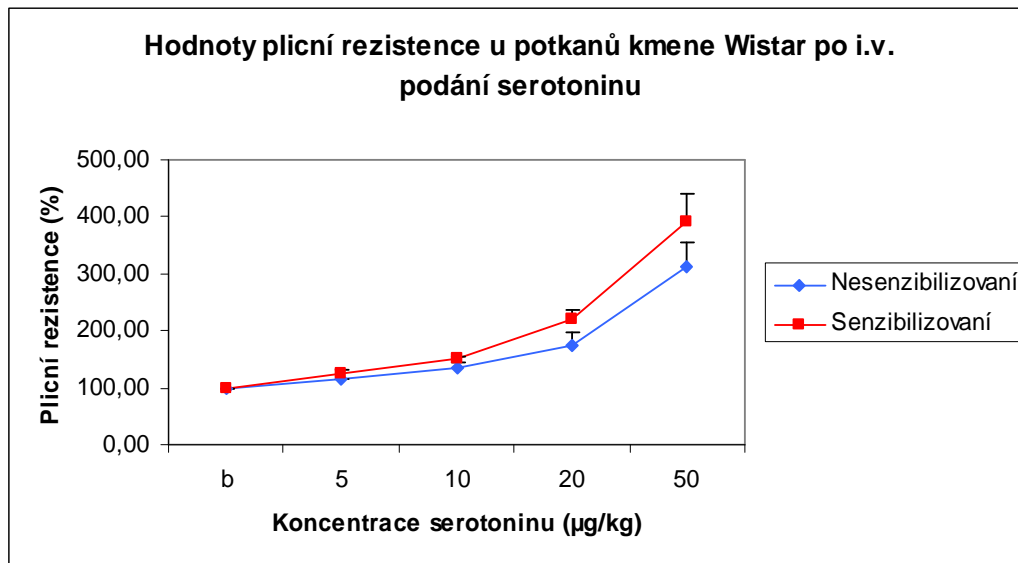
A.

cmH ₂ O/ml/sec	Zvíře	Bazální hodnota	5 µg/kg serotoninu	10 µg/kg serotoninu	20 µg/kg serotoninu	50 µg/kg serotoninu
NS	W1-1	0,29	0,34	0,45	0,64	1,15
	W1-2	0,19	0,22	0,25	0,29	0,48
	W1-3	0,33	0,36	0,38	0,49	0,95
S	W2-1	0,42	0,48	0,60	0,81	1,32
	W2-2	0,36	0,50	0,52	0,67	1,40
	W2-3	0,31	0,38	0,49	0,74	1,04
	W2-4	0,60	0,78	0,93	1,55	3,19

B.

%	Zvíře	Bazální hodnota	5 µg/kg serotoninu	10 µg/kg serotoninu	20 µg/kg serotoninu	50 µg/kg serotoninu
NS	W1-1	100,00	117,24	155,17	220,69	396,55
	W1-2	100,00	115,79	131,58	152,63	252,63
	W1-3	100,00	109,09	115,15	148,48	287,88
S	W2-1	100,00	114,29	142,86	192,86	314,29
	W2-2	100,00	138,89	144,44	186,11	388,89
	W2-3	100,00	122,58	158,06	238,71	335,48
	W2-4	100,00	130,00	155,00	258,33	531,67

Tabulka č. 5 Hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu jednotlivým potkanům Wistar (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 1 Hodnoty plicní rezistence v % u potkanů kmene Wistar po i.v. podání serotoninu

POTKANI KMENE BROWN NORWAY

Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 3 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 193$ g a skupina senzibilizovaná, ve které bylo 7 zvířat o průměrné hmotnosti $m = 217$ g.

Účinky intravenózně podávaného serotoninu na bronchiální reaktivitu potkanů kmene Brown Norway

Intenzita bronchokonstrikční odpovědi se zvyšovala s postupně se zvyšujícími koncentracemi podávaného serotoninu (5-50 $\mu\text{g/kg}$). Bronchospasmus u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl výraznější než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. Po podání poslední dávky serotoninu byl nárůst plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat $283,97 \pm 67,31$ % ($n = 3$) a u senzibilizovaných zvířat $491,29 \pm 42,51$ % ($n = 7$) vzhledem k bazální hodnotě (tabulka č. 6B a graf č. 2). Mezi hodnotami byl signifikantní rozdíl.

A.

cmH ₂ O/ml/sec	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu ($\mu\text{g/kg}$)			
		5	10	20	50
NS	0,43 \pm 0,02	0,47 \pm 0,01	0,61 \pm 0,01	0,78 \pm 0,09	1,14 \pm 0,23
S	0,52 \pm 0,01	0,66 \pm 0,04	0,80 \pm 0,08	1,31 \pm 0,23	2,58 \pm 0,22

B.

%	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu ($\mu\text{g/kg}$)			
		5	10	20	50
NS	100,00 \pm 0,00	111,35 \pm 4,59	144,79 \pm 10,14	186,12 \pm 30,03	283,97 \pm 67,31
S	100,00 \pm 0,00	125,63 \pm 7,93	153,33 \pm 15,36	249,26 \pm 44,51	491,29 \pm 42,51

Tabulka č. 6 Průměrné hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu potkanům Brown Norway (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). Počet zvířat $n = 10$; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

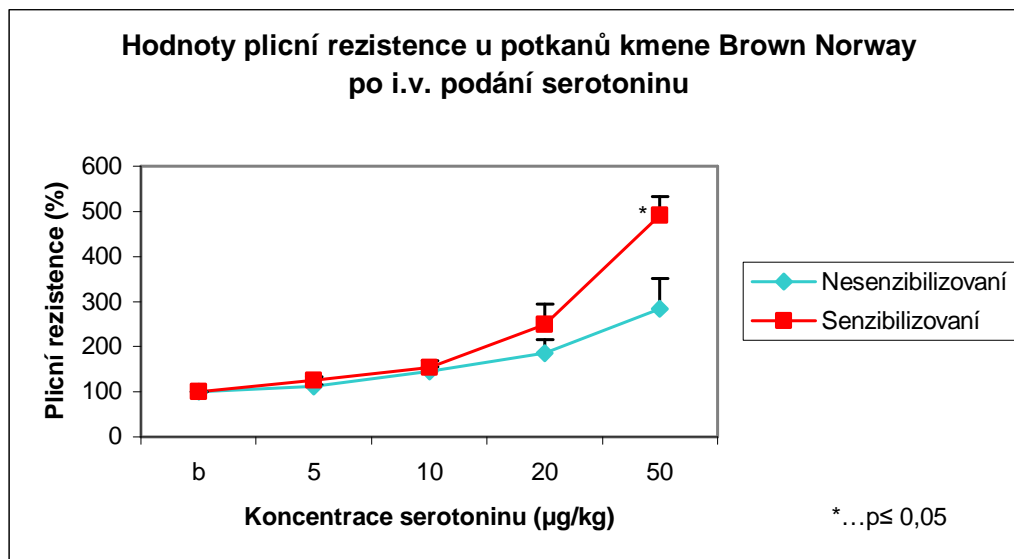
A.

cmH ₂ O/ml/sec	Zvíře	Bazální hodnota	5 µg/kg serotoninu	10 µg/kg serotoninu	20 µg/kg serotoninu	50 µg/kg serotoninu
NS	B1-1	0,39	0,47	0,64	0,96	1,37
	B1-2	0,47	0,50	0,61	0,74	---
	B1-3	0,42	0,45	0,59	0,65	0,91
S	B2-1	0,53	0,65	0,79	0,91	3,13
	B2-2	0,56	0,57	0,58	1,19	2,53
	B2-3	0,53	0,54	0,54	0,51	2,29
	B2-4	0,50	0,70	0,85	1,41	1,94
	B2-5	0,50	0,65	0,90	---	---
	B2-6	0,54	0,87	1,16	1,95	---
	B2-7	0,50	0,61	0,77	1,86	2,97

B.

%	Zvíře	Bazální hodnota	5 µg/kg serotoninu	10 µg/kg serotoninu	20 µg/kg serotoninu	50 µg/kg serotoninu
NS	B1-1	100,00	120,51	164,10	246,15	351,28
	B1-2	100,00	106,38	129,79	157,45	---
	B1-3	100,00	107,14	140,48	154,76	216,67
S	B2-1	100,00	122,64	149,06	171,70	590,57
	B2-2	100,00	101,79	103,57	212,50	451,79
	B2-3	100,00	101,89	101,89	96,23	432,08
	B2-4	100,00	140,00	170,00	282,00	388,00
	B2-5	100,00	130,00	180,00	---	---
	B2-6	100,00	161,11	214,81	361,11	---
	B2-7	100,00	122,00	154,00	372,00	594,00

Tabulka č. 7 Hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu jednotlivým potkanům Brown Norway (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 2 Hodnoty plicní rezistence v % u potkanů kmene Brown Norway po i.v. podání serotoninu

MORČATA

Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – skupina nesenzibilizovaná (kontrolní skupina), ve které byla celkem 4 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 300$ g a skupina senzibilizovaná, ve které byla také 4 zvířata o průměrné hmotnosti $m = 275$ g.

Účinky intravenózně podávaného serotoninu na bronchiální reaktivitu morčat

Intravenózní podání serotoninu (5-50 $\mu\text{g/kg}$) vyvolalo u morčat bronchokonstrikční odpověď závislou na podané dávce. Bronchospasmus u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl však menší než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. Po podání poslední dávky serotoninu byl nárůst plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat $994,76 \pm 179,62$ % ($n = 3$) a u senzibilizovaných zvířat $709,90 \pm 2,12$ % ($n = 3$) vzhledem k bazální hodnotě (tabulka č. 8B a graf č. 3).

A.

cmH ₂ O/ml/sec	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu ($\mu\text{g/kg}$)			
		5	10	20	50
NS	0,68 \pm 0,11	1,62 \pm 0,45	3,50 \pm 0,46	5,35 \pm 0,21	6,60 \pm 1,03
S	0,67 \pm 0,08	1,15 \pm 0,37	1,63 \pm 0,85	2,38 \pm 0,94	4,78 \pm 0,57

B.

%	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace serotoninu ($\mu\text{g/kg}$)			
		5	10	20	50
NS	100,00 \pm 0,00	230,59 \pm 28,83	518,84 \pm 20,07	816,71 \pm 102,25	994,76 \pm 179,62
S	100,00 \pm 0,00	190,06 \pm 86,70	282,38 \pm 179,01	394,55 \pm 200,61	709,90 \pm 2,12

Tabulka č. 8 Průměrné hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). Počet zvířat $n = 6$; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

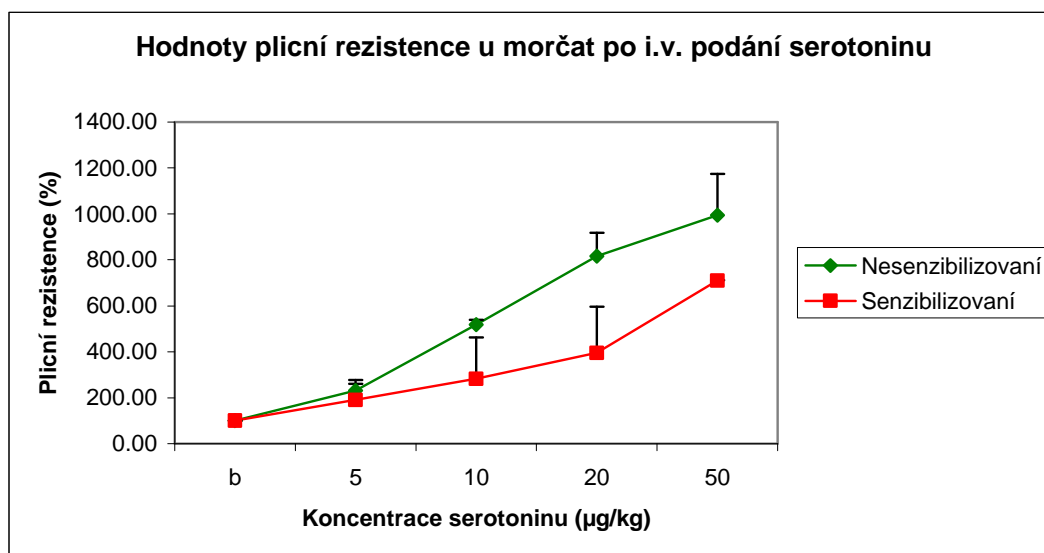
A.

cmH ₂ O/ml/sec	Zvíře	Bazální hodnota	5 $\mu\text{g/kg}$ serotoninu	10 $\mu\text{g/kg}$ serotoninu	20 $\mu\text{g/kg}$ serotoninu	50 $\mu\text{g/kg}$ serotoninu
NS	M1-1	0,58	1,05	3,24	4,94	7,85
	M1-2	0,89	2,50	4,40	5,56	7,41
	M1-3	0,57	1,31	2,87	5,55	4,55
S	M2-1	0,52	1,89	3,33	4,07	3,67
	M2-2	0,78	0,80	0,80	2,25	5,56
	M2-3	0,72	0,75	0,75	0,81	5,12

B.

%	Zvíře	Bazální hodnota	5 µg/kg serotoninu	10 µg/kg serotoninu	20 µg/kg serotoninu	50 µg/kg serotoninu
NS	M1-1	100,00	181,03	558,62	851,72	1353,45
	M1-2	100,00	280,90	494,38	624,72	832,58
	M1-3	100,00	229,82	503,51	973,68	798,25
S	M2-1	100,00	363,46	640,38	782,69	705,77
	M2-2	100,00	102,56	102,56	288,46	712,82
	M2-3	100,00	104,17	104,17	112,50	711,11

Tabulka č. 9 Hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace serotoninu jednotlivým morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 3 Hodnoty plicní rezistence v % u morčat po i.v. podání serotoninu

Účinky intravenózně podávaného acetylcholinu na bronchiální reaktivitu morčat

Intravenózní podání acetylcholinu (1-50 µg/kg) vyvolalo u morčat bronchokonstrikční odpověď, jejíž intenzita se zvyšovala s postupně se zvyšujícími koncentracemi podávaného acetylcholinu. Bronchospasmus u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl výraznější než u zvířat z kontrolní skupiny, která senzibilizována nebyla. Po podání poslední dávky acetylcholinu byl nárůst plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat 447,74±89,27 % (n = 3) a u senzibilizovaných zvířat 746,58±43,98% (n = 4) vzhledem k bazální hodnotě (tabulka č. 10B a graf č. 4). Rozdíl mezi hodnotami byl významný.

A.

cmH ₂ O/ml/sec	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace acetylcholinu (µg/kg)				
		1	5	10	20	50
NS	0,62±0,11	0,65±0,14	0,82±0,26	1,02±0,40	2,02±0,77	2,89±0,93
S	0,53±0,03	0,58±0,06	1,04±0,28	1,93±10,61	3,37±0,78	4,01±0,44

B.

%	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace acetylcholinu (µg/kg)				
		1	5	10	20	50
NS	100,00±0,00	103,53±3,53	125,98±15,33	152,13±30,78	304,90±64,16	447,74±89,27
S	100,00±0,00	107,77±4,59	189,74±44,57	349,08±99,60	615,75±121,59	746,58±43,98

Tabulka č. 10 Průměrné hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace acetylcholinu morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). Počet zvířat n = 7; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

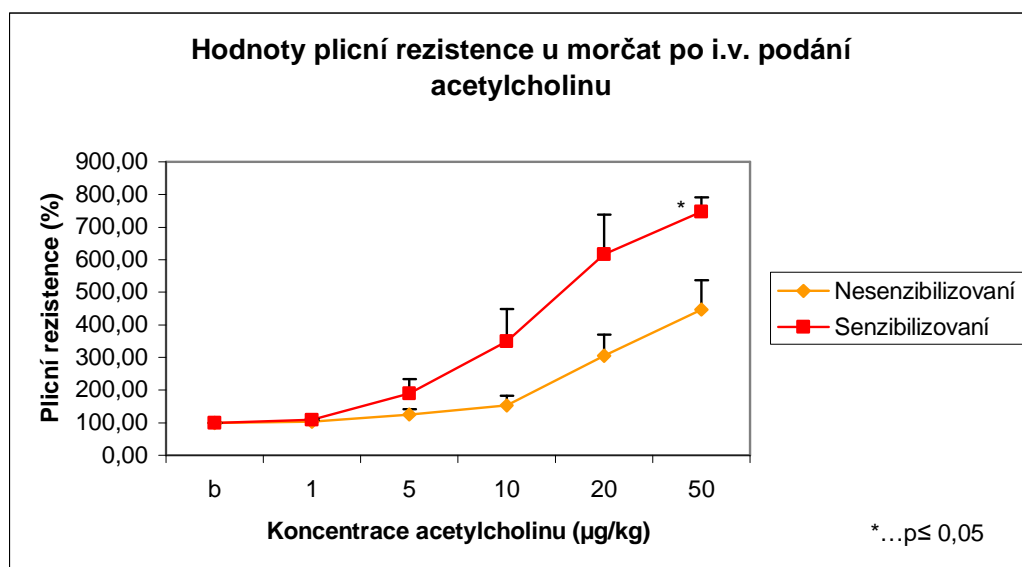
A.

cmH ₂ O/ml/sec	Zvíře	Bazální hodnota	1 µg/kg Ach	5 µg/kg Ach	10 µg/kg Ach	20 µg/kg Ach	50 µg/kg Ach
NS	M1-1	0,85	0,94	1,33	1,81	3,54	4,59
	M1-2	0,50	0,50	0,54	0,65	1,52	2,67
	M1-3	0,52	0,52	0,59	0,59	1,01	1,4
S	M2-1	0,46	0,46	0,51	0,62	1,46	3,17
	M2-2	0,51	0,52	0,71	1,47	2,92	3,47
	M2-3	0,59	0,71	1,16	2,13	3,94	5,14
	M2-4	0,57	0,62	1,78	3,49	5,16	4,25

B.

%	Zvíře	Bazální hodnota	1 µg/kg Ach	5 µg/kg Ach	10 µg/kg Ach	20 µg/kg Ach	50 µg/kg Ach
NS	M1-1	100,00	110,59	156,47	212,94	416,47	540,00
	M1-2	100,00	100,00	108,00	130,00	304,00	534,00
	M1-3	100,00	100,00	113,46	113,46	194,23	269,23
S	M2-1	100,00	100,00	110,87	134,78	317,39	689,13
	M2-2	100,00	101,96	139,22	288,24	572,55	680,39
	M2-3	100,00	120,34	196,61	361,02	667,80	871,19
	M2-4	100,00	108,77	312,28	612,28	905,26	745,61

Tabulka č. 11 Hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace acetylcholinu jednotlivým morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 4 Hodnoty plicní rezistence v % u morčat po i.v. podání acetylcholinu

Účinky intravenózně podávaného histaminu na bronchiální reaktivitu morčat

Intenzita bronchokonstrikční odpovědi u morčat se zvyšovala s postupně se zvyšujícími koncentracemi podávaného histaminu (0,1-5 µg/kg). Bronchospasmus u zvířat senzibilizovaných ovalbuminem a po challenge antigenem byl větší než u zvířat z kontrolní skupiny, která nebyla senzibilizována. Po podání předposlední dávky histaminu (2 µg/kg) byl nárůst plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat 238,39±35,78 % (n = 4) a u senzibilizovaných zvířat 267,59±63,44 % (n = 4) vzhledem k bazální hodnotě. Po podání poslední dávky histaminu (5 µg/kg) byla však hodnota plicní rezistence u nesenzibilizovaných zvířat vyšší než u zvířat senzibilizovaných (tabulka č. 12B a graf č. 5).

A.

cmH ₂ O/ml/sec	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace histaminu (µg/kg)				
		0,1	0,5	1	2	5
NS	0,44±0,07	0,51±0,08	0,52±0,10	0,59±0,10	1,18±0,38	4,09±0,41
S	0,40±0,03	0,42±0,04	0,46±0,05	0,60±0,12	1,12±0,32	3,65±0,34

B.

%	Bazální hodnota	i.v. podaná koncentrace histaminu (µg/kg)				
		0,1	0,5	1	2	5
NS	100,00±0,00	116,12±9,79	110,99±1,22	132,35±4,70	238,39±35,78	961,02±107,54
S	100,00±0,00	104,68±1,93	114,75±5,23	146,69±22,52	267,59±63,44	914,05±47,50

Tabulka č. 12 Průměrné hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace histaminu morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). Počet zvířat n = 8; NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat

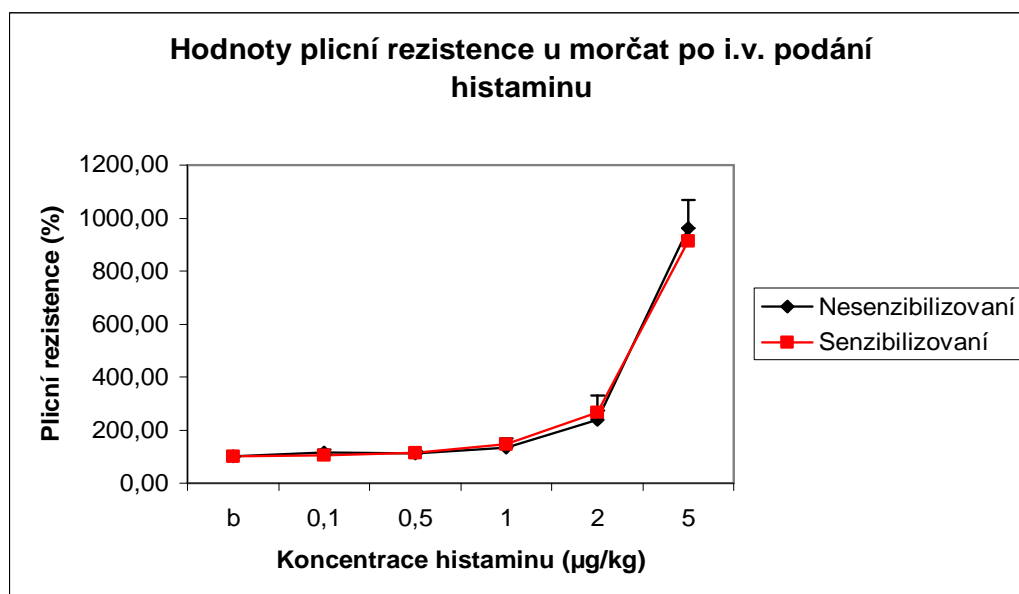
A.

cmH ₂ O/ml/sec	Zvíře	Bazální hodnota	0,1 µg/kg His	0,5 µg/kg His	1 µg/kg His	2 µg/kg His	5 µg/kg His
NS	M1-1	0,35	0,38	---	0,50	---	2,90
	M1-2	0,64	0,69	0,72	0,88	1,88	4,82
	M1-3	0,35	0,36	0,38	0,43	0,60	4,31
	M1-4	0,42	0,61	0,47	0,53	1,05	4,33
S	M2-1	0,31	0,32	0,34	0,38	0,44	3,10
	M2-2	0,39	0,39	0,40	0,46	0,85	3,16
	M2-3	0,46	0,50	0,56	0,61	1,24	4,55
	M2-4	0,44	0,47	0,55	0,94	1,94	3,77

B.

%	Zvíře	Bazální hodnota	0,1 µg/kg His	0,5 µg/kg His	1 µg/kg His	2 µg/kg His	5 µg/kg His
NS	M1-1	100,00	108,57	---	142,86	---	828,57
	M1-2	100,00	107,81	112,50	137,50	293,75	753,13
	M1-3	100,00	102,86	108,57	122,86	171,43	1231,43
	M1-4	100,00	145,24	111,90	126,19	250,00	1030,95
S	M2-1	100,00	103,23	109,68	122,58	141,94	1000,00
	M2-2	100,00	100,00	102,56	117,95	217,95	810,26
	M2-3	100,00	108,70	121,74	132,61	269,57	989,13
	M2-4	100,00	106,82	125,00	213,64	440,91	856,82

Tabulka č. 13 Hodnoty plicní rezistence (cmH₂O/ml/sec) naměřené po intravenózním podání vzestupné koncentrace histaminu jednotlivým morčatům (A). Tytéž hodnoty vyjádřené v procentech vzhledem k bazální hodnotě plicní rezistence (B). NS = skupina nesenzibilizovaných zvířat, S = skupina senzibilizovaných zvířat



Graf č. 5 Hodnoty plicní rezistence v % u morčat po i.v. podání histaminu

V. DISKUZE

Asthma bronchiale je chronické zánětlivé onemocnění dýchacích cest, kde hrají roli mnohé buňky, zejména mastocyty, eozinofily a T-lymfocyty. Chronický zánět je spojen s průduškovou hyperreaktivitou a vede k opakujícím se epizodám pískotů, dušnosti, tíže na hrudi a kašle, zvláště v noci nebo časně ráno. Tyto epizody jsou obvykle spojeny s variabilní obstrukcí, která je často reverzibilní buď spontánně nebo vlivem léčby (definice dle GINA = Global Initiative for Asthma). Dalšími typickými projevy astmatu jsou především zvýšená vaskulární permeabilita doprovázená edémem, zvýšená mukózní sekrece a infiltrace plicní tkáně zánětlivými buňkami.

Ačkoliv se na patofyziologii astmatu podílí celá řada zánětlivých buněk, hlavní roli zde hraje především zvýšený výskyt eozinofilů v dýchacích cestách. Ostatní buňky, jako např. neutrofilů, bazofilů, T-lymfocyty a žírné buňky se na rozvoji zánětu v dýchacích cestách podílí také, nicméně jejich úloha není rozhodující.

Všechny buňky, které se účastní rozvoje zánětlivé reakce, uvolňují v místě infekce nebo poškozené tkáně množství mediátorů regulujících přestup a aktivitu dalších buněk. Z mastocytů se degranulací uvolňuje histamin, spazmogenně působící peptidy, dochází k rychlé tvorbě spazmogenně působících leukotrienů LTC₄ a LTD₄, PAF (platelet activating factor), prostaglandinů a LTB₄, působícího chemotakticky především na eozinofily a mononukleáry; posléze svou roli uplatňují i α - a β -chemokiny, tromboxany, serotonin a mnoho dalších. Všechny tyto aspekty byly již mnohokrát popsány a zkoumány na mnoha modelech experimentálního astmatu. (17)

Cílem této práce bylo optimalizovat model alergického astmatu a přispět k jeho zavedení na Farmaceutické fakultě. Použitý protokol přitom vycházel z modelů popsaných v odborné literatuře. Soustředili jsme se na vybrání vhodného zvířecího druhu a dále pak na zvolení vhodné bronchokonstrikční látky, která po kumulativním i.v. podání vyvolá měřitelné změny plicní rezistence a tak umožní hodnocení reaktivity dýchacích cest. Kromě toho jsme vždy ověřili i účinnost zvoleného modelu porovnáním s kontrolní skupinou.

1. Určení nejvhodnějšího zvířecího druhu.

V diplomové práci jsme srovnávali potkany Wistar, potkany Brown Norway a morčata. Jejich volba nebyla náhodná. Všechny tři druhy jsou experimentálně běžně používané, a to i v experimentech na dýchacím systému. Chtěli jsme proto ověřit, který z nich je nejvýhodnější pro zvolený experimentální model alergického astmatu.

Porovnávali jsme potkany a morčata a dále jsme srovnávali oba typy potkanů mezi sebou.

Nejprve jsme porovnávali potkany a morčata. Mezi živočišnými druhy existuje řada rozdílů, mimo jiné je to i variabilní citlivost na různé mediátory. Ověřili jsme, že respirační systém potkana vůbec nereaguje na i.v. podání histaminu, naproti tomu morče je vůči němu velmi citlivé. Při pokusech, kde by bylo cílem ověřit vliv na H-receptory, by byla zcela jistě dána přednost morčeti. U pokusů, kde by reagovaly oba druhy, se nám jeví jako výhodnější potkan. Hlavní nevýhodou práce s morčaty byly nekonzistentní výsledky v porovnání s potkany. Ty mohly být způsobeny pozorovanou velmi vysokou a zároveň značně variabilní citlivostí respiračního systému morčat. Respirační systém morčete silně reaguje na alergické podněty, které mohou vyvolat až letální bronchokonstrikci (při challenge alergenem nám dvě morčata uhynula). Citlivost každého zvířete přitom nelze předvídat. Challenge alergenem proto musela být u jednotlivých zvířat prováděna na základě individuální reakce zvířete různě velkými dávkami ovalbuminu. Další nevýhodou práce s morčaty byla obtížnější preparace *v. jugularis externa*, která snadno kontrahovala a práce tak kladla větší nároky na přesnost a jemnost než u potkanů.

Dále jsme srovnávali oba kmeny potkanů – Wistar a Brown Norway. Ukázalo se, že bronchokonstrikce po podání serotoninu u alergických potkanů kmene Brown Norway byla mnohem vyšší než u potkanů Wistar – potkani Brown Norway byli v použitém modelu alergického astmatu vnímavější. Toto zjištění může souviset se skutečností, že potkani Brown Norway mají přirozeně zvýšené množství eozinofilů a výrazněji proto reagují na alergické podněty. Navíc rozptýl získaných hodnot plicní rezistence u potkanů Brown Norway byl mnohem menší a výsledky byly více homogenní. Do budoucna by proto bylo možné v experimentech používat menší množství zvířat, což by bylo přijatelnější i z hlediska etického. Kromě toho při porovnání etologie obou druhů jsme zjistili, že potkani Brown Norway jsou klidnější a lépe se s nimi pracuje než s potkany Wistar.

Při výběru vhodného druhu zvířat je třeba vzít do úvahy i ekonomické hledisko. Výsledky získané z experimentů na potkanech Brown Norway jsou sice nejlepší, ale velkou nevýhodou těchto zvířat je jejich vyšší nákupní cena. Tu by mohla kompenzovat dobrá konzistentnost výsledků a z toho plynoucí použití menšího počtu potkanů, což by v konečném důsledku mohlo snížit celkové náklady. Morčata jsou sice levnější, ale práce s nimi byla spojena s výše uvedenými nevýhodami. Nezastupitelnou úlohu budou

mít však v pokusech, které principiálně není možné provádět na potkanech (např. již zmíněná reakce na histamin). Potkani Wistar jsou ze všech tří druhů zvířat finančně nejméně nároční, ale pro získání věrohodných výsledků je potřeba použít větší skupiny zvířat než při práci s potkany Brown Norway a navíc zvolený model byl navozen hůře než u morčat a potkanů Brown Norway.

2. Volba mediátoru.

Z předchozích pokusů jsme měli vyzkoušeno, že nejvhodnějším mediátorem ve zvoleném modelu astmatu je u potkanů serotonin a proto jsme se soustředili jen na porovnání obou druhů (Wistar a Brown Norway). Serotonin v obou případech vyvolával požadovaný na dávce závislý nárůst plicní rezistence, srovnání obou druhů již bylo uvedeno výše.

Naproti tomu u morčat jsme vyzkoušeli tři mediátory – serotonin, acetylcholin a histamin. Je obecně známo, že morčata jsou velmi citlivý živočišný druh a zvláště jejich dýchací systém je extrémně reaktivní. Proto jsme předpokládali, že budou vhodná pro testovaný model astmatu. První zvolený mediátor – serotonin – však v našem pokusu selhal v mnoha ohledech. Paradoxně u skupiny nesenzibilizovaných zvířat jsme naměřili mnohem vyšší hodnoty plicní rezistence než u zvířat senzibilizovaných. Možným vysvětlením je, že vyvolaná alergická reakce byla příliš bouřlivá, a tím se setřel rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty. Dalším problémem mohlo být menší množství zvířat ve skupině. Získané výsledky byly nehomogenní a bylo by potřeba větší množství zvířat, aby bylo možné vyvodit objektivní závěry. V literatuře jsme nenalezli žádný model popisující podání serotoninu u senzibilizovaných morčat. Domníváme se, že při dalším testování tohoto modelu alergické reakce by bylo vhodnější použít nižší dávky serotoninu.

Druhý u morčat zkoumaný mediátor – acetylcholin – se nám jeví jako nejvýhodnější z testovaných látek. Reakce respiračního systému morčat byla přiměřená, zvyšovala se úměrně s podanou dávkou acetylcholinu a po podání poslední dávky (50 µg/kg) byl rozdíl v hodnotách plicní rezistence mezi kontrolní a senzibilizovanou skupinou signifikantní. Takto vyvolaná bronchokonstrikce je optimální a zvolený model by bylo možné použít např. pro testování bronchoprotektivních látek.

Na třetí mediátor – histamin – morčata reagovala podle předpokladu velmi citlivě a odpověď byla úměrná podané dávce. Překvapivě se nám ale nepodařilo při žádné z dávek prokázat signifikantní rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými

zvířaty. Možné vysvětlení je podobné jako u podání serotoninu – respirační trakt morčat je k histaminu velmi vnímavý a reakce na histamin byla tak bouřlivá, že se ztratil rozdíl mezi kontrolní a senzibilizovanou skupinou. I když podané dávky vycházely z odborné literatury, je možné, že pro tento model by bylo vhodnější zvolit nižší. Rozptyl naměřených hodnot sice nebyl extrémní, ale i zde by bylo možné použít skupiny o větším počtu zvířat.

3. Ověření zvoleného modelu.

Navození zkoumaného modelu jsme u každého druhu ověřovali srovnáním s kontrolní skupinou nealergických zvířat. Téměř ve všech případech byl v naměřených hodnotách plicní rezistence patrný rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty s tím, že alergická zvířata byla na podávanou bronchokonstrikční látku citlivější než zvířata kontrolní. Po podání nejvyšší dávky serotoninu 50 µg/kg potkanům Brown Norway byl prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinou kontrolní a skupinou senzibilizovanou. Obdobně tomu bylo při podání acetylcholinu morčatům – po aplikaci dávky 50 µg/kg byl pozorován signifikantní rozdíl mezi skupinou senzibilizovaných a nesenzibilizovaných zvířat. Tyto dva modely proto považujeme za nejlepší a použitelné do budoucna.

VI. ZÁVĚR

Výběr nejvhodnějšího zvířecího druhu a bronchokonstrikční látky pro realizaci modelu alergického astmatu závisí na řadě faktorů. Pro optimalizaci zkoumaného modelu jsme zjistili:

1. Po zhodnocení všech hledisek (ekonomické hledisko, náročnost práce se zvířaty, etický aspekt, kvalita získaných výsledků) se nám jeví jako nejvhodnější použít senzibilizované potkany kmene Brown Norway a serotonin jako bronchokonstrikční mediátor. V tomto uspořádání pokusu jsme získali homogenní výsledky a po podání dávky serotoninu 50 µg/kg byl prokázán signifikantní rozdíl mezi senzibilizovanými a nesenzibilizovanými zvířaty.
2. Pokud bychom model realizovali na morčatech, bylo by nejvýhodnější zvolit jako látku vyvolávající bronchokonstrikci acetylcholin. S ním získané výsledky jsou homogenní a po podání dávky 50 µg/kg byl v našem pokusu prokázán signifikantní rozdíl mezi skupinou senzibilizovaných a nesenzibilizovaných zvířat.
3. Pro testování vlivu látek na H-receptory, kdy by byl pokus spojený s podáváním histaminu, bylo by lepší použít morčata, která na tento mediátor velmi citlivě reagují. Potkani jsou pro tento typ pokusů nevhodní.
4. Použitý model alergického astmatu byl dobře zvolen – jak u potkanů, tak u morčat vedl k senzibilizaci a po challenge antigenem k odpovídající alergické reakci. Reaktivita dýchacích cest byla u senzibilizovaných zvířat zvýšena oproti kontrole a rozdíl v odpovědi závisel na použité bronchokonstrikční látce (jedinou výjimkou bylo podání serotoninu u morčat). Reakce respiračního systému se ve všech případech zvyšovala s podanou dávkou.

VII. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ČERVENÝ, Č. a kol.: Chov a využití pokusných zvířat, 2. díl. Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech, Brno, 1999, s. 23-24, 31, 43-45, 53
2. ELWOOD, W., BARNES, P. J., CHUNG, K. F.: Airway hyperresponsiveness is associated with inflammatory cell infiltration in allergic Brown-Norway rats. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, 99, s. 91-97
3. FENDRICH, Z. a kol.: Farmakologie pro farmaceuty I. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, 2002, s. 108-121
4. HASLETON, P. S.: *Spencer's Pathology of the Lung*. McGraw – Hill Companies Inc., USA, 1996, s. 698
5. <http://mujweb.cz/www/illova/psycho/krysa.htm> (12. 3. 2006)
6. <http://www.alternativeeducation.org/index.php?action=4&go=07&lang=cz> (12.3.2006)
7. <http://www.causa-subita.cz/clanek.php?akce=view&clanekid=242&r=6&c=1> (22.3.2006)
8. <http://www.cls.cz/dp> (11.1.2006)
9. <http://www.harvardapparatus.com> (22.3.2006)
10. <http://www.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/propedeutika.htm> (12.3.2006)
11. <http://www.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/etika.htm> (12.3.2006)
12. <http://www.lf3.cuni.cz/physio/Physiology/education/materialy/praktika/tracheakan.htm> (12.3.2006)
13. <http://www.tigis.cz/alergie/ALERG199/11Kopriv.htm> (16.3.2006)
14. http://www.zdrava-rodina.cz/med/med498/m498_4.html (11.2.2006)
15. HUETHER, S. E., McCANCE, K. L.: *Understanding Pathophysiology*. Mosby Inc., St. Louis, USA, 2000, s. 753-754, 781
16. KOPŘIVA, F.: Chronický eozinofilní zánět a asthma bronchiale. Maxdorf, Praha, 2003, s. 17, 35-54, 67-119
17. LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. a kol.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén a Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, 2002, s. 331-340
18. METTLER, M.: *Morče, původ – péče – ošetřování*. Art Area s.r.o., Bratislava, 1997, s. 49
19. POPESKO, P., RAJTOVÁ, V., HORÁK, J.: *Atlas anatomie malých laboratorních zvířat*, 1. díl. Příroda, Bratislava, 1990, s. 189-191

20. POPESKO, P., RAJTOVÁ, V., HORÁK, J.: Atlas anatómie malých laboratórných zvierat, 2. díl. Příroda, Bratislava, 1990, s. 50-52
21. SLAVÍKOVÁ, J.: Fyziologie dýchání. Univerzita Karlova v Praze – Nakladatelství Karolinum, Praha, 1997, s. 15-16
22. TROJAN, S.: Fyziologie. Avicenum, Praha, 1988, s. 188-189
23. ŽIVNÁ, H.: Základy práce s potkanem v laboratoři. Solichte, Hradec Králové, 2001, s. 22, 44